PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43*bis*.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.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US2017/020529	02.03.2017	02.03.2016

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. A61K47/68

Applicant
EISAI INC

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

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.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 notifed the International Bureau under Rule 66.1*bis*(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:	Date of completion of this opinion	Authorized Officer
European Patent Office P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Fax: +31 70 340 - 3016	see form PCT/ISA/210	Schleifenbaum, A 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 43*bis*.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:

   a. ☐ forming part of the international application as filed:

      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      ☐ on paper or in the form of an image file.

   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

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 forming part of 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 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	2-123, 125-141, 143-150, 152-156, 158-162, 164-168, 170-174, 177-183
	No:	Claims	1, 124, 142, 151, 157, 163, 169, 175, 176
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	
	No:	Claims	1-183
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-183
	No:	Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Re Item V

1 Reference is made to the following documents:

D1 WO 2014/089335 A2 (AMGEN INC [US]) 12 June 2014 (2014-06-12)

D2 ZHENG W ET AL: "Macrocyclic ketone analogues of halichondrin B"BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, PERGAMON, AMSTERDAM, NLvol. 14, no. 22, 15 November 2004 (2004-11-15), pages 5551-5554, XP004598592ISSN: 0960-894X, DOI: 10.1016/J.BMCL.2004.08.069

D3 SRIDHAR NARAYAN ET AL: "Novel second generation analogs of eribulin. Part II: Orally available and active against resistant tumors in vivo"BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, PERGAMON, AMSTERDAM, NLvol. 21, no. 6, 20 January 2011 (2011-01-20), pages 1634-1638, XP028169543ISSN: 0960-894X, DOI: 10.1016/J.BMCL.2011.01.097

D4 NIKOLAOS DIAMANTIS ET AL: "Antibody-drug conjugates-an emerging class of cancer treatment"BRITISH JOURNAL OF CANCERvol. 114, no. 4, 16 February 2016 (2016-02-16), pages 362-367, XP55371017GB ISSN: 0007-0920, DOI: 10.1038/bjc.2015.435

2 Claims 124-150 and 157-162 relate to a subject-matter considered by this Authority to be covered by the provision of Rule 39.1(iv)/67.1(iv) PCT.

2.1 However, an opinion is given based on the effect of the compounds/ compositions.

2.2 The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as patentable claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for use in a first or further medical treatment.

Article 33(2) PCT - Novelty

3 The subject-matter of claims 1, 124, 142, 151, 157, 163, and 169 is not novel in the sense of Article 33(2) PCT:

3.1 D1 discloses internalizing (D1, Fig 9) BCMA antigen binding antibodies and conjugates thereof; D1 suggests eribulin as suitable drug (D1, claim 53: E7389). D1 discloses pharmaceutical compositions and the use in the treatment of in particular cancers (D1, claims 197-204).

3.2 The subject-matter of claims 2-123, 125-141, 143-150, 152-156, 158-162, 164-168, 170-175 and 177-183 is novel since the prior art does not disclose the antibody-drug ratio, linkers or the claimed antibodies.

4 The subject-matter of claims 175 and 176 is not novel in the sense of Article 33(2) PCT:

4.1 D2 (compounds 38 - 40) and D3 (compounds 17, 29) disclose eribulin compounds with a cleavable linker (amide or ester) and a further moiety (substituted phenyl, benzoyl, ethyl or propyl) at the C-35 amine.

Article 33(3) PCT - Inventive Step

5 The subject-matter of claims 1-183 in so far as novel is not regarded to comply with Article 33(3) PCT:

5.1 The claims define different parts of the conjugate (like the linker, the antibody or the disease to be treated) which provide for a distinguishing feature.

5.2 For none of these features taken alone an unexpected effect was demonstrated. The problem to be solved is therefore the provision of different embodiments of the conjugates suggested in D1. The solutions provided cannot be regarded to be inventive since the different technical features are well known designs of antibody drug conjugates, eg like those well known ADC summarized in D4, and would be chosen by the skilled person according to circumstances (eg according to the target cell or cleavage conditions the appropriate antibody or peptide cleavage sequence would be selected).

Article 33(4) PCT - Industrial Applicability

6 The application meets the requirements of Article 33(4) PCT since its subject-matter can be used in industry.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	**FOR FURTHER ACTION**	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
08061 24-304		
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)*
PCT/US2017/020529	2 March 2017 (02-03-2017)	2 March 2016 (02-03-2016)
Applicant		
EISAI INC		

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

This international search report consists of a total of 5 sheets.

[X] 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:
      [X] 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. [X] 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,**
   [X] the text is approved as submitted by the applicant
   [ ] the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract,**
   [X] 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. [X] none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2017/020529

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [ ] forming part of the international application as filed:

      [ ] in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      [ ] on paper or in the form of an image file.

   b. [ ] furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. [X] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      [X] in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. [ ] 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 forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2017/020529

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K47/68
ADD.

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

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, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014/089335 A2 (AMGEN INC [US]) 12 June 2014 (2014-06-12)	1,124, 142,151, 157,163, 169
Y	claims 53,197-204; figure 9	2-123, 125-141, 143-150, 152-156, 158-162, 164-168, 170-175, 177-183

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] 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	Date of mailing of the international search report
10 May 2017	31/05/2017

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Schleifenbaum, A

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHENG W ET AL: "Macrocyclic ketone analogues of halichondrin B", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, PERGAMON, AMSTERDAM, NL, vol. 14, no. 22, 15 November 2004 (2004-11-15), pages 5551-5554, XP004598592, ISSN: 0960-894X, DOI: 10.1016/J.BMCL.2004.08.069 compounds 38-40	175,176
X	SRIDHAR NARAYAN ET AL: "Novel second generation analogs of eribulin. Part II: Orally available and active against resistant tumors in vivo", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, PERGAMON, AMSTERDAM, NL, vol. 21, no. 6, 20 January 2011 (2011-01-20), pages 1634-1638, XP028169543, ISSN: 0960-894X, DOI: 10.1016/J.BMCL.2011.01.097 [retrieved on 2011-01-25] compounds 17,29	175,176
Y	NIKOLAOS DIAMANTIS ET AL: "Antibody-drug conjugates-an emerging class of cancer treatment", BRITISH JOURNAL OF CANCER, vol. 114, no. 4, 16 February 2016 (2016-02-16), pages 362-367, XP55371017, GB ISSN: 0007-0920, DOI: 10.1038/bjc.2015.435 the whole document	2-123, 125-141, 143-150, 152-156, 158-162, 164-168, 170-175, 177-183

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2017/020529

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014089335 A2	12-06-2014	AR 093867 A1	24-06-2015
		AU 2013355172 A1	11-06-2015
		CA 2894257 A1	12-06-2014
		CL 2015001507 A1	18-12-2015
		CN 105143263 A	09-12-2015
		EA 201591091 A1	29-02-2016
		EP 2928922 A2	14-10-2015
		HK 1212711 A1	17-06-2016
		JP 2016500256 A	12-01-2016
		KR 20150093744 A	18-08-2015
		PE 11462015 A1	21-08-2015
		PH 12015501284 A1	24-08-2015
		SG 11201504248W A	29-06-2015
		TN 2015000247 A1	03-10-2016
		TW 201425336 A	01-07-2014
		US 2015344583 A1	03-12-2015
		UY 35173 A	30-05-2014
		WO 2014089335 A2	12-06-2014

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> EISAI CO., LTD.
EISAI INC.
MORPHOTEK, INC.

<120> ANTICUERPOS CONJUGADOS A FÁRMACOS EN BASE A ERIBULINA Y MÉTODOS DE USO

<130> 08061.0024-00304

<140> PCT/US2017/020529
<141> 2017-03-02

<150> 62/302,562
<151> 2016-03-02

<160> 368

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 449
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 1
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

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

Ala Met Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80

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

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

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

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

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

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 2
Gly Tyr Gly Leu Ser
1 5

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

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 3
Met Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 4
His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 5
<211> 468
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 5
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Gly Tyr Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

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

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
130 135 140

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

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
165 170 175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
180 185 190

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
195 200 205

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
210 215 220

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
225 230 235 240

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
245 250 255

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
275 280 285

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
305 310 315 320

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
355 360 365

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
370 375 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
405 410 415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
450 455 460

Ser Pro Gly Lys
465

<210> 6
<211> 217
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 6
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

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

Tyr Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
115 120 125

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

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
145 150 155 160

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
180 185 190

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 7
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 7
Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn Asn Leu His
1 5 10

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 8
Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 9
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 9
Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Tyr Met Tyr Thr
1 5 10

<210> 10
<211> 236
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 10
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
20 25 30

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Ile
35 40 45

Ser Ser Asn Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
50 55 60

Lys Pro Trp Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser
100 105 110

Ser Tyr Pro Tyr Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
115 120 125

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 11
<211> 1407
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 11
atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccactccgag 60

gtccaactgg tggagagcgg tggaggtgtt gtgcaacctg gccggtccct gcgcctgtcc 120

tgctccgcat ctggcttcac cttcagcggc tatgggttgt cttgggtgag acaggcacct 180

ggaaaaggtc ttgagtgggt tgcaatgatt agtagtggtg gtagttatac ctactatgca 240

gacagtgtga agggtagatt tgcaatatcg cgagacaacg ccaagaacac attgttcctg 300

caaatggaca gcctgagacc cgaagacacc ggggtctatt tttgtgcaag acatggggac 360

gatcccgcct ggttcgctta ttggggccaa gggaccccgg tcaccgtctc ctcagcctcc 420

accaagggcc catcggtctt ccccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 480

gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 540

tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 600

tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 660

tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagttga gcccaaatct 720

tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 780

gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 840

acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 900

gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 960

taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 1020

aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1080

aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc 1140

aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1200

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1260

tccgacggct ccttcttctt atattcaaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1320

gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1380

agcctctccc tgtctcccgg gaaatga 1407

<210> 12
<211> 711
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 12
atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccactccgac 60

atccagctga cccagagccc aagcagcctg agcgccagcg tgggtgacag agtgaccatc 120

acctgtagtg tcagctcaag tataagttcc aacaacttgc actggtacca gcagaagcca 180

ggtaaggctc caaagccatg gatctacggc acatccaacc tggcttctgg tgtgccaagc 240

agattcagcg gtagcggtag cggtaccgac tacaccttca ccatcagcag cctccagcca 300

gaggacatcg ccacctacta ctgccaacag tggagtagtt acccgtacat gtacacgttc 360

ggccaaggga ccaaggtgga aatcaaacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc 420

ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 480

ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac 540

tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 600

ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 660

cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgtta a 711

<210> 13
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 13
Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Gly
1 5

<210> 14
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 14
Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr
1 5

<210> 15
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 15
Ala Arg His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 16
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 16

Ser Ser Ile Ser Ser Asn Asn
1 5

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

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 17
Gly Thr Ser
1

<210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 18
Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Tyr Met Tyr Thr
1 5 10

<210> 19
<211> 257
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19
Met Ala Gln Arg Met Thr Thr Gln Leu Leu Leu Leu Leu Val Trp Val
1 5 10 15

Ala Val Val Gly Glu Ala Gln Thr Arg Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu
20 25 30

Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly
35 40 45

Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln Cys Arg Pro Trp Arg Lys Asn Ala
50 55 60

Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr
65 70 75 80

Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys
85 90 95

Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn
100 105 110

Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val Asp Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg
115 120 125

Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Glu Gln Trp Trp Glu
130 135 140

Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp
145 150 155 160

Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys Cys Ala Val Gly Ala Ala Cys Gln
165 170 175

Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile
180 185 190

Trp Thr His Ser Tyr Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg
195 200 205

Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu
210 215 220

Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala Met Ser Gly Ala Gly Pro Trp Ala
225 230 235 240

Ala Trp Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ala Leu Met Leu Leu Trp Leu Leu
245 250 255

Ser

<210> 20
<211> 982
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 20
cattccttgg tgccactgac cacagctctt tcttcaggga cagacatggc tcagcggatg 60

acaacacagc tgctgctcct tctagtgtgg gtggctgtag taggggaggc tcagacaagg 120

attgcatggg ccaggactga gcttctcaat gtctgcatga acgccaagca ccacaaggaa 180

aagccaggcc ccgaggacaa gttgcatgag cagtgtcgac cctggaggaa gaatgcctgc 240

tgttctacca acaccagcca ggaagcccat aaggatgttt cctacctata tagattcaac 300

tggaaccact gtggagagat ggcacctgcc tgcaaacggc atttcatcca ggacacctgc 360

ctctacgagt gctcccccaa cttggggccc tggatccagc aggtggatca gagctggcgc 420

aaagagcggg tactgaacgt gcccctgtgc aaagaggact gtgagcaatg gtgggaagat 480

tgtcgcacct cctacacctg caagagcaac tggcacaagg gctggaactg gacttcaggg 540

tttaacaagt gcgcagtggg agctgcctgc caacctttcc atttctactt ccccacaccc 600

actgttctgt gcaatgaaat ctggactcac tcctacaagg tcagcaacta cagccgaggg 660

agtggccgct gcatccagat gtggttcgac ccagcccagg gcaaccccaa tgaggaggtg 720

gcgaggttct atgctgcagc catgagtggg gctgggccct gggcagcctg gcctttcctg 780

cttagcctgg ccctaatgct gctgtggctg ctcagctgac ctccttttac cttctgatac 840

ctggaaatcc ctgccctgtt cagccccaca gctcccaact atttggttcc tgctccatgg 900

tcgggcctct gacagccact ttgaataaac cagacaccgc acatgtgtct tgagaattat 960

ttggaaaaaa aaaaaaaaaa aa 982

<210> 21
<211> 1255
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21
Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu
1 5 10 15

Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys
20 25 30

Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His
35 40 45

Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr
50 55 60

Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val
65 70 75 80

Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu
85 90 95

Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr
100 105 110

Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro
115 120 125

Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser
130 135 140

Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln
145 150 155 160

Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn
165 170 175

Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys
180 185 190

His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser

195 200 205

Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys
210 215 220

Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys
225 230 235 240

Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu
245 250 255

His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val
260 265 270

Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg
275 280 285

Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu
290 295 300

Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln
305 310 315 320

Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys
325 330 335

Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu
340 345 350

Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys
355 360 365

Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp
370 375 380

Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe
385 390 395 400

Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro
405 410 415

Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg
420 425 430

Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu
435 440 445

Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly
450 455 460

Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val
465 470 475 480

Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr
485 490 495

Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His
500 505 510

Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys
515 520 525

Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys
530 535 540

Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys
545 550 555 560

Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys
565 570 575

Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp
580 585 590

Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu
595 600 605

Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln
610 615 620

Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys
625 630 635 640

Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser
645 650 655

Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly
660 665 670

Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg
675 680 685

Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly
690 695 700

Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu
705 710 715 720

Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys
725 730 735

Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile
740 745 750

Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu
755 760 765

Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg
770 775 780

Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu
785 790 795 800

Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg
805 810 815

Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly
820 825 830

Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala
835 840 845

Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe
850 855 860

Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp
865 870 875 880

Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg
885 890 895

Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val
900 905 910

Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala
915 920 925

Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro
930 935 940

Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met
945 950 955 960

Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe
965 970 975

Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu
980 985 990

Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu
995 1000 1005

Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr

1010 1015 1020

Leu Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly
1025 1030 1035

Ala Gly Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg
1040 1045 1050

Ser Gly Gly Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu
1055 1060 1065

Glu Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser
1070 1075 1080

Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu
1085 1090 1095

Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser
1100 1105 1110

Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr Val
1115 1120 1125

Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro
1130 1135 1140

Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro Arg Glu Gly Pro Leu Pro
1145 1150 1155

Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu Arg Pro Lys Thr Leu
1160 1165 1170

Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val Phe Ala Phe Gly
1175 1180 1185

Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln Gly Gly Ala
1190 1195 1200

Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala Phe Asp
1205 1210 1215

Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala Pro
1220 1225 1230

Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr
1235 1240 1245

Leu Gly Leu Asp Val Pro Val
1250 1255

<210> 22
<211> 3768
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 22
atggagctgg cggccttgtg ccgctggggg ctcctcctcg ccctcttgcc ccccggagcc 60

gcgagcaccc aagtgtgcac cggcacagac atgaagctgc ggctccctgc cagtcccgag 120

acccacctgg acatgctccg ccacctctac cagggctgcc aggtggtgca gggaaacctg 180

gaactcacct acctgcccac caatgccagc ctgtccttcc tgcaggatat ccaggaggtg 240

cagggctacg tgctcatcgc tcacaaccaa gtgaggcagg tcccactgca gaggctgcgg 300

attgtgcgag gcacccagct ctttgaggac aactatgccc tggccgtgct agacaatgga 360

gacccgctga acaataccac ccctgtcaca ggggcctccc caggaggcct gcgggagctg 420

cagcttcgaa gcctcacaga gatcttgaaa ggaggggtct tgatccagcg gaacccccag 480

ctctgctacc aggacacgat tttgtggaag gacatcttcc acaagaacaa ccagctggct 540

ctcacactga tagacaccaa ccgctctcgg gcctgccacc cctgttctcc gatgtgtaag 600

ggctcccgct gctggggaga gagttctgag gattgtcaga gcctgacgcg cactgtctgt 660

gccggtggct gtgcccgctg caaggggcca ctgcccactg actgctgcca tgagcagtgt 720

gctgccggct gcacgggccc caagcactct gactgcctgg cctgcctcca cttcaaccac 780

agtggcatct gtgagctgca ctgcccagcc ctggtcacct acaacacaga cacgtttgag 840

tccatgccca atcccgaggg ccggtataca ttcggcgcca gctgtgtgac tgcctgtccc 900

tacaactacc tttctacgga cgtgggatcc tgcaccctcg tctgcccct gcacaaccaa 960

gaggtgacag cagaggatgg aacacagcgg tgtgagaagt gcagcaagcc ctgtgcccga 1020

gtgtgctatg gtctgggcat ggagcacttg cgagaggtga gggcagttac cagtgccaat 1080

atccaggagt ttgctggctg caagaagatc tttgggagcc tggcatttct gccggagagc 1140

tttgatgggg acccagcctc caacactgcc ccgctccagc cagagcagct ccaagtgttt 1200

gagactctgg aagagatcac aggttaccta tacatctcag catggccgga cagcctgcct 1260

gacctcagcg tcttccagaa cctgcaagta atccggggac gaattctgca caatggcgcc 1320

tactcgctga ccctgcaagg gctgggcatc agctggctgg ggctgcgctc actgagggaa 1380

ctgggcagtg gactggccct catccaccat aacacccacc tctgcttcgt gcacacggtg 1440

ccctgggacc agctctttcg gaacccgcac caagctctgc tccacactgc caaccggcca 1500

gaggacgagt gtgtgggcga gggcctggcc tgccaccagc tgtgcgcccg agggcactgc 1560

tggggtccag ggcccaccca gtgtgtcaac tgcagccagt tccttcgggg ccaggagtgc 1620

gtggaggaat gccgagtact gcaggggctc cccagggagt atgtgaatgc caggcactgt 1680

ttgccgtgcc accctgagtg tcagccccag aatggctcag tgacctgttt tggaccggag 1740

gctgaccagt gtgtggcctg tgcccactat aaggaccctc ccttctgcgt ggcccgctgc 1800

cccagcggtg tgaaacctga cctctcctac atgcccatct ggaagtttcc agatgaggag 1860

ggcgcatgcc agccttgccc catcaactgc acccactcct gtgtggacct ggatgacaag 1920

ggctgccccg ccgagcagag agccagccct ctgacgtcca tcatctctgc ggtggttggc 1980

attctgctgg tcgtggtctt gggggtggtc tttgggatcc tcatcaagcg acggcagcag 2040

aagatccgga agtacacgat gcggagactg ctgcaggaaa cggagctggt ggagccgctg 2100

acacctagcg gagcgatgcc caaccaggcg cagatgcgga tcctgaaaga gacggagctg 2160

aggaaggtga aggtgcttgg atctggcgct tttggcacag tctacaaggg catctggatc 2220

cctgatgggg agaatgtgaa aattccagtg gccatcaaag tgttgaggga aaacacatcc 2280

cccaaagcca acaaagaaat cttagacgaa gcatacgtga tggctggtgt gggctcccca 2340

tatgtctccc gccttctggg catctgcctg acatccacgg tgcagctggt gacacagctt 2400

atgccctatg gctgcctctt agaccatgtc cgggaaaacc gcggacgcct gggctcccag 2460

gacctgctga actggtgtat gcagattgcc aaggggatga gctacctgga ggatgtgcgg 2520

ctcgtacaca gggacttggc cgctcggaac gtgctggtca agagtcccaa ccatgtcaaa 2580

attacagact tcgggctggc tcggctgctg gacattgacg agacagagta ccatgcagat 2640

gggggcaagg tgcccatcaa gtggatggcg ctggagtcca ttctccgccg gcggttcacc 2700

caccagagtg atgtgtggag ttatggtgtg actgtgtggg agctgatgac ttttggggcc 2760

aaaccttacg atgggatccc agcccgggag atccctgacc tgctggaaaa gggggagcgg 2820

ctgccccagc cccccatctg caccattgat gtctacatga tcatggtcaa atgttggatg 2880

attgactctg aatgtcggcc aagattccgg gagttggtgt ctgaattctc ccgcatggcc 2940

agggaccccc agcgctttgt ggtcatccag aatgaggact tgggcccagc cagtcccttg 3000

gacagcacct tctaccgctc actgctggag gacgatgaca tgggggacct ggtggatgct 3060

gaggagtatc tggtacccca gcagggcttc ttctgtccag accctgcccc gggcgctggg 3120

ggcatggtcc accacaggca ccgcagctca tctaccagga gtggcggtgg ggacctgaca 3180

ctagggctgg agccctctga agaggaggcc cccaggtctc cactggcacc ctccgaaggg 3240

gctggctccg atgtatttga tggtgacctg ggaatggggg cagccaaggg gctgcaaagc 3300

ctccccacac atgaccccag ccctctacag cggtacagtg aggaccccac agtacccctg 3360

ccctctgaga ctgatggcta cgttgccccc ctgacctgca gcccccagcc tgaatatgtg 3420

aaccagccag atgttcggcc ccagcccccc tcgccccgag agggccctct gcctgctgcc 3480

cgacctgctg gtgccactct ggaaaggccc aagactctct ccccagggaa gaatggggtc 3540

gtcaaagacg tttttgcctt tgggggtgcc gtggagaacc ccgagtactt gacaccccag 3600

ggaggagctg cccctcagcc ccaccctcct cctgccttca gcccagcctt cgacaacctc 3660

tattactggg accaggaccc accagagcgg ggggctccac ccagcacctt caaagggaca 3720

cctacggcag agaacccaga gtacctgggt ctggacgtgc cagtgtga 3768

<210> 23
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 23
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

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

Ala Met Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80

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

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

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 24
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 24
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

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

Tyr Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 25
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 25
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Leu Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Ala Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

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

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

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 26
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 26
Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

Asp Asp Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Lys His Pro Leu Thr

85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 27
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 27
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 28

<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 28
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 29
<211> 123
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 29
Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Ser Leu Ser Ser Asp Ala
20 25 30

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

Ile Ile Asn Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr
65 70 75 80

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

Gln His Gly Gly Gly Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Leu
100 105 110

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

<210> 30
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 30
Glu Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
1 5 10 15

Asp Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Val
20 25 30

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

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

Ser Arg Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
65 70 75 80

Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Thr Asn Tyr Gly Thr Ser Ser
85 90 95

Ser Asn Tyr Gly Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 31
<211> 126
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 31
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Ser Leu Ser Ser Asp
20 25 30

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

Gly Ile Ile Asn Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg His Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Arg Gly Ile Gln His Gly Gly Gly Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
100 105 110

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

<210> 32
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 32
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Val
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Cys
65 70 75 80

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

Ser Asn Tyr Gly Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 33
<211> 118

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 33
Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

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

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

Ser Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ala Phe Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Met Thr
65 70 75 80

Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Gly Arg Asn Gly
85 90 95

Gly Gly Ser Tyr Ile Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 34
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 34
Ala Phe Glu Leu Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Glu Ala Ala Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Ile Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
65 70 75 80

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

Ser Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105

<210> 35
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 35
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asn Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Ser Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ala Phe Tyr Ala Asn Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Arg Asn Gly Gly Gly Ser Tyr Ile Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 36
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 36
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Cys
65 70 75 80

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

Ser Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 37
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 37
Gln Ser Val Lys Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

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

Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly
35 40 45

Thr Ile Asn Ile Gly Gly Arg Val Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ala Pro
65 70 75 80

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

Asn Gly Gly Ser Tyr Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Leu

<210> 38
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 38
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Ala Ser Glu Pro Val Gly
1 5 10 15

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

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

Tyr Gly Ile Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 39
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 39

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Thr Ile Asn Ile Gly Gly Arg Val Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 40
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 40
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Arg Val
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Cys
65 70 75 80

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

Tyr Gly Ile Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 41
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 41
Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Lys Pro Asp Glu Ser
1 5 10 15

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

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

Thr Ile Ser Thr Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr
65 70 75 80

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Ala Tyr Tyr Leu Pro Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp
100 105 110

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

<210> 42
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 42
Ala Ala Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn
20 25 30

Asn Asn Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val
65 70 75 80

Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Cys Asp Asp
85 90 95

Asp Ala Asp Thr Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 43
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
sintético"

<400> 43
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Thr Ile Ser Thr Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Arg Gly Gly Tyr Ala Ala Ser Ser Ala Tyr Tyr Leu Pro Tyr Tyr Phe
100 105 110

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

<210> 44
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido

sintético"

<400> 44
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn
20 25 30

Asn Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

Gln Cys Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Cys Asp Asp
85 90 95

Asp Ala Asp Thr Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 45
<211> 357
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido
sintético"

<400> 45
gaggtccaac tggtggagag cggtggaggt gttgtgcaac ctggccggtc cctgcgcctg 60

tcctgctccg catctggctt caccttcagc ggctatgggt tgtcttgggt gagacaggca 120

cctggaaaag gtcttgagtg ggttgcaatg attagtagtg gtggtagtta tacctactat 180

gcagacagtg tgaagggtag atttgcaata tcgcgagaca acgccaagaa cacattgttc 240

ctgcaaatgg acagcctgag acccgaagac accggggtct atttttgtgc aagacatggg 300

gacgatcccg cctggttcgc ttattggggc caagggaccc cggtcaccgt ctcctca 357

<210> 46
<211> 330
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 46
gacatccagc tgacccagag cccaagcagc ctgagcgcca gcgtgggtga cagagtgacc 60

atcacctgta gtgtcagctc aagtataagt tccaacaact tgcactggta ccagcagaag 120

ccaggtaagg ctccaaagcc atggatctac ggcacatcca acctggcttc tggtgtgcca 180

agcagattca gcggtagcgg tagcggtacc gactacacct tcaccatcag cagcctccag 240

ccagaggaca tcgccaccta ctactgccaa cagtggagta gttacccgta catgtacacg 300

ttcggccaag ggaccaaggt ggaaatcaaa 330

<210> 47
<211> 357
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 47
caggtacaac tgcagcagtc tgggcctgag ctggagaagc ctggcgcttc agtgaagata 60

tcctgcaagg cttctggtta ctcattcact ggctacacca tgaactgggt gaagcagagc 120

catggaaaga gccttgagtg gattggactt attactcctt acaatggtgc ttctagctac 180

aaccagaagt tcaggggcaa ggccacatta actgtagaca agtcatccag cacagcctac 240

atggacctcc tcagtctgac atctgaagac tctgcagtct atttctgtgc aaggggggt 300

tacgacggga ggggttttga ctactgggga tccgggaccc cggtcaccgt ctcctca 357

<210> 48
<211> 318
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 48
gacatcgagc tcactcagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60

atgacctgca gtgccagctc aagtgtaagt tacatgcact ggtaccagca gaagtcaggc 120

acctccccca aaagatggat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt cccaggtcgc 180

ttcagtggca gtgggtctgg aaactcttac tctctcacaa tcagcagcgt ggaggctgaa 240

gatgatgcaa cttattactg ccagcagtgg agtaagcacc ctctcacgtt cggatccggg 300

accaaggtgg aaatcaaa 318

<210> 49
<211> 369
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 49
cagtcggtgg aggagtccgg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacacccct gacactcacc 60

tgcaccgtct ctggaatctc cctcagtagc gatgcaataa gctgggtccg ccaggctcca 120

gggaaggggc tcgaatacat cggaatcatt aatggtggtg gtaacacata ctacgcgagc 180

tgggcgaaag gccgattcac catctccaaa acctcgacca cggtggatct gaaaatcacc 240

agtccgacaa ccgaggacac ggccacctat ttctgtgcca gaggcattca acatggtggt 300

ggtaatagtg attattatta ttacggcatg gacctctggg gcccaggcac cctggtcact 360

gtctcttca 369

<210> 50
<211> 336
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 50
gaagtgttga tgacccagac tccatcctcc gtgtctgcag ctgtgggaga cacagtcacc 60

atcaagtgcc aggccagtca gagcattagt agtgtcttgt cctggtatca gcagaaacca 120

gggcagcctc ccaagctcct gatctatctg gcatccactc tggcatctgg ggtcccatcg 180

cggttcagcg gcagtagatc tgggacagag ttcactctca ccatcagcga cctggagtgt 240

gacgatgctg ccacttacta ctgtcaaacc aattatggta ctagtagtag taattatggt 300

tttgctttcg gcggagggac cgaggtggtc gtcaaa 336

<210> 51
<211> 378
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 51
gaagtccaac tggtggaaag cgggggagga ctggtgcagc cgggcggatc cctccggctg 60

tcatgtgctg catcgggaat ttccctctcc tccgacgcga ttagctgggt cagacaggcc 120

cccggaaagg ggctggagta catcggtatc atcaacggcg gcggaaacac ctactacgcc 180

tcctgggcca agggccgctt caccatctcg cggcataatt ccaagaacac tctgtacttg 240

caaatgaact ccctgagggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcgcg cggcatccag 300

cacggtggtg gaaacagcga ctactactac tatgggatgg atctgtgggg ccagggaact 360

cttgtgaccg tgtcgtca 378

<210> 52

<211> 336
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 52
gacattcaga tgacccagtc cccaagctcg ctgtccgcct ccgtgggcga ccgcgtgacc 60

atcacgtgcc aggcgtccca gtcaattagc agcgtgctct cctggtacca acagaagccg 120

gggaaagcac ccaagctgct gatctacttg gcctccactc tggcctcggg agtgccttca 180

cggttctccg gatcgggatc tggtactgat ttcaccctca ccatctcgag ccttcagtgc 240

gaggacatcg ctacttacta ttgtcaaacc aactacggaa cctccagctc caactacggc 300

tttgccttcg gtggcgggac caaggtcgaa atcaaa 336

<210> 53
<211> 354
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 53
cagtcggtgg aggagtccgg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacacccct gacactcacc 60

tgcacagtct ctggattctc cctcaataac tatgcaatga gctgggtccg ccaggctcca 120

gggaaggggc tggaatggat cggatccatt agtactggtg gtctcgcatt ctacgcgaac 180

tgggcaaaag gccgattcac catctccaga acctcgacca cggtggatct gaaaatgacc 240

agtctgacaa ccgaggacac ggccacctat ttctgtggca gaaatggtgg tggtagttat 300

attttctatt attttgactt gtggggccaa ggcaccctcg tcactgtctc ttca 354

<210> 54
<211> 324
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido
sintético"

<400> 54
gcattcgaat tgacccagac tccatcctcc gtggaggcag ctgtgggagg cacaatcacc 60

atcaagtgcc aggccagtca gagcattagt agttacttat cctggtatca gcagaaacca 120

gggcagcctc ccaagctcct gatctattct gcatccactc tggcatctgg ggtctcatcg 180

cggttcaaag gcagtggatc tgggacagag tacactctca ccatcagcga cctggagtgt 240

gccgatgctg ccacttactt ctgtcaaagc tattatgata ttggtactag tactttcggc 300

ggagggaccg aggtggtcgt caaa 324

<210> 55
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido
sintético"

<400> 55
gaagtgcagc tggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

tcttgtgccg cctccggctt ctccctgaac aactacgcca tgtcctgggt gcgacaggcc 120

cctggcaaag gcctggaatg gatcggctcc atcagcacag gcggcctggc cttctacgcc 180

aattgggcca agggccggtt caccatcagc cgggacaact ccaagaacac cctgtacctc 240

cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgtgccag aaacggcgga 300

ggctcctaca tcttctacta cttcgacctg tggggccagg gcaccctcgt gacagtgtca 360

tct 363

<210> 56
<211> 324
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 56
gatattcaga tgacccagtc cccctccagc ctgtccgctt ctgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgtc aggcctccca gtccatctcc tcctacctgt cctggtatca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctactct gcctccacac tggcctccgg cgtgccctct 180

agattctccg gctctggctc tggcaccgac tttaccctga ccatcagctc cctccagtgc 240

gaggatgccg ccacctacta ctgccagtcc tactacgaca tcggcacctc caccttcggc 300

ggaggcacca aggtggaaat caaa 324

<210> 57
<211> 342
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 57
cagtcagtga aggagtccgg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacacccct gacactcacc 60

tgcacagtct ctggaatcga cctcagtagc tatgcaatgg gctggttccg ccaggctcca 120

gggaaggggc tggaatacat cggaaccatt aatattggtg gtcgcgtata ttacgcgagc 180

tgggcaaaag gccgattcac catctccaga acctcgacca cggtggatct gaaagcgccc 240

agtctgacag ccgaggacac ggccacctat ttctgtgcca gatattataa tggtggtagt 300

tatgacatct ggggcccagg caccctggtc accgtctctt ta 342

<210> 58
<211> 330
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido

sintético"

<400> 58
gatgttgtga tgacccagac tccagcctcc gcgtctgaac ctgtgggagg cacagtcacc 60

atcaagtgcc aggccagtga gagcatttat cgcgtattgg cctggtatca gcagaaacca 120

gggcagcctc ccaagctcct gatctatgat acatccactc tggcatctgg ggccccatcg 180

cggttcaaag gcagtggata tgggacagag ttcactctca ccatcagcgg cgtgcagtgt 240

gaagatgctg ccacttacta ctgtcaaggc ggttattatg ctgatagtta tggtattgct 300

ttcggcggag ggaccgaggt ggtggtcaaa 330

<210> 59
<211> 351
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido
sintético"

<400> 59
caggtgcagc tggtggaatc tggcggagga ctggtgcagc ctggcggctc tctgagactg 60

tcctgttccg cctccggaat cgacctgtcc tcctacgcta tgggctgggt gcgacaggct 120

cctggcaagg gcctggagta catcggcacc atcaacatcg gcggcagagt gtactacgcc 180

tcctgggcca agggccggtt caccatctcc agagacaact ccaagaacac cctgtacctc 240

cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccg gtactacaac 300

ggcggctcct acgatatctg gggccagggc acactcgtga ccgtgtcctc t 351

<210> 60
<211> 330
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido
sintético"

<400> 60

gatatccaga tgacccagtc cccctccacc ctgtctgcct ctgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgtc aggcctccga gtccatctac cgggtgctgg cctggtatca gcagaagcct 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac accagcacac tggcctccgg cgtgccctct 180

agattctccg gctctggctc tggcaccgag tttaccctga ccatctccag cctccagtgc 240

gacgacgccg ccacctacta ttgtcagggc ggctactacg ccgactccta cggaatcgct 300

ttcggcggag gcaccaaggt ggaaatcaaa 330

<210> 61
<211> 366
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 61
cagtcggtgg aggagtccgg cggtcgcctg gtaaagcctg acgaatccct gacactcacc 60

tgcacagcct ctggattctc cctcagtagt tatgcaatga tctgggtccg ccaggctcca 120

ggggaggggc tggaatggat cggaaccatt agtactggtg gtatcacata ctacgcgagc 180

tgggcgaaag gccgattcac catctccaaa acctcgacca cggtggatct gaaaatcacc 240

agtccgacaa ccgaggacac ggccacctat ttctgtgcca gaggggggata tgctgctagt 300

agtgcttatt atctcccgta ctactttgac ttgtggggcc aagggaccct ggtcaccgtc 360

tcctca 366

<210> 62
<211> 336
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 62
gcagccgtgc tgacccagac accatcaccc gtgtctgcag ctgtgggagg cacagtcacc 60

atcagttgcc agtccagtca gagtgtttat aataataaca acttagcctg gtttcagcag 120

aaacccgggc agcctcccaa gcttctgatc tatctggcat ccactctggc atctggggtc 180

ccatcacggt tcagcggcag tggatctggg acacagttca ctctcaccat cagcggcgtg 240

cagtgtgacg atgctgccac ttattactgt ctaggtggtt gtgatgatga tgctgatact 300

tttgctttcg gcggagggac tgaggtggtg gtcaaa 336

<210> 63
<211> 375
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 63
gaagtgcagc tggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

tcttgtgccg cctccggctt ctccctgtcc tcctacgcta tgatctgggt gcgacaggcc 120

cctggcaagg gcctggaatg gatcggcacc atctctaccg gcggaattac ctactacgcc 180

tcctgggcca agggccggtt caccatctcc agagacaact ccaagaacac cctgtacctc 240

cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact attgtgctag aggcggctac 300

gccgccagct ccgcttacta cctgccctac tacttcgacc tgtggggcca gggcaccctc 360

gtgacagtgt catct 375

<210> 64
<211> 336
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 64
gatattcaga tgacccagtc cccctccagc ctgtccgctt ctgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgtc agtcctccca gtccgtgtat aacaacaaca acctggcctg gtatcagcag 120

aaacccggca aggtgcccaa gctgctgatc tacctggcct ccacactggc ctctggcgtg 180

ccctctagat tctccggctc tggctctggc accgacttta ccctgaccat cagctccctc 240

cagtgcgagg atgccgccac ctactattgc ctgggcggct gcgacgacga cgccgatacc 300

tttgcttttg gcggaggcac caaggtggaa atcaaa 336

<210> 65
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 65
Gly Tyr Thr Met Asn
1 5

<210> 66
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 66
Leu Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Ala Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Arg
1 5 10 15

Gly

<210> 67
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 67
Gly Gly Tyr Asp Gly Arg Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 68
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 68
Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
1 5 10

<210> 69
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 69
Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 70
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 70
Gln Gln Trp Ser Lys His Pro Leu Thr

1 5

<210> 71
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 71
Asp Thr Tyr Ile His
1 5

<210> 72
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 72
Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 73
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 73
Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 74
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 74
Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 75
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 75
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 76
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 76
Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 77
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 77
Ser Asp Ala Ile Ser
1 5

<210> 78
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 78
Ile Ile Asn Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 79
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 79
Gly Ile Gln His Gly Gly Gly Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
1 5 10 15

Asp Leu

<210> 80
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 80
Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Val Leu Ser
1 5 10

<210> 81
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 81
Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 82
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 82
Gln Thr Asn Tyr Gly Thr Ser Ser Ser Asn Tyr Gly Phe Ala
1 5 10

<210> 83
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 83
Ser Asp Ala Ile Ser
1 5

<210> 84
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 84
Ile Ile Asn Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 85
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 85
Gly Ile Gln His Gly Gly Gly Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
1 5 10 15

Asp Leu

<210> 86
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 86
Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Val Leu Ser
1 5 10

<210> 87
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 87
Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 88
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 88
Gln Thr Asn Tyr Gly Thr Ser Ser Ser Asn Tyr Gly Phe Ala
1 5 10

<210> 89
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 89
Asn Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 90
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 90
Ser Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ala Phe Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 91
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 91
Asn Gly Gly Gly Ser Tyr Ile Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 92
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 92
Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ser
1 5 10

<210> 93
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 93
Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser

1 5

<210> 94
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 94
Gln Ser Tyr Tyr Asp Ile Gly Thr Ser Thr
1 5 10

<210> 95
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 95
Asn Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 96
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 96
Ser Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ala Phe Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 97
<211> 13
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 97
Asn Gly Gly Gly Ser Tyr Ile Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 98
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 98
Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ser
1 5 10

<210> 99
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 99
Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 100
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 100
Gln Ser Tyr Tyr Asp Ile Gly Thr Ser Thr
1 5 10

<210> 101
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 101
Ser Tyr Ala Met Gly
1 5

<210> 102
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 102
Thr Ile Asn Ile Gly Gly Arg Val Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 103
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 103
Tyr Tyr Asn Gly Gly Ser Tyr Asp Ile
1 5

<210> 104
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 104
Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Arg Val Leu Ala
1 5 10

<210> 105
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 105
Asp Thr Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 106
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 106
Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala Asp Ser Tyr Gly Ile Ala
1 5 10

<210> 107
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 107
Ser Tyr Ala Met Gly
1 5

<210> 108
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 108
Thr Ile Asn Ile Gly Gly Arg Val Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 109
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 109
Tyr Tyr Asn Gly Gly Ser Tyr Asp Ile
1 5

<210> 110
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 110
Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Arg Val Leu Ala

1 5 10

<210> 111
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 111
Asp Thr Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 112
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 112
Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala Asp Ser Tyr Gly Ile Ala
1 5 10

<210> 113
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 113
Ser Tyr Ala Met Ile
1 5

<210> 114
<211> 16
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 114
Thr Ile Ser Thr Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 115
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 115
Gly Gly Tyr Ala Ala Ser Ser Ala Tyr Tyr Leu Pro Tyr Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Leu

<210> 116
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 116
Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 117
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 117
Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 118
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 118
Leu Gly Gly Cys Asp Asp Asp Ala Asp Thr Phe Ala
1 5 10

<210> 119
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 119
Ser Tyr Ala Met Ile
1 5

<210> 120
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 120

Thr Ile Ser Thr Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 121
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 121
Gly Gly Tyr Ala Ala Ser Ser Ala Tyr Tyr Leu Pro Tyr Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Leu

<210> 122
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 122
Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 123
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 123
Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 124
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 124
Leu Gly Gly Cys Asp Asp Asp Ala Asp Thr Phe Ala
1 5 10

<210> 125
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido
sintético"

<400> 125
ggctatgggt tgtct 15

<210> 126
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido
sintético"

<400> 126
atgattagta gtggtggtag ttatacctac tatgcagaca gtgtgaaggg t 51

<210> 127
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 127
catggggacg atcccgcctg gttcgcttat 30

<210> 128
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 128
agtgtcagct caagtataag ttccaacaac ttgcac 36

<210> 129
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 129
ggcacatcca acctggcttc t 21

<210> 130
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 130
caacagtgga gtagttaccc gtacatgtac acg 33

<210> 131

<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 131
ggctacacca tgaac 15

<210> 132
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 132
cttattactc cttacaatgg tgcttctagc tacaaccaga agttcagggg c 51

<210> 133
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 133
gggggttacg acgggagggg ttttgactac 30

<210> 134
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 134
agtgccagct caagtgtaag ttacatgcac 30

<210> 135
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 135
gacacatcca aactggcttc t 21

<210> 136
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 136
cagcagtgga gtaagcaccc tctcacg 27

<210> 137
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 137
agcgatgcaa taagc 15

<210> 138
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 138
atcattaatg gtggtggtaa cacatactac gcgagctggg cgaaaggc 48

<210> 139
<211> 54
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 139
ggcattcaac atggtggtgg taatagtgat tattattatt acggcatgga cctc 54

<210> 140
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 140
caggccagtc agagcattag tagtgtcttg tcc 33

<210> 141
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 141
ctggcatcca ctctggcatc t 21

<210> 142
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 142
caaaccaatt atggtactag tagtagtaat tatggttttg ct 42

<210> 143
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 143
tccgacgcga ttagc 15

<210> 144
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 144
atcatcaacg gcggcggaaa cacctactac gcctcctggg ccaagggc 48

<210> 145
<211> 54
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 145
ggcatccagc acggtggtgg aaacagcgac tactactact atgggatgga tctg 54

<210> 146
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 146
caggcgtccc agtcaattag cagcgtgctc tcc 33

<210> 147
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 147
ttggcctcca ctctggcctc g 21

<210> 148
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 148
caaaccaact acggaacctc agctccaac tacggctttg cc 42

<210> 149
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 149
aactatgcaa tgagc 15

<210> 150
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 150
tccattagta ctggtggtct cgcattctac gcgaactggg caaaaggc 48

<210> 151
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 151
aatggtggtg gtagttatat tttctattat tttgacttg 39

<210> 152
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 152
caggccagtc agagcattag tagttactta tcc 33

<210> 153
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 153
tctgcatcca ctctggcatc t 21

<210> 154
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 154
caaagctatt atgatattgg tactagtact 30

<210> 155
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 155
aactacgcca tgtcc 15

<210> 156
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido

sintético"

<400> 156
tccatcagca caggcggcct ggccttctac gccaattggg ccaagggc 48

<210> 157
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 157
aacggcggag gctcctacat cttctactac ttcgacctg 39

<210> 158
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 158
caggcctccc agtccatctc ctcctacctg tcc 33

<210> 159
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 159
tctgcctcca cactggcctc c 21

<210> 160
<211> 30
<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 160
cagtcctact acgacatcgg cacctccacc 30

<210> 161
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 161
agctatgcaa tgggc 15

<210> 162
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 162
accattaata ttggtggtcg cgtatattac gcgagctggg caaaaggc 48

<210> 163
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 163
tattataatg gtggtagtta tgacatc 27

<210> 164
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 164
caggccagtg agagcattta tcgcgtattg gcc 33

<210> 165
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 165
gatacatcca ctctggcatc t 21

<210> 166
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 166
caaggcggtt attatgctga tagttatggt attgct 36

<210> 167
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 167
tcctacgcta tgggc 15

<210> 168
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 168
accatcaaca tcggcggcag agtgtactac gcctcctggg ccaagggc 48

<210> 169
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 169
tactacaacg gcggctccta cgatatc 27

<210> 170
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 170
caggcctccg agtccatcta ccgggtgctg gcc 33

<210> 171
<211> 21

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 171
gacaccagca cactggcctc c 21

<210> 172
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 172
cagggcggct actacgccga ctcctacgga atcgct 36

<210> 173
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 173
agttatgcaa tgatc 15

<210> 174
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 174

accattagta ctggtggtat cacatactac gcgagctggg cgaaaggc 48

<210> 175
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 175
gggggatatg ctgctagtag tgcttattat ctcccgtact actttgactt g 51

<210> 176
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 176
cagtcctccc agtccgtgta taacaacaac aacctggcc 39

<210> 177
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 177
ctggcatcca ctctggcatc t 21

<210> 178
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 178
ctaggtggtt gtgatgatga tgctgatact tttgct 36

<210> 179
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 179
tcctacgcta tgatc 15

<210> 180
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 180
accatctcta ccggcggaat tacctactac gcctcctggg ccaagggc 48

<210> 181
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 181
ggcggctacg ccgccagctc cgcttactac ctgccctact acttcgacct g 51

<210> 182

<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 182
cagtcctccc agtccgtgta taacaacaac aacctggcc 39

<210> 183
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 183
ctggcctcca cactggcctc t 21

<210> 184
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 184
ctgggcggct gcgacgacga cgccgatacc tttgct 36

<210> 185
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 185
Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr
1 5

<210> 186
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 186
Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Ala Ser
1 5

<210> 187
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 187
Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Arg Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 188
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 188
Ser Ser Val Ser Tyr
1 5

<210> 189

<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 189
Asp Thr Ser
1

<210> 190
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 190
Gln Gln Trp Ser Lys His Pro Leu Thr
1 5

<210> 191
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 191
Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr
1 5

<210> 192
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 192
Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr
1 5

<210> 193
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 193
Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 194
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 194
Gln Asp Val Asn Thr Ala
1 5

<210> 195
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 195
Ser Ala Ser
1

<210> 196
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 196
Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 197
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 197
Gly Ile Ser Leu Ser Ser Asp Ala
1 5

<210> 198
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 198
Ile Asn Gly Gly Gly Asn Thr
1 5

<210> 199
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 199
Ala Arg Gly Ile Gln His Gly Gly Gly Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Tyr
1 5 10 15

Gly Met Asp Leu
20

<210> 200
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 200
Gln Ser Ile Ser Ser Val
1 5

<210> 201
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 201
Leu Ala Ser
1

<210> 202
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 202
Gln Thr Asn Tyr Gly Thr Ser Ser Ser Asn Tyr Gly Phe Ala
1 5 10

<210> 203
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 203
Gly Ile Ser Leu Ser Ser Asp Ala
1 5

<210> 204
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 204
Ile Asn Gly Gly Gly Asn Thr
1 5

<210> 205
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 205
Ala Arg Gly Ile Gln His Gly Gly Gly Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Tyr

1 5 10 15

Gly Met Asp Leu
20

<210> 206
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 206
Gln Ser Ile Ser Ser Val
1 5

<210> 207
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 207
Leu Ala Ser
1

<210> 208
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 208
Gln Thr Asn Tyr Gly Thr Ser Ser Ser Asn Tyr Gly Phe Ala
1 5 10

<210> 209
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 209
Gly Phe Ser Leu Asn Asn Tyr Ala
1 5

<210> 210
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 210
Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ala
1 5

<210> 211
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 211
Gly Arg Asn Gly Gly Gly Ser Tyr Ile Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu
1 5 10 15

<210> 212
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 212
Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

<210> 213
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 213
Ser Ala Ser
1

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

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 214
Gln Ser Tyr Tyr Asp Ile Gly Thr Ser Thr
1 5 10

<210> 215
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 215

Gly Phe Ser Leu Asn Asn Tyr Ala
1 5

<210> 216
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 216
Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ala
1 5

<210> 217
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 217
Ala Arg Asn Gly Gly Gly Ser Tyr Ile Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu
1 5 10 15

<210> 218
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 218
Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

<210> 219
<211> 3

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 219
Ser Ala Ser
1

<210> 220
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 220
Gln Ser Tyr Tyr Asp Ile Gly Thr Ser Thr
1 5 10

<210> 221
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 221
Gly Ile Asp Leu Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 222
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido

sintético"

<400> 222
Ile Asn Ile Gly Gly Arg Val
1 5

<210> 223
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 223
Ala Arg Tyr Tyr Asn Gly Gly Ser Tyr Asp Ile
1 5 10

<210> 224
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 224
Glu Ser Ile Tyr Arg Val
1 5

<210> 225
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 225
Asp Thr Ser
1

<210> 226
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 226
Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala Asp Ser Tyr Gly Ile Ala
1 5 10

<210> 227
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 227
Gly Ile Asp Leu Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 228
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 228
Ile Asn Ile Gly Gly Arg Val
1 5

<210> 229
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 229
Ala Arg Tyr Tyr Asn Gly Gly Ser Tyr Asp Ile
1 5 10

<210> 230
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 230
Glu Ser Ile Tyr Arg Val
1 5

<210> 231
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 231
Asp Thr Ser
1

<210> 232
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 232

Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala Asp Ser Tyr Gly Ile Ala
1 5 10

<210> 233
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 233
Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 234
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 234
Ile Ser Thr Gly Gly Ile Thr
1 5

<210> 235
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 235
Ala Arg Gly Gly Tyr Ala Ala Ser Ser Ala Tyr Tyr Leu Pro Tyr Tyr
1 5 10 15

Phe Asp Leu

<210> 236
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 236
Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn Asn
1 5

<210> 237
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 237
Leu Ala Ser
1

<210> 238
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 238
Leu Gly Gly Cys Asp Asp Asp Ala Asp Thr Phe Ala
1 5 10

<210> 239
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 239
Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 240
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 240
Ile Ser Thr Gly Gly Ile Thr
1 5

<210> 241
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 241
Ala Arg Gly Gly Tyr Ala Ala Ser Ser Ala Tyr Tyr Leu Pro Tyr Tyr
1 5 10 15

Phe Asp Leu

<210> 242
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 242
Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn Asn
1 5

<210> 243
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 243
Leu Ala Ser
1

<210> 244
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 244
Leu Gly Gly Cys Asp Asp Asp Ala Asp Thr Phe Ala
1 5 10

<210> 245
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido
sintético"

<400> 245
ggcttcacct tcagcggcta tggg 24

<210> 246
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 246
attagtagtg gtggtagtta tacc 24

<210> 247
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 247
gcaagacatg gggacgatcc cgcctggttc gcttat 36

<210> 248
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 248
tcaagtataa gttccaacaa c 21

<210> 249
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 249
ggcacatcc 9

<210> 250
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 250
caacagtgga gtagttaccc gtacatgtac acg 33

<210> 251
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 251
ggttactcat tcactggcta cacc 24

<210> 252
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 252
attactcctt acaatggtgc ttct 24

<210> 253
<211> 36

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 253
gcaaggggg gttacgacgg gaggggtttt gactac 36

<210> 254
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 254
tcaagtgtaa gttac 15

<210> 255
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 255
gacacatcc 9

<210> 256
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 256

cagcagtgga gtaagcaccc tctcacg 27

<210> 257
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 257
ggaatctccc tcagtagcga tgca 24

<210> 258
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 258
attaatggtg gtggtaacac a 21

<210> 259
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 259
gccagaggca ttcaacatgg tggtggtaat agtgattatt attattacgg catggacctc 60

<210> 260
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 260
cagagcatta gtagtgtc 18

<210> 261
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 261
ctggcatct 9

<210> 262
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 262
caaaccaatt atggtactag tagtagtaat tatggttttg ct 42

<210> 263
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 263
ggaatttccc tctcctccga cgcg 24

<210> 264

<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 264
atcaacggcg gcggaaacac c 21

<210> 265
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 265
gcgcgcggca tccagcacgg tggtggaaac agcgactact actactatgg gatggatctg 60

<210> 266
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 266
cagtcaatta gcagcgtg 18

<210> 267
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 267
ttggcctcc 9

<210> 268
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 268
caaaccaact acggaacctc cagctccaac tacggctttg cc 42

<210> 269
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 269
ggattctccc tcaataacta tgca 24

<210> 270
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 270
attagtactg gtggtctcgc a 21

<210> 271
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 271
ggcagaaatg gtggtggtag ttatattttc tattattttg acttg 45

<210> 272
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 272
cagagcatta gtagttac 18

<210> 273
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 273
tctgcatcc 9

<210> 274
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 274
caaagctatt atgatattgg tactagtact 30

<210> 275
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 275
ggcttctccc tgaacaacta cgcc 24

<210> 276
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 276
atcagcacag gcggcctggc c 21

<210> 277
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 277
gccagaaacg gcggaggctc ctacatcttc tactacttcg acctg 45

<210> 278
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 278
cagtccatct cctcctac 18

<210> 279
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 279
tctgcctcc 9

<210> 280

<400> 280
000

<210> 281

<400> 281
000

<210> 282

<400> 282
000

<210> 283

<400> 283
000

<210> 284

<400> 284
000

<210> 285

<400> 285
000

<210> 286

<400> 286
000

<210> 287

<400> 287
000

<210> 288

<400> 288
000

<210> 289

<400> 289
000

<210> 290

<400> 290
000

<210> 291

<400> 291
000

<210> 292

<400> 292
000

<210> 293

<400> 293
000

<210> 294

<400> 294
000

<210> 295

<400> 295
000

<210> 296

<400> 296
000

<210> 297

<400> 297
000

<210> 298

<400> 298
000

<210> 299

<400> 299
000

<210> 300
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 300
cagtcctact acgacatcgg cacctccacc 30

<210> 301
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 301
ggaatcgacc tcagtagcta tgca 24

<210> 302
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 302
attaatattg gtggtcgcgt a 21

<210> 303
<211> 33
<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 303
gccagatatt ataatggtgg tagttatgac atc 33

<210> 304
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 304
gagagcattt atcgcgta 18

<210> 305
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 305
gatacatcc 9

<210> 306
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 306
caaggcggtt attatgctga tagttatggt attgct 36

<210> 307
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 307
ggaatcgacc tgtcctccta cgct 24

<210> 308
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 308
atcaacatcg gcggcagagt g 21

<210> 309
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 309
gcccggtact acaacggcgg ctcctacgat atc 33

<210> 310
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 310
gagtccatct accgggtg 18

<210> 311
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 311
gacaccagc 9

<210> 312
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 312
cagggcggct actacgccga ctcctacgga atcgct 36

<210> 313
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 313
ggattctccc tcagtagtta tgca 24

<210> 314
<211> 21

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 314
attagtactg gtggtatcac a 21

<210> 315
<211> 57
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 315
gccagagggg gatatgctgc tagtagtgct tattatctcc cgtactactt tgacttg 57

<210> 316
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 316
cagagtgttt ataataataa caac 24

<210> 317
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 317

ctggcatcc 9

<210> 318
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 318
ctaggtggtt gtgatgatga tgctgatact tttgct 36

<210> 319
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 319
ggcttctccc tgtcctccta cgct 24

<210> 320
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 320
atctctaccg gcggaattac c 21

<210> 321
<211> 57
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 321
gctagaggcg gctacgccgc cagctccgct tactacctgc cctactactt cgacctg 57

<210> 322
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 322
cagtccgtgt ataacaacaa caac 24

<210> 323
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 323
ctggcctcc 9

<210> 324
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 324
ctgggcggct gcgacgacga cgccgatacc tttgct 36

<210> 325

<211> 449
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
sintético"

<400> 325
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

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

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

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 326
<211> 213
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 326
Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 327
<211> 451
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 327

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

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

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

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

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 328
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 328
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 329
<211> 453
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 329
Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Ser Leu Ser Ser Asp Ala
20 25 30

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

Ile Ile Asn Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr
65 70 75 80

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

Gln His Gly Gly Gly Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Leu
100 105 110

Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

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

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

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

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

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr

245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 330
<211> 219
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 330
Glu Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
1 5 10 15

Asp Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Val
20 25 30

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

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

Ser Arg Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
65 70 75 80

Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Thr Asn Tyr Gly Thr Ser Ser
85 90 95

Ser Asn Tyr Gly Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 331
<211> 456
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 331
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Ser Leu Ser Ser Asp
20 25 30

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

Gly Ile Ile Asn Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg His Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Arg Gly Ile Gln His Gly Gly Gly Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
100 105 110

Met Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu 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 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
195 200 205

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys 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 Asp Glu Leu 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

<210> 332
<211> 219
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 332
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Val
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Cys
65 70 75 80

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

Ser Asn Tyr Gly Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 333
<211> 448
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 333
Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

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

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

Ser Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ala Phe Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Met Thr
65 70 75 80

Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Gly Arg Asn Gly
85 90 95

Gly Gly Ser Tyr Ile Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

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

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr

325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 334
<211> 215
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 334
Ala Phe Glu Leu Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Glu Ala Ala Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Ile Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
65 70 75 80

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

Ser Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 335
<211> 451
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
sintético"

<400> 335
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asn Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Ser Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ala Phe Tyr Ala Asn Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Arg Asn Gly Gly Gly Ser Tyr Ile Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

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

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

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

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

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

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 336
<211> 215
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 336
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Cys
65 70 75 80

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

Ser Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 337
<211> 444
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 337
Gln Ser Val Lys Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

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

Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly
35 40 45

Thr Ile Asn Ile Gly Gly Arg Val Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ala Pro
65 70 75 80

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

Asn Gly Gly Ser Tyr Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Leu Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
115 120 125

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
130 135 140

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
145 150 155 160

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
180 185 190

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
195 200 205

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 338
<211> 217
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 338
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Ala Ser Glu Pro Val Gly
1 5 10 15

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

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

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

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
115 120 125

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro

130 135 140

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
145 150 155 160

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
180 185 190

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 339
<211> 447
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 339
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Thr Ile Asn Ile Gly Gly Arg Val Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu

65 70 75 80

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

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

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 340
<211> 217
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 340

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Arg Val
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Cys
65 70 75 80

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

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

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
115 120 125

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

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
145 150 155 160

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
180 185 190

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 341
<211> 452
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 341
Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Lys Pro Asp Glu Ser
1 5 10 15

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

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

Thr Ile Ser Thr Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr
65 70 75 80

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Ala Tyr Tyr Leu Pro Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

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

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

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

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

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

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 342
<211> 219
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 342
Ala Ala Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn
20 25 30

Asn Asn Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val
65 70 75 80

Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Cys Asp Asp
85 90 95

Asp Ala Asp Thr Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 343

<211> 455
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
sintético"

<400> 343
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Thr Ile Ser Thr Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Arg Gly Gly Tyr Ala Ala Ser Ser Ala Tyr Tyr Leu Pro Tyr Tyr Phe
100 105 110

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

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

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

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His

165 170 175

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

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

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
210 215 220

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225 230 235 240

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
245 250 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
260 265 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
290 295 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
325 330 335

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
340 345 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
355 360 365

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385 390 395 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
405 410 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 344
<211> 219
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 344
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn
20 25 30

Asn Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

Gln Cys Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Cys Asp Asp
85 90 95

Asp Ala Asp Thr Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 345
<211> 1350
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 345

gaggtccaac tggtggagag cggtggaggt gttgtgcaac ctggccggtc cctgcgcctg 60

tcctgctccg catctggctt caccttcagc ggctatgggt tgtcttgggt gagacaggca 120

cctggaaaag gtcttgagtg ggttgcaatg attagtagtg gtggtagtta tacctactat 180

gcagacagtg tgaagggtag atttgcaata tcgcgagaca acgccaagaa cacattgttc 240

ctgcaaatgg acagcctgag acccgaagac accggggtct atttttgtgc aagacatggg 300

gacgatcccg cctggttcgc ttattggggc caagggaccc cggtcaccgt ctcctcagcc 360

tccaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 420

acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480

aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga 540

ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 600

atctgcaacg tgaatcacaa gcccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 660

tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct gggggggaccg 720

tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 780

gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 840

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960

tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 1020

gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 1080

accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1140

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200

gactccgacg gctccttctt cttatattca aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320

aagagcctct ccctgtctcc cgggaaatga 1350

<210> 346
<211> 654
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido
sintético"

<400> 346
gacatccagc tgacccagag cccaagcagc ctgagcgcca gcgtgggtga cagagtgacc 60

atcacctgta gtgtcagctc aagtataagt tccaacaact tgcactggta ccagcagaag 120

ccaggtaagg ctccaaagcc atggatctac ggcacatcca acctggcttc tggtgtgcca 180

agcagattca gcggtagcgg tagcggtacc gactacacct tcaccatcag cagcctccag 240

ccagaggaca tcgccaccta ctactgccaa cagtggagta gttacccgta catgtacacg 300

ttcggccaag ggaccaaggt ggaaatcaaa cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcatc 360

ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat 420

aacttctatc ccagagaggc caaagtacag tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt 480

aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc 540

accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc 600

catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag agcttcaaca ggggagagtg ttaa 654

<210> 347
<211> 1350
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido
sintético"

<400> 347
caggtacaac tgcagcagtc tgggcctgag ctggagaagc ctggcgcttc agtgaagata 60

tcctgcaagg cttctggtta ctcattcact ggctacacca tgaactgggt gaagcagagc 120

catggaaaga gccttgagtg gattggactt attactcctt acaatggtgc ttctagctac 180

aaccagaagt tcaggggcaa ggccacatta actgtagaca agtcatccag cacagcctac 240

atggacctcc tcagtctgac atctgaagac tctgcagtct atttctgtgc aaggggggggt 300

tacgacggga ggggttttga ctactgggga tccgggaccc cggtcaccgt ctcctcagcc 360

tccaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 420

acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480

aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga 540

ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 600

atctgcaacg tgaatcacaa gcccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 660

tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct gggggggaccg 720

tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 780

gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 840

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960

tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 1020

gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 1080

accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1140

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200

gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320

aagagcctct ccctgtctcc cgggaaatga 1350

<210> 348
<211> 642
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 348
gacatcgagc tcactcagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60

atgacctgca gtgccagctc aagtgtaagt tacatgcact ggtaccagca gaagtcaggc 120

acctccccca aaagatggat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt cccaggtcgc 180

ttcagtggca gtgggtctgg aaactcttac tctctcacaa tcagcagcgt ggaggctgaa 240

gatgatgcaa cttattactg ccagcagtgg agtaagcacc ctctcacgtt cggatccggg 300

accaaggtgg aaatcaaacg aactgtggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct 360

gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 420

agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 480

agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 540

agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg 600

agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt aa 642

<210> 349
<211> 1362
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 349
cagtcggtgg aggagtccgg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacacccct gacactcacc 60

tgcaccgtct ctggaatctc cctcagtagc gatgcaataa gctgggtccg ccaggctcca 120

gggaaggggc tcgaatacat cggaatcatt aatggtggtg gtaacacata ctacgcgagc 180

tgggcgaaag gccgattcac catctccaaa acctcgacca cggtggatct gaaaatcacc 240

agtccgacaa ccgaggacac ggccacctat ttctgtgcca gaggcattca acatggtggt 300

ggtaatagtg attattatta ttacggcatg gacctctggg gcccaggcac cctggtcact 360

gtctcttcag catccaccaa gggcccatcg gtcttccccc tggcaccctc ctccaagagc 420

acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg 480

acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta 540

cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc 600

acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa 660

gttgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc 720

ctgggggac cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc 780

cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag 840

ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 900

cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg 960

aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 1020

accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc 1080

cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc 1140

agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1200

cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttcttatatt caaagctcac cgtggacaag 1260

agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac 1320

cactacacgc agaagagcct ctccctgtct cccgggaaat ga 1362

<210> 350
<211> 660
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 350
gaagtgttga tgacccagac tccatcctcc gtgtctgcag ctgtgggaga cacagtcacc 60

atcaagtgcc aggccagtca gagcattagt agtgtcttgt cctggtatca gcagaaacca 120

gggcagcctc ccaagctcct gatctatctg gcatccactc tggcatctgg ggtcccatcg 180

cggttcagcg gcagtagatc tgggacagag ttcactctca ccatcagcga cctggagtgt 240

gacgatgctg ccacttacta ctgtcaaacc aattatggta ctagtagtag taattatggt 300

tttgctttcg gcggagggac cgaggtggtc gtcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540

agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600

gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttga 660

<210> 351
<211> 1371
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 351
gaagtccaac tggtggaaag cgggggagga ctggtgcagc cgggcggatc cctccggctg 60

tcatgtgctg catcgggaat ttccctctcc tccgacgcga ttagctgggt cagacaggcc 120

cccggaaagg ggctggagta catcggtatc atcaacggcg gcggaaacac ctactacgcc 180

tcctgggcca agggccgctt caccatctcg cggcataatt ccaagaacac tctgtacttg 240

caaatgaact ccctgagggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcgcg cggcatccag 300

cacggtggtg gaaacagcga ctactactac tatgggatgg atctgtgggg ccagggaact 360

cttgtgaccg tgtcgtcagc atccaccaag ggcccatcgg tcttcccccct ggcaccctcc 420

tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc 480

gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg 540

gctgtcctac agtcctcagg actctactcc ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc 600

agcttgggca cccagaccta catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg 660

gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca 720

cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc 780

atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 840

gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg 900

cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 960

gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 1020

atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 1080

cccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 1140

ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 1200

aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcttatattc aaagctcacc 1260

gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 1320

ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc ccgggaaatg a 1371

<210> 352
<211> 660
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 352
gacattcaga tgacccagtc cccaagctcg ctgtccgcct ccgtgggcga ccgcgtgacc 60

atcacgtgcc aggcgtccca gtcaattagc agcgtgctct cctggtacca acagaagccg 120

gggaaagcac ccaagctgct gatctacttg gcctccactc tggcctcggg agtgccttca 180

cggttctccg gatcgggatc tggtactgat ttcaccctca ccatctcgag ccttcagtgc 240

gaggacatcg ctacttacta ttgtcaaacc aactacggaa cctccagctc caactacggc 300

tttgccttcg gtggcgggac caaggtcgaa atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540

agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600

gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttga 660

<210> 353
<211> 1347
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido
sintético"

<400> 353
cagtcggtgg aggagtccgg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacacccct gacactcacc 60

tgcacagtct ctggattctc cctcaataac tatgcaatga gctgggtccg ccaggctcca 120

gggaaggggc tggaatggat cggatccatt agtactggtg gtctcgcatt ctacgcgaac 180

tgggcaaaag gccgattcac catctccaga acctcgacca cggtggatct gaaaatgacc 240

agtctgacaa ccgaggacac ggccacctat ttctgtggca gaaatggtgg tggtagttat 300

attttctatt attttgactt gtggggccaa ggcaccctcg tcactgtctc ttcagcatcc 360

accaagggcc catcggtctt ccccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 420

gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480

tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 540

tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 600

tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagttga gcccaaatct 660

tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 720

gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 780

acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 840

gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 900

taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 960

aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1020

aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc 1080

aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1140

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1200

tccgacggct ccttcttctt atattcaaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1260

gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1320

agcctctccc tgtctcccgg gaaatga 1347

<210> 354
<211> 648
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 354
gcattcgaat tgacccagac tccatcctcc gtggaggcag ctgtgggagg cacaatcacc 60

atcaagtgcc aggccagtca gagcattagt agttacttat cctggtatca gcagaaacca 120

gggcagcctc ccaagctcct gatctattct gcatccactc tggcatctgg ggtctcatcg 180

cggttcaaag gcagtggatc tgggacagag tacactctca ccatcagcga cctggagtgt 240

gccgatgctg ccacttactt ctgtcaaagc tattatgata ttggtactag tactttcggc 300

ggagggaccg aggtggtcgt caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420

tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgttga 648

<210> 355
<211> 1356
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 355
gaagtgcagc tggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

tcttgtgccg cctccggctt ctccctgaac aactacgcca tgtcctgggt gcgacaggcc 120

cctggcaaag gcctggaatg gatcggctcc atcagcacag gcggcctggc cttctacgcc 180

aattgggcca agggccggtt caccatcagc cgggacaact ccaagaacac cctgtacctc 240

cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgtgccag aaacggcgga 300

ggctcctaca tcttctacta cttcgacctg tggggccagg gcaccctcgt gacagtgtca 360

tctgcatcca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttctta tattcaaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctcccggg aaatga 1356

<210> 356
<211> 648
<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido
sintético"

<400> 356
gatattcaga tgacccagtc cccctccagc ctgtccgctt ctgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgtc aggcctccca gtccatctcc tcctacctgt cctggtatca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctactct gcctccacac tggcctccgg cgtgccctct 180

agattctccg gctctggctc tggcaccgac tttaccctga ccatcagctc cctccagtgc 240

gaggatgccg ccacctacta ctgccagtcc tactacgaca tcggcacctc caccttcggc 300

ggaggcacca aggtggaaat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420

tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgttga 648

<210> 357
<211> 1335
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido
sintético"

<400> 357
cagtcagtga aggagtccgg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacacccct gacactcacc 60

tgcacagtct ctggaatcga cctcagtagc tatgcaatgg gctggttccg ccaggctcca 120

gggaaggggc tggaatacat cggaaccatt aatattggtg gtcgcgtata ttacgcgagc 180

tgggcaaaag gccgattcac catctccaga acctcgacca cggtggatct gaaagcgccc 240

agtctgacag ccgaggacac ggccacctat ttctgtgcca gatattataa tggtggtagt 300

tatgacatct ggggcccagg caccctggtc accgtctctt tagcatccac caagggccca 360

tcggtcttcc ccctggcacc ctcctccaag agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc 420

tgcctggtca aggactactt ccccgaaccg gtgacggtgt cgtggaactc aggcgccctg 480

accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc ctacagtcct caggactcta ctccctcagc 540

agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg ggcacccaga cctacatctg caacgtgaat 600

cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag aaagttgagc ccaaatcttg tgacaaaact 660

cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa ctcctggggg gaccgtcagt cttcctcttc 720

cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg 780

gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 840

gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc 900

agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc 960

tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1020

cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc 1080

agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1140

aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 1200

ttcttcttat attcaaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1260

tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1320

tctcccggga aatga 1335

<210> 358
<211> 654
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 358
gatgttgtga tgacccagac tccagcctcc gcgtctgaac ctgtgggagg cacagtcacc 60

atcaagtgcc aggccagtga gagcatttat cgcgtattgg cctggtatca gcagaaacca 120

gggcagcctc ccaagctcct gatctatgat acatccactc tggcatctgg ggccccatcg 180

cggttcaaag gcagtggata tgggacagag ttcactctca ccatcagcgg cgtgcagtgt 240

gaagatgctg ccacttacta ctgtcaaggc ggttattatg ctgatagtta tggtattgct 300

ttcggcggag ggaccgaggt ggtggtcaaa cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcatc 360

ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat 420

aacttctatc ccagagaggc caaagtacag tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt 480

aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc 540

accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc 600

catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag agcttcaaca ggggagagtg ttga 654

<210> 359
<211> 1344
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 359
caggtgcagc tggtggaatc tggcggagga ctggtgcagc ctggcggctc tctgagactg 60

tcctgttccg cctccggaat cgacctgtcc tcctacgcta tgggctgggt gcgacaggct 120

cctggcaagg gcctggagta catcggcacc atcaacatcg gcggcagagt gtactacgcc 180

tcctgggcca agggccggtt caccatctcc agagacaact ccaagaacac cctgtacctc 240

cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccg gtactacaac 300

ggcggctcct acgatatctg gggccagggc acactcgtga ccgtgtcctc tgcatccacc 360

aagggcccat cggtcttccc cctggcaccc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 420

gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 480

ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac 540

tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 600

aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 660

gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 720

ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 780

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 840

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 900

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 960

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag 1080

aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1140

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1200

gacggctcct tcttcttata ttcaaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1260

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1320

ctctccctgt ctcccgggaa atga 1344

<210> 360
<211> 654
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 360
gatatccaga tgacccagtc cccctccacc ctgtctgcct ctgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgtc aggcctccga gtccatctac cgggtgctgg cctggtatca gcagaagcct 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac accagcacac tggcctccgg cgtgccctct 180

agattctccg gctctggctc tggcaccgag tttaccctga ccatctccag cctccagtgc 240

gacgacgccg ccacctacta ttgtcagggc ggctactacg ccgactccta cggaatcgct 300

ttcggcggag gcaccaaggt ggaaatcaaa cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcatc 360

ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat 420

aacttctatc ccagagaggc caaagtacag tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt 480

aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc 540

accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc 600

catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag agcttcaaca ggggagagtg ttga 654

<210> 361
<211> 1359
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 361
cagtcggtgg aggagtccgg cggtcgcctg gtaaagcctg acgaatccct gacactcacc 60

tgcacagcct ctggattctc cctcagtagt tatgcaatga tctgggtccg ccaggctcca 120

ggggaggggc tggaatggat cggaaccatt agtactggtg gtatcacata ctacgcgagc 180

tgggcgaaag gccgattcac catctccaaa acctcgacca cggtggatct gaaaatcacc 240

agtccgacaa ccgaggacac ggccacctat ttctgtgcca gagggggata tgctgctagt 300

agtgcttatt atctcccgta ctactttgac ttgtggggcc aagggaccct ggtcaccgtc 360

tcctcagcat ccaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctcctc caagagcacc 420

tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 480

gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag 540

tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc 600

cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt 660

gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg 720

gggggaccgt cagtcttcct cttccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg 780

acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 840

aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 900

tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 960

ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc 1020

atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg 1080

gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1140

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1200

cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ttatattcaa agctcaccgt ggacaagagc 1260

aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1320

tacacgcaga agagcctctc cctgtctccc gggaaatga 1359

<210> 362
<211> 660
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 362
gcagccgtgc tgacccagac accatcaccc gtgtctgcag ctgtgggagg cacagtcacc 60

atcagttgcc agtccagtca gagtgtttat aataataaca acttagcctg gtttcagcag 120

aaacccgggc agcctcccaa gcttctgatc tatctggcat ccactctggc atctggggtc 180

ccatcacggt tcagcggcag tggatctggg acacagttca ctctcaccat cagcggcgtg 240

cagtgtgacg atgctgccac ttattactgt ctaggtggtt gtgatgatga tgctgatact 300

tttgctttcg gcggagggac tgaggtggtg gtcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540

agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600

gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttga 660

<210> 363
<211> 1368
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido
sintético"

<400> 363
gaagtgcagc tggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

tcttgtgccg cctccggctt ctccctgtcc tcctacgcta tgatctgggt gcgacaggcc 120

cctggcaagg gcctggaatg gatcggcacc atctctaccg gcggaattac ctactacgcc 180

tcctgggcca agggccggtt caccatctcc agagacaact ccaagaacac cctgtacctc 240

cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact attgtgctag aggcggctac 300

gccgccagct ccgcttacta cctgccctac tacttcgacc tgtggggcca gggcaccctc 360

gtgacagtgt catctgcatc caccaagggc ccatcggtct tccccctggc accctcctcc 420

aagagcacct ctgggggcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 480

ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct 540

gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc 600

ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac 660

aagaaagttg agcccaaatc ttgtgacaaa actcacacat gcccaccgtg cccagcacct 720

gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc ttcccccaa aacccaagga caccctcatg 780

atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag 840

gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 900

gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 960

tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag gtctccaaca aagccctccc agcccccatc 1020

gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc 1080

ccatcccggg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc 1140

tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 1200

accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttct tatattcaaa gctcaccgtg 1260

gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 1320

cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctcccg ggaaatga 1368

<210> 364
<211> 660
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 364
gatattcaga tgacccagtc cccctccagc ctgtccgctt ctgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgtc agtcctccca gtccgtgtat aacaacaaca acctggcctg gtatcagcag 120

aaacccggca aggtgcccaa gctgctgatc tacctggcct ccacactggc ctctggcgtg 180

ccctctagat tctccggctc tggctctggc accgacttta ccctgaccat cagctccctc 240

cagtgcgagg atgccgccac ctactattgc ctgggcggct gcgacgacga cgccgatacc 300

tttgcttttg gcggaggcac caaggtggaa atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540

agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600

gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttga 660

<210> 365
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 365
Ala His Lys Asp
1

<210> 366
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 366
Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr Leu
1 5 10

<210> 367
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 367
Gly Phe Leu Gly
1

<210> 368
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 368
Ala Leu Ala Leu
1

CONJUGADOS DE ANTICUERPO Y FÁRMACO BASADOS EN ERIBULINA Y MÉTODOS PARA SU USO

[0001]La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud de patente provisional estadounidense N.º 62/302.562, presentada el 2 de marzo de 2016, cuyo contenido se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia.

[0002]La presente descripción se refiere a conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC) que se unen a antígenos diana de oncología tales como el receptor de folato alfa y/o proporcionan actividad del fármaco anti-tubulina. La descripción además se refiere a métodos y composiciones útiles en el tratamiento y diagnóstico de cánceres que expresan receptor de folato alfa y/o son aptos para el tratamiento por interrupción de tubulina.

[0003]El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, con aproximadamente 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes relacionadas con cáncer en 2012. Las causas más comunes de muertes por cáncer son cánceres: de pulmón (1,59 millones de muertes); de hígado (745.000 muertes); de estómago (723.000 muertes); colorrectal (694.000 muertes); de mama (521.000 muertes); y de esófago (400.000 muertes). Se espera que la cantidad de casos nuevos de cáncer aumente en aproximadamente un 70 % durante las próximas dos décadas, a aproximadamente 22 millones de casos nuevos de cáncer por año (World Cancer Report 2014).

[0004]Los microtúbulos son proteínas citoesqueléticas, filamentosas y dinámicas que están implicadas en una variedad de funciones celulares, incluso la migración y el transporte intracelular, la señalización celular y el mantenimiento de la forma celular. Los microtúbulos también desempeñan un papel fundamental en la división celular mitótica al formar el huso mitótico necesario para segregar cromosomas en dos células hijas. Las funciones biológicas de los microtúbulos en todas las células son reguladas, en gran parte, por su dinámica de polimerización, que se produce por la adición no covalente y reversible de dímeros de tubulina α y β en ambos extremos de los microtúbulos. Este comportamiento dinámico y el control resultante sobre la longitud de los microtúbulos es vital para el funcionamiento adecuado del huso mitótico. Incluso una alteración mínima de la dinámica de los microtúbulos puede engranar el punto de control del huso, interrumpir el avance del ciclo celular en mitosis y, posteriormente, conducir a la muerte celular (Mukhtar et ál. (2014) Mol. Cancer Ther. 13:275-84). Debido a su división celular rápida, las células cancerosas generalmente son más sensibles a compuestos que se unen a tubulina e interrumpen su función normal, en comparación con células normales. Por este motivo, los inhibidores de tubulina y otros agentes objetivo de microtúbulos se han convertido en una

prometedora clase de medicamentos para el tratamiento de cáncer (Dumontet y Jordan (2010) Nat. Rev. Drug Discov. 9:790-803).

[0005]El receptor de folato alfa (FRA) es una proteína de membrana unida a glicofosfatidilinositol (GPI) que se une a folato. Aunque el papel de FRA en la biología de tejidos normales y cancerosos no se conoce completamente, está altamente sobreexpresado en un alto porcentaje de cánceres de ovario de origen epitelial (O'Shannessy et ál. (2013) Int. J. Gynecol. Pathol. 32(3):258-68), así como en un porcentaje de carcinomas de pulmón de células no pequeñas (Christoph et ál. (2014) Clin. Lung Cancer 15(5):320-30). El FRA también tiene expresión limitada en tejidos normales. Estas propiedades hacen que FRA sea una diana atractiva para la inmunoterapia contra el cáncer.

[0006]El receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (*HER2*) de protooncogenes codifica un receptor de tirosina cinasa transmembrana que pertenece a la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR), (King et ál. (1985) Science 229:974-6). La sobreexpresión de HER2 permite la activación constitutiva de las vías de señalización del factor de crecimiento, por ejemplo la vía PI3K–AKT–mTOR y, de este modo, sirve como un conductor oncogénico en varios tipos de cáncer, incluso aproximadamente el 20 % de los carcinomas de mama invasivos (Slamon et ál. (1989) Science 244:707-12; Gajria y Chandarlapaty (2011) Expert Rev. Anticancer Ther. 11:263-75). Dado que la amplificación de HER2 media el fenotipo transformado, HER2 es otra diana prometedora para el tratamiento de cáncer.

[0007]La presente descripción proporciona, en parte, compuestos novedosos con actividad biológica contra células tumorales. Los compuestos pueden inhibir el crecimiento tumoral en mamíferos y pueden ser útiles para tratar pacientes humanos con cáncer.

[0008]La presente descripción se refiere, más específicamente, a compuestos de conjugados de anticuerpo-fármaco que son capaces de unirse, internalizar y destruir células tumorales (p. ej., células tumorales que expresan FRA). Se describen compuestos de conjugados de anticuerpo-fármaco que comprenden un enlazador que une a un resto de fármaco a un resto de anticuerpo. Los compuestos de conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) pueden estar representados por la fórmula I:

$$Ab\text{-}(L\text{-}D)_p \quad (I)$$

en donde Ab es un anticuerpo de internalización o un fragmento de unión al antígeno de internalización de este que se dirige a una célula tumoral;

D es eribulina;

L es un enlazador escindible que une covalentemente Ab con D; y

p es un entero entre 1 y 20.

[0009]En algunas modalidades, el enlazador es estable fuera de una célula, de modo que el ADC permanece intacto cuando está presente en condiciones extracelulares pero puede escindirse en la internalización en una célula, p. ej., una célula de cáncer. En algunas modalidades, el resto del fármaco de eribulina se escinde del resto del anticuerpo cuando ADC ingresa a una célula que expresa un antígeno específico para el resto del anticuerpo del ADC, y la escisión libera una forma no modificada de eribulina. En algunas modalidades, el enlazador comprende un resto escindible que está posicionado de tal manera que ninguna parte del enlazador o el resto del anticuerpo permanece unido al resto del fármaco de eribulina tras la escisión.

[0010]En algunas modalidades, el resto escindible en el enlazador es un resto de péptido escindible. En algunas modalidades, un ADC que comprende un resto de péptido escindible demuestra niveles de agregación más bajos, mejor proporción anticuerpo:fármaco, mayor destrucción de células cancerosas en el objetivo, menor destrucción de células no cancerosas fuera del objetivo, y/o mayor carga de fármaco (*p*) con respecto a un ADC que comprende un resto escindible alternativo. En algunas modalidades, agregar un resto escindible aumenta la citotoxicidad y/o la potencia con respecto a un enlazador no escindible. En algunas modalidades, el aumento de la potencia y/o citotoxicidad es un cáncer que expresa niveles moderados del antígeno objetivo del resto del anticuerpo del ADC (p. ej., expresión de FRA moderada). En algunas modalidades, el resto de péptido escindible se puede escindir por una enzima y el enlazador es un enlazador escindible de enzima. En algunas modalidades, la enzima es catepsina y el enlazador es un enlazador escindible de catepsina. En determinadas modalidades, el enlazador escindible de enzima (p. ej., enlazador escindible de catepsina) presenta una o más de las propiedades mejoradas mencionadas anteriormente, en comparación con un mecanismo de escisión alternativo.

[0011]En algunas modalidades, el resto de péptido escindible en el enlazador comprende una unidad de aminoácido. En algunas modalidades, la unidad de aminoácido comprende valina-citrulina (Val-Cit). En algunas modalidades, un ADC que comprende Val-Cit demuestra una mayor estabilidad, una menor destrucción celular fuera del objetivo, una mayor destrucción celular en el objetivo, niveles de agregación más bajos, y/o mayor carga de fármaco con respecto a un ADC que comprende una unidad de aminoácido alternativa o resto escindible alternativo.

[0012]En algunas modalidades, el enlazador comprende al menos una unidad espaciadora que une el resto de anticuerpo con el resto escindible. En algunas modalidades, la unidad espaciadora en el

enlazador puede comprender al menos un resto de polietilenglicol (PEG). El resto de PEG, por ejemplo, puede comprender -$(PEG)_m$-, en donde *m* es un entero entre 1 y 10. En algunas modalidades, la unidad espaciadora en el enlazador comprende $(PEG)_2$. En algunas modalidades, un ADC que comprende una unidad espaciadora más corta (p. ej., $(PEG)_2$) demuestra niveles de agregación más bajos y/o mayor carga de fármaco con respecto a un ADC que comprende una unidad espaciadora más larga (p. ej., $(PEG)_8$) a pesar de la longitud más corta del enlazador.

[0013]En algunas modalidades, la unidad espaciadora en el enlazador se une al resto de anticuerpo del ADC mediante un resto de maleimida (Mal). En algunas modalidades, un ADC que comprende un enlazador unido al resto de anticuerpo mediante Mal demuestra mayor carga de fármaco con respecto a un ADC que comprende un enlazador unido al resto de anticuerpo mediante un resto alternativo. En algunas modalidades, la Mal en el enlazador es reactiva con un residuo de cisteína en el resto de anticuerpo. En algunas modalidades, la Mal en el enlazador se une al resto de anticuerpo mediante un residuo de cisteína. En algunas modalidades, Mal-unidad espaciadora comprende un resto de PEG. En algunas modalidades, el enlazador comprende Mal-$(PEG)_m$, p. ej., Mal-$(PEG)_2$. En algunas modalidades, el enlazador comprende Mal-$(PEG)_2$. En algunas modalidades, Mal-unidad espaciadora une el resto del anticuerpo con el resto escindible en el enlazador. En algunas modalidades, el resto escindible en el enlazador es un resto de péptido escindible, p. ej. una unidad de aminoácido. En algunas modalidades, el enlazador comprende Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit.

[0014]En algunas modalidades, el resto escindible en el enlazador se une directamente al resto de fármaco de eribulina del ADC y el resto escindible se conecta directamente al resto de anticuerpo o se conecta a través de una unidad espaciadora. En algunas modalidades, una unidad espaciadora también une el resto escindible en el enlazador con el resto de fármaco de eribulina. En algunas modalidades, la unidad espaciadora que se une el resto escindible en el enlazador con el resto de fármaco de eribulina es autodestructiva. En algunas modalidades, el espaciador autodestructivo puede liberar eribulina no modificada en una célula diana. En algunas modalidades, la unidad espaciadora autodestructiva comprende un alcohol p-aminobencílico. En algunas modalidades, la unidad espaciadora autodestructiva comprende p-aminobenciloxicarbonilo (pAB). El pAB en el enlazador, en algunas modalidades, une el resto escindible con el resto de fármaco de eribulina. En algunas modalidades, el resto escindible es un resto de péptido escindible, p. ej. una unidad de aminoácido. En algunas modalidades, el enlazador comprende Val-Cit-pAB. En algunas modalidades, el enlazador comprende Val-Cit-pAB y una unidad espaciadora de PEG que une el enlazador con el resto de anticuerpo a través de una Mal.

[0015]En algunas modalidades, *p* es un entero entre 1 y 6, entre 2 y 5 o, preferentemente, entre 3 y 4. En algunas modalidades, *p* es 4. En algunas modalidades, se proporciona un grupo de ADC y la *p* promedio en el grupo es aproximadamente es aproximadamente 4 (p. ej., 3,5-4,5, tal como aproximadamente 3,8). En algunas modalidades, el enlazador comprende Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB. En algunas modalidades, el enlazador comprende Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB y *p* es 4. En algunas modalidades, se proporciona un grupo de ADC, en donde cada ADC comprende un enlazador de Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB y la *p* promedio en el grupo es de aproximadamente 4 (p. ej., 3,5-4,5, tal como aproximadamente 3,8).

[0016]En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización (Ab o resto de Ab) del ADC es un anticuerpo del receptor anti-folato alfa (FRA) o fragmento de anticuerpo de internalización, y se puede unir a células tumorales que expresan FRA (es decir, el ADC se dirige a células que expresan FRA). En algunas modalidades, el ADC que comprende un resto de Ab anti-FRA y un resto de péptido escindible demuestra niveles de agregación más bajos, mejor proporción anticuerpo:fármaco, mayor destrucción de células cancerosas en el objetivo, menor destrucción de células no cancerosas fuera del objetivo, mayor carga de fármaco (*p*), mayor citotoxicidad y/o potencia con respecto a un enlazador no escindible o un mecanismo de escisión alternativo. En algunas modalidades, el aumento de la potencia y/o citotoxicidad es un cáncer que expresa niveles moderados del antígeno objetivo del resto del anticuerpo del ADC (p. ej., expresión de FRA moderada). En algunas modalidades, el resto de péptido escindible se puede escindir por una enzima y el enlazador es un enlazador escindible de enzima. En algunas modalidades, la enzima es catepsina y el enlazador es un enlazador es un enlazador escindible de catepsina. En determinadas modalidades, el enlazador escindible de enzima (p. ej., enlazador escindible de catepsina) presenta una o más de las propiedades mejoradas mencionadas anteriormente, en comparación con un mecanismo de escisión alternativo. En algunas modalidades, el enlazador es un Mal-$(PEG)_m$-Val-Cit-pAB.

[0017]En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o el fragmento de unión al antígeno de internalización se une al receptor de folato alfa (FRA) y se dirige a células tumorales que expresan FRA. En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (CDR) y tres CDR de cadena ligera, en donde las CDR de cadena pesada comprenden CDR1 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:2, CDR2 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:3 y CDR3 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:4; y las tres CDR de cadena ligera comprenden CDR1 de cadena ligera que consiste en ID DE SEC. NO.:7, CDR2 de cadena ligera que

consiste en ID DE SEC. NO.:8 y CDR3 de cadena ligera que consiste en ID DE SEC. NO.:9, según lo definido por el sistema de numeración de Kabat; o en donde las CDR de cadena pesada comprenden CDR1 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:13, CDR2 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:14 y CDR3 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:15; y las CDR de cadena ligera comprenden CDR1 de cadena ligera que consiste en ID DE SEC. NO.:16, CDR2 de cadena ligera que consiste en ID DE SEC. NO.:17 y CDR3 de cadena ligera que consiste en ID DE SEC. NO.:18, según lo definido por el sistema de numeración de IMGT. En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización comprende secuencias marco humanas. En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización comprende un dominio variable de cadena pesada de ID DE SEC. NO.:23 y un dominio variable de cadena ligera de ID DE SEC. NO.:24. En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización comprende un dominio constante de cadena pesada de IgG1 humana y un dominio constante de cadena ligera de kappa de Ig. En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o el fragmento de unión al antígeno de internalización compite por la unión y/o se une al mismo epítopo que un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada de ID DE SEC. NO.:23 y un dominio variable de cadena ligera de ID DE SEC. NO.:24. En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o el fragmento de unión al antígeno de internalización se une a un epítopo que comprende alanina-histadina-lisina-ácido aspártico (AHKD) (ID DE SEC. NO.:365) (O'Shannessy et al., (2011) Oncotarget 2:1227-43). En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o el fragmento de unión al antígeno de internalización se une a un epítopo que comprende NTSQEAHKDVSYL (ID DE SEC. NO.:366).

[0018]En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o el fragmento de unión al antígeno de internalización es un anticuerpo anti-FRA de internalización o un fragmento de unión al antígeno de internalización. En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización comprende tres CDR de cadena pesada y tres CDR de cadena ligera, en donde las CDR de cadena pesada comprenden CDR1 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:2, CDR2 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:3 y CDR3 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:4; y las tres CDR de cadena ligera comprenden CDR1 de cadena ligera que consiste en ID DE SEC. NO.:7, CDR2 de cadena ligera que consiste en ID DE SEC. NO.:8 y CDR3 de cadena ligera que consiste en ID DE SEC. NO.:9, según lo definido por el sistema de numeración de Kabat; o en donde las CDR de cadena pesada comprenden CDR1 de cadena pesada que consiste en ID

DE SEC. NO.:13, CDR2 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:14 y CDR3 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:15; y las CDR de cadena ligera comprenden CDR1 de cadena ligera que consisten en ID DE SEC. NO.:16, CDR2 de cadena ligera que consisten en ID DE SEC. NO.:17 y CDR3 de cadena ligera que consisten en ID DE SEC. NO.:18, según lo definido por el sistema de numeración de IMGT; el enlazador comprende Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB; y *p* es 4. En algunas modalidades, se proporciona un grupo de dichas ADC y *p* es aproximadamente 4 (p. ej., aproximadamente 3,8). En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización comprende un dominio variable de cadena pesada de ID DE SEC. NO.:23 y un dominio variable de cadena ligera de ID DE SEC. NO.:24. En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización comprende un dominio constante de cadena pesada de IgG1 humana y un dominio constante de cadena ligera de kappa de Ig. En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización compite por la unión y/o se une al mismo epítopo que un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada de ID DE SEC. NO.:23 y un dominio variable de cadena ligera de ID DE SEC. NO.:24. En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o el fragmento de unión al antígeno de internalización se une a un epítopo que comprende ID DE SEC. NO.:365. En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o el fragmento de unión al antígeno de internalización se une a un epítopo que comprende ID DE SEC. NO.:366.

[0019]En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o el fragmento de unión al antígeno de internalización se une al receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (her2) y se dirige a las células tumorales que expresan her2. En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (CDR) y tres CDR de cadena ligera, en donde las CDR de cadena pesada comprenden CDR1 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:71, CDR2 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:72 y CDR3 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:73; y las tres CDR de cadena ligera comprenden CDR1 de cadena ligera que consiste en ID DE SEC. NO.:74, CDR2 de cadena ligera que consiste en ID DE SEC. NO.:75 y CDR3 de cadena ligera que consiste en ID DE SEC. NO.:76, según lo definido por el sistema de numeración de Kabat; o en donde las CDR de cadena pesada comprenden CDR1 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:191, CDR2 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:192 y CDR3 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:193; y las CDR de cadena ligera comprenden CDR1 de cadena ligera que consiste

en ID DE SEC. NO.:194, CDR2 de cadena ligera que consiste en ID DE SEC. NO.:195 y CDR3 de cadena ligera que consiste en ID DE SEC. NO.:196, según lo definido por el sistema de numeración de IMGT. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de internalización comprende secuencias marco humanas. En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización comprende un dominio variable de cadena pesada de ID DE SEC. NO.:27 y un dominio variable de cadena ligera de ID DE SEC. NO.:28. En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización comprende un dominio constante de cadena pesada de IgG1 humana y un dominio constante de cadena ligera de kappa de Ig. En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización compite por la unión y/o se une al mismo epítopo que un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada de ID DE SEC. NO.:27 y un dominio variable de cadena ligera de ID DE SEC. NO.:28.

[0020]En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o el fragmento de unión al antígeno de internalización es un anticuerpo anti-her2 de internalización o un fragmento de unión al antígeno de internalización. En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización comprende tres CDR de cadena pesada y tres CDR de cadena ligera, en donde las CDR de cadena pesada comprenden CDR1 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:71, CDR2 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:72 y CDR3 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:73; y las tres CDR de cadena ligera comprenden CDR1 de cadena ligera que consiste en ID DE SEC. NO.:74, CDR2 de cadena ligera que consiste en ID DE SEC. NO.:75 y CDR3 de cadena ligera que consiste en ID DE SEC. NO.:76, según lo definido por el sistema de numeración de Kabat; o en donde las CDR de cadena pesada comprenden CDR1 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:191, CDR2 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:192 y CDR3 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:193; y las CDR de cadena ligera comprenden CDR1 de cadena ligera que consisten en ID DE SEC. NO.:194, CDR2 de cadena ligera que consisten en ID DE SEC. NO.:195 y CDR3 de cadena ligera que consisten en ID DE SEC. NO.:196, según lo definido por el sistema de numeración de IMGT; el enlazador comprende Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB; y *p* es 4. En algunas modalidades, se proporciona un grupo de dichas ADC y *p* es aproximadamente 4 (p. ej., aproximadamente 3,8). En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización comprende un dominio variable de cadena pesada de ID DE SEC. NO.:27 y un dominio variable de cadena ligera de ID DE SEC. NO.:28. En algunas modalidades, el anticuerpo

de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización comprende un dominio constante de cadena pesada de IgG1 humana y un dominio constante de cadena ligera de kappa de Ig. En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización compite por la unión y/o se une al mismo epítopo que un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada de ID DE SEC. NO.:27 y un dominio variable de cadena ligera de ID DE SEC. NO.:28.

[0021]En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o el fragmento de unión al antígeno de internalización se une a la mesotelina (MSLN) y se dirige a células tumorales que expresan MSLN. En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (CDR) y tres CDR de cadena ligera, en donde las CDR de cadena pesada comprenden CDR1 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:65, CDR2 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:66 y CDR3 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:67; y las tres CDR de cadena ligera comprenden CDR1 de cadena ligera que consiste en ID DE SEC. NO.:68, CDR2 de cadena ligera que consiste en ID DE SEC. NO.:69 y CDR3 de cadena ligera que consiste en ID DE SEC. NO.:70, según lo definido por el sistema de numeración de Kabat; o en donde las CDR de cadena pesada comprenden CDR1 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:185, CDR2 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:186 y CDR3 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:187; y las CDR de cadena ligera comprenden CDR1 de cadena ligera que consiste en ID DE SEC. NO.:188, CDR2 de cadena ligera que consiste en ID DE SEC. NO.:189 y CDR3 de cadena ligera que consiste en ID DE SEC. NO.:190, según lo definido por el sistema de numeración de IMGT. En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización comprende un dominio variable de cadena pesada de ID DE SEC. NO.:25 y un dominio variable de cadena ligera de ID DE SEC. NO.:26. En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización comprende un dominio constante de cadena pesada de IgG1 humana y un dominio constante de cadena ligera de kappa de Ig. En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización compite por la unión y/o se une al mismo epítopo que un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada de ID DE SEC. NO.:25 y un dominio variable de cadena ligera de ID DE SEC. NO.:26.

[0022]En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o el fragmento de unión al antígeno de internalización es un anticuerpo anti-MSLN de internalización o un fragmento de unión al antígeno de

internalización. En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización comprende tres CDR de cadena pesada y tres CDR de cadena ligera, en donde las CDR de cadena pesada comprenden CDR1 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:65, CDR2 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:66 y CDR3 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:67; y las tres CDR de cadena ligera comprenden CDR1 de cadena ligera que consiste en ID DE SEC. NO.:68, CDR2 de cadena ligera que consiste en ID DE SEC. NO.:69 y CDR3 de cadena ligera que consiste en ID DE SEC. NO.:70, según lo definido por el sistema de numeración de Kabat; o en donde las CDR de cadena pesada comprenden CDR1 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:185, CDR2 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:186 y CDR3 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:187; y las CDR de cadena ligera comprenden CDR1 de cadena ligera que consisten en ID DE SEC. NO.:188, CDR2 de cadena ligera que consisten en ID DE SEC. NO.:189 y CDR3 de cadena ligera que consisten en ID DE SEC. NO.:190, según lo definido por el sistema de numeración de IMGT; el enlazador comprende Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB; y *p* es 4. En algunas modalidades, se proporciona un grupo de dichas ADC y *p* es aproximadamente 4 (p. ej., aproximadamente 3,8). En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización comprende un dominio variable de cadena pesada de ID DE SEC. NO.:25 y un dominio variable de cadena ligera de ID DE SEC. NO.:26. En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización comprende un dominio constante de cadena pesada de IgG1 humana y un dominio constante de cadena ligera de kappa de Ig. En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización compite por la unión y/o se une al mismo epítopo que un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada de ID DE SEC. NO.:25 y un dominio variable de cadena ligera de ID DE SEC. NO.:26.

[0023]En la presente también se proporcionan composiciones que comprenden múltiples copias de cualquiera de las ADC descritas, en donde la carga de fármaco promedio (*p* promedio) de las ADC en la composición es de entre aproximadamente 3 y 4, entre aproximadamente 3,5 y aproximadamente 4,5, o aproximadamente 4. En algunas modalidades, la *p* promedio es de entre aproximadamente 3,2 y 3,8. En algunas modalidades, la *p* promedio es de entre aproximadamente 3,6 y 4,4.

[0024]También se proporcionan en la presente composiciones que comprenden -L-D, en donde D es eribulina; y L es un enlazador escindible que se une mediante enlace covalente a D. En algunas modalidades, el enlazador escindible se une mediante enlace covalente a la amina C-35 en la eribulina.

En algunas modalidades, el enlazador escindible comprende Val-Cit. En algunas modalidades, el enlazador escindible comprende una unidad espaciadora PEG. En algunas modalidades, el enlazador escindible comprende Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB.

[0025]En la presente además se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un ADC y un diluyente, portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0026]Otro aspecto de la presente descripción incluye usos terapéuticos y de diagnóstico para los compuestos y composiciones de ADC descritos, p. ej., para tratar cáncer. Otro aspecto incluye métodos para tratar cáncer que expresa un antígeno objetivo del resto de anticuerpo del ADC, por ejemplo FRA. En diversas modalidades, se proporcionan métodos para destruir o inhibir la proliferación de células tumorales o células de cáncer mediante la administración de una cantidad y/o régimen terapéuticamente eficaz de cualquiera de los ADC descritos. Otro aspecto incluye métodos para detectar células tumorales o células de cáncer que expresan FRA utilizando los ADC descritos y métodos para seleccionar pacientes con cáncer que respondan al tratamiento con los ADC descritos. En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer gástrico, un cáncer de ovario seroso, un cáncer de ovario de células claras, un cáncer de pulmón de células no pequeñas, un cáncer colorrectal, un cáncer de mama triple negativo, un cáncer endometrial, un carcinoma endometrial seroso, un carcinoide de pulmón o un osteosarcoma. También se describen métodos para producir los ADC descritos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0027]La figura 1 muestra una de las metodologías utilizadas para preparar ADC de MORAb-003, tal como se describe en determinadas modalidades. En este enfoque, se generaron cisteínas desapareadas a través de la reducción parcial con equivalentes molares limitados del agente reductor no tiol TCEP. Este enfoque reduce preferentemente los enlaces disulfuro entre cadenas que unen la cadena ligera y la cadena pesada (un par por apareamiento H-L) y las dos cadenas pesadas en la región bisagra (dos pares por apareamiento H-H en el caso de IgG1 humana), dejando intactos los enlaces disulfuro entre cadenas.

[0028]La figura 2 muestra un método para sintetizar maleimida-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB-eribulina (mal-$(PEG)_2$-VCP-eribulina), tal como se describe en determinadas modalidades.

[0029]La figura 3 muestra un análisis SDS-PAGE de las condiciones de reducción para MORAb-003. Los carriles están indicados a la derecha de la figura. El carril M corresponde al estándar proteico; el carril 1 corresponde a MORAb-003 no tratado; el carril 2 corresponde a 5,3 mg/mL reducido en 70,6 µM TCEP; el carril 3 corresponde a 5,3 mg/mL de MORAb-003 reducido en 141,2 µM TCEP; el carril 4 corresponde a 1,5 mg/mL de MORAb-003 reducido en 20 µM TCEP; y el carril 5 corresponde a

1,5 mg/mL de MORAb-003 reducido en 40 µM TCEP. Las identidades de cada banda se indican en el gel derecho inferior. **"H"** indica cadena pesada. **"L"** indica cadena ligera.

[0030]La figura 4 muestra un análisis SDS-PAGE de las condiciones de reducción para MORAb-003. El carril 1 corresponde al estándar proteico; el carril 2 corresponde a MORAb-003 no tratado; el carril 3 corresponde a MORAb-003 tratado en una proporción de MORAb-003:TCEP de 1:1; el carril 4 corresponde a MORAb-003 tratado en una proporción de MORAb-003:TCEP de 1:2; el carril 5 corresponde a MORAb-003 tratado en una proporción de MORAb-003:TCEP de 1:3; y el carril 6 corresponde a MORAb-003 tratado en una proporción de MORAb-003:TCEP de 1:4.

[0031]La figura 5 muestra un análisis SDS-PAGE no reductor de ADC de MORAb-003 seleccionados, incluso M-MMAE (carril 2), M-DM1 (carril 3), M-0026 (carril 4), M-0260 (carril 5), M-0267 (carril 6), M-0272 (carril 7), M-0285 (carril 8), M-0292 (carril 9), M-027-0381 (carril 10) y M-0284 (carril 11).

[0032]La figura 6A muestra los resultados de un ensayo de citotoxicidad no específica de MORAb-003-maleimido-PEG2-Val-Cit-pAB-eribulina (M3-VCP-eribulina o **"**MORAb-202**"**). La figura 6B muestra los resultados de un ensayo de citotoxicidad no específica de MORAb-003-maleimido-$(CH_2)_5$-Val-Cit-pAB-ER-001150828 (M3-ER-61318). La figura 6C muestra los resultados de un ensayo de citotoxicidad no específica de MORAb-003-PEG-pAB-duostatina 3 (M3-027-0285). La información que se muestra en las leyendas de las figuras respectivas proporciona línea celular:agente evaluados (línea celular/líneas celulares cultivadas, densidad de siembra de 1º/2º línea celular).

[0033]Las figuras 7A y 7B muestran la distribución de la proporción de fármaco a anticuerpo (DAR) para MORAb-003-VCP-eribulina (figura 7A) y MORAb-003-0285 (figura 7B) de ADC con respecto a MORAb-003 no conjugado, tal como se describe en algunas modalidades. Los números sobre cada pico indican la DAR de las especies individuales.

[0034]La figura 8 muestra los resultados de un análisis de citotoxicidad -competencia de MORAb-003-VCP-eribulina con MORAb-003 no conjugado (2 µM) en células IGROV1 o SJSA-1.

[0035]La figura 9 muestra la cinética de peso corporal para cada grupo de ratones CD-1 (promedio por grupo y SEM) tratados con una dosis intravenosa simple de vehículo (PBS) o MORAb-202 en 10, 20, 40 o 80 mg/kg.

[0036]La figura 10 muestra la cinética del peso corporal para cada grupo de ratones CD-1 (promedio por grupo y SEM) tratados intravenosamente con PBS o con eribulina en 0,4, 0,8, 1,6 o 3,2 mg/kg, de acuerdo con un régimen de dosificación q4dx3 (dosis administradas una vez cada cuatro días para 3 dosis totales).

[0037]La figura 11 muestra la cinética del crecimiento tumoral para cada grupo de ratones CB17-SCID implantados con células hNSCLC NCI-H2110 (promedio por grupo y SEM) y tratados con una dosis intravenosa simple de PBS, MORAb-003-VCP-eribulina (MORAb-202) en 1, 2,5 o 5 mg/kg, o MORAb-003-0285 en 5 mg/kg.

[0038]La figura 12 muestra volúmenes tumorales de ratones CB17-SCID individuales implantados con células hNSCLC NCI-H2110, así como promedio por grupo y SEM, el día 17. Los grupos se trataron con una dosis intravenosa simple de PBS, MORAb-003-VCP-eribulina (MORAb-202) en 1, 2,5 o 5 mg/kg, o MORAb-003-0285 en 5 mg/kg.

[0039]La figura 13 muestra la cinética del peso corporal para cada grupo de ratones CB17-SCID implantados con NCI-H2110 (promedio por grupo y SEM) tratados con una dosis intravenosa simple de PBS, MORAb-003-VCP-eribulina (MORAb-202) en 1, 2,5 o 5 mg/kg, o MORAb-003-0285 en 5 mg/kg.

[0040]La figura 14 muestra la cinética del crecimiento tumoral para cada grupo de ratones CB17-SCID implantados con NCI-H2110 (promedio por grupo y SEM) tratados intravenosamente con vehículo (PBS) o con eribulina en 0,5, 0,2, 0,8 o 1,6 mg/kg, de acuerdo con un régimen de dosificación q4dx3.

[0041]La figura 15 muestra volúmenes tumorales de ratones CB17-SCID individuales implantados con NCI-H2110, así como el promedio por grupo y SEM, el día 24. Los grupos se trataron intravenosamente con vehículo (PBS) o con eribulina en 0,5, 0,2, 0,8 o 1,6 mg/kg, de acuerdo con un régimen de dosificación q4dx3.

[0042]La figura 16 muestra la cinética del peso corporal para cada grupo de ratones CB17-SCID implantados con NCI-H2110 (promedio por grupo y SEM) tratados intravenosamente con vehículo (PBS) o con eribulina en 0,5, 0,2, 0,8 o 1,6 mg/kg, de acuerdo con un régimen de dosificación q4dx3.

[0043]La figura 17 muestra la potencia de MORAb-003-VCP-eribulina (MORAb-202) en células IGROV1, OVCAR3, NCI-H2110, A431-A3 y SJSA-1, según lo medido mediante ensayo de citotoxicidad cristal violeta.

[0044]La figura 18 muestra la cinética del crecimiento tumoral para cada grupo de ratones CB17-SCID implantados con NCI-H2110 (promedio por grupo y SEM) tratados con una dosis intravenosa simple de PBS o MORAb-003-VCP-eribulina (MORAb-202) en 1, 2,5 o 5 mg/kg.

[0045]Las figuras 19A y 19B muestran la cinética del crecimiento tumoral (figura 19A) y la cinética del cambio del peso corporal (figura 19B) para cada grupo de ratones que presentan tumor NSCLC PDx (LXFA-737), (promedio por grupo y SEM), tratados con una dosis intravenosa simple de vehículo (PBS), MORAb-003 en 5 mg/kg o MORAb-003-VCP-eribulina (MORAb-202) en 5 mg/kg.

[0046]Las figuras 20A y 20B muestran las proporciones de volúmenes tumorales individuales (figura 20A) y la cinética del cambio de peso corporal (figura 20B) para cada grupo de ratones que presentan tumor de cáncer endometrial PDx (Endo-12961), (promedio por grupo y SEM), tratados con una dosis individual simple de PBS, eribulina en 0,1 o 3,2 mg/kg, o MORAb-003-VCP-eribulina (MORAb-202) en 5 mg/kg. Las figuras 20C y 20D muestran la cinética del crecimiento tumoral (figura 20C) y la cinética del cambio de peso corporal (figura 20D) para cada grupo de ratones que presentan tumor de cáncer endometrial PDx (Endo-10590), (promedio por grupo y SEM), tratados con una dosis individual simple de PBS, eribulina en 0,1 o 3,2 mg/kg, o MORAb-003-VCP-eribulina (MORAb-202) en 5 mg/kg.

[0047]La figura 21A muestra la tinción inmunohistoquímica (IHC) del tejido tumoral en ratones que presentan tumor TNBC PDx (OD-BRE-0631) con un anticuerpo de IgG anti-humano. Los tejidos tumorales de ratones tratados con una dosis intravenosa simple de vehículo (derecha) o MORAb-003-VCP-eribulina (MORAb-202) en 5 mg/kg (izquierda) se recogieron y se tiñeron 5 días después del tratamiento. La figura 21B muestra la tinción IHC del tejido tumoral en ratones que presentan tumor TNBC PDx (OD-BRE-0631) con un anticuerpo FITC de actina de músculo liso α (SMA). Los tejidos tumorales de los ratones no tratados se recogieron 2 días antes del tratamiento (izquierda), mientras que los tejidos tumorales de ratones tratados con una dosis intravenosa simple de MORAb-003-VCP-eribulina (MORAb-202) en 5 mg/kg se recogieron 5 días después del tratamiento (derecha). La figura 21C muestra la cinética del crecimiento tumoral para cada grupo de ratones que presentan tumor TNBC PDx (OD-BRE-0631), (promedio por grupo y SEM), tratados con una dosis intravenosa simple de vehículo (PBS) o MORAb-003-VCP-eribulia (MORAb-202) en 5 mg/kg.

[0048]La figura 22 muestra la diferenciación de células madre de la médula ósea humana-mesenquimales (BM-MSC) en cultivo con células MKN-74 después del tratamiento con vehículo (PBS o etanol), eribulina, MORAb-003 o MORAb-003-VCP-eribulina (MORAb-202), según lo medido mediante análisis de citometría de flujo. Stro-1^+/$CD105^+$, $CD34^+$/$CD31^-$ y $NG2^+$ son marcadores de MSC, adipocitos y pericitos, respectivamente.

[0049]La figura 23 muestra el análisis del transcurso del tiempo de tejidos tumorales de ratones CB17-SCID implantados con NCI-H2110 tratados con una dosis intravenosa simple de vehículo (PBS) o MORAb-003-VCP-eribulina (MORAb-202) en 5 mg/kg, tejidos con un anticuerpo FITC de actina de músculo liso α (SMA). Los tejidos tumorales se recogieron y tiñeron el día 0 y en los días 3, 5, 7 y 9 después del tratamiento. Eje Y: % = [células teñidas contadas/células totales contadas] * 100. Eje X: día (células totales contadas).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE MODALIDADES ILUSTRATIVAS

[0050]Las composiciones y métodos descritos se pueden entender más fácilmente mediante la referencia a la siguiente descripción detallada tomada en conexión con las figuras adjuntas, que forman parte de la presente descripción. Se entenderá que las composiciones y métodos descritos no se limitan a las composiciones y métodos específicos descritos y/o que se muestran en la presente, y que la terminología utilizada en la presente tiene el propósito de describir modalidades particulares a modo de ejemplo solamente y no se pretende que sea limitante de las composiciones y métodos reivindicados.

[0051]A lo largo de este texto, las descripciones se refieren a composiciones y métodos para utilizar dichas composiciones. Cuando la descripción describe o reivindica una característica o modalidad asociada con una composición, esa característica o modalidad es igualmente aplicable a los métodos para utilizar dicha composición. Asimismo, cuando la descripción describe o reivindica una característica o modalidad asociada con un método para utilizar una composición, esa característica o modalidad es igualmente aplicable a la composición.

[0052]Cuando se expresa un intervalo de valores, este incluye modalidades que utilizan cualquier valor particular dentro del intervalo. Además, la referencia a los valores establecidos en los intervalos incluye todos y cada uno de los valores dentro de ese intervalo. Todos los intervalos son inclusivos de sus puntos finales y son combinables. Cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del antecedente **"**aproximaciones**"**, se entenderá que el valor particular forma otra modalidad. La referencia a un valor numérico particular incluye al menos ese valor particular, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. El uso de **"**o**"** significa **"**y/o**"**, a menos que el contexto específico de su uso indique lo contrario. Todas las referencias mencionadas en la presente se incorporan mediante referencia a todos los efectos. En caso de conflicto entre la referencia y la memoria descriptiva, prevalecerá la memoria descriptiva.

[0053]Se apreciará que determinadas características de las composiciones y métodos descritos que se describen, por motivos de claridad, en el contexto de modalidades independientes, también se pueden proporcionar en combinación en una sola modalidad. Contrariamente, varias características de las composiciones y métodos descritos que se describen, por motivos de brevedad, en el contexto de una única modalidad se pueden proporcionar en forma separada o en cualquier subcombinación.

Definiciones

[0054]Varios términos referentes a los aspectos de la descripción se utilizan a lo largo de la memoria descriptiva y reivindicaciones. Tales términos deben tener su significado regular en la técnica a menos

que se especifique de otro modo. Otros términos definidos específicamente deben considerarse de modo coherente con las definiciones provistas en la presente.

[0055]Tal como se usa en la presente, las formas singulares **"**un**"**, **"**una**"**, **"**el**"** y **"**la**"** incluyen formas plurales a menos que el contexto claramente indique lo contrario.

[0056]Los términos "alrededor" o "aproximadamente" en el contexto de valores e intervalos numéricos se refieren a valores o intervalos que se aproximan o se encuentran cerca de los valores o intervalos mencionados de tal manera que la modalidad se puede realizar según se pretende, por ejemplo con una cantidad deseada de ácidos nucleicos o polipéptidos en una mezcla de reacción, tal como resulta evidente para el experto a partir de los principios contenidos en la presente. Esto se debe, al menos en parte, a las diferentes propiedades de las composiciones de ácido nucleico, la edad, la raza, el género, las variaciones anatómicas y fisiológicas y la inexactitud de los sistemas biológicos. Por ende, estos términos abarcan valores más allá de los resultantes del error sistemático.

[0057]Los términos **"**conjugado de anticuerpo-fármaco**"**, **"**conjugado de anticuerpo**"**, **"**conjugado**"**, **"**inmunoconjugado**"** y **"**ADC**"** se utilizan de forma indistinta y se refieren a un compuesto o derivado de este que se une a un anticuerpo (p. ej., un anticuerpo anti-FRA) y está definido por la fórmula genérica: Ab-(L-D)$_p$ (fórmula I), en donde Ab = un resto de anticuerpo (es decir, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno), L = un resto de enlazador, D = un resto de fármaco y p = la cantidad de restos de fármaco por resto de anticuerpo.

[0058]El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio para hacer referencia a una molécula de inmunoglobulina que reconoce y se une específicamente a una diana, tal como una proteína, polipéptido, carbohidrato, polinucleótido, lípido o combinaciones de los anteriores, a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno dentro de la región variable de la molécula de inmunoglobulina. La cadena pesada de un anticuerpo está compuesta por un dominio variable de cadena pesada (V_H) y una región constante de cadena pesada (C_H). La cadena ligera está compuesta por un dominio variable de cadena ligera (V_L) y un dominio constante de cadena ligera (C_L). A los efectos de la presente solicitud, cada uno de los dominios variables de cadena pesada y cadena ligera maduras comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) dentro de cuatro regiones marco (FR1, FR2, FR3 y FR4) dispuestas desde el extremo N hasta el extremo C: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Un "anticuerpo" puede ser natural o hecho por el hombre, por ejemplo anticuerpos monoclonales producidos mediante tecnología de hibridoma convencional. El término **"**anticuerpo**"** incluye anticuerpos monoclonales de longitud completa y anticuerpos policlonales de longitud completa,

así como fragmentos de anticuerpo tales como Fab, Fab', F(ab')2, Fv y anticuerpos de cadena simple. Un anticuerpo puede ser cualquiera de las cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG y IgM, o subclases de estas (p. ej., isotipos IgG1, IgG2, IgG3, IgG4). El término además abarca anticuerpos humanos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y cualquier molécula de inmunoglobulina modificada que contenga un sitio de reconocimiento del antígeno, siempre que demuestre la actividad biológica deseada.

[0059]El término "anticuerpo monoclonal", tal como se usa en la presente, hace referencia a un anticuerpo obtenido a partir de un población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y se dirigen a un único epítopo antigénico. En cambio, las preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales normalmente incluyen múltiples anticuerpos dirigidos contra (o específicos para) diferentes epítopos. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos considerablemente homogénea y no se debe interpretar que requiere la producción del anticuerpo a través de ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a utilizar de acuerdo con los métodos de la presente descripción pueden producirse mediante el método de hibridoma descrito en primera instancia por Kohler et ál. (1975) Nature 256:495, o se pueden producir mediante métodos de ADN recombinante (ver, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4,816,567). Anticuerpos monoclonales también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fagos mediante el uso de las técnicas que se describen en Clackson et ál. (1991) Nature 352:624-8 y Marks et ál. (1991) J. Mol. Biol. 222:581-97, por ejemplo.

[0060]Los anticuerpos monoclonales descritos en la presente incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos", en los cuales una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la o las cadenas son idénticas u homólogas a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como también fragmentos de dichos anticuerpos, siempre y cuando se unan específicamente al antígeno diana y/o exhiban la actividad biológica deseada.

[0061]El término "anticuerpo humano", tal como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo producido por un humano o un anticuerpo con una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo producido por un ser humano.

[0062]El término "anticuerpo quimérico", tal como se usa en la presente, se refiere a anticuerpos donde la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina deriva de dos o más especies. En algunos casos, las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras corresponden a las regiones variables de los anticuerpos derivados de una especie con la especificidad, afinidad y actividad deseada, mientras que las regiones constantes son homólogas a los anticuerpos derivados de otras especies (p. ej., ser humano) para minimizar una respuesta inmunitaria en la última especie.

[0063]Tal como se usa en la presente, la expresión **"**anticuerpo humanizado**"** se refiere a formas de anticuerpos que contienen secuencias de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos), así como anticuerpos humanos. Dichos anticuerpos son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, donde todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones marco (FR) son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente de una inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado puede modificarse adicionalmente con la sustitución de residuos ya sea en la región marco Fv y/o dentro de los residuos no humanos reemplazados para perfeccionar y optimizar la especificidad, afinidad y/o actividad del anticuerpo.

[0064]El término "fragmento de unión al antígeno" o "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo, tal como se utiliza en la presente, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (p. ej., FRA). Los fragmentos de unión al antígeno, preferentemente, también conservan la capacidad de internalizarse en una célula que expresa antígeno. En algunas modalidades, los fragmentos de unión al antígeno también conservan actividad efectora inmunitaria. Se ha demostrado que los fragmentos de un anticuerpo de longitud completa puede desempeñar la función de unión al antígeno de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro de la frase "fragmento de unión al antígeno" o "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L, V_H, C_L y C_{H1}; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_{H1}; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo; (v) un fragmento dAb, que comprende un dominio variable simple, p. ej., un dominio

V_H (véase, p. ej., Ward et ál. (1989) Nature 341:544-6; y Winter et ál., WO 90/05144); y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H, son codificados por genes separados, se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, por un enlazador sintético que les permite formarse como cadena proteína simple donde las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena simple (scFv)). Véase, p. ej., Bird et al. (1988) Science 242:423-6; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 85:5879-83. También se pretende que dichos anticuerpos de cadena simple estén abarcados dentro de la frase "fragmento de unión al antígeno" o "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo, y se conocen en la técnica como un tipo ejemplar de fragmento de unión que puede internalizarse en células tras la unión. Véase, p. ej., Zhu et ál. (2010) 9:2131-41; He et ál. (2010) J. Nucl. Med. 51:427-32; y Fitting et ál. (2015) MAbs 7:390-402. En determinadas modalidades, las moléculas scFv se pueden incorporar en una proteína de fusión. Otras formas de anticuerpos de cadena simple, tales como los diacuerpos, también están comprendidas. Los diacuerpos son anticuerpos biespecíficos bivalentes en los cuales los dominios V_H y V_L se expresan en una cadena de polipéptidos simple, pero mediante el uso de un enlace que es muy corto para permitir el emparejamiento entre dos dominios de la misma cadena, obligando de esta manera a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígenos (véase, p. ej., Holliger et ál. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 90:6444-8; y Poljak et ál. (1994) Structure 2:1121-3). Los fragmentos de unión al antígeno se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y se analiza la utilidad (p. ej., afinidad de unión, internalización) de los fragmentos de unión de la misma forma que los anticuerpos intactos. Los fragmentos de unión al antígeno se pueden preparar por escisión de la proteína intacta, p. ej., mediante escisión de proteasa o química.

[0065]**"**Internalizar**"**, tal como se utiliza en la presente con referencia a un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se puede tomar a través de la membrana bicapa lipídica de una célula en un compartimiento interno (es decir, **"**internalizado**"**) tras la unión a la célula, preferentemente en un compartimiento degradante en la célula. Por ejemplo, un anticuerpo anti-FRA de internalización es uno que se puede tomar en la célula después de la unión a FRA en la membrana celular.

[0066]La frase **"**receptor de folato alfa**"** o **"**FRA**"**, tal como se utiliza en la presente, se refiere a cualquier forma natural de FRA humano. La frase abarca FRA de longitud completa (p. ej., secuencias de referencia NCBI: NP_000793; ID DE SEC. NO.: 19), así como cualquier forma de FRA humano

derivado del procesamiento celular. La frase también abarca variantes naturales de FRA, incluso, entre otros, variantes de corte y empalme, variantes alélicas e isoformas. El FRA puede ser aislado de un ser humano o se puede producir recombinantemente o a través de métodos sintéticos.

[0067]La frase "anticuerpo anti-FRA" o **"**anticuerpo que se une específicamente a FRA**"** se refiere a cualquier forma de anticuerpo o fragmento de este que se une específicamente a FRA y abarca anticuerpos monoclonales (incluso anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales y fragmentos de anticuerpo biológicamente funcionales siempre que se unan específicamente a FRA. Preferentemente, el anticuerpo anti-FRA utilizado en los ADC descritos en la presente es un anticuerpo de internalización o fragmento de anticuerpo de internalización. MORAb-003 es un anticuerpo FRA anti-humano de internalización ejemplar. Tal como se utiliza en la presente, las frases "específico" y "se une específicamente" se refieren a la unión selectiva del anticuerpo al epítopo del antígeno diana. Los anticuerpos se pueden evaluar para detectar su especificidad de unión mediante la comparación de la unión a un antígeno adecuado con la unión a un antígeno o mezcla de antígenos irrelevante en un determinado conjunto de condiciones. Si el anticuerpo se une al antígeno adecuado con al menos 2, 5, 7 y preferentemente 10 veces más de afinidad que al antígeno o mezcla de antígenos irrelevante, se considera específico. En una modalidad, un anticuerpo específico es uno que se une al antígeno de FRA, pero no se une (o presenta unión mínima) a otros antígenos.

[0068]La frase **"**receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano**"**, **"**her2**"** o **"**her2/neu**"**, tal como se utiliza en la presente, se refiere a cualquier forma natural de her2 humano. La frase abarca her2 de longitud completa (p. ej., secuencias de referencia NCBI: NP_004439.2; ID DE SEC. NO.: 21), así como cualquier forma de her2 humano derivado del procesamiento celular. La frase también abarca variantes naturales de her2, incluso, entre otros, variantes de corte y empalme, variantes alélicas e isoformas. El Her2 puede ser aislado de ser humano o se puede producir recombinantemente o a través de métodos sintéticos.

[0069]La frase **"**anticuerpo anti-her2**"** o **"**anticuerpo que se une específicamente a her2**"** se refiere a cualquier forma de anticuerpo o fragmento de este que se une específicamente a her2 y abarca anticuerpos monoclonales (incluso anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales y fragmentos de anticuerpo biológicamente funcionales siempre que se unan específicamente a her2. La patente estadounidense N.º 5.821.337 (incorporada a la presente mediante referencia) proporciona secuencias de unión a her2 ejemplares, incluso secuencias de anticuerpo anti-her2 ejemplares. Preferentemente, el anticuerpo anti-her2 utilizado en los ADC descritos en la presente

es un anticuerpo de internalización o fragmento de anticuerpo de internalización. Trastuzumab es un anticuerpo her2 anti-humano de internalización ejemplar.

[0070]El término **"**epítopo**"** se refiere a una porción de un antígeno capaz de ser reconocido y unirse específicamente a un anticuerpo. Cuando el antígeno es un polipéptido, los epítopos pueden formarse a partir de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos mediante plegamiento terciario del polipéptido. El epítopo unido por un anticuerpo puede ser identificado utilizando cualquier técnica de mapeo de epítopos conocida en la técnica, incluso cristalografía de rayos X para identificación de epítopos mediante visualización directa del complejo antígeno-anticuerpo, así como monitorizando la unión del anticuerpo a fragmentos o variaciones mutadas del antígeno, o monitorizando la accesibilidad solvente de diferentes partes del anticuerpo y el antígeno. Las estrategias ejemplares para mapear epítopos de anticuerpo incluyen, entre otros, escaneo de oligopéptidos basado en matrices, proteólisis limitada, mutagénesis dirigida al sitio, mapeo de mutagénesis de alto rendimiento, intercambio de hidrógeno-deuterio y espectrometría de masas (véase, p. ej., Gershoni et ál. (2007) 21:145-56; y Hager-Braun y Tomer (2005) Expert Rev. Proteomics 2:745-56).

[0071]También se pueden utilizar unión competitiva y unión al epítopo para determinar los anticuerpos que comparten epítopos idénticos o superpuestos. La unión competitiva se puede evaluar utilizando un ensayo de bloqueo cruzado, por ejemplo el ensayo descrito en **"**Antibodies, A Laboratory Manual,**"** Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow y Lane (1º edición 1988, 2º edición 2014). En algunas modalidades, la unión competitiva se identifica cuando un anticuerpo o proteína de unión de prueba reduce la unión de un anticuerpo o proteína de unión de referencia a un antígeno diana tal como FRA o her2 (p. ej., una proteína de unión que comprende CDR y/o dominios variables seleccionados de los identificados en las tablas 2, 4 y 6), en al menos aproximadamente un 50 % en el ensayo de bloqueo cruzado (p. ej., 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 %, 99,5 % o más, o cualquier porcentaje intermedio) y/o viceversa. En algunas modalidades, la unión competitiva puede ser debido a epítopos compartidos o similares (p. ej., parcialmente superpuestos) o debido a un impedimento estérico cuando los anticuerpos o proteínas de unión se unen en epítopos cercanos. *Véase, p. ej*., Tzartos, Methods in Molecular Biology (Morris, ed. (1998) vol. 66, pp. 55-66). En algunas modalidades, la unión competitiva se puede utilizar para ordenar los grupos de proteínas de unión que comparten epítopos similares, p. ej., las que compiten por la unión se pueden unir como un grupo de proteínas de unión que tienen epítopos superpuestos o cercanos, mientras las que no compiten se colocan en un grupo separado de proteínas de unión que no tienen epítopos superpuestos o cercanos.

[0072]El término "k_{on}" o "k_a" se refiere a la constante asociada de asociación de un anticuerpo al antígeno para formar el complejo anticuerpo/antígeno. La velocidad puede ser determinada utilizando ensayos estándar, por ejemplo un ensayo Biacore o ELISA.

[0073]El término "k_{off}" o "k_d" se refiere a la constante disociada de disociación de un anticuerpo del complejo de anticuerpo/antígeno. La velocidad puede ser determinada utilizando ensayos estándar, por ejemplo un ensayo Biacore o ELISA.

[0074]El término "K_D" se refiere a la constante de disociación de equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno particular. K_D se calcula mediante k_a/k_d. La velocidad puede ser determinada utilizando ensayos estándar, por ejemplo un ensayo Biacore o ELISA.

[0075]La frase **"***p***"**, **"**proporción de anticuerpo:fármaco**"**, **"**proporción de fármaco a anticuerpo**"** o **"**DAR**"** se refiere a la cantidad de restos de fármaco por resto de resto de anticuerpo, es decir, carga de fármaco, o la cantidad de restos -L-D por anticuerpo o fragmento de unión al antígeno (Ab) en ADC de fórmula I. En las composiciones que comprenden múltiples copias de ADC de fórmula I, **"***p***"** se refiere a la cantidad promedio de restos -L-D por anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, también denominada carga de fármaco promedio.

[0076]Un **"**enlazador**"** o **"**resto de enlazador**"** es cualquier resto químico capaz de unir covalentemente un compuesto, usualmente un resto de fármaco tal como un agente quimioterapéutico, con otro resto tal como un resto de anticuerpo. Los enlazadores pueden ser susceptibles o sustancialmente resistentes a la escisión inducida por ácido, la escisión inducida por peptidasa, la escisión inducida por luz, la escisión inducida por esterasa y/o la escisión de enlace de disulfuro, en condiciones en las que el compuesto o el anticuerpo permanecen activos.

[0077]El término **"**agente**"** se utiliza en la presente para hacer referencia a un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica, o un extracto hecho a partir de sustancias biológicas. La frase **"**agente terapéutico**"**, **"**fármaco**"** o **"**resto de fármaco**"** se refiere a un agente capaz de modular un proceso biológico y/o tiene actividad biológica.

[0078]La frase "agente quimioterapéutico" o **"**agente anticanceroso**"** se utiliza en la presente para hacer referencia a todos los compuestos químicos que son eficaces para tratar cáncer independientemente del mecanismo de acción. La inhibición de metástasis o angiogénesis, frecuentemente, es una propiedad de un agente quimioterapéutico. Los ejemplos no taxativos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes, por ejemplo, mostazas de nitrógeno, compuestos de etilenimina y sulfonatos de alquilo; antimetabolitos, por ejemplo, ácido fólico, purina o antagonistas de pirimidina; agentes antimitóticos,

por ejemplo, agentes anti-tubulina tal como eribulina o mesilato de eribulina (Halaven™) o derivados de estos, alcaloides de la vinca y auristatinas; antibióticos citotóxicos; compuestos que dañan o interfieren con la expresión o replicación de ADN, por ejemplo, aglutinantes de la ranura menor de ADN; y antagonistas del receptor del factor de crecimiento. Además, los agentes quimioterapéuticos incluyen anticuerpos, moléculas biológicas y moléculas pequeñas. Un agente quimioterapéutico puede ser un agente citotóxico o citostático. La frase **"**agente citostático**"** se refiere a un agente que inhibe o suprime el crecimiento celular y/o la multiplicación de células.

[0079]La frase "agente citotóxico" se refiere a una sustancia que provoca muerte celular principalmente mediante la interferencia con la actividad y/o funcionamiento de la expresión de una célula. Los ejemplos de agentes citotóxicos incluyen, entre otros, agente antimitóticos, por ejemplo eribulina, auristatinas (p. ej., auristatina de monometilo E (MMAE), auristatina de monometilo F (MMAF)), maitansinoides (p. ej., maitansina), dolastatinas, duostatinas, criptoficinas, alcaloides de la vinca (p. ej., vincristina, vinblastina), taxanos, taxoles y colchicinas; antraciclinas (p. ej., daunorubicina, doxorubicina, dihidroxiantracindiona); antibióticos citotóxicos (p. ej., mitomicinas, actinomicinas, duocarmicinas (p. ej., CC-1065), auromicinas, duomicinas, calicheamicinas, endomicinas, fenomicinas); agentes alquilantes (p. ej., cisplatina); agentes intercalantes (p. ej., bromuro de etidio); inhibidores de topoisomerasa (p. ej., etopósido, tenopósido); radioisótopos, por ejemplo At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212} o ^{213}, P^{32}, e isótopos radiactivos de lutetio (p. ej., Lu^{177}); y toxinas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal (p. ej., ricina (p. ej., cadena A de ricina), toxina difteria, exotoxina A de *Pseudomonas* (p. ej., PE40), endotoxina, mitogelina, combrestatina, restrictocina, gelonina, alfa-sarcina, abrina (p. ej., cadena A de abrina), modeccina (p. ej., cadena A de modeccina), curicina, crotina, inhibidor de *Sapaonaria officinalis*, glucocorticoides).

[0080]El término **"**eribulina**"**, tal como se utiliza en la presente, se refiere a un análogo sintético de halicondrina B, un compuesto macrocíclico que originalmente fue aislado de la esponja marina *Halichondria okadais*. La frase **"**resto de fármaco de eribulina**"** se refiere al componente de un ADC que tiene la estructura de eribulina y está unido al enlazador del ADC mediante su amina C-35. Eribulina es un inhibidor dinámico de microtúbulos, que se cree que se une a tubulina e induce la detención del ciclo celular en la fase G2/M mediante la inhibición del ensamblaje del huso mitótico. La frase **"**mesilato de eribulina**"** se refiere a la sal mesilato de eribulina, que es comercializada con el nombre comercial Halaven™.

[0081]El término "homóloga" se refiere a una molécula que presenta homología con otra molécula, por

ejemplo, al tener secuencias de residuos químicos que son los mismos o similares en posiciones correspondientes.

[0082]El término "inhibir" o "inhibición de", tal como se utiliza en la presente, significa reducir en una cantidad mensurable y puede incluir pero no requiere una prevención o inhibición completa.

[0083]La frase **"**negativo de diana**"** o **"**negativo de antígeno diana**"** se refiere a la ausencia de expresión de antígeno diana de una célula o tejido. La frase **"**positivo de diana**"** o **"**positivo de antígeno diana**"** se refiere a la presencia de expresión de antígeno diana. Por ejemplo, una célula o una línea celular que no expresa un antígeno diana se puede describir como negativo de diana, mientras que una célula o línea celular que expresa un antígeno diana se puede describir como positivo de diana.

[0084]La frase **"**destrucción no específica**"** o **"**efecto no específico**"** se refiere a la destrucción de células negativas de diana en presencia de células positivas de diana, en donde la destrucción de células negativas de diana no se observa en ausencia de células positivas de diana. El contacto entre las células, o al menos la proximidad entre células positivas de diana y negativas de diana, permite la destrucción no específica. Este tipo de destrucción se distingue de **"**destrucción fuera del objetivo**"**, que se refiere a la destrucción indiscriminada de células negativas de diana. La **"**destrucción fuera del objetivo**"** se puede observar en ausencia de células positivas de diana.

[0085]El término **"**cáncer**"** se refiere a la afección fisiológica en mamíferos donde una población de células se caracteriza por tener un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cánceres incluyen, de modo taxativo, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer microcítico de pulmón, cáncer no microcítico de pulmón, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de células escamosas de pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer del cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama (p. ej., cáncer de mama triple negativo), osteosarcoma, melanoma, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer endometrial (p. ej., seroso) o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y varios tipos de cánceres de cabeza y cuello. Cáncer de mama triple negativo se refiere a un cáncer de mama que es negativo para la expresión de los genes para el receptor de estrógeno (ER), el receptor de progesterona (PR) o Her2/neu.

[0086]Los términos "tumor" y "neoplasma" se refieren a cualquier masa de tejido que resulta del crecimiento celular o proliferación excesivos, ya sea benigno o maligno que incluye lesiones

precancerosas.

[0087]Las frases **"**célula de cáncer**"** y **"**célula tumoral**"** se refieren a células individuales o a la población total de células derivadas de un tumor, incluidas células no tumorígenas y células madre cancerosas. Tal como se utiliza en la presente, el término **"**célula tumoral**"** se modificará por el término **"**no tumorigénica**"** cuando se refiere solamente a aquellas células tumorales que carecen de la capacidad de renovarse y diferenciarse para distinguir aquellas células tumorales de las células madre cancerosas.

[0088]Los términos **"**sujeto**"** y **"**paciente**"** en la presente se utilizan de manera intercambiable para hacer referencia a cualquier animal, por ejemplo mamífero, incluso, entre otros, seres humanos, primates no humanos, roedores y similares. En algunas modalidades, el mamífero es un ratón. En algunas modalidades, el mamífero es un humano.

[0089]El término **"**coadministración**"**o administración **"**en combinación con**"** uno o más agentes terapéuticos incluye la administración concurrente y consecutiva en cualquier orden.

[0090]Una **"**composición farmacéutica**"** se refiere a una preparación en forma tal que permite la administración y, posteriormente, proporciona la actividad biológica prevista de los ingredientes activos y/o logra un efecto terapéutico, y que no contiene ningún componente adicional que resulte inaceptablemente tóxico para un sujeto al cual se administre la formulación. La composición farmacéutica puede ser estéril.

[0091]Un "excipiente farmacéutico" comprende un material tal como un adyuvante, un portador, agentes amortiguadores y de ajuste de pH, agentes de ajuste de tonicidad, agentes humectantes, conservantes y similares.

[0092]"Farmacéuticamente aceptable" significa aprobado o aprobable por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal, o enumerado en la Farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea reconocida en general, para su uso en animales y, más específicamente, en seres humanos.

[0093]Una **"**cantidad eficaz**"** de un ADC, según se describe en la presente, es una cantidad suficiente para realizar un propósito indicado específicamente, por ejemplo para producir un efecto terapéutico después de la administración, tal como una reducción de la velocidad de crecimiento tumoral o el volumen tumoral, una reducción en un síntoma de cáncer o algún otro indicio de eficacia en el tratamiento. Una cantidad eficaz puede ser determinada de manera rutinaria con relación al propósito establecido. El término **"**cantidad terapéuticamente eficaz**"** se refiere a una cantidad de un ADC eficaz para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto. En el caso del cáncer, una cantidad terapéuticamente eficaz de ADC puede reducir la cantidad de células de cáncer, reducir el tamaño tumoral, inhibir (p. ej.,

ralentizar o detener) la metástasis tumoral, inhibir (p. ej., ralentizar o detener) el crecimiento tumoral y/o aliviar uno o más síntomas. Una "cantidad profilácticamente eficaz" hace referencia a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios, para alcanzar el resultado profiláctico deseado. Típicamente, dado que se utiliza una dosis profiláctica antes o en una etapa temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

[0094]Tal como se utilizan en la presente, "para tratar" o "terapéutico" y los términos relacionados gramaticalmente, se refieren a cualquier mejora de cualquier consecuencia de enfermedad, por ejemplo supervivencia prolongada, menos morbilidad y/o una disminución de los efectos secundarios que son los subproductos de una modalidad terapéutica alternativa. Tal como se aprecia fácilmente en la técnica, la erradicación completa de una enfermedad es una opción preferida pero no es un requisito para un acto de tratamiento. **"**Tratamiento**"** o **"**tratar**"**, tal como se utiliza en la presente, se refiere a la administración de un ADC descrito en un sujeto, p. ej., un paciente. El tratamiento puede ser para curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, mejorar, paliar, favorecer o afectar el trastorno, los síntomas del trastorno o la predisposición al trastorno, p. ej., un cáncer.

[0095]En algunas modalidades, se utiliza un ADC etiquetado. Las "etiquetas" adecuadas incluyen radionucleidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, restos fluorescentes, restos quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares.

[0096]"Proteína", tal como se utiliza en la presente, significa al menos dos aminoácidos unidos covalentemente. El término abarca polipéptidos, oligopéptidos y péptidos. En algunas modalidades, los dos o más aminoácidos unidos covalentemente están unidos por un enlace peptídico. La proteína puede estar compuesta por aminoácidos de origen natural y enlaces peptídicos, por ejemplo cuando la proteína se hace recombinantemente utilizando sistemas de expresión y células hospedadoras. Alternativamente, la proteína puede incluir aminoácidos sintéticos (p. ej., homofenilalanina, citrulina, ornitina y norleucina) o estructuras peptidomiméticas, es decir, "análogos de péptidos o proteínas", por ejemplo peptoides. Los peptoides son una clase ejemplar de peptidomiméticos cuyas cadenas laterales están unidas al átomo de nitrógeno de la estructura principal peptídica, en lugar de estar unidas a los carbonos α (como están en los aminoácidos), y tienen diferentes enlaces de hidrógeno y características conformacionales en comparación con los péptidos (véase, p. ej., Simon et ál. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 89:9367). Como tal, los peptoides pueden ser resistentes a proteólisis u otras condiciones fisiológicas o de almacenamiento, y eficaces en la permeación de las membranas celulares. Dichos aminoácidos sintéticos se pueden incorporar en particular cuando el anticuerpo se sintetiza *in vitro* a

través de métodos convencionales conocidos en la técnica. Además, se puede utilizar cualquier combinación de residuos/estructuras peptidomiméticos, sintéticos y de origen natural. "Aminoácido" también incluye residuos de aminoácidos, por ejemplo prolina e hidroxiprolina. El "grupo R" o "cadena lateral" del aminoácido puede estar en cualquiera de las configuraciones (L) o (S). En una modalidad específica, los aminoácidos están en la configuración (L) o (S).

[0097]Una "proteína recombinante" es una proteína hecha utilizando técnicas recombinantes que utilizan cualquier técnica y método conocido en la técnica, es decir, a través de la expresión de un ácido nucleico recombinante. Los métodos y técnicas para la producción de proteínas recombinantes son conocidos en la técnica.

[0098]Una proteína "aislada" no está acompañada por al menos parte del material con el cual se asocia normalmente en su estado natural, por ejemplo constituyendo al menos aproximadamente el 5 %, o al menos aproximadamente el 50 % en peso del total de proteína en una muestra dada. Se entiende que la proteína aislada puede constituir de 5 a 99.9% en peso del contenido total de proteínas según las circunstancias. Por ejemplo, la proteína puede realizarse a una concentración significativamente más alta mediante el uso de un promotor inducible o promotor de alta expresión, de modo que la proteína se realice a niveles de concentración aumentados. La definición incluye la producción de un anticuerpo en una amplia variedad de organismos y/o células hospedadoras conocidas en la técnica.

[0099]La identidad y/o similitud de secuencia de las secuencias de aminoácidos se pueden determinar utilizando técnicas estándar conocidas en la técnica, incluso, entre otros, el algoritmo de identidad de secuencia local de Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482, el algoritmo de alineamiento de identidad de secuencia de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443, el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. EUA 85:2444, las implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el paquete de software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.), el programa de secuencia Best Fit descrito por Devereux et ál. (1984) Nucl. Acid Res. 12:387-95, preferentemente utilizando las configuraciones por defecto o por inspección. Preferentemente, la identidad de secuencia se calcula a través de FastDB según los siguientes parámetros: penalización por mal emparejamiento de 1; penalización por huecos de 1; penalización por tamaño de hueco de 0,33; y penalización de unión de 30 ("Current Methods in Sequence Comparison and Analysis," Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pp. 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc).

[00100]Un ejemplo de algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea una alineación de secuencias múltiples a

partir de un grupo de secuencias relacionadas usando alineaciones progresivas por pares. También puede trazarse un árbol que muestre las relaciones de agrupamiento usadas para crear la alineación. PILEUP usa una simplificación del método de alineamiento progresivo de Feng & Doolittle (1987) J. Mol. Evol. 35:351-60; el método es similar al descrito por Higgins y Sharp (1989) CABIOS 5:151-3. Los parámetros de PILEUP útiles que incluyen un peso de brecha por defecto de 3.00, un peso longitud de brecha por defecto de 0.10, y brechas finales ponderadas.

[00101] Otro ejemplo de un algoritmo útil es el algoritmo BLAST, descrito en: Altschul et ál. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10; Altschul et ál. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-402; y Karin et ál. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 90:5873-87. Un programa BLAST particularmente útil es al programa WU-BLAST-2 que se obtuvo de Altschul et ál. (1996) Methods in Enzymology 266:460-80. El WU-BLAST-2 utiliza varios parámetros de búsqueda, la mayoría de los cuales se encuentran configurados en los valores predeterminados. Los parámetros ajustables se configuran a los siguientes valores: lapso de superposición=l; fracción de superposición=0,125, umbral de palabra (T)=II. Los parámetros HSP S y HSP S2 son valores dinámicos establecidos por el propio programa dependiendo de la composición de la secuencia particular o composición de la base de datos particular contra la cual se busca la secuencia de interés; sin embargo, los valores se puede ajustar para aumentar la sensibilidad.

[00102] Un algoritmo útil adicional es BLAST con brechas según informa Altschul et ál. (1993) Nucl. Acids Res. 25:3389-402. BLAST con brechas usa puntuaciones de sustitución BLOSUM-62; parámetro T de umbral establecido hasta 9; los métodos TWO-HIT para activar extensiones sin brechas, carga longitudes de brechas de k un costo de 10+k; Xu establecido hasta 16 y Xg establecido hasta 40 para la etapa de búsqueda en bases de datos y hasta 67 para la etapa de resultado de los algoritmos. Las alineaciones con brechas se activan mediante una puntuación correspondiente a alrededor de 22 bits.

[00103] En general, la homología, similitud o identidad de aminoácidos entre las proteínas descritas en la presente y variantes de estas, incluidas variantes de FRA, variantes de her2, variantes de secuencias de tubulina y variantes de dominios variables de anticuerpos (incluso CDR de variante individual), son de al menos el 80 % con las secuencias ilustradas en la presente y, más típicamente, con homologías o identidades preferentemente crecientes de al menos el 85 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % y casi el 100 % o 100 %.

[00104] De manera similar, "el porcentaje (%) de identidad de secuencia de ácido nucleico" con respecto a la secuencia de ácido nucleico de los anticuerpos y otras proteínas identificadas en la presente se define como el porcentaje de residuos de nucleótidos en una secuencia candidata idénticos con los

residuos de nucleótidos en la secuencia codificante de la proteína de unión al antígeno. Un método específico utiliza el módulo BLASTN de WU-BLAST-2 establecido en los parámetros por defecto, con alcance de superposición y fracción de superposición establecidos a 1 y 0,125, respectivamente.

[00105] Aunque el sitio o región para introducir una variación de secuencia de aminoácidos se predetermina, la mutación per se no necesita predeterminarse. Por ejemplo, para optimizar el rendimiento de una mutación en un sitio determinado, se puede realizar mutagénesis aleatoria en el codón o región diana y se pueden analizar las variantes de CDR de proteína de unión al antígeno expresadas para obtener la combinación óptima de la actividad deseada. Las técnicas para realizar mutaciones de sustitución en sitios predeterminados en ADN que tiene una secuencia conocida son conocidas, por ejemplo, mutagénesis por cebador de MI3 y mutación por PCR.

Conjugados anticuerpo-fármaco

[00106] Los compuestos de la presente descripción incluyen los que tienen actividad anticancerosa. En particular, los compuestos incluyan un resto de anticuerpo (incluso un fragmento de unión al antígeno de este) conjugado (es decir, unido por enlace covalente mediante un enlazador) con un resto de fármaco, en donde el resto de fármaco, cuando no está conjugado con un resto de anticuerpo, tiene un efecto citotóxico o citostático. En diversas modalidades, el resto de fármaco presenta citotoxicidad reducida o no presenta citotoxicidad cuando está unido en un conjugado pero reanuda la citotoxicidad después de la escisión de un enlazador y resto de anticuerpo. En diversas modalidades, el resto de fármaco presenta destrucción no específica reducida o nula cuando está unido en un conjugado (p. ej., utilizando un enlazador no escindible), pero presenta mayor destrucción no específica después de la escisión de un conjugado (p. ej., un conjugado que tiene un resto escindible Val-Cit escindible).

[00107] El desarrollo y producción de un ADC para su uso como un agente terapéutico humano, p. ej., como un agente oncológico, puede requerir más que la identificación de un anticuerpo capaz de unirse a una diana o dianas deseadas y unirse a un fármaco utilizado por sí mismo para tratar cáncer. Unir el anticuerpo con el fármaco puede tener efectos significativos e impredecibles en la actividad de uno o ambos del anticuerpo y el fármaco, los cuales efectos varían dependiendo del tipo de enlazador y/o fármaco elegido. Por lo tanto, en algunas modalidades, los componentes del ADC se seleccionan para (i) conservar una o más propiedades terapéuticas presentadas por los restos de anticuerpo y fármaco en aislamiento, (ii) mantener las propiedades de unión específica del resto de anticuerpo; (iii) optimizar las proporciones de carga de fármaco y fármaco a anticuerpo; (iv) permitir la administración, p. ej., administración intracelular, del resto de fármaco mediante unión estable al resto de anticuerpo; (v)

conservar la estabilidad de ADC como un conjugado intacto hasta el transporte o administración en un sitio diana; (vi) minimizar la agregación del ADC antes o después de la administración; (vii) permitir el efecto terapéutico, p. ej., efecto citotóxico, del resto de fármaco después de la escisión en el entorno celular; (viii) presentar eficacia en el tratamiento contra el cáncer *in vivo* comparable o superior a la de los restos de anticuerpo y fármaco en aislamiento; (ix) minimizar la destrucción fuera del objetivo del resto de fármaco; y/o (x) presentar propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas deseables, y perfiles toxicológicos/inmunológicos. La detección de cada una de estas propiedades puede ser necesaria para identificar un ADC mejorado para uso terapéutico (Ab et ál. (2015) Mol. Cancer Ther. 14:1605-13).

[00108]En diversas modalidades, los ADC descritos en la presente presentan propiedades inesperadamente favorables en algunas o en cada una de las categorías enumeradas anteriormente. Por ejemplo, en algunas modalidades, las construcciones de ADC que comprenden una unión de Mal a un anticuerpo, una unidad espaciadora de PEG (preferentemente una unidad espaciadora de PEG corta) y/o enlazador escindible peptídico (p. ej., un enlazador Val-Cit) presentan perfiles de carga de fármaco, agregación y/o estabilidad sorprendentemente favorables, y/o conservan la función de unión del anticuerpo, la actividad del fármaco y/o una destrucción no específica mejorada, mientras reducen la destrucción fuera del objetivo, en comparación con los ADC que utilizan otras estructuras de enlazador escindible o no escindible.

[00109]En algunas modalidades, un ADC que comprende un enlazador Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB que une eribulina con un anticuerpo (p. ej., un anticuerpo anti-FRA tal como MORAb-003) presenta propiedades particularmente favorables en todas las categorías enumeradas, en comparación con otros enlazadores escindibles o no escindibles que unen eribulina con un resto de anticuerpo. En algunas modalidades, un ADC que comprende un enlazador Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB que une eribulina con un anticuerpo (p. ej., un anticuerpo anti-FRA tal como MORAb-003) presenta propiedades de destrucción no específica particularmente favorables en comparación con un ADC no escindible. En algunas modalidades, un ADC que comprende un enlazador Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB que une eribulina con un anticuerpo (p. ej., un anticuerpo anti-FRA tal como MORAb-003) presenta propiedades de destrucción no específica particularmente favorables en comparación con un ADC que utiliza estructuras de enlazador escindible alternativas.

[00110]En algunas modalidades, un ADC que comprende un enlazador Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB que une eribulina con MORAb-003 presenta una proporción fármaco:anticuerpo mayor y más deseable (es

decir, una proporción de aproximadamente 3-4) con respecto a un ADC, p. ej., que comprende un enlazador unido al anticuerpo mediante un resto alternativo (p. ej., un resto de succinimida). En algunas modalidades, un ADC que comprende un enlazador Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB que une eribulina con MORAb-003 presenta una proporción fármaco:anticuerpo mayor y más deseable y/o niveles de agregación más bajos con respecto a un ADC, p. ej., que comprende una unidad espaciadora más larga (p. ej., $(PEG)_8$). En algunas modalidades, un ADC que comprende un enlazador Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB que une eribulina con MORAb-003 demuestra una proporción fármaco:anticuerpo mayor y más deseable, niveles de agregación más bajos, una aumento de la destrucción en el objetivo y/o una disminución de la destrucción fuera del objetivo con respecto a un ADC, p. ej., que comprende un resto escindible alternativo (es decir, un resto escindible no peptídico, por ejemplo un disulfuro o sulfonamida escindible). En algunas modalidades, un ADC que comprende un enlazador Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB que une eribulina con MORAb-003 demuestra un aumento de la estabilidad, un aumento de la destrucción en el objetivo, una disminución de la destrucción fuera del objetivo, niveles de agregación más bajos y/o una proporción fármaco:anticuerpo mayor o más deseable con respecto a un ADC, p. ej., que comprende una unidad de aminoácido alternativa (p. ej., Ala-Ala-Asn) o resto escindible alternativo (p. ej., un disulfuro o sulfonamida escindible).

[00111]En algunas modalidades, algunas o todas las características deseables descritas anteriormente para ADC que comprenden un enlazador Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB que une eribulina con MORAb-003 se pueden observar con ADC que comprenden el enlazador-toxina Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB-eribulina conjugado con un anticuerpo anti-her2 tal como trastuzumab o un anticuerpo anti-mesotelina.

[00112]Los compuestos de ADC de la presente descripción pueden administrar selectivamente una dosis eficaz de un agente citotóxico o citostático a células cancerosas o tejido tumoral. Se ha descubierto que los ADC descritos tienen actividad citotóxica y/o citostática potente contra células que expresan el antígeno diana respectivo (p. ej., FRA o her2). En algunas modalidades, la actividad citotóxica y/o citostática del ADC dependen del nivel de expresión del antígeno diana en una célula. En algunas modalidades, los ADC descritos son particularmente eficaces para destruir células cancerosas que expresan un nivel alto de antígeno diana, en comparación con células cancerosas que expresan el mismo antígeno en un nivel bajo. En algunas modalidades, los ADC descritos son particularmente eficaces para destruir células cancerosas que expresan el antígeno diana en un nivel moderado, en comparación con células cancerosas que expresan el mismo antígeno en un nivel bajo. Algunos ejemplos de cánceres con expresión alta de FRA incluyen, entre otros, cáncer de ovario (p. ej., cáncer de ovario seroso, cáncer de

ovario de células claras), carcinoide pulmonar, cáncer de mama triple negativo, cáncer endometrial y cáncer de pulmón de células no pequeñas (p. ej., adenocarcinoma). Algunos ejemplos de cánceres con expresión moderada de FRA incluyen, entre otros, cáncer gástrico y cáncer colorrectal. Algunos ejemplos de cánceres con expresión baja de FRA incluyen, entre otros, melanoma y linfoma. Algunos ejemplos de cánceres con expresión alta de her2 incluyen, entre otros, cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de ovario y cáncer endometrial. Algunos ejemplos de cánceres con expresión moderada de her2 incluyen, entre otros, cáncer de pulmón y cáncer de vejiga.

[00113]En algunas modalidades, la escisión de un ADC libera eribulina del resto de anticuerpo y enlazador. En algunas modalidades, la escisión y liberación de la eribulina mejora la citotoxicidad del ADC. En algunas modalidades, un ADC que comprende un enlazador escindible es particularmente eficaz para destruir células de cáncer, lo que incluye la destrucción no específica, en comparación con un tratamiento comparable con un ADC que comprende un enlazador no escindible. En algunas modalidades, un ADC que comprende un enlazador escindible (p. ej., un enlazador Val-Cit) demuestra un aumento de la destrucción celular en el objetivo y/o una disminución de la destrucción celular fuera del objetivo con respecto a un ADC que comprende un enlazador no escindible (p. ej., un enlazador $(PEG)_2$ o $(PEG)_4$ no escindible), particularmente en donde las células y/o cáncer tratado con el ADC no expresan altos niveles del antígeno diana.

[00114]En algunas modalidades, los ADC descritos también demuestran actividad de destrucción no específica, pero baja citotoxicidad fuera del objetivo. Sin pretender limitarse por la teoría, la actividad de destrucción no específica de un ADC puede ser particularmente beneficioso cuando su penetración en un tumor sólido es limitada y/o la expresión del antígeno diana entre las células tumorales es heterogénea. En algunas modalidades, un ADC que comprende un enlazador escindible es particularmente eficaz para la destrucción no específica y/o demuestra una actividad de destrucción no específica mejorada, en comparación con un tratamiento comparable con un ADC que comprende un enlazador no escindible.

[00115]En la presente se proporcionan compuestos de ADC que comprenden un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este (Ab) que se dirige a una célula tumoral, un resto de fármaco (D) y un resto de enlazador (L) que une mediante enlace covalente Ab con D. En determinados aspectos, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es capaz de unirse a un antígeno asociado al tumor (p. ej., FRA o her2) con especificidad elevada y afinidad elevada. En determinadas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se internaliza en una célula diana tras la unión, p. ej., en un compartimiento degradante en la célula. Por ende, los ADC preferidos son los que se internalizan tras la unión a una

célula diana, experimentan degradación y liberan el resto de fármaco para destruir células cancerosas. El resto de fármaco puede ser liberado del anticuerpo y/o el resto de enlazador del ADC por acción enzimática, hidrólisis, oxidación o cualquier otro mecanismo.

[00116] Un ejemplo de ADC tiene la fórmula I:

$$Ab\text{-}(L\text{-}D)_p \quad (I)$$

en donde Ab = resto de anticuerpo (es decir, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno), L = resto de enlazador, D = resto de fármaco y *p* = la cantidad de restos de fármaco por resto de anticuerpo.

Anticuerpos

[00117] El resto de anticuerpo (Ab) de fórmula I incluye dentro de su alcance cualquier anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se une específicamente a un antígeno diana en una célula cancerosa. El antígeno o fragmento de unión al antígeno se puede unir a un antígeno diana con una constante de disociación (K_D) de ≤1 mM, ≤100 nM o ≤10 nM, o cualquier cantidad intermedia, según lo medido, p. ej., mediante análisis BIAcore®. En determinadas modalidades, la K_D es de entre 1 pM y 500 pM. En algunas modalidades, la K_D es de entre 500 pM y 1 µM, entre 1 µM y 100 nM, o entre 100 mM y 10 nM.

[00118] En algunas modalidades, el resto de anticuerpo es un anticuerpo de cuatro cadenas (también denominado inmunoglobulina) que comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. En algunas modalidades, el resto de anticuerpo es un medio cuerpo de dos cadenas (una cadena ligera y una cadena pesada) o un fragmento de unión al antígeno de una inmunoglobulina.

[00119] En algunas modalidades, el resto de anticuerpo es un anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización de este. En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización se une a un antígeno de cáncer diana expresado en la superficie de una célula e ingresa a la célula tras la unión. En algunas modalidades, el resto de fármaco del ADC se libera del resto de anticuerpo del ADC después de que el ADC ingresa y está presente en una célula que expresa el antígeno de cáncer diana (es decir, después de que ADC se haya internalizado).

[00120] En las tablas 1-9 se establecen secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de anticuerpos ejemplares de la presente descripción.

Tabla 1. Anticuerpos

mAb	**Clase/isotipo**	**Diana**
MORAb-003	humanizado	receptor de folato humano alfa
MORAb-009	quimérico de ratón-humano	mesotelina humana

trastuzumab	humanizado	her2/neu humano
33011-xi	quimérico de conejo-humano	mesotelina humana
33011-zu	humanizado	mesotelina humana
111B10-xi	quimérico de conejo-humano	mesotelina humana
111B10-zu	humanizado	mesotelina humana
201C15-xi	quimérico de conejo-humano	mesotelina humana
201C15-zu	humanizado	mesotelina humana
346C6-xi	quimérico de conejo-humano	mesotelina humana
346C6-zu	humanizado	mesotelina humana

Abreviaturas: xi – quimérico; zu – humanizado.

Tabla 2. Secuencias de aminoácidos de regiones variables de mAb

	mAb	**Cadena de IgG**	**ID DE SEC. NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
1	MORAb-003	Cadena pesada	23	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSAS GFTFSGYGLSWVRQAPGKGLEWVA MISSGGSYTYYADSVKGRFAISRDNA KNTLFLQMDSLRPEDTGVYFCARHG DDPAWFAYWGQGTPVTVSS
2	MORAb-003	Cadena ligera	24	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSVSS SISSNNLHWYQQKPGKAPKPWIYGT SNLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSL QPEDIATYYCQQWSSYPYMYTFGQG TKVEIK
3	MORAb-009	Cadena pesada	25	QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASG YSFTGYTMNWVKQSHGKSLEWIGLI TPYNGASSYNQKFRGKATLTVDKSS STAYMDLLSLTSEDSAVYFCARGGY

				DGRGFDYWGSGTPVTVSS
4	MORAb-009	Cadena ligera	26	DIELTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPGRFSGSGSGNSYSLTISSVEAEDDATYYCQQWSKHPLTFGSGTKVEIK
5	trastuzumab	Cadena pesada	27	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
6	trastuzumab	Cadena ligera	28	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK
7	33011-xi	Cadena pesada	29	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGISLSSDAISWVRQAPGKGLEYIGIINGGGNTYYASWAKGRFTISKTSTTVDLKITSPTTEDTATYFCARGIQHGGGNSDYYYYGMDLWGPGTLVTVSS
8	33011-xi	Cadena ligera	30	EVLMTQTPSSVSAAVGDTVTIKCQASQSISSVLSWYQQKPGQPPKLLIYLASTLASGVPSRFSGSRSGTEFTLTISDLECDDAATYYCQTNYGTSSSNYGFAFGGGTEVVVK
9	33011-zu	Cadena pesada	31	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGISLSSDAISWVRQAPGKGLEYIGIINGGGNTYYASWAKGRFTISRHNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIQHGGGNSDYYYYGMDLWGQGTLVTVSS

10	33011-zu	Cadena ligera	32	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQAS QSISSVLSWYQQKPGKAPKLLIYLAS TLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ CEDIATYYCQTNYGTSSSNYGFAFGG GTKVEIK
11	111B10-xi	Cadena pesada	33	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGF SLNNYAMSWVRQAPGKGLEWIGSIS TGGLAFYANWAKGRFTISRTSTTVD LKMTSLTTEDTATYFCGRNGGGSYIF YYFDLWGQGTLVTVSS
12	111B10-xi	Cadena ligera	34	AFELTQTPSSVEAAVGGTITIKCQAS QSISSYLSWYQQKPGQPPKLLIYSAST LASGVSSRFKGSGSGTEYTLTISDLEC ADAATYFCQSYYDIGTSTFGGGTEV VVK
13	111B10-zu	Cadena pesada	35	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFSLNNYAMSWVRQAPGKGLEWIG SISTGGLAFYANWAKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNG GGSYIFYYFDLWGQGTLVTVSS
14	111B10-zu	Cadena ligera	36	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQAS QSISSYLSWYQQKPGKAPKLLIYSAS TLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ CEDAATYYCQSYYDIGTSTFGGGTK VEIK
15	201C15-xi	Cadena pesada	37	QSVKESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGI DLSSYAMGWFRQAPGKGLEYIGTINI GGRVYYASWAKGRFTISRTSTTVDL KAPSLTAEDTATYFCARYYNGGSYD IWGPGTLVTVSL
16	201C15-xi	Cadena ligera	38	DVVMTQTPASASEPVGGTVTIKCQA

				SESIYRVLAWYQQKPGQPPKLLIYDT STLASGAPSRFKGSGYGTEFTLTISGV QCEDAATYYCQGGYYADSYGIAFGG GTEVVVK
17	201C15-zu	Cadena pesada	39	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSAS GIDLSSYAMGWVRQAPGKGLEYIGTI NIGGRVYYASWAKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYN GGSYDIWGQGTLVTVSS
18	201C15-zu	Cadena ligera	40	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCQAS ESIYRVLAWYQQKPGKAPKLLIYDTS TLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQ CDDAATYYCQGGYYADSYGIAFGG GTKVEIK
19	346C6-xi	Cadena pesada	41	QSVEESGGRLVKPDESLTLTCTASGF SLSSYAMIWVRQAPGEGLEWIGTIST GGITYYASWAKGRFTISKTSTTVDLK ITSPTTEDTATYFCARGGYAASSAYY LPYYFDLWGQGTLVTVSS
20	346C6-xi	Cadena ligera	42	AAVLTQTPSPVSAAVGGTVTISCQSS QSVYNNNNLAWFQQKPGQPPKLLIY LASTLASGVPSRFSGSGSGTQFTLTIS GVQCDDAATYYCLGGCDDDADTFA FGGGTEVVVK
21	346C6-zu	Cadena pesada	43	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFSLSSYAMIWVRQAPGKGLEWIGTI STGGITYYASWAKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGYA ASSAYYLPYYFDLWGQGTLVTVSS
22	346C6-zu	Cadena ligera	44	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQ SVYNNNNLAWYQQKPGKVPKLLIYL

				ASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQCEDAATYYCLGGCDDDADTFAFG GGTKVEIK

Tabla 3. Secuencias de ácido nucleico que codifican regiones variables de mAb

	mAb	**Cadena de IgG**	**ID DE SEC. NO.**	**Secuencia de ácido nucleico**
1	MORAb-003	Cadena pesada	45	GAGGTCCAACTGGTGGAGAGCGGTGGAG GTGTTGTGCAACCTGGCCGGTCCCTGCGC CTGTCCTGCTCCGCATCTGGCTTCACCTT CAGCGGCTATGGGTTGTCTTGGGTGAGA CAGGCACCTGGAAAAGGTCTTGAGTGGG TTGCAATGATTAGTAGTGGTGGTAGTTAT ACCTACTATGCAGACAGTGTGAAGGGTA GATTTGCAATATCGCGAGACAACGCCAA GAACACATTGTTCCTGCAAATGGACAGC CTGAGACCCGAAGACACCGGGGTCTATT TTTGTGCAAGACATGGGGACGATCCCGC CTGGTTCGCTTATTGGGGCCAAGGGACC CCGGTCACCGTCTCCTCA
2	MORAb-003	Cadena ligera	46	GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCAAGCA GCCTGAGCGCCAGCGTGGGTGACAGAGT GACCATCACCTGTAGTGTCAGCTCAAGT ATAAGTTCCAACAACTTGCACTGGTACC AGCAGAAGCCAGGTAAGGCTCCAAAGCC ATGGATCTACGGCACATCCAACCTGGCTT CTGGTGTGCCAAGCAGATTCAGCGGTAG

				CGGTAGCGGTACCGACTACACCTTCACC ATCAGCAGCCTCCAGCCAGAGGACATCG CCACCTACTACTGCCAACAGTGGAGTAG TTACCCGTACATGTACACGTTCGGCCAAG GGACCAAGGTGGAAATCAAA
3	MORAb-009	Cadena pesada	47	CAGGTACAACTGCAGCAGTCTGGGCCTG AGCTGGAGAAGCCTGGCGCTTCAGTGAA GATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCAT TCACTGGCTACACCATGAACTGGGTGAA GCAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGG ATTGGACTTATTACTCCTTACAATGGTGC TTCTAGCTACAACCAGAAGTTCAGGGGC AAGGCCACATTAACTGTAGACAAGTCAT CCAGCACAGCCTACATGGACCTCCTCAG TCTGACATCTGAAGACTCTGCAGTCTATT TCTGTGCAAGGGGGGGTTACGACGGGAG GGGTTTTGACTACTGGGGATCCGGGACC CCGGTCACCGTCTCCTCA
4	MORAb-009	Cadena ligera	48	GACATCGAGCTCACTCAGTCTCCAGCAA TCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGT CACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGT GTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGA AGTCAGGCACCTCCCCCAAAAGATGGAT TTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAG TCCCAGGTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCT GGAAACTCTTACTCTCTCACAATCAGCAG CGTGGAGGCTGAAGATGATGCAACTTAT TACTGCCAGCAGTGGAGTAAGCACCCTC TCACGTTCGGATCCGGGACCAAGGTGGA AATCAAA
5	33011-xi	Cadena pesada	49	CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGTCGCC

				TGGTCACGCCTGGGACACCCCTGACACT CACCTGCACCGTCTCTGGAATCTCCCTCA GTAGCGATGCAATAAGCTGGGTCCGCCA GGCTCCAGGGAAGGGGCTCGAATACATC GGAATCATTAATGGTGGTGGTAACACAT ACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATT CACCATCTCCAAAACCTCGACCACGGTG GATCTGAAAATCACCAGTCCGACAACCG AGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCCAG AGGCATTCAACATGGTGGTGGTAATAGT GATTATTATTATTACGGCATGGACCTCTG GGGCCCAGGCACCCTGGTCACTGTCTCTT CA
6	33011-xi	Cadena ligera	50	GAAGTGTTGATGACCCAGACTCCATCCTC CGTGTCTGCAGCTGTGGGAGACACAGTC ACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGCA TTAGTAGTGTCTTGTCCTGGTATCAGCAG AAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGA TCTATCTGGCATCCACTCTGGCATCTGGG GTCCCATCGCGGTTCAGCGGCAGTAGAT CTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAG CGACCTGGAGTGTGACGATGCTGCCACT TACTACTGTCAAACCAATTATGGTACTAG TAGTAGTAATTATGGTTTTGCTTTCGGCG GAGGGACCGAGGTGGTCGTCAAA
7	33011-zu	Cadena pesada	51	GAAGTCCAACTGGTGGAAAGCGGGGGAG GACTGGTGCAGCCGGGCGGATCCCTCCG GCTGTCATGTGCTGCATCGGGAATTTCCC TCTCCTCCGACGCGATTAGCTGGGTCAGA CAGGCCCCCGGAAAGGGGCTGGAGTACA TCGGTATCATCAACGGCGGCGGAAACAC

				CTACTACGCCTCCTGGGCCAAGGGCCGC TTCACCATCTCGCGGCATAATTCCAAGAA CACTCTGTACTTGCAAATGAACTCCCTGA GGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTG CGCGCGCGGCATCCAGCACGGTGGTGGA AACAGCGACTACTACTACTATGGGATGG ATCTGTGGGGCCAGGGAACTCTTGTGAC CGTGTCGTCA
8	33011-zu	Cadena ligera	52	GACATTCAGATGACCCAGTCCCCAAGCT CGCTGTCCGCCTCCGTGGGCGACCGCGT GACCATCACGTGCCAGGCGTCCCAGTCA ATTAGCAGCGTGCTCTCCTGGTACCAACA GAAGCCGGGGAAAGCACCCAAGCTGCTG ATCTACTTGGCCTCCACTCTGGCCTCGGG AGTGCCTTCACGGTTCTCCGGATCGGGAT CTGGTACTGATTTCACCCTCACCATCTCG AGCCTTCAGTGCGAGGACATCGCTACTT ACTATTGTCAAACCAACTACGGAACCTC CAGCTCCAACTACGGCTTTGCCTTCGGTG GCGGGACCAAGGTCGAAATCAAA
9	111B10-xi	Cadena pesada	53	CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGTCGCC TGGTCACGCCTGGGACACCCCTGACACT CACCTGCACAGTCTCTGGATTCTCCCTCA ATAACTATGCAATGAGCTGGGTCCGCCA GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATC GGATCCATTAGTACTGGTGGTCTCGCATT CTACGCGAACTGGGCAAAAGGCCGATTC ACCATCTCCAGAACCTCGACCACGGTGG ATCTGAAAATGACCAGTCTGACAACCGA GGACACGGCCACCTATTTCTGTGGCAGA AATGGTGGTGGTAGTTATATTTTCTATTA

				TTTTGACTTGTGGGGCCAAGGCACCCTCG TCACTGTCTCTTCA
10	111B10-xi	Cadena ligera	54	GCATTCGAATTGACCCAGACTCCATCCTC CGTGGAGGCAGCTGTGGGAGGCACAATC ACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGCA TTAGTAGTTACTTATCCTGGTATCAGCAG AAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGA TCTATTCTGCATCCACTCTGGCATCTGGG GTCTCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGAT CTGGGACAGAGTACACTCTCACCATCAG CGACCTGGAGTGTGCCGATGCTGCCACTT ACTTCTGTCAAAGCTATTATGATATTGGT ACTAGTACTTTCGGCGGAGGGACCGAGG TGGTCGTCAAA
11	111B10-zu	Cadena pesada	55	GAAGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGCG GACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAG ACTGTCTTGTGCCGCCTCCGGCTTCTCCC TGAACAACTACGCCATGTCCTGGGTGCG ACAGGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAATGG ATCGGCTCCATCAGCACAGGCGGCCTGG CCTTCTACGCCAATTGGGCCAAGGGCCG GTTCACCATCAGCCGGGACAACTCCAAG AACACCCTGTACCTCCAGATGAACTCCCT GCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTAC TGTGCCAGAAACGGCGGAGGCTCCTACA TCTTCTACTACTTCGACCTGTGGGGCCAG GGCACCCTCGTGACAGTGTCATCT
12	111B10-zu	Cadena ligera	56	GATATTCAGATGACCCAGTCCCCCTCCAG CCTGTCCGCTTCTGTGGGCGACAGAGTG ACCATCACCTGTCAGGCCTCCCAGTCCAT CTCCTCCTACCTGTCCTGGTATCAGCAGA

				AGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGAT CTACTCTGCCTCCACACTGGCCTCCGGCG TGCCCTCTAGATTCTCCGGCTCTGGCTCT GGCACCGACTTTACCCTGACCATCAGCTC CCTCCAGTGCGAGGATGCCGCCACCTAC TACTGCCAGTCCTACTACGACATCGGCAC CTCCACCTTCGGCGGAGGCACCAAGGTG GAAATCAAA
13	201C15-xi	Cadena pesada	57	CAGTCAGTGAAGGAGTCCGGGGGTCGCC TGGTCACGCCTGGGACACCCCTGACACT CACCTGCACAGTCTCTGGAATCGACCTCA GTAGCTATGCAATGGGCTGGTTCCGCCA GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATACATC GGAACCATTAATATTGGTGGTCGCGTAT ATTACGCGAGCTGGGCAAAAGGCCGATT CACCATCTCCAGAACCTCGACCACGGTG GATCTGAAAGCGCCCAGTCTGACAGCCG AGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCCAG ATATTATAATGGTGGTAGTTATGACATCT GGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCGTCTC TTTA
14	201C15-xi	Cadena ligera	58	GATGTTGTGATGACCCAGACTCCAGCCTC CGCGTCTGAACCTGTGGGAGGCACAGTC ACCATCAAGTGCCAGGCCAGTGAGAGCA TTTATCGCGTATTGGCCTGGTATCAGCAG AAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGA TCTATGATACATCCACTCTGGCATCTGGG GCCCCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGAT ATGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAG CGGCGTGCAGTGTGAAGATGCTGCCACT TACTACTGTCAAGGCGGTTATTATGCTGA

				TAGTTATGGTATTGCTTTCGGCGGAGGGA CCGAGGTGGTGGTCAAA
15	201C15-zu	Cadena pesada	59	CAGGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGAG GACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCTCTGAG ACTGTCCTGTTCCGCCTCCGGAATCGACC TGTCCTCCTACGCTATGGGCTGGGTGCGA CAGGCTCCTGGCAAGGGCCTGGAGTACA TCGGCACCATCAACATCGGCGGCAGAGT GTACTACGCCTCCTGGGCCAAGGGCCGG TTCACCATCTCCAGAGACAACTCCAAGA ACACCCTGTACCTCCAGATGAACTCCCTG CGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACT GCGCCCGGTACTACAACGGCGGCTCCTA CGATATCTGGGGCCAGGGCACACTCGTG ACCGTGTCCTCT
16	201C15-zu	Cadena ligera	60	GATATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCAC CCTGTCTGCCTCTGTGGGCGACAGAGTG ACCATCACCTGTCAGGCCTCCGAGTCCAT CTACCGGGTGCTGGCCTGGTATCAGCAG AAGCCTGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGA TCTACGACACCAGCACACTGGCCTCCGG CGTGCCCTCTAGATTCTCCGGCTCTGGCT CTGGCACCGAGTTTACCCTGACCATCTCC AGCCTCCAGTGCGACGACGCCGCCACCT ACTATTGTCAGGGCGGCTACTACGCCGA CTCCTACGGAATCGCTTTCGGCGGAGGC ACCAAGGTGGAAATCAAA
17	346C6-xi	Cadena pesada	61	CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGCGGTCGCC TGGTAAAGCCTGACGAATCCCTGACACT CACCTGCACAGCCTCTGGATTCTCCCTCA GTAGTTATGCAATGATCTGGGTCCGCCA

				GGCTCCAGGGGAGGGGCTGGAATGGATC GGAACCATTAGTACTGGTGGTATCACAT ACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATT CACCATCTCCAAAACCTCGACCACGGTG GATCTGAAAATCACCAGTCCGACAACCG AGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCCAG AGGGGGATATGCTGCTAGTAGTGCTTATT ATCTCCCGTACTACTTTGACTTGTGGGGC CAAGGGACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
18	346C6-xi	Cadena ligera	62	GCAGCCGTGCTGACCCAGACACCATCAC CCGTGTCTGCAGCTGTGGGAGGCACAGT CACCATCAGTTGCCAGTCCAGTCAGAGT GTTTATAATAATAACAACTTAGCCTGGTT TCAGCAGAAACCCGGGCAGCCTCCCAAG CTTCTGATCTATCTGGCATCCACTCTGGC ATCTGGGGTCCCATCACGGTTCAGCGGC AGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCTCA CCATCAGCGGCGTGCAGTGTGACGATGC TGCCACTTATTACTGTCTAGGTGGTTGTG ATGATGATGCTGATACTTTTGCTTTCGGC GGAGGGACTGAGGTGGTGGTCAAA
19	346C6-zu	Cadena pesada	63	GAAGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGCG GACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAG ACTGTCTTGTGCCGCCTCCGGCTTCTCCC TGTCCTCCTACGCTATGATCTGGGTGCGA CAGGCCCCTGGCAAGGGCCTGGAATGGA TCGGCACCATCTCTACCGGCGGAATTACC TACTACGCCTCCTGGGCCAAGGGCCGGT TCACCATCTCCAGAGACAACTCCAAGAA CACCCTGTACCTCCAGATGAACTCCCTGC GGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATTG

				TGCTAGAGGCGGCTACGCCGCCAGCTCC GCTTACTACCTGCCCTACTACTTCGACCT GTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACAGTG TCATCT
20	346C6-zu	Cadena ligera	64	GATATTCAGATGACCCAGTCCCCCTCCAG CCTGTCCGCTTCTGTGGGCGACAGAGTG ACCATCACCTGTCAGTCCTCCCAGTCCGT GTATAACAACAACAACCTGGCCTGGTAT CAGCAGAAACCCGGCAAGGTGCCCAAGC TGCTGATCTACCTGGCCTCCACACTGGCC TCTGGCGTGCCCTCTAGATTCTCCGGCTC TGGCTCTGGCACCGACTTTACCCTGACCA TCAGCTCCCTCCAGTGCGAGGATGCCGC CACCTACTATTGCCTGGGCGGCTGCGAC GACGACGCCGATACCTTTGCTTTTGGCGG AGGCACCAAGGTGGAAATCAAA

Tabla 4. Secuencias de aminoácidos de CDR de Kabat de mAb

	mAb	**Cadena de IgG**	**ID DE SEC. NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
1	MORAb-003	CDR1 de cadena pesada	2	GYGLS
2	MORAb-003	CDR2 de cadena pesada	3	MISSGGSYTYYADSVKG
3	MORAb-003	CDR3 de cadena pesada	4	HGDDPAWFAY
4	MORAb-003	CDR1 de cadena ligera	7	SVSSSISSNNLH
5	MORAb-003	CDR2 de cadena ligera	8	GTSNLAS
6	MORAb-	CDR3 de	9	QQWSSYPYMYT

	003	cadena ligera		
7	MORAb-009	CDR1 de cadena pesada	65	GYTMN
8	MORAb-009	CDR2 de cadena pesada	66	LITPYNGASSYNQKFRG
9	MORAb-009	CDR3 de cadena pesada	67	GGYDGRGFDY
10	MORAb-009	CDR1 de cadena ligera	68	SASSSVSYMH
11	MORAb-009	CDR2 de cadena ligera	69	DTSKLAS
12	MORAb-009	CDR3 de cadena ligera	70	QQWSKHPLT
13	trastuzumab	CDR1 de cadena pesada	71	DTYIH
14	trastuzumab	CDR2 de cadena pesada	72	RIYPTNGYTRYADSVKG
15	trastuzumab	CDR3 de cadena pesada	73	WGGDGFYAMDY
16	trastuzumab	CDR1 de cadena ligera	74	RASQDVNTAVA
17	trastuzumab	CDR2 de cadena ligera	75	SASFLYS
18	trastuzumab	CDR3 de cadena ligera	76	QQHYTTPPT
19	33011-xi	CDR1 de cadena pesada	77	SDAIS
20	33011-xi	CDR2 de cadena pesada	78	IINGGGNTYYASWAKG
21	33011-xi	CDR3 de	79	GIQHGGGNSDYYYYGMDL

		cadena pesada		
22	33011-xi	CDR1 de cadena ligera	80	QASQSISSVLS
23	33011-xi	CDR2 de cadena ligera	81	LASTLAS
24	33011-xi	CDR3 de cadena ligera	82	QTNYGTSSSNYGFA
25	33011-zu	CDR1 de cadena pesada	83	SDAIS
26	33011-zu	CDR2 de cadena pesada	84	IINGGGNTYYASWAKG
27	33011-zu	CDR3 de cadena pesada	85	GIQHGGGNSDYYYYGMDL
28	33011-zu	CDR1 de cadena ligera	86	QASQSISSVLS
29	33011-zu	CDR2 de cadena ligera	87	LASTLAS
30	33011-zu	CDR3 de cadena ligera	88	QTNYGTSSSNYGFA
31	111B10-xi	CDR1 de cadena pesada	89	NYAMS
32	111B10-xi	CDR2 de cadena pesada	90	SISTGGLAFYANWAKG
33	111B10-xi	CDR3 de cadena pesada	91	NGGGSYIFYYFDL
34	111B10-xi	CDR1 de cadena ligera	92	QASQSISSYLS
35	111B10-xi	CDR2 de cadena ligera	93	SASTLAS
36	111B10-xi	CDR3 de	94	QSYYDIGTST

		cadena ligera		
37	111B10-zu	CDR1 de cadena pesada	95	NYAMS
38	111B10-zu	CDR2 de cadena pesada	96	SISTGGLAFYANWAKG
39	111B10-zu	CDR3 de cadena pesada	97	NGGGSYIFYYFDL
40	111B10-zu	CDR1 de cadena ligera	98	QASQSISSYLS
41	111B10-zu	CDR2 de cadena ligera	99	SASTLAS
42	111B10-zu	CDR3 de cadena ligera	100	QSYYDIGTST
43	201C15-xi	CDR1 de cadena pesada	101	SYAMG
44	201C15-xi	CDR2 de cadena pesada	102	TINIGGRVYYASWAKG
45	201C15-xi	CDR3 de cadena pesada	103	YYNGGSYDI
46	201C15-xi	CDR1 de cadena ligera	104	QASESIYRVLA
47	201C15-xi	CDR2 de cadena ligera	105	DTSTLAS
48	201C15-xi	CDR3 de cadena ligera	106	QGGYYADSYGIA
49	201C15-zu	CDR1 de cadena pesada	107	SYAMG
50	201C15-zu	CDR2 de cadena pesada	108	TINIGGRVYYASWAKG
51	201C15-zu	CDR3 de	109	YYNGGSYDI

		cadena pesada		
52	201C15-zu	CDR1 de cadena ligera	110	QASESIYRVLA
53	201C15-zu	CDR2 de cadena ligera	111	DTSTLAS
54	201C15-zu	CDR3 de cadena ligera	112	QGGYYADSYGIA
55	346C6-xi	CDR1 de cadena pesada	113	SYAMI
56	346C6-xi	CDR2 de cadena pesada	114	TISTGGITYYASWAKG
57	346C6-xi	CDR3 de cadena pesada	115	GGYAASSAYYLPYYFDL
58	346C6-xi	CDR1 de cadena ligera	116	QSSQSVYNNNNLA
59	346C6-xi	CDR2 de cadena ligera	117	LASTLAS
60	346C6-xi	CDR3 de cadena ligera	118	LGGCDDDADTFA
61	346C6-zu	CDR1 de cadena pesada	119	SYAMI
62	346C6-zu	CDR2 de cadena pesada	120	TISTGGITYYASWAKG
63	346C6-zu	CDR3 de cadena pesada	121	GGYAASSAYYLPYYFDL
64	346C6-zu	CDR1 de cadena ligera	122	QSSQSVYNNNNLA
65	346C6-zu	CDR2 de cadena ligera	123	LASTLAS
66	346C6-zu	CDR3 de	124	LGGCDDDADTFA

		cadena ligera		

Tabla 5. Secuencias de ácido nucleico que codifican CDR de Kabat de mAb

	mAb	**Cadena de IgG**	**ID DE SEC. NO.**	**Secuencia de ácido nucleico**
1	MORAb-003	CDR1 de cadena pesada	125	GGCTATGGGTTGTCT
2	MORAb-003	CDR2 de cadena pesada	126	ATGATTAGTAGTGGTGGTAGTTATACCTACTATGCAGACAGTGTGAAGGGT
3	MORAb-003	CDR3 de cadena pesada	127	CATGGGGACGATCCCGCCTGGTTCGCTTAT
4	MORAb-003	CDR1 de cadena ligera	128	AGTGTCAGCTCAAGTATAAGTTCCAACAACTTGCAC
5	MORAb-003	CDR2 de cadena ligera	129	GGCACATCCAACCTGGCTTCT
6	MORAb-003	CDR3 de cadena ligera	130	CAACAGTGGAGTAGTTACCCGTACATGTACACG
7	MORAb-009	CDR1 de cadena pesada	131	GGCTACACCATGAAC
8	MORAb-009	CDR2 de cadena pesada	132	CTTATTACTCCTTACAATGGTGCTTCTAGCTACAACCAGAAGTTCAGGGGC
9	MORAb-009	CDR3 de cadena pesada	133	GGGGGTTACGACGGGAGGGGTTTTGACTAC
10	MORAb-009	CDR1 de cadena ligera	134	AGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGCAC
11	MORAb-009	CDR2 de cadena ligera	135	GACACATCCAAACTGGCTTCT

12	MORAb-009	CDR3 de cadena ligera	136	CAGCAGTGGAGTAAGCACCCTCTCACG
13	33011-xi	CDR1 de cadena pesada	137	AGCGATGCAATAAGC
14	33011-xi	CDR2 de cadena pesada	138	ATCATTAATGGTGGTGGTAACACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGC
15	33011-xi	CDR3 de cadena pesada	139	GGCATTCAACATGGTGGTGGTAATAGTGATTATTATTATTACGGCATGGACCTC
16	33011-xi	CDR1 de cadena ligera	140	CAGGCCAGTCAGAGCATTAGTAGTGTCTTGTCC
17	33011-xi	CDR2 de cadena ligera	141	CTGGCATCCACTCTGGCATCT
18	33011-xi	CDR3 de cadena ligera	142	CAAACCAATTATGGTACTAGTAGTAGTAATTATGGTTTTGCT
19	33011-zu	CDR1 de cadena pesada	143	TCCGACGCGATTAGC
20	33011-zu	CDR2 de cadena pesada	144	ATCATCAACGGCGGCGGAAACACCTACTACGCCTCCTGGGCCAAGGGC
21	33011-zu	CDR3 de cadena pesada	145	GGCATCCAGCACGGTGGTGGAAACAGCGACTACTACTACTATGGGATGGATCTG
22	33011-zu	CDR1 de cadena ligera	146	CAGGCGTCCCAGTCAATTAGCAGCGTGCTCTCC
23	33011-zu	CDR2 de cadena ligera	147	TTGGCCTCCACTCTGGCCTCG
24	33011-zu	CDR3 de cadena ligera	148	CAAACCAACTACGGAACCTCCAGCTCCAACTACGGCTTTGCC
25	111B10-xi	CDR1 de cadena pesada	149	AACTATGCAATGAGC

26	111B10-xi	CDR2 de cadena pesada	150	TCCATTAGTACTGGTGGTCTCG CATTCTACGCGAACTGGGCAAA AGGC
27	111B10-xi	CDR3 de cadena pesada	151	AATGGTGGTGGTAGTTATATTT TCTATTATTTTGACTTG
28	111B10-xi	CDR1 de cadena ligera	152	CAGGCCAGTCAGAGCATTAGTA GTTACTTATCC
29	111B10-xi	CDR2 de cadena ligera	153	TCTGCATCCACTCTGGCATCT
30	111B10-xi	CDR3 de cadena ligera	154	CAAAGCTATTATGATATTGGTA CTAGTACT
31	111B10-zu	CDR1 de cadena pesada	155	AACTACGCCATGTCC
32	111B10-zu	CDR2 de cadena pesada	156	TCCATCAGCACAGGCGGCCTGG CCTTCTACGCCAATTGGGCCAA GGGC
33	111B10-zu	CDR3 de cadena pesada	157	AACGGCGGAGGCTCCTACATCT TCTACTACTTCGACCTG
34	111B10-zu	CDR1 de cadena ligera	158	CAGGCCTCCCAGTCCATCTCCT CCTACCTGTCC
35	111B10-zu	CDR2 de cadena ligera	159	TCTGCCTCCACACTGGCCTCC
36	111B10-zu	CDR3 de cadena ligera	160	CAGTCCTACTACGACATCGGCA CCTCCACC
37	201C15-xi	CDR1 de cadena pesada	161	AGCTATGCAATGGGC
38	201C15-xi	CDR2 de cadena pesada	162	ACCATTAATATTGGTGGTCGCG TATATTACGCGAGCTGGGCAAA AGGC
39	201C15-xi	CDR3 de cadena pesada	163	TATTATAATGGTGGTAGTTATG ACATC
40	201C15-xi	CDR1 de cadena ligera	164	CAGGCCAGTGAGAGCATTTATC

				GCGTATTGGCC
41	201C15-xi	CDR2 de cadena ligera	165	GATACATCCACTCTGGCATCT
42	201C15-xi	CDR3 de cadena ligera	166	CAAGGCGGTTATTATGCTGATA GTTATGGTATTGCT
43	201C15-zu	CDR1 de cadena pesada	167	TCCTACGCTATGGGC
44	201C15-zu	CDR2 de cadena pesada	168	ACCATCAACATCGGCGGCAGA GTGTACTACGCCTCCTGGGCCA AGGGC
45	201C15-zu	CDR3 de cadena pesada	169	TACTACAACGGCGGCTCCTACG ATATC
46	201C15-zu	CDR1 de cadena ligera	170	CAGGCCTCCGAGTCCATCTACC GGGTGCTGGCC
47	201C15-zu	CDR2 de cadena ligera	171	GACACCAGCACACTGGCCTCC
48	201C15-zu	CDR3 de cadena ligera	172	CAGGGCGGCTACTACGCCGACT CCTACGGAATCGCT
49	346C6-xi	CDR1 de cadena pesada	173	AGTTATGCAATGATC
50	346C6-xi	CDR2 de cadena pesada	174	ACCATTAGTACTGGTGGTATCA CATACTACGCGAGCTGGGCGA AAGGC
51	346C6-xi	CDR3 de cadena pesada	175	GGGGGATATGCTGCTAGTAGTG CTTATTATCTCCCGTACTACTTT GACTTG
52	346C6-xi	CDR1 de cadena ligera	176	CAGTCCTCCCAGTCCGTGTATA ACAACAACAACCTGGCC
53	346C6-xi	CDR2 de cadena ligera	177	CTGGCATCCACTCTGGCATCT
54	346C6-xi	CDR3 de cadena ligera	178	CTAGGTGGTTGTGATGATGATG CTGATACTTTTGCT
55	346C6-zu	CDR1 de cadena	179	TCCTACGCTATGATC

		pesada		
56	346C6-zu	CDR2 de cadena pesada	180	ACCATCTCTACCGGCGGAATTACCTACTACGCCTCCTGGGCCAAGGGC
57	346C6-zu	CDR3 de cadena pesada	181	GGCGGCTACGCCGCCAGCTCCGCTTACTACCTGCCCTACTACTTCGACCTG
58	346C6-zu	CDR1 de cadena ligera	182	CAGTCCTCCCAGTCCGTGTATAACAACAACAACCTGGCC
59	346C6-zu	CDR2 de cadena ligera	183	CTGGCCTCCACACTGGCCTCT
60	346C6-zu	CDR3 de cadena ligera	184	CTGGGCGGCTGCGACGACGACGCCGATACCTTTGCT

Tabla 6. Secuencias de aminoácidos de CDR de IMGT de mAb

	mAb	**Cadena de IgG**	**ID DE SEC. NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
1	MORAb-003	CDR1 de cadena pesada	13	GFTFSGYG
2	MORAb-003	CDR2 de cadena pesada	14	ISSGGSYT
3	MORAb-003	CDR3 de cadena pesada	15	ARHGDDPAWFAY
4	MORAb-003	CDR1 de cadena ligera	16	SSISSNN
5	MORAb-003	CDR2 de cadena ligera	17	GTS

6	MORAb-003	CDR3 de cadena ligera	18	QQWSSYPYMYT
7	MORAb-009	CDR1 de cadena pesada	185	GYSFTGYT
8	MORAb-009	CDR2 de cadena pesada	186	ITPYNGAS
9	MORAb-009	CDR3 de cadena pesada	187	ARGGYDGRGFDY
10	MORAb-009	CDR1 de cadena ligera	188	SSVSY
11	MORAb-009	CDR2 de cadena ligera	189	DTS
12	MORAb-009	CDR3 de cadena ligera	190	QQWSKHPLT
13	trastuzumab	CDR1 de cadena pesada	191	GFNIKDTY
14	trastuzumab	CDR2 de cadena pesada	192	IYPTNGYT
15	trastuzumab	CDR3 de cadena pesada	193	SRWGGDGFYAMDY
16	trastuzumab	CDR1 de cadena ligera	194	QDVNTA
17	trastuzumab	CDR2 de cadena ligera	195	SAS
18	trastuzumab	CDR3 de cadena ligera	196	QQHYTTPPT
19	33011-xi	CDR1 de cadena pesada	197	GISLSSDA
20	33011-xi	CDR2 de cadena pesada	198	INGGGNT
21	33011-xi	CDR3 de cadena pesada	199	ARGIQHGGGNSDYYYYGMDL
22	33011-xi	CDR1 de cadena ligera	200	QSISSV
23	33011-xi	CDR2 de cadena ligera	201	LAS
24	33011-xi	CDR3 de cadena ligera	202	QTNYGTSSSNYGFA
25	33011-zu	CDR1 de cadena pesada	203	GISLSSDA
26	33011-zu	CDR2 de cadena pesada	204	INGGGNT
27	33011-zu	CDR3 de cadena pesada	205	ARGIQHGGGNSDYYYYGMDL
28	33011-zu	CDR1 de cadena ligera	206	QSISSV

29	33011-zu	CDR2 de cadena ligera	207	LAS
30	33011-zu	CDR3 de cadena ligera	208	QTNYGTSSSNYGFA
31	111B10-xi	CDR1 de cadena pesada	209	GFSLNNYA
32	111B10-xi	CDR2 de cadena pesada	210	ISTGGLA
33	111B10-xi	CDR3 de cadena pesada	211	GRNGGGSYIFYYFDL
34	111B10-xi	CDR1 de cadena ligera	212	QSISSY
35	111B10-xi	CDR2 de cadena ligera	213	SAS
36	111B10-xi	CDR3 de cadena ligera	214	QSYYDIGTST
37	111B10-zu	CDR1 de cadena pesada	215	GFSLNNYA
38	111B10-zu	CDR2 de cadena pesada	216	ISTGGLA
39	111B10-zu	CDR3 de cadena pesada	217	ARNGGGSYIFYYFDL
40	111B10-zu	CDR1 de cadena ligera	218	QSISSY
41	111B10-zu	CDR2 de cadena ligera	219	SAS
42	111B10-zu	CDR3 de cadena ligera	220	QSYYDIGTST
43	201C15-xi	CDR1 de cadena pesada	221	GIDLSSYA
44	201C15-xi	CDR2 de cadena pesada	222	INIGGRV
45	201C15-xi	CDR3 de cadena pesada	223	ARYYNGGSYDI
46	201C15-xi	CDR1 de cadena ligera	224	ESIYRV
47	201C15-xi	CDR2 de cadena ligera	225	DTS
48	201C15-xi	CDR3 de cadena ligera	226	QGGYYADSYGIA
49	201C15-zu	CDR1 de cadena pesada	227	GIDLSSYA
50	201C15-zu	CDR2 de cadena pesada	228	INIGGRV
51	201C15-zu	CDR3 de cadena pesada	229	ARYYNGGSYDI
52	201C15-zu	CDR1 de cadena ligera	230	ESIYRV
53	201C15-zu	CDR2 de cadena ligera	231	DTS
54	201C15-zu	CDR3 de cadena ligera	232	QGGYYADSYGIA
55	346C6-xi	CDR1 de cadena pesada	233	GFSLSSYA
56	346C6-xi	CDR2 de cadena pesada	234	ISTGGIT
57	346C6-xi	CDR3 de cadena pesada	235	ARGGYAASSAYYLPYYFDL
58	346C6-xi	CDR1 de cadena ligera	236	QSVYNNNN

59	346C6-xi	CDR2 de cadena ligera	237	LAS
60	346C6-xi	CDR3 de cadena ligera	238	LGGCDDDADTFA
61	346C6-zu	CDR1 de cadena pesada	239	GFSLSSYA
62	346C6-zu	CDR2 de cadena pesada	240	ISTGGIT
63	346C6-zu	CDR3 de cadena pesada	241	ARGGYAASSAYYLPYYFDL
64	346C6-zu	CDR1 de cadena ligera	242	QSVYNNNN
65	346C6-zu	CDR2 de cadena ligera	243	LAS
66	346C6-zu	CDR3 de cadena ligera	244	LGGCDDDADTFA

Tabla 7. Secuencias de ácido nucleico que codifican CDR de IMGT de mAb

	mAb	**Cadena de IgG**	**ID DE SEC. NO.**	**Secuencia de ácido nucleico**
1	MORAb-003	CDR1 de cadena pesada	245	GGCTTCACCTTCAGCGGCTATGGG
2	MORAb-003	CDR2 de cadena pesada	246	ATTAGTAGTGGTGGTAGTTATACC
3	MORAb-003	CDR3 de cadena pesada	247	GCAAGACATGGGGACGATCCCGCCTGGTTCGCTTAT
4	MORAb-003	CDR1 de cadena ligera	248	TCAAGTATAAGTTCCAACAAC
5	MORAb-003	CDR2 de cadena ligera	249	GGCACATCC
6	MORAb-003	CDR3 de cadena ligera	250	CAACAGTGGAGTAGTTACCCGTACATGTACACG
7	MORAb-009	CDR1 de cadena pesada	251	GGTTACTCATTCACTGGCTACACC

8	MORAb-009	CDR2 de cadena pesada	252	ATTACTCCTTACAATGGTGCTTCT
9	MORAb-009	CDR3 de cadena pesada	253	GCAAGGGGGGGTTACGACGGGAGGGGTTTTGACTAC
10	MORAb-009	CDR1 de cadena ligera	254	TCAAGTGTAAGTTAC
11	MORAb-009	CDR2 de cadena ligera	255	GACACATCC
12	MORAb-009	CDR3 de cadena ligera	256	CAGCAGTGGAGTAAGCACCCTCTCACG
13	33011-xi	CDR1 de cadena pesada	257	GGAATCTCCCTCAGTAGCGATGCA
14	33011-xi	CDR2 de cadena pesada	258	ATTAATGGTGGTGGTAACACA
15	33011-xi	CDR3 de cadena pesada	259	GCCAGAGGCATTCAACATGGTGGTGGTAATAGTGATTATTATTATTACGGCATGGACCTC
16	33011-xi	CDR1 de cadena ligera	260	CAGAGCATTAGTAGTGTC
17	33011-xi	CDR2 de cadena ligera	261	CTGGCATCT
18	33011-xi	CDR3 de cadena ligera	262	CAAACCAATTATGGTACTAGTAGTAGTAATTATGGTTTTGCT
19	33011-zu	CDR1 de cadena pesada	263	GGAATTTCCCTCTCCTCCGACGCG
20	33011-zu	CDR2 de cadena pesada	264	ATCAACGGCGGCGGAAACACC
21	33011-zu	CDR3 de cadena pesada	265	GCGCGCGGCATCCAGCACGGTGGTGGAAACAGCGACTACTACTACTATGGGATGGATCTG
22	33011-zu	CDR1 de cadena ligera	266	CAGTCAATTAGCAGCGTG
23	33011-zu	CDR2 de cadena ligera	267	TTGGCCTCC
24	33011-zu	CDR3 de cadena ligera	268	CAAACCAACTACGGAACCTCCAGCTCCAACTACGGCTTTGCC
25	111B10-xi	CDR1 de cadena pesada	269	GGATTCTCCCTCAATAACTATGCA

26	111B10-xi	CDR2 de cadena pesada	270	ATTAGTACTGGTGGTCTCGCA
27	111B10-xi	CDR3 de cadena pesada	271	GGCAGAAATGGTGGTGGTAGTTATATTTTCTATTATTTTGACTTG
28	111B10-xi	CDR1 de cadena ligera	272	CAGAGCATTAGTAGTTAC
29	111B10-xi	CDR2 de cadena ligera	273	TCTGCATCC
30	111B10-xi	CDR3 de cadena ligera	274	CAAAGCTATTATGATATTGGTACTAGTACT
31	111B10-zu	CDR1 de cadena pesada	275	GGCTTCTCCCTGAACAACTACGCC
32	111B10-zu	CDR2 de cadena pesada	276	ATCAGCACAGGCGGCCTGGCC
33	111B10-zu	CDR3 de cadena pesada	277	GCCAGAAACGGCGGAGGCTCCTACATCTTCTACTACTTCGACCTG
34	111B10-zu	CDR1 de cadena ligera	278	CAGTCCATCTCCTCCTAC
35	111B10-zu	CDR2 de cadena ligera	279	TCTGCCTCC
36	111B10-zu	CDR3 de cadena ligera	300	CAGTCCTACTACGACATCGGCACCTCCACC
37	201C15-xi	CDR1 de cadena pesada	301	GGAATCGACCTCAGTAGCTATGCA
38	201C15-xi	CDR2 de cadena pesada	302	ATTAATATTGGTGGTCGCGTA
39	201C15-xi	CDR3 de cadena pesada	303	GCCAGATATTATAATGGTGGTAGTTATGACATC
40	201C15-xi	CDR1 de cadena ligera	304	GAGAGCATTTATCGCGTA

41	201C15-xi	CDR2 de cadena ligera	305	GATACATCC
42	201C15-xi	CDR3 de cadena ligera	306	CAAGGCGGTTATTATGCTGATAGTTATGGTATTGCT
43	201C15-zu	CDR1 de cadena pesada	307	GGAATCGACCTGTCCTCCTACGCT
44	201C15-zu	CDR2 de cadena pesada	308	ATCAACATCGGCGGCAGAGTG
45	201C15-zu	CDR3 de cadena pesada	309	GCCCGGTACTACAACGGCGGCTCCTACGATATC
46	201C15-zu	CDR1 de cadena ligera	310	GAGTCCATCTACCGGGTG
47	201C15-zu	CDR2 de cadena ligera	311	GACACCAGC
48	201C15-zu	CDR3 de cadena ligera	312	CAGGGCGGCTACTACGCCGACTCCTACGGAATCGCT
49	346C6-xi	CDR1 de cadena pesada	313	GGATTCTCCCTCAGTAGTTATGCA
50	346C6-xi	CDR2 de cadena pesada	314	ATTAGTACTGGTGGTATCACA
51	346C6-xi	CDR3 de cadena pesada	315	GCCAGAGGGGGATATGCTGCTAGTAGTGCTTATTATCTCCCGTACTACTTTGACTTG
52	346C6-xi	CDR1 de cadena ligera	316	CAGAGTGTTTATAATAATAACAAC
53	346C6-xi	CDR2 de cadena ligera	317	CTGGCATCC
54	346C6-xi	CDR3 de cadena ligera	318	CTAGGTGGTTGTGATGATGATGCTGATACTTTTGCT
55	346C6-zu	CDR1 de cadena pesada	319	GGCTTCTCCCTGTCCTCCTACGCT
56	346C6-zu	CDR2 de cadena pesada	320	ATCTCTACCGGCGGAATTACC
57	346C6-	CDR3 de cadena pesada	321	GCTAGAGGCGGCTACGCCGCCAGC

	zu			TCCGCTTACTACCTGCCCTACTACT TCGACCTG
58	346C6-zu	CDR1 de cadena ligera	322	CAGTCCGTGTATAACAACAACAAC
59	346C6-zu	CDR2 de cadena ligera	323	CTGGCCTCC
60	346C6-zu	CDR3 de cadena ligera	324	CTGGGCGGCTGCGACGACGACGCC GATACCTTTGCT

Tabla 8. Secuencias de aminoácidos de cadenas de Ig de mAb de longitud completa

	mAb	**Cadena de IgG**	**ID DE SEC. NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
1	MORAb-003	Cadena pesada	1	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFT FSGYGLSWVRQAPGKGLEWVAMISSGG SYTYYADSVKGRFAISRDNAKNTLFLQ MDSLRPEDTGVYFCARHGDDPAWFAY WGQGTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
2	MORAb-	Cadena	6	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSVSSSIS

	003	ligera		SNNLHWYQQKPGKAPKPWIYGTSNLAS GVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATY YCQQWSSYPYMYTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
3	MORAb-009	Cadena pesada	325	QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYS FTGYTMNWVKQSHGKSLEWIGLITPYN GASSYNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMD LLSLTSEDSAVYFCARGGYDGRGFDYW GSGTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
4	MORAb-009	Cadena ligera	326	DIELTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSV SYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASG VPGRFSGSGSGNSYSLTISSVEAEDDATY YCQQWSKHPLTFGSGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT

				HQGLSSPVTKSFNRGEC
5	trastuzumab	Cadena pesada	327	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFN IKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTN GYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMD YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
6	trastuzumab	Cadena ligera	328	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQD VNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY SGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC
7	33011-xi	Cadena pesada	329	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGISLS SDAISWVRQAPGKGLEYIGIINGGGNTY YASWAKGRFTISKTSTTVDLKITSPTTED TATYFCARGIQHGGGNSDYYYYGMDL WGPGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST

				SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
8	33011-xi	Cadena ligera	330	EVLMTQTPSSVSAAVGDTVTIKCQASQS ISSVLSWYQQKPGQPPKLLIYLASTLASG VPSRFSGSRSGTEFTLTISDLECDDAATY YCQTNYGTSSSNYGFAFGGGTEVVVKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
9	33011-zu	Cadena pesada	331	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIS LSSDAISWVRQAPGKGLEYIGIINGGGNT YYASWAKGRFTISRHNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARGIQHGGGNSDYYYY GMDLWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY

				NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
10	33011-zu	Cadena ligera	332	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSI SSVLSWYQQKPGKAPKLLIYLASTLASG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQCEDIATYY CQTNYGTSSSNYGFAFGGGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
11	111B10-xi	Cadena pesada	333	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLN NYAMSWVRQAPGKGLEWIGSISTGGLA FYANWAKGRFTISRTSTTVDLKMTSLTT EDTATYFCGRNGGGSYIFYYFDLWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK

12	111B10-xi	Cadena ligera	334	AFELTQTPSSVEAAVGGTITIKCQASQSIS SYLSWYQQKPGQPPKLLIYSASTLASGV SSRFKGSGSGTEYTLTISDLECADAATYF CQSYYDIGTSTFGGGTEVVVKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC
13	111B10-zu	Cadena pesada	335	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFS LNNYAMSWVRQAPGKGLEWIGSISTGG LAFYANWAKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARNGGGSYIFYYFD LWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
14	111B10-zu	Cadena ligera	336	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSI SSYLSWYQQKPGKAPKLLIYSASTLASG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQCEDAATY YCQSYYDIGTSTFGGGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK

				DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC
15	201C15-xi	Cadena pesada	337	QSVKESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGIDLS SYAMGWFRQAPGKGLEYIGTINIGGRVY YASWAKGRFTISRTSTTVDLKAPSLTAE DTATYFCARYYNGGSYDIWGPGTLVTV SLASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
16	201C15-xi	Cadena ligera	338	DVVMTQTPASASEPVGGTVTIKCQASES IYRVLAWYQQKPGQPPKLLIYDTSTLAS GAPSRFKGSGYGTEFTLTISGVQCEDAA TYYCQGGYYADSYGIAFGGGTEVVVKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
17	201C15-zu	Cadena pesada	339	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGID LSSYAMGWVRQAPGKGLEYIGTINIGGR VYYASWAKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARYYNGGSYDIWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT

				AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
18	201C15-zu	Cadena ligera	340	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASESI YRVLAWYQQKPGKAPKLLIYDTSTLAS GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQCDDAAT YYCQGGYYADSYGIAFGGGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
19	346C6-xi	Cadena pesada	341	QSVEESGGRLVKPDESLTLTCTASGFSLS SYAMIWVRQAPGEGLEWIGTISTGGITY YASWAKGRFTISKTSTTVDLKITSPTTED TATYFCARGGYAASSAYYLPYYFDLWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS

				VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
20	346C6-xi	Cadena ligera	342	AAVLTQTPSPVSAAVGGTVTISCQSSQS VYNNNNLAWFQQKPGQPPKLLIYLAST LASGVPSRFSGSGSGTQFTLTISGVQCDD AATYYCLGGCDDDADTFAFGGGTEVVV KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
21	346C6-zu	Cadena pesada	343	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFS LSSYAMIWVRQAPGKGLEWIGTISTGGI TYYASWAKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARGGYAASSAYYLPY YFDLWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK

22	346C6-zu	Cadena ligera	344	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSV YNNNNLAWYQQKPGKVPKLLIYLASTL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQCEDA ATYYCLGGCDDDADTFAFGGGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Tabla 9. Secuencias de ácidos nucleicos que codifican cadenas de Ig de mAb de longitud completa+

	mAb	**Cadena de IgG**	**ID DE SEC. NO.**	**Secuencia de ácido nucleico**
1	MORAb-003	Cadena pesada	345	GAGGTCCAACTGGTGGAGAGCGGTGG AGGTGTTGTGCAACCTGGCCGGTCCCT GCGCCTGTCCTGCTCCGCATCTGGCTT CACCTTCAGCGGCTATGGGTTGTCTTG GGTGAGACAGGCACCTGGAAAAGGTC TTGAGTGGGTTGCAATGATTAGTAGTG GTGGTAGTTATACCTACTATGCAGACA GTGTGAAGGGTAGATTTGCAATATCGC GAGACAACGCCAAGAACACATTGTTC CTGCAAATGGACAGCCTGAGACCCGA AGACACCGGGGTCTATTTTTGTGCAAG ACATGGGGACGATCCCGCCTGGTTCGC TTATTGGGGCCAAGGGACCCCGGTCAC CGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCC ATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTC CAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGG CCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT TCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGA

				ACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG CACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCC TCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAAT CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTG ACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCC CAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCG TCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCC AAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGAC GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAA GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCG CGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTA CCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCT GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA GCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACC ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG AGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCC ATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACC AGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGT GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTT ATATTCAAAGCTCACCGTGGACAAGA GCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG

				CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCT CTCCCTGTCTCCCGGGAAATGA
2	MORAb-003	Cadena ligera	346	GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCAAG CAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGTGACA GAGTGACCATCACCTGTAGTGTCAGCT CAAGTATAAGTTCCAACAACTTGCACT GGTACCAGCAGAAGCCAGGTAAGGCT CCAAAGCCATGGATCTACGGCACATCC AACCTGGCTTCTGGTGTGCCAAGCAGA TTCAGCGGTAGCGGTAGCGGTACCGA CTACACCTTCACCATCAGCAGCCTCCA GCCAGAGGACATCGCCACCTACTACTG CCAACAGTGGAGTAGTTACCCGTACAT GTACACGTTCGGCCAAGGGACCAAGG TGGAAATCAAACGAACTGTGGCTGCA CCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTG ATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCT CTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCT ATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGG AAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGG TAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGC AGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGC CTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAA AGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCT ACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGC CTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTC AACAGGGGAGAGTGTTAA
3	MORAb-009	Cadena pesada	347	CAGGTACAACTGCAGCAGTCTGGGCCT GAGCTGGAGAAGCCTGGCGCTTCAGT GAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTA CTCATTCACTGGCTACACCATGAACTG

				GGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAGCC TTGAGTGGATTGGACTTATTACTCCTT ACAATGGTGCTTCTAGCTACAACCAGA AGTTCAGGGGCAAGGCCACATTAACT GTAGACAAGTCATCCAGCACAGCCTA CATGGACCTCCTCAGTCTGACATCTGA AGACTCTGCAGTCTATTTCTGTGCAAG GGGGGGTTACGACGGGAGGGGTTTTG ACTACTGGGGATCCGGGACCCCGGTC ACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGC CCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCC TCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGC GGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTA CTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTG GAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCG TGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGT CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCG TGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGG GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGA ATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG GACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTG TGACAAAACTCACACATGCCCACCGTG CCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGAC CGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAAC CCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGA CCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGG ACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTC AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG TACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTC

				CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAA GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACA AAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAA ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAG AACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTC AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCC GGAGAACAACTACAAGACCACGCCTC CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCT TCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACA AGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTC TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT CTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCCCGGGAAATGA
4	MORAb-009	Cadena ligera	348	GACATCGAGCTCACTCAGTCTCCAGCA ATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAG GTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCA AGTGTAAGTTACATGCACTGGTACCAG CAGAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAAG ATGGATTTATGACACATCCAAACTGGC TTCTGGAGTCCCAGGTCGCTTCAGTGG CAGTGGGTCTGGAAACTCTTACTCTCT CACAATCAGCAGCGTGGAGGCTGAAG ATGATGCAACTTATTACTGCCAGCAGT GGAGTAAGCACCCTCTCACGTTCGGAT CCGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGA ACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATC TTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA TCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTG

				CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCC AAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGC CCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGA GTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGAC AGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTG ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAA ACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCA CCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCA CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT TAA
5	33011-xi	Cadena pesada	349	CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGTCG CCTGGTCACGCCTGGGACACCCCTGAC ACTCACCTGCACCGTCTCTGGAATCTC CCTCAGTAGCGATGCAATAAGCTGGGT CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTCG AATACATCGGAATCATTAATGGTGGTG GTAACACATACTACGCGAGCTGGGCG AAAGGCCGATTCACCATCTCCAAAACC TCGACCACGGTGGATCTGAAAATCACC AGTCCGACAACCGAGGACACGGCCAC CTATTTCTGTGCCAGAGGCATTCAACA TGGTGGTGGTAATAGTGATTATTATTA TTACGGCATGGACCTCTGGGGCCCAGG CACCCTGGTCACTGTCTCTTCAGCATC CACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCT GGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGG TCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGA CGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGA CCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTG TCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCC

				TCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCA GCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCT GCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAAC ACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCC CAAATCTTGTGACAAAACTCACACATG CCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCT GGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCC CCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGA TCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCG TGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACA ACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCC TCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTC TCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATC GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACA CCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGA CCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGC CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCT CCTTCTTCTTATATTCAAAGCTCACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGGAAA TGA

6	33011-xi	Cadena ligera	350	GAAGTGTTGATGACCCAGACTCCATCC TCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAGACACA GTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCA GAGCATTAGTAGTGTCTTGTCCTGGTA TCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCA AGCTCCTGATCTATCTGGCATCCACTC TGGCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTCA GCGGCAGTAGATCTGGGACAGAGTTC ACTCTCACCATCAGCGACCTGGAGTGT GACGATGCTGCCACTTACTACTGTCAA ACCAATTATGGTACTAGTAGTAGTAAT TATGGTTTTGCTTTCGGCGGAGGGACC GAGGTGGTCGTCAAACGAACTGTGGC TGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCC ATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC TGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAA CTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACA GTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAAT CGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACA GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTA CAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAA GTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAG CTTCAACAGGGGAGAGTGTTGA
7	33011-zu	Cadena pesada	351	GAAGTCCAACTGGTGGAAAGCGGGGG AGGACTGGTGCAGCCGGGCGGATCCC TCCGGCTGTCATGTGCTGCATCGGGAA TTTCCCTCTCCTCCGACGCGATTAGCT GGGTCAGACAGGCCCCCGGAAAGGGG CTGGAGTACATCGGTATCATCAACGGC

				GGCGGAAACACCTACTACGCCTCCTGG
				GCCAAGGGCCGCTTCACCATCTCGCGG
				CATAATTCCAAGAACACTCTGTACTTG
				CAAATGAACTCCCTGAGGGCCGAGGA
				CACCGCCGTGTACTACTGCGCGCGCGG
				CATCCAGCACGGTGGTGGAAACAGCG
				ACTACTACTACTATGGGATGGATCTGT
				GGGGCCAGGGAACTCTTGTGACCGTGT
				CGTCAGCATCCACCAAGGGCCCATCG
				GTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAG
				AGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCT
				GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC
				CGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACT
				CAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC
				ACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCA
				GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG
				ACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC
				CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC
				AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAA
				GAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACA
				AAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAG
				CACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCA
				GTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAG
				GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT
				GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGT
				GAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT
				TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG
				GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCG
				GGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACC
				GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGC
				ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG

				TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGC CCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCAT CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG AACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAG GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCT GGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTATA TTCAAAGCTCACCGTGGACAAGAGCA GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC TGTCTCCCGGGAAATGA
8	33011-zu	Cadena ligera	352	GACATTCAGATGACCCAGTCCCCAAGC TCGCTGTCCGCCTCCGTGGGCGACCGC GTGACCATCACGTGCCAGGCGTCCCAG TCAATTAGCAGCGTGCTCTCCTGGTAC CAACAGAAGCCGGGGAAAGCACCCAA GCTGCTGATCTACTTGGCCTCCACTCT GGCCTCGGGAGTGCCTTCACGGTTCTC CGGATCGGGATCTGGTACTGATTTCAC CCTCACCATCTCGAGCCTTCAGTGCGA GGACATCGCTACTTACTATTGTCAAAC CAACTACGGAACCTCCAGCTCCAACTA CGGCTTTGCCTTCGGTGGCGGGACCAA GGTCGAAATCAAACGAACTGTGGCTG CACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATC TGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGC CTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTT

				CTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGT GGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG GGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGA GCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA GCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGC AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT CTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGG CCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTT CAACAGGGGAGAGTGTTGA
9	111B10-xi	Cadena pesada	353	CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGTCG CCTGGTCACGCCTGGGACACCCCTGAC ACTCACCTGCACAGTCTCTGGATTCTC CCTCAATAACTATGCAATGAGCTGGGT CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG AATGGATCGGATCCATTAGTACTGGTG GTCTCGCATTCTACGCGAACTGGGCAA AAGGCCGATTCACCATCTCCAGAACCT CGACCACGGTGGATCTGAAAATGACC AGTCTGACAACCGAGGACACGGCCAC CTATTTCTGTGGCAGAAATGGTGGTGG TAGTTATATTTTCTATTATTTTGACTTG TGGGGCCAAGGCACCCTCGTCACTGTC TCTTCAGCATCCACCAAGGGCCCATCG GTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAG AGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCT GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC CGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACT CAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCA GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG ACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC

				CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACA AAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAG CACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCA GTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAG GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGT GAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCG GGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACC GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGC ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGC CCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCAT CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG AACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAG GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCT GGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTATA TTCAAAGCTCACCGTGGACAAGAGCA GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC TGTCTCCCGGGAAATGA
10	111B10-xi	Cadena ligera	354	GCATTCGAATTGACCCAGACTCCATCC TCCGTGGAGGCAGCTGTGGGAGGCAC

				AATCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTC AGAGCATTAGTAGTTACTTATCCTGGT ATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCC AAGCTCCTGATCTATTCTGCATCCACT CTGGCATCTGGGGTCTCATCGCGGTTC AAAGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTA CACTCTCACCATCAGCGACCTGGAGTG TGCCGATGCTGCCACTTACTTCTGTCA AAGCTATTATGATATTGGTACTAGTAC TTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTCG TCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTG TCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGC AGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTG TGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCA GAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTG GATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC CAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAG CAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCA GCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGAC TACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTG CGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTC GCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGG GAGAGTGTTGA
11	111B10-zu	Cadena pesada	355	GAAGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGG CGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCT GAGACTGTCTTGTGCCGCCTCCGGCTT CTCCCTGAACAACTACGCCATGTCCTG GGTGCGACAGGCCCCTGGCAAAGGCC TGGAATGGATCGGCTCCATCAGCACA GGCGGCCTGGCCTTCTACGCCAATTGG GCCAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCG

				GGACAACTCCAAGAACACCCTGTACCT
				CCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGG
				ACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAA
				ACGGCGGAGGCTCCTACATCTTCTACT
				ACTTCGACCTGTGGGGCCAGGGCACCC
				TCGTGACAGTGTCATCTGCATCCACCA
				AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC
				CCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCA
				CAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG
				GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTG
				TCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGC
				GGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTA
				CAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC
				AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGC
				TTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC
				GTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAA
				GGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAAT
				CTTGTGACAAAACTCACACATGCCCAC
				CGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGG
				GACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAA
				AACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCC
				GGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTG
				GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA
				GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG
				GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA
				AAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG
				CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC
				CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG
				CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA
				ACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAG
				AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA

				GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC TGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCA AGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTG GTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA GCCGGAGAACAACTACAAGACCACGC CTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT TCTTCTTATATTCAAAGCTCACCGTGG ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG GCTCTGCACAACCACTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGGAAATG A
12	111B10-zu	Cadena ligera	356	GATATTCAGATGACCCAGTCCCCCTCC AGCCTGTCCGCTTCTGTGGGCGACAGA GTGACCATCACCTGTCAGGCCTCCCAG TCCATCTCCTCCTACCTGTCCTGGTATC AGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAG CTGCTGATCTACTCTGCCTCCACACTG GCCTCCGGCGTGCCCTCTAGATTCTCC GGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTTACC CTGACCATCAGCTCCCTCCAGTGCGAG GATGCCGCCACCTACTACTGCCAGTCC TACTACGACATCGGCACCTCCACCTTC GGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAA ACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTT CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTT GAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTG CCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGA GGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATA ACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGG

				AGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAG GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCAC CCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACG AGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCC GTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGTTGA
13	201C15-xi	Cadena pesada	357	CAGTCAGTGAAGGAGTCCGGGGGTCG CCTGGTCACGCCTGGGACACCCCTGAC ACTCACCTGCACAGTCTCTGGAATCGA CCTCAGTAGCTATGCAATGGGCTGGTT CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG AATACATCGGAACCATTAATATTGGTG GTCGCGTATATTACGCGAGCTGGGCAA AAGGCCGATTCACCATCTCCAGAACCT CGACCACGGTGGATCTGAAAGCGCCC AGTCTGACAGCCGAGGACACGGCCAC CTATTTCTGTGCCAGATATTATAATGG TGGTAGTTATGACATCTGGGGCCCAGG CACCCTGGTCACCGTCTCTTTAGCATC CACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCT GGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGG TCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGA CGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGA CCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTG TCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCC TCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCA GCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCT GCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAAC ACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCC

				CAAATCTTGTGACAAAACTCACACATG CCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCT GGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCC CCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGA TCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCG TGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACA ACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCC TCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTC TCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATC GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACA CCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGA CCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGC CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCT CCTTCTTCTTATATTCAAAGCTCACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGGAAA TGA
14	201C15-xi	Cadena ligera	358	GATGTTGTGATGACCCAGACTCCAGCC TCCGCGTCTGAACCTGTGGGAGGCACA GTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTGA GAGCATTTATCGCGTATTGGCCTGGTA

				TCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCA AGCTCCTGATCTATGATACATCCACTC TGGCATCTGGGGCCCCATCGCGGTTCA AAGGCAGTGGATATGGGACAGAGTTC ACTCTCACCATCAGCGGCGTGCAGTGT GAAGATGCTGCCACTTACTACTGTCAA GGCGGTTATTATGCTGATAGTTATGGT ATTGCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGT GGTGGTCAAACGAACTGTGGCTGCAC CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGA TGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTC TGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTA TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGA AGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGT AACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCA GGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCC TCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAA GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTA CGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCT GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCA ACAGGGGAGAGTGTTGA
15	201C15-zu	Cadena pesada	359	CAGGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGG AGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCTCT GAGACTGTCCTGTTCCGCCTCCGGAAT CGACCTGTCCTCCTACGCTATGGGCTG GGTGCGACAGGCTCCTGGCAAGGGCC TGGAGTACATCGGCACCATCAACATCG GCGGCAGAGTGTACTACGCCTCCTGGG CCAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAG ACAACTCCAAGAACACCCTGTACCTCC AGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGAC

				ACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGTAC TACAACGGCGGCTCCTACGATATCTGG GGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCC TCTGCATCCACCAAGGGCCCATCGGTC TTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGC ACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGG CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA ACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAG GCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCT TCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGAC TCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCG TGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGA CCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAA GTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACT CACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCT GAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTC CTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACC CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCA CGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACT GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGA GCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGG TCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCA GCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAC AGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGG ATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGC

				CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAT CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACT ACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACT CCGACGGCTCCTTCTTCTTATATTCAA AGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT CCCGGGAAATGA
16	201C15-zu	Cadena ligera	360	GATATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCC ACCCTGTCTGCCTCTGTGGGCGACAGA GTGACCATCACCTGTCAGGCCTCCGAG TCCATCTACCGGGTGCTGGCCTGGTAT CAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCCCAA GCTGCTGATCTACGACACCAGCACACT GGCCTCCGGCGTGCCCTCTAGATTCTC CGGCTCTGGCTCTGGCACCGAGTTTAC CCTGACCATCTCCAGCCTCCAGTGCGA CGACGCCGCCACCTACTATTGTCAGGG CGGCTACTACGCCGACTCCTACGGAAT CGCTTTCGGCGGAGGCACCAAGGTGG AAATCAAACGAACTGTGGCTGCACCA TCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATG AGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTG TTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATC CCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAG GTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAC TCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGA CAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCA GCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCA

				GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGC CTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGA GCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACA GGGGAGAGTGTTGA
17	346C6-xi	Cadena pesada	361	CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGCGGTCG CCTGGTAAAGCCTGACGAATCCCTGAC ACTCACCTGCACAGCCTCTGGATTCTC CCTCAGTAGTTATGCAATGATCTGGGT CCGCCAGGCTCCAGGGGAGGGGCTGG AATGGATCGGAACCATTAGTACTGGTG GTATCACATACTACGCGAGCTGGGCG AAAGGCCGATTCACCATCTCCAAAACC TCGACCACGGTGGATCTGAAAATCACC AGTCCGACAACCGAGGACACGGCCAC CTATTTCTGTGCCAGAGGGGGATATGC TGCTAGTAGTGCTTATTATCTCCCGTA CTACTTTGACTTGTGGGGCCAAGGGAC CCTGGTCACCGTCTCCTCAGCATCCAC CAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGC ACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGG CACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAA GGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGT GTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCA GCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCC TACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCA GCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA GCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACC AAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAA ATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCC ACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGG

				GGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTC CCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGT GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA CCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGA GAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGC AGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACC AAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCT GGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC AGCCGGAGAACAACTACAAGACCACG CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCC TTCTTCTTATATTCAAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA AGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGGAAAT GA
18	346C6-xi	Cadena ligera	362	GCAGCCGTGCTGACCCAGACACCATC ACCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAGGCAC AGTCACCATCAGTTGCCAGTCCAGTCA GAGTGTTTATAATAATAACAACTTAGC CTGGTTTCAGCAGAAACCCGGGCAGC CTCCCAAGCTTCTGATCTATCTGGCAT

				CCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCAC GGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACA CAGTTCACTCTCACCATCAGCGGCGTG CAGTGTGACGATGCTGCCACTTATTAC TGTCTAGGTGGTTGTGATGATGATGCT GATACTTTTGCTTTCGGCGGAGGGACT GAGGTGGTGGTCAAACGAACTGTGGC TGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCC ATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC TGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAA CTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACA GTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAAT CGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACA GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTA CAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAA GTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAG CTTCAACAGGGGAGAGTGTTGA
19	346C6-zu	Cadena pesada	363	GAAGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGG CGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCT GAGACTGTCTTGTGCCGCCTCCGGCTT CTCCCTGTCCTCCTACGCTATGATCTG GGTGCGACAGGCCCCTGGCAAGGGCC TGGAATGGATCGGCACCATCTCTACCG GCGGAATTACCTACTACGCCTCCTGGG CCAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAG ACAACTCCAAGAACACCCTGTACCTCC AGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGAC ACCGCCGTGTACTATTGTGCTAGAGGC GGCTACGCCGCCAGCTCCGCTTACTAC

				CTGCCCTACTACTTCGACCTGTGGGGC CAGGGCACCCTCGTGACAGTGTCATCT GCATCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTC CCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACC TCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC GGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCG CCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC CGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCT ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGC CCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCT ACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGT TGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCA CACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGA ACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCT CATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACG AAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAT GCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCA GTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA GCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACT GGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGG TGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATG AGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTG ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC

				AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG CAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACA AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCG ACGGCTCCTTCTTCTTATATTCAAAGC TCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCC GGGAAATGA
20	346C6-zu	Cadena ligera	364	GATATTCAGATGACCCAGTCCCCCTCC AGCCTGTCCGCTTCTGTGGGCGACAGA GTGACCATCACCTGTCAGTCCTCCCAG TCCGTGTATAACAACAACAACCTGGCC TGGTATCAGCAGAAACCCGGCAAGGT GCCCAAGCTGCTGATCTACCTGGCCTC CACACTGGCCTCTGGCGTGCCCTCTAG ATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGA CTTTACCCTGACCATCAGCTCCCTCCA GTGCGAGGATGCCGCCACCTACTATTG CCTGGGCGGCTGCGACGACGACGCCG ATACCTTTGCTTTTGGCGGAGGCACCA AGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCT GCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCA TCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACT GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC TTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACA GTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAAT CGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACA GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTA CAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAA

				GTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAG CTTCAACAGGGGAGAGTGTTGA

Las secuencias de ácido nucleico enumeradas no incluyen las secuencias líderes.

[00121]En diversas modalidades, un ADC descrito en la presente puede comprender cualquier conjunto de dominios variables de cadena pesada y ligera enumerado en las tablas anteriores (p. ej., dominios variables de cadena pesada y ligera de MORAb-003 o dominios variables de cadena pesada y ligera de) o el conjunto de seis secuencias de CDR del conjunto de cadena pesada y ligera. En algunas modalidades, el ADC además comprende dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos o fragmentos de estos. Por ejemplo, el ADC puede comprender un dominio constante de cadena pesada y ligera de IgG humana (tal como un IgG1) y un dominio constante de cadena ligera kappa o lambda humano. En diversas modalidades, el resto de anticuerpo de los ADC descritos comprende un dominio constante de cadena pesada de subtipo 1 de inmunoglobulina G humana (IgG1) con un dominio constante de cadena ligera kappa de Ig humana.

[00122]En diversas modalidades, el antígeno de cáncer diana para un ADC es receptor de folato alfa (**"**FRA**"**).

[00123]En diversas modalidades, en anticuerpo anti-FRA o fragmento de unión al antígeno de este comprende tres CDR de cadena pesada y tres CDR de cadena ligera de la siguiente manera: CDR1 de cadena pesada (HCDR1) que consiste en ID DE SEC. NO.:2, CDR2 de cadena pesada (HCDR2) que consiste en ID DE SEC. NO.:3, CDR3 de cadena pesada (HCDR3) que consiste en ID DE SEC. NO.:4; CDR1 de cadena ligera (LCDR1) que consiste en ID DE SEC. NO.:7, CDR2 de cadena ligera (LCDR2) que consiste en ID DE SEC. NO.:8 y CDR3 de cadena ligera (LCDR3) que consiste en ID DE SEC. NO.:9, según lo definido mediante el sistema de numeración Kabat (Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991))).

[00124]En algunas modalidades, en anticuerpo anti-FRA o fragmento de unión al antígeno de este comprende tres CDR de cadena pesada y tres CDR de cadena ligera de la siguiente manera: CDR1 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:13, CDR2 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:14, CDR3 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:15; CDR1 de cadena ligera que consiste en ID DE SEC. NO.:16, CDR2 de cadena ligera que consiste en ID DE SEC. NO.:17 y CDR3 de cadena ligera que consiste en ID DE SEC. NO.:18, según lo definido mediante el sistema de numeración IMGT (International ImMunoGeneTics Information System (IMGT®)).

[00125]En diversas modalidades, el anticuerpo anti-FRA o fragmento de unión al antígeno de este comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:23 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:24. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-FRA o fragmento de unión al antígeno de este comprende la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de ID DE SEC. NO.:23 y la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera ID DE SEC. NO.:24, o secuencias que son al menos el 95 % idénticas a las secuencias mencionadas anteriormente. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-FRA o fragmento de unión al antígeno de este tiene una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada que es al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idéntica a ID DE SEC. NO.:23 y una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera que es al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idéntica a ID DE SEC. NO.:24.

[00126]En diversas modalidades, el anticuerpo anti-FRA comprende un dominio constante de cadena pesada de IgG1 humana con un dominio constante de cadena ligera kappa de Ig humana.

[00127]En diversas modalidades, el anticuerpo anti-FRA comprende la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de ID DE SEC. NO.:1 o una secuencia que es al menos el 95 % idéntica a ID DE SEC. NO.:1, y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de ID DE SEC. NO.:6 o una secuencia que es al menos el 95 % idéntica a ID DE SEC. NO.:6. En modalidades específicas, el anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de ID DE SEC. NO.:1 y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de ID DE SEC. NO.:6, o secuencias que son al menos el 95 % idénticas a las secuencias mencionadas anteriormente. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-FRA tiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que es al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idéntica a ID DE SEC. NO.:1 y/o una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que es al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idéntica a ID DE SEC. NO.:6. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-FRA comprende una cadena pesada codificada por la secuencia de nucleótidos de ID DE SEC. NO.:11 (con los nucleótidos que codifican la secuencia líder) o ID DE SEC. NO.:345 (sin los nucleótidos que codifican la secuencia líder); y una cadena ligera codificada por la secuencia de nucleótidos de ID DE SEC. NO.:12 (con los nucleótidos que codifican la secuencia líder) o ID DE SEC. NO.:346 (son los nucleótidos que codifican la secuencia líder). En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de cadena pesada carece de lisina de extremo C. En diversas modalidades, el anticuerpo anti-FRA tiene la secuencia de aminoácidos del anticuerpo

producido por una línea celular depositada en condiciones de acuerdo con el tratado de Budapest con la Colección de Cultivos Tipo de Estados Unidos (ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209) el 24 de abril de 2006, con el N.º de acceso PTA-7552, o dichas secuencias que carecen de lisina de extremo C de cadena pesada. En diversas modalidades, el anticuerpo anti-FRA es MORAb-003 (nombre USAN: farletuzumab) (Ebel et ál. (2007) Cancer Immunity 7:6) o un fragmento de unión al antígeno de este.

[00128]En otras modalidades distintas, el antígeno de cáncer diana para un ADC es receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (“her2”).

[00129]En diversas modalidades, en anticuerpo anti-her2 o fragmento de unión al antígeno de este comprende tres CDR de cadena pesada y tres CDR de cadena ligera de la siguiente manera: CDR1 de cadena pesada (HCDR1) que consiste en ID DE SEC. NO.:71, CDR2 de cadena pesada (HCDR2) que consiste en ID DE SEC. NO.:72, CDR3 de cadena pesada (HCDR3) que consiste en ID DE SEC. NO.:73; CDR1 de cadena ligera (LCDR1) que consiste en ID DE SEC. NO.:74, CDR2 de cadena ligera (LCDR2) que consiste en ID DE SEC. NO.:75 y CDR3 de cadena ligera (LCDR3) que consiste en ID DE SEC. NO.:76, según lo definido mediante el sistema de numeración Kabat.

[00130]En algunas modalidades, en anticuerpo anti-her2 o fragmento de unión al antígeno de este comprende tres CDR de cadena pesada y tres CDR de cadena ligera de la siguiente manera: CDR1 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:191, CDR2 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:192, CDR3 de cadena pesada que consiste en ID DE SEC. NO.:193; CDR1 de cadena ligera que consiste en ID DE SEC. NO.:194, CDR2 de cadena ligera que consiste en ID DE SEC. NO.:195 y CDR3 de cadena ligera que consiste en ID DE SEC. NO.:196, según lo definido mediante el sistema de numeración IMGT.

[00131]En diversas modalidades, el anticuerpo anti-her2 o fragmento de unión al antígeno de este comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:27 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:28. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-her2 o fragmento de unión al antígeno de este comprende la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de ID DE SEC. NO.:27 y la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera ID DE SEC. NO.:28, o secuencias que son al menos el 95 % idénticas a las secuencias mencionadas anteriormente. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-her2 o fragmento de unión al antígeno de este tiene una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada que es al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos

el 98 % o al menos el 99 % idéntica a ID DE SEC. NO.:27 y/o una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera que es al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idéntica a ID DE SEC. NO.:28.

[00132]En diversas modalidades, el anticuerpo anti-her2 comprende un dominio constante de cadena pesada de IgG1 humana y un dominio constante de cadena ligera kappa de Ig humana.

[00133]En diversas modalidades, el anticuerpo anti-her2 comprende la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de ID DE SEC. NO.:327 o una secuencia que es al menos el 95 % idéntica a ID DE SEC. NO.:327, y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de ID DE SEC. NO.:328 o una secuencia que es al menos el 95 % idéntica a ID DE SEC. NO.:328. En modalidades específicas, el anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de ID DE SEC. NO.:327 y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de ID DE SEC. NO.:328, o secuencias que son al menos el 95 % idénticas a las secuencias mencionadas anteriormente. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-her2 tiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que es al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idéntica a ID DE SEC. NO.:327 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que es al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idéntica a ID DE SEC. NO.:328. En diversas modalidades, el anticuerpo anti-her2 es trastuzumab o un fragmento de unión al antígeno de este.

[00134]En diversas modalidades, el anticuerpo anti-FRA o fragmento de unión al antígeno de este comprende las tres CDR de cadena pesada y las tres CDR de cadena ligera de MORAb-003 o en donde las CDR incluyen no más de una, dos, tres, cuatro, cinco o seis adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de HCDR1 (ID DE SEC. NO.:2 de acuerdo con Kabat o ID DE SEC. NO.:13 acuerdo con IMGT), HCDR2 (ID DE SEC. NO.:3 acuerdo con Kabat o ID DE SEC. NO.:14 acuerdo con IMGT), HCDR3 (ID DE SEC. NO.:4 acuerdo con Kabat o ID DE SEC. NO.:15 acuerdo con IMGT); LCDR1 (ID DE SEC. NO.:7 acuerdo con Kabat o ID DE SEC. NO.:16 acuerdo con IMGT), LCDR2 (ID DE SEC. NO.:8 acuerdo con Kabat o ID DE SEC. NO.:17 acuerdo con IMGT) y LCDR3 (ID DE SEC. NO.:9 acuerdo con Kabat o ID DE SEC. NO.:18 acuerdo con IMGT).

[00135]En varias otras modalidades, el anticuerpo anti-her2 o fragmento de unión al antígeno de este comprende las tres CDR de cadena pesada y las tres CDR de cadena ligera de trastuzumab o en donde las CDR incluyen no más de una, dos, tres, cuatro, cinco o seis adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de HCDR1 (ID DE SEC. NO.:71 de acuerdo con Kabat o ID DE SEC. NO.:191 acuerdo con IMGT), HCDR2 (ID DE SEC. NO.:72 acuerdo con Kabat o ID DE SEC. NO.:192 acuerdo con

IMGT), HCDR3 (ID DE SEC. NO.:73 acuerdo con Kabat o ID DE SEC. NO.:193 acuerdo con IMGT); LCDR1 (ID DE SEC. NO.:74 acuerdo con Kabat o ID DE SEC. NO.:194 acuerdo con IMGT), LCDR2 (ID DE SEC. NO.:75 acuerdo con Kabat o ID DE SEC. NO.:195 acuerdo con IMGT) y LCDR3 (ID DE SEC. NO.:76 acuerdo con Kabat o ID DE SEC. NO.:196 acuerdo con IMGT).

[00136]En diversas modalidades, las sustituciones de aminoácidos son de residuos simples. En general, las inserciones son del orden de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 residuos de aminoácidos, aunque se pueden tolerar inserciones considerablemente más grandes siempre y cuando se mantenga la función biológica (p. ej., unión a FRA o her2). En general, las eliminaciones oscilan entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 residuos de aminoácidos, aunque, en algunos casos, las eliminaciones pueden ser más grandes. Se pueden utilizar sustituciones, eliminaciones, inserciones o cualquier combinación de estas para lograr un derivado o variante final. En general, estos cambios se realizan en algunos aminoácidos para minimizar la alteración de la molécula, particularmente la inmunogenicidad y especificidad de la proteína de unión al antígeno. Sin embargo, en determinadas circunstancias se pueden tolerar cambios más grandes. Generalmente, se realizan sustituciones conservadoras de acuerdo con el siguiente gráfico ilustrado en la tabla 10.

Tabla 10

Residuo original	Sustituciones ejemplares
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr

Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

[00137] Se realizan cambios sustanciales en la función o identidad inmunológica mediante la selección de sustituciones que son menos conservadoras que las que se muestran en la tabla 10. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones que afecten de manera más significativa: la estructura de la estructura principal polipeptídica en el área de alteración, por ejemplo la estructura helicoidal alfa o de láminas beta; la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana; o el volumen de la cadena lateral. Las sustituciones que, en general, se espera que produzcan los cambios más grandes en las propiedades del polipéptido son aquellas en las que (a) un residuo hidrofílico, p. ej., serilo o treonilo, se sustituye con (o por) un residuo hidrofóbico, p. ej., leucilo, isoleucilo, fenilalanilo, valilo o alanilo; (b) una cisteína o prolina se sustituye con (o por) cualquier otro residuo; (c) un residuo que tiene una cadena lateral electropositiva, p. ej., lisilo, arginilo o histidilo, se sustituye con (o por) un residuo electronegativo, p. ej., glutamilo o aspartilo; o (d) un residuo que tiene una cadena lateral voluminosa, p. ej., fenilalanina, se sustituye con (o por) uno que no tiene una cadena lateral, p. ej., glicina.

[00138] En diversas modalidades donde se utilizan secuencias de anticuerpos variantes en un ADC, las variantes normalmente presentan la misma actividad biológica cualitativa y provocan la misma respuesta inmunitaria, aunque también se pueden seleccionar variantes para modificar las características de las proteínas de unión al antígeno, según sea necesario. Alternativamente, la variante se puede diseñar de manera tal que la actividad biológica de la proteína de unión al antígeno se vea alterada. Por ejemplo, se pueden alterar o eliminar los sitios de glicosilación, tal como se describió en la presente.

[00139] Con los ADC utilizados en la presente, se pueden utilizar diversos anticuerpos para marcar como diana a células cancerosas. Tal como se muestra, el enlazador-toxina en los ADC descritos en la presente son sorprendentemente efectivos con diferentes anticuerpos dirigidos a antígenos tumorales. En la técnica se conocen antígenos adecuados expresados en células tumorales pero no en células sanas, o expresados en células tumorales a un nivel más elevado que en células sanas, así como también se conocen anticuerpos dirigidos contra estos. Estos anticuerpos se pueden utilizar con los enlazadores y toxina (p. ej., eribulina) descritos en la presente. En algunas modalidades, el resto de anticuerpo se dirige a FRA. En algunas modalidades, el resto de anticuerpo que se dirige a FRA es MORAb-003. En algunas

modalidades, aunque los enlazadores y toxina (eribulina) descritos son sorprendentemente efectivos con varios anticuerpos dirigidos a tumores diferentes, los restos de anticuerpos que se dirigen FRA tal como MORAb-003 proporcionaron proporción fármaco:anticuerpo, direccionamiento hacia el tumor, destrucción no específica, eficacia del tratamiento particularmente mejorada y reducción de la destrucción fuera del objetivo. La eficacia en el tratamiento mejorada se puede medir *in vitro* o *in vivo*, y puede incluir reducción de la velocidad de crecimiento tumoral y/o reducción del volumen tumoral.

[00140]En determinadas modalidades, se utilizan anticuerpos para otros antígenos diana que proporcionan al menos algunas de las propiedades funcionales favorables de un ADC que comprende un resto de anticuerpo dirigido a FRA tal como MORAb-003 (p. ej., proporción fármaco:anticuerpo mejorada, eficacia del tratamiento mejorada, destrucción fuera del objetivo mejorada, etc.). En algunas modalidades, algunas o todas estas propiedades funcionales favorables se observan cuando los enlazadores y toxina (eribulina) descritos son conjugados con un resto de anticuerpo dirigido a her2 tal como trastuzumab. En algunas modalidades, el resto de anticuerpo dirigido a her2. En algunas modalidades, el resto de anticuerpo dirigido a her2 es trastuzumab. En algunas modalidades, algunas o todas estas propiedades funcionales favorables se observan cuando los enlazadores y toxina (eribulina) descritos son conjugados con un resto de anticuerpo dirigido a MSLN tal como MORAb-009. En algunas modalidades, el resto de anticuerpo dirigido a MSLN. En algunas modalidades, el resto de anticuerpo dirigido a MSLN es MORAb-009.

Enlazadores

[00141]En diversas modalidades, en enlazador en un ADC es estable a nivel extracelular de una manera suficiente para ser terapéuticamente eficaz. En algunas modalidades, el enlazador es estable fuera de una célula, de modo que el ADC permanece intacto cuando está presente en condiciones extracelulares (p. ej., antes del transporte o administración en una célula). El término **"**intacto**"**, utilizado en el contexto de un ADC, significa que el resto de anticuerpo permanece unido al resto de fármaco. Tal como se utiliza en la presente, **"**estable**"**, en el contexto de un enlazador o ADC que comprende un enlazador, significa que no se escinde más del 20 %, más de aproximadamente el 15 %, más de aproximadamente el 10 %, más de aproximadamente el 5 %, más de aproximadamente el 3 % o más de aproximadamente el 1 % de los enlazadores (o cualquier porcentaje intermedio) en una muestra de ADC (o en el caso de un ADC general no están de otro modo intactos) cuando el ADC está presente en condiciones extracelulares.

[00142]Puede determinarse si un enlazador es estable a nivel extracelular, por ejemplo, mediante la inclusión de un ADC en plasma durante un período predeterminado (p. ej., 2, 4, 6, 8, 16 o 24 horas) y

luego la cuantificación de la cantidad de resto de fármaco libre presente en el plasma. La estabilidad puede permitir que el tiempo de ADC localice las células tumorales diana y evite la liberación prematura del fármaco, que puede reducir el índice terapéutico del ADC dañando Indiscriminadamente tanto los tejidos normales como los tumorales. En algunas modalidades, el enlazador es estable fuera de una célula diana y libera el resto de fármaco del ADC una vez que se encuentra adentro de la célula, de tal manera que el resto de fármaco se puede unir a su diana (p. ej., a microtúbulos). Por ende, un enlazador efectivo: (i) mantiene las propiedades de unión específicas del resto de anticuerpo; (ii) permite la administración, p. ej., la administración intracelular, del resto de fármaco mediante unión estable al resto de anticuerpo; (iii) permanece estable e intacto hasta que el ADC se haya transportado o administrado en su sitio diana; y (iv) permite un efecto terapéutico, p. ej., efecto citotóxico, del resto de fármaco después de la escisión.

[00143] Los enlazadores pueden afectar las propiedades fisicoquímicas de un ADC. Debido a que muchos agentes citotóxicos son hidrofóbicos por naturaleza, unirlos al anticuerpo con un resto hidrofóbico adicional puede conducir a agregación. Los agregados de ADC son insolubles y suelen limitar la carga de fármaco alcanzable en el anticuerpo, lo cual puede afectar negativamente la potencia del ADC. Los agregados de proteína de agentes biológicos, en general, también han sido vinculados a una mayor inmunogenicidad. Tal como se muestra más abajo, los enlazadores descritos en la presente generan ADC con niveles de agregación bajos y niveles deseables de carga de fármaco.

[00144] Un enlazador puede ser "escindible" o "no escindible" (Ducry y Stump, Bioconjugate Chem. (2010) 21:5-13). Los enlazadores escindibles están diseñados para liberar el fármaco cuando se someten a determinados factores ambientales, p. ej., cuando se internalizan en la célula diana, mientras que los enlazadores no escindibles, generalmente, dependen de la degradación del propio resto de anticuerpo.

[00145] En algunas modalidades, el enlazador es un enlazador no escindible. En algunas modalidades, el resto de fármaco del ADC se libera mediante degradación del resto de anticuerpo. Los enlazadores no escindibles tienen a permanecer asociados covalentemente con al menos un aminoácido del anticuerpo y el fármaco tras la internalización por y la degradación dentro de la célula diana. Los enlazadores no escindibles comúnmente incluyen un enlace tioéter, que se prepara mediante la conjugación de un grupo tiol en el fármaco o el anticuerpo con un grupo maleimida o haloacetamida en el anticuerpo o fármaco, respectivamente (Goldmacher et. ál., In Cancer Drug Discovery and Development: Antibody-Drug Conjugates and Immunotoxins (G. L. Phillips ed., Springer, 2013)). Un enlazador no escindible ejemplar comprende tioéter, ciclohexilo, N-succinimidilo 4-(N-maleimidometilo) ciclohexano-1 carboxilato

(SMCC), N-hidroxisuccinimida (NHS) o uno o más restos de polietilenglicoles (PEG), p. ej., 1, 2, 3, 4, 5 o 6 restos de PEG. En algunas modalidades, el enlazador no escindible comprende $(PEG)_2$. En otras modalidades, el enlazador no escindible comprende $(PEG)_4$.

[00146]En algunas modalidades, el enlazador es un enlazador escindible. Un enlazador escindible se refiere a cualquier enlazador que comprende un resto escindible. Tal como se utiliza en la presente, la frase **"**resto escindible**"** se refiere a cualquier enlace químico que se puede escindir. Los enlaces químicos escindibles adecuados son conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, enlaces lábiles a ácido, enlaces lábiles a proteasa/peptidasa, enlaces fotolábiles, enlaces disulfuro y enlaces lábiles a esterasa. Los enlazadores que comprenden un resto escindible pueden permitir la liberación del resto de fármaco del ADC mediante escisión en un sitio particular en el enlazador. En diversas modalidades, la escisión del anticuerpo de la toxina unida activa o aumenta la actividad de la toxina. En algunas modalidades, un ADC que comprende un enlazador escindible (p. ej., un enlazador Val-Cit) demuestra un aumento de la destrucción celular en el objetivo y/o una disminución de la destrucción celular fuera del objetivo, en comparación con un ADC que comprende un enlazador no escindible (p. ej., un enlazador de $(PEG)_2$ o $(PEG)_4$ no escindible). En algunas modalidades, un ADC que comprende un enlazador escindible presenta eficacia del tratamiento mejorada con respecto a un ADC que comprende un enlazador no escindible cuando las células y/o el cáncer tratado con el ADC no expresan altos niveles del antígeno diana (p. ej., FRA o her2). En algunas modalidades, se requiere escisión del anticuerpo de la toxina unida para lograr eficacia en el tratamiento mejorada de un ADC, según lo medido *in vitro* y/o *in vivo*.

[00147]En algunas modalidades, el enlazador es escindible en condiciones intracelulares, de tal manera que la escisión del enlazador libera suficiente resto de fármaco del resto de anticuerpo en el entorno intracelular para activar el fármaco y/o hacer que el fármaco sea terapéuticamente eficaz. En algunas modalidades, el resto de fármaco no se escinde del resto de anticuerpo hasta que el ADC ingresa a la célula que expresa un antígeno específico para al resto de anticuerpo del ADC y el resto de fármaco se escinde del resto de anticuerpo tras el ingreso a la célula. En algunas modalidades, el enlazador comprende un resto escindible que está posicionado de tal manera que ninguna parte del enlazador o el resto del anticuerpo permanece unido al resto del fármaco tras la escisión. Los enlazadores escindibles ejemplares incluyen enlazadores lábiles a ácido, enlazadores sensibles a proteasa/peptidasa, enlazadores fotolábiles, enlazadores que contienen dimetilo, disulfuro o sulfonamida.

[00148]En algunas modalidades, el enlazador es un enlazador sensible al pH y es sensible a hidrólisis en

determinados valores de pH. Normalmente, el enlazador sensible al pH se puede escindir en condiciones ácidas. Esta estrategia de escisión, en general, aprovecha el pH más bajo en los compartimentos intracelulares endosomales (pH ~ 5–6) y lisosomales (pH ~ 4,8), en comparación con citosol (pH ~ 7,4), para activar la hidrólisis de un grupo lábil a ácido en el enlazador, por ejemplo una hidrazona (Jain et ál. (2015) Pharm Res 32:3526-40). En algunas modalidades, el enlazador es un enlazador lábil a ácido y/o enlazador hidrolizable. Por ejemplo, se puede utilizar un enlazador lábil a ácido que es hidrolizable en el lisosoma y contiene un grupo lábil a ácido (p. ej., una hidrazona, semicarbazona, tiosemicarbazon, amida cis-aconítica, ortoéster, acetal, cetal o similares). *Véase*, *p. ej*., las patentes estadounidenses N.º 5.122.368; 5.824.805; 5.622.929; Dubowchik y Walker (1999) Pharm. Therapeutics 83:67-123; Neville et ál. (1989) Biol. Chem. 264:14653-61. Dichos enlazadores son relativamente estables en condiciones de pH neutro, como aquellas en la sangre, pero son inestables a un pH por debajo de 5,5 o 5,0, el pH aproximado del lisosoma. En determinadas modalidades, el enlazador capaz de hidrolizarse es un enlazador tioéter (tal como, por ejemplo, un tioéter unido al agente terapéutico a través de una unión de acilhidrazona). *Véase, p. ej*., la patente estadounidense N.º 5.622.929.

[00149]En algunas modalidades, el enlazador es escindible en condiciones de reducción. En algunas modalidades, el enlazador es escindible en presencia de un agente reductor, por ejemplo glutatión o ditiotreitol. En algunas modalidades, el enlazador es un enlazador disulfuro escindible o un enlazador sulfonamida escindible.

[00150]En algunas modalidades, el enlazador es un enlazador disulfuro escindible. En la técnica se conoce una variedad de enlaces disulfuros, incluyendo, por ejemplo, aquellos que pueden formarse mediante el uso de SATA (N-succinimidil-5-acetiltioacetato), SPDP (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato), SPDB (N-succinimidil-3-(2-piridilditiio)butirato) y SMPT (N-succinimidiloxicarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridil-ditio)tolueno)- , SPDB y SMPT. *Véase*, *p. ej*., Thorpe et ál. (1987) Cancer Res. 47:5924-31; Wawrzynczak et ál., In Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimagery and Therapy of Cancer (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987). *Véase también* la patente estadounidense N.º 4.880.935. Normalmente, los enlazadores disulfuro se utilizan para explotar la abundancia de tioles intracelulares, lo cual puede facilitar la escisión de sus enlaces disulfuro. Las concentraciones intracelulares del tiol intracelular de más abundancia, glutatión reducido, generalmente se encuentran en el intervalo de 1-10 nM, que es aproximadamente 1.000 veces más elevado que el del tiol de bajo peso molecular más abundante en la sangre (es decir, cisteína) en aproximadamente 5 µM (Goldmacher et. ál., In Cancer Drug Discovery and Development: Antibody-Drug Conjugates and

Immunotoxins (G. L. Phillips ed., Springer, 2013)). Las enzimas intracelulares de la familia de isomerasa de disulfuro proteico también puede contribuir a la escisión intracelular de un enlazador disulfuro. Tal como se utiliza en la presente, un enlazador disulfuro escindible se refiere a cualquier enlazador que comprende un resto de disulfuro escindible. La frase **"**resto de disulfuro escindible**"** se refiere a un enlace de disulfuro que puede ser escindido y/o reducido, p. ej., por un tiol o enzima. En algunas modalidades, el resto de disulfuro escindible es disulfidilo-dimetilo.

[00151]En algunas modalidades, el enlazador es un enlazador sulfonamida escindible. Tal como se utiliza en la presente, un enlazador sulfonamida escindible se refiere a cualquier enlazador que comprende un resto de sulfonamida escindible. La frase **"**resto de sulfonamida escindible**"** se refiere a un grupo sulfonamida, es decir, grupo sulfonilo conectado a un grupo amina, en donde el enlace azufre-nitrógeno se puede escindir.

[00152]En algunas modalidades, el enlace puede ser un enlazador de tipo dendrítico para unión covalente de más de un resto de fármaco a un resto de anticuerpo a través de resto enlazador multifuncional y de ramificación. Véase, p. ej., Sun et ál. (2002) Bioorg. Med. Chem. Lett. 12:2213-5; Sun et ál. (2003) Bioorg. Med. Chem. 11:1761-8. Los enlazadores dendríticos pueden aumentar la relación molar de fármaco con respecto a anticuerpo, es decir, la carga de fármaco, que está relacionada con la potencia del ADC. Por lo tanto, cuando un resto de anticuerpo tiene solo un grupo tiol de cisteína reactivo, por ejemplo, se pueden unir muchos restos de fármaco a través de un enlazador dendrítico. En algunas modalidades, el resto de enlazador o resto de enlazador-fármaco se puede unir al anticuerpo mediante química de enlaces disulfuro reducidos o tecnología de utilización de lisina limitada. *Véase*, *p. ej*., las publicaciones internacionales N.º WO2013173391 y WO2013173393.

[00153]En algunas modalidades, el enlace se puede escindir mediante un agente de escisión, p. ej., una enzima, que está presente en el medio intracelular (p. ej., dentro de un lisosoma o endosoma o caveola). El enlazador puede ser, por ejemplo, un enlazador de péptido que se escinde mediante una peptidasa intracelular o enzima proteasa que incluye, de modo no taxativo, una proteasa lisosomal o endosomal. En algunas modalidades, el enlazador es un enlazador de péptido escindible. Tal como se utiliza en la presente, un enlazador de péptido escindible se refiere a cualquier enlazador que comprende un resto de péptido escindible. La frase **"**resto de péptido escindible**"** se refiere a cualquier enlace químico que une aminoácidos (derivados de aminoácidos naturales o sintéticos) que se puede escindir por un agente presente en el entorno intracelular. Por ejemplo, un enlazador puede comprender una secuencia alanina-alanina-asparagina (Ala-Ala-Asn) o una secuencia valina-citrulina (Val-Cit) escindible por una

peptidasa tal como catepsina, p. ej., catepsina B.

[00154] En algunas modalidades, el enlazador es un enlazador escindible de enzima y un resto de péptido escindible en el enlazador es escindible por una enzima. En algunas modalidades, el resto de péptido escindible es escindible por una enzima lisosomal, p. ej., catepsina. En algunas modalidades, el enlazador es un enlazador escindible de catepsina. En algunas modalidades, el resto de péptido escindible en el enlazador es escindible por una catepsina de cisteína lisosomal, por ejemplo catepsina B, C, F, H, K, L, O, S, V, X o W. En algunas modalidades, el resto de péptido escindible es escindible por catepsina B. Un dipéptido ejemplar que puede ser escindido por catepsina B es valina-citrulina (Val-Cit) (Dubowchik et ál. (2002) Bioconjugate Chem. 13:855-69). En algunas modalidades, un ADC que comprende un resto de péptido escindible demuestra niveles de agregación más bajos y/o mayor carga de fármaco (*p*) con respecto a un ADC que comprende un resto escindible alternativo (p. ej., un resto de disulfuro escindible o un resto de sulfonamida escindible).

[00155] En algunas modalidades, el enlazador o el resto de péptido escindible en el enlazador comprende una unidad de aminoácido. En algunas modalidades, la unidad de aminoácido permite la escisión del enlazador por una proteasa, facilitando así la liberación del resto de fármaco del ADC tras la exposición a una o más proteasas intracelulares, por ejemplo una o más enzimas lisosomales (Doronina et ál. (2003) Nat. Biotechnol. 21:778-84; Dubowchik y Walker (1999) Pharm. Therapeutics 83:67-123). Los ejemplos de unidades de aminoácido incluyen, de modo no taxativo, dipéptidos, tripéptidos, tetrapéptidos y pentapéptidos. Los dipéptidos ejemplares incluyen, entre otros, valina-citrulina (Val-Cit), alanina-asparagina (Ala-Asn), alanina-fenilalanina (Ala-Phe), fenilalanina-lisina (Phe-Lys), alanina-lisina (Ala-Lys), alanina-valina (Ala-Val), valina-alanina (Val-Ala), valina-lisina (Val-Lys), lisina-lisina (Lys-Lys), fenilalanina-citrulina (Phe-Cit), leucina-citrulina (Leu-Cit), isoleucina-citrulina (Ile-Cit), triptófano-citrulina (Trp-Cit) y fenilalanina-alanina (Phe-Ala). Los tripéptidos ejemplares incluyen, entre otros, alanina-alanina-asparagina (Ala-Ala-Asn), glicina-valina-citrulina (Gly-Val-Cit), glicina-glicina-glocina (Gly-Gly-Gly), fenilalanina-fenilalanina-lisina (Phe-Phe-Lys) y glicina-fenilalanin-lisina (Gly-Phe-Lys). Otras unidades de aminoácido ejemplares incluyen, entre otros, Gly-Phe-Leu-Gly, Ala-Leu-Ala-Leu, Phe-N^9-tosyl-Arg y Phe-N^9-Nitro-Arg, como se describe, p. ej., en la patente estadounidense N.º 6.214.345. En algunas modalidades, la unidad de aminoácido en el enlazador comprende Val-Cit. En algunas modalidades, la unidad de aminoácido en el enlazador comprende Ala-Ala-Asn. En algunas modalidades, un ADC que comprende Val-Cit demuestra mayor destrucción fuera del objetivo, un aumento de la destrucción en el objetivo, niveles de agregación más bajos y/o mayor carga de fármaco

(*p*) con respecto a un ADC que comprende una unidad de aminoácido alternativa o un resto escindible alternativo. Una unidad de aminoácido puede comprender residuos de aminoácidos de origen natural y/o aminoácidos menores y/o análogos de aminoácidos de origen no natural, tales como la citrulina. Las unidades de aminoácidos pueden diseñarse y optimizarse para la escisión enzimática mediante una enzima en particular, por ejemplo, una proteasa asociada a un tumor, una proteasa lisosomal tal como catepsina B, C, D o S, o una proteasa plasmina.

[00156] En algunas modalidades, el enlazador en cualquiera de los ADC descritos en la presente puede comprender al menos una unidad espaciadora que une el resto de anticuerpo con el resto de fármaco. En algunas modalidades, la unidad espaciadora une un sitio escindible (p. ej., un resto de péptido escindible) en el enlazador con un resto de anticuerpo. En algunas modalidades, el enlazador y/o unidad enlazadora en el enlazador, es sustancialmente hidrofílico. Un enlazador hidrofílico se puede utilizar para reducir el grado en que el fármaco puede ser bombeado fuera de células cancerosas resistentes a través de múltiples transportadores de resistencia a fármacos (MDR) o funcionalmente similares. En algunos aspectos, el enlazador incluye uno o más restos de polietilenglicol (PEG), p. ej., 1, 2, 3, 4, 5 o 6 restos de PEG. En algunas modalidades, el enlazador es un enlazador de PEG más corto y proporciona estabilidad mejorada y agregación reducida sobre los enlazadores de PEG más largos.

[00157] En algunas modalidades, la unidad enlazadora en el enlazador comprende uno o más restos de PEG. En algunas modalidades, la unidad espaciadora comprende -$(PEG)_m$- y *m* es un entero entre 1 y 10. En algunas modalidades, *m* oscila entre 1 y 10; entre 2 y 8; entre 2 y 6; entre 2 y 5; entre 2 y 4; o entre 2 y 3. En algunas modalidades, *m* es 8. En algunas modalidades, *m* es 4. En algunas modalidades, *m* es 3. En algunas modalidades, *m* es 2. En algunas modalidades, la unidad espaciadora comprende $(PEG)_2$, $(PEG)_4$, $(PEG)_8$, $(PEG)_9$, $(PEG)_3$-triazol-$(PEG)_3$, $(PEG)_4$-triazol-$(PEG)_3$ o dibencilciclooctena-triazol-$(PEG)_3$. En algunas modalidades preferidas, la unidad espaciadora comprende $(PEG)_2$. En algunas modalidades, un ADC que comprende una unidad espaciadora más corta (p. ej., $(PEG)_2$) demuestra niveles de agregación más bajos y/o mayor carga de fármaco (*p*) con respecto a un ADC que comprende una unidad espaciadora más larga (p. ej., $(PEG)_8$).

[00158] En algunas modalidades, la unidad espaciadora en el enlazador comprende un resto de alquilo. En algunas modalidades, la unidad espaciadora comprende -$(CH_2)_n$- y *n* es un entero entre 1 y 10 (es decir, *n* puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10). En algunas modalidades, *n* es 5. En algunas modalidades, un ADC que comprende una unidad espaciadora más corta (p. ej., $(CH_2)_5$) demuestra niveles de agregación más bajos y/o mayor carga de fármaco (*p*) con respecto a un ADC que comprende una

unidad espaciadora más larga (p. ej., $(PEG)_8$).

[00159] Una unidad espaciadora se puede utilizar, por ejemplo, para unir el resto de anticuerpo con el resto de fármaco, ya sea directa o indirectamente. En algunas modalidades, la unidad espaciadora une el resto de anticuerpo con el resto de fármaco directamente. En algunas modalidades, el resto de anticuerpo y el resto de fármaco se unen mediante una unidad espaciadora que comprende uno o más restos de PEG (p. ej., $(PEG)_2$ o $(PEG)_4$). En algunas modalidades, la unidad espaciadora une el resto de anticuerpo con el resto de fármaco indirectamente. En algunas modalidades, la unidad espaciadora une el resto de anticuerpo con el resto de fármaco a través de un resto escindible (p. ej., un péptido escindible, un disulfuro escindible o una sulfonamida escindible) y/o un resto de unión para unir la unidad espaciadora con el resto de anticuerpo, p. ej., un resto de maleimida.

[00160] La unidad espaciadora, en diversas modalidades, se une al resto de anticuerpo (es decir, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno) mediante un resto de maleimida (Mal). En algunas modalidades, un ADC que comprende un enlazador unido al resto de anticuerpo mediante un resto de maleimida demuestra mayor carga de fármaco (p) con respecto a un ADC que comprende un enlazador unido al resto de anticuerpo mediante un resto de unión alternativo tal como un resto de succinimida.

[00161] Una unidad espaciadora que se une al anticuerpo o fragmento de unión al antígeno mediante una Mal se denomina en la presente **"**Mal-unidad espaciadora**"**. La frase **"**resto de maleimida**"**, tal como se utiliza en la presente, significa un compuesto que contiene un grupo de maleimida y que es reactivo con un grupo sulfhidrilo, p. ej., un grupo sulfhidrilo de un residuo de cisteína en el resto de anticuerpo. Otros grupos funcionales que son reactivos a grupos sulfhidrilo (tioles) incluyen, de modo no taxativo, yodoacetamida, bromoacetamida, vinilpiridina, disulfuro, disulfuro de piridilo, isocianato e isotiocianato. En algunas modalidades, el Mal-unidad espaciadora es reactiva con un residuo de cisteína en el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno. En algunas modalidades, el Mal-unidad espaciadora se une al anticuerpo o fragmento de unión al antígeno mediante un residuo de cisteína. En algunas modalidades, el Mal-unidad espaciadora comprende un resto de PEG. En algunas modalidades, el Mal-unidad espaciadora comprende un resto de alquilo.

[00162] En determinadas modalidades, el enlazador comprende un Mal-unidad espaciadora y un resto de péptido escindible. En algunas modalidades, el resto de péptido escindible comprende una unidad de aminoácido. En algunas modalidades, la unidad de aminoácido comprende Val-Cit. En algunas modalidades, la unidad de aminoácido comprende Ala-Ala-Asn. En algunas modalidades, el enlazador comprende un Mal-unidad espaciadora y Val-Cit. En algunas modalidades, el enlazador comprende

Mal-$(PEG)_2$ y Val-Cit. En algunas modalidades, el enlazador comprende Mal-$(PEG)_m$ y Val-Cit, donde *m* es entre 2 y 8 o entre 2 y 5, o 2, 3, 4 o 5. En algunas modalidades, el enlazador comprende Mal-$(PEG)_8$ y Val-Cit. En determinadas modalidades, el enlazador comprende Mal-$(CH_2)_5$ y Val-Cit. En algunas modalidades, el enlazador comprende el Mal-unidad espaciadora y Ala-Ala-Asn. En algunas modalidades, el enlazador comprende Mal-$(PEG)_2$ y Ala-Ala-Asn.

[00163]En algunas modalidades, el enlazador comprende el Mal-unidad espaciadora y un resto de disulfuro escindible. En algunas modalidades, el resto de disulfuro escindible es disulfidilo-dimetilo. En algunas modalidades, el enlazador comprende el Mal-unidad espaciadora y disulfidilo-dimetilo. En algunas modalidades, el enlazador comprende Mal-$(PEG)_4$-triazol-$(PEG)_3$ y disulfidilo-dimetilo.

[00164]En algunas modalidades, el enlazador comprende el Mal-unidad espaciadora y un resto de sulfonamida escindible. En algunas modalidades, el enlazador comprende Mal-$(PEG)_4$-triazol-$(PEG)_3$ y sulfonamida.

[00165]En diversas modalidades, la unidad espaciadora se une al anticuerpo o fragmento de unión al antígeno mediante un resto de succinimida (OSu). Una unidad espaciadora que se une al anticuerpo o fragmento de unión al antígeno mediante un OSu se denomina en la presente **"**OSu-unidad espaciadora **"**. La frase **"**resto de succinimida**"**, tal como se utiliza en la presente, significa un compuesto que contiene un compuesto de succinimida que es reactivo con un grupo amina, p. ej., un grupo amina de un residuo de lisina en el resto de anticuerpo. Un resto de succinimida ejemplar es N-hidroxisuccinimida (NHS). En algunas modalidades, el OSu-unidad espaciadora es reactiva con un residuo de lisina en el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno. En algunas modalidades, el OSu-unidad espaciadora se une al anticuerpo o fragmento de unión al antígeno mediante un residuo de lisina. En algunas modalidades, el OSu-unidad espaciadora comprende un resto de PEG. En algunas modalidades, el OSu-unidad espaciadora comprende un resto de alquilo.

[00166]En determinadas modalidades, el enlazador comprende el OSu-unidad espaciadora y un resto de péptido escindible. En algunas modalidades, el resto de péptido escindible comprende una unidad de aminoácido. En algunas modalidades, la unidad de aminoácido comprende Val-Cit. En algunas modalidades, la unidad de aminoácido comprende Ala-Ala-Asn. En algunas modalidades, el enlazador comprende el OSu-unidad espaciadora y Val-Cit. En algunas modalidades, el enlazador comprende OSu-$(PEG)_2$ y Val-Cit. En otras modalidades, el enlazador comprende OSu-$(PEG)_9$ y Val-Cit. En otras modalidades, el enlazador comprende OSu-$(CH_2)_5$ y Val-Cit. En determinadas modalidades, el enlazador comprende OSu-$(PEG)_3$-triazol-$(PEG)_3$ y Val-Cit. En algunas modalidades, el enlazador

comprende el OSu-unidad espaciadora y Ala-Ala-Asn. En algunas modalidades, el enlazador comprende OSu-$(PEG)_2$ y Ala-Ala-Asn.

[00167]En algunas modalidades, el enlazador comprende el OSu-unidad espaciadora y un resto de disulfuro escindible. En algunas modalidades, el resto de disulfuro escindible es disulfidilo-dimetilo. En algunas modalidades, el enlazador comprende el OSu-unidad espaciadora y disulfidilo-dimetilo. En algunas modalidades, el enlazador comprende OSu-$(PEG)_3$-triazol-$(PEG)_3$ y disulfidilo-dimetilo. En otras modalidades, el enlazador comprende OSu-dibencilciclooctena-triazol-$(PEG)_3$ y disulfidilo-dimetilo.

[00168]En algunas modalidades, el enlazador comprende el OSu-unidad espaciadora y un resto de sulfonamida escindible. En algunas modalidades, el enlazador comprende OSu-$(PEG)_3$-triazol-$(PEG)_3$ y sulfonamida. En otras modalidades, el enlazador comprende OSu-dibencilciclooctena-triazol-$(PEG)_3$ y sulfonamida.

[00169]En algunas modalidades, el Mal-unidad espaciadora o el OSu-unidad espaciadora une el resto de anticuerpo (es decir, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno) con el resto escindible en el enlazador. En algunas modalidades, el Mal-unidad espaciadora o el OSu-unidad espaciadora une el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno con un resto de péptido escindible. En algunas modalidades, el resto de péptido escindible comprende una unidad de aminoácido. En algunas modalidades, el enlazador comprende Mal-unidad espaciadora-unidad de aminoácido o OSu-unidad espaciadora-unidad de aminoácido. En algunas modalidades, el Mal-unidad espaciadora o OSu-unidad espaciadora comprende un resto de PEG. En algunas modalidades, el Mal-unidad espaciadora o el OSu-unidad espaciadora comprende un resto de alquilo. En algunas modalidades, la unidad de aminoácido comprende Val-Cit. En otras modalidades, la unidad de aminoácido comprende Ala-Ala-Asn.

[00170]En algunas modalidades, el enlazador comprende la siguiente estructura: Mal-unidad espaciadora-Val-Cit. En algunas modalidades, el enlazador comprende la siguiente estructura: Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit. En algunas modalidades, el enlazador comprende la siguiente estructura: Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB. En algunas modalidades, el enlazador comprende Mal-$(PEG)_8$-Val-Cit. En determinadas modalidades, el enlazador comprende Mal-$(CH_2)_5$-Val-Cit. En algunas modalidades, el enlazador comprende el Mal-unidad espaciadora-Ala-Ala-Asn. En algunas modalidades, el enlazador comprende Mal-$(PEG)_2$-Ala-Ala-Asn.

[00171]En algunas modalidades, el enlazador comprende OSu-unidad espaciadora-Val-Cit. En algunas modalidades, el enlazador comprende OSu-$(PEG)_2$-Val-Cit. En otras modalidades, el enlazador

comprende OSu-$(PEG)_9$-Val-Cit. En otras modalidades, el enlazador comprende OSu-$(CH_2)_5$-Val-Cit. En otras modalidades, el enlazador comprende OSu-$(PEG)_3$-triazol-$(PEG)_3$-Val-Cit. En algunas modalidades, el enlazador comprende el OSu-unidad espaciadora-Ala-Ala-Asn. En algunas modalidades, el enlazador comprende OSu-$(PEG)_2$-Ala-Ala-Asn.

[00172]En diversas modalidades, el Mal-unidad espaciadora o el OSu-unidad espaciadora une el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno con un resto de disulfuro escindible. En algunas modalidades, el enlazador comprende Mal-unidad espaciadora-disulfuro o OSu-unidad espaciadora-disulfuro. En algunas modalidades, el disulfuro es disulfidilo-dimetilo. En algunas modalidades, el enlazador comprende Mal-unidad espaciadora-disulfidilo-dimetilo. En algunas modalidades, el enlazador comprende Mal-$(PEG)_4$-triazol-$(PEG)_3$-disulfidilo-dimetilo. En otras modalidades, el enlazador comprende OSu-unidad espaciadora-disulfidilo-dimetilo. En algunas modalidades, el enlazador comprende OSu-$(PEG)_3$-triazol-$(PEG)_3$-disulfidilo-dimetilo. En otras modalidades, el enlazador comprende OSu-dibencilciclooctena-triazol-$(PEG)_3$-disulfidilo-dimetilo.

[00173]En determinas modalidades, el Mal-unidad espaciadora o el OSu-unidad espaciadora une el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno con un resto de sulfonamida escindible. En algunas modalidades, el enlazador comprende Mal-unidad espaciadora-sulfonamida o OSu-unidad espaciadora-sulfonamida. En algunas modalidades, el enlazador comprende Mal-$(PEG)_4$-triazol-$(PEG)_3$-sulfonamida. En algunas modalidades, el enlazador comprende OSu-$(PEG)_3$-triazol-$(PEG)_3$-sulfonamida. En otras modalidades, el enlazador comprende OSu-dibencilciclooctena-triazol-$(PEG)_3$-sulfonamida.

[00174]En diversas modalidades, el resto escindible en el enlazador se une directamente al resto de fármaco. En algunas modalidades, se utiliza otra unidad espaciadora para unir el resto escindible en el enlazador con el resto de fármaco. En diversas modalidades, el resto de fármaco es eribulina. En diversas modalidades, la eribulina se une al resto escindible en el enlazador mediante una unidad espaciadora. En algunas modalidades, la eribulina se une al resto escindible en el enlazador mediante una unidad espaciadora autodestructiva. En determinadas modalidades, la eribulina se une al resto escindible en el enlazador mediante una unidad espaciadora autodestructiva, el resto escindible comprende Val-Cit y una unidad espaciadora adicional que comprende PEG une el resto escindible con el resto de anticuerpo. En determinadas modalidades, la eribulina se une a un anticuerpo anti-FRA mediante un Mal-unidad espaciadora en el enlazador unido a un resto escindible de Val-Cit y una unidad espaciadora autodestructiva de pAB. En otras modalidades determinadas, la eribulina se une a un anticuerpo anti-her2 mediante un Mal-unidad espaciadora en el enlazador unido a un resto escindible de

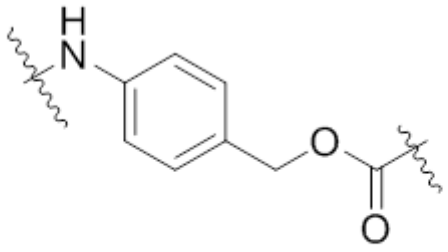
Val-Cit y una unidad espaciadora autodestructiva de pAB.

[00175] Una unidad espaciadora puede ser "autodestructiva" o "no autodestructiva". Una unidad espaciadora "no autodestructiva" es una unidad en la cual parte o toda la unidad espaciadora permanece unida al resto de fármaco tras la escisión del enlazador. Los ejemplos de unidades espaciadoras no autodestructivas incluyen, de modo no taxativo, una unidad espaciadora de glicina y una unidad espaciadora de glicina-glicina. Las unidades espaciadoras no autodestructivas puede degradarse eventualmente a través del tiempo pero no liberan con facilidad un fármaco nativo unido completamente en condiciones celulares. Una unidad espaciadora "autodestructiva" permite la liberación del resto de fármaco nativo en condiciones intracelulares. Un **"**fármaco nativo**"** es uno en donde ninguna parte de la unidad espaciadora u otra modificación química permanece después de la escisión/degradación de la unidad espaciadora.

[00176] La química de la autodestrucción es conocida en la técnica y se puede seleccionar fácilmente para los ADC descritos. En diversas, la unidad espaciadora que une el resto escindible en el enlazador con el resto de fármaco (p. ej., eribulina) es autodestructiva y experimenta autodestrucción simultáneamente o poco antes/después de la escisión del resto escindible en condiciones intracelulares.

[00177] En determinadas modalidades, la unidad espaciadora autodestructiva en el enlazador comprende una unidad de p-aminobencilo. En alcohol, un alcohol p-aminobencilo (pABOH) se une a la unidad de aminoácido u otro resto escindible en el enlazador mediante un enlace amida, y se forma un carbamato, metilcarbamato o carbonato entre pABOH y el resto de fármaco (Hamann et ál. (2005) Expert Opin. Ther. Patents 15:1087-103). En algunas modalidades, la unidad espaciadora autodestructiva es o comprende p-aminobenciloxicarbonilo (pAB). Sin pretender limitarse por la teoría, se cree que la autodestrucción de pAB implica una reacción de eliminación 1,6 espontánea (Jain et ál. (2015) Pharm Res 32:3526-40).

[00178] En diversas modalidades, la estructura de p-aminobenciloxicarbonilo (pAB) utilizada en el ADC descrito se muestra a continuación:



p-aminobenciloxicarbonilo

[00179]En diversas modalidades, la unidad espaciadora autodestructiva une el resto escindible en el enlazador con amina C-35 en eribulina. En algunas modalidades, la unidad espaciadora autodestructiva es pAB. En algunas modalidades, el pAB une el resto escindible en el enlazador con amina C-35 en eribulina. En algunas modalidades, el pAB experimenta autodestrucción tras la escisión del resto escindible y se libera eribulina del ADC en su forma activa y nativa. En algunas modalidades, un anticuerpo anti-FRA (p. ej., MORAb-003) se une a la amina C-35 de eribulina mediante un enlazador que comprende Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB. En otras modalidades, un anticuerpo anti-her2 (p. ej., trastuzumab) se une a la amina C-35 de eribulina mediante un enlazador que comprende Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB.

[00180]En algunas modalidades, el pAB experimenta autodestrucción tras la escisión de un resto de péptido escindible en el enlazador. En algunas modalidades, el resto de péptido escindible comprende una unidad de aminoácido. En algunas modalidades, el enlazador comprende unidad de aminoácido-pAB. En algunas modalidades, la unidad de aminoácido es Val-Cit. En algunas modalidades, el enlazador comprende Val-Cit-pAB (VCP). En determinadas modalidades, la unidad de aminoácido es Ala-Ala-Asn. En algunas modalidades, el enlazador comprende Ala-Ala-Asn-pAB.

[00181]En algunas modalidades, el pAB experimenta autodestrucción tras la escisión de un resto de disulfuro escindible en el enlazador. En algunas modalidades, el enlazador comprende disulfuro-pAB. En algunas modalidades, el enlazador comprende disulfidilo-dimetilo-pAB.

[00182]En algunas modalidades, el pAB experimenta autodestrucción tras la escisión de un resto de sulfonamida escindible en el enlazador. En algunas modalidades, el enlazador comprende sulfonamida-pAB.

[00183]En diversos aspectos, el resto de anticuerpo del ADC se conjuga con el resto de fármaco mediante un enlazador, en donde el enlazador comprende un Mal-unidad espaciadora, una unidad de aminoácido escindible y un pAB. En algunas modalidades, la unidad espaciadora comprende un resto de

PEG. En algunas modalidades, la unidad espaciadora comprende un resto de alquilo. En algunas modalidades, el enlazador comprende Mal-$(PEG)_2$-unidad de aminoácido-pAB. En algunas modalidades, el enlazador comprende Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB. En otras modalidades, el enlazador comprende Mal-$(PEG)_2$-Ala-Ala-Asn-pAB. En algunas modalidades, el enlazador comprende Mal-$(PEG)_8$-unidad de aminoácido-pAB. En algunas modalidades, el enlazador comprende Mal-$(PEG)_8$-Val-Cit-pAB. En algunas modalidades, el enlazador comprende Mal-$(CH_2)_5$-unidad de aminoácido-pAB. En algunas modalidades, el enlazador comprende Mal-$(CH_2)_5$-Val-Cit-pAB.

[00184]En diversas modalidades, el resto de anticuerpo del ADC se conjuga con el resto de fármaco mediante un enlazador, en donde el enlazador comprende Mal-unidad espaciadora-disulfuro-pAB. En algunas modalidades, la unidad espaciadora comprende un resto de PEG. En algunas modalidades, el enlazador comprende Mal-$(PEG)_4$-triazol-$(PEG)_3$-disulfuro-pAB. En algunas modalidades, el enlazador comprende Mal-$(PEG)_4$-triazol-$(PEG)_3$-disulfidilo-dimetilo-pAB.

[00185]En algunas modalidades, el resto de anticuerpo del ADC se conjuga con el resto de fármaco mediante un enlazador, en donde el enlazador comprende Mal-unidad espaciadora-sulfonamida-pAB. En algunas modalidades, la unidad espaciadora comprende un resto de PEG. En algunas modalidades, el enlazador comprende Mal-$(PEG)_4$-triazol-$(PEG)_3$-sulfonamida-pAB.

[00186]En algunos aspectos, el resto de anticuerpo del ADC se conjuga con el resto de fármaco mediante un enlazador, en donde el enlazador comprende OSu-unidad espaciadora-unidad de aminoácido-pAB. En algunas modalidades, la unidad espaciadora comprende un resto de PEG. En algunas modalidades, la unidad espaciadora comprende un resto de alquilo. En algunas modalidades, el enlazador comprende OSu-$(PEG)_2$-unidad de aminoácido-pAB. En algunas modalidades, el enlazador comprende OSu-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB. En otras modalidades, el enlazador comprende OSu-$(PEG)_2$-Ala-Ala-Asn-pAB. En algunas modalidades, el enlazador comprende OSu-$(PEG)_9$-unidad de aminoácido-pAB. En algunas modalidades, el enlazador comprende OSu-$(PEG)_9$-Val-Cit-pAB. En algunas modalidades, el enlazador comprende OSu-$(CH_2)_5$-unidad de aminoácido-pAB. En algunas modalidades, el enlazador comprende OSu-$(CH_2)_5$-Val-Cit-pAB. En algunas modalidades, el enlazador comprende OSu-$(PEG)_3$-triazol-$(PEG)_3$-unidad de aminoácido-pAB. En algunas modalidades, el enlazador comprende OSu-$(PEG)_3$-triazol-$(PEG)_3$-Val-Cit-pAB.

[00187]En algunas modalidades, el resto de anticuerpo del ADC se conjuga con el resto de fármaco mediante un enlazador, en donde el enlazador comprende OSu-unidad espaciadora-disulfuro-pAB. En algunas modalidades, la unidad espaciadora comprende un resto de PEG. En algunas modalidades, el

enlazador comprende OSu-$(PEG)_3$-triazol-$(PEG)_3$-disulfuro-pAB. En algunas modalidades, el enlazador comprende OSu-$(PEG)_3$-triazol-$(PEG)_3$-disulfidilo-dimetilo-pAB. En algunas modalidades, el enlazador comprende OSu-dibencilciclooctena-triazol-$(PEG)_3$-disulfuro-pAB. En algunas modalidades, el enlazador comprende OSu-dibencilciclooctena-triazol-$(PEG)_3$-disulfidilo-dimetilo-pAB.

[00188]En algunas modalidades, el resto de anticuerpo del ADC se conjuga con el resto de fármaco mediante un enlazador, en donde el enlazador comprende OSu-unidad espaciadora-sulfonamida-pAB. En algunas modalidades, la unidad espaciadora comprende un resto de PEG. En algunas modalidades, el enlazador comprende OSu-$(PEG)_3$-triazol-$(PEG)_3$-sulfonamida-pAB. En algunas modalidades, el enlazador comprende OSu-dibencilciclooctena-triazol-$(PEG)_3$-sulfonamida-pAB.

[00189]En diversas modalidades, el enlazador está diseñado para facilitar la destrucción no específica (la destrucción de células vecinas) a través de la escisión después de la interiorización celular y la difusión del enlazador-resto de fármaco y/o el resto de fármaco solo a células vecinas. En algunas modalidades, el enlazador promueve la internalización celular. En algunas modalidades, el enlazador está diseñado para minimizar la escisión en el entorno extracelular y reducir así la toxicidad al tejido fuera del objetivo (p. ej., tejido no canceroso), conservando la unión de ADC al tejido diana y la destrucción no específica del tejido canceroso que no expresa un antígeno objetivo del resto de anticuerpo de un ADC, pero rodea el tejido de cáncer dina que expresa ese antígeno. En algunas modalidades, un enlazador que comprende un resto de maleimida (Mal), un resto de polietilenglicol (PEG), una valina-citrulina (Val-Cit o "vc") y un pAB proporciona estas características funcionales. En algunas modalidades, un enlazador que comprende Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB es particularmente eficaz para proporcionar estas características funcionales, p. ej., cuando une un resto de anticuerpo anti-FRA tal como MORAb-003 y un resto de fármaco tal como eribulina. En algunas modalidades, al menos algunas de estas características funcionales también se pueden observar sin un resto de anticuerpo anti-FRA y/o sin MORAb-003. Por ejemplo, en algunas modalidades, un enlazador que comprende Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB es eficaz para proporcionar algunas o todas estas características funcionales, p. ej., cuando une un resto de anticuerpo anti-her2 tal como trastuzumab y un resto de fármaco tal como eribulina.

[00190]En algunas modalidades, el resto de anticuerpo se conjuga con el resto de fármaco mediante un enlazador que comprende un resto de maleimida (Mal), un resto de polietilenglicol (PEG), valina citrulina (Val-Cit o "vc") y un pAB. En estas modalidades, el resto de maleimida une de forma covalente el enlazador-resto de fármaco con el resto de anticuerpo y el pAB actúa como una unidad espaciadora

autodestructiva. Dicho enlazador se puede denominar enlazador de "m-vc-pAB**”**, enlazador de **“**Mal-VCP**”, enlazador de "Mal-(PEG)$_2$-VCP",** o enlazador de **“**Mal-(PEG)2-Val-Cit-pAB**”**. En algunas modalidades, el resto de fármaco es eribulina. La estructura de Mal-(PEG)$_2$-Val-Cit-pAB-eribulina se proporciona en la tabla 46. El pAB del enlazador de Mal-(PEG)$_2$-Val-Cit-pAB se une a la amina C-35 en eribulina.

[00191]Se ha descubierto que los ADC que comprenden Mal-(PEG)$_2$-Val-Cit-pAB-eribulina demuestran una combinación particular de propiedades deseables, específicamente cuando se emparejan con un anticuerpo anti-FRA tal como MORAb-003 o un fragmento de unión al antígeno de este. Estas propiedades incluyen, entre otros, niveles efectivos de carga de fármaco (p ~ 4), niveles de agregación bajos, estabilidad en condiciones de almacenamiento o cuando se encuentran en circulación en el cuerpo (p. ej., estabilidad sérica), retención de afinidad para células que expresan la diana comparable con anticuerpo no conjugado, citotoxicidad potente contra células que expresan la diana, bajos niveles de destrucción celular fuera del objetivo, altos niveles de destrucción no específica y/o actividad anticancerosa *in vivo* eficaz, todo en comparación con los ADC que utilizan otro enlazador-toxina y/o restos de anticuerpo. Aunque en la técnica se conocen numerosas opciones de enlazadores y combinaciones de espaciadores y sitios de escisión que pueden proporcionar determinados beneficios en una o más de estas categorías funcionales, la combinación particular de un enlazador de Mal-(PEG)$_2$-Val-Cit-pAB que une eribulina con un resto de anticuerpo tal como un anticuerpo anti-FRA (p. ej., MORAb-003) puede proporcionar propiedades buenas o superiores en todo el espectro de propiedades funcionales deseables para un ADC terapéutico. En algunas modalidades, las propiedades funcionales buenas o superiores proporcionadas por la combinación particular de un enlazador de Mal-(PEG)$_2$-Val-Cit-pAB que une eribulina a un resto de anticuerpo se pueden observar con este enlazador-toxina conjugado, p. ej., con un anticuerpo anti-her 2 tal como trastuzumab.

[00192]En algunas modalidades, el ADC comprende Mal-(PEG)$_2$-Val-Cit-pAB-eribulina y un resto de anticuerpo que comprende un anticuerpo de internalización o un fragmento de unión al antígeno de este que conserva la capacidad de dirigirse e internalizarse en una célula tumoral. En algunas modalidades, el ADC comprende Mal-(PEG)$_2$-Val-Cit-pAB-eribulina y un anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización de este que se dirige a una célula tumoral que expresa FRA. En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización de este que se dirige a una célula tumoral que expresa FRA comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) que comprenden secuencias de

aminoácidos de ID DE SEC. NO.:2 (HCDR1), ID DE SEC. NO.:3 (HCDR2) y ID DE SEC. NO.:4 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:7 (LCDR1), ID DE SEC. NO.:8 (LCDR2) y ID DE SEC. NO.:9 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración de Kabat; o tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:13 (HCDR1), ID DE SEC. NO.:14 (HCDR2) y ID DE SEC. NO.:15 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:16 (LCDR1), ID DE SEC. NO.:17 (LCDR2) y ID DE SEC. NO.:18 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración IMGT. En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización de este que se dirige a una célula tumoral que expresa FRA comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:23 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:24. En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización de este que se dirige a una célula tumoral que expresa FRA comprende un dominio constante de cadena pesada de IgG1 humana y un dominio constante de cadena ligera de kappa de Ig.

[00193]En algunas modalidades, el ADC tiene la fórmula I:

$$Ab\text{-}(L\text{-}D)_p \qquad (I)$$

en donde:

a. Ab es un anticuerpo anti-receptor de folato alfa (FRA) de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización de este que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:2 (HCDR1), ID DE SEC. NO.:3 (HCDR2) y ID DE SEC. NO.:4 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:7 (LCDR1), ID DE SEC. NO.:8 (LCDR2) y ID DE SEC. NO.:9 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración de Kabat; o tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:13 (HCDR1), ID DE SEC. NO.:14 (HCDR2) y ID DE SEC. NO.:15 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:16 (LCDR1), ID DE SEC. NO.:17 (LCDR2) y ID DE SEC. NO.:18 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración IMGT;

(ii)D es eribulina;

(iii) L es un enlazador escindible que comprende Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB; y

(iv) *p* es un entero entre 1 y 20.

[00194]En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización de este comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:23 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:24. En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización es MORAb-003. En algunas modalidades, *p* es entre 1 y 8, o entre 1 y 6. En algunas modalidades, *p* es entre 2 y 8, o entre 2 y 5. En algunas modalidades, *p* es entre 3 y 4. En algunas modalidades, *p* es 4.

[00195]En otras modalidades, el ADC comprende Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB-eribulina y un anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización de este que se dirige a una célula tumoral que expresa her2. En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización de este que se dirige a una célula tumoral que expresa her2 comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:71 (HCDR1), ID DE SEC. NO.:72 (HCDR2) y ID DE SEC. NO.:73 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:74 (LCDR1), ID DE SEC. NO.:75 (LCDR2) y ID DE SEC. NO.:76 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración de Kabat; o tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:191 (HCDR1), ID DE SEC. NO.:192 (HCDR2) y ID DE SEC. NO.:193 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:194 (LCDR1), ID DE SEC. NO.:195 (LCDR2) y ID DE SEC. NO.:196 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración IMGT. En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización de este que se dirige a una célula tumoral que expresa her2 comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:27 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:28. En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización de este que se dirige a una célula tumoral que expresa her2 comprende un dominio constante de cadena pesada de IgG1 humana y un dominio constante de cadena ligera de kappa de Ig.

[00196]En algunas modalidades, el ADC tiene la fórmula I:

$Ab-(L-D)_p$ (I)

en donde:

a. Ab es un anticuerpo anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (her2) de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización de este que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:71 (HCDR1), ID DE SEC. NO.:72 (HCDR2) y ID DE SEC. NO.:73 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:74 (LCDR1), ID DE SEC. NO.:75 (LCDR2) y ID DE SEC. NO.:76 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración de Kabat; o tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:191 (HCDR1), ID DE SEC. NO.:192 (HCDR2) y ID DE SEC. NO.:193 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:194 (LCDR1), ID DE SEC. NO.:195 (LCDR2) y ID DE SEC. NO.:196 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración IMGT;

D es eribulina;

L es un enlazador escindible que comprende Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB; y

p es un entero entre 1 y 20.

[00197]En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización de este comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:27 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:28. En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización es trastuzumab. En algunas modalidades, *p* es entre 1 y 8, o entre 1 y 6. En algunas modalidades, *p* es entre 2 y 8, o entre 2 y 5. En algunas modalidades, *p* es entre 3 y 4. En algunas modalidades, *p* es 4.

[00198]En otras modalidades, el ADC comprende Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB-eribulina y un anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización de este que se dirige a una célula tumoral que expresa mesotelina (MSLN). En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización de este que se dirige a una célula tumoral que expresa MSLN comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) que

comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:65 (HCDR1), ID DE SEC. NO.:66 (HCDR2) y ID DE SEC. NO.:67 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:68 (LCDR1), ID DE SEC. NO.:69 (LCDR2) y ID DE SEC. NO.:70 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración de Kabat; o tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:185 (HCDR1), ID DE SEC. NO.:186 (HCDR2) y ID DE SEC. NO.:187 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:188 (LCDR1), ID DE SEC. NO.:189 (LCDR2) y ID DE SEC. NO.:190 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración IMGT. En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización de este que se dirige a una célula tumoral que expresa MSLN comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:25 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:26. En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización de este que se dirige a una célula tumoral que expresa MSLN comprende un dominio constante de cadena pesada de IgG1 humana y un dominio constante de cadena ligera de kappa de Ig.

[00199] En algunas modalidades, el ADC tiene la fórmula I:

$$Ab\text{-}(L\text{-}D)_p \qquad (I)$$

en donde:

a. Ab es un anticuerpo anti-mesotelina de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización de este que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:65 (HCDR1), ID DE SEC. NO.:66 (HCDR2) y ID DE SEC. NO.:67 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:68 (LCDR1), ID DE SEC. NO.:69 (LCDR2) y ID DE SEC. NO.:70 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración de Kabat; o tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:185 (HCDR1), ID DE SEC. NO.:186 (HCDR2) y ID DE SEC. NO.:187 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:188 (LCDR1), ID DE SEC. NO.:189 (LCDR2) y ID DE SEC. NO.:190 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración IMGT;

b. D es eribulina;

c. L es un enlazador escindible que comprende Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB; y

d. *p* es un entero entre 1 y 20.

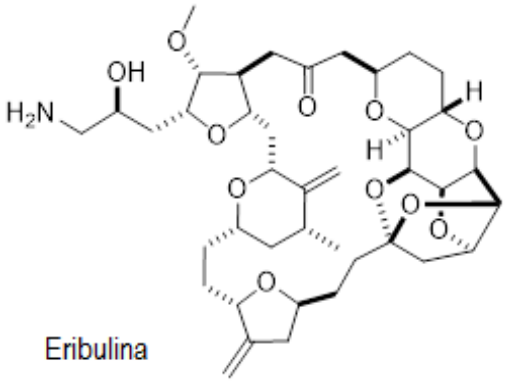
[00200]En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización de este comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:25 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:26. En algunas modalidades, el anticuerpo de internalización es MORAb-003, MORAb-009 o trastuzumab. En algunas modalidades, *p* es entre 1 y 8, o entre 1 y 6. En algunas modalidades, *p* es entre 2 y 8, o entre 2 y 5. En algunas modalidades, *p* es entre 3 y 4. En algunas modalidades, *p* es 4.

Restos de fármaco

[00201]El resto de fármaco (D) de los ADC descritos en la presente puede ser cualquier agente quimioterapéutico. Las clases útiles de agentes quimioterapéuticos incluyen, por ejemplo, agentes anti-tubulina. En determinadas modalidades, el resto de fármaco es un agente anti-tubulina. Los ejemplos de agentes anti-tubulina incluyen criptoficina y eribulina. El resto de fármaco preferido para su uso en los ADC descritos es eribulina.

[00202]En diversas modalidades, el resto de fármaco es eribulina. En estas modalidades, el enlazador del ADC está unido mediante la amina C-35 en eribulina.

[00203]En diversas modalidades, a continuación se muestra la forma natural de eribulina utilizada para unirse al enlazador y resto de anticuerpo:



Eribulina

[00204]En determinadas modalidades, se hace reaccionar un intermedio, que es el precursor del enlazador, con el resto de fármaco en condiciones apropiadas. En determinadas modalidades, se utilizan grupos reactivos en el fármaco y/o el intermedio o enlazador. El producto de la reacción entre el fármaco y el intermedio o el fármaco derivado, se hace reaccionar posteriormente con el anticuerpo o fragmento

de unión al antígeno en condiciones apropiadas. Alternativamente, el enlazador o intermedio primero se puede hacer reaccionar con el anticuerpo o un anticuerpo derivado y luego con el fármaco o fármaco derivado.

[00205] Hay una cantidad de reacciones diferentes disponibles para la unión covalente de fármacos y/o enlazadores con el resto de anticuerpo. Esto a menudo se logra mediante la reacción de uno o más residuos de aminoácidos de la molécula de anticuerpo, incluso los grupos amina de lisina, los grupos de ácido carboxílico libre de ácido glutámico y ácido aspártico, los grupos sulfhidrilo de cisteína y los diversos restos de los aminoácidos aromáticos. Por ejemplo, se puede llevar a cabo una unión covalente no específica utilizando una reacción de carbodiimida para unir un grupo carboxi (o amino) en un compuesto con un grupo amino (o carboxi) en un resto de anticuerpo. Adicionalmente, también se pueden utilizar agentes bifuncionales tal como dialdehídos o imidoésteres para unir el grupo amino en un compuesto con un grupo amino en un resto de anticuerpo. La reacción de base Schiff también se encuentra disponible para la unión de fármacos a agentes aglutinantes. Este método involucra la oxidación por periodato de un fármaco que contiene grupos glicol o hidroxi y por lo tanto forma un aldehído el cual luego se hace reaccionar con el agente aglutinante. La unión ocurre mediante la formación de una base Schiff con grupos amino del agente aglutinante. Los isotiocianatos también pueden usarse como agentes de acoplamiento para enlazar covalentemente fármacos a agentes aglutinantes. Otras técnicas son conocidas para el experto y se encuentran dentro del alcance de la presente descripción.

Carga de fármaco

[00206] La carga de fármaco está representada con *p* y en la presente también se denomina proporción de fármaco a anticuerpo (DAR). La carga de fármaco puede oscilar entre 1 y 20 restos de fármaco por resto de anticuerpo. En algunas modalidades, *p* es un entero entre 1 y 20. En algunas modalidades, *p* es un entero entre 1 y 10, entre 1 y 9, entre 1 y 8, entre 1 y 7, entre 1 y 6, entre 1 y 5, entre 1 y 4, entre 1 y 3, o entre 1 y 2. En algunas modalidades, *p* es un entero entre 2 y 10, entre 2 y 9, entre 2 y 8, entre 2 y 7, entre 2 y 6, entre 2 y 5, entre 2 y 4, o entre 2 y 3. En algunas modalidades, *p* es un entero entre 3 y 4. En otras modalidades, *p* es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, preferentemente 3 o 4.

[00207] La carga de fármaco puede estar limitada por la cantidad de sitios de unión en el resto de anticuerpo. En algunas modalidades, el resto de enlazador (L) del ADC se une al resto de anticuerpo a través de un grupo químicamente activo en uno o más residuos de aminoácidos en el resto de anticuerpo. Por ejemplo, el enlazador puede estar unido al resto de anticuerpo mediante un grupo amino, imino,

hidroxilo, tiol o carboxilo libre (p. ej., al extremo N o extremo C, al grupo amino épsilon de uno o más residuos de lisina, al gripo de ácido carboxílico libre de uno o más residuos de ácido glutámico o ácido aspártico, o al grupo sulfhidrilo de uno o más residuos de cisteína). El sitio al cual se une el enlazador puede ser un residuo natural en la secuencia de aminoácidos del resto de anticuerpo o se puede introducir en el resto de anticuerpo, p. ej., a través de tecnología recombinante de ADN (p. ej., mediante la introducción de un residuo de cisteína en la secuencia de aminoácidos) o a través de bioquímica de proteína (p. ej., mediante reducción, ajuste de pH o hidrólisis).

[00208] En algunas modalidades, la cantidad de restos de fármaco que se pueden conjugar con un resto de anticuerpo limitado por la cantidad de residuos de cisteína libres. Por ejemplo, cuando la unión es un grupo tiol de cisteína, un anticuerpo puede tener solo uno o algunos grupos tiol de cisteína o puede tener solo uno o algunos grupos tiol suficientemente reactivos a través de los cuales se puede unir un enlazador. En general, los anticuerpos no contienen muchos grupos tiol con cisteína reactivos y libres que se pueden enlazar a un resto de fármaco. En efecto, la mayoría de los residuos tiol de cisteína en anticuerpos existen como puentes disulfuro. El exceso de unión del enlazador-toxina a un anticuerpo puede desestabilizar el anticuerpo al reducir los residuos de cisteína disponibles para formar puentes disulfuro. Por lo tanto, una proporción fármaco:anticuerpo óptima debería aumentar la potencia del ADC (al aumentar la cantidad de restos de fármaco unidos por anticuerpo) sin desestabilizar el resto de anticuerpo. En algunas modalidades, una proporción óptima puede ser aproximadamente 3-4.

[00209] En algunas modalidades, un enlazador unido a un resto de anticuerpo a través de un resto de Mal proporciona una proporción de aproximadamente 3-4. En algunas modalidades, un enlazador unido a un resto de anticuerpo a través de un resto alternativo (p. ej., un resto de OSu) puede proporcionar una proporción menos óptima (p. ej., una proporción inferior, tal como aproximadamente 0-3). En algunas modalidades, un enlazador que comprende una unidad espaciadora corta (p. ej., una unidad espaciadora de PEG corta tal como $(PEG)_2$ o $(PEG)_4$, o una unidad espaciadora de alquilo corta tal como $(CH_2)_5$) proporciona una proporción de aproximadamente 3-4. En algunas modalidades, un enlazador que comprende una unidad espaciadora más larga (p. ej., $(PEG)_8$) puede proporcionar una proporción menos óptima (p. ej., una proporción inferior, tal como aproximadamente 0-3). En algunas modalidades, un enlazador que comprende un resto escindible de péptido proporciona una proporción de aproximadamente 3-4. En algunas modalidades, un enlazador que comprende un resto escindible alternativo (p. ej., un disulfuro escindible o una sulfonamida escindible) puede proporcionar una proporción menos óptima (p. ej., una proporción inferior, tal como aproximadamente 0-3). En algunas

modalidades, un ADC que comprende Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB-eribulina unido a un anticuerpo tal como un anticuerpo anti-FRA (p. ej., MORAb-003) tiene una proporción de aproximadamente 3-4. En algunas modalidades, se observa una proporción de aproximadamente 3-4 con un ADC que comprende Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB-eribulina unido a un anticuerpo diferente, por ejemplo un anticuerpo anti-her2 (p. ej., trastuzumab). En algunas modalidades, la proporción óptima observada con los ADC que comprende el enlazador-toxina de Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB-eribulina es independiente del anticuerpo.

[00210]En algunas modalidades, se expone un resto de anticuerpo a condiciones de reducción antes de la conjugación para generar uno o más residuos de cisteína libres. Un anticuerpo, en algunas modalidades, se puede reducir con un agente de reducción tal como ditiotreitol (DTT) o tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), en condiciones de reducción parcial o total, para generar grupos tiol de cisteína reactivos. Se pueden generar cisteínas desapareadas a través de reducción parcial con equivalentes molares limitados de TCEP, que reduce preferentemente los enlaces disulfuro entre cadenas que unen la cadena ligera y la cadena pesada (un par por apareamiento H-L) y las dos cadenas pesadas en la región bisagra (dos pares por apareamiento H-H en el caso de IgG1 humana), dejando intactos los enlaces disulfuro entre cadenas (Stefano et ál. (2013) Methods Mol. Biol. 1045:145-71). En algunas modalidades, los enlaces de disulfuro dentro de los anticuerpos se reducen electroquímicamente, p. ej., empleando un electrodo de trabajo que aplica un voltaje alternativo de reducción y oxidación. Este enfoque puede permitir el acoplamiento en línea de reducción de enlace disulfuro con un dispositivo analítico (p. ej., un dispositivo de detección electroquímica, un espectrómetro NMR o un espectrómetro de masas) o un dispositivo de separación química (p. ej., un cromatógrafo líquido (p. ej., un HPLC) o un dispositivo de electroforesis (véase, p. ej., la publicación estadounidense N.º 20140069822)). En determinados grupos, se somete un anticuerpo a condiciones de desnaturalización para revelar grupos nucleofílicos reactivos en residuos de aminoácidos, por ejemplo lisina o cisteína.

[00211]La carga de fármaco de un ADC puede ser controlada de diferentes maneras, p. ej., mediante: (i) limitación del exceso molar del intermedio fármaco-enlazador o reactivo de enlace relacionado con el anticuerpo; (ii) limitación del tiempo o la temperatura de reacción de conjugación; (iii) condiciones de reducción parcial o limitantes de la modificación del tiol de cisteína; y/o (iv) modificación genética mediante técnicas recombinantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de manera tal que la cantidad y posición de residuos de cisteína quede modificada para el control del número y/o posición de uniones enlazador-fármaco.

[00212]En algunas modalidades, se introducen residuos de cisteína libres en la secuencia de

aminoácidos del resto de anticuerpo. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos modificados con cisteína, en donde se reemplazan uno o más aminoácidos de un anticuerpo original con un aminoácido de cisteína. Cualquier forma de anticuerpo se puede modificar genéticamente, es decir mutar, de esta manera. Por ejemplo, se puede modificar un fragmento de anticuerpo Fab original para formar un Fab modificado con cisteína denominado "ThioFab". De manera similar, se puede modificar un anticuerpo monoclonal original para formar un "ThioMab". Una mutación de sitio único produce un único residuo cisteína modificado en un TioFab, mientras que una mutación de sitio único produce dos residuos cisteína modificados en un TioMab debido a la naturaleza dimérica del anticuerpo de IgG. Se puede preparar un ADN que codifique una variante de secuencia de aminoácidos del polipéptido original a través de diversos métodos conocidos en la técnica (véase, p. ej., los métodos descritos en WO2006/034488). Dichos métodos incluyen, de modo no taxativo, la preparación mediante mutagénesis dirigida al sitio (o mediada por oligonucleótidos), mutagénesis por PCR y mutagénesis de casete de un ADN preparado anteriormente que codifica el polipéptido. También es posible construir variantes de anticuerpos recombinantes mediante manipulación de fragmentos de restricción o mediante PCR de extensión solapada con oligonucleótidos sintéticos. Los ADC de fórmula I incluyen, de modo no taxativo, anticuerpos que tienen 1, 2, 3 o 4 aminoácidos de cisteína modificados (Lyon et ál. (2012) Methods Enzymol. 502:123-38). En algunas modalidades, uno o más residuos de cisteína libres ya están presentes en un resto de anticuerpo, sin el uso de modificación genética, en cuyo caso los residuos de cisteína libres existentes se pueden utilizar para conjugar el resto de anticuerpo con un resto de fármaco.

[00213] En algunas modalidades, una carga de fármaco mayor (p. ej., $p > 5$) puede provocar agregación, insolubilidad, toxicidad o pérdida de permeabilidad celular de determinados conjugados anticuerpo-fármaco. Una mayor carga de fármaco también puede afectar negativamente la farmacocinética (p. ej., depuración) de determinados ADC. En algunas modalidades, una carga de fármaco inferior (p. ej., $p < 3$) puede reducir la potencia de determinados ADC contra células que expresan la diana y/o células no específicas. En algunas modalidades, la carga de fármaco para un ADC de la presente descripción oscila entre 1 y aproximadamente 8; entre aproximadamente 2 y aproximadamente 6; entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5; entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5; o entre aproximadamente 3 y aproximadamente 4.

[00214] Cuando más de un grupo nucleofílico reacciona con un intermedio fármaco-enlazador o un reactivo de resto de enlazador seguido por reactivo de resto de fármaco, en una mezcla de reacción que comprende múltiples copias del resto de anticuerpo y resto de enlazador, el producto resultante puede

ser una mezcla de compuestos de ADC con una distribución de uno o más restos de fármaco unidos a cada copia del resto de anticuerpo en la mezcla. En algunas modalidades, la carga de fármaco en una mezcla de ADC que proviene de una reacción de conjugación oscila entre 1 y 20 restos de fármaco unidos por resto de anticuerpo. La cantidad promedio de restos de fármaco por resto de anticuerpo (es decir, la carga de fármaco promedio o *p* promedio) se puede calcular a través de cualquier método convencional conocido en la técnica, p. ej., mediante espectrometría de masas (p. ej., LC-MS de fase inversa) y/o cromatografía líquida de alto rendimiento (p. ej., HIC-HPLC). En algunas modalidades, la cantidad promedio de restos de fármaco por resto de anticuerpo se determina mediante cromatografía de interacción hidrofóbica-cromatografía líquida de alto rendimiento (HIC-HPLC). En algunas modalidades, la cantidad promedio de restos de fármaco por resto de anticuerpo se determina mediante cromatografía líquida de fase inversa-espectrometría de masas (LC-MS). En algunas modalidades, la cantidad promedio de restos de fármaco por resto de anticuerpo es de entre aproximadamente 3 y aproximadamente 4; entre aproximadamente 3,1 y aproximadamente 3,9; entre aproximadamente 3,2 y aproximadamente 3,8; entre aproximadamente 3,2 y aproximadamente 3,7; entre aproximadamente 3,2 y aproximadamente 3,6; entre aproximadamente 3,3 y aproximadamente 3,8; o entre aproximadamente 3,3 y aproximadamente 3,7. En algunas modalidades, la cantidad promedio de restos de fármaco por resto de anticuerpo es de entre aproximadamente 3,2 y aproximadamente 3,8. En algunas modalidades, la cantidad promedio de restos de fármaco por resto de anticuerpo es de aproximadamente 3,8. En algunas modalidades, la cantidad promedio de restos de fármaco por resto de anticuerpo es de entre 3 y 4; entre 3,1 y 3,9; entre 3,2 y 3,8; entre 3,2 y 3,7; entre 3,2 y 3,6; entre 3,3 y 3,8; o entre 3,3 y 3,7. En algunas modalidades, la cantidad promedio de restos de fármaco por resto de anticuerpo es de entre 3,2 y 3,8. En algunas modalidades, la cantidad promedio de restos de fármaco por resto de anticuerpo es de 3,8.

[00215]En algunas modalidades, la cantidad promedio de restos de fármaco por resto de anticuerpo es de entre aproximadamente 3,5 y aproximadamente 4,5; entre aproximadamente 3,6 y aproximadamente 4,4; entre aproximadamente 3,7 y aproximadamente 4,3; entre aproximadamente 3,7 y aproximadamente 4,2; o entre aproximadamente 3,8 y aproximadamente 4,2. En algunas modalidades, la cantidad promedio de restos de fármaco por resto de anticuerpo es de entre aproximadamente 3,6 y aproximadamente 4,4. En algunas modalidades, la cantidad promedio de restos de fármaco por resto de anticuerpo es de aproximadamente 4,0. En algunas modalidades, la cantidad promedio de restos de fármaco por resto de anticuerpo es de entre 3,5 y 4,5; entre 3,6 y 4,4; entre 3,7 y 4,3; entre 3,7 y 4,2; o entre 3,8 y 4,2. En algunas modalidades, la cantidad promedio de restos de fármaco por resto de

anticuerpo es de entre 3,6 y 4,4. En algunas modalidades, la cantidad promedio de restos de fármaco por resto de anticuerpo es de 4,0.

[00216] En diversas modalidades, el término **"**aproximadamente**"**, tal como se utiliza con respecto a la cantidad promedio de restos de fármaco por resto de anticuerpo, significa +/- 10 %.

[00217] Los compuestos de ADC individuales, o **"**especies**"**, se pueden identificar en la mezcla mediante espectroscopía de masas y separar mediante UPLC o HPLC, p. ej. cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC-HPLC). En determinadas modalidades, un ADC homogéneo o casi homogéneo con un valor de carga único se puede aislar de la mezcla de conjugación, p. ej., mediante electroforesis o cromatografía.

[00218] En algunas modalidades, una carga de fármaco y/o una carga de fármaco provee de aproximadamente 4 proporciona propiedades beneficiosas. En algunas modalidades, una carga de fármaco y/o una carga de fármaco promedio inferior a aproximadamente 4 puede generar un nivel inaceptablemente elevado de especies de anticuerpos no conjugados, los cuales pueden competir con ADC para la unión a un antígeno diana y/o proporcionar una eficacia en el tratamiento reducida. En algunas modalidades, una carga de fármaco y/o carga de fármaco promedio de más de aproximadamente 4 puede generar un nivel Inaceptablemente elevado de heterogeneidad del producto y/o agregación de ADC. Una carga de fármaco y/o carga de fármaco promedio de más de aproximadamente 4 también puede afectar la estabilidad del ADC, debido a la pérdida de uno o más enlaces químicos necesarios para estabilizar el resto de anticuerpo.

[00219] En algunas modalidades, un ADC tiene la fórmula I:

$Ab\text{-}(L\text{-}D)_p$ (I)

en donde:

(i) Ab es un anticuerpo anti-receptor de folato alfa de internalización o fragmento de unión al antígeno de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:23 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:24;

(ii) D es eribulina;

(iii) L es un enlazador escindible que comprende Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB; y

(iv) *p* es un entero entre 3 y 4.

[00220] En otras modalidades, un ADC tiene la fórmula I:

$Ab\text{-}(L\text{-}D)_p$ (I)

en donde:

(i) Ab es un anticuerpo anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 de internalización o fragmento de unión al antígeno de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:27 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:28;

(ii) D es eribulina;

(iii) L es un enlazador escindible que comprende Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB; y

(iv) *p* es un entero entre 3 y 4.

[00221]En algunas modalidades, *p* es 4.

[00222]La presente descripción incluye métodos para producir los ADC descritos. En resumen, los ADC comprenden un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno como el resto de anticuerpo, un resto de fármaco y un enlazador que une el resto de fármaco y el resto de anticuerpo. En algunas modalidades, los ADC se pueden preparar utilizando un enlazador que tenga funcionalidades reactivas para unirse de forma covalente al resto de fármaco y al resto de anticuerpo. Por ejemplo, en algunas modalidades, un tiol de cisteína de un resto de anticuerpo puede formar un enlace con un grupo funcional reactivo de un enlazador o un intermedio fármaco-enlazador (p. ej., un resto de maleimida) para producir un ADC. La generación de los ADC puede lograrse mediante cualquier técnica conocida para el experto.

[00223]En algunas modalidades, un ADC se produce mediante el contacto de un resto de anticuerpo con un enlazador y un resto de fármaco de manera secuencial, de tal manera que el resto de anticuerpo se une de forma covalente al enlazador primero y luego el intermedio anticuerpo-enlazador preformado reacciona con el resto de fármaco. El intermedio anticuerpo-enlazador se puede someter a una etapa de purificación o no antes del contacto con el resto de fármaco. En otras modalidades, un ADC se produce mediante el contacto de un resto de anticuerpo con un compuesto de fármaco enlazador preformado mediante la reacción de un enlazador con un resto de fármaco. El compuesto de enlazador-fármaco preformado se puede someter a una etapa de purificación o no antes del contacto con el resto de anticuerpo. En otras modalidades, el resto de anticuerpo entra en contacto con el enlazador y el resto de fármaco en una mezcla de reacción, permitiendo la formación simultánea de los enlaces covalentes entre el resto de anticuerpo y el enlazador, y entre el enlazador y el resto de fármaco. Este método para producir ADC puede incluir una reacción, en donde el resto de anticuerpo entra en contacto con el resto de anticuerpo antes de la adición del enlazador a la mezcla de reacción, y viceversa. En determinadas modalidades, un ADC se produce mediante la reacción de un resto de anticuerpo con un enlazador unido

a un resto de fármaco, por ejemplo Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB-eribulina, en condiciones que permiten la conjugación.

[00224]Los ADC preparados de acuerdo con los métodos descritos anteriormente se puede someter a una etapa de purificación. La etapa de purificación puede implicar cualquier método bioquímico conocido en la técnica para purificar proteínas o cualquier combinación de métodos de estos. Estos incluyen, entre otros, filtración de flujo tangencial (TFF), cromatografía por afinidad, cromatografía de intercambio de iones, cualquier cromatografía basada en punto isoeléctrico o carga, cromatografía de modo mixto, p. ej., CHT (hidroxiapatita cerámica), cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de exclusión de tamaño, diálisis, filtración, precipitación selectiva o cualquier combinación de estos.

Composiciones y usos terapéuticos

[00225]En la presente se describen métodos para utilizar los ADC descritos para tratar un sujeto debido a un trastorno, p. ej., un trastorno oncológico. Los ADC se pueden administrar solos o en combinación con un segundo agente terapéutico y se pueden administrar en cualquier formulación, dosificación y régimen de dosificación farmacéuticamente aceptable. Se puede evaluar la eficacia del tratamiento con ADC para detectar la toxicidad así como indicadores de eficacia y se pueden ajustar en consecuencia. Las medidas de eficacia incluyen, entre otros, un efecto citostático y/o citotóxico observado *in vitro* o *in vivo*, reducción del volumen tumoral, inhibición del crecimiento tumoral y/o supervivencia prolongada.

[00226]Los métodos para determinar si un ADC produce un efecto citostático y/o citotóxico en una célula son conocidos. Por ejemplo, la actividad citotóxica o citostática de un ADC se puede medir mediante: exposición de células de mamífero que expresan una proteína diana del ADC en un medio de cultivo celular; cultivo de las células durante un período de entre aproximadamente 6 horas y aproximadamente 5 días; y medición de la viabilidad celular. También se pueden utilizar ensayos *in vitro* basados en células para medir la viabilidad (proliferación), citotoxicidad e inducción de apoptosis (activación de la caspasa) del ADC.

[00227]Para determinar si un conjugado de anticuerpo-fármaco produce un efecto citostático, se puede utilizar un ensayo de incorporación de timidina. Por ejemplo, las células de cáncer que expresan un antígeno diana a una densidad de 5.000 células/pocillo de una placa de 96 pocillos pueden cultivarse durante un período de 72 horas y exponerse a 0,5 µCi de ^{3}H-timidina durante las 8 horas finales del período de 72 horas. La incorporación de ^{3}H-timidina en las células del cultivo se mide en presencia y ausencia del ADC.

[00228] Para determinar la citotoxicidad, se puede medir la necrosis o apoptosis (la muerte celular programada). Típicamente, la necrosis se encuentra acompañada por una permeabilidad en aumento de la membrana plasmática; la hinchazón de la célula y la ruptura de la membrana plasmática. Normalmente, la apoptosis se caracteriza por encogimiento celular, condensación de citoplasma y la activación de endonucleasas endógenas. La determinación de cualquiera de estos efectos en células cancerosas indica que un ADC es útil en el tratamiento de cánceres.

[00229] La viabilidad celular puede medirse, por ejemplo, mediante la determinación en una célula de la absorción de un tinte tal como rojo neutro, azul tripán, cristal violeta o azul ALAMAR™ (véase, p. ej., Page et ál. (1993) Intl. J. Oncology 3:473-6). En dicho ensayo, las células se incuban en medios que contienen el tinte, las células se lavan y el tinte restante, que refleja la absorción celular del tinte, se mide espectrofotométricamente. En determinadas modalidades, se evalúa la potencia *in vitro* de los ADC preparados utilizando un ensayo de cristal violeta. El cristal violeta es una tinta de triarilmetano que se acumula en el núcleo de células viables. En este ensayo, las células son expuestas a los ADC o agentes de control durante un período definido, después del cual, las células se tiñen con cristal violeta, se lavan en abundancia con agua y luego se solubilizan con SDS al 1 % y se leen espectrofotométricamente. La tinta de unión a proteínas sulforhodamina B (SRB) también se puede utilizar para medir la citotoxicidad (Skehan et ál. (1990) J. Natl. Cancer Inst. 82:1107-12).

[00230] La apoptosis se puede cuantificar, por ejemplo, mediante la medición de la fragmentación de ADN. Los métodos fotométricos comerciales para la determinación cuantitativa *in vitro* de la fragmentación de ADN se encuentran disponibles. Ejemplos de dichos ensayos, incluyendo TUNEL (que detecta la incorporación de nucleótidos etiquetados en ADN fragmentado) y ensayos basados en ELISA, se describen en Biochemica (1999) No. 2, pp. 34-37 (Roche Molecular Biochemicals).

[00231] La apoptosis también puede determinarse mediante la medición de cambios morfológicos en una célula. Por ejemplo, como con la necrosis, la pérdida de la integridad de la membrana plasmática puede determinarse mediante la medición de la absorción de ciertos tintes (por ejemplo, un tinte fluorescente tal como, por ejemplo, naranja de acridina o bromuro de etidio). Un método para medir la cantidad de células apoptósicas ha sido descrito por Duke y Cohen, Current Protocols in Immunology (Coligan et ál., eds. (1992) pp. 3.17.1-3.17.16). Las células también pueden teñirse con tinte de ADN (por ejemplo, naranja de acridina, bromuro de etidio o yoduro de propidio) y las células observarse para determinar la condensación de cromatina y la marginación a lo largo de la membrana nuclear interna. Otros cambios morfológicos que se pueden medir para determinar apoptosis incluyen, p. ej., condensación

citoplásmica, aumento del encogimiento celular y reducción celular.

[00232] Los ADC descritos también se pueden evaluar para detectar la actividad de destrucción no específica. La actividad de destrucción no específica se puede determinar, p. ej., mediante un ensayo que emplea dos líneas celulares, una positiva para el antígeno diana y una negativa para el antígeno diana. Preferentemente, las líneas celulares son etiquetadas para diferenciarlas. Por ejemplo, las células IGROV1 (FRA+) etiquetadas con verde Nuclight™ (NLG) y HL-60 (FRA-) etiquetadas con rojo Nuclight™ (NLR) se pueden cocultivar, tratar con un ADC anti-FRA seguido de monitorización de citotoxicidad. La destrucción de células negativas para el antígeno diana cuando se mezclan con células positivas para el antígeno diana indica destrucción no específica, mientras que la destrucción de células negativas para el antígeno diana en ausencia de células positivas para el antígeno diana indica destrucción fuera del objetivo.

[00233] En algunos aspectos, la presente descripción presenta un método para destruir, inhibir o modular el crecimiento de, o interferir con el metabolismo de, una célula o tejido de cáncer por interrupción de tubulina. El método se puede utilizar con cualquier sujeto donde la interrupción de tubulina proporciona un beneficio terapéutico. Los sujetos que se pueden beneficiar de la interrupción de tubulina incluyen, entre otros, los que padecen o tienen riesgo de padecer un cáncer gástrico, cáncer de ovario (p. ej., cáncer de ovario seroso), cáncer de pulmón (p. ej., cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer de mama (p. ej., cáncer de mama triple negativo), cáncer endometrial (p. ej., cáncer endometrial seroso), osteosarcoma, sarcoma de Kaposi, cáncer de células germinales testiculares, leucemia, linfoma (p. ej., enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin), mieloma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de cerebro (p. ej., glioblastoma), cáncer de tiroides, cáncer colorrectal y/o cáncer de piel (p. ej., melanoma), o cualquier metástasis de estos (Dumontet y Jordan (2010) Nat. Rev. Drug Discov. 9:790-803). En diversas modalidades, los ADC descritos se pueden administrar en cualquier célula o tejido que exprese FRA, por ejemplo una célula o tejido de cáncer que exprese FRA. Una modalidad ejemplar incluye un método para inhibir la señalización celular mediada por FRA o un método para destruir una célula. El método se puede utilizar con cualquier célula o tejido que exprese FRA, por ejemplo una célula cancerosa o una lesión metastásica. Los ejemplos no taxativos de cánceres que expresan FRA incluyen cáncer gástrico, cáncer de ovario seroso, cáncer de ovario de células claras, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer colorrectal, cáncer de mama triple negativo, cáncer endometrial, carcinoma endometrial seroso, carcinoide de pulmón y osteosarcoma. Los ejemplos no taxativos de células que expresan FRA incluyen células de carcinoma de

ovario humano IGROV1 y OVCAR3, células de carcinoma de pulmón de células no pequeñas humano NCI-H2110 y células que comprenden un ácido nucleico recombinante que codifica FRA o una parte de este.

[00234]En diversas otras modalidades, los ADC descritos se pueden administrar en cualquier célula o tejido que exprese her2, por ejemplo una célula o tejido de cáncer que exprese her2. Una modalidad ejemplar incluye un método para inhibir la señalización celular mediada por her2 o un método para destruir una célula. El método se puede utilizar con cualquier célula o tejido que exprese her2, por ejemplo una célula cancerosa o una lesión metastásica. Los ejemplos no taxativos de cánceres que expresan her2 incluyen cáncer de pecho, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, carcinoma de células uroteliales, Cáncer de esófago, cáncer de pulmón, cáncer de cuello uterino, cáncer de endometrio y cáncer de ovario (English et ál. (2013) Mol. Diagn. Ther. 17:85-99). Los ejemplos no taxativos de células que expresan her2 incluyen células de carcinoma gástrico humano NCI-N87-luc, células de carcinoma ductal de mama humano ZR75 y BT-474 y células que comprenden un ácido nucleico recombinante que codifica her2 o una parte de este.

[00235]En diversas otras modalidades, los ADC descritos se pueden administrar en cualquier célula o tejido que exprese mesotelina (MSLN), por ejemplo una célula o tejido de cáncer que exprese MSLN. Una modalidad ejemplar incluye un método para inhibir la señalización celular mediada por MSLN o un método para destruir una célula. El método se puede utilizar con cualquier célula o tejido que exprese MSLN, por ejemplo una célula cancerosa o una lesión metastásica. Los ejemplos no taxativos de cánceres que expresan MSLN incluyen mesotelioma, cáncer pancreático (p. ej., adenocarcinoma pancreático), cáncer de ovario y cáncer de pulmón (p. ej., adenocarcinoma de pulmón) (Wang et ál. (2012) PLoS ONE 7:e33214). Los ejemplos no taxativos de células que expresan MSLN incluyen células de carcinoma de ovario humano OVCAR3, células de endometrioide humano HEC-251, células de mesotelioma de células escamosas de pulmón humano H226 y células que comprenden un ácido nucleico recombinante que codifica MSLN o una proteína de estos.

[00236]Los métodos ejemplares incluyen las etapas de contacto de la célula con un ADC, según se describe en la presente, en una cantidad eficaz, es decir, una cantidad suficiente para destruir la célula. El método se puede utilizar en cultivo, p. ej. *in vitro, in vivo, ex vivo* o *in situ.* Por ejemplo, las células que expresan FRA, her2 y/o MSLN (p. ej., células recogidas por biopsia de un tumor o lesión metastásica; células de una línea celular de cáncer establecida; o células recombinantes) se pueden cultivar *in vitro* en medio de cultivo y la etapa de contacto se puede realizar mediante la adición del

ADC al medio de cultivo. El método provocará la destrucción de células que expresan FRA, her2 y/o MSLN, incluso, en particular, células tumorales que expresan FRA, her2 y/o MSLN. Alternativamente, el ADC se puede administrar a un sujeto a través de cualquier vía de administración adecuada (p. ej., intravenosa, subcutánea o contacto directo con un tejido tumoral) para tener un efecto *in vivo*.

[00237] El efecto *in vivo* de una composición terapéutica de ADC descrita se puede evaluar en un modelo animal adecuado. Por ejemplo, se pueden utilizar modelos de cáncer xenogénicos, donde los explantes de cáncer o tejidos injertados pasados se introduzcan en animales con inmunidad comprometida, tales como ratones lampiños o SCID (Klein et ál. (1997) Nature Med. 3:402-8). Se puede predecir la eficacia mediante ensayos que midan la inhibición de la formación del tumor, la regresión del tumor o la metástasis y similares.

[00238] También se pueden utilizar ensayos *in vivo* que evalúan la promoción de apoptosis. En una modalidad, se pueden analizar xenoinjertos de ratones que presentan tumores tratados con la composición terapéutica para detectar la presencia de focos apoptóticos y se pueden comparar con ratones que presentan xenoinjertos de control no tratados. El grado al que se encuentran los focos apoptóticos en los tumores de los ratones tratados proporciona una indicación de la eficacia terapéutica de la composición.

[00239] En la presente además se proporcionan métodos para tratar cáncer. Los ADC descritos en la presente se puede administrar a un mamífero no humano o sujeto humano con fines terapéuticos. Los métodos terapéuticos implican administrar a un mamífero que tiene un tumor una cantidad biológicamente eficaz de un ADC que comprende un agente quimioterapéutico seleccionado (p. ej., eribulina) unido a un anticuerpo de direccionamiento que se une a un antígeno expresado, que es accesible a la unión, o está localizado en una superficie de célula de cáncer. Una modalidad ejemplar es un método para administrar un agente quimioterapéutico a una célula que expresa FRA que comprende conjugar el agente quimioterapéutico con un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un epítopo de FRA y exponer la célula al ADC. Las células tumorales que expresan FRA ejemplares para las cuales se indican los ADC de la presente descripción incluyen células de un cáncer gástrico, un cáncer de ovario seroso, un cáncer de pulmón de células no pequeñas, un cáncer colorrectal, un cáncer de mama (p. ej., un cáncer de mama triple negativo), un carcinoide de pulmón, un osteosarcoma, un cáncer endometrial y un carcinoma endometrial carcinoma con histología serosa.

[00240] Otra modalidad ejemplar es un método para administrar un agente quimioterapéutico a una célula que expresa her2 que comprende conjugar el agente quimioterapéutico con un anticuerpo que se

une inmunoespecíficamente a un epítopo de her2 y exponer la célula al ADC. Las células tumorales que expresan her2 ejemplares para las cuales se indican los ADC de la presente descripción incluyen células de un cáncer de mama, un cáncer gástrico, un cáncer de vejiga, un carcinoma de células uroteliales, un cáncer de esófago, un cáncer de pulmón, un cáncer de cuello uterino, un cáncer de endometrio y un cáncer de ovario.

[00241] Otra modalidad ejemplar es un método para administrar un agente quimioterapéutico a una célula que expresa MSLN que comprende conjugar el agente quimioterapéutico con un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un epítopo de MSLN y exponer la célula al ADC. Las células tumorales que expresan MSLN ejemplares para las cuales se indican los ADC de la presente descripción incluyen células de mesotelioma, un cáncer pancreático (p. ej., un adenocarcinoma pancreático), un cáncer de ovario y un cáncer de pulmón (p. ej., adenocarcinoma de pulmón).

[00242] Otra modalidad ejemplar es un método para tratar un paciente que padece o tiene riesgo de padecer un cáncer que expresa un antígeno diana para el resto de anticuerpo del ADC, por ejemplo FRA, her2 o MSLN que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un ADC de la presente descripción. En algunas modalidades, el paciente no responde o respondo poco al tratamiento con un anticuerpo anti-FRA cuando se administra solo y/o al tratamiento con un resto de fármaco (p. ej., eribulina) cuando se administra solo. En otras modalidades, el paciente no responde o respondo poco al tratamiento con un anticuerpo anti-her2 cuando se administra solo y/o al tratamiento con un resto de fármaco (p. ej., eribulina) cuando se administra solo. En otras modalidades, el paciente no responde o respondo poco al tratamiento con un anticuerpo anti-MSLN cuando se administra solo y/o al tratamiento con un resto de fármaco (p. ej., eribulina) cuando se administra solo. En otras modalidades, el paciente es intolerante al tratamiento con un resto de fármaco (p. ej., eribulina) cuando se administra solo. Por ejemplo, un paciente puede necesitar dosis de eribulina para tratar un cáncer que conduce a toxicidad sistémica, las cuales se superan mediante la administración dirigida a un cáncer que expresa un antígeno diana para el resto de anticuerpo del ADC tal como FRA, her2 o MSLN, reduciendo así la destrucción fuera del objetivo.

[00243] Otra modalidad ejemplar es un método para reducir o inhibir el crecimiento de un tumor que expresa el antígeno diana (p. ej., un tumor que expresa FRA, un tumor que expresa her2 o un tumor que expresa MSLN) que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un ADC. En algunas modalidades, el tratamiento es suficiente para reducir o inhibir el crecimiento del tumor del paciente, reducir la cantidad o tamaño de lesiones metastásicas, reducir la carga tumoral, reducir la carga

tumoral primaria, reducir la invasión, prolongar el tiempo de supervivencia y/o mantener o mejorar la calidad de vida. En algunas modalidades, el tumor es resistente o refractario al tratamiento con un anticuerpo anti-FRA cuando se administra solo y/o al tratamiento con un resto de fármaco (p. ej., eribulina) cuando se administra solo. En otras modalidades, el tumor es resistente o refractario al tratamiento con un anticuerpo anti-her2 cuando se administra solo y/o al tratamiento con un resto de fármaco (p. ej., eribulina) cuando se administra solo. En algunas modalidades, el tumor es resistente o refractario al tratamiento con un anticuerpo anti-MSLN cuando se administra solo y/o al tratamiento con un resto de fármaco (p. ej., eribulina) cuando se administra solo.

[00244] Además, los anticuerpos de la presente descripción se pueden administrar a un mamífero no humano que expresa un antígeno con el cual el ADC es capaz de unirse para fines veterinarios o como un modelo animal de enfermedad humana. Con respecto a lo último, dichos modelos de animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los ADC descritos (p. ej., evaluar las dosificaciones y cursos de tiempo de la administración).

[00245] En la presente además se proporcionan usos terapéuticos de los ADC descritos. Una modalidad ejemplar es el uso de un ADC en el tratamiento de un cáncer que expresa el antígeno diana (p. ej., un cáncer que expresa FRA, un cáncer que expresa her2 o un cáncer que expresa MSLN). También se describen los ADC para utilizar en el tratamiento de un cáncer que expresa el antígeno diana (p. ej., un cáncer que expresa FRA, un cáncer que expresa her2 o un cáncer que expresa MSLN). Los métodos para identificar sujetos que padecen cánceres que expresan FRA, her2 y/o MSLN son conocidos en la técnica y se pueden utilizar para identificar pacientes adecuados para el tratamiento con un ADC descrito.

[00246] Otra modalidad ejemplar es el uso de un ADC en un método para fabricar un medicamento para el tratamiento de un cáncer que expresa el antígeno diana (p. ej., un cáncer que expresa FRA, un cáncer que expresa her2 o un cáncer que expresa MSLN).

[00247] Las composiciones terapéuticas utilizadas en la práctica de los métodos que anteceden pueden formularse en composiciones farmacéuticas que contengan un portador farmacéuticamente adecuado apropiado para el método de administración deseado. Una modalidad ejemplar es una composición farmacéutica que comprende un ADC de la presente descripción y un portador farmacéuticamente aceptable. Los portadores adecuados incluyen cualquier material que, cuando se combina con la composición terapéutica, retiene la función anti-tumoral de la composición terapéutica y que, por lo general, no sea reactivo con respecto al sistema inmunológico del paciente. Los portadores

farmacéuticamente aceptables incluyen cualquiera de los solventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y todos ellos, y similares que son fisiológicamente compatibles. Los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina amortiguada de fosfato, dextrosa, glicerol, etanol, salo de mesilato y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. Los portadores farmacéuticamente aceptables pueden incluir además pequeñas cantidades de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o amortiguadores, que potencian la vida útil o la efectividad del ADC.

[00248] Las formulaciones terapéuticas se pueden solubilizar y administrar a través de cualquier vía capaz de administrar la composición terapéutica al sitio del tumor. Las vías de administración potencialmente efectivas incluyen, entre otros, intravenosa, parenteral, intraperitoneal, intramuscular, intratumoral, intradérmica, intraorgánica, ortotópica y similares. Las preparaciones de proteínas terapéuticas se pueden liofilizar y almacenar como polvos estériles, preferentemente al vacío, y luego reconstituir en agua bacteriostática (que contiene, por ejemplo, conservante de alcohol bencílico) o en agua estéril antes de la inyección. Las formulaciones terapéuticas pueden comprender un ADC o una sal farmacéuticamente aceptable de este, p. ej., una sal mesilato.

[00249] Los ADC descritos en la presente se pueden administrar en una dosificación que oscila entre aproximadamente 0,2 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg a un paciente que lo necesita. En algunas modalidades, el ADC se administra al paciente diariamente, bimensualmente o cualquier otro período intermedio. Las dosificaciones y los protocolos de administración para el tratamiento de cáncer utilizando los métodos anteriores varían con el método y el cáncer diana y, generalmente, dependen de una cantidad de otros factores comprendidos en la técnica.

[00250] Existen diversos sistemas de administración que se pueden utilizar para administrar uno o más ADC de la presente descripción. Los métodos para administrar los ADC incluyen, entre otros, administración parenteral (p. en., intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), administración epidural, administración intratumoral y administración a través de la mucosa (p. ej., vías intranasal y oral). Además, se puede emplear administración pulmonar, p. ej., utilizando un inhalador o nebulizador y la formulación con un agente de formación de aerosol. Véase, p. ej., las composiciones y métodos para la administración pulmonar descritos en las patentes estadounidenses N.º 6.019.968,

5.985.320, 5.985.309, 5.934.272, 5.874.064, 5.855.913, 5.290.540 y 4.880.078; y las publicaciones PCT N.º WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 y WO 99/66903. Los ADC se pueden administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo, mediante infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, rectal e intestinal, etc.). La administración puede ser sistémica o local.

[00251]Las composiciones terapéuticas descritas en la presente pueden ser estériles y estables en condiciones de fabricación y almacenamiento. En algunas modalidades, uno o más de los ADC, o composiciones farmacéuticas, se suministran como un polvo liofilizado esterilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente sellado herméticamente y se pueden reconstituir (p. ej., con agua o salina) a la concentración adecuada para administración a un sujeto. Preferentemente, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos o composiciones farmacéuticas se suministran como un polvo liofilizado estéril seco en un recipiente sellado herméticamente a una dosificación unitaria de al menos 5 mg, al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos 25 mg, al menos 35 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg, al menos 75 mg o al menos 100 mg, o cualquier cantidad intermedia. En algunas modalidades, los ADC liofilizados o composiciones farmacéuticas se almacenan entre 2 ºC y 8 ºC en el recipiente original. En algunas modalidades, uno o más de los ADC o composiciones farmacéuticas descritos en la presente se suministran de forma líquida en un recipiente sellado herméticamente, p. ej., un recipiente que indica la cantidad y concentración del agente. En algunas modalidades, la forma líquida de la composición administrada se suministra en un recipiente sellado herméticamente de al menos 0,25 mg/mL, al menos 0,5 mg/mL, al menos 1 mg/mL, al menos 2,5 mg/mL, al menos 5 mg/mL, al menos 8 mg/mL, al menos 10 mg/mL, al menos 15 mg/mL, al menos 25 mg/mL, al menos 50 mg/mL, al menos 75 mg/mL, o al menos 100 mg/mL ADC. La forma líquida se puede almacenar entre 2 ºC y 8 ºC en el recipiente original.

[00252]En algunas modalidades, los ADC descritos se pueden incorporar en una composición farmacéutica adecuada para la administración parenteral. La solución inyectable puede estar compuesta por una forma de dosis líquida o liofilizada en un vial de pedernal o ámbar, ampolla o jeringa precargada, u otro dispositivo de administración o almacenamiento conocido.

[00253]Las composiciones descritas en la presente pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (p. ej., soluciones inyectables e infundibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo de administración y la

aplicación terapéutica pretendidas.

[00254] En diversas modalidades, el tratamiento implica bolo simple o administración repetida de la preparación de ADC a través de una vía de administración aceptable.

[00255] Se puede evaluar a los pacientes para detectar los niveles de antígeno diana en una muestra determinada (p. ej. los niveles de células que expresan el antígeno diana) para ayudar a determinar el régimen de dosificación más eficaz, etc. Una modalidad ejemplar es un método para determinar si un paciente responde al tratamiento con un ADC de la presente descripción que comprenden proporcionar una muestra biológica del paciente y poner en contacto la muestra biológica con el ADC. Las muestras biológicas ejemplares incluyen tejido o fluido corporal, por ejemplo un exudado inflamatorio, sangre, suero, líquido intestinal, muestra de heces o biopsia de tumores (p. ej., una biopsia de tumor derivada de un paciente que padece o tiene riesgo de padecer un cáncer que expresa el antígeno diana, p. ej., un cáncer que expresa FRA, un cáncer que expresa her2 o un cáncer que expresa MSLN). En algunas modalidades, se puede obtener una muestra (p. ej., un tejido y/o fluido corporal) de un sujeto y se puede utilizar un método inmunológico adecuado para detectar y/o medir la expresión de proteína del antígeno diana (p. ej., FRA, her2 o MSLN). Dichas evaluaciones también se utilizan para monitorizar los propósitos en toda la terapia y son útiles para medir el éxito terapéutico en combinación con la evaluación de otros parámetros.

[00256] En algunas modalidades, la eficacia de un ADC se puede evaluar mediante el contacto de una muestra de tumor de un sujeto con el ADC y evaluando la velocidad o volumen del crecimiento tumoral. En algunas modalidades, cuando se ha determinado que ADC es eficaz, se puede administrar al sujeto.

[00257] Los enfoques terapéuticos anteriores se pueden combinar con cualquiera de una gran variedad de regímenes de terapia quirúrgica, de quimioterapia o de radiación adicionales.

[00258] En la presente también se describen usos de uno o más de los ADC descritos en la fabricación de un medicamento para tratar cáncer, p. ej., de acuerdo con los métodos descritos anteriormente. En algunas modalidades, los ADC descritos en la presente se utilizan para tratar cáncer, p. ej., de acuerdo con los métodos descritos anteriormente.

[00259] En diversas modalidades, los kits para utilizar en el laboratorio y las aplicaciones terapéuticas descritos en la presente se encuentran dentro del alcance de la presente descripción. Esos kits pueden comprender un portador, envase o recipiente que se divide en compartimientos para recibir uno o más recipientes tales como viales, tubos y similares, en cuyo caso cada uno de los recipientes comprende uno de los elementos separados que se utilizarán en un método descrito en la presente, con una etiqueta o

inserto que comprende instrucciones para su uso, por ejemplo un uso descrito en la presente. Los kits pueden comprender un recipiente que comprende un resto de fármaco. La presente descripción también proporciona uno o más de los ADC, o una composición farmacéutica de estos, empaquetados en un recipiente sellado herméticamente, por ejemplo una ampolla o sachet, que indica la cantidad del agente.

[00260]Los kits pueden comprender el recipiente descrito anteriormente y uno o más recipientes diferentes asociados que comprenden materiales deseables de un punto de vista comercial y de usuario, incluso amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas, jeringas; portador, paquete, recipiente, vial y/o etiquetas de tubo que enumera los contenidos y/o instrucciones para su uso, e insertos de paquete con instrucciones para su uso.

[00261]Una etiqueta puede estar presente en o con el recipiente para indicar que la composición se utiliza para una terapia específica o aplicación no terapéutica, por ejemplo una aplicación de pronóstico, profiláctica, de diagnóstico o de laboratorio. Una etiqueta también puede indicar instrucciones para uso *in vivo* o *in vitro*, por ejemplo las descritas en la presente. Las instrucciones y otra información también se pueden incluir en insertos o etiquetas que se incluyen con o en el kit. La etiqueta puede estar en o estar asociada con el recipiente. Una etiqueta puede estar en un recipiente cuando las letras, números u otros caracteres que forman la etiqueta están moldeados o grabados en el propio recipiente. Una etiqueta puede estar asociada con un recipiente cuando está presente dentro de un receptáculo o portador que también sostiene el recipiente, p. ej., un inserto de paquete. La etiqueta puede indicar que la composición se utiliza para diagnosticar o tratar una afección, como un cáncer descrito en la presente.

[00262]Los expertos en la técnica se darán cuenta fácilmente que otras modificaciones y adaptaciones adecuadas de los métodos de la invención que se describen en la presente son evidentes y se pueden realizar mediante el uso de equivalentes adecuados sin apartarse del alcance de la invención o las modalidades que se describen en la presente. Habiendo descrito ahora la invención en detalle, estas se entenderán más claramente mediante referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen únicamente a efectos ilustrativos y no se pretende que sean limitativos.

EJEMPLO 1

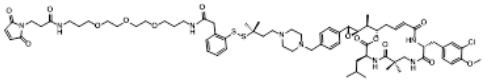
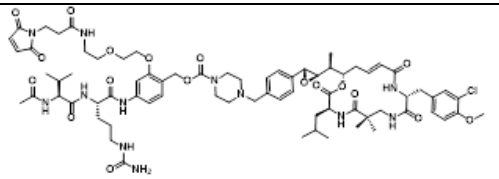
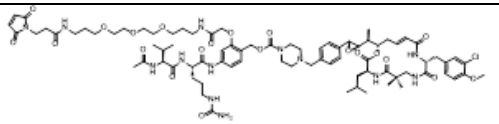
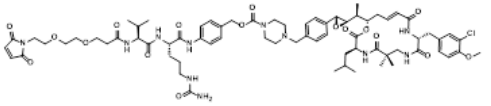
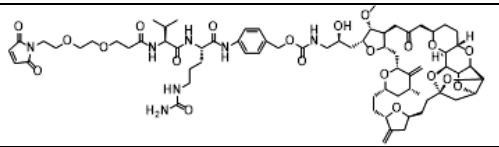
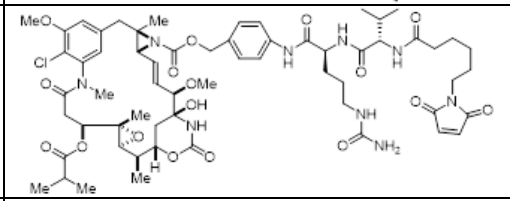
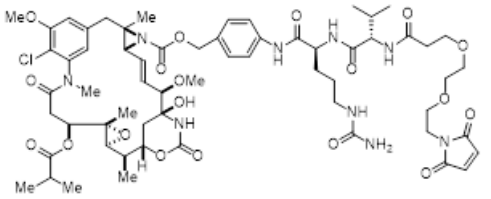
1. Materiales y métodos

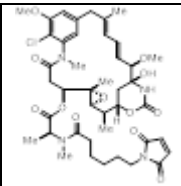
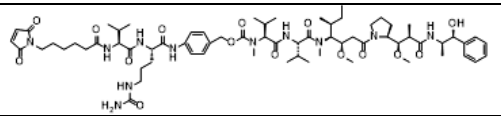
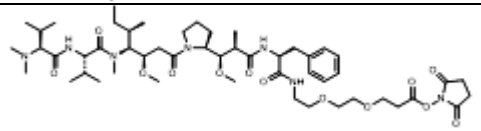
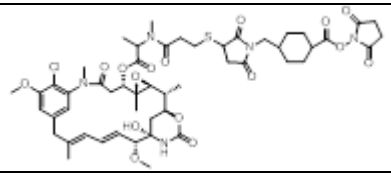
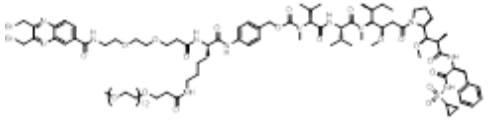
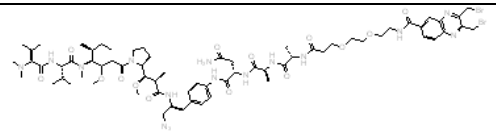
[00263]MORAb-003 utilizado para la preparación de ADC se obtuvo del lote N.º AA0312.

1.1 Citotoxinas

[00264]Las estructuras de las citotoxinas conjugables se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Citotoxinas conjugables

Nombre del compuesto	**Enlazador**	**Citotoxina**	**Escindibi-lidad**	**Estructura**
PEG3-Bz-disulfidil-dimetil-criptoficina	maleimido-PEG3-bencil-disulfidil-dimetilo	criptoficina	sí	
LL2-criptoficina	LL2	criptoficina	sí	
LL3-criptoficina	LL3	criptoficina	sí	
VCP-criptoficina	maleimido-PEG2-Val-Cit-pAB	criptoficina	sí	
VCP-eribulina (ER-001159569)	maleimido-PEG2-Val-Cit-pAB	eribulina	sí	
ER-001161318	maleimido-$(CH_2)_5$-Val-Cit-pAB	ER-001150828 (aziridino-maitanzina-P3)	sí	
ER-001161319	maleimido-PEG2-Val-Cit-pAB	ER-001150828 (aziridino-maitanzina-P3)	sí	

ER-001159200	maleimido-$(CH_2)_5$	maitanzina DM1	No	
M-MMAE	maleimido-$(CH_2)_5$-Val-Cit-pAB	monometil auristatina E	sí	
NHS-PEG2-AuF	NHS-PEG2	auristatina F	no	
M-DM1	SMCC	maitansina DM1	no	
M-0285	PEG-pAB	duostatina 3	sí	Química de enlaces disulfuro reducidos 
M-0115	Asn-Ala	duostatina-5	sí	
M-172	ciclohexilo	duostatina 3	no	Química de unión disulfuro reducida
M-174	ciclohexilo	duostatina 3	no	Química de unión disulfuro reducida
M-158	PEG-pAB	duostatina 10	sí	Química de unión disulfuro reducida
M-0384	PEG-tioéter	duostatina 14	no	Química de unión disulfuro reducida
M-0302	PEG-Asn	duostatina 14	no	Química de unión disulfuro reducida
M-292	PEG-Asn	duostatina 14	sí	Química de unión disulfuro reducida
M-0026	PEG	duostatina 14	sí	Química de unión disulfuro reducida

M-0267	PEG-tioéter	duomicina 7	no	Química de unión disulfuro reducida
M-0272	Asn-Ala	duomicina 7	sí	Química de unión disulfuro reducida
M-0260	PEG-pAB	duomicina 7	sí	Química de unión disulfuro reducida
M-0276	Asn-Ala	duomicina 7	sí	Química de unión disulfuro reducida
M-015-0913	ciclohexilo	duostatina 3	no	Utilización de lisina limitada
M-030-0132	PEG-pAB	duostatina 6	sí	Utilización de lisina limitada
M-0161	ciclohexilo	duostatina 10	no	Utilización de lisina limitada
M-0157	PEG-pAB	duostatina 10	sí	Utilización de lisina limitada
M-027-0381	tioéter	duostatina 14	no	Utilización de lisina limitada
M-0025	PEG	duostatina 14	no	Utilización de lisina limitada
M-0301	PEG-Asn	duostatina 14	no	Utilización de lisina limitada
M-030-0011	PEG-pAB	duostatina 14	sí	Utilización de lisina limitada
M-030-0291	PEG-Asn	duostatina 14	sí	Utilización de lisina limitada
M-0114	PEG-pAB	duostatina-5	sí	Química de enlaces disulfuro reducidos

Abreviaturas: Ala, alanina; Asn, asparagina; Cit, citrulina; NHS, N-hidroxisuccinimida; pAB, p-aminobenciloxicarbonilo; PEG, polietilenglicol; SMCC, 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo; Val, valina; VCP, Val-Cit-pAB.

1.2 Conjugación de anticuerpo-fármaco

1.2.1 Reducción parcial utilizando TCEP

[00265] Se establecieron condiciones de reducción parcial para MORAb-003 mediante la variación de la concentración del agente reductor no tiol tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), concentración de anticuerpo y tiempo de reducción. Se cambió el amortiguador de MORAb-003 por solución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco (DPBS) que contenía 1 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), después se concentró a 10 mg/mL utilizando concentración centrífuga con filtros centrífugos de corte de peso molecular (MWCO) de 10 kD. Se diluyeron los anticuerpos a la concentración adecuada y se les añadió TCEP a la concentración final indicada y se mezcló suavemente durante 1 hora a temperatura ambiente. Se retiró el TCEP mediante desalinización utilizando columnas centrífugas desalinizantes de 5 o 10 mL Zeba™ con DPBS/1mM EDTA como amortiguador (Thermo Fisher, 40 kD MWCO), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se analizaron las muestras para detectar el contenido de tiol libre utilizando el kit de cuantificación fluorométrica de tiol (Abcam), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se realizó análisis SDS-PAGE en condiciones no reductoras para determinar el grado y la ubicación de la ruptura del enlace disulfuro, como se describe en la sección 1.3.3. En algunos casos, se llevaron los MAb desalinizados a 1-2 mg/mL mediante dilución en DPBS y se sometieron a biotinilación para determinar la conjugabilidad y la proporción de fármaco a anticuerpo (DAR). Se añadieron 10 mM de maleimido-PEG2-biotina (Thermo Fisher) en dimetilsulfóxido (DMSO) al anticuerpo (mAb) en una proporción molar de 10:1 y se incubó a temperatura ambiente durante 4 horas con agitación suave. Después de la conjugación, se retiró el compuesto sin reaccionar mediante desalinización utilizando columnas centrífugas desalinizantes Zeba™ (Thermo Fisher). Se analizaron las muestras mediante LC-MS para la determinación de DAR, como se detalla en la sección 1.3.4.

1.2.2 Conjugación de citotoxina

[00266] El anticuerpo reducido parcialmente se llevó a 2,5 mg/mL en 0,5X DPBS, 0,5 mM EDTA y se mezcló bien. Se añadieron codisolventes orgánicos, en caso de utilizarse, y se mezcló bien. Los codisolventes analizados fueron propilenglicol (concentración final del 20 % y 50 %), dimetilsulfóxido (DMSO) (10 %), *N,N*-dimetilformamida (20 %), *N,N*-dimetilacetamida (20 %) y *N,N*-dimetilpropionamida (20 %). Se añadió citotoxina modificada por maleimido (solución madre 6 mM en DMSO) a los anticuerpos en una proporción molar de 1:6 (mAb:compuesto) y se mezcló bien. La conjugación se realizó a temperatura ambiente durante 3,5 horas, con agitación suave. Se eligió 50 % de propilenglicol al 50 % como el modificador orgánico final y se utilizó en todas las reacciones de

conjugación posteriores.

1.2.3 Purificación

[00267] Se purificó el anticuerpo conjugado utilizando columnas desalinizantes 26/10 HiTrap® (GE Healthcare) con cromatografía realizada en cromatografía líquida de proteína rápida (FPLC) (GE Healthcare), para retirar la maleimido-citotoxina sin reaccionar y el propilenglicol. Se formularon MORAb-003 ADC, incluida MORAb-003-mal-VCP-eribulina (MORAb-202), en DPBS (se utilizó amortiguador de formulación como amortiguador de corrida durante la cromatografía FPLC).

1.3 Caracterización biofísica

1.3.1 Ensayo de BCA

[00268] Se añadió reactivo de ácido bicinconínico (BCA) (200 µL) a 25 µL de ADC diluidos en serie o estándar 2 mg/mL de gamma globulina bovina (Thermo Fisher) y se mezclaron bien las muestras. Se incubaron las muestras a 37 ºC durante 20 min. Se leyeron las placas a 595 nm en un lector de placas M5 SpectraMax® (Molecular Devices). Se analizaron los datos utilizando SoftMax® Pro (versión 3.2) con un modelo de ajuste de 4 parámetros.

1.3.2 Análisis SEC-HPLC

[00269] Se analizó la agregación de anticuerpo mediante cromatografía líquida de alto rendimiento y exclusión por tamaño (SEC-HPLC) utilizando un Agilent 1100. Se diluyó el mAb a 1 mg/mL en DPBS. Se inyectó el anticuerpo (20 µL) en una columna protectora SuperSW TSKgel® (4,6 mm x 3,5 cm, tamaño de poro 4 µm, Tosoh Bioscience), seguido de una columna SuperSW3000 TSKgel® (4,6 mm x 30 cm, tamaño de poro 4 µm), se eluyó de la columna con fosfato de sodio 0,1 M que contenía 0,15 M NaCl y NaN_3 al 0,05 %, a pH 7,4, a una velocidad de flujo de 0,3 mL/min durante 20 min. Se analizaron todos los datos utilizando el software Agilent ChemStation. Se calculó la agregación porcentual como $[PA_{agregación}/PA_{total}]*100$, en donde PA = área pico integrada.

1.3.3 Análisis SDS-PAGE

[00270] Se llevaron muestras de proteína (0,1-10 µg) a 1X con amortiguador de muestra de dodecilsulfato de litio (LDS). Para las muestras no reducidas, se realizó incubación a temperatura ambiente durante 10 min antes de la electroforesis. Para las muestras reducidas, se añadió ditiotreitol (DTT) hasta una concentración final de 20 mM y se calentaron las muestras a 95 ºC durante 10 min y se colocaron sobre hielo antes de la electroforesis. Se cargaron las muestras en geles SDS-PAGE Bis-Tris de 10, 12 o 15 pocillos (Thermo Fisher) con 1X MOPS o 1X MES como amortiguador de corrida. Se realizó la electroforesis a 185 V (voltaje constante) durante 1 hora. Se tiñeron los geles con solución de

tinción InstantBlue (Expedeon) y se destiñeron en agua. La documentación se realizó en un sistema de documentación de gel UltraLum utilizando filtros anaranjados de 600 nm.

1.3.4 Análisis UPLC/ESI-MS de la proporción de fármaco a anticuerpo (DAR)

[00271] Se desglicosilaron los ADC utilizando PNGasa F (New England BioLabs). Se añadieron amortiguador G7 (10 µL) y PNGasa F (2 µL) al mAb (90 µL, 1 mg/mL en DPBS). Se incubó la reacción en un microondas Discover (CEM) para 2 ciclos: (1) potencia del microondas 10 W, 37 ºC, 10 min, seguido de una pausa de 5 min; (2) potencia del microondas 2 W, 37 ºC, 10 min. Se redujo una parte de la muestra mediante el añadido de DTT hasta una concentración final de 20 mM, seguido de incubación a 60 ºC durante 3 min. Se analizaron las muestras utilizando una cromatografía líquida de ultrarrendimiento Waters Acquity (UPLC) y espectrómetro de masas Premier de tiempo de vuelo de cuadropolo (Q-Tof). Se inyectaron muestras (0,5-2 µg cada una) a una microcolumna desalinizante MassPrep™ a 65 ºC, se eluyeron de la columna con un equilibrio de 5 min en 95 % de la fase móvil A, un gradiente de 10 min (5-90 % B) y un nuevo equilibrio de 10 min en 95 % de la fase móvil A, a 0,05 mL/min. La fase móvil A fue ácido fórmico al 0,1 % en agua. La fase móvil B fue ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo. El espectrómetro de masas Q-Tof se ejecutó en modo V de ion positivo con detección en el intervalo de 500-4000 m/z. Los parámetros originales fueron los siguientes: voltaje capilar, 2,25 kV (anticuerpo intacto)-2,50 kV (anticuerpo reducido); voltaje de cono de muestreo, 65,0 V (anticuerpo intacto) o 50,0 V (anticuerpo reducido); temperatura original, 100 ºC; temperatura de desolvatación, 250 ºC; flujo de gas de desolvatación, 550 L/h. El pico de proteína se desconvolucionó utilizando la función MaxEnt 1 MassLynx®. Se combinaron las intensidades relativas de cada masa de cadena pesada y ligera sin conjugar, conjugada de forma única y conjugada de forma múltiple para calcular la DAR general utilizando la fórmula:

$$2[[I_{LC+1} + 2(I_{LC+2}) + 3(I_{LC+3}) + \ldots n(I_{LC+n})]/\Sigma I_{LC}tot] + 2[[I_{HC+1} + 2(I_{HC+2}) + 3(I_{HC+3}) + \ldots n(I_{HC+n})]/\Sigma I_{HC}tot]$$

en donde I_{LC+1} es la intensidad de masa de la cadena ligera conjugada con una citotoxina, I_{LC+2} es la intensidad de masa de la cadena ligera conjugada con dos citotoxinas, etc. I_{HC} son las intensidades de las cadenas pesadas conjugadas correspondientes y $\Sigma I_{LC}tot$ y $\Sigma I_{HC}tot$ son las intensidades combinadas de todas las cadenas ligeras y cadenas pesadas sin conjugar y conjugadas, respectivamente.

1.3.5 Análisis de DAR HIC-HPLC

[00272] Además del análisis de DAR por análisis UPLC/ionización por electropulverización (ESI)-MS, también se analizaron la DAR de MORAb-003-vcp-eribulina y la DAR de MORAb-003-0285 utilizando HPLC de interacción hidrófoba (HIC-HPLC). Se inyectaron las muestras en un TSKgel® éter-5 PW, 7,5

mm ID x 7,5 cm, tamaño de poro 10 µM y se eluyeron de la columna con un equilibrio de 3 min en 100 % de la fase móvil A, un gradiente de 15 min (0-100 % B), un reposo de 5 min en 100 % B, un cambio de 1 min a 100 % A y un nuevo equilibrio de 5 min en 100 % de la fase móvil A, a 0,7 mL/min. La fase móvil A fue 25 mM de fosfato de sodio, sulfato de amonio 1,5 M, pH 7,0. La fase móvil B fue 25 mM de fosfato de sodio, isopropanol al 25 %, pH 7,0. Se realizó la detección a 280 nm (referencia 320 nm). Se determinó DAR mediante la fórmula:

$[AUC_{+1} + 2(AUC_{+2}) + 3(AUC_{+3}) + \ldots n(AUC_{+n})]/\Sigma AUC_{tot}]$

en donde AUC_{+1} es el área bajo la curva para el pico de mAb que corresponde a ADC conjugado con una citotoxina, AUC_{+2} es el área bajo la curva para el pico de mAb que corresponde a ADC conjugado con dos citotoxinas, etc. ΣAUC_{tot} es el área combinada bajo la curva para todos los picos.

1.4 Análisis de citotoxicidad

1.4.1 Ensayo de cristal violeta

[00273] Se subcultivaron y se sembraron células IGROV1 (FR^{hi}) y SJSA-1 (FR^{neg}) a 10.000 células/pocillo en medio de crecimiento completo en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos, se incubaron a 37 ºC, CO_2 al 5 % durante la noche (16 horas). Típicamente, se diluyeron en serie los reactivos de prueba 1:4 en placas de dilución de pocillo profundo de 2 mL, partiendo de 1 µM (10 diluciones en total). Se añadieron 100 µL de muestras diluidas a las placas de células (concentración de partida de las muestras de prueba a 500 nM). Se incubaron las placas a 37 ºC, CO_2 al 5 % durante otras 48 horas. Se desechó el medio, se lavaron las placas una vez con 200 µL de DPBS, se tiñeron con 50 µL de solución de cristal violeta al 0,2 % a temperatura ambiente durante 15 min y después se lavaron bien con agua del grifo. Se secaron al aire las placas y se disolvió cristal violeta con 200 µL de solución de SDS al 1 %. Se leyeron las placas a 570 nm. Se analizaron los datos utilizando GraphPad Prism 6. Se realizaron los ensayos utilizando una densidad de siembra de 1.000 células por pocillo y la exposición al compuesto fue durante un total de 5 días. Cuando se deseaba una exposición más breve, se retiró el medio que contenía los agentes citotóxicos después de 4 horas y se reemplazó por medio de crecimiento nuevo antes de la incubación de 5 días. Para OVCAR3, CaOV3 y NCI-H2110, se sembraron células a 3.000 células/pocillo y se incubaron durante 5 días con ADC. Para los experimentos de competencia, se preincubaron ADC titulados con 2 µM (final) de MORAb-003 sin conjugar antes de la incubación con células.

1.4.2 Ensayo de destrucción no específica

[00274] El día antes del inicio del estudio, se sembraron células IGROV1 Nuclight™ Green (NLG) a

5.000 células/pocillo en placas de fondo redondo de 96 pocillos, seguido de centrifugación a 1.000 rpm durante 3 min a temperatura ambiente para garantizar la formación de un sedimento celular. Se colocó la placa en el recipiente de un Incucyte Zoom® (EssenBio science) y se incubó a 37 ºC/CO_2 al 5 % durante la noche. Se configuró el programa para recoger imágenes del crecimiento celular y para determinar las cantidades totales de células nucleares teñidas de verde y células nucleares teñidas de rojo, así como la confluencia de fase de las células cada dos horas. El día del experimento, se diluyó ADC de MORAb-003 o fármaco libre en medio RPMI completo y se diluyó en serie, partiendo de 400 nM. Se añadieron 50 µL de solución de citotoxina a las células NLG-IGROV1 y se incubaron durante 30 min. Durante el período de incubación, se diluyeron células HL-60 (FR^{neg}) Nuclight™ Red (NLR) a $2x10^5$, $1x10^5$ o $5x10^4$ célula/mL con medio nuevo. 50 µL de la suspensión celular NLR-HL60 o medio solo se añadió a los pocillos de NLG-IGROV1, seguido de centrifugación a 1.000 rpm durante 3 min a temperatura ambiente para garantizar la nueva formación del sedimento celular. Se colocó la placa nuevamente en el recipiente de Incucyte Zoom (EssenBio science) y se incubó a 37 ºC/CO_2 al 5 % durante hasta 5 días. El crecimiento celular relativo de NLG-IGROV1 se determinó mediante comparación con muestras sin añadido de ADC o fármaco libre solo utilizando los conteos de células verdes. El crecimiento celular relativo de HL60 se realizó de forma similar, con la diferencia de que se determinó el conteo de glóbulos rojos. La determinación de los valores de IC_{50} para NLG-IGROV1 y NLR-HL-60 se determinó utilizando Prism (GraphPad).

1.4.3 Ensayo de estabilidad sérica

[00275]Se mezclaron bien 20 µL de ADC de MORAb-003 con 80 µL de DPBS, suero humano agrupado normal (Bioreclamation, lote BRH552911) o suero de ratón agrupado normal (Bioreclamation, lote MSE152591) y se incubó a 37 ºC durante 0, 4, 24 y 48 horas. Después de la incubación, se congelaron las muestras y se almacenaron a -20 ºC hasta su evaluación en ensayos de citotoxicidad y unión. Para los análisis de citotoxicidad, se evaluaron las muestras en células IGROV1 y SJSA-1, como se detalla en la sección 1.4.1. Para la evaluación de unión, se evaluaron las muestras utilizando un ensayo MSD ECL basado en solución. Se incubaron las muestras con receptor de folato alfa biotinilado y anti-MORAb-003 sulfoetiquetado antes de la captura en una placa de estreptavidina y se detectaron utilizando electroquimioluminiscencia con un generador de imágenes MSD Sector 2400.

2. Resultados

2.1 Preparación de ADC de MORAb-003

[00276]Con el fin de seleccionar la mejor combinación de enlazador y citotoxina para conjugar con

MORAb-003, se prepararon ADC utilizando tres metodologías. De acuerdo con la estrategia de conjugación que se muestra en la figura 1, se generaron cisteínas desapareadas a través de la reducción parcial con equivalentes molares limitados del agente reductor no tiol TCEP. Esta estrategia reduce preferentemente los enlaces disulfuro entre cadenas que unen la cadena ligera y la cadena pesada (un par por apareamiento H-L) y las dos cadenas pesadas en la región bisagra (dos pares por apareamiento H-H en el caso de IgG1 humana), dejando intactos los enlaces disulfuro entre cadenas.

[00277] La segunda estrategia de conjugación para preparar ADC de MORAb-003 utilizó química de enlaces disulfuro reducidos. La química de enlaces disulfuro reducidos enlaza nuevamente los tioles libres de los residuos de cisteína liberados durante el proceso de reducción parcial, simulando la función del enlace disulfuro y reteniendo así la estabilidad y la función del ADC.

[00278] La tercera estrategia de conjugación para preparar ADC de MORAb-003 empleó utilización de lisina limitada. La utilización de lisina limitada produce la conjugación de una cantidad muy limitada de las 70+ lisinas expuestas a disolvente calculadas disponibles en una molécula de IgG humana típica, y puede producir potencialmente mezclas de producto ADC con menor homogeneidad con respecto a las estrategias que comprenden la modificación de cisteínas.

2.1.1 Preparación de VCP-eribulina para los ADC de MORAb-003

[00279] Se disolvió eribulina (1) (10 mg, 14 µmol) (figura 2) en *N,N*-dimetilformamida (DMF) (1 mL) y se mezcló bien. Se añadió *N,N*-diisopropiletilamina (base de Hunig o *i*Pr_2NEt) (3,6 µL, 21 µmol) y Fmoc-Val-Cit-*para*-aminobencil-*para*-nitrofenol (Fmoc-VCP-PNP) (2) (16 mg, 21 µmol, Concortis Biosystems, N.º de cat. VC1003). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 4-16 horas, se monitorizó utilizando un kit de prueba de ninhidrina (Anaspec, N.º de cat. 25241) hasta que se completó la reacción. Se añadió dietilamina (Et_2NH) (0,014 mL, 0,14 mmol) a la mezcla de reacción, se agitó durante 2 horas a 18-25 ºC para retirar el grupo protector Fmoc. Se monitorizó la reacción utilizando un kit de prueba de ninhidrina. Luego de finalizar, se evaporó el disolvente al vacío para dar VCP-eribulina bruta (**3**) (16 mg), se purificó utilizando una columna ZOBAX SB-C18 (tamaño de poro 5 µm, 9,4 x 150 mm) en un sistema HPLC e2695 Waters Alliance en la fase móvil de H_2O-CH_3CN que contenía ácido fórmico al 0,1 %, a través de un gradiente de 15-70 % B. Se disolvió VCP-eribulina (**3**) (16 mg) en DMF (1 mL). Se añadieron base de Hunig (7,2 µL, 41 µmol) y maleimido-PEG_2-NHS (**4**) (9,7 mg, 27 µmol). Se agitó la mezcla de reacción a 18-25 ºC durante 3 horas. Se purificó la mezcla de reacción mediante HPLC (H_2O-CH_3CN) que contenía ácido fórmico al 0,1 %) a través de un gradiente de 15-70 % B. Se retiró el disolvente mediante liofilización para dar mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-p-

aminobenciloxicarbonilo (pAB)-eribulina (mal-$(PEG)_2$- (VCP-eribulina) (**5**).

2.1.2 Optimización de las condiciones de reducción

[00280]Se prepararon ADC de MORAb-003 mediante la generación de cisteínas desapareadas mediante la reducción parcial con equivalentes molares limitados del agente reductor no tiol tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP). Se realizó una investigación inicial sobre MORAb-003, mediante la cual se variaron la concentración de anticuerpo, la concentración de TCEP y el tiempo de incubación con el objetivo de generar un promedio de 4 sitios conjugables por molécula de anticuerpo. La cantidad de sitios de tiol libre se determinó utilizando un ensayo de cuantificación de tiol fluorométrico. Los resultados de este análisis se muestran en la tabla 12. El grado de la ruptura del enlace H-H y H-L después de una incubación de 10 min, 30 min, 60 min o 120 min también se analizó por SDS-PAGE (figura 3). Para este análisis, se cargaron muestras no reducidas y reducidas en un gel SDS-PAGE y se realizó electroforesis a 185 V durante 1 hora. En la figura 3, el carril M corresponde al estándar proteico. El carril 1 corresponde a MORAb-003 no tratado, no reducido. El carril 2 corresponde a MORAb-003 (5,3 mg/mL) reducido en 70,6 µM TCEP. El carril 3 corresponde a MORAb-003 (5,3 mg/mL reducido) en 141,2 µM TCEP. El carril 4 corresponde a MORAb-003 (1,5 mg/mL) reducido en 20 µM TCEP. El carril 5 corresponde a MORAb-003 (1,5 mg/mL) reducido en 40 µM TCEP. Las identidades de cada banda se indican en el gel derecho inferior. **"**H**"** indica cadena pesada, mientras que **"**L**"** indica cadena ligera.

Tabla 12. Optimización de las condiciones de reducción de MORAb-003

		10 min		**30min**		**60min**		**120min**	
Concentración de MORAb-003 µM (mg/ml)	**Concentración de TCEP µM**	**Tiol libre µM**	**Enlaces disulfuro reducidos por MAb**	**Tiol libre µM**	**Enlaces disulfuro reducidos por MAb**	**Tiol libre µM**	**Enlaces disulfuro reducidos por MAb**	**Tiol libre µM**	**Enlaces disulfuro reducidos por MAb**
35,3 (5,3)	**70,6**	**215**	**3,0**	**247,5**	**3,5**	**297,6**	**4,2**	**266,8**	**3,8**
35,3 (5,3)	**141,2**	**339**	**4,8**	**372,8**	**5,3**	**384,2**	**5,4**	**479,8**	**6,8**
10 (1,5)	**20**	**13,3**	**0,7**	**14,7**	**0,7**	**15,2**	**0,8**	**14,6**	**0,7**
10 (1,5)	**40**	**21,8**	**1,1**	**25,6**	**1,3**	**26,9**	**1,3**	**27,4**	**1,4**

[00281]El análisis de SDS-PAGE y el contenido de tiol sugirió que una incubación de 60 min de 5,3 mg/mL mAb a una proporción molar de 4 veces de TCEP a mAb proporcionó un punto de partida

razonable, ya que una reducción limitada de los disulfuros intramoleculares parecía estar presente (según lo determinado por el contenido de tiol libre) y quedó muy poco mAb sin reducir restante (el mAb sin reducir actuaría como un inhibidor competitivo en estudios *in vitro* e *in vivo* utilizando ADC preparados). Se realizaron otros estudios con MORAb-003 a concentraciones iniciales de 5,0 mg/mL para confirmar esta proporción molar optimizada de TCEP a mAb utilizando análisis SDS-PAGE (figura 4). En la figura 4, el carril 1 corresponde al estándar proteico. El carril 2 corresponde a MORAb-003 no tratado, no reducido. El carril 3 corresponde a MORAb-003 tratado en una proporción de MORAb-003:TCEP de 1:1. El carril 4 corresponde a MORAb-003 tratado en una proporción de MORAb-003:TCEP de 1:2. El carril 5 corresponde a MORAb-003 tratado en una proporción de MORAb-003:TCEP de 1:3. El carril 6 corresponde a MORAb-003 tratado en una proporción de MORAb-003:TCEP de 1:4. También se realizó conjugación utilizando maleimido-PEG2-biotina después de la reducción y eliminación de TCEP, con el fin de simular la conjugación de citotoxina para la preparación de ADC. Se realizó un análisis de DAR utilizando LC-MS. Los resultados de estos estudios se proporcionan en la tabla 13.

Tabla 13. Optimización de las condiciones de reducción de MORAb-003 – niveles de conjugación con maleimido-PEG2-biotina

TCEP		**MORAb-003**		
TCEP:mAb	TCEP (µM)	LC	HC	DAR
1	33,3	0,29	0,34	1,26
2	66,7	0,48	0,83	2,62
3	100	0,63	1,21	3,68
4	133,2	0,73	1,70	4,86

LC, nivel de biotina de cadena ligera; HC, nivel de biotina de cadena pesada; DAR, biotina por mAb [DAR = 2(LC) + 2(HC)].

[00282]Después de la conjugación de biotina, los análisis de tiol libre indicaron que no había tiol libre presente en la MORAb-003-biotina. Esto indicó que, después de la reducción de los enlaces disulfuro, la conjugación se produjo, típicamente, en ambos tioles generados y que cualquier disulfuro reducido no conjugado sufrió reoxidación para reformar los enlaces disulfuro. Las condiciones finales elegidas para

la reducción para la generación de ADC fueron concentración de anticuerpo de 5,0 mg/mL, concentración de TCEP de 110 µM y tiempo de incubación de 60 min. Esto produce un mAb con una DAR de 4 después de la conjugación.

2.1.3 Optimización de la conjugación de ADC

[00283]Como la primera citotoxina utilizada para la preparación de ADC era criptoficina, que es un compuesto hidrófobo, se realizaron experimentos de optimización de conjugación iniciales con un anticuerpo de mesotelina antihumano **"**sustituto**"** que tenía dos cisteínas desapareadas disponibles para la conjugación (una por cadena ligera) en ubicaciones específicas. Esto facilita ampliamente el análisis de la eficacia de la conjugación por espectrometría de masas, ya que solo se debe analizar la cadena ligera. Se realizó la titulación del propilenglicol durante la conjugación de maleimido-LL3-criptoficina con el anticuerpo sustituto, seguida de análisis de la eficacia de la conjugación de la cadena ligera por LC-MS (tabla 14).

Tabla 14. Optimización de la concentración de propilenglicol en la reacción de conjugación

Propilenglicol (%)	**LC de Ab conjugado (%)**
0	8 %
20	48 %
50	100 %

Masas LC: sin conjugar, 23536 Da; conjugado, 24367 Da.

[00284]50 % de propilenglicol provocó la ocupación completa de los sitios disponibles y se eligió como la concentración final para utilizar. No se observó pérdida de la unión de los mAb después de la conjugación (no se muestran los datos), lo que indica que el propilenglicol no presentó efectos perjudiciales para el anticuerpo. Por ende, las condiciones de reacción de conjugación finales elegidas fueron 2,5 mg/mL mAb final, proporción molar 6:1 de maleimido-enlazador-citotoxina:mAb en 0,5X DPBS (concentración final después del añadido de propilenglicol), EDTA 0,5 mM, propilenglicol al 50 %, pH 7,2 durante 3,5-4 horas a temperatura ambiente. En estas reacciones, el propilenglicol se añade antes del añadido de maleimido-enlazador-citotoxina.

2.1.4 Preparación de ADC y caracterización biofísica

[00285] Se utilizaron las condiciones de reducción y conjugación establecidas, descritas en la sección 2.1.2, para preparar los primeros 10 ADC de MORAb-003 enumerados en la tabla 15. Los ADC restantes se prepararon ya sea mediante enlaces disulfuro reducidos o utilización de lisina limitada, con las excepciones de M-MMAE y M-DM1. M-MMAE y M-DM1 se prepararon mediante Concortis Biosystems, Inc., y se recibieron en forma conjugada.

[00286] La química de enlaces disulfuro reducidos enlaza los tioles libres producidos durante el proceso de reducción parcial, proporcionando una citotoxina por disulfuro reducido. En teoría, un anticuerpo de DAR = 4 tendría un nuevo enlace de los disulfuros H-L y bisagra, lo que proporciona un ADC con mayor estabilidad y homogeneidad sobre los enfoques de conjugación tradicionales. La utilización de lisina limitada produce la conjugación de una cantidad muy limitada de las 70+ lisinas expuestas a disolvente calculadas disponibles en una molécula de IgG humana típica. Los conjugados de MORAb-003 preparados utilizando este método produjeron una DAR de 2,0, lo que sugiere que se utilizó una lisina única por par H-L.

[00287] Se purificaron todos los ADC mediante cromatografía desalinizante HiPrep 26/10 y se formularon en DPBS. Se realizó el análisis DAR a todos los ADC preparados por LC-MS y se determinaron los niveles de agregación por SEC-HPLC. Los resultados de estas DAR y los análisis de agregación se enumeran en la tabla 15 junto al ADC respectivo.

Tabla 15. Análisis biofísicos de ADC de MORAb-003

	Nombre del compuesto	**DAR**	**Agregación (%)**
1	PEG3-Bz-disulfidil-dimetil-criptoficina	3,7 - 3,9	29
2	LL2-criptoficina	3,2	18 - 36
3	LL3-criptoficina	3,2 - 3,7	22 - 36
4	VCP-criptoficina	3,4	50
5	VCP-eribulina	3,6	0 - 2,6
6	ER-001161318	3,5	3,2
7	ER-001161319	3,5	3,1
8	ER-001159200	2,8	
9	M-MMAE	4,0	2
10	NHS-PEG2-AuF	5,0	
11	M-DM1	3,6	1,8

12	M-0285	4,0	1,2
13	M-0115	4,0	0,4
14	M-172	3,1	3,6
15	M-174	2,8	4,4
16	M-158	4,5	3,8
17	M-0384	4,2	4,2
18	M-0302	4,3	3,3
19	M-292	4,0	4,5
20	M-0026	4,2	3,3
21	M-0267	4,0	2,9
22	M-0272	3,3	1,5
23	M-0260	3,2	1
24	M-0276	4,6	6,2
25	M-015-0913	2,0	<1
26	M-030-0132	2,0	<1
27	M-0161	2,1	2,4
28	M-0157	2,0	<1
29	M-027-0381	2,0	<1
30	M-0025	2,0	1,7
31	M-0301	2,0	1,4
32	M-030-0011	2,0	<1
33	M-030-0291	2,0	<1
34	M-0255	3,6	5,9
35	M-0114	4,0	3,9

[00288]Los valores de DAR para todos los ADC se encontraron en el intervalo predeterminado (DAR entre 3 y 4). Los niveles de agregado para los ADC basados en criptoficina fueron significativamente mayores que lo deseado (>10 %), mientras que las maleimido-enlazador-citotoxinas basadas en eribulina (VCP-eribulina) y basadas en maitansina (ER-001161318, ER-001161319 y M-MMAE) demostraron niveles de agregado aceptables. Se realizó una investigación sobre otros codisolventes orgánicos sobre las reacciones de conjugación con MORAb-003 utilizando VCP-criptoficina. Los codisolventes

evaluados fueron DMSO (10 %), *N,N*-dimetilformamida (20 %), *N,N*-dimetilacetamida (20 %) y *N,N*-dimetilpropionamida (20 %). Los niveles de agregado después de la conjugación utilizando estos codisolventes fueron todos iguales a, o mayores que, propilenglicol al 50 %.

[00289]Se realizó un análisis SDS-PAGE no reductor en un subgrupo de los ADC (figura 5). Como se determinó que DAR para todos estos ADC era 4, se pensó que estos ADC deberían migrar como IgG intacto de ~ 160 kD, ya que ambos H-L y ambos disulfuros bisagra se deberían enlazar nuevamente. Este subgrupo de ADC incluía M-MMAE (carril 2), M-DM1 (carril 3), M-0026 (carril 4), M-0260 (carril 5), M-0267 (carril 6), M-0272 (carril 7), M-0285 (carril 8), M-292 (carril 9), M-027-0381 (carril 10) y M-0384 (carril 11) (figura 5). En la figura 5, el carril 1 corresponde al estándar proteico.

[00290]Resulta evidente a partir de este análisis que, para los ADC de química de enlaces disulfuro reducidos (carriles 4-9, 11), hay especies monovalentes H-L significativas (80 kD), además del ADC intacto. Esto indica que hay formación de enlaces disulfuro bisagra intracatenarios significativa, además de la formación de enlaces bisagra intercatenarios. El análisis SEC-HPLC indica que los ADC migran como una IgG intacta única, lo que indica que para los ADC con formación de enlaces H-H intracatenarios, las cadenas pesadas están asociadas de forma no covalente en el ADC final.

2.2 Análisis de potencia *in vitro* de ADC de MORAb-003

2.2.1 Citotoxicidad sobre células IGROV1 y SJSA-1

[00291]Se evaluó la potencia *in vitro* de los ADC preparados utilizando un ensayo de cristal violeta como se describe en la sección 1.4.1.

[00292]La detección inicial de todos los ADC de MORAb-003 se realizó sobre células IGROV1 ($FR^{hi(+++)}$) y SJSA-1 ($FR^{neg(-)}$). Las células IGROV1 son de origen de carcinoma epitelial de ovario humano y expresan niveles altos de receptor de folato alfa (FR), el antígeno diana de MORAb-003. Las células SJSA-1 son una línea celular de tumor de osteosarcoma humano que es negativa para el receptor de folato alfa. La detección de ADC también se realizó en células de CaOV3 (carcinoma de ovario humano, $FR^{med(++)}$), NCI-H2110 (carcinoma de pulmón de células no pequeñas humano, $FR^{med(++)}$) y/u OVCAR3 (carcinoma de ovario humano, $FR^{med(++)}$). Los resultados de esta detección se proporcionan en la tabla 16.

Tabla 16. Detección de citotoxicidad (IC_{50}) de ADC de MORAb-003 sobre diversas líneas celulares de tumores

Nombre del compuesto	IGROV1	SJSA-1	CaOV3	NCI-H2110	OVCAR3
PEG3-Bz-disulfidil-dimetil-criptoficina	0,067	0,41			

LL2-criptoficina	0,023	4,7	0,33		
LL3-criptoficina	0,086	12,7	0,19		0,094
VCP-criptoficina	0,03	~100	0,02		
VCP-eribulina	0,054	>100	3,7	0,73	0,16
ER-001161318	0,26	>100	3,1		
ER-001161319	0,49	>100	11,3		
ER-001159200	6,5	>100	9,2		
M-MMAE	0,2	253			
NHS-PEG2-AuF	0,2	>500			
M-DM1	55	132			
M-0285	0,3	>100		14	8,8
M-0115	0,54	>100			
M-172	>500	>500			
M-174	>500	>500			
M-158	>500	>500			
M-0384	2,25	2,45			
M-0302	330	>500			
M-292	1,7	>500			
M-0026	1,38	540			
M-0267	0,029	0,028			
M-0272	0,252	1,02			
M-0260	0,383	0,036			
M-0276	0,43	30			
M-015-0913	>500	>500			
M-030-0132	>500	17,3			
M-0161	>500	>500			
M-0157	>500	>500			
M-027-0381	14,5	28			
M-0025	>500	>500			
M-0301	>500	>500			

M-030-0011	61,6	>500			
M-030-0291	>500	105			
M-0255	0,12	0,46			
M-0114	144	>100			

Todos los valores son IC_{50} en nM y son valores promedio de experimentos repetidos, si se realizaron.

[00293]ADC de VCP-eribulina fue potente (54 pM) sobre las células IGROV1 y presentó destrucción baja sobre las células SJSA-1. Para estas líneas celulares, el ADC de VCP-eribulina demostró mayor potencia y especificidad con respecto a los ADC con valores de DAR equivalentes, como M-MMAE y M-DM1. ADC de VCP-eribulina también demostró citotoxicidad potente sobre líneas celulares de tumores que expresan FR de origen de ovario (CaOV3 y OVCAR3) y carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NC-H2110) adicionales.

[00294]Los ADC VCP-eribulina, LL2-criptoficina, LL3-criptoficina, VCP-criptoficina, ER-001161318, ER-001161319 y ER-001159200 presentaron citotoxicidad específica (> 2-log de especificidad) en células CaOV3 ($FR^{med(++)}$). Algunos de estos ADC presentaron potencia sub-nanomolar. Los conjugados de criptoficina también demostraron niveles altos de potencia (23 pM – 86 pM) en células IGROV1, pero, con la excepción de VCP-criptoficina, también demostraron citotoxicidad medible sobre las células SJSA-1. Los conjugados de maitansina escindibles ER-001161318 y ER-001161319 presentaron potencia intermedia sobre las células IGROV1 (0,26 nM y 0,49 nM) y destrucción fuera del objetivo baja de las células SJSA-1.

[00295]Todos los conjugados de utilización de lisina limitada demostraron especificidad nula y no se continuaron evaluando. Los conjugados escindibles que utilizan tecnología de enlaces disulfuro reducidos de duostatina-3 (M-0285), duostatina-5 (M-0115) y duostatina-14 (M-292 y M-0026) demostraron citotoxicidad específica en la línea celular IGROV1, con citotoxicidad baja en la línea celular SJSA-1. Los conjugados de duostatina-3 y duostatina-5, derivados de auristatina, fueron ligeramente mayores en potencia que los conjugados de duostatina-14, que es un derivado de maitansina. Las potencias y especificidades fueron comparables con el conjugado de M-MMAE de control, que emplea un enlazador Val-Cit-pAB (VCP) unido al monometilo E. Los conjugados de química de disulfuro reducida no escindibles o bien carecían de potencia o especificidad suficiente y no se analizaron adicionalmente.

2.2.2 Citotoxicidad sobre la línea celular de cáncer de ovario CaOV3 que expresa el receptor de folato humano

[00296]También se determinó la potencia de ADC de MORAb-003 seleccionados sobre las líneas celulares de tumor de ovario humano OVCAR3 y CaOV3, así como la línea celular de NSCLC humana NCI-H2110 (tabla 16). Para la línea celular de ovario humano CaOV3, los conjugados de criptoficina demostraron una potencia más alta medible que el conjugado de VCP-eribulina, a diferencia de lo observado en las células IGROV1. Esto se puede deber al menor nivel de expresión del receptor de folato alfa en las células CaOV3 en comparación con IGROV1 o la mayor potencia de la criptoficina sobre estas células, en comparación con la eribulina. Los conjugados basados en maitansina ER-001161318, ER-001161319 y ER-001159200 todos tenían potencias similares, o inferiores, a la VCP-eribulina.

2.3 Destrucción no específica de VCP-eribulina, ER-001161318 y M-0285

[00297]Con el fin de evaluar la actividad de destrucción no específica, se configuró un ensayo utilizando dos líneas celulares marcadas. En este ensayo, las células IGROV1 (FR^{hi}) marcadas con Nuclight™ Green y HL-60 (FR^{neg}) marcadas con Nuclight™ Red se cocultivaron en diferentes proporciones de cantidades de células y se trataron con titulaciones de ADC de MORAb-003 VCP-eribulina, ER-001161318 o M-0285. VCP-eribulina es un ADC basado en eribulina que comprende un enlazador escindible maleimido-PEG_2-Val-Cit-pAB, mientras que ER-001161318 es un ADC basado en maitansina que comprende un enlazador escindible maleimido-$(CH_2)_5$-Val-Cit-pAB y M-0285 es un ADC basado en duostatina que comprende un enlazador escindible PEG-pAB. Se monitorizó la citotoxicidad mediante un generador de imágenes de células Incucyte Zoom®. Los resultados de este ensayo de citotoxicidad no específica se muestran en la tabla 17 y las figuras 6A-C.

Tabla 17. Actividad de destrucción no específica de VCP-eribulina sobre el cocultivo de líneas celulares positivas de FR y negativas de FR

EC_{50} (nM)			
IGROV-1	HL-60	HL-60 (cocultivo con IGROV-1)	HL-60 (eribulina)
0,0005972	39,74	0,2399	0,1702

[00298]Cuando se cultivaron células HL-60 (FR^{neg}) en una proporción de 2:1 a células IGROV1 (FR^{hi}), el tratamiento con MORAb003-VCP-eribulina produjo un aumento de 2-log en la destrucción de las células HL-60, en comparación con las células HL-60 solas (tabla 17 y figura 6A). Estos datos sugieren que las células negativas de diana del receptor de folato alfa (FR) son destruidas de forma más eficaz por

MORAb003-VCP-eribulina cuando se cocultivan con células positivas de diana FR, lo que se denomina en la presente destrucción no específica. La destrucción no específica se distingue de la destrucción fuera del objetivo, que se define como la destrucción de células negativas de diana solas, sin y de forma independiente del cocultivo con células positivas de diana. El aumento observado en la destrucción no específica también fue casi idéntico al aumento observado después del tratamiento de las células HL-60 con eribulina libre, lo que indica un posible mecanismo para el efecto no específico. Sin pretender restringirse a una teoría particular, MORAb003-VCP-eribulina se puede escindir en las células IGROV1 positivas de FR o cerca de estas, que también sufren apoptosis y liberan eribulina libre al cultivo. La citotoxina liberada puede destruir las células HL-60 negativas de FR.

[00299] En cambio, solo se observó un cambio leve para MORAb003-ER-001161318 (figura 6B) y no se observó cambio con MORAb003-0285 (figura 6C). Cuando la proporción HL-60:IGROV1 bajó de 2:1 a 1:2, se observó la destrucción medible de las células HL-60, con respecto a las células HL-60 solas, para MORAb003-ER-001161318, mientras que el efecto no específico permaneció bajo, aunque detectable, para MORAb003-0285. Estos datos sugieren que, en términos de destrucción no específica, los ADC de MORAb-003 evaluados se pueden calificar como VCP-eribulina > ER-001161318 > M-0285.

2.4 Análisis de estabilidad sérica

[00300] Dada la semivida en circulación prolongada *in vivo* de los ADC y el potencial de toxicidad si las citotoxinas se liberan en circulación, los ADC deben demostrar estabilidad en suero. Se preincubaron los ADC de MORAb-003 VCP-eribulina, ER-001161319 y M-0285 en suero humano o de ratón a 37 ºC durante hasta 48 horas, después se evaluaron en un ensayo de citotoxicidad con células IGROV1 y SJSA-1. ER-001161319 es ADC basado en maitansina que comprende el mismo enlazador escindible que VCP-eribulina, maleimido-PEG_2-Val-Cit-pAB. Se incluyeron controles de PBS y suero para corregir cualquier efecto del suero sobre el rendimiento del ensayo. Los resultados de este estudio se muestran en la tabla 18.

Tabla 18. Estabilidad sérica de ADC de MORAb-003 seleccionados

	Ensayo de citotoxicidad basado en células, EC_{50}, nM								
	MORAb003-VCP eribulina			**MORAb003-ER001161319**			**MORAb003-0285**		
Tiempo	PBS	Suero human	Suero de	PBS	Suero human	Suero de	PBS	Suero human	Suero de

			o	ratón		o	ratón		o	ratón
IGROV 1	0 h-PBS	0,021	0,013	0,02	0,28	0,15	0,2	0,074	0,089	ND
	0 h-Suero	0,022	0,014	0,01	0,15	0,15	0,2	0,063	0,078	0,049
	4 h	0,03	0,018	0,019	0,14	0,17	0,25	0,065	0,075	0,049
	24 h	0,024	0,019	ND	ND	0,27	0,9	0,059	0,074	0,044
	48 h	0,022	0,021	0,03	0,21	0,73	2,56	0,043	0,05	0,051
SJSA-1	0 h-PBS	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
	0 h-Suero	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
	4 h	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
	24 h	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
	48 h	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10

Las casillas sombreadas indican una disminución significativa en la potencia desde la muestra de T=0. Aunque VCP-eribulina y M-0285 fueron estables durante al menos 48 horas en suero, ER-001161319 demostró una caída significativa en la potencia después de 48 horas. Esto se puede deber al enlace de aziridino-carbamato con la maitansina, que no se ha descrito anteriormente en la bibliografía. La forma del compuesto liberado puede no ser altamente potente, ya que no se observó aumento de la citotoxicidad en las células SJSA-1.

2.5 Estudios *in vitro* con MORAb003-VCP-eribulina

2.5.1 Análisis HIC-HPLC de DAR y heterogeneidad del producto

[00301]MORAb003-VCP-eribulina y MORAb003-0285 se analizaron mediante HIC-HPLC para evaluar DAR mediante un método alternativo y analizar la heterogeneidad del producto y el contenido de anticuerpo sin conjugar (competidor). Se demostró que MORAb003-VCP-eribulina tiene especies de DAR de 0, 2, 4 y 6, lo que coincide con el método utilizado para la reducción y la conjugación (figura 7A). Se observaron cantidades muy bajas de la especie DAR = 0. En general, DAR, basándose en los

cálculos de AUC, fue 3,80, lo que coincide con los valores determinados por LC-MS. MORAb003-0285 migró como un pico único por HIC-HPLC, lo que indica una especie de DAR única (figura 7B). Esta se asignó como DAR 4,0.

2.5.2 Especificidad mediante ensayo de competencia

[00302] Se demostró la especificidad de antígeno de la citotoxicidad de MORAb-003-VCP-eribulina para el conjugado de VCP-eribulina utilizando un formato de ensayo de competencia (figura 8). En este experimento, se coincubaron las titulaciones de MORAb-003-VCP-eribulina (concentración inicial de 100 nM) con 2 µM de MORAb-003 sin conjugar. El MORAb-003 sin conjugar proporcionó un cambio de 2-log en potencia sobre las células IGROV1, similar a los resultados obtenidos con IMGN853, el ADC de receptor de folato alfa anti-humano-maitansina de Immunogen actualmente en ensayos clínicos de fase II, sobre células KB (Moore *et al*., 2015 American Society of Clinical Oncology (ASCO) Annual Meeting, Abstract 5518).

2.5.3 Citotoxicidad sobre células NCI-H2110 NSCLC

[00303] La citotoxicidad para MORAb003-VCP-eribulina y MORAb003-0285 sobre la línea celular de NSCLC humana NCI-H2110 se realizó utilizando un ensayo de cristal violeta. Los resultados de este ensayo se muestran en la tabla 16. MORAb003-VCP-eribulina presentó una IC_{50} de 0,73 nM, mientras que MORAb003-0285 presentó una IC_{50} de 14 nM.

2.6 Estudios *in vivo*

2.6.1 Dosis máxima tolerada (MTD) de MORAb-003-VCP-eribulina (MORAb-202) en la cepa de ratón CD-1

[00304] Se inyectaron ratones CD-1 sin tratamiento previo por vía intravenosa con 200 µL de MORAb-202 según el cronograma de la tabla 19. Se midió el peso corporal antes de la dosis en el día de dosificación, 24 horas después de la dosis y tres veces por semana a partir de ese momento. Se observaron los animales en cuanto al bienestar clínico durante todo el estudio. Dos semanas después de la dosificación, se midió el peso corporal final y se registró. Los ratones eutanizados al final del estudio (y si se sometió a eutanasia o se encontró muerto algún ratón durante el estudio) se procesaron para la necropsia. Se analizaron los órganos para detectar signos de daño tisular.

Tabla 19. Diseño del estudio

Grupo	N.º de ratones	Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Régimen	Vía
1	3	Vehículo*	0	bolo único	i.v.
2		MORAb-202	10		

3			20		
4			40		
5			80		

[00305] ---------- No se observó pérdida de peso corporal significativa en ninguno de los grupos de tratamiento en comparación con el grupo de control tratado con PBS ni ningún hallazgo clínico que indicara toxicidad durante el tratamiento. El peso corporal de los ratones individuales se muestra en la tabla 20 y el promedio grupal y SEM se muestran en la tabla 21. La cinética de cambio de peso corporal para cada grupo (promedio grupal y SEM) se muestran en la figura 9. MORAb-202 en dosis de hasta 80 mg/kg mediante administración intravenosa por bolo no produjo toxicidad. Por ende, la MTD es superior a 80 mg/kg.

Tabla 20

Días después de Rx	Control de PBS			MORAb-202 10mg/kg			MORAb-202 20mg/kg			MORAb-202 40mg/kg			MORAb-202 80mg/kg		
X	A:Y1	A:Y2	A:Y3	B:Y1	B:Y2	B:Y3	C:Y1	C:Y2	C:Y3	D:Y1	D:Y2	D:Y3	E:Y1	E:Y2	E:Y3
0	22.50	20.60	21.20	22.60	23.50	21.80	27.40	26.20	21.00	23.80	23.30	21.70	21.80	26.50	25.80
1	23.60	21.50	22.00	22.80	23.80	23.00	28.80	27.50	21.40	23.60	23.50	21.60	23.10	27.80	27.80
2	23.30	21.90	22.00	23.30	24.00	22.90	29.30	29.00	22.10	23.60	24.60	21.80	23.30	28.30	28.30
4	23.30	21.90	22.00	23.30	23.90	23.30	30.20	31.00	23.00	24.40	24.10	22.70	23.50	29.50	28.60
7	23.90	23.10	22.70	24.80	25.20	24.90	29.60	32.00	24.00	25.10	25.50	23.40	23.30	30.40	30.10
9	24.60	22.50	22.80	24.90	25.30	25.00	30.80	31.70	23.40	25.80	25.20	23.70	23.60	31.00	30.20
11	24.20	23.40	23.20	24.30	25.10	24.30	31.00	32.40	23.80	25.30	25.00	23.80	23.10	29.10	29.40
14	24.00	23.50	24.40	25.80	25.60	25.70	33.20	32.40	24.10	25.70	25.30	26.30	21.70	28.40	28.90

Tabla 21

días después de las inyecciones	PBS			MORAb-202 10 mg/kg			MORAb-202 20mg/kg			MORAb-202 40mg/kg			MORAb-202 80mg/kg		
	promedio (g)	sem	n	promedio (g)	sem	n	promedio (g)	sem	n	promedio	promedio (g)	n	promedio	promedio (g)	n
0	21.4	0.6	3	22.6	0.5	3	24.9	2.0	3	22.9	0.6	3	24.7	1.5	3
1	22.4	0.6	3	23.2	0.3	3	25.9	2.3	3	22.9	0.7	3	26.2	1.6	3
2	22.4	0.5	3	23.4	0.3	3	26.8	2.4	3	23.3	0.8	3	26.6	1.7	3
4	22.4	0.5	3	23.5	0.2	3	28.1	2.5	3	23.7	0.5	3	27.2	1.9	3
7	23.2	0.4	3	25.0	0.1	3	28.5	2.4	3	24.7	0.6	3	27.9	2.3	3
9	23.3	0.7	3	25.1	0.1	3	28.6	2.6	3	24.9	0.6	3	28.3	2.3	3
11	23.6	0.3	3	24.6	0.3	3	29.1	2.7	3	24.7	0.5	3	27.2	2.1	3
14	24.0	0.3	3	25.7	0.1	3	29.9	2.9	3	25.8	0.3	3	26.3	2.3	3

2.6.2 Dosis máxima tolerada de eribulina en ratones CD-1

[00306] Se inyectaron ratones CD-1 sin tratamiento previo por vía intravenosa con 200 µL de eribulina según el cronograma de la tabla 22. Se midió el peso corporal tres veces por semana, incluso antes de la dosis en cada día de dosificación y 24 horas después de cada dosis. Se observaron los animales en cuanto al bienestar clínico durante todo el estudio (dos semanas después de la última dosis). Se midió el peso corporal final y se registró. Los ratones eutanizados al final del estudio (y si se sometió a eutanasia o se encontró muerto algún ratón durante el estudio) se procesaron para la necropsia. Se analizaron los órganos para detectar signos de daño tisular.

Tabla 22. Diseño del estudio

Grupo	N.º de ratones	Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Régimen	Vía
1	3	PBS	0	q4dx3	i.v.
2		Eribulina	0,4		
3			0,8		
4			1,6		
5			3,2		

[00307]No se observaron pérdida de peso corporal significativa ni hallazgos clínicos que indicaran toxicidad en los animales que recibieron eribulina en dosis de hasta 1,6 mg/kg, utilizando el régimen de dosificación q4dx3 (una vez cada cuatro días hasta un total de 3 dosis). Administración de 3,2 mg/kg con la misma piloerección inducida por cronograma en los tres ratones después de la segunda dosis. Se observó pérdida de peso grave (23 % de pérdida en un ratón, N.º 552, después de la segunda dosis; 17 % y 8 % en el resto, N.º 551 y N.º 552, después de la tercera dosis) en comparación con el control tratado con PBS. No se observaron cambios bruscos en los órganos de los ratones durante la necropsia. El peso corporal de los ratones individuales se muestra en la tabla 23 y el promedio grupal y SEM se muestran en la tabla 24. La cinética de cambio de peso corporal para cada grupo (promedio grupal y SEM) se muestran en la figura 10.

[00308]Eribulina en dosis de hasta 1,6 mg/kg, utilizando el régimen de dosificación q4dx3, no produjo toxicidad, mientras que 3,2 mg/kg indujo pérdida de peso grave. Por ende, la MTD de la eribulina, en este estudio, es 1,6 mg/kg, q4dx3.

Tabla 23

Día	PBS			eribulina 0.4mg/kg			eribulina 0.8mg/kg			eribulina 1.6mg/kg			eribulina 3.2mg/kg		
X	A:Y1	A:Y2	A:Y3	B:Y1	B:Y2	B:Y3	C:Y1	C:Y2	C:Y3	D:Y1	D:Y2	D:Y3	E:Y1	E:Y2	E:Y3
0	26.50	24.40	23.40	22.40	24.60	23.10	23.90	25.50	25.10	21.90	24.40	23.70	24.30	25.00	22.00
1	28.13	25.11	24.36	21.84	24.02	22.43	23.03	23.60	24.46	21.13	24.10	24.15	22.31	23.47	20.57
4	25.60	25.10	24.40	22.70	24.00	24.00	23.80	24.40	24.50	21.70	24.10	23.30	20.90	22.20	17.50
5	26.40	24.80	24.50	22.30	24.10	23.40	24.10	24.00	24.80	21.50	24.50	24.10	20.90	22.70	16.90
8	27.50	25.70	24.50	23.30	23.70	25.20	24.00	24.80	25.90	21.90	24.50	24.20	21.80	23.90	9003.00*
9	27.50	25.50	24.40	22.90	23.40	25.40	24.00	24.70	25.30	21.80	24.80	24.30	20.20	23.00	
11	27.50	25.60	24.40	22.60	23.90	25.60	24.70	25.10	26.00	22.20	25.70	24.70	20.00	23.30	
13	27.40	26.80	25.40	23.70	23.90	26.50	25.30	25.60	26.60	22.80	25.80	25.20	21.40	23.70	
15	27.30	26.80	26.20	24.70	24.10	26.70	25.40	25.80	26.40	23.40	26.70	25.10	23.60	24.30	
18	27.00	27.40	27.30	24.30	24.90	27.90	26.20	28.00	27.90	24.70	27.90	26.20	25.90	25.90	
20	28.10	27.60	26.50	26.10	25.70	28.50	25.40	28.20	28.10	25.40	29.00	26.00	26.80	26.00	

Cada columna representa a un animal individual.

*9003: sometidos a eutanasia por pérdida de peso >20 %.

Tabla 24

días después de las inyecciones	PBS			eribulina 0.4mg/kg			eribulina 0.8mg/kg			eribulina 1.6mg/kg			eribulina 3.2mg/kg		
	promedio (g)	sem	n	promedio (g)	sem	n	promedio (g)	sem	n	promedio	promedio (g)	n	promedio	promedio (g)	n
0	24.8	0.9	3	23.4	0.6	3	24.8	0.5	3	23.3	0.7	3	23.8	0.9	3
1	25.9	1.2	3	22.8	0.7	3	23.7	0.4	3	23.1	1.0	3	22.1	0.8	3
4	25.0	0.3	3	23.6	0.4	3	24.2	0.2	3	23.0	0.7	3	20.2	1.4	3
5	25.2	0.6	3	23.3	0.5	3	24.3	0.3	3	23.4	0.9	3	20.2	1.7	3
8	25.9	0.9	3	24.1	0.6	3	24.9	0.6	3	23.5	0.8	3	22.9	0.9	2
9	25.8	0.9	3	23.9	0.8	3	24.7	0.4	3	23.6	0.9	3	21.6	1.1	2
11	25.8	0.9	3	24.0	0.9	3	25.3	0.4	3	24.2	1.0	3	21.7	1.3	2
13	26.5	0.6	3	24.7	0.9	3	25.8	0.4	3	24.6	0.9	3	22.6	0.9	2
16	26.8	0.3	3	25.2	0.8	3	25.9	0.3	3	25.4	1.0	3	24.0	0.3	2
18	27.2	0.1	3	25.7	1.1	3	27.4	0.6	3	26.3	0.9	3	25.9	0.0	2
20	27.4	0.5	3	26.8	0.9	3	27.2	0.9	3	26.8	1.1	3	26.4	0.3	2

2.6.3 Evaluación de dosis eficaz mínima de MORAb003-VCP-eribulina (MORAb-202) en el modelo de hNSCLC NCI-H2110 en ratones CB17-SCID

[00309] Se implantaron células NSCLC humanas, NCI-H2110, pasaje 47 por vía subcutánea en 30 ratones CB17 SCID (hembra, de 5 a 6 semanas, con un peso de 20 gramos). Después de 14 días después del implante, se aleatorizaron los ratones en cinco grupos. El volumen tumoral promedio en cada grupo en el día del tratamiento (día 0) osciló entre 154-175 mm^3 (tabla 27). Los ratones participantes se trataron con MORAb003-VCP-eribulina (MORAb-202) (lote N.º NB2900-87E 07/10/15) a 1, 2,5 o 5 mg/kg, con MORAb-003-0285 (lote N.º 042-150-002) como control a 5 mg/kg o con PBS, de acuerdo con el diseño del estudio (tabla 25). Se retiró cada grupo del estudio cuando el volumen tumoral en cualquier animal del grupo alcanzó >2000 mm^3. El último grupo finalizó el día 61.

Tabla 25. Diseño del estudio

Grupo	N.º de ratones	Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Régimen	Vía
1	5	PBS	0	bolo único	i.v.
2	5	MORAb-003-VCP-eribulina	1		
3	5	MORAb-003-VCP-eribulina	2,5		
4	4[1]	MORAb-003-VCP-eribulina	5		
5	5	MORAb003-0285	5		

[00310] Los volúmenes tumorales en los ratones individuales se muestran en la tabla 26 y el promedio grupal y SEM se muestran en la tabla 27. La cinética del crecimiento tumoral para cada grupo (promedio grupal y error estándar del promedio, SEM) se muestra en la figura 11 y los volúmenes tumorales en los

[1] Cuatro ratones en este grupo. Un ratón fue excluido de este grupo debido a un error en la inyección del tratamiento, lo que se verificó por la ausencia del compuesto en el suero animal basándose en los datos del inmunoensayo electroquimioluminiscente (ECLIA).

ratones individuales, así como el promedio grupal y SEM, se muestran en la figura 12. Basándose en los volúmenes tumorales del día 17 (cuando se observó el primer volumen tumoral >2000 mm^3), la inhibición del crecimiento tumoral provocada por MORAb-202 (TGI) del 47 % a 1 mg/kg (p = 0,002 contra solución salina), TGI del 96 % a 2,5 mg/kg (p < 0,0001 contra solución salina). Sin embargo, los tumores con regresión volvieron a crecer una a dos semanas después del final del tratamiento. No se detectaron tumores en los ratones tratados con 5 mg/kg de MORAb-202. Estos ratones permanecieron libres de tumores después de 60 días después de un tratamiento de dosis única. MORAb-003-0285 provocó una TGI del 89,7 % a 5 mg/kg (p < 0,0001 contra solución salina).

[00311] El peso corporal de los ratones individuales se muestra en la tabla 28 y el promedio grupal y SEM se muestran en la tabla 29. La cinética de cambio de peso corporal para cada grupo (promedio grupal y SEM) se muestran en la figura 13.

[00312] No se observó pérdida de peso corporal significativa en ninguno de los grupos de tratamiento en comparación con el control.

[00313] MORAb-202 mostró un efecto significativo sobre el crecimiento tumoral de NCI-H2110. Se logró la regresión tumoral mediante un tratamiento de bolo a 2,5 mg/kg con TGI del 94 % (contra PBS). Por ende, la dosis mínima eficaz de MORAb-202 es de 2,5 mg/kg, evaluada en este modelo. Se logró la erradicación completa del tumor mediante una dosis única de 5 mg/kg. No se observó crecimiento tumoral durante más de 60 días.

Tabla 26. Volúmenes tumorales

días después de la aleatorización	PBS					MORAb-202 1mg/kg					MORAb-202 2.5 mg/kg					MORAb-202 5mg/kg					003-0285 5mg/kg				
0	164	195	137	300	80	178	218	133	118	150	187	189	92	120	236	110	202	159	146	65	208	241	243	97
3	368	413	279	587	171	178	207	104	106	216	144	97	65	69	148	40	115	68	68	83	259	358	292	164
5	327	481	285	555	190	161	193	83	95	215	75	51	37	35	56	14	52	22	37	54	160	168	239	105
6	467	758	541	894	275	257	258	139	160	348	61	52	58	33	57	7	28	25	20	43	197	235	247	129
7	642	815	621	1055	395	317	306	182	167	476	64	54	53	36	57	8	48	16	20	52	192	255	266	128
10	891	1238	895	1328	662	506	494	230	285	708	24	37	35	15	71	0	0	0	0	39	155	240	181	86
12	993	1274	983	1519	1115	638	655	371	361	865	40	21	51	9	69	0	0	0	0	32	106	206	223	83
14	981	1410	1131	1695	971	848	812	402	418	901	41	30	37	0	89	0	0	0	0	31	115	235	157	79
17	1320	1723	1319	2089	1466	955	980	727	592	946	46	33	64	0	161	0	0	0	0	28	114	346	251	74
19						838	1030	856	602	953	56	37	90	0	282	0	0	0	0	27	144	438	359	94
24											102	37	197	0	702	0	0	0	0	46	391	1244	824	187
26											168	102	319	0	790	0	0	0	0	103	564	1470	1030	287
28											269	54	474	9	990	0	0	0	0	125	703	1898	1112	375
31											362	105	558	13	1187	0	0	0	0	225	1144	2427	1413	657
33											496	124	588	9	1461	0	0	0	0					
35											573	212	669	16	1847	0	0	0	0					
38											764	348	952	20	2367	0	0	0	0					
40																0	0	0	0					
42																0	0	0	0					
45																0	0	0	0					
47																0	0	0	0					
52																0	0	0	0					
54																0	0	0	0					
59																0	0	0	0					
61																0	0	0	0					

Cada columna representa a un animal individual.

Tabla 27

días después de la aleatorización	PBS			MORAb-202 1mg/kg			MORAb-202 2.5mg/kg			MORAb-202 5mg/kg			MORAb-003-0285 5mg/kg		
	PROMEDIO	SEM	N	PROMEDIO	SEM	N	PROMEDIO	SEM	N	PROMEDIO	SEM	N	PROMEDIO	SEM	N
0	175.2	36.41527	5	159.4	17.68781	5	164.8	25.8917	5	154.25	16.95792	4	170.8	37.46065	5
3	363.6	69.3831	5	162.2	24.14101	5	104.6	17.7581	5	72.75	13.88661	4	231.2	48.4055	5
5	367.6	66.21275	5	149.4	26.13343	5	50.8	7.242607	5	31.25	7.500133	4	145.2	31.14683	5
6	587	108.7468	5	232.4	37.74183	5	52.2	5.005179	5	20	4.140008	4	170.2	37.81015	5
7	705.6	109.7441	5	289.6	55.74694	5	52.8	4.611415	5	23	7.76666	4	178.6	40.08123	5
10	1002.8	122.532	5	444.6	85.61518	5	36.4	9.499597	5	0	0	4	140.2	35.30937	5
12	1176.8	100.25	5	578	95.18355	5	38	10.62087	5	0	0	4	130	36.5513	5
14	1237.6	138.8994	5	676.2	109.4307	5	39.4	14.30871	5	0	0	4	123.4	34.69758	5
17	1583.4	146.0629	5	840	76.78507	5	60.8	27.09899	5	0	0	4	162.6	58.96373	5
19				855.8	72.16584	5	93	49.35207	5	0	0	4	212.4	79.06236	5
24							207.6	127.8177	5	0	0	4	538.4	219.5123	5
26							275.8	138.3498	5	0	0	4	690.8	249.2466	5
28							359.2	177.874	5	0	0	4	842.6	310.8641	5
31							445	208.4929	5	0	0	4	1173.2	373.2365	5
33							535.6	255.2269	5	0	0	4			
35							663.4	318.1881	5	0	0	4			
38							890.2	402.5237	5	0	0	4			
40										0	0	4			
42										0	0	4			
45										0	0	4			
47										0	0	4			
52										0	0	4			
54										0	0	4			
59										0	0	4			
61										0	0	4			

Tabla 28

días después de la aleatorización	PBS					MORAb-202 1mg/kg					MORAb-202 2.5 mg/kg					MORAb-202 5mg/kg				MORAb-003-0285 5mg/kg				
0	19.1	18.2	18.4	18.9	18.8	19.1	18.6	19.3	20.6	18.4	17.8	18.1	18	19.8	16.3	17.6	18.7	16.1	19.7	20.5	17.4	18	17.4	18.8
3	19.6	18.2	18.9	18.9	19.3	19.3	18.4	20.2	20.9	18.6	18.4	19.1	18.6	19.9	16.4	17.5	18.8	15.9	19.9	20.8	17	18.1	16.3	18.5
6	19.7	18.4	18.4	19.1	19.1	19	18.3	20.3	21.3	19	18.5	19.4	18.7	20	16.4	17.5	19.3	16.3	19.6	20.8	17.7	18.2	16.8	18.7
7	19.7	18	18.9	18.8	18.9	18.9	18	20	21.2	18.9	18.7	18.7	18.7	19.7	16.5	17.4	19.4	16.5	19.2	20.6	17.7	18.5	16.8	19
10	19.7	18	19.2	18.5	19.1	18.4	18	20.1	20.9	19	19.3	19.7	18.8	19.8	16.6	17.6	19.4	16.7	20	20.5	18.2	18.6	17.5	20.3
12	19.8	17.7	19.1	18.4	19	18.3	17.8	20.5	20.9	19.5	18.9	20	19.7	20.2	17.2	17.9	19.6	16.9	20.2	20.4	18.3	18.8	18.1	20.4
14	18.8	17.4	18.4	18.2	17.5	17.9	17.7	20.3	21.2	19.9	18.8	19.6	19	19.3	17	17.5	19.3	17	19.2	20	18.2	18.9	18.4	19.7
17	18.8	17.2	18.3	17.5	17.2	17.4	17.7	20.4	20.7	19.2	18.8	19.8	19.7	19.2	17.3	17.9	20	17.3	19.7	19.8	17.9	18.9	18.6	19.5
19						16.7	17.2	19.9	20.7	18.9	18.3	19.8	18.7	19.5	16.8	18.1	20	17.1	20.2	19.7	18	19.3	18.4	19.6
24											18.8	20.2	19.2	19.9	16.9	18.5	20.7	17.5	20.2	20.1	18.5	20	19.1	18.9
26											18.9	19.6	18.9	19.5	16.5	18.3	20.7	17.6	19.7	20.6	18.4	19.9	18.6	19.1
28											18.8	19.6	19.5	19.6	16.6	18.6	21.3	17.6	20.1	20.8	18.5	19.9	18.8	19.5
31											18.9	20.1	19.6	20.7	17	18.6	20.4	17.9	20.9	20.7	18.2	20.9	19.6	19.5
33											18.9	19.8	19.4	21.2	17.6	18.8	19.6	18.2	21.3					
35											19.2	19.7	19.5	20.7	17.4	18.7	20.2	18.1	19.6					
38											19.6	20	19.7	20.6	18	18.8	20.4	19	17.2					
40																19.4	20.4	18.7	19.3					
42																19.9	20.4	18.8	20.6					
45																19.8	21	18.3	21.7					
47																19.7	20.7	18.3	21.1					
52																20.2	21.1	18.5	21.9					
54																20.3	21.4	18.6	22.6					
59																20	21.6	18.8	21.7					
61																20.5	22.1	19.2	21.3					

Tabla 29

días después de la aleatorización	PBS			MORAb-202 1mg/kg			MORAb-202 2.5mg/kg			MORAb-202 5mg/kg			MORAb-003-durostatina 5mg/kg		
	PROMEDIO	SEM	N	PROMEDIO	SEM	N	PROMEDIO	SEM	N	PROMEDIO	SEM	N	PROMEDIO	SEM	N
0	18.68	0.165239	5	19.2	0.385328	5	18	0.554902	5	18.025	0.689078	4	18.42	0.578982	5
3	18.98	0.234959	5	19.48	0.47393	5	18.48	0.579842	5	18.025	0.769253	4	18.14	0.76975	5
6	18.94	0.245739	5	19.58	0.537015	5	18.6	0.609665	5	18.175	0.694839	4	18.44	0.667108	5
7	18.86	0.268971	5	19.4	0.549488	5	18.46	0.525953	5	18.125	0.628577	4	18.52	0.638721	5
10	18.9	0.29444	5	19.28	0.537015	5	18.84	0.585996	5	18.425	0.68618	4	19.02	0.590063	5
12	18.8	0.352933	5	19.4	0.600608	5	19.2	0.545849	5	18.65	0.678513	4	19.2	0.502108	5
14	18.06	0.267112	5	19.4	0.685817	5	18.74	0.454832	5	18.25	0.523801	4	19.04	0.352368	5
17	17.8	0.320373	5	19.08	0.673649	5	18.96	0.451533	5	18.725	0.592675	4	18.94	0.33497	5
19				18.68	0.764423	5	18.62	0.527655	5	18.85	0.670634	4	19	0.338521	5
24							19	0.579498	5	19.225	0.663539	4	19.32	0.313137	5
26							18.68	0.563279	5	19.075	0.621135	4	19.32	0.41086	5
28							18.82	0.573795	5	19.4	0.728103	4	19.5	0.407939	5
31							19.26	0.636533	5	19.45	0.638148	4	19.78	0.484329	5
33							19.38	0.585826	5	19.475	0.60047	4			
35							19.3	0.536644	5	19.15	0.416401	4			
38							19.58	0.430983	5	18.85	0.584918	4			
40										19.45	0.314619	4			
42										19.925	0.359691	4			
45										20.2	0.665164	4			
47										19.96	0.549137	4			
52										20.425	0.651414	4			
54										20.725	0.758819	4			
59										20.525	0.620064	4			
61										20.775	0.552051	4			

2.6.4 Evaluación de la dosis mínima eficaz de eribulina en el modelo de hNSCLC NCI-H2110 en ratones CB17-SCID

[00314] Se implantaron células H2110, NSCLC humanas, pasaje 46 por vía subcutánea en 30 ratones CB17 SCID (hembra, de 5 a 6 semanas, con un peso de 20 gramos). Después de 11 días después del implante, se aleatorizaron los ratones en cinco grupos. Se excluyeron los cinco animales con los volúmenes tumorales que se desviaban más del promedio. El volumen tumoral promedio en cada grupo en el día del tratamiento (día 0) osciló entre 87,6-89,4 mm^3 (tabla 32). Los ratones participantes se trataron con eribulina (lote N.º N1201193) a 0,05, 0,2, 0,8 o 1,6 mg/kg o con PBS, de acuerdo con el diseño del estudio (tabla 30). Se suspendió cada grupo, respectivamente, cuando se observó un primer volumen tumoral >2000 mm^3 dentro del grupo. El estudio se suspendió en el día 38 (30 días después de

la última dosis).

Tabla 30. Diseño del estudio

Grupo	N.º de ratones	Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Régimen	Vía
1	5	PBS	0	q4dx3	i.v.
2		Eribulina	0,05		
3			0,2		
4	4*		0,8		
5	5		1,6		

[00315] Los volúmenes tumorales en los ratones individuales se muestran en la tabla 31 y el promedio grupal y SEM se muestran en la tabla 32. Se muestra la cinética del crecimiento tumoral para cada grupo (promedio grupal y SEM) en la figura 14 y se muestran los volúmenes tumorales en los ratones individuales, así como el promedio grupal y SEM en el día 24 (cuando el volumen tumoral >2000 mm^3 se observó en ratones tratados con PBS) en la figura 15. Eribulina provocó una TGI del 50,5 % (no se observó regresión tumoral) a 0,05 mg/kg (p = 0,0026 contra solución salina); TGI de ~ 99 % a 0,2, 0,8 o 1,6 mg/kg (los valores p fueron < 0,0001 para los 3 grupos en comparación con la solución salina). La dosis mínima eficaz que indujo regresión tumoral fue de 0,2 mg/kg. Sin embargo, la mayoría de los tumores con regresión en estos ratones (3/5 en el grupo de 0,2 mg/kg, 4/5 en el grupo de 0,8 mg/kg y 2/5 en el grupo de 1,6 mg/kg) volvieron a crecer o permanecieron medibles a lo largo de la duración del estudio (30 días después de la última dosis).

[00316] El peso corporal de los ratones individuales se muestra en la tabla 33 y el promedio grupal y SEM se muestran en la tabla 34. La cinética de cambio de peso corporal para cada grupo (promedio grupal y SEM) se muestran en la figura 16.

[00317] No se observó pérdida de peso corporal significativa en ninguno de los grupos de tratamiento en comparación con el grupo de control tratado con solución salina. No se observaron hallazgos clínicos que indiquen toxicidad durante el tratamiento.

[00318] Eribulina, a 0,2 mg/kg y más, administrada q4dX3 i.v., mostró un efecto significativo sobre el crecimiento tumoral de H2110. Se logró la regresión tumoral. Cuando se administró una dosis más baja (a 0,05 mg/kg), no se logró regresión tumoral. Por lo tanto, la dosis mínima eficaz evaluada en este estudio es 0,2 mg/kg.

Tabla 31

días después de 1º dosis	vehículo					eribulina 0.05mg/kg					eribulina 0.2mg/kg					eribulina 0.8mg/kg					eribulina 1.6mg/kg				
0	59	91	118	88	91	105	101	94	61	77	103	68	78	130	62	111	104	81	93	54	70	116	74	91	91
3	62	179	219	236	173	175	149	117	161	64	68	62	52	79	61	54	55	40	51	33	50	44	44	44	47
5	80	255	436	283	257	231	157	228	261	132	60	60	48	90	51	32	29	34	42	25	25	22	32	24	24
7	111	433	440	472	446	357	171	269	247	102	48	47	39	49	47	26	34	17	21	24	19	12	31	15	11
10	230	555	747	622	489	370	200	413	376	226	33	39	28	36	47	17	22	19	5	21	15	0	29	14	0
12	263	677	722	877	620	539	265	448	350	135	19	41	23	13	14	15	23	16	12	24	13	0	14	0	0
17	720	959	960	1158	885	725	514	751	620	531	0	0	0	0	13	17	38	0	0	26	0	0	0	0	0
19	862	1314	940	1097	941	869	437	908	776	837	27	39	29	29	16	0	20	18	0	27	0	0	19	0	0
24	1886	2308	1854	2760	1671	712	718	1489	1225	1040	0	15	19	23	11	14	0	20	0	33	18	0	19	0	0
26											0	24	0	11	14	0	8	14	14	15	8	0	17	0	0
28											0	7	0	14	83	0	16	20	14	17	0	0	16	0	0
31											0	16	0	10	31	0	10	15	26	29	11	0	17	0	0
33											0	27	0	13	22	0	13	8	18	44	8	0	28	0	0
35											0	19	0	16	42	0	13	0	22	50	14	0	17	0	0
38											0	19	0	14	45	0	11	13	13	54	11	0	20	0	0

Tabla 32

	PBS			eribulina 0.05mg/kg			eribulina 0.2mg/kg			eribulina 0.8mg/kg			eribulina 1.6mg/kg		
días después de 1º dosis	PROMEDIO	SEM	N	PROMEDIO	SEM	N	PROMEDIO	SEM	N	PROMEDIO	SEM	N	PROMEDIO	SEM	N
0	89.4	9.34	5	87.6	8.18	5	88.2	12.56	5	88.6	10.02	5	88.4	8.11	5
3	173.8	30.31	5	133.2	19.74	5	64.4	4.45	5	46.6	4.31	5	45.8	1.20	5
5	262.2	56.43	5	201.8	24.37	5	61.8	7.43	5	32.4	2.83	5	25.4	1.72	5
7	380.4	67.55	5	229.2	43.40	5	46	1.79	5	24.4	2.83	5	17.6	3.62	5
10	528.6	85.83	5	317	43.21	5	36.6	3.17	5	16.8	3.07	5	11.6	5.42	5
12	631.8	101.42	5	347.4	70.14	5	22	5.07	5	18	2.34	5	5.4	3.30	5
17	936.4	70.46	5	628.2	48.40	5	2.6	2.60	5	16.2	7.39	5	0	0.00	5
19	1030.8	80.29	5	765.4	84.75	5	28	3.65	5	13	5.50	5	3.8	3.79	5
24	2095.8	195.76	5	1036.8	149.24	5	13.6	3.94	5	13.4	6.26	5	7.4	4.53	5
26							9.8	4.54	5	10.2	2.83	5	5	3.37	5
28							20.8	15.74	5	13.4	3.48	5	3.2	3.19	5
31							11.4	5.77	5	16	5.29	5	5.6	3.55	5
33							12.4	5.53	5	16.6	7.45	5	7.2	5.42	5
35							15.4	7.72	5	17	9.22	5	6.2	3.82	5
38							15.6	8.25	5	18.2	9.25	5	6.2	4.05	5

Tabla 33

días después de la 1º dosis	vehículo					eribulina 0.05mg/kg					eribulina 0.2mg/kg					eribulina 0.8mg/kg					eribulina 1.6mg/kg				
0	18.5	16.7	19.1	20.4	19.6	19.1	16.4	18.6	20.1	17.9	18.2	18.5	16.7	19.8	18.9	18.6	17.8	18.4	17.8	18.1	18.2	18.3	19.4	16.3	19.0
3	18.8	16.6	19.6	20.9	20.0	19.4	17.1	18.5	20.4	18.7	18.6	18.5	16.9	19.6	19.8	18.8	18.0	18.4	18.1	19.0	17.8	18.3	20.1	15.8	19.6
5	18.8	16.8	19.3	21.2	20.0	19.4	16.5	18.4	20.4	19.4	18.5	19.1	16.9	20.2	20.1	18.9	18.1	18.5	17.6	18.2	18.1	18.1	19.5	16.0	19.3
7	18.6	16.5	19.3	21.2	19.8	19.4	16.3	18.7	20.3	19.1	18.5	18.5	17.1	19.6	20.7	19.1	18.1	19.0	17.8	19.0	18.1	18.2	19.5	16.3	19.4
8	18.3	16.7	18.8	21.1	19.6	19.3	16.3	18.4	20.4	19.4	18.6	19.1	17.0	19.6	19.9	19.2	18.0	19.0	17.7	18.8	18.0	18.3	20.1	16.2	19.4
9	18.4	16.4	18.5	21.0	19.5	18.8	16.1	18.6	19.9	19.1	18.3	20.0	16.8	19.5	19.5	19.2	17.7	18.5	17.5	18.5	17.4	18.0	19.6	15.8	19.4
10	19.0	17.2	19.2	21.6	20.3	19.7	16.3	19.4	20.5	20.0	18.7	19.4	17.1	20.0	20.1	19.0	17.7	18.9	17.8	19.1	18.1	18.5	21.0	16.1	20.0
12	19.0	15.9	18.5	21.3	19.2	18.8	15.9	18.6	19.6	19.7	18.3	19.3	16.9	19.7	19.9	18.9	17.8	19.0	17.8	19.0	18.0	18.8	20.5	16.3	20.1
17	18.8	15.5	17.8	20.4	18.3	17.5	16.0	18.5	18.0	19.7	19.0	19.3	17.4	20.5	20.0	19.2	18.0	18.8	18.1	19.1	19.0	19.2	21.0	16.4	19.4
19	18.9	15.6	17.2	20.6	18.1	17.8	16.3	18.4	18.0	19.4	19.1	19.0	17.1	21.1	21.0	19.1	17.7	19.4	18.7	19.1	19.1	19.5	21.1	16.3	19.8
24	18.2	15.8	17.4	20.3	18.2	18.8	16.5	18.8	17.4	18.0	19.3	20.2	18.8	21.7	22.0	20.1	18.5	20.3	19.1	20.3	19.4	20.6	21.7	18.1	20.7
26											19.8	20.9	18.6	22.0	20.4	20.3	18.1	19.9	19.3	20.9	19.5	20.7	21.6	18.3	20.6
28											20.1	20.6	18.1	21.5	21.0	20.3	17.8	20.2	19.6	20.6	19.6	20.3	21.2	17.6	21.1
31											18.7	20.1	18.7	22.0	21.2	20.1	18.2	20.3	19.5	20.7	19.8	20.4	21.9	18.1	21.9
33											20.0	20.3	18.4	22.2	21.8	20.2	18.3	21.0	19.2	20.2	20.1	19.9	21.7	17.9	20.7
35											19.5	20.1	18.7	22.1	21.4	20.1	17.8	21.0	19.3	20.3	20.3	18.2	21.8	18.2	20.9
38											19.8	20.8	18.3	21.6	21.6	20.4	18.1	21.4	19.4	21.2	20.0	21.0	21.9	18.4	20.3

Cada columna representa a un animal individual.

Tabla 34

		PBS		eribulina 0.05mg/kg			eribulina 0.2mg/kg			eribulina 0.8mg/kg			eribulina 1.6mg/kg		
días después de 1º dosis	PROMEDIO	SEM	N	PROMEDIO	SEM	N	PROMEDIO	SEM	N	PROMEDIO	SEM	N	PROMEDIO	SEM	N
0	18.9	0.62	5	18.4	0.62	5	18.4	0.51	5	18.1	0.16	5	18.2	0.53	5
3	19.2	0.73	5	18.8	0.54	5	18.7	0.51	5	18.5	0.19	5	18.3	0.75	5
5	19.2	0.73	5	18.8	0.66	5	19.0	0.60	5	18.3	0.22	5	18.2	0.62	5
7	19.1	0.77	5	18.8	0.67	5	18.9	0.60	5	18.6	0.27	5	18.3	0.58	5
10	18.9	0.72	5	18.8	0.69	5	18.8	0.51	5	18.5	0.29	5	18.4	0.67	5
12	18.8	0.76	5	18.5	0.65	5	18.8	0.59	5	18.3	0.30	5	18.0	0.69	5
17	19.5	0.73	5	19.2	0.74	5	19.1	0.55	5	18.5	0.32	5	18.7	0.84	5
19	18.8	0.86	5	18.5	0.68	5	18.8	0.56	5	18.5	0.28	5	18.7	0.77	5
24	18.2	0.79	5	17.9	0.60	5	19.3	0.53	5	18.6	0.24	5	19.0	0.73	5
26							19.5	0.74	5	18.8	0.30	5	19.2	0.79	5
28							20.4	0.63	5	19.7	0.36	5	20.1	0.62	5
31							20.3	0.56	5	19.7	0.48	5	20.1	0.57	5
33							20.3	0.59	5	19.7	0.50	5	20.0	0.66	5
35							20.1	0.66	5	19.8	0.43	5	20.4	0.71	5
38							20.5	0.68	5	19.8	0.47	5	20.1	0.62	5

EJEMPLO 2

1. Materiales y métodos

[00319] Se sintetizó MORAb003-VCP-eribulina (MORAb-202) mediante conjugación de MORAb-003 (receptor de folato alfa anti-humano humanizado) con el compuesto MAL-PEG2-Val-Cit-PAB-eribulina (ER-001159569) descrito en la sección 1,1 del ejemplo 3. El método de conjugación se describe en la sección 1.4.1 del ejemplo 4.

1.1 Modelos tumorales

[00320] Las líneas celulares de tumores humanos utilizadas en la evaluación *in vitro* adicional de MORAb-202 incluyen IGROV1 (carcinoma de ovario humano, $FR^{hi\ (+++)}$), OVCAR3 (carcinoma de ovario humano, $FR^{med(++)}$), NCI-H2110 (carcinoma pulmonar de células no pequeñas humano, $FR^{med(++)}$), A431-A3 (línea celular parental A431 transfectada de forma estable con mesotelina humana, $FR^{lo(+/-)}$), SJSA-1 (osteosarcoma humano, $FR^{neg(-)}$) y HL-60 (leucemia humana, $FR^{neg(-)}$). Todas estas líneas celulares se obtuvieron directamente de la Colección de Cultivos Tipo de Estados Unidos (ATCC). Para los estudios *in vivo*, se establecieron modelos de ratón de xenoinjerto derivado de pacientes de cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama triple negativo y cáncer endometrial y se mantuvieron en Oncotest GmbH (Friburgo, Alemania), Oncodesign (Dijon, Francia) y EPO Berlin-Buch GmbH (Berlín, Alemania), respectivamente.

1.2 Análisis de citotoxicidad *in vitro*

1.2.1 Ensayo de cristal violeta

[00321] Se subcultivaron y se sembraron células IGROV1 ($FR^{hi\ (+++)}$), A431-A3 ($FR^{lo(+/-)}$) y SJSA-1 ($FR^{neg(-)}$) a 10.000 células/pocillo en medio de crecimiento completo en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos, se incubaron a 37 ºC, CO_2 al 5 % durante la noche (16 horas). Típicamente, se diluyeron en

serie los reactivos de prueba 1:4 en placas de dilución de pocillo profundo de 2 mL, partiendo de 1 µM (10 diluciones en total). Se añadieron 100 µL de muestras diluidas a las placas de células (concentración de partida de las muestras de prueba a 100 nM). Se incubaron las placas a 37 ºC, CO_2 al 5 % durante otras 48 horas. Se desechó el medio, se lavaron las placas una vez con 200 µL de DPBS, se tiñeron con 50 µL de solución de cristal violeta al 0,2 % a temperatura ambiente durante 15 min y después se lavaron bien con agua del grifo. Se secaron al aire las placas y se disolvió cristal violeta con 200 µL de solución de SDS al 1 %. Se leyeron las placas a 570 nm. Se analizaron los datos utilizando GraphPad Prism 6. Para OVCAR3 ($FR^{med(++)}$) y NCI-H2110 ($FR^{med(++)}$), se sembraron células a 3.000 células/pocillo y se incubaron durante 5 días con MORAb-202.

1.3 Estudios *in vivo*

1.3.1 Modelo de xenoinjerto NCI-H2110

[00322] *Preparación de los animales*: Se alojaron ratones CB17 SCID (hembra, 6 semanas) a 5 ratones por jaula ventilada. Pastillas de alimento esterilizadas y una botella de agua estaban disponibles a voluntad para los animales. Se aclimataron los animales durante 5-7 días antes del implante tumoral.

[00323] *Cultivo celular*: Se descongelaron células NCI-H2110 humanas de una solución madre congelada (NB2813-65) y se cultivaron en medio RPMI-1640 complementado con suero bovino fetal al 10 % (FBS) en CO_2 al 5 % a 37 ºC. Después de dos pasajes, después de alcanzar la confluencia en aproximadamente el 70 %, se cosecharon las células utilizando solución de disociación celular, se lavaron dos veces con medio libre de suero y se contaron.

[00324] *Implante tumoral*: se mezcló la suspensión celular en medio libre de suero con matrigel helado a 1:1 (v:v) hasta una concentración final de 1,0 x 10^8 células/mL. Se inyectó cada ratón por vía subcutánea con 100 µL de la mezcla a 1,0 x 10^7 células/ratón. Se utilizó una aguja de 27G para todas las inyecciones. Se monitorizaron los ratones para observar el bienestar clínico y se midieron los tumores con un calibrador digital tres veces por semana, comenzando el día 3 después del implante. Se calculó el volumen tumoral (mm^3) utilizando la fórmula: W (mm) × L (mm) × D (mm) × π/6. Cuando los tumores alcanzaron ~100 mm^3 (en un promedio de >70 a ~130 mm^3), se aleatorizaron los animales a 4-5 por grupo. Se excluyeron los 5 animales con los volúmenes tumorales que se desviaban más del promedio.

[00325] *Diseño del estudio*: los ratones experimentales participantes se inyectaron por vía intravenosa con 200 µL de vehículo o MORAb-202 a 1,0, 2,5 y 5 mg/kg, de acuerdo con el diseño del estudio (tabla 35), el día de la aleatorización. Se midió el peso corporal antes de la dosis y dos veces por semana durante el estudio. Al final del estudio, se midió el peso corporal final y se registró. Los animales se

sometieron a eutanasia cuando el volumen tumoral individual superó 2000 mm^3. Los criterios de finalización temprana antes de alcanzar el volumen tumoral máximo permitido incluyeron: (1) ulceración tumoral mayor que el 50 % del tumor (v:v); (2) parálisis; (3) pérdida de peso corporal >20 %; y (4) 50 % de los animales dentro del grupo habían llegado a la finalización. A todo ratón sometido a eutanasia o encontrado muerto durante el estudio se le realizó el proceso siguiendo el procedimiento final descrito arriba.

Tabla 35. Diseño del estudio

Grupo	N.º de ratones	Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Régimen	Vía
1	5	Vehículo	0	bolo único	i.v.
2		MORAb-202	1		
3			2,5		
4			5		

1.3.2 Modelos de xenoinjerto derivados de pacientes (PDx)

1.3.2.1 Modelo de PDx de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC): LXFA-737 (Oncotest)

[00326]*Implante tumoral*: se obtuvieron fragmentos de tumor de NSCLC a partir de pasaje en serie de xenoinjertos de tumor LXFA-737 en ratones pelados. Después de la eliminación de los ratones donantes, los tumores se cortaron en fragmentos (3-4 mm de longitud de borde) y se colocaron en solución salina amortiguada con fosfato (PBS) que contenía 10 % de penicilina/estreptomicina. Los animales receptores fueron anestesiados mediante inhalación de isoflurano y recibieron implantes tumorales unilaterales o bilaterales por vía subcutánea en el costado. Los xenoinjertos de tumores se implantaron con uno o dos tumores por ratón a una tasa de arraigo < 65 %. En el caso de un arraigo bilateral, uno de estos tumores se extrajo antes de la aleatorización. Los animales y los implantes tumorales se monitorizaron diariamente hasta que se pudo detectar un crecimiento de tumores sólidos en una cantidad suficiente de animales. En la aleatorización, se determinó el volumen de tumores en crecimiento. Los animales que cumplieron los criterios de aleatorización (es decir, con tumores de 50-250 mm^3, preferentemente 80-200 mm^3) se distribuyeron en grupos experimentales que consistían en 5-6 animales por grupo, con el objetivo de volúmenes tumorales grupales promedio y medianos similares de aproximadamente 100-120 mm^3. Los animales que no se utilizaron para los experimentos se sometieron a eutanasia. El día de la

aleatorización se designó como el día 0 del experimento.

[00327]*Diseño del estudio:* los ratones experimentales participantes se inyectaron por vía intravenosa con vehículo, MORAb-003 a 5 mg/kg o MORAb-202 a 5 mg/kg, de acuerdo con el diseño del estudio (tabla 36), el día de la aleatorización. Se midió el peso corporal antes de la dosis en cada día de dosificación y dos veces por semana durante el estudio. Al final del estudio, se midió el peso corporal final y se registró. Los animales se sometieron a eutanasia cuando el volumen tumoral individual superó 2000 mm^3.

Tabla 36. Diseño del estudio

Grupo	N.º de ratones	Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Régimen	Vía
1	6	Vehículo	0	bolo único	i.v.
2	6	MORAb-003	5		
3	6	MORAb-202	5		

1.3.2.2 Modelo de PDx de cáncer de mama triple negativo (TNBC): OD-BRE-0631 (Oncodesign)

[00328]*Implante tumoral*: se inyectaron por vía subcutánea nueve ratones pelados SWISS hembra en el costado derecho con fragmentos de tumor de TNBC derivados de paciente. Los ratones con tumor se sometieron a eutanasia cuando el volumen tumoral alcanzó 500-1000 mm^3 y los tumores se extirparon quirúrgicamente. Se implantaron ortotópicamente fragmentos de tumores (30-50 mg) en la región de la almohadilla de grasa mamaria de 34 ratones pelados SWISS hembra 24 a 72 horas después de una irradiación de cuerpo entero con una fuente gamma (2 Gy, 60Co, BioMEP, Francia). Cuando los tumores alcanzaron un volumen promedio de 200-300 mm^3, 24 de los 34 animales totales se aleatorizaron en dos grupos (n=12 animales) de acuerdo con su volumen tumoral individual utilizando el software Vivo Manager® (Biosystemes, Couternon, Francia). Se realizó una prueba estadística (análisis de varianza) para evaluar la homogeneidad entre los grupos. El día de la aleatorización se designó como el día 0 del experimento.

[00329]*Diseño del estudio*: en el día 1 (un día después de la aleatorización y dos días antes del tratamiento), se suspendió a 3 ratones de cada uno de los dos grupos sin tratamiento. Los ratones experimentales restantes se inyectaron por vía intravenosa con vehículo o MORAb-202 a 5 mg/kg, de acuerdo con el diseño del estudio (tabla 37), en el día 3. En el día 8 (cinco días después del tratamiento), se suspendió a 3 ratones de cada uno de los dos grupos tratados. Inmediatamente después de la

finalización, se recogió tejido tumoral y se fijó en formalina amortiguada neutra al 4 % durante 24 a 48 horas y después se incrustaron en parafina (Histosec®, Merck, Darmstadt, Alemania). Se almacenó la muestra incrustada en parafina a temperatura ambiente para un análisis de inmunohistoquímica posterior.

Tabla 37. Diseño del estudio

Grupo	N.º de ratones	Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Régimen	Vía
1	3	n/a	n/a	n/a	n/a
	9	Vehículo	0	bolo único	i.v.
2	3	n/a	n/a	n/a	n/a
	9	MORAb-202	5	bolo único	i.v.

[00330]*Análisis de inmunohistoquímica (IHC)*: se realizó tinción IHC de tejidos tumorales incrustados en parafina fijados en formalina para evaluar la ocupación de MORAb-202 y la expresión de fibroblastos asociada con el cáncer. Antes de la tinción, se desparafinaron los portaobjetos y se recuperó el antígeno en un módulo PT Lab Vision™ (Thermo Scientific), en amortiguador de citrato (pH 6,0) se precalentaron a 85 ºC, utilizando el siguiente programa: calentamiento a 97 ºC; incubación a 97 ºC durante 30 min; y enfriamiento a 60 ºC. Se transfirieron los portaobjetos a agua doblemente destilada a temperatura ambiente durante 5 min. La tinción se realizó en un Lab Vision™ Autostainer 360 (Thermo Scientific). En resumen, se lavaron dos veces los portaobjetos en 1X solución salina amortiguada con Tris/Tween-20 (TBST) durante 6 min/lavado. Las secciones de tejido se incubaron en amortiguador de bloqueo (300 µL) (suero de cabra al 10 % (Jackson Immunoresearch Laboratory Inc., N.º de cat. 005-000-121), se diluyeron en albúmina de suero bovino al 3 % (BSA) - solución salina amortiguada con fosfato (PBS)) durante 1 hora, se incubaron en anticuerpo conjugado (200 µL) (tabla 38) durante 1 hora y se lavaron cinco veces en 1X TBST durante 6 min/lavado. Se contratiñeron los portaobjetos con DAPI en medio de fijación y se dejó que los portaobjetos cubiertos con cubreobjetos se endurecieran durante 30 min. Se procesaron los portaobjetos en un escáner Panoramic MIDI (3DHISTECH), y se analizaron las imágenes IHC utilizando el software Halo (Indica Labs). Los anticuerpos utilizados en este análisis se dirigían a α-actina de músculo liso (SMA), que es un marcador específico para los fibroblastos asociados con el cáncer, e IgG humana, que puede detectar la presencia de MORAb-202.

Tabla 38. Anticuerpos IHC

Anticuerpo	Conjugados	Proveedor	Cat. n.º	Lote	Solución madre	Solución de trabajo
α-actina de músculo liso (SMA)-FITC	FITC	Sigma	F3777	124M4775V	2,0 mg/mL	5,0 µg/mL
IgG1 de ratón, control de isotipo κ	AF488	Biolegend	400129	B128493	0,2 mg/mL	1:1000
IgG de cabra anti-humana	AF555	Sondas mol.	A21433	1709318	n/a	1:200

1.3.2.3 Modelos de PDx de cáncer endometrial: Endo-12961 y Endo-10590 (EPO Berlin)

[00331]*Implante tumoral*: se obtuvieron fragmentos tumorales de cáncer endometrial de xenoinjertos de tumor Endo-12961 y Endo-10590 pasados en serie y se almacenaron como solución madre en nitrógeno líquido. Se implantaron los fragmentos tumorales por vía subcutánea en el costado izquierdo de 40 ratones hembra NMRI nu/nu y se monitorizó el volumen tumoral. Los ratones con un volumen tumoral de 100-160 mm^3 se aleatorizaron en uno de cuatro grupos (grupos A-D, tabla 39). Se incluyeron ratones satélite para la aleatorización en un quinto grupo (grupo E, tabla 39). Cada grupo consistía en 8 animales. El día de la aleatorización se designó como el día 0 del experimento.

[00332]*Diseño del estudio*: los ratones experimentales participantes se inyectaron por vía intravenosa con PBS, eribulina a 3,2 mg/kg o 0,1 mg/kg o MORAb-202 a 5 mg/kg, de acuerdo con el diseño del estudio (tabla 39), el día de la aleatorización. Se evaluó el crecimiento tumoral mediante la medición de dos diámetros perpendiculares dos veces por semana y se calcularon el volumen tumoral (TV), el volumen tumoral relativo (RTV) y los valores de tratamiento/control (T/C). El peso corporal también se evaluó dos veces por semana como un parámetro para la toxicidad, con el cálculo del peso corporal por grupo y cambios de peso corporal (BWC) con respecto al inicio del tratamiento. Se sacrificaron los animales cuando el volumen tumoral individual superaba 1 cm^3 o al final del estudio.

Tabla 39. Diseño del estudio

Grupo	N.º de ratones	Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Régimen	Vía
A	8	PBS	0	bolo único	i.v.
B		Eribulina	3,2		
C		Eribulina	0,1		
D		MORAb-202	5		
E		n/a	n/a	n/a	n/a

1.4 Mecanismo de acción

1.4.1 Sistema de cocultivo tridimensional (3D) en zPredicta

[00333]Todos los experimentos de cocultivo 3D que contenían células madre mesenquimales (MSC) se realizaron en zPredicta, utilizando sistemas de matriz extracelular 3D específica de órgano como rStomach™. Se cocultivaron células madre mesenquimales de médula ósea (BM-MSCs) en rStomach™ con la línea celular de cáncer gástrico Nuc Red Light MKN-74 por cuadruplicado en un formato de 48 pocillos durante 12 días. Se había demostrado anteriormente que las células MKN-74 expresaban receptor de folato alfa (FR) suficiente para que el tratamiento de MORAb-202 indujera la apoptosis celular. Antes del cultivo, se evaluaron BM-MSC en cuanto a la expresión de antígeno diana y para los marcadores de diferenciación de MSC (tabla 40) mediante citometría de flujo.

Tabla 40. Marcadores de diferenciación de MSC

Población celular	Marcadores
Células madre mesenquimales (MSC)	Stro-1^+/$CD105^+$
Pre-adipocitos	$CD34^+$/$CD31^-$
Adipocitos	Oil red
Fibroblastos asociados con el cáncer (CAF)	alfa-actina de músculo liso (αSMA), vimentina
Pre-pericitos/pericitos	$NG2^+$, $CD13^+$, $CD146^+$
Todos	FRA

[00334] Los cultivos de rStomach™ se trataron con MORAb-202, anticuerpo MORAb-003 sin conjugar, eribulina o control, como se describe en la tabla 41. Los controles incluyeron cultivos no tratados y tratados con vehículo (PBS y DMSO). Se monitorizó la diferenciación de MSC mediante microscopía de luz. Una vez que se observó diferenciación visible, se recogieron las muestras para análisis de tinción y citometría de flujo.

Tabla 41. Tratamientos de cocultivo

Agente	**Concentraciones de trabajo**
MORAb-202	10 nM
MORAb-003 (anticuerpo sin conjugar)	10 nM
Eribulina	1,7 nM y 0,2 nM
PBS	
DMSO	0,1%
Control sin tratamiento	

1.4.2 Análisis del transcurso del tiempo del efecto de MORAb-202 sobre los fibroblastos asociados con el cáncer

[00335] Se prepararon ratones con tumor de xenoinjerto de H2110 subcutáneo como se describe en la sección 1.3.1. Se cosecharon muestras tumorales en los días 0, 3, 5, 7 y 9 después de la administración de vehículo o MORAb-202 a 5 mg/kg. Se procesaron las muestras tumorales recogidas en portaobjetos y se analizó la expresión de fibroblastos asociada con el cáncer mediante IHC como se describe en la sección 1.3.2.2.

2. Resultados

2.1 Análisis de citotoxicidad *in vitro*

2.1.1 Citotoxicidad de MORAb-202

[00336] Se evaluó la potencia *in vitro* de MORAb-202 utilizando un ensayo de cristal violeta como se describe en la sección 1.2.1. La detección se realizó en células IGROV1 ($FR^{hi\ (+++)}$), OVCAR3 ($FR^{med(++)}$), NCI-H2110 ($FR^{med(++)}$), A431-A3 ($FR^{lo(+/-)}$) y SJSA-1 ($FR^{neg(-)}$). Los resultados de esta detección se proporcionan en la figura 17 y la tabla 42.

Tabla 42. Detección de citotoxicidad (EC_{50}) de MORAb-202 en diversas líneas celulares tumorales

EC_{50} (nM)

IGROV I (FR+++)	OVCAR3 (FR++)	NCI-H2110 (FR++)	A431-A3 (FR+/-)	SJSA-1 (FR-)
0,01	0,16	0,74	23	> 100

[00337]MORAb-202 presentó citotoxicidad dependiente de la expresión del receptor de folato alfa contra líneas celulares tumorales y niveles bajos de destrucción fuera del objetivo. MORAb-202 demostró el mayor nivel de potencia (0,01 nM) sobre las células IGROV1, con citotoxicidad baja (> 100 nM) sobre las células SJSA-1 negativas de receptor de folato alfa. Se observó potencia intermedia en las células OVCAR3 y NCI-H2110 (0,16 nM y 0,74 nM).

2.2 Estudios *in vivo*

2.2.1 Eficacia de MORAb-202 en el modelo de xenoinjerto NC1-H2110

[00338]Se inyectaron ratones con tumor H2110 subcutáneo por vía intravenosa con vehículo o MORAb-202 a 1, 2,5 y 5 mg/kg. Se observó regresión tumoral significativa después de una dosis única de MORAb-202 a 5 mg/kg (figura 18 y tabla 43). Utilizando este modelo de xenoinjerto con expresión alta de receptor de folato alfa y administraciones de dosis únicas, se demostró que la ventana terapéutica para MORAb-202 era 1 mg/kg para el retraso del crecimiento tumoral (con enfermedad estable) y ≥ 2,5 mg/kg para la regresión tumoral. En este estudio, MORAb-202 en una dosis de 2,5 mg/kg produjo una respuesta parcial y MORAb-202 en una dosis de 5 mg/kg produjo una respuesta completa.

Tabla 43. Actividad antitumoral de MORAb-202 en el modelo de xenoinjerto NC1-H2110

	Volumen tumoral, mm^3 (inhibición del crecimiento tumoral, %)	
	Día 17	Día 31
Vehículo (n=5)	1583,4 ± 146,1 (100)	n/a
MORAb-202, 1 mg/kg, dosis única (n=5)	840,0 ± 76,8 (53,1)	n/a
MORAb-202, 2,5 mg/kg, dosis única (n=5)	60,8 ± 27,1 (3,8)	1173,2 ± 373,2
MORAb-202, 5 mg/kg, dosis única (n=4)	0,0 (0,0)	0 (0,0)

2.2.2 Eficacia de MORAb-202 en el modelo de PDx de NSCLC: LXFA-737

[00339] Se inyectaron ratones con tumor de PDx de NSCLC subcutáneo por vía intravenosa con vehículo, MORAb-003 a 5 mg/kg o MORAb-202 a 5 mg/kg. Una dosis única de MORAb-202 (5 mg/kg) provocó regresión tumoral significativa en este modelo, en contraste con una dosis única de anticuerpo MORAb-003 sin conjugar (5 mg/kg), que no demostró actividad antitumoral significativa (figura 19A). Cinco de los seis ratones totales tratados con MORAb-202 se consideraron libres de tumor en el día 32 del estudio (tabla 44) y cuatro permanecieron libres de tumor hasta el día 74 (finalización del estudio). Además, no se observó pérdida de peso corporal significativa en el grupo de tratamiento en comparación con el grupo de control tratado con vehículo, lo que indica ausencia de toxicidad durante el tratamiento (figura 19B).

Tabla 44. Actividad antitumoral de MORAb-202 en el modelo de PDx de NSCLC

	Volumen tumoral, mm^3 (inhibición del crecimiento tumoral, %)		
	Día 21	Día 32	Día 74
Vehículo (n=6)	1004,5 (100)	1561,3 (100)	n/a
MORAb-003, 5 mg/kg, dosis única (n=6)	860,7 (85,7)	1572,1 (100,7)	n/a
MORAb-202, 5 mg/kg, dosis única (n=6)	22,9 (2,3)	4,7 (0,3)	418,3 (4/6 libre de tumor)

2.2.3 Eficacia relativa de MORAb-202 y eribulina en modelos de PDx de cáncer endometrial: Endo-12961 y Endo-10590

[00340] Los xenoinjertos de Endo-12961 y Endo-10590 expresan niveles altos de receptor de folato alfa. Se inyectaron ratones con tumor de PDx de cáncer endometrial subcutáneo por vía intravenosa con PBS, eribulina a 3,2 mg/kg o 0,1 mg/kg o MORAb-202 a 5 mg/kg. La dosis máxima tolerada (MTD) de eribulina en este modelo es 3,2 mg/kg, mientras que 0,1 mg/kg es equivalente a la dosificación de eribulina proporcionada por MORAb-202 administrado a 5 mg/kg. A lo largo del comienzo del estudio, se observó actividad antitumoral significativa después del tratamiento con MORAb-202 (5 mg/kg) y la dosis de MTD de eribulina (3,2 mg/kg) en ambos modelos de animales, mientras que no se observó actividad antitumoral significativa después del tratamiento con eribulina a 0,1 mg/kg (figuras 20A y 20C). Sin embargo, los tumores con regresión en los ratones tratados con eribulina a 3,2 mg/kg

comenzaron a crecer nuevamente durante el estudio, mientras que no se detectó crecimiento nuevo del tumor significativo en los ratones tratados con MORAb-202. En este estudio, MORAb-202 resultó ser significativamente más eficaz que la eribulina. El tratamiento con eribulina también afectó transitoriamente el peso corporal en la primera semana después del tratamiento (figuras 20B y 20D). En cambio, no se observó pérdida de peso corporal en los animales tratados con MORAb-202.

2.3 Mecanismo de acción de MORAb-202

2.3.1 IHC y eficacia de MORAb-202 en el modelo de PDx de TNBC: OD-BRE-0631

[00341] Se inyectaron ratones con tumor de PDx de TNBC subcutáneo por vía intravenosa con vehículo o MORAb-202 a 5 mg/kg. Se recogió el tejido tumoral de los ratones en cada grupo antes del tratamiento (día 1) y después del tratamiento (día 8). Los análisis IHC de los tejidos tumorales recogidos revelaron que MORAb-202 ocupa células tumorales con expresión de receptor de folato alfa cinco días después del tratamiento (día 8), después de la administración en el día 3 como una dosis única (5 mg/kg). Se evaluó la ocupación celular utilizando un anticuerpo IgG anti-humano (figura 21A). También se demostró que el tratamiento con MORAb-202 disminuye la estructura de los fibroblastos asociados con el cáncer, como lo muestra la tinción IHC con un anticuerpo anti-α-actina de músculo liso (SMA)-FITC (figura 21B). En términos de eficacia, el tratamiento con MORAb-202 produjo regresión tumoral máxima 11 días después del tratamiento, lo cual se midió por un volumen tumoral relativo (RTV) de 0,62 (figura 21C).

2.3.2 Efecto de MORAb-202, MORAb-003 y eribulina sobre sistema de cocultivo 3D

[00342] Se cocultivaron células madre mesenquimales de médula ósea (BM-MSCs) en rStomach™ (zPredicta) con la línea celular de cáncer gástrico MKN-74 durante 12 días. Antes del cultivo, se evaluaron BM-MSC en cuanto a la expresión de receptor de folato alfa y para los marcadores de diferenciación de MSC mediante citometría de flujo. Los cultivos de rStomach™ se trataron con MORAb-202, anticuerpo MORAb-003 sin conjugar, eribulina o control. Una vez que se observó diferenciación MSC visible por microscopía de luz, se recogieron las muestras para análisis de tinción y citometría de flujo. Los resultados de estos análisis se muestran en la figura 22.

[00343] Una duración total del tratamiento de 7 días, con reabastecimiento del tratamiento durante este período, fue suficiente para producir un efecto medible sobre la diferenciación de BM-MSC humanas en cultivo con células MKN-74. Con respecto al control de vehículo, el tratamiento con MORAb-202 (10 nM) produjo un aumento en las poblaciones de MSC y adipocitos y una disminución en las poblaciones de pericitos (tabla 45). Estos datos indican que MORAb-202 puede tener un efecto significativo sobre el

microambiente tumoral.

Tabla 45. Efecto de MORAb-202, MORAb-003 y eribulina sobre sistema de cocultivo 3D

	Porcentaje de células vivas		
Tratamiento	**MSC**	**Adipocitos**	**Pericitos**
PBS	32,3 %	0,72%	14,6%
MORAb-202	43,7%	22,6%	11,4%
MORAb-003	37,1%	0,69%	24,0%
Eribulina	29,9%	2,68%	25,8%

2.3.3 Análisis del transcurso del tiempo del efecto de MORAb-202 sobre los fibroblastos asociados con el cáncer

[00344] Se cosecharon muestras tumorales de ratones portadores de tumores de xenoinjerto de H2110 subcutáneo en los días 0, 3, 5, 7 y 9 después de la administración de vehículo o MORAb-202 a 5 mg/kg. Se procesaron las muestras tumorales recogidas en portaobjetos y se analizó la expresión de fibroblastos asociada con el cáncer (CAF) mediante IHC. La estructura de red CAF, según lo evaluado y cuantificado por tinción con un anticuerpo anti-α-actina de músculo liso (SMA)-FITC, fue prominente en el día 3 y el día 5, después de la administración de una dosis única de MORAb-202 a 5 mg/kg (figura 23). Sin embargo, para el día 7, la mayor parte de esta estructura se disminuyó significativamente.

EJEMPLO 3

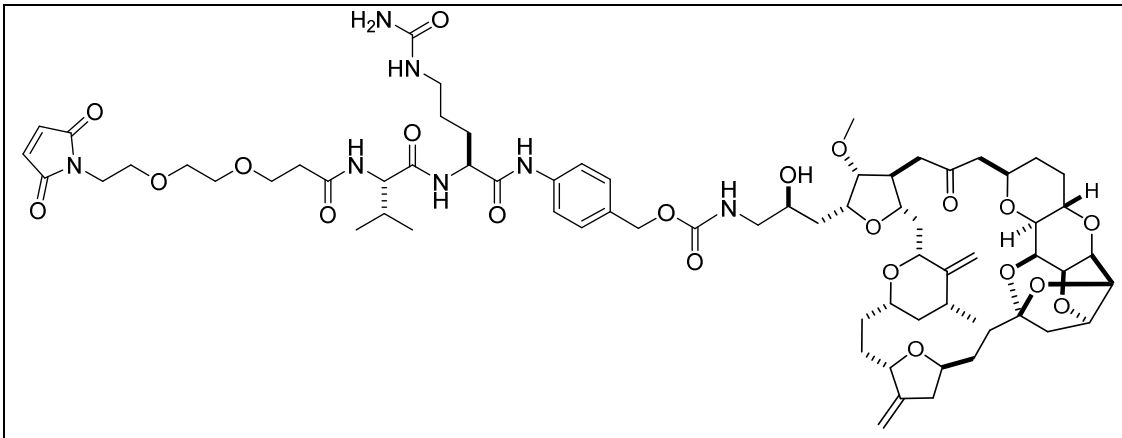
[0001] Materiales y métodos

[00345] Se sintetizaron los compuestos de eribulina conjugables con las estructuras que se muestran en la tabla 46 de acuerdo con los siguientes procedimientos y se utilizaron en la preparación de ADC (ejemplo 4).

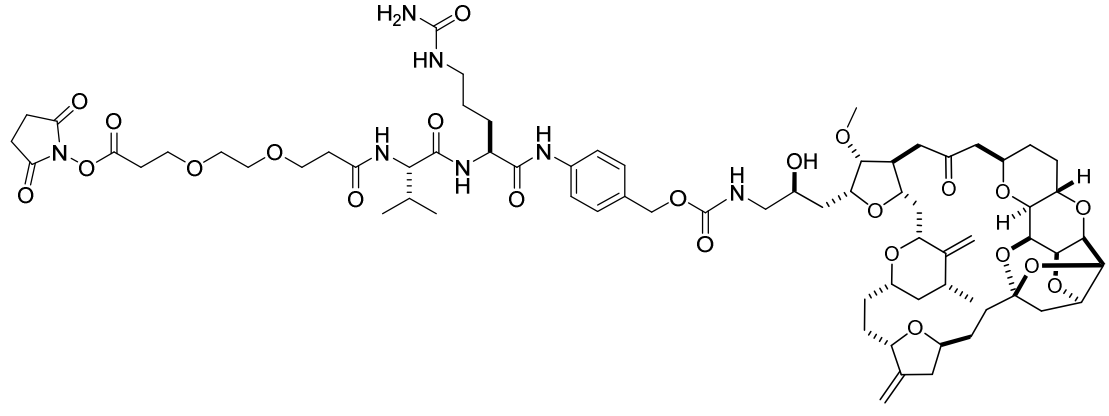
[00346] Todos los disolventes utilizados en las reacciones de síntesis fueron de grado anhidro (EMD Millipore). Todos los disolventes utilizados para el procesamiento o la purificación fueron de grado de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (EMD Millipore). A menos que se indique lo contrario, todos los químicos estaban disponibles en el mercado. Se realizó la cromatografía en columna utilizando una Biotage® SP4. La eliminación del disolvente se realizó utilizando o bien un evaporador giratorio (Büchi Labortechik AG) o un evaporador centrífugo (Genevac, SP scientific). La cromatografía líquida-espectrometría de masas preparativa (LC/MS) se realizó utilizando un sistema Waters AutoPurification System y una columna XTerra MS C18 (5 µm, 19 mm x 100 mm) en condiciones de

fase móvil ácida. Se obtuvieron los espectros de resonancia magnética nuclear (NMR) utilizando cloroformo deuterado ($CDCl_3$) a menos que se indique lo contrario y se registraron a 400 o 500 MHz utilizando un instrumento Varian (Agilent Technologies). Se obtuvieron los espectros de masa utilizando LC/MS de ultra rendimiento Waters Acquity. Según se utiliza en la presente, el término **"**inerte**"** se refiere al reemplazo del aire en un reactor (p. ej., un recipiente de reacción, un matraz, un reactor de vidrio) con un gas inerte, esencialmente libre de humedad, como nitrógeno o argón. Las multiplicidades se indican utilizando las siguientes abreviaturas: s=singlete, d=doblete, t=triplete, q=cuarteto, quint=quinteto, sxt=sexteto, m=multiplete, dd=doblete de dobletes, ddd=doblete de dobletes de dobletes, dt=doblete de tripletes, br s=un singlete amplio.

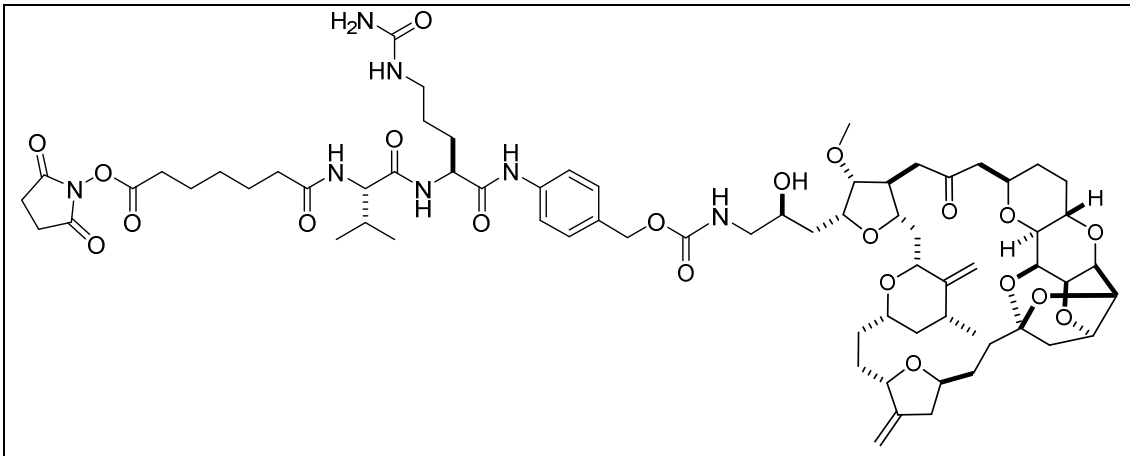
Tabla 46. Compuestos de eribulina conjugables



MAL-PEG2-Val-Cit-PAB-eribulina
(ER-001159569)

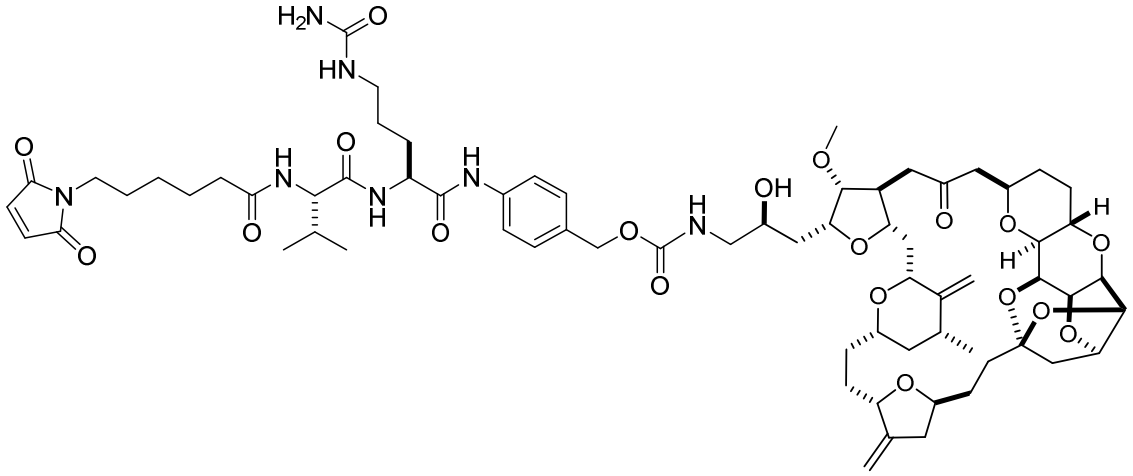


NHS-PEG2-Val-Cit-PAB-eribulina
(ER-001236940)



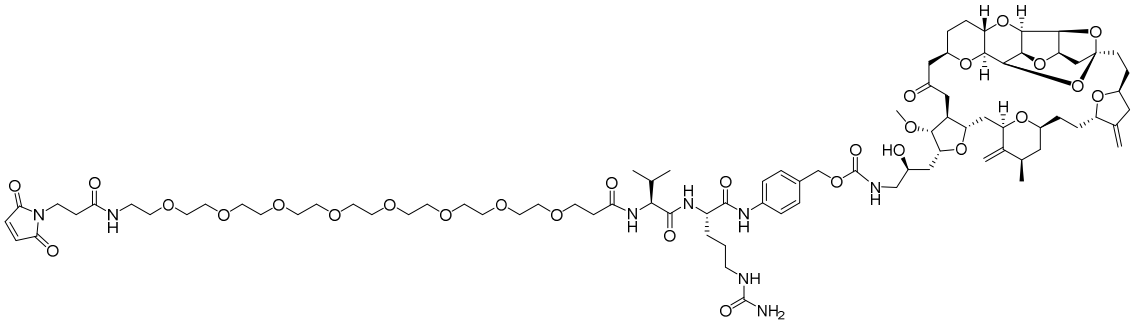
NHS-$(CH_2)_5$-Val-Cit-PAB-eribulina

(ER-001236941)



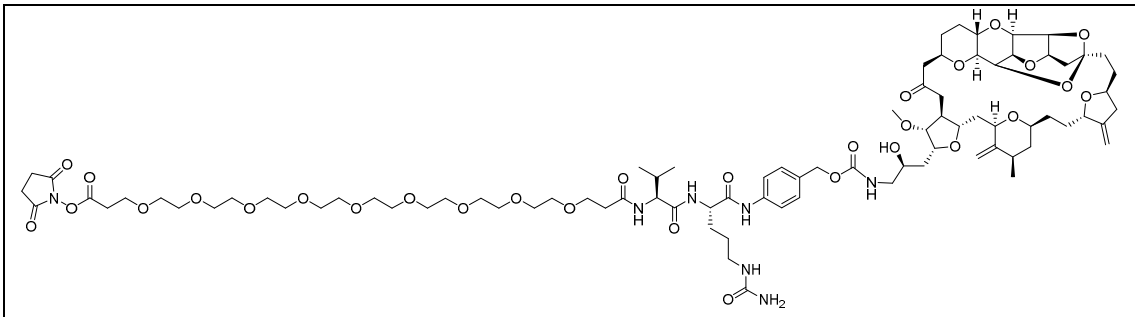
Mal-$(CH_2)_5$-Val-Cit-PAB-eribulina

(ER-001235638)



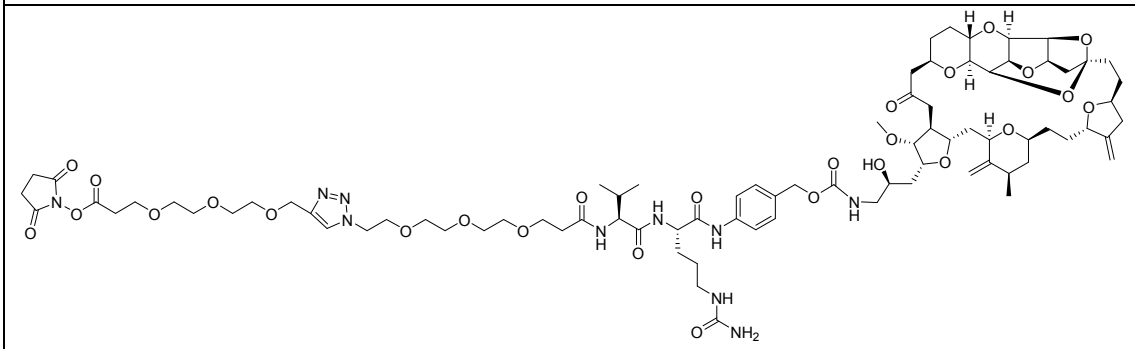
Mal-PEG8-Val-Cit-PAB-eribulina

(ER-001242287)



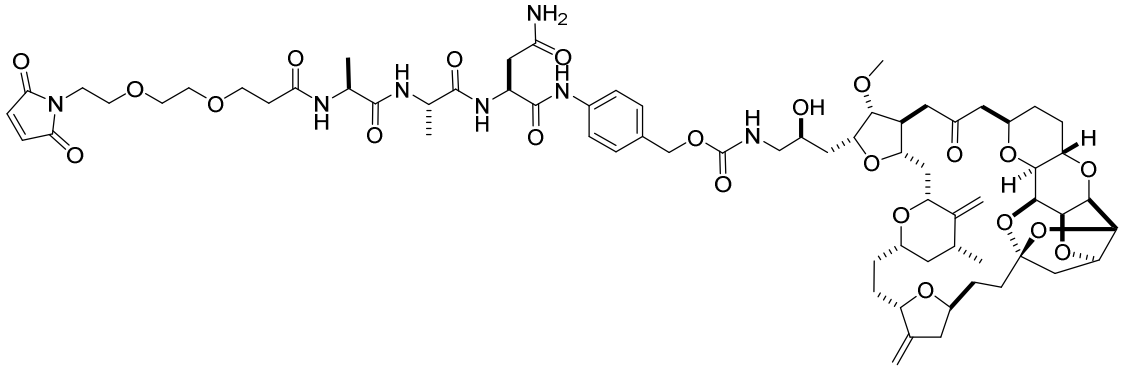
NHS-PEG9-Val-Cit-PAB-eribulina

(ER-001242288)



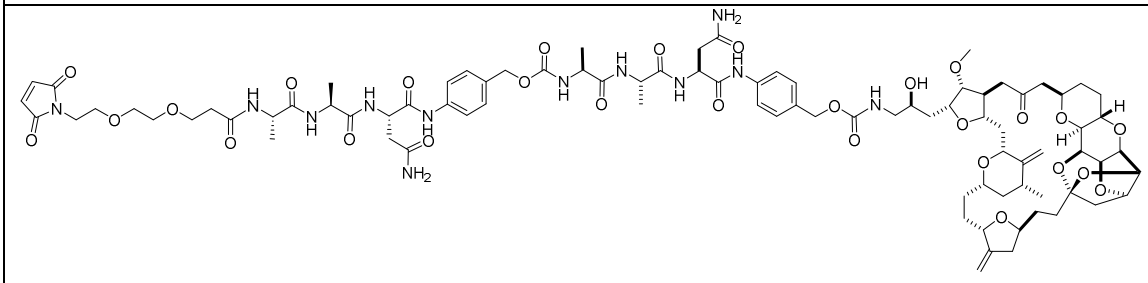
NHS-PEG3-triazol-PEG3-Val-Cit-PAB-eribulina

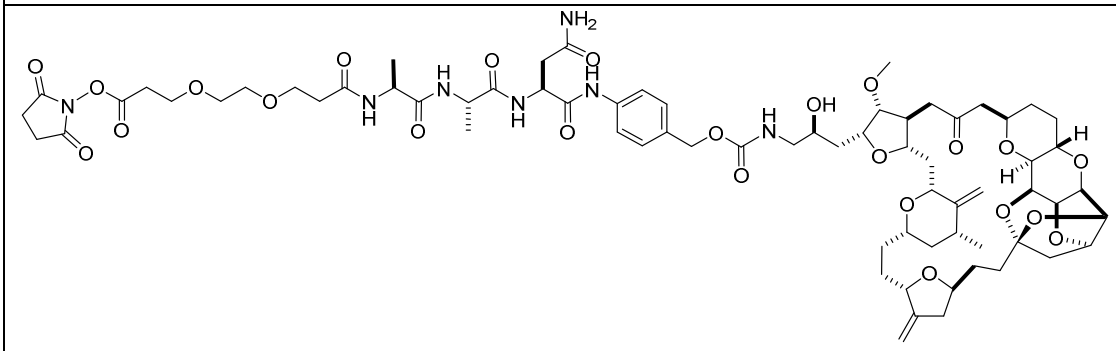
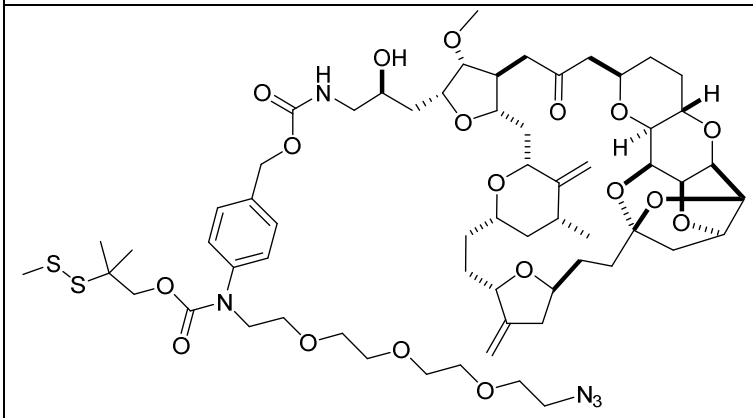
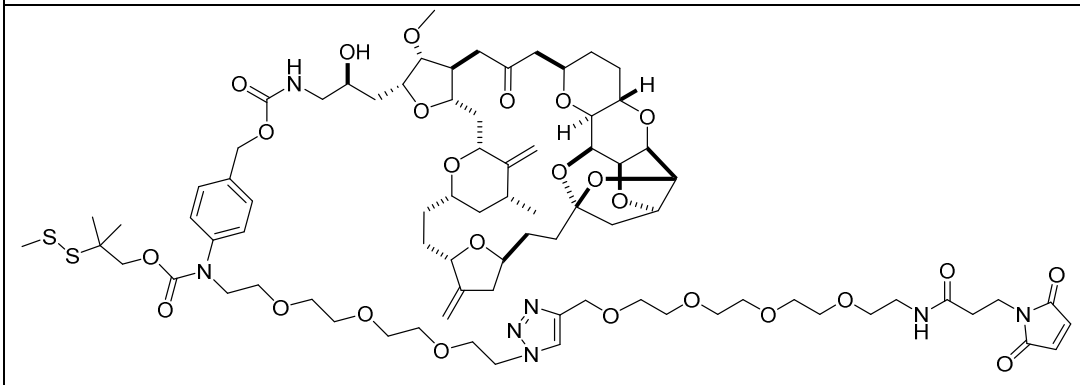
(ER-001243700)

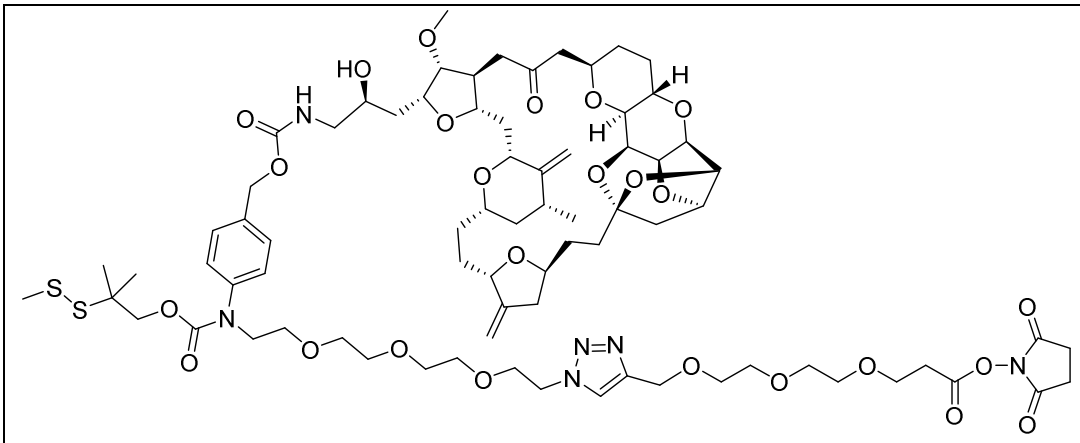


Mal-PEG2-Ala-Ala-Asn-PAB-eribulina

(ER-001231679)

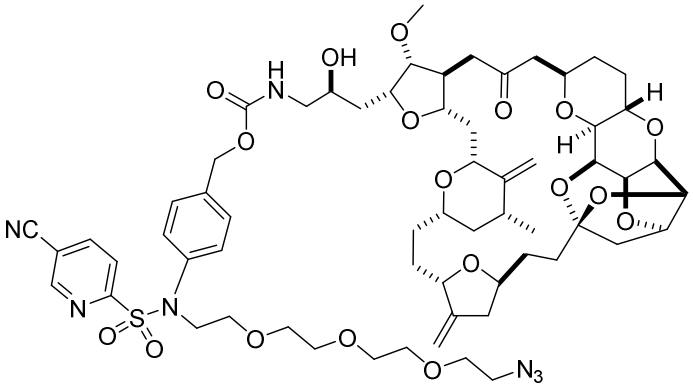


Mal-PEG2-(Ala-Ala-Asn-PAB)2-eribulina (ER-001231690)
 NHS-PEG2-Ala-Ala-Asn-PAB-eribulina (ER-001231691)
 Azida-PEG3-disulfide-PAB-eribulina (ER-001237508)
 Mal-PEG4-triazol-PEG3-disulfuro-PAB-eribulina (ER-001237504)



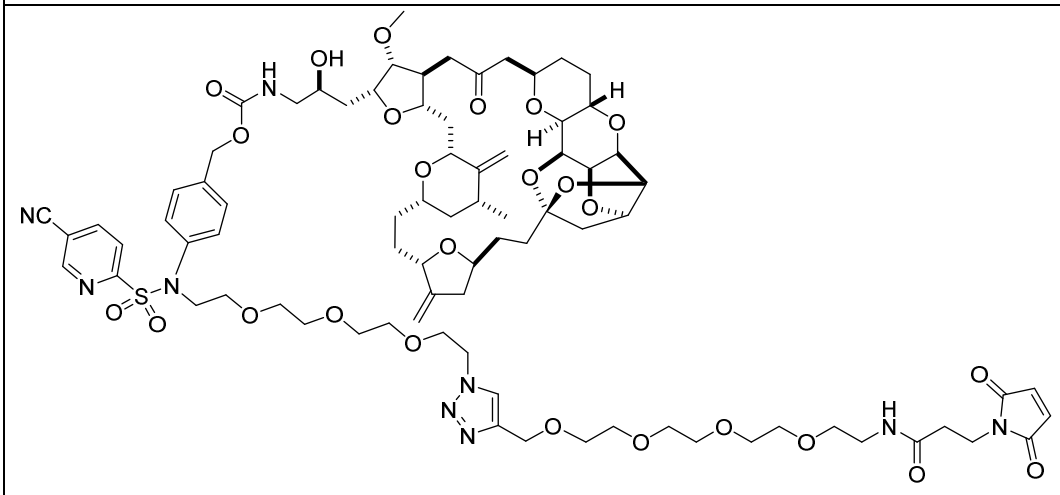
NHS-PEG3-triazol-PEG3-disulfuro-PAB-eribulina

(ER-001244129)



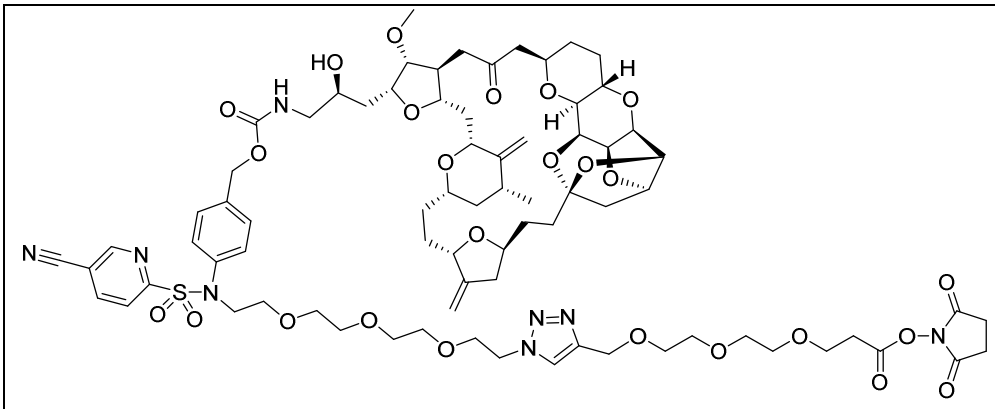
Azida-PEG3-sulfonamida-PAB-eribulina

(ER-001138856)



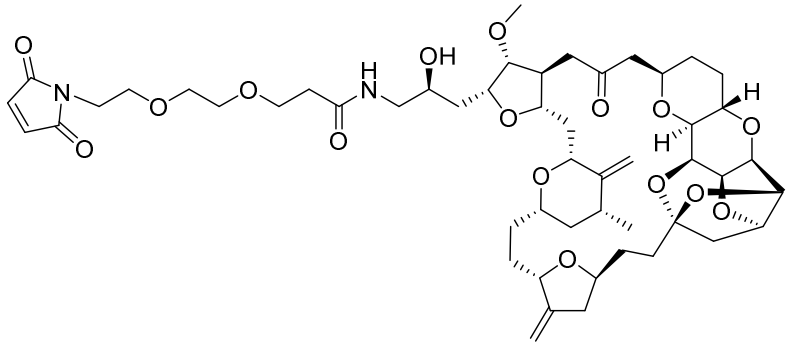
Mal-PEG4-triazol-PEG3-sulfonamida-PAB-eribulina

(ER-001237505)

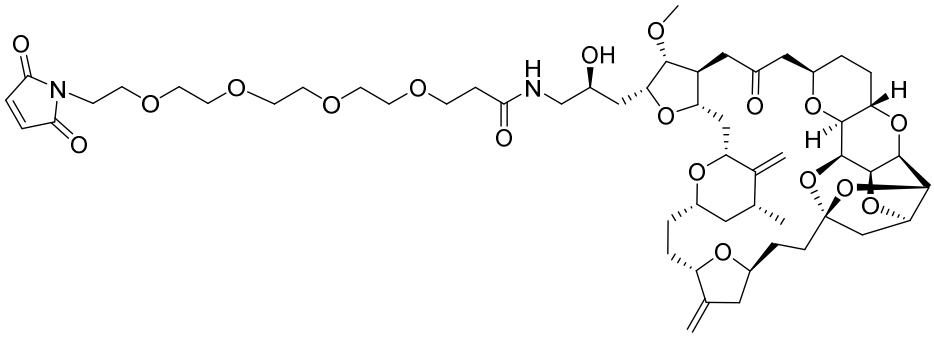


NHS-PEG3-triazol-PEG3-sulfonamida-PAB-eribulina

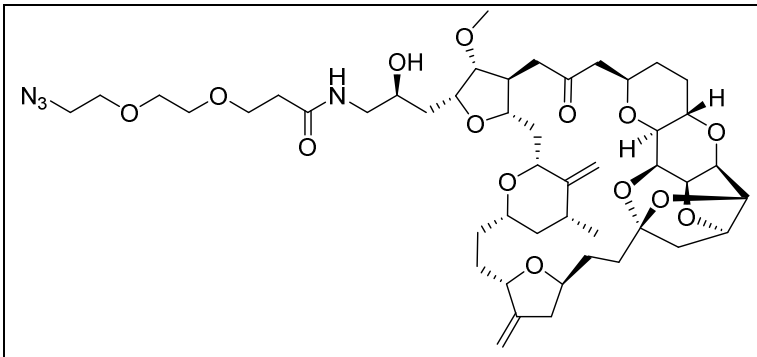
(ER-001244623)



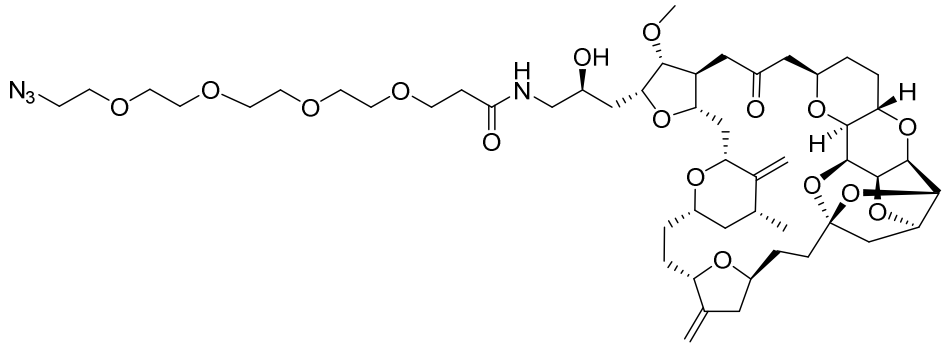
Mal-PEG2-eribulina



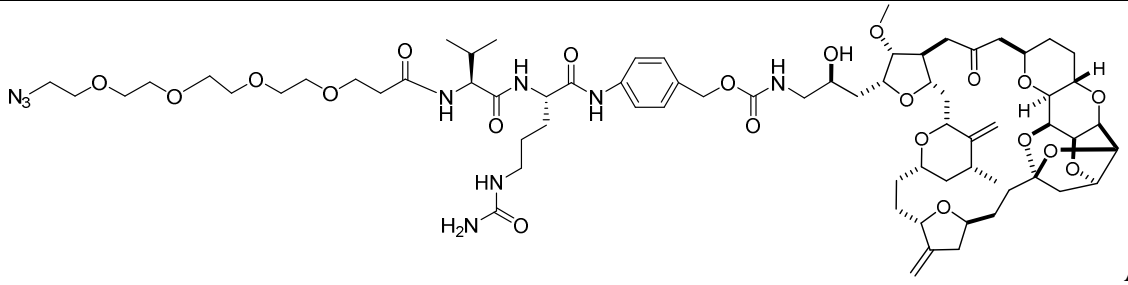
Mal-PEG4-eribulina



Azido-PEG2-eribulina

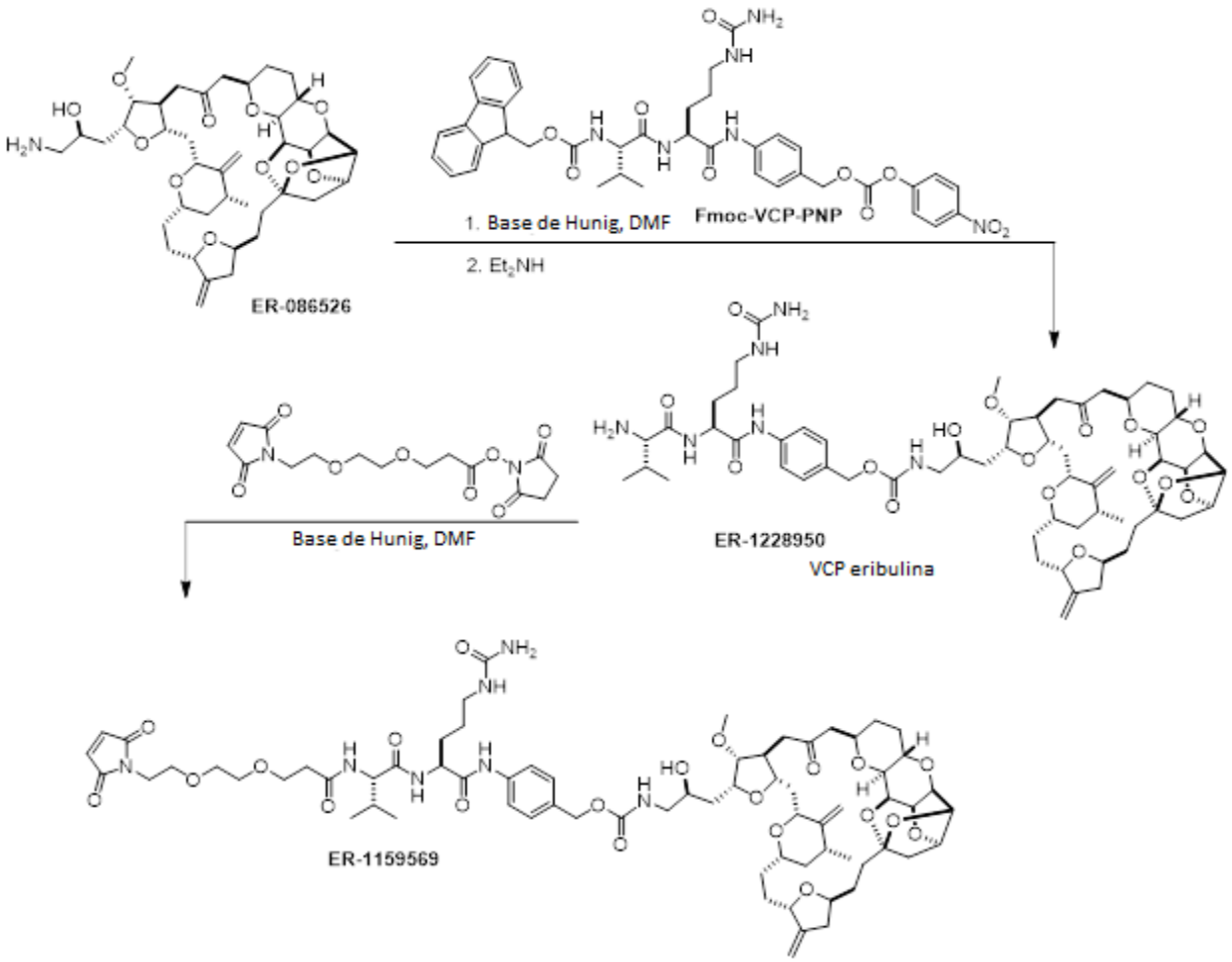


Azido-PEG4-eribulina



Azido-PEG4-Val-Cit-PAB-eribulina

1.1 Preparación de MAL-PEG2-Val-Cit-PAB-eribulina (ER-001159569)

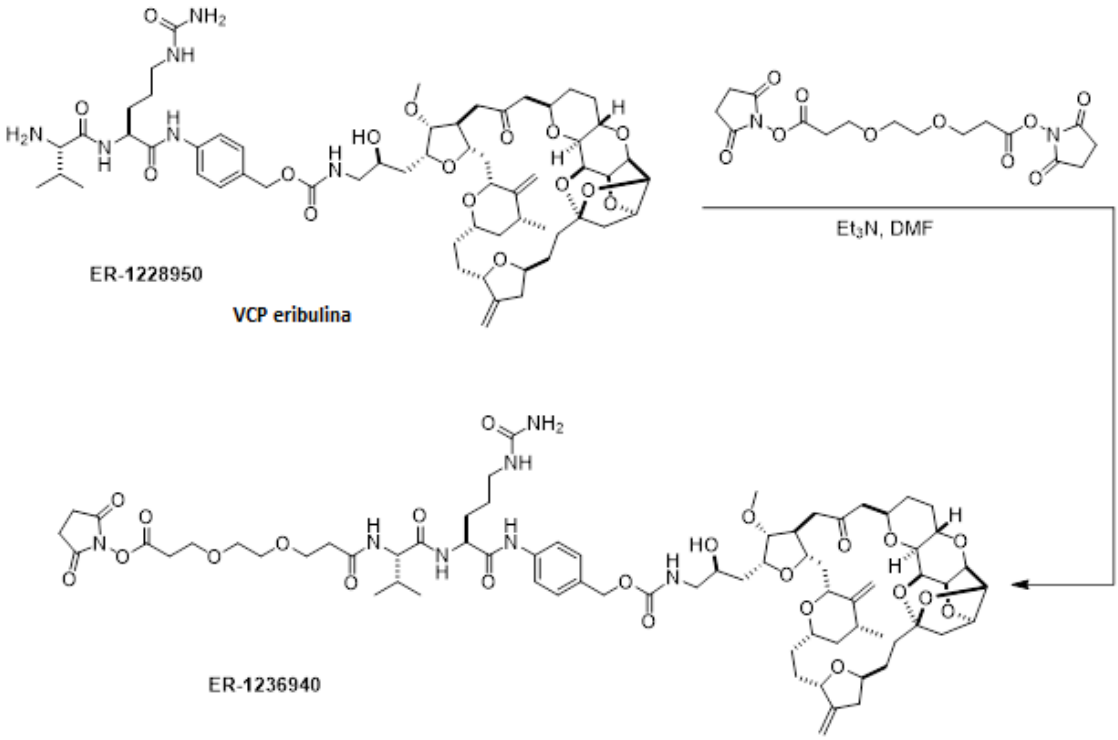


[00347] Se disolvió eribulina (ER-000086526) (61,5 mg, 0,074 mmol) en *N*,*N*-dimetilformamida (DMF) (6,0 mL) y después se mezcló con base de Hunig (0,027 mL, 0,156 mmol) y Fmoc-Val-Cit-PAB-PNP (86 mg, 0,112 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 18 horas hasta que finalizó el acoplamiento, según lo determinado por análisis de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Se añadió dietilamina (0,078 mL, 0,745 mmol) a la mezcla y se agitó la mezcla durante otras 2 horas hasta que finalizó la reacción. Se retiró el disolvente mediante evaporación y se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea para obtener Val-Cit-PAB-eribulina (ER-001228950) como un sólido blanco (60 mg, 71 % de rendimiento). ^{1}HNMR (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 7,56 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,32 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 5,14 (s, 1H), 5,06 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H), 5,03 (s, 1H), 5,01 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H), 4,87 (s, 1H), 4,83 (s, 1H), 4,71 (t, *J* = 4,4 Hz, 1H), 4,62 (t, *J* = 4,4 Hz, 1H), 4,57 (dd, *J* = 4,8, 8,8 Hz, 1H), 4,47 (d, *J* = 10,8 Hz, 1H), 4,32-4,27 (m, 2H), 4,18 (dd, *J* = 4,8, 6,4 Hz, 1H), 4,13-4,07 (m, 2H), 3,98 (t, *J* = 10,4 Hz, 1H), 3,88-3,82 (m, 3H), 3,76-3,70 (m, 4H), 3,60 (d, *J* = 6,0 Hz, 1H), 3,38 (s, 3H), 3,26-3,10 (m, 3H), 2,93 (dd, *J* = 2,0, 11,2 Hz, 1H), 2,91-2,84 (m, 1H), 2,75-2,64 (m, 2H), 2,44-2,29 (m,

5H), 2,21-1,97 (m, 8H), 1,93-1,83 (m, 3H), 1,79-1,72 (m, 5H), 1,68-1,29 (m, 8H), 1,11 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H), 1,07-1,01 (m, 1H), 1,06 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H), 1,02 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H). LCMS (M+H)=1135,7.

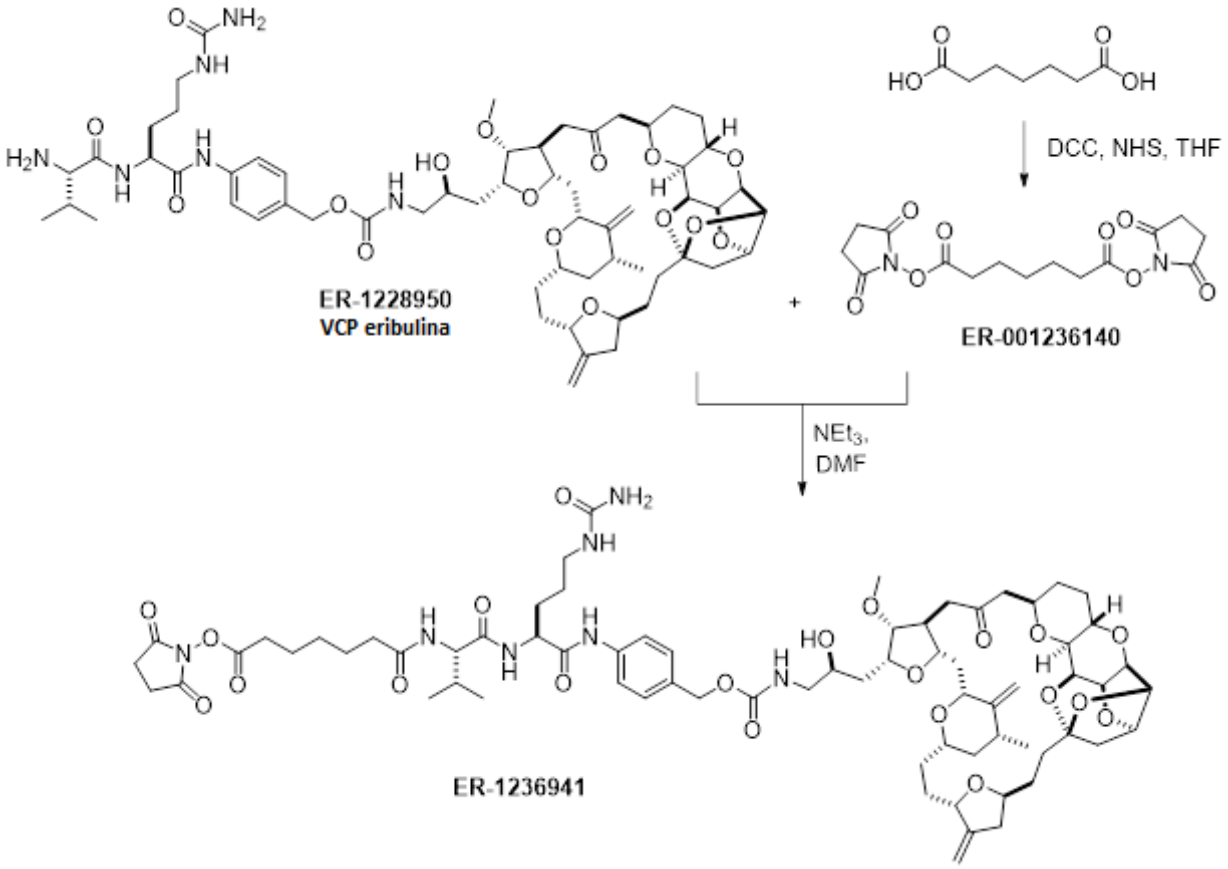
[00348] Se disolvió Val-Cit-PAB-eribulina (ER-001228950) (16 mg, 14 µmol) en DMF (1 mL). Se añadieron *N,N*-diisopropiletilamina (7,2 µL, 41 µmol) y Mal-PEG2-NHS (9,7 mg, 27 µmol) a esta solución a temperatura ambiente y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras completarse la reacción, se purificó la mezcla bruta mediante HPLC de fase inversa utilizando una fase móvil de acetonitrilo-agua que contenía ácido fórmico al 0,1 %. Se concentraron las fracciones recogidas al vacío a temperatura ambiente en un baño de agua no calentado para dar Mal-PEG2-Val-Cit-PAB-eribulina (ER-001159569) (7,1 mg, 5,2 µmol, 38 % de rendimiento). ^{1}HNMR (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 7,59 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,31 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 6,81 (s, 2H), 5,13 (s, 1H), 5,06 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H), 5,02 (s, 1H), 5,01 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H), 4,87 (s, 1H), 4,82 (s, 1H), 4,71 (t, *J* = 4,0 Hz, 1H), 4,61 (t, *J* = 4,4 Hz, 1H), 4,50 (dd, *J* = 5,2, 9,2 Hz, 1H), 4,47 (d, *J* = 10,8 Hz, 1H), 4,32-4,27 (m, 2H), 4,19 (dd, *J* = 6,8, 11,6 Hz, 1H), 4,13-4,07 (m, 2H), 3,98 (t, *J* = 10,4 Hz, 1H), 3,88-3,82 (m, 3H), 3,76-3,64 (m, 6H), 3,62-3,51 (m, 6H), 3,38 (s, 3H), 3,22-3,08 (m, 4H), 2,93 (dd, *J* = 2,4, 9,6 Hz, 1H), 2,92-2,84 (m, 1H), 2,76-2,63 (m, 2H), 2,52 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H), 2,44-2,29 (m, 5H), 2,21-1,97 (m, 8H), 1,93-1,83 (m, 3H), 1,80-1,66 (m, 5H), 1,66-1,28 (m, 10H), 1,11 (d, *J* = 6,4 Hz, 3H), 1,07-1,01 (m, 1H), 0,99 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H), 0,97 (d, *J* = 6,4 Hz, 3H). LCMS (M+H)=1374,9.

1.2 Preparación de NHS-PEG2-Val-Cit-PAB-eribulina (ER-001236940)



[00349] Se mezclaron Val-Cit-PAB-eribulina (ER-001228950) (45 mg, 0,04 mmol) y 3,3'-(etano-1,2-diilbis(oxi))dipropanoato de bis(2,5-dioxopirrolidin-1-ilo) (79 mg, 0,198 mmol) en DMF (1,5 mL) y después se añadió Et_3N (44,2 µl, 0,317 mmol). Se agitó la mezcla durante 18 horas hasta que se completó la reacción, según lo determinado por análisis HPLC. Se evaporó el disolvente y se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea para obtener NHS-PEG2-Val-Cit-PAB-eribulina (ER-001236940) como un sólido blanco (38 mg, 68 % de rendimiento). ^{1}HNMR (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 7,58 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,33 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 5,14 (s, 1H), 5,05 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H), 5,03 (s, 1H), 5,01 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H), 4,87 (s, 1H), 4,83 (s, 1H), 4,71 (t, *J* = 4,4 Hz, 1H), 4,62 (t, *J* = 4,4 Hz, 1H), 4,51 (dd, *J* = 4,8, 8,8 Hz, 1H), 4,50-4,47 (m, 1H), 4,32-4,27 (m, 2H), 4,21 (dd, *J* = 4,8, 6,4 Hz, 1H), 4,14-4,08 (m, 2H), 3,99 (t, *J* = 10,4 Hz, 1H), 3,88-3,82 (m, 3H), 3,78-3,70 (m, 4H), 3,62 (s, 2H), 3,62-3,58 (m, 1H), 3,50-3,46 (m, 2H), 3,39 (s, 4H), 3,36 (s, 3H), 3,22-3,08 (m, 3H), 2,93 (dd, *J* = 2,0, 11,2 Hz, 1H), 2,91-2,87 (m, 1H), 2,84 (s, 2H), 2,80 (s, 2H), 2,75-2,64 (m, 2H), 2,59-2,52 (m, 2H), 2,44-2,29 (m, 5H), 2,21-1,97 (m, 10H), 1,93-1,83 (m, 3H), 1,79-1,72 (m, 5H), 1,68-1,29 (m, 8H), 1,11 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H), 1,08-0,98 (m, 1H), 1,00 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H), 0,98 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H). LCMS (M+H)=1421,0.

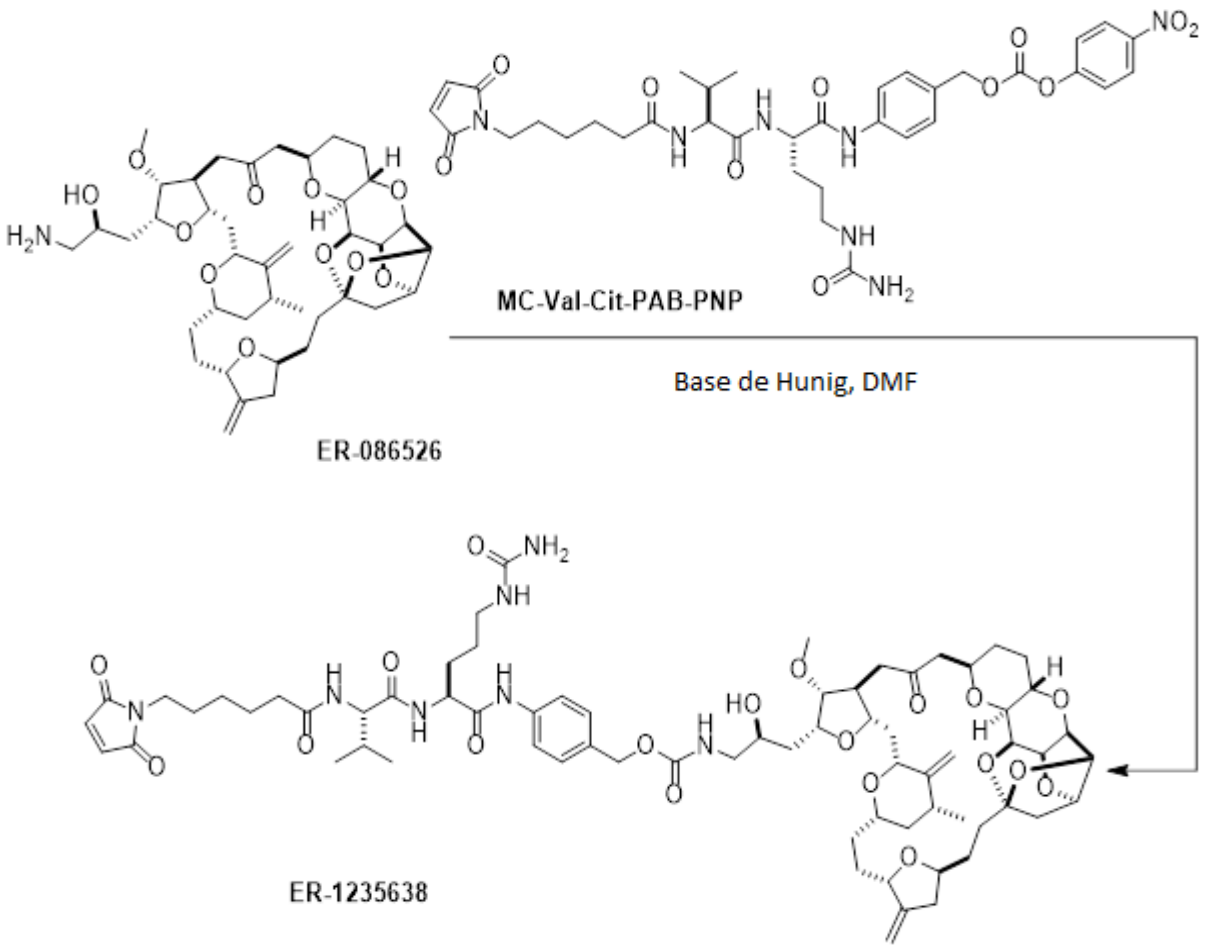
1.3 Preparación de NHS-$(CH_2)_5$-Val-Cit-PAB-eribulina (ER-001236941)



[00350] Se disolvió ácido heptanodioico (1,6 g, 9,99 mmol) en tetrahidrofurano (THF) (100 mL) y se añadió después 1-hidroxipirrolidina-2,5-diona (2,299 g, 19,98 mmol), seguido del añadido de DCC (4,12 g, 19,98 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 18 horas hasta que el análisis HPLC indicó que la reacción se había completado. Se retiró el sólido mediante filtración a través de una almohadilla de celite y se lavó con THF (3 x 2 mL). Se concentró el filtrado combinado y se purificó mediante cromatografía instantánea para dar heptanodioato de bis(2,5-dioxopirrolidin-1-ilo) (ER-001236140) como un sólido blanco (2,5 g, 71 % de rendimiento). ^{1}HNMR (400 MHz) δ ppm 2,83 (s, 8H), 2,64 (t, *J* = 7,6 Hz, 4H), 1,80 (dt, *J* = 7,6 Hz, 4H), 1,59-1,51 (m, 2H). LCMS (M+H)=355,2.

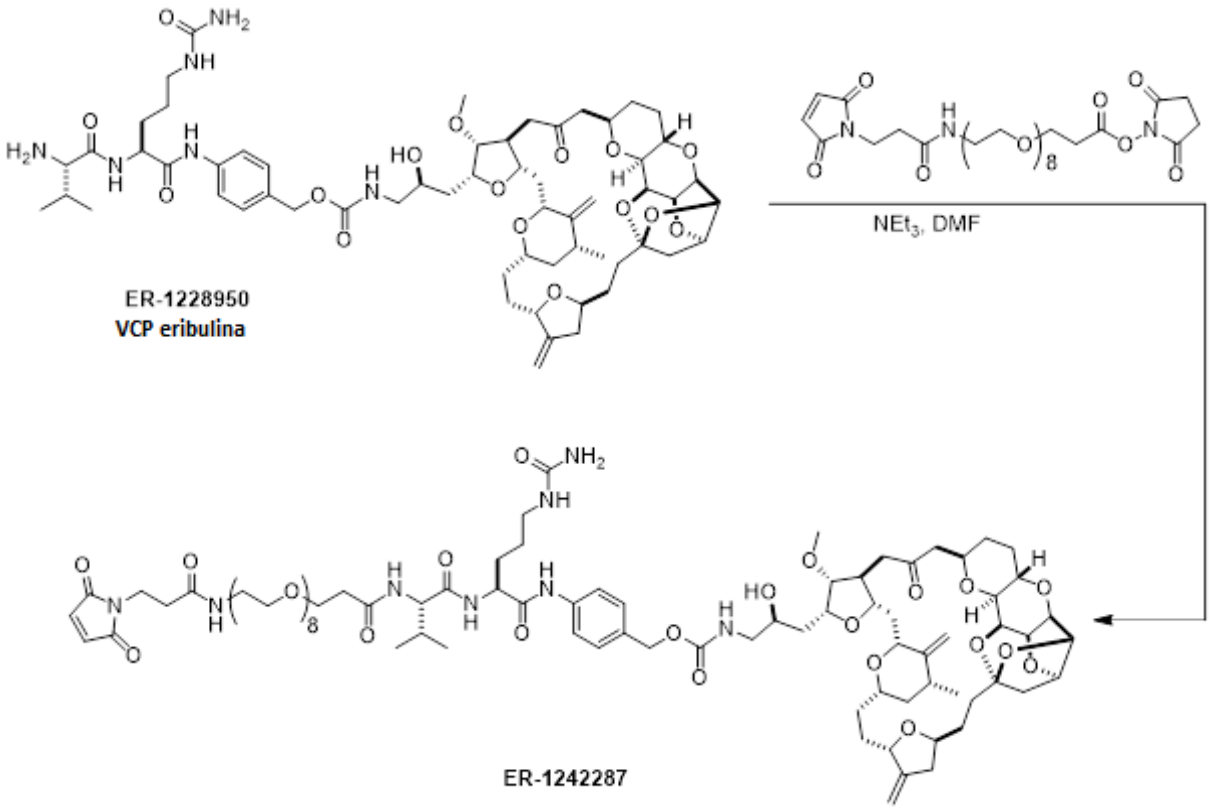
[00351] Se preparó NHS-$(CH_2)_5$-Val-Cit-PAB-eribulina (ER-001236941) (8,5 mg, 47 % de rendimiento) a partir de VCP-eribulina (ER-001228950) y heptanodioato de bis(2,5-dioxopirrolidin-1-ilo) (ER-001236140) utilizando el mismo procedimiento que se describió anteriormente para la preparación de NHS-PEG2-Val-Cit-PAB-eribulina (ER-001236940). ^{1}HNMR (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 7,56 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,30 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 5,13 (s, 1H), 5,04 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H), 5,01 (s, 1H), 5,00 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H), 4,86 (s, 1H), 4,82 (s, 1H), 4,70 (t, *J* = 4,4 Hz, 1H), 4,60 (t, *J* = 4,4 Hz, 1H), 4,50 (dd, *J* = 4,8, 8,8 Hz, 1H), 4,46 (d, *J* = 10,8 Hz, 1H), 4,36-4,25 (m, 2H), 4,17 (dd, *J* = 4,8, 6,4 Hz, 1H), 4,13-4,06 (m, 2H), 3,97 (t, *J* = 10,4 Hz, 1H), 3,87-3,80 (m, 3H), 3,74-3,68 (m, 2H), 3,37 (s, 3H), 3,20-3,06 (m, 4H), 2,94 (dd, *J* = 2,0, 11,2 Hz, 1H), 2,90-2,82 (m, 1H), 2,82 (s, 4H), 2,74-2,65 (m, 2H), 2,61 (t, *J* = 8,0 Hz, 2H), 2,46-2,26 (m, 7H), 2,24-1,81 (m, 13H), 1,78-1,28 (m, 19H), 1,10 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H), 1,06-0,96 (m, 1H), 0,97 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H), 0,95 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H). LCMS (M+H)=1375,1.

1.4 Preparación de Mal-$(CH_2)_5$-Val-Cit-PAB-eribulina (ER-001235638)



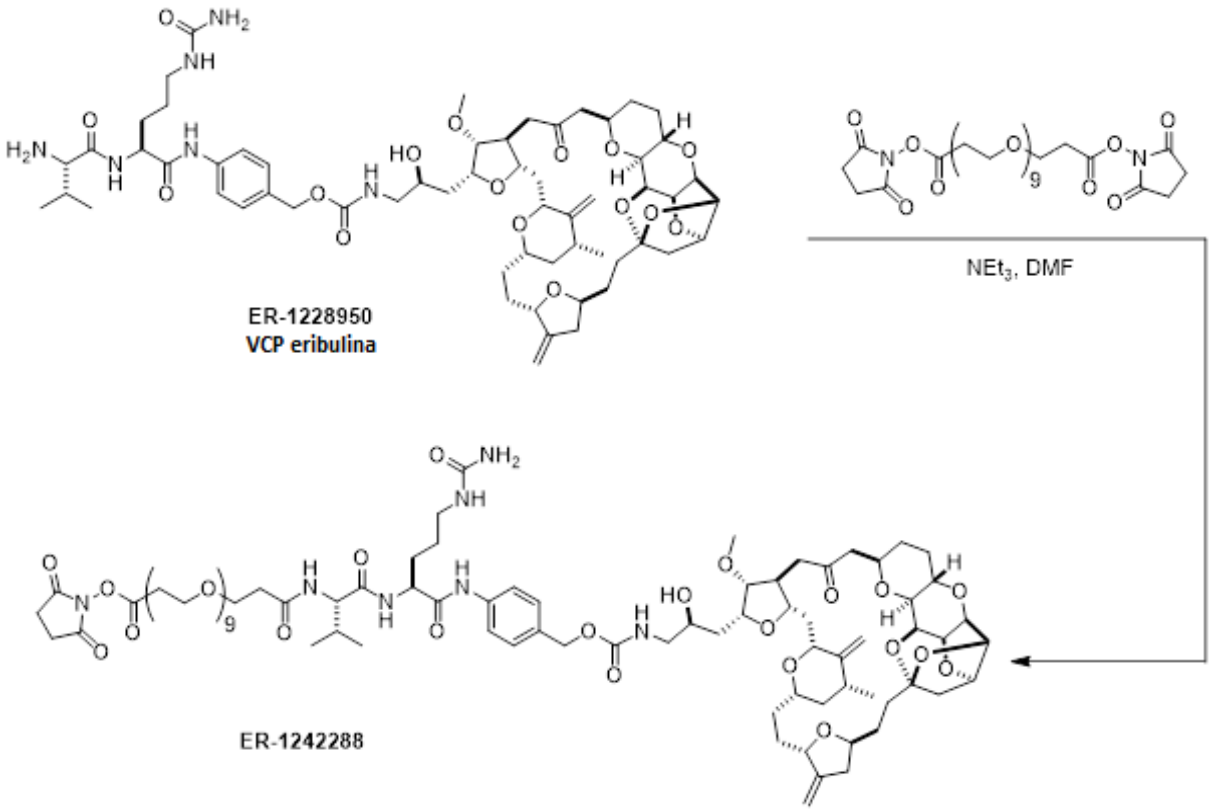
[00352] Se disolvió eribulina (ER-000086526) (10 mg, 0,012 mmol) en DMF (1 mL), y se mezcló con MC-Val-Cit-PAB-PNP (9,02 mg, 0,012 mmol) y base de Hunig (4,44 µL, 0,025 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 12 horas hasta que el análisis HPLC indicó que la reacción se había completado. Se concentró la mezcla de reacción y se purificó mediante cromatografía instantánea para dar Mal-$(CH_2)_5$-Val-Cit-PAB-eribulina (ER-001235638) como un sólido blanco (11,3 mg, 63 % de rendimiento). ^{1}HNMR (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 7,57 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,31 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 6,79 (s, 2H), 5,13 (s, 1H), 5,05 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H), 5,02 (s, 1H), 5,00 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H), 4,87 (s, 1H), 4,83 (s, 1H), 4,71 (t, *J* = 4,4 Hz, 1H), 4,61 (t, *J* = 4,4 Hz, 1H), 4,56-4,46 (m, 3H), 4,35-4,27 (m, 2H), 4,20-4,07 (m, 4H), 3,98 (t, *J* = 10,8 Hz, 1H), 3,87-3,83 (m, 3H), 3,73-3,70 (m, 2H), 3,48 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 3,38 (s, 3H), 3,20-3,08 (m, 4H), 2,93 (dd, *J* = 1,6, 9,6 Hz, 1H), 2,89-2,85 (m, 1H), 2,69 (dt, *J* = 11,2, 16,8 Hz, 2H), 2,44-2,33 (m, 5H), 2,27-1,83 (m, 13H), 1,78-1,68 (m, 5H), 1,66-1,27 (m, 14H), 1,11 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H), 1,07-0,98 (m, 1H), 0,98 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H), 0,96 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H). LCMS (M+H)=1328,9.

1.5 Preparación de Mal-PEG8-Val-Cit-PAB-eribulina (ER-001242287)



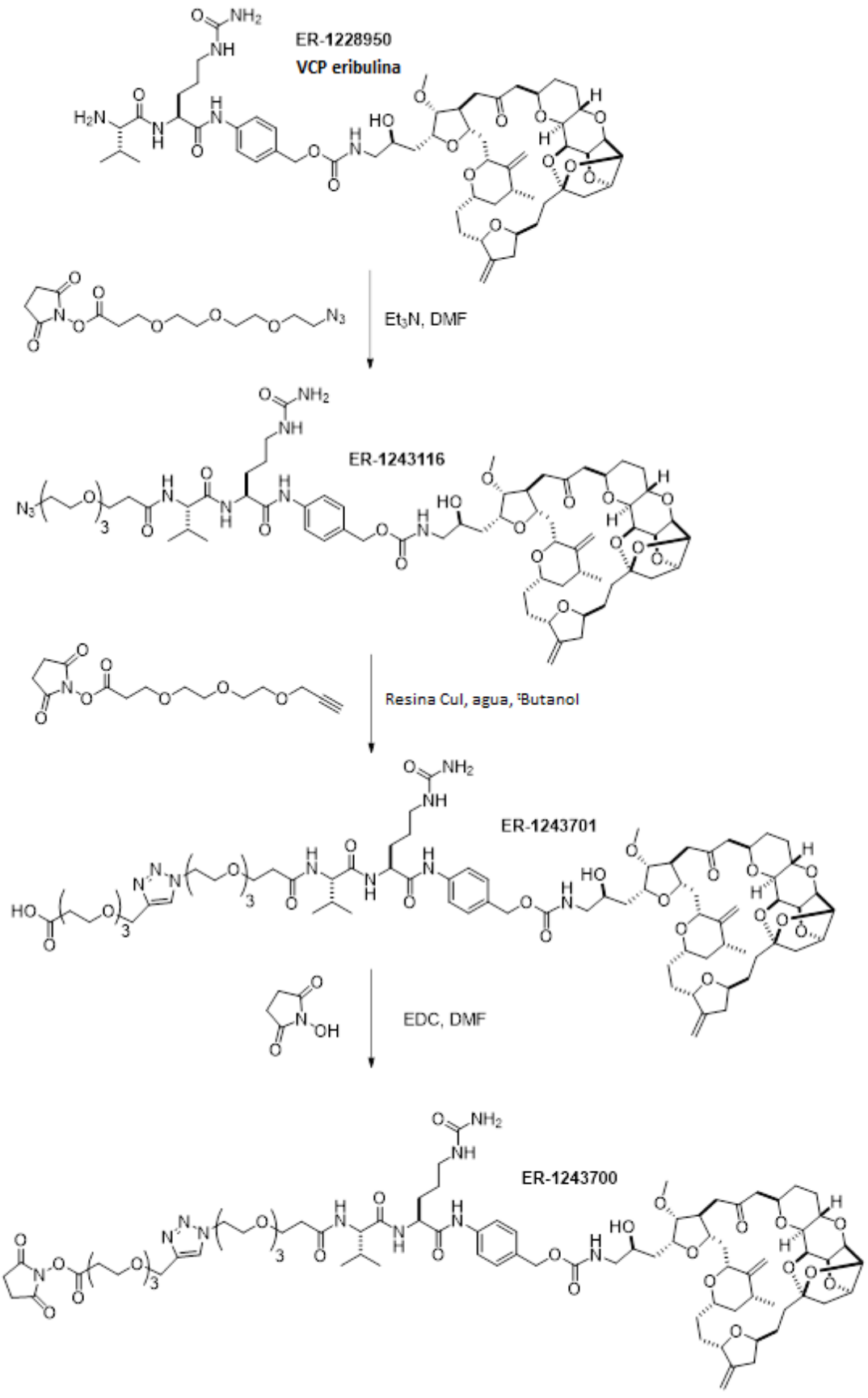
[00353] Se mezclaron VCP-eribulina (ER-001228950) (10 mg, 8,808 µmol) y 1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-3-oxo-7,10,13,16,19,22,25,28-octaoxa-4-azahentriacontan-31-oato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (6,07 mg, 8,808 µmol) en DMF (1 mL), seguido del añadido de Et_3N (9,82 µl, 0,07 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 18 horas hasta que el análisis HPLC indicó que la reacción se había completado. Se retiró el disolvente mediante evaporación y se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea para dar Mal-PEG8-Val-Cit-PAB-eribulina (ER-001242287) como un sólido blanco (3,0 mg, 20 % de rendimiento). ^{1}HNMR (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 7,58 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,29 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 6,80 (s, 2H), 5,12 (s, 1H), 5,04 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H), 5,01 (s, 1H), 4,99 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H), 4,85 (s, 1H), 4,80 (s, 1H), 4,69 (t, *J* = 4,4 Hz, 1H), 4,59 (t, *J* = 4,4 Hz, 1H), 4,50-4,42 (m, 2H), 4,32-4,24 (m, 2H), 4,20-4,14 (m, 2H), 4,12-4,04 (m, 3H), 3,96 (t, *J* = 10,4 Hz, 1H), 3,86-3,80 (m, 3H), 3,76-3,57 (m, 4H), 3,48 (t, *J* = 6,0 Hz, 1H), 3,36 (s, 3H), 3,20-3,08 (m, 3H), 2,91 (dd, *J* = 2,0, 11,2 Hz, 1H), 2,90-2,82 (m, 1H), 2,74-2,60 (m, 2H), 2,44-2,29 (m, 5H), 2,21-1,97 (m, 10H), 1,93-1,83 (m, 3H), 1,79-1,20 (m, 19H), 1,09 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H), 1,04-0,98 (m, 1H), 0,99 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H), 0,97 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H). LCMS (M+H)=1711,6.

1.6 Preparación de NHS-PEG9-Val-Cit-PAB-eribulina (ER-001242288)



[00354] Se preparó NHS-PEG9-Val-Cit-PAB-eribulina (ER-001242288) (13 mg, 85% de rendimiento) a partir de VCP-eribulina (ER-001228950) y BisNHS-PEG9 utilizando el mismo procedimiento que se describió anteriormente para la preparación de NHS-PEG2-Val-Cit-PAB-eribulina (ER-001236940). ^{1}HNMR (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 7,61 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,32 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 5,16 (s, 1H), 5,06 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H), 5,01 (s, 1H), 5,00 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H), 4,87 (s, 1H), 4,82 (s, 1H), 4,71 (t, *J* = 4,4 Hz, 1H), 4,61 (t, *J* = 4,4 Hz, 1H), 4,52-4,45 (m, 2H), 4,34-4,26 (m, 2H), 4,20-4,19 (m, 1H), 4,14-4,06 (m, 2H), 3,98 (t, *J* = 10,4 Hz, 1H), 3,88-3,80 (m, 3H), 3,76-3,70 (m, 4H), 3,66-3,58 (m, 37H), 3,38 (s, 3H), 3,24-3,10 (m, 3H), 2,93 (dd, *J* = 2,0, 11,2 Hz, 1H), 2,91-2,84 (m, 1H), 2,84 (s, 4H), 2,76-2,64 (m, 2H), 2,58-2,50 (m, 4H), 2,46-2,28 (m, 5H), 2,22-1,96 (m, 8H), 1,91-1,82 (m, 3H), 1,79-1,68 (m, 5H), 1,64-1,24 (m, 8H), 1,11 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H), 1,08-0,96 (m, 1H), 0,99 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H), 0,97 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H). LCMS (M+H)=1729,7.

1.7 Preparación de NHS-PEG3-triazol-PEG3-Val-Cit-PAB-eribulina (ER-001243700)


ER-1228950
VCP eribulina
Et3N, DMF
ER-1243116
Resina CuI, agua, tButanol
ER-1243701
EDC, DMF
ER-1243700

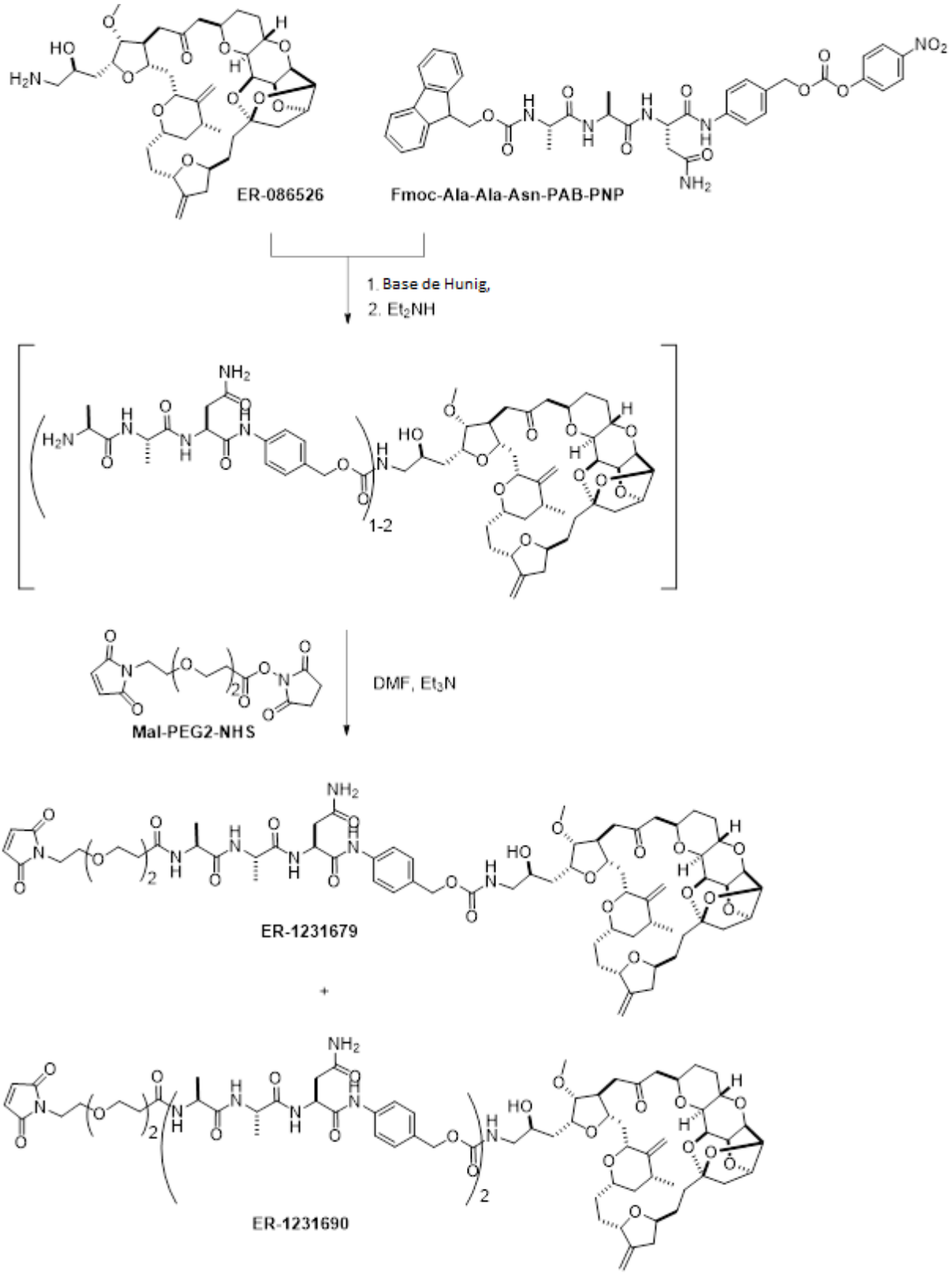
[00355] Se disolvió VCP-eribulina (ER-001228950) (25 mg, 0,022 mmol) en DMF (2,5 mL) y después se mezcló con Et_3N (24,55 µl, 0,176 mmol) y Azida-PEG3-NHS (8,34 mg, 0,024 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 18 horas hasta que el análisis HPLC indicó que la reacción se había completado. Se concentró la mezcla al vacío y se purificó el residuo mediante prep-HPLC (MeCN y agua con ácido fórmico al 0,1 %). Se extrajeron las fracciones que contenían azida-PEG3-Val-Cit-PAB-eribulina con diclorometano (CH_2Cl_2) (3 x 20 mL) y se evaporó el CH_2Cl_2 para obtener azida-PEG3-Val-Cit-PAB-eribulina (ER-001243116) como un sólido blanco (18,9 mg, 63 % de rendimiento). ^{1}HNMR (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 7,58 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,30 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 5,14 (s, 1H), 5,04 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H), 5,03 (s, 1H), 5,01 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H), 4,85 (s, 1H), 4,81 (s, 1H), 4,70 (t, *J* = 4,4 Hz, 1H), 4,61 (t, *J* = 4,4 Hz, 1H), 4,52-4,48 (m, 2H), 4,31-4,25 (m, 2H), 4,20-4,15 (m, 1H), 4,13-4,07 (m, 2H), 3,99 (t, *J* = 10,4 Hz, 1H), 3,84-3,79 (m, 3H), 3,77-3,65 (m, 4H), 3,64-3,56 (m, 13H), 3,38 (s, 3H), 3,20-3,05 (m, 3H), 2,95-2,80 (m, 2H), 2,75-2,60 (m, 2H), 2,55-2,50 (m, 2H), 2,43-2,25 (m, 5H), 2,21-1,97 (m, 8H), 1,93-1,83 (m, 3H), 1,79-1,72 (m, 5H), 1,68-1,29 (m, 10H), 1,08 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H), 1,05-0,95 (m, 1H), 0,98 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H), 0,95 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H). LCMS (M+H)=1365,1.

[00356] Se mezclaron azida-PEG3-VCP-eribulina (ER-001243116) (9,6 mg, 7,035 µmol) y 3-(2-(2-(prop-2-in-1-iloxi)etoxi)etoxi)propanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (6,61 mg, 0,021 mmol) en agua (0,6 mL) y t-butanol (1,8 mL). Se burbujeó la mezcla con N_2 durante 45 min. Se añadió yoduro de cobre en amberlyst-21 (1,23 mmol/g, 10 mg) a la mezcla y se burbujeó N_2 a través de la mezcla durante otros 30 min. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 72 horas hasta el consumo completo del material de partida. No se observó producto de éster de NHS deseado mediante análisis LCMS, solo el ácido carboxílico hidrolizado. Se filtró la mezcla a través de una almohadilla de celite corta para retirar la resina de CuI. Se concentró el filtrado al vacío y se purificó el residuo resultante mediante cromatografía de capa fina preparativa (prep-TLC) (20 % MeOH/CH_2Cl_2) para obtener acid-PEG3-triazol-PEG3-Val-Cit-PAB-eribulina (ER-001243701) como un sólido blanco (3,7 mg, 33 % de rendimiento). LCMS (ES) (M+H)=1581,2.

[00357] Se disolvió ácido-PEG3-triazol-PEG3-Val-Cit-PAB-eribulina (ER-001243701) (3,0 mg, 1,898 µmol) en DMF (200 µL) y 1-hidroxipirrolidina-2,5-diona (0,437 mg, 3,796 µmol), seguido del añadido de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) (0,728 mg, 3,796 µmol). Se completó aproximadamente el 50 % de la reacción después de agitar a temperatura ambiente durante 18 horas. Se añadió EDC (1,46 mg, 7,8 µmol) y se agitó la mezcla durante otras 18 horas hasta que el análisis de HPLC indicó >95 % de conversión a NHS-PEG3-triazol-PEG3-Val-Cit-PAB-eribulina. Se concentró la

mezcla al vacío y se purificó el residuo mediante prep-TLC (15 % MeOH/CH_2Cl_2) para dar NHS-PEG3-triazol-PEG3-Val-Cit-PAB-eribulina (ER-001243700) como un sólido blanco (2,2 mg, 69 % de rendimiento). ^{1}HNMR (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 8,00 (s, 1H), 7,59 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,31 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 5,13 (s, 1H), 5,04 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H), 5,02 (s, 1H), 5,00 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H), 4,87 (s, 1H), 4,83 (s, 1H), 4,71 (t, *J* = 4,0 Hz, 1H), 4,63 (s, 2H), 4,61 (t, *J* = 4,4 Hz, 1H), 4,57-4,55 (m, 2H), 4,51-4,45 (m, 1H), 4,32-4,28 (m, 2H), 4,21-4,17 (m, 2H), 4,13-4,10 (m, 2H), 3,98 (t, *J* = 10,8 Hz, 1H), 3,88-3,80 (m, 5H), 3,75-3,70 (m, 4H), 3,68-3,55 (m, 18H), 3,45-3,40 (m, 2H), 3,38 (s, 3H), 3,20-3,08 (m, 4H), 2,93-2,80 (m, 2H), 2,75-2,50 (m, 2H), 2,68 (s, 4H), 2,48-2,30 (m, 7H), 2,28-1,92 (m, 10H), 1,90-1,68 (m, 8H), 1,65-1,27 (m, 8H), 1,11 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H), 1,05-0,95 (m, 1H), 0,99 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H), 0,97 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H). LCMS (M+H)=1678,3.

1.8 Preparación de Mal-PEG2-Ala-Ala-Asn-PAB-eribulina (ER-001231679) y Mal-PEG2-(Ala-Ala-Asn-PAB)2-eribulina (ER-001231690)



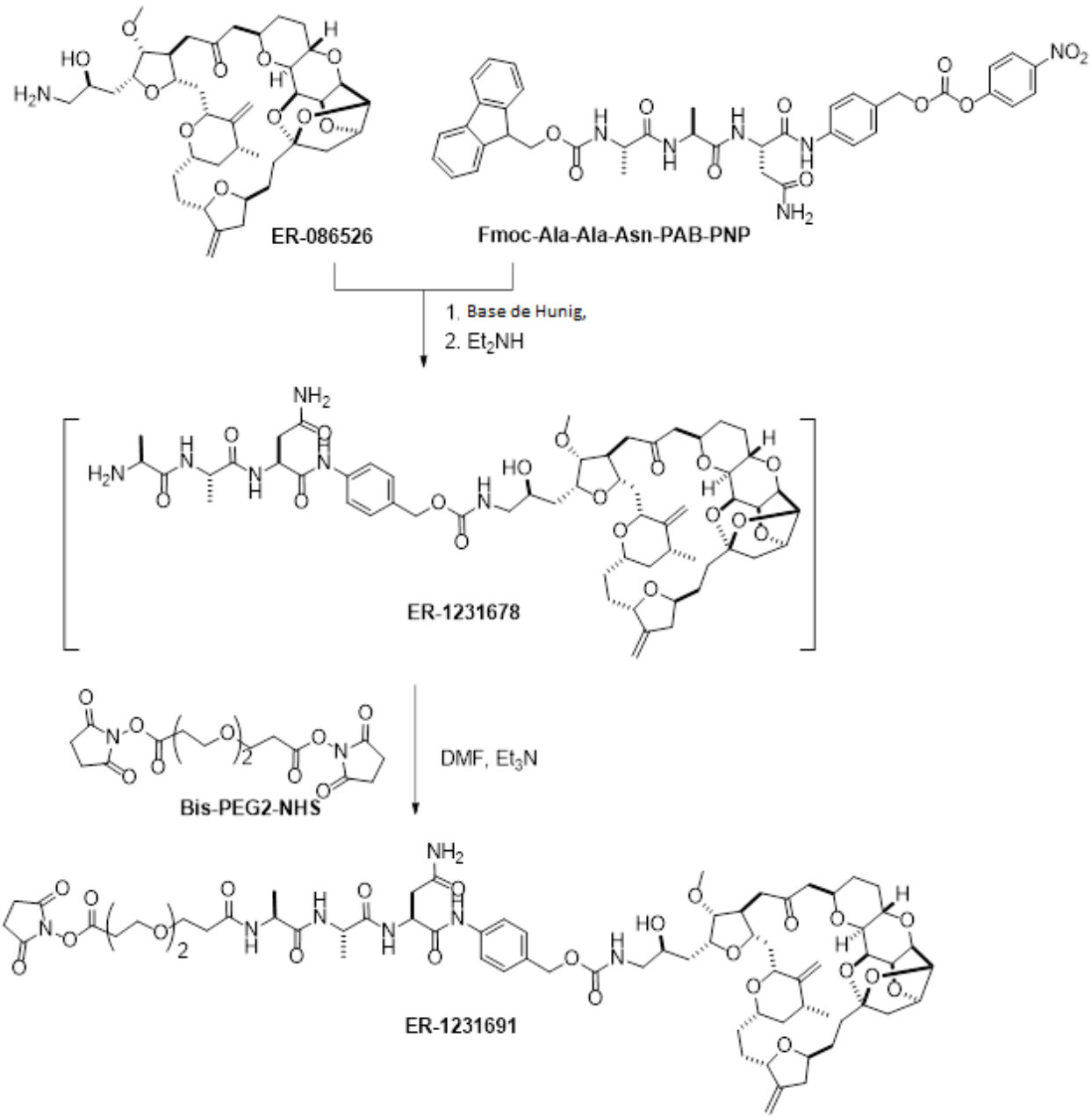
[00358] Se disolvió eribulina (ER-000086526) (10 mg, 0,014 mmol) en DMF (0,5 mL), y se mezcló con base de Hunig (3,59 µL, 0,021 mmol). Se añadió ((S)-1-(((S)-1-(((S)-4-amino-1-((4-((((4-

nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenil)amino)-1,4-dioxobutan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (15,76 mg, 0,021 mmol) y se agitó la solución amarilla resultante a temperatura ambiente durante 3 días hasta que el análisis HPLC indicó el consumo completo del material de partida. Se añadió dietilamina (14,23 µL, 0,137 mmol) a la mezcla de reacción, que después se agitó a temperatura ambiente durante otras 2 horas hasta que hubo una escisión del 100 % de la protección de Fmoc. Se concentró la mezcla de reacción para retirar la dietilamina y se redisolvió el residuo en DMF (1,5 mL). Se añadió Et_3N (0,015 mL, 0,11 mmol) a temperatura ambiente, seguido del añadido de 3-(2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)etoxi)propanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (9,71 mg, 0,027 mmol). Se agitó la mezcla de reacción durante 16 horas a temperatura ambiente hasta que se completó la reacción, según lo determinado por análisis LCMS. Se concentró la mezcla a vacío alto y se purificó mediante cromatografía instantánea para obtener Mal-PEG2-Ala-Ala-Asn-PAB-eribulina (ER-001231679) (9,2 mg, 49 % de rendimiento) y Mal-PEG2-(Ala-Ala-Asn-PAB)2-eribulina (ER-001231690) (6,0 mg, 18 % de rendimiento) como aceites incoloros.

[00359] Mal-PEG2-Ala-Ala-Asn-PAB-eribulina (ER-001231679): ^{1}HNMR (400 MHz) δ ppm 9,23 (s, 1H), 8,00 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 7,61 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,38 (d, *J* = 6,8 Hz, 1H), 7,24 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,13 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 6,68 (s, 2H), 6,30 (br s, 1H), 6,04-6,00 (m, 1H), 5,77 (br s, 1H), 5,42 (br s, 1H), 5,07 (s, 1H), 5,06-4,98 (m, 2H), 4,93 (s, 1H), 4,88 (s, 1H), 4,90-4,82 (m, 1H), 4,80 (s, 1H), 4,69 (t, *J* = 4,0 Hz, 1H), 4,60 (t, *J* = 4,0 Hz, 1H), 4,49-4,42 (m, 1H), 4,38-4,25 (m, 4H), 4,19 (t, *J* = 4,8 Hz, 1H), 4,15-4,08 (m, 1H), 4,03 (t, *J* = 4,8 Hz, 1H), 3,97-3,85 (m, 3H), 3,83-3,50 (m, 12H), 3,41 (s, 3H), 3,50-3,10 (m, 3H), 3,02-2,64 (m, 6H), 2,52-2,30 (m, 7H), 2,30-1,65 (m, 14H), 1,65-1,20 (m, 12H), 1,10 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H), 1,13-1,05 (m, 1H). LCMS (M+Na)=1396,6.

[00360] Mal-PEG2-(Ala-Ala-Asn-PAB)2-eribulina (ER-001231690): ^{1}HNMR (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 7,65 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,60 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,28 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,23 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 6,79 (s, 2H), 5,13 (s, 1H), 5,02 (s, 1H), 5,06-4,98 (m, 4H), 4,87 (s, 1H), 4,82 (s, 1H), 4,85-4,72 (m, 2H), 4,71 (t, *J* = 4,8 Hz, 1H), 4,61 (t, *J* = 4,4 Hz, 1H), 4,47 (d, *J* = 11,2 Hz, 1H), 4,30-4,06 (m, 9H), 3,97 (t, *J* = 4,8 Hz, 1H), 3,89-3,80 (m, 3H), 3,75-3,48 (m, 12H), 3,38 (s, 3H), 3,17 (d, *J* = 6,8 Hz, 2H), 2,94-2,62 (m, 8H), 2,50-2,28 (m, 7H), 2,22-1,65 (m, 14H), 1,58-1,30 (m, 18H), 1,10 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H), 1,06-0,97 (m, 1H). LCMS (M+Na)=1802,8.

1.9 Preparación de NHS-PEG2-Ala-Ala-Asn-PAB-eribulina (ER-001231691)

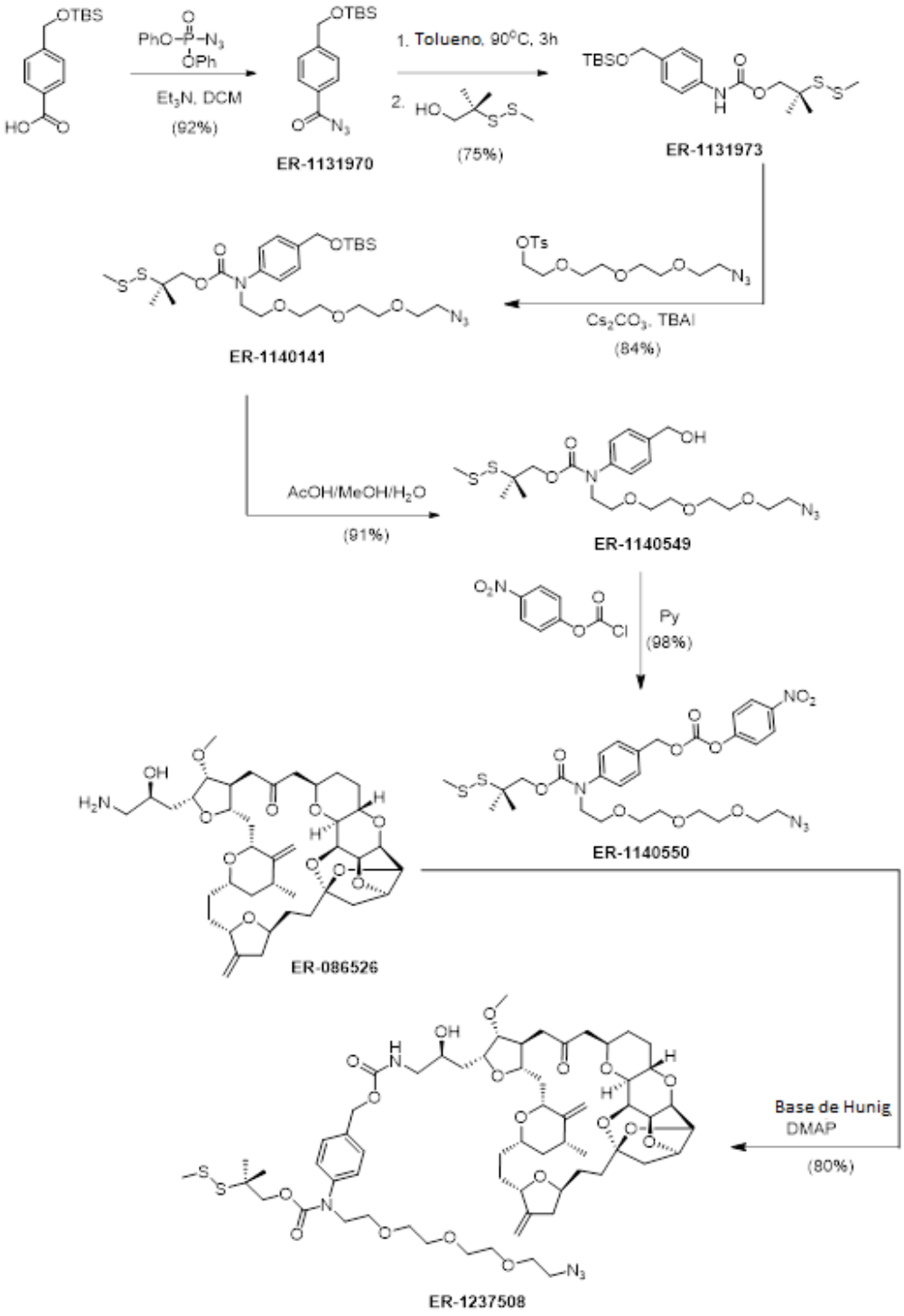


[00361] Se preparó Ala-Ala-Asn-PAB-eribulina (ER-001231678) (15 mg, rendimiento cuantitativo) a partir de eribulina (ER-000086526) y Fmoc-Ala-Ala-Asn-PAB-PNP utilizando el mismo procedimiento que se describió arriba para la preparación de Val-Cit-PAB-eribulina (ER-001228950). LCMS (M+H)=1135,5.

[00362] Se preparó NHS-PEG2-Ala-Ala-Asn-PAB-eribulina (ER-001231691) (12,4 mg, 64 % de rendimiento) a partir de Ala-Ala-Asn-PAB-eribulina (ER-001231678) y BisNHS-PEG2 utilizando el mismo procedimiento que se describió anteriormente para la preparación de NHS-PEG2-Val-Cit-PAB-eribulina (ER-001236940). ^{1}HNMR (400 MHz) δ ppm 9,21 (s, 1H), 7,95 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,62 (d, *J*

= 8,8 Hz, 2H), 7,58-7,52 (m, 1H), 7,28 (br s, 1H), 7,24 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,10 (br s, 1H), 6,29 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H), 5,83 (br s, 1H), 5,38 (br s, 1H), 5,07 (s, 1H), 5,05-4,95 (m, 2H), 4,93 (s, 1H), 4,88 (s, 1H), 4,90-4,83 (m, 1H), 4,81 (s, 1H), 4,69 (t, *J* = 4,4 Hz, 1H), 4,60 (t, *J* = 4,4 Hz, 1H), 4,46-4,41 (m, 1H), 4,36-4,25 (m, 4H), 4,19 (dd, *J* = 4,8, 6,0 Hz, 1H), 4,15-4,09 (m, 1H), 4,03 (dd, *J* = 4,8, 6,0 Hz, 1H), 3,99-3,89 (m, 3H), 3,85-3,50 (m, 10H), 3,41 (s, 3H), 3,40-3,10 (m, 3H), 3,01-2,60 (m, 10H), 2,60-2,35 (m, 7H), 2,35-1,65 (m, 14H), 1,65-1,20 (m, 14H), 1,10 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H), 1,15-1,03 (m, 1H). LCMS (ES) (M+H)=1442,7.

1.10 Preparación de azida-PEG3-disulfuro-PAB-eribulina (ER-001237508)



[00363]Se disolvió ácido 4-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)benzoico (1,0 g, 3,754 mmol) en diclorometano (DCM) (25 mL) enfriado a 0 ºC. Se agregaron trietilamina (0,549 mL, 3,941 mmol), seguido de fosforazidato de difenilo (1,085 mg, 3,941 mmol). Se calentó lentamente la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se agitó durante 14 horas. Se diluyó la mezcla bruta con acetato de

etilo (EtOAc)/Hep (1:1, 100 mL) y se pasó a través de un tapón de sílice corto eluyendo con EtOAc/Hep (50 %). Se retiró el disolvente al vacío para dar 1,10 g de azida de 4-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)benzoilo (ER-001131970). ^{1}H NMR (400 MHz) δ ppm 7,98 (d, 2 H, *J* = 8,0 Hz), 7,40 (d, 2 H, *J* = 8,0 Hz), 4,79 (s, 2 H), 0,94 (s, 9 H), 0,10 (s, 6 H).

[00364] Se calentó azida de 4-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil) benzoilo (ER-001131970) (1,1 g, 3,775 mmol) disuelta en tolueno (20 mL), a 110 ºC durante 3 horas. Aunque el producto no se mostró como una mancha única, el análisis de cromatografía de capa fina (TLC) indicó que el material de partida se había consumido. Se enfrió la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se transfirió a un vial sellado bajo nitrógeno y se almacenó como una solución en tolueno (1 mL = 32,6 mg) a -20 ºC.

[00365] Se añadió trietilamina (0,099 mL, 0,709 mmol) a una solución de ((4-isocianatobencil)oxi)dimetilsilano de terc-butilo (165 mg, 0,626 mmol) en tolueno (5 mL), seguido de alcohol (90,0 mg, 0,591 mmol) y se agitó la mezcla de reacción durante 6 horas a 36 ºC. Se monitorizó el avance de la reacción mediante UPLC/MS. Se añadió una solución saturada de carbonato de hidrógeno de sodio ($NaHCO_3$) (10 mL), se extrajo con EtOAc/Hep (1:1, 60 mL), se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. Se purificó el material bruto mediante cromatografía instantánea (EtOAc/Hep 10 % al 40 %) para obtener 215 mg de 2-metil-2-(metildisulfanil)propil(4-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)fenil)carbamato (ER-001131973). ^{1}H NMR (400 MHz) δ ppm 7,34 (d, 2 H, *J* = 8,4 Hz), 7,26 (d, 2 H, *J* = 7,6 Hz), 6,63 (br s, 1 H), 4,69 (s, 2 H), 4,17 (s, 2 H), 2,42 (s, 3 H), 1,35 (s, 6 H), 0,93 (s, 9 H), 0,08 (s, 6 H).

[00366] Se disolvieron (4-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)fenil)carbamato de 2-metil-2-(metildisulfanil)propilo (ER-001131973) (198 mg, 0,476 mmol) y 4-metilbencenosulfonato de 2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etilo (325 mg, 0,87 mmol) en DMF (6,6 mL). Se añadió carbonato de cesio (621 mg, 1,905 mmol), seguido de yoduro de tetrabutilamonio (45 mg, 0,122 mmol) y se agitó la mezcla de reacción durante 15 horas a 36 ºC. Se monitorizó el avance de la reacción mediante UPLC/MS. Se añadió una solución saturada de NH_4Cl (30 mL), se extrajo con EtOAc/Hep (2:1, 150 mL), se lavó con salmuera (10 mL), se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío. Se purificó el material bruto mediante cromatografía instantánea (EtOAc/Hep 20% al 50%) para obtener 248 mg de (2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etil)(4-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)fenil)carbamato de 2-metil-2-(metildisulfanil)propilo (ER-001140141). ^{1}H NMR (400 MHz) δ ppm 7,28 (d, 2 H, *J* = 8,4 Hz), 7,20 (d, 2 H, *J* = 8,0 Hz), 4,73 (s, 2 H), 4,06 (br s, 2 H), 3,83 (dd, 2 H, *J* = 6,4, 5,6 Hz), 3,68- 3,56 (m, 12 H), 3,37 (dd, 2 H, *J* = 5,6, 5,2 Hz), 2,33 (s, 3 H), 1,14 (br s, 6 H), 0,93 (s, 9 H), 0,09 (s, 6 H).

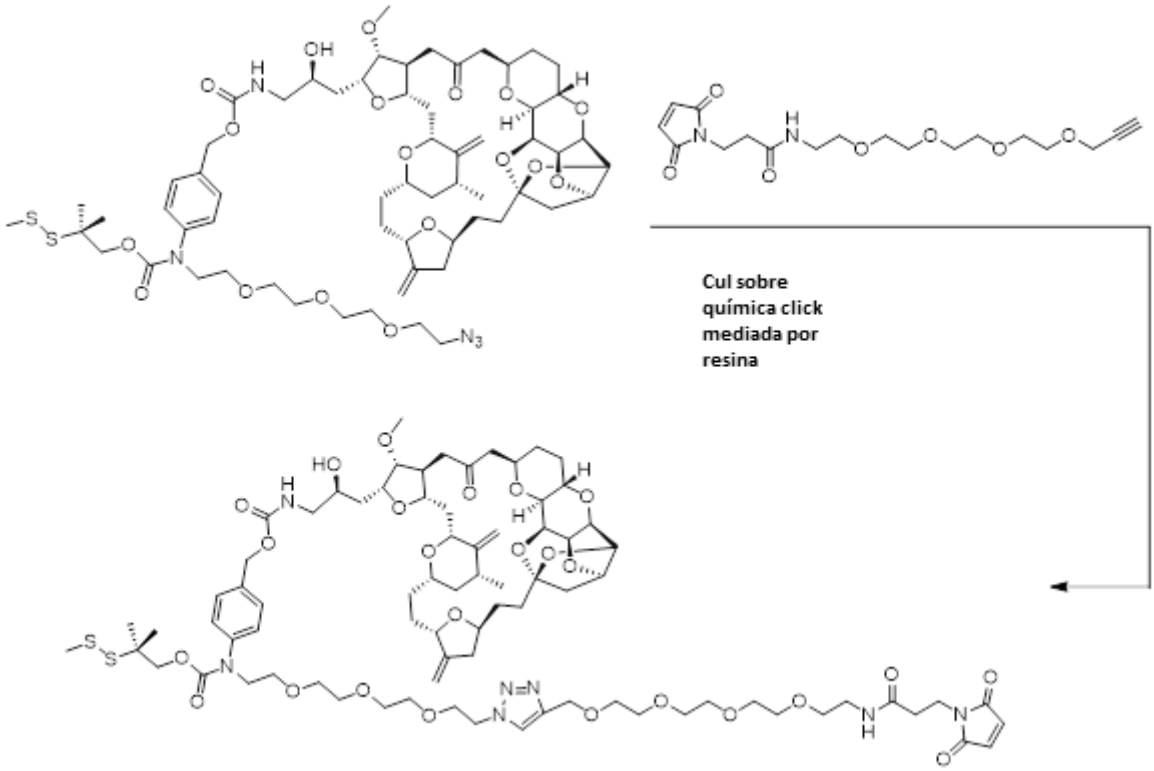
[00367] Se disolvió (2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etil)(4-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)fenil)carbamato de 2-metil-2-(metildisulfanil)propilo (ER-001140141) (81 mg, 0,131 mmol) en una mezcla de metanol (5 mL) y agua (0,5 mL). Se añadió ácido acético (0,5 mL, 8,734 mmol) a la mezcla de reacción y se agitó durante 14 horas a 38 ºC. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y el solvente se retiró al vacío. Se diluyó el residuo con EtOAc (30 mL), se lavó con agua (2 X 5 mL), $NaHCO_3$ y salmuera (3 mL), se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío. Se purificó el material bruto mediante cromatografía instantánea (EtOAc/Hep 30% al 90%) para obtener 61,0 mg de (2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etil)(4-(hidroximetil)fenil)carbamato de 2-metil-2-(metildisulfanil)propilo (ER-001140549). ^{1}H NMR (400 MHz) δ ppm 7,34 (d, 2 H, *J* = 8,8 Hz), 7,26 (d, 2 H, *J* = 8,0 Hz), 4,69 (d, 2 H, *J* = 4,4 Hz), 4,06 (br s, 2 H), 3,84 (dd, 2 H, *J* = 6,2, 6,2 Hz), 3,66- 3,56 (m, 12 H), 3,37 (dd, 2 H, *J* = 5,2, 5,2 Hz), 2,33 (s, 3 H), 1,74 (br s, 1 H), 1,14 (br s, 6 H).

[00368] Se disolvió (2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etil)(4-(hidroximetil)fenil)carbamato de 2-metil-2-(metildisulfanil)propilo (ER-001140549) (60 mg, 0,119 mmol) en DCM (2 mL) y Py (0,019 mL, 0,239 mmol) enfriado a 0 ºC. Se añadieron carbonocloridato de 4-nitrofenilo (38,5 mg, 0,191 mmol) en DCM (2 mL) y dimetilaminopiridina (DMAP) (2,9 mg, 0,024 mmol) y se agitó la mezcla de reacción durante 30 min a 0 ºC. Se calentó lentamente la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se agitó hasta que se consumió el material de partida (aproximadamente 2,5 horas). Se retiró el disolvente al vacío y se purificó el residuo mediante cromatografía instantánea (EtOAc/Hep 10% al 35%) para obtener 78 mg de (2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etil)(4-((((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenil)carbamato de 2-metil-2-(metildisulfanil)propilo (ER-001140550). ^{1}H NMR (400 MHz) δ ppm 8,27 (dd, 2 H, *J* = 6,8, 2,4 Hz), 7,41 (d, 2 H, *J* = 8,8 Hz), 7,37 (dd, 2 H, *J* = 7,2, 2,4 Hz), 7,33(d, 2 H, *J* = 8,8 Hz), 5,27 (s, 2 H), 4,08 (br s, 2 H), 3,85 (dd, 2 H, *J* = 5,8, 5,8 Hz), 3,66- 3,57 (m, 12 H), 3,36 (dd, 2 H, *J* = 5,2, 5,2 Hz), 2,33 (br s, 3 H), 1,19 (br s, 6 H).

[00369] (2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etil)(4-((((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenil)carbamato de 2-metil-2-(metildisulfanil)propilo (ER-001140550) (30 mg, 0,045 mmol) en DCM (3 mL, 46,625 mmol) se colocó en un matraz de 25-ml bajo nitrógeno y se enfrió a 0 ºC. Se añadieron amina (40,8 mg, 0,049 mmol) en DCM (2 mL) y base de Hunig (0,024 mL, 0,135 mmol), seguido de DMAP (1,4 mg, 0,011 mmol). Se calentó lentamente la mezcla de reacción a temperatura ambiente, se agitó durante 3 horas, se concentró al vacío y se purificó mediante cromatografía instantánea (EtOAc/Hep 50 % al 100 %, seguido de MeOH/EtOAc 3 % al 8 %) para obtener 45,0 mg de azida-PEG3-disulfuro-PAB-eribulina pura (ER-001237508). ^{1}H NMR (400 MHz) δ ppm 7,32 (d, 2 H, *J* = 8,0 Hz), 7,25 (d, 2 H, *J* = 7,2 Hz),

5,28 (dd, 1 H, *J* = 5,6, 5,6 Hz), 5,11-5,04 (m, 3 H), 4,93 (s, 1 H), 4,88 (s, 1 H), 4,81 (s, 1 H), 4,69 (dd, 1 H, *J* = 4,4, 4,4 Hz), 4,60 (dd, 1 H, *J* = 4,2, 4,2 Hz), 4,36 (br. s, 1 H), 4,33(dd, 1 H, *J* = 4,0, 2,0), 4,29 (ddd, 1 H, *J* = 9,6, 4,4, 4,4 Hz), 4,18 (dd, 1 H, *J* = 6,4, 4,4 Hz), 4,14-4,04 (m, 3 H), 4,03 (dd, 1 H, *J* = 6,4, 4,4 Hz), 3,97-3,89 (m, 3 H), 3,84-3,78 (m, 3 H), 3,67-3,56 (m, 14 H), 3,42 (s, 3 H), 3,40-3,35 (m, 1 H), 3,37 (dd, 2 H, *J* = 5,2, 5,2 Hz), 3,27 (d, 1 H, *J* = 3,2 Hz), 3,20 (ddd, 1 H, *J* = 12,8, 6,0, 6,0 Hz), 2,91-2,83 (m, 2 H), 2,70 (dd, 1 H, *J* = 16,0, 10,0 Hz), 2,52-2,40 (m, 3 H), 2,35-2,13 (m, 9 H), 2,10-2,06 (m, 1 H), 2,01-1,89 (m, 4 H), 1,78-1,64 (m, 4 H), 1,60-1,52 (m, 4 H), 1,49-1,28 (m, 5 H), 1,22-1,07 (m, 6 H), 1,09 (d, 3 H, *J* = 6,0 Hz).

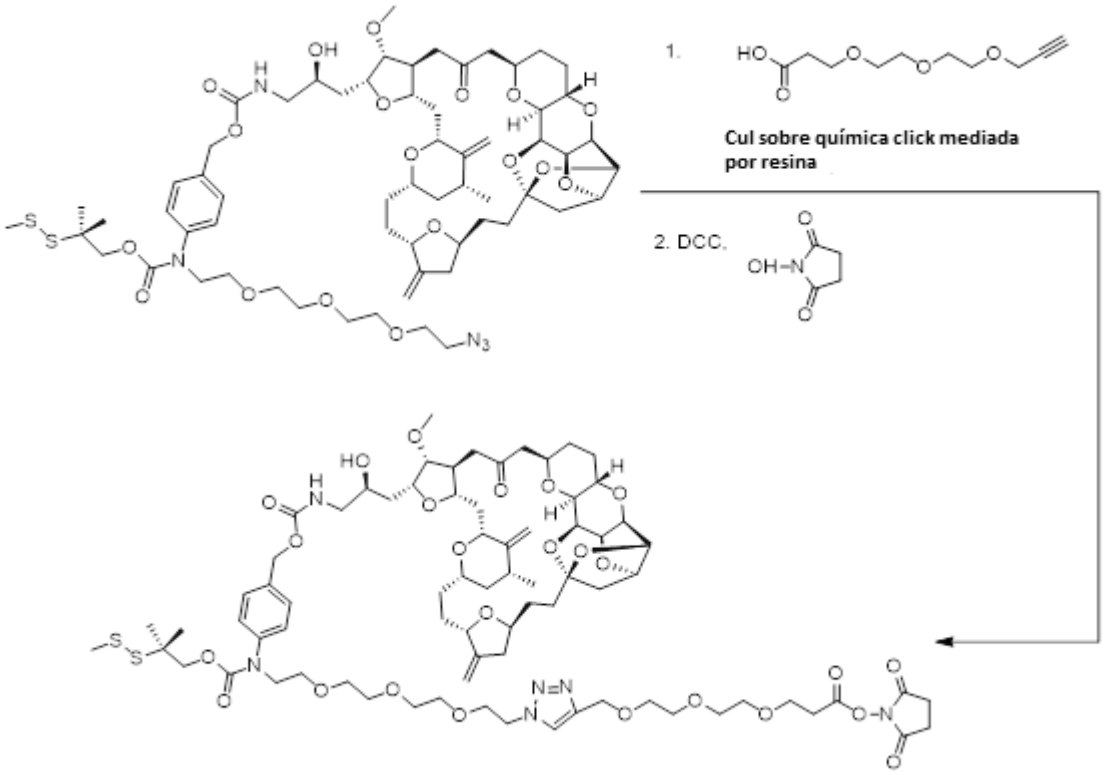
1.11 Preparación de Mal-PEG4-triazol-PEG3-disulfuro-PAB-eribulina (ER-001237504)



[00370] Se desgasificó una mezcla de azida (9,0 mg, 7,151 µmol) y 3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-(3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-in-1-il)propanamida (6,8 mg, 0,018 mmol) en terc-butanol (1,5 mL) y agua (0,5 mL) durante 45 min. Se añadió yoduro de cobre en amberlyst-21 (1,23 mmol/g, 10 mg) y se desgasificó durante otros 30 min. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas y se monitorizó mediante UPLC/MS. Se consumió la mayoría del material de partida y se mostró el producto deseado como un pico principal. Se separó la mezcla de la resina y se purificó en HPLC (acetonitrilo/agua con 0,05 % de ácido fórmico) para obtener 1,5 mg de Mal-PEG4-triazol-PEG3-disulfuro-PAB-eribulina (ER-001237504). ^{1}H NMR (400 MHz) δ ppm 7,74 (s, 1 H), 7,32 (d, 2 H, *J* =

8,4 Hz), 7,27-7,25 (m, 2 H), 6,69 (br s, 2 H), 5,43 (dd, 1 H, *J* = 5,6, 5,6 Hz), 5,14-5,06 (m, 3 H), 4,95 (s, 1 H), 4,89 (s, 1 H), 4,82 (s, 1 H), 4,70 (dd, 1 H, *J* = 4,4, 4,4 Hz), 4,66 (s, 2 H), 4,62 (dd, 1 H, *J* = 4,4, 4,4 Hz), 4,52(dd, 1 H, *J* = 5,2, 5,2 Hz), 4,38-4,31 (m, 2 H), 4,30 (ddd, 1 H, *J* = 10,4, 4,0, 4,0 Hz), 4,20 (dd, 1 H, *J* = 6,4, 4,4 Hz), 4,16-4,05 (m, 3 H), 4,04 (dd, 1 H, *J* = 6,4, 4,4 Hz), 3,99-3,91 (m, 3 H), 3,87-3,80 (m, 6 H), 3,70-3,59 (m, 22 H), 3,53 (dd, 2 H, *J* = 5,2, 5,2 Hz), 3,44 (s, 3 H), 3,43-3,36 (m, 3 H), 3,29 (d, 1 H, *J* = 2,8 Hz), 3,18 (ddd, 1 H, *J* = 12,9, 6,2, 6,2 Hz), 2,92-2,84 (m, 2 H), 2,72 (dd, 1 H, *J* = 16,0, 10,0 Hz), 2,54-2,42 (m, 5 H), 2,37-1,90 (m, 19 H), 178-1,52 (m, 3 H), 1,50-1,14 (m, 16 H), 1,10 (d, 3 H, *J* = 6,0 Hz). LCMS (M+H)=1642,1.

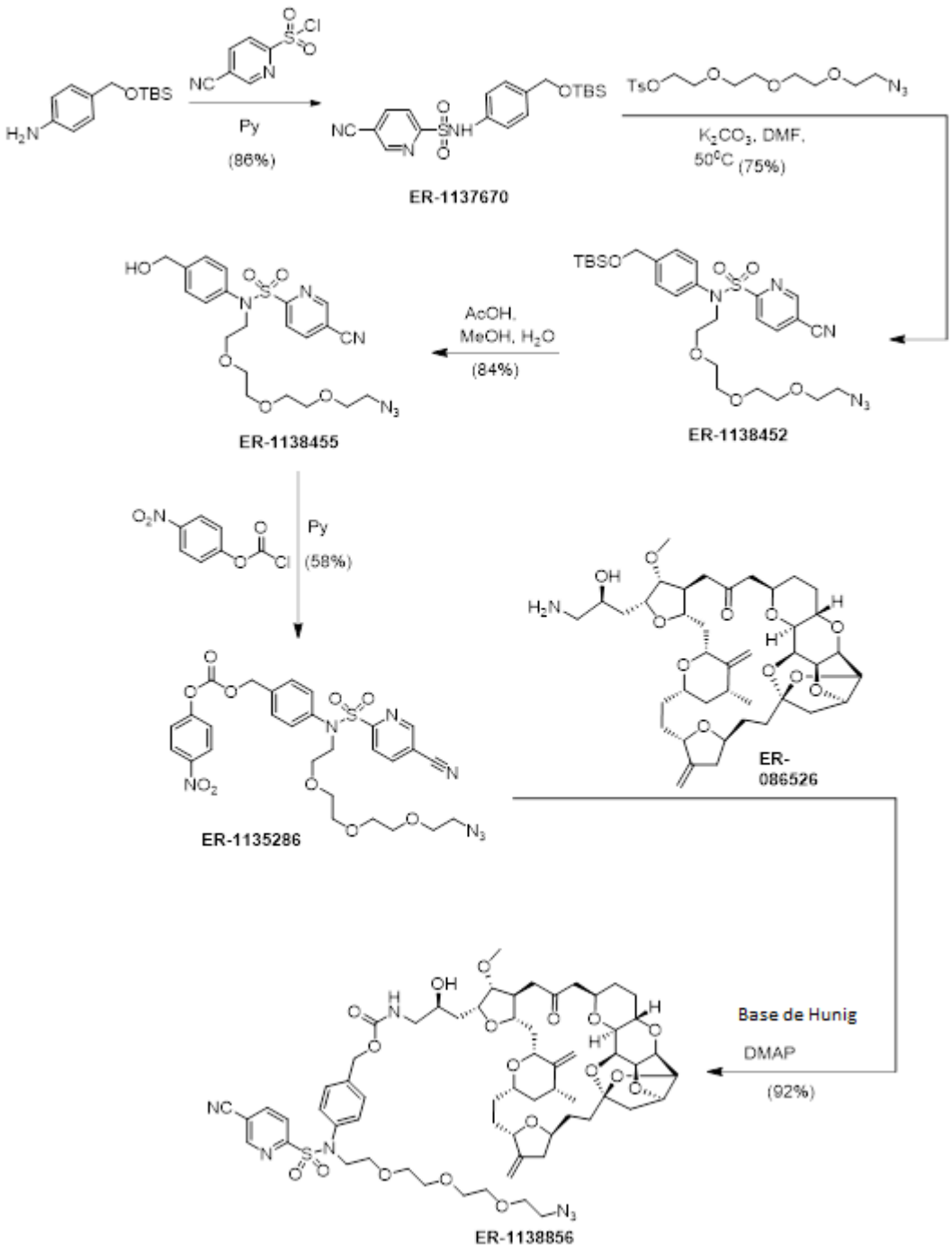
1.12 Preparación de NHS-PEG3-triazol-PEG3-disulfuro-PAB-eribulina (ER-001244129)



[00371] Se desgasificó una mezcla de azida (9 mg, 7,151 µmol) y 3-(2-(2-(prop-2-il-1-iloxi)etoxi)etoxi)propanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (4,5 mg, 14,30 µmol) en terc-butanol (1 mL) y agua (0,5 mL) durante 45 min. Se añadió yoduro de cobre en amberlyst-21 (1,23 mmol/g, 10 mg, 7,151 µmol) y se desgasificó durante otros 30 min. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas y se monitorizó mediante UPLC/MS. Se consumió la mayoría del material de partida y se mostró el producto deseado como un pico principal. Se separó la mezcla de la resina mediante filtración, se extrajo con DCM (15 mL), se lavó con salmuera (3 X 3 mL), se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío. Se destiló azeotrópicamente el residuo (5 mg, 3,39 µmol) con tolueno, se

disolvió en THF (1 mL) y se enfrió a 0 ºC. Se le añadió DCC (4,2 mg, 0,02 mmol), seguido de 1-hidroxipirrolidina-2,5-diona (2,2 mg, 0,019 mmol) y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 18 horas. Se consumió la mayoría del material de partida y se mostró el producto deseado como un pico principal, según lo determinado por UPLC/MS. Se concentró la mezcla de reacción y se purificó en TLC preparativa (DCM/*i*-propanol, 8 %) para dar 2,5 mg de NHS-PEG3-triazol-PEG3-disulfuro-PAB-eribulina (ER-001244129) como un aceite incoloro. ^{1}H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2) δ ppm 7,72 (s, 1 H), 7,32 (d, 2 H, *J* = 8,8 Hz), 7,25 (d, 2 H, *J* = 8,8 Hz), 5,08-5,04 (m, 3 H), 4,93 (s, 1 H), 4,85 (s, 1 H), 4,78 (s, 1 H), 4,64 (dd, 1 H, *J* = 4,4, 4,4 Hz), 4,58 (s, 2 H), 4,55 (dd, 1 H, *J* = 4,4, 4,4 Hz), 4,48 (dd, 2 H, *J* = 5,0, 5,0 Hz), 4,32 (d, 1 H, *J* = 6,6 Hz), 4,27-4,22 (m, 2 H), 4,14 (dd, 1 H, *J* = 6,6, 4,8 Hz), 4,10-4,01 (m, 3 H), 4,00 (dd, 1 H, *J* = 6,8, 4,4 Hz), 3,92-3,78 (m, 9 H), 3,65-3,53 (m, 19 H), 3,44-3,39 (m, 4 H), 3,37 (s, 3 H), 3,26 (d, 1 H, *J* = 3,2 Hz), 3,13 (ddd, 1 H, *J* = 12,4, 6,0, 6,0 Hz), 2,91-2,73 (m, 11 H), 2,70-2,64 (m, 2 H), 2,54-2,41 (m, 3 H), 2,38-1,80 (m, 16 H), 1,74-1,52 (m, 3 H), 1,41-1,13 (m, 10 H), 1,07 (d, 3 H, *J* = 6,4 Hz). LCMS (M+H)=1572,3.

1.13 Preparación de azida-PEG3-sulfonamida-PAB-eribulina (ER-001138856)



[00372] Se disolvió 4-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)anilina (315 mg, 1,327 mmol) en DCM (10 mL) enfriado a 0 ºC. Se añadió piridina (0,268 mL, 3,317 mmol), seguido de cloruro de 5-cianopiridina-2-sulfonilo (365 mg, 1,801 mmol) en DCM (10 mL) durante 15 min. Se calentó lentamente la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 hora y se agitó durante 2 horas. Se diluyó la mezcla de reacción con EtOAc (50 mL), se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío para obtener 610 mg (103 %) de N-(4-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)fenil)-5-cianopiridina-2-

sulfonamida (ER-001137670). El producto bruto fue razonablemente puro, aunque con color. ^{1}H NMR (400 MHz) δ ppm 8,94 (dd, 1 H, *J* = 1,8, 0,6 Hz), 8,10 (dd, 1 H, *J* = 8,4, 2,0 Hz), 7,99 (dd, 1 H, *J* = 8,0, 0,8 Hz), 7,18 (d, 2 H, *J* = 8,2 Hz), 7,15 (br s, 1 H), 7,11 (dd, 2 H, *J* = 6,8, 0,8 Hz), 4,64 (s, 2 H), 0,90 (s, 9 H), 0,05 (s, 6 H).

[00373] Se disolvieron N-(4-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)fenil)-5-cianopiridina-2-sulfonamida (ER-001137670) (105,0 mg, 0,26 mmol) y 4-metilbencenosulfonato de 2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etilo (143 mg, 0,383 mmol) en DMF (4 mL). Se añadió carbonato de potasio (K_2CO_3) (144 mg, 1,041 mmol), seguido de yoduro de tetrabutilamonio (19,2 mg, 0,052 mmol) y se agitó la mezcla de reacción durante 36 horas a 50 ºC. Se monitorizó el avance de la reacción mediante UPLC/MS. Se añadió una solución saturada de NH_4Cl (10 mL), se extrajo con EtOAc/Hep (2:1, 30 mL), se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. Se purificó el material bruto mediante cromatografía instantánea (EtOAc/Hep 25% al 80%) para obtener 118,0 mg de N-(2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etil)-N-(4-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)fenil)-5-cianopiridina-2-sulfonamida (ER-001138452) (75 %). ^{1}H NMR (400 MHz) δ ppm 8,99 (dd, 1 H, *J* = 1,8, 0,6 Hz), 8,08 (dd, 1 H, *J* = 8,2, 2,2 Hz), 7,86 (dd, 1 H, *J* = 8,0, 0,8 Hz), 7,24 (d, 2 H, *J* = 10 Hz), 7,09 (d, 2 H, *J* = 8,8 Hz), 4,69 (s, 2 H), 4,06 (dd, 2 H, *J* = 6,0, 6,0 Hz), 3,67 (dd, 2 H, *J* = 5,2, 5,2 Hz), 3,65 – 3,62 (m, 4 H), 3,58 (dd, 2 H, *J* = 6,2, 6,2 Hz), 3,56 – 3,53 (m, 4 H), 3,38 (dd, 2 H, *J* = 5,2, 5,2 Hz), 0,93 (s, 9 H), 0,08 (s, 6 H).

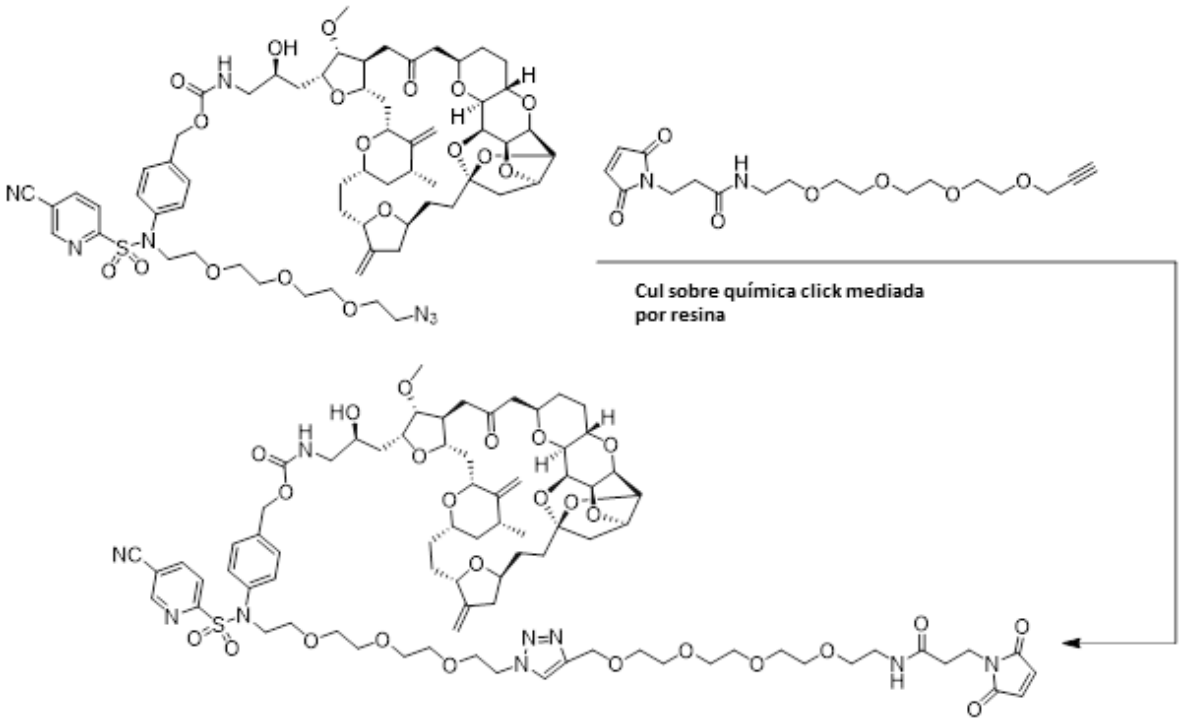
[00374] Se disolvió N-(2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etil)-N-(4-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)fenil)-5-cianopiridina-2-sulfonamida (ER-001138452) (150 mg, 0,248 mmol) en metanol (6 mL). Se añadió agua (0,60 mL), seguido de ácido acético (AcOH) (0,60 mL, 10,481 mmol). Se calentó lentamente la mezcla de reacción a 38 ºC y se agitó durante 14 horas. Se retiró la mayoría del disolvente al vacío. Se diluyó el residuo con EtOAc (30 mL), se lavó con agua (2 X 5 mL), $NaHCO_3$ y salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío. Se purificó el material bruto mediante cromatografía instantánea (EtOAc/Hep 35% al 90%) para obtener 105,0 mg de N-(2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etil)-5-ciano-N-(4-(hidroximetil)fenil)piridina-2-sulfonamida (ER-001138455) (84 %). ^{1}H NMR (400 MHz) δ ppm 8,99 (d, 1 H, *J* = 1,2 Hz), 8,09 (dd, 1 H, *J* = 8,4, 2,0 Hz), 7,88 (dd, 1 H, *J* = 8,4, 0,8 Hz), 7,30 (d, 2 H, *J* = 8,8 Hz), 7,15 (d, 2 H, *J* = 8,4 Hz), 4,67 (s, 2 H), 4,06 (dd, 2 H, *J* = 6,2, 6,2 Hz), 3,66 (dd, 2 H, *J* = 5,0, 5,0 Hz), 3,65 – 3,58 (m, 6 H), 3,55 – 3,51 (m, 4 H), 3,38 (dd, 2 H, *J* = 5,2, 5,2 Hz.

[00375] Se disolvió N-(2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etil)-5-ciano-N-(4-(hidroximetil)fenil)piridina-2-sulfonamida (ER-001138455) (45 mg, 0,092 mmol) en DCM (3 mL) y se enfrió a 0 ºC después del

añadido de piridina (0,015 mL, 0,183 mmol). Se añadieron carbonocloridato de 4-nitrofenilo (20,3 mg, 0,101 mmol) en DCM (2 mL) y DMAP (2,3 mg, 0,018 mmol). Se calentó lentamente la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas. UPLC/MS indicó que parte del material de partida permaneció. Se concentró la mezcla de reacción al vacío y se purificó mediante cromatografía instantánea (EtOAc/Hep 12 % al 40 %) para obtener 35 mg de (4-nitrofenil)carbonato de 4-((N-(2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etil)-5-cianopiridina)-2-sulfonamido)bencilo (ER-001235286) (58 %) y 20 mg de material de partida. ^{1}H NMR (400 MHz) δ ppm 8,99 (d, 1 H, *J* = 0,8 Hz), 8,27 (dd, 2 H, *J* = 9,2, 2,0 Hz), 8,12 (dd, 1 H, *J* = 7,6, 2,0 Hz), 7,92 (d, 1 H, *J* = 8,4 Hz), 7,38 (d, 4 H, *J* = 9,6 Hz), 7,26 (d, 2 H, *J* = 8,8 Hz), 5,45 (s, 2 H), 4,06 (dd, 2 H, *J* = 5,8, 5,8 Hz), 3,67 – 3,58 (m, 8 H), 3,58 – 3,50 (m, 4 H), 3,38 (dd, 2 H, *J* = 6,1, 6,1 Hz).

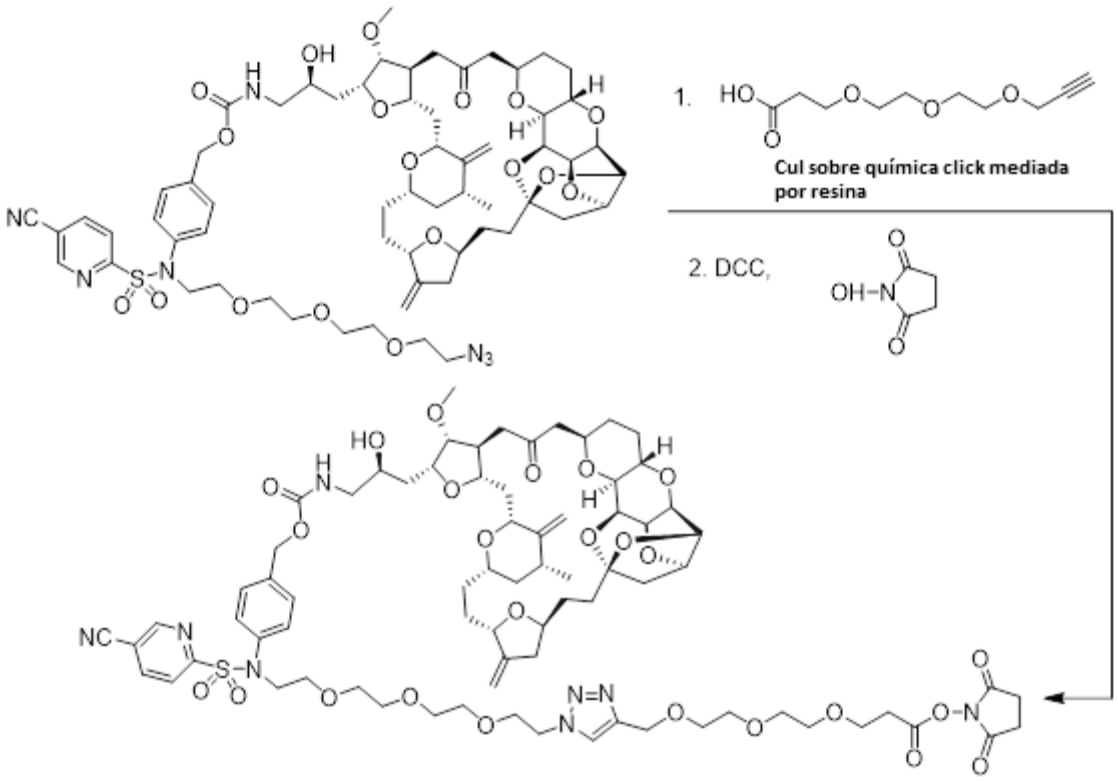
[00376] Se colocó (4-nitrofenil)carbonato de 4-(N-(2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etil)-5-cianopiridina-2-sulfonamido)bencilo (ER-001235286) (35,0 mg, 0,053 mmol) en un matraz de 25-mL bajo nitrógeno y se enfrió a 0 ºC. Se añadieron amina (48,5 mg, 0,059 mmol) en DCM (3 mL, 46,625 mmol) y base de Hunig (0,037 mL, 0,214 mmol), seguido de DMAP (2,61 mg, 0,021 mmol). Se agitó la mezcla de reacción durante 30 min a 0 ºC y después se agitó durante otras 6 horas a temperatura ambiente. Se concentró la mezcla de reacción al vacío, se purificó mediante cromatografía instantánea (EtOAc/Hep 50 % al 100 %, seguido de MeOH/EtOAc 3 % al 8 %) para obtener 61,0 mg de azida-PEG3-sulfonamida-PAB-eribulina pura (ER-001138856). ^{1}H NMR (400 MHz) δ ppm 8,98 (d, 1 H, *J* = 1,2 Hz), 8,10 (dd, 1 H, *J* = 8,2, 1,8 Hz), 7,87 (d, 1 H, *J* = 8,0 Hz), 7,26 (d, 2 H, *J* = 6,8 Hz), 7,13 (d, 2 H, *J* = 8,4 Hz), 5,29 (dd, 1 H, *J* = 5,6, 5,6 Hz), 5,08-5,00 (m, 3 H), 4,92 (s, 1 H), 4,87 (s, 1 H), 4,80 (s, 1 H), 4,68 (dd, 1 H, *J* = 4,6, 4,6 Hz), 4,59 (dd, 1 H, *J* = 4,6, 4,6 Hz), 4,38-4,30 (m, 2 H), 4,28 (ddd, 1 H, *J* = 10,4, 4,0, 4,0, Hz), 4,17 (dd, 1 H, *J* = 6,2, 4,6 Hz), 4,13-4,01 (m, 4 H), 3,97-3,88 (m, 3 H), 3,82-3,78 (m, 1 H), 3,67-3,50 (m, 15 H), 3,41 (s, 3 H), 3,40-3,33 (m, 1 H), 3,37 (dd, 2 H, *J* = 4,8, 4,8 Hz), 3,27 (d, 1 H, *J* = 3,2 Hz), 3,15 (ddd, 1 H, *J* = 12,8, 6,4, 6,4 Hz), 2,90-2,82 (m, 2 H), 2,70 (dd, 1 H, *J* = 16,0, 10,0 Hz), 2,51-2,40 (m, 3 H), 2,34-2,13 (m, 7 H), 2,10-2,05 (m, 1 H), 1,99-1,88 (m, 4 H), 1,78-1,64 (m, 5 H), 1,62-1,52 (m, 2 H), 1,50-1,29 (m, 4 H), 1,08 (d, 3 H, *J* = 6,8 Hz).

1.14 Preparación de Mal-PEG4-triazol-PEG3-sulfonamida-PAB-eribulina (ER-001237505)



[00377] Se desgasificó una mezcla de azida (10 mg, 8,023 µmol) y 3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-(3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-in-1-il)propanamida (9,20 mg, 0,024 mmol) en terc-butanol (2,1 mL) y agua (0,7 mL) durante 45 min. Se añadió yoduro de cobre en amberlyst-21 (1,23 mmol/g, 15 mg) y se desgasificó durante otros 30 min. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas y se monitorizó mediante UPLC/MS. Se consumió la mayoría del material de partida y se mostró el producto deseado como un pico principal. Se separó la mezcla de reacción de la resina y se purificó sobre TLC preparativa (DCM/metanol, 7 %) para dar 5,5 mg de Mal-PEG4-triazol-PEG3-sulfonamida-PAB-eribulina (ER-001237505). ^{1}H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2) δ ppm 9,01 (s, 1 H), 8,15 (dd, 1 H, *J* = 8,0, 1,8 Hz), 7,87 (d, 1 H, *J* = 8,0 Hz), 7,75 (s, 1 H), 7,28 (d, 2 H, *J* = 8,0 Hz), 7,14 (d, 2 H, *J* = 8,4 Hz), 6,68 (s, 2 H), 6,47 (br s, 1 H), 5,44 (br s, 1 H), 5,10-5,02 (m, 3 H), 4,94 (s, 1 H), 4,86 (s, 1 H), 4,80 (s, 1 H), 4,68 (dd, 1 H, *J* = 4,4, 4,4 Hz), 4,59 (s, 2 H), 4,56 (dd, 1 H, *J* = 4,4, 4,4 Hz), 4,51(dd, 2 H, *J* = 5,2, 5,2, Hz), 4,34(d, 1 H, *J* = 7,6, Hz), 4,30-4,23 (m, 2 H), 4,19 – 4,14 (m, 2 H), 4,08 (dd, 1 H, *J* = 4,0, 4,0 Hz), 4,03 – 3,98 (m, 2 H), 3,94 – 3,72 (m, 8 H), 3,68 – 3,46 (m, 28 H), 3,38 (s, 3 H), 3,38 – 3,33 (m, 3 H), 3,27 (d, 1 H, *J* = 3,2 Hz), 3,16 – 3,02 (m, 2 H), 2,90 – 2,81 (m, 2 H), 2,68 (dd, 1 H, *J* = 16,2, 9,8 Hz), 2,54-2,40 (m, 7H), 2,40-1,8 (m, 11 H), 1,80-1,50 (m, 3 H), 1,48-1,25 (m, 3 H), 1,09 (d, 3 H, *J* = 6,4 Hz). LCMS (M+H)=1630,0.

1.15 Preparación de NHS-PEG3-triazol-PEG3-sulfonamida-PAB-eribulina (ER-001244623)



[00378] Se desgasificó una mezcla de azida (14 mg, 0,011 mmol) y 3-(2-(2-(prop-2-il-1-iloxi)etoxi)etoxi)propanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (8,80 mg, 0,028 mmol) en terc-butanol (2 mL) y agua (1 mL) durante 45 min. Se añadió yoduro de cobre en amberlyst-21 (1,23 mmol/g, 20 mg) y se desgasificó durante otros 30 min. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas y se monitorizó mediante UPLC/MS. Se consumió la mayoría del material de partida y se mostró el producto deseado como un pico principal. Se separó la mezcla de reacción de la resina mediante extracción con DCM (2 x 10 mL). La capa de DCM se lavó con salmuera (4 x 5 mL), se secó sobre sulfato de sodio y se concentró hasta obtener el producto deseado (que se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional).

[00379] Se disolvió ácido bruto (15,0 mg, 10,255 µmol) en THF (1,5 mL) y se enfrió a 0 ºC. Se añadió DCC (15,2 mg, 0,074 mmol), seguido de 1-hidroxipirrolidina-2,5-diona (8,3 mg, 0,072 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. UPLC/MS indicó que se consumió la mayoría del material de partida y se mostró el producto deseado como un pico principal. Se concentró la mezcla de reacción y se purificó en TLC preparativa (DCM/*i*-propanol, 8 %) para dar 2,5 mg de NHS-PEG3-triazol-PEG3-sulfonamida-PAB-eribulina (ER-001244623). ^{1}H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2) δ ppm 9,00 (s, 1 H), 8,12 (d, 1 H, *J* = 8,4 Hz), 8,00 (d, 1 H, *J* = 8,0 Hz), 7,72 (s, 1 H), 7,26 (d, 2 H, *J* = 8,0 Hz), 7,12 (d, 2 H, *J* = 8,0 Hz), 5,37 (br, s, 1 H), 5,08-5,02 (m, 3 H), 4,93 (s, 1 H), 4,85 (s, 1 H), 4,78 (s, 1 H),

4,66-4,62 (m, 1 H), 4,58-4,56 (m, 4 H), 4,33 (d, 1 H, *J* = 10,8 Hz), 4,29-4,21 (m, 2 H), 4,10-3,96 (m, 4 H), 3,93-3,76 (m, 6 H), 3,74-3,44 (m, 27 H), 3,36 (s, 3 H), 3,34-3,24 (m, 2 H), 3,15-3,06 (m, 1 H), 2,97 (br s, 1 H), 2,90-2,78 (m, 8 H), 2,74-2,08 (m, 13 H), 2,05 -1,78 (m, 5 H), 1,73-1,50 (m, 2 H), 1,41-1,25 (m, 4 H), 1,07 (d, 3 H, *J* = 6,0 Hz). LCMS (M+H)=1560,0.

1.16 Preparación de Mal-PEG2-eribulina

[00380] Se disolvió eribulina (5 mg, 7 µmol) en DMF (0,5 mL) y se mezcló con maleimido-PEG2-NHS (5 mg, 14 µmol; Broadpharm, N.º de cat. BP-21680) y base de Hunig (2,4 µL, 14 µ mol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se purificó la mezcla de reacción mediante HPLC (gradiente de agua—acetonitrilo 30-70 % que contenía ácido fórmico al 0,1 %). Se recogió el eluyente por masa y se liofilizó a sequedad. El rendimiento final fue de 3,7 mg (3,8 µmol, 54%). La masa exacta prevista fue de 968,5 Da. La masa medida fue de 969,6 Da [M+H].

1.17 Preparación de Mal-PEG4-eribulina

[00381] Se disolvió eribulina (5 mg, 7 µmol) en DMF (0,5 mL) y se mezcló con maleimido-PEG4-NHS (6,2 mg, 14 µmol; Broadpharm, N.º de cat. BP-20554) y base de Hunig (2,4 µL, 14 µ mol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se purificó la mezcla de reacción mediante HPLC (gradiente de agua—acetonitrilo 30-70 % que contenía ácido fórmico al 0,1 %). Se recogió el eluyente por masa y se liofilizó a sequedad. El rendimiento final fue de 3,7 mg (3,5 µmol, 50 %). La masa exacta prevista fue de 1056,5 Da. La masa medida fue de 1057,7 Da [M+H].

1.18 Preparación de azido-PEG2-eribulina

[00382] Se disolvió eribulina (5 mg, 7 µmol) en DMF (0,5 mL) y se mezcló con azido-PEG2-NHS (4,2 mg, 14 µmol; Broadpharm, N.º de cat. BP-20524) y base de Hunig (2,4 µL, 14 µ mol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se purificó la mezcla de reacción mediante HPLC (gradiente de agua—acetonitrilo 30-70 % que contenía ácido fórmico al 0,1 %). Se recogió el eluyente por masa y se liofilizó a sequedad. El rendimiento final fue de 2,2 mg (2,4 µmol, 34%). La masa exacta prevista fue de 914,5 Da. La masa medida fue de 915,7 Da [M+H].

1.19 Preparación de azido-PEG4-eribulina

[00383] Se disolvió eribulina (5 mg, 7 µmol) en DMF (0,5 mL) y se mezcló con azido-PEG4-NHS (5,5 mg, 14 µmol; Broadpharm, N.º de cat. BP-20518) y base de Hunig (2,4 µL, 14 µ mol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se purificó la mezcla de reacción mediante HPLC (gradiente de agua—acetonitrilo 30-70 % que contenía ácido fórmico al 0,1 %). Se recogió el eluyente por masa y se liofilizó a sequedad. El rendimiento final fue de 3,0 mg (3,0 µmol, 43%). La

masa exacta prevista fue de 1002,5 Da. La masa medida fue de 1003,7 Da [M+H].

1.20 Preparación de azido-PEG4-Val-Cit-PAB-eribulina

[00384] Se disolvió eribulina (15 mg, 21 µmol) en DMF (1,5 mL) y se mezcló bien. Se añadieron base de Hunig (5,5 µL, 32 µmol) y Fmoc-VCP-PNP (24 mg, 22 µmol; Levena Biopharma, N.º de cat. VC1003). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche (16 horas). Tras la finalización de la reacción, se añadió dietilamina (20 µL, 0,21 mmol) a la mezcla de reacción y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente para retirar el grupo protector Fmoc. Se monitorizó la reacción de desprotección utilizando un espectrómetro de masas Waters SQD. Tras la finalización de la reacción, se transfirió la mezcla de reacción a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL pesado anteriormente. Se evaporó el disolvente al vacío utilizando un concentrador Centrivap refrigerado con la temperatura fijada a 30 ºC. El rendimiento fue de 16 mg (14 µmol) de NH2-Val-Cit-pAB-eribulina bruta (masa exacta 1134,6 Da, 67 % de rendimiento).

[00385] Se disolvió NH2-Val-Cit-pAB-eribulina (16 mg, 14,1 µmol) en DMF (1,5 mL). Se añadieron base de Hunig (7,2 µL, 41 µmol) y azido-PEG4-NHS (11 mg, 28,2 µmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Se purificó la mezcla de reacción mediante HPLC (gradiente de agua—acetonitrilo 48-72% que contenía ácido fórmico al 0,1 %). Se recogió el eluyente a m/z 1409 y se liofilizó para dar azido-PEG4-Val-Cit-PAB-eribulina (masa exacta 1407,7 Da). Se obtuvieron 13 mg (9,2 µmol) de azido-PEG4-Val-Cit-PAB-eribulina (65 % de rendimiento de etapa, 44 % en general).

EJEMPLO 4

1. Materiales y métodos

[00386] Todos los reactivos utilizados fueron obtenidos de proveedores comerciales de grado de investigación o mayor, a menos que se indique algo diferente.

1.1 Anticuerpos

[00387] El MORAb-003 (receptor de folato alfa anti-humano humanizado, 25 mg/mL) y el MORAb-009 (mesotelina anti-humana quimérica de ratón-humano, 25 mg/mL) utilizados en los siguientes estudios fueron del lote N.º NB02962-19 y lote N.º 030A14, respectivamente. Trastuzumab se obtuvo en el mercado (Clingen) y fue del lote N.º 503345.

[00388] Se expresaron anticuerpos de mesotelina anti-humanos humanizados y quiméricos de ratón-humano que tienen una cisteína desapareada en LCcys80 (tabla 1) en células 293F transitoriamente o como grupos seleccionados de forma estable. Se purificó medio acondicionado y se decisteinilizó como

se describe en la sección 1.4.1.2.1.

1.2 Citotoxinas

[00389] Se sintetizaron compuestos de eribulina conjugables como se describe en el ejemplo 3 (tabla 46). Se prepararon soluciones madre (10 mM) en DMSO y se almacenaron a -20 ºC hasta su uso.

1.3 Líneas celulares tumorales

[00390] Las líneas celulares tumorales humanas utilizadas en los análisis de ADC de MORAb-003, MORAb-009 y trastuzumab preparadas con compuestos de maleimido/succinimida (OSu)/azido-enlazador-eribulina (tabla 46) incluyen IGROV1 (carcinoma de ovario humano, FR^{hi}, $MSLN^{neg}$), NCI-H2110 (carcinoma pulmonar de células no pequeñas humano, FR^{med}, $MSLN^{med}$), A431 (FR^{neg}, $MSLN^{neg}$), NCI-N87-luc (carcinoma gástrico humano, FR^{lo}, $MSLN^{med}$, $her2^{hi}$), NUGC3 (adenocarcinoma gástrico humano, FR^{neg}, $MSLN^{neg}$, $her2^{neg}$), ZR75 (carcinoma ductal de mama humano, FR^{neg}, $MSLN^{neg}$, $her2^{med}$) y BT-474 (carcinoma ductal de mama humano, FR^{neg}, $MSLN^{neg}$, $her2^{hi}$). Las líneas celulares tumorales humanas utilizadas en los análisis de anticuerpos LCcys80 de mesotelina anti-humanos humanizados y quiméricos de ratón-humano conjugados con MAL-PEG2-Val-Cit-PAB-eribulina (ER-001159569) fueron A3 (A431 transfectado de forma estable con mesotelina humana, $MSLN^{hi}$), OVCAR3 (carcinoma de ovario humano, $MSLN^{hi}$), HEC-251 (endometroide humano, $MSLN^{med}$), H226 (mesotelina de células escamosas de pulmón humano, $MSLN^{lo}$) y parental A431 ($MSLN^{neg}$). Todas las líneas celulares utilizadas se obtuvieron directamente de la Colección de Cultivos Tipo de Estados Unidos (ATCC), con las excepciones de IGROV1 (obtenido del Instituto Nacional del Cáncer, con autorización) y A3 (generado en Morphotek de A431 parental).

1.4 Conjugación de anticuerpo-fármaco

1.4.1 Conjugación basada en cisteína utilizando maleimidas

1.4.1.1 Conjugación con disulfuros intercatenarios

1.4.1.1.1 Reducción parcial

[00391] Se cambió el amortiguador de MORAb-003 y MORAb-009 por solución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco (DPBS) y después se concentró a 20 mg/mL utilizando concentración centrífuga. Se añadió un volumen igual de 270 µM tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) en 1X DPBS con 2 mM EDTA y se realizó la reducción mediante agitación suave durante 80 min a temperatura ambiente. Se redujo parcialmente trastuzumab de forma similar, con la diferencia de que la reducción se realizó mediante agitación suave durante 40 min a temperatura ambiente.

1.4.1.1.2 Conjugación

[00392] Se conjugó el compuesto de maleimido-enlazador-eribulina (en DMSO) con los anticuerpos reducidos parcialmente en una proporción molar de 1:6 (mAb:compuesto). Se añadió el compuesto a propilenglicol al 50 % en DPBS y se mezcló bien. Se añadió un volumen igual de anticuerpo parcialmente reducido y se mezcló suavemente (concentración final de propilenglicol del 25 %). La conjugación continuó durante 3,5 a 4 horas a temperatura ambiente.

1.4.1.2 Conjugación con LCcys80

1.4.1.2.1 Decisteinilación

[00393] Utilizando un ÄKTA Explorer (GE Healthcare), se equilibró una columna de proteína A (GE Healthcare) con 10 volúmenes de columna (CV) de 20 mM de fosfato de sodio, 10 mM de EDTA, pH 7,2 (amortiguador de equilibrio). Se cargó el medio acondicionado, seguido del lavado del material no unido con 10 CV de amortiguador de equilibrio. Se lavó la columna con 16 CV de 20 mM de fosfato de sodio, 10 mM de EDTA, 5 mM de cisteína, pH 7,2 a 0,5 mL/min durante 16 horas para retirar el grupo casquete. Se lavó la columna con 60 CV de 20 mM de Tris, pH 7,5 a 0,5 mL/min durante 60 horas. Se eluyó el anticuerpo decisteinilado utilizando 5 CV de glicina 0,1 M, pH 2,9 y se neutralizó inmediatamente utilizando un volumen del 5 % de Tris 2 M, pH 9,0. Se agruparon las fracciones que contenían los anticuerpos y se dializaron en DPBS utilizando un MWCO 20K Slide-A-Lyzer (Thermo Fisher).

1.4.1.2.2 Conjugación

[00394] El anticuerpo decisteinilado se llevó a 5,0 mg/mL en DPBS, se preparó 1 mM de EDTA y 50 % de propilenglicol en DPBS, 1 mM de EDTA. Se añadió MAL-PEG2-Val-Cit-PAB-eribulina (ER-001159569) (12 mM en DMSO) al propilenglicol al 50 % y se mezcló bien. Se añadió un volumen igual de anticuerpo decisteinilado en una proporción molar de 1:4 (mAb:compuesto) y se mezcló suavemente. La conjugación continuó durante 3,5 a 4 horas a temperatura ambiente.

1.4.2 Conjugación basada en amina utilizando succinimidas

1.4.2.1 Conjugación

[00395] Se llevó el anticuerpo (MORAb-003 o MORAb-009, no reducido) a 10,0 mg/mL en bicarbonato de sodio 0,1 M, pH 8,3. Se preparó propilenglicol al 50 % en bicarbonato de sodio 0,1 M, pH 8,3. Se añadió succinimida (OSu)-enlazador-eribulina (en DMSO) al propilenglicol al 50 % y se mezcló bien. Se añadió un volumen igual de anticuerpo en una proporción molar de 1:4 (mAb:compuesto) y se mezcló bien. La conjugación continuó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se inactivó la reacción de conjugación con el añadido de un volumen 1:20 de 1 M Tris, pH 8,0 y se purificó el ADC como se

describe en la sección 1.4.4.

1.4.3 Conjugación basada en amina de dos etapas utilizando química de alquino-azida promovida por cepa (SPAAC)

1.4.3.1 Derivación de dibencilciclooctino (DBCO)

[00396] Se llevó el anticuerpo (MORAb-003 o MORAb-009, no reducido) a 10,0 mg/mL en bicarbonato de sodio 0,1 M, pH 8,3. Se preparó propilenglicol al 50 % en bicarbonato de sodio 0,1 M, pH 8,3. Se añadió NHS-PEG_4-DBCO (Click Chemistry Tools, 50 mM en DMSO) al propilenglicol al 50 % y se mezcló bien. Se añadió un volumen igual de anticuerpo en una proporción molar de 1:4 (mAb:compuesto) y se mezcló bien. La conjugación continuó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se retiró el NHS-PEG_4-DBCO sin reaccionar, como se describe en la sección 1.4.4.

1.4.3.2 Conjugación

[00397] Se preparó propilenglicol al 50 % en DPBS. Se añadieron compuestos de azido-enlazador-eribulina al propilenglicol al 50 % y se mezcló bien. Se añadió un volumen igual del MORAb-003 o MORAb-009 modificado por DBCO a la mezcla en una proporción molar de 1:4 (mAb:compuesto) y se mezcló bien. Se dejó que continuara la conjugación de SPAAC durante la noche a temperatura ambiente. Se retiró el NHS-PEG_4-DBCO sin reaccionar, como se describe en la sección 1.4.4.

1.4.4 Purificación

[00398] Se purificó el anticuerpo conjugado utilizando columnas desalinizantes HiTrap (GE Healthcare). Se realizó cromatografía en cromatografía líquida de proteína rápida (FPLC) (GE Healthcare), utilizando 1X DPBS como amortiguador de corrida para retirar maleimido/OSu/azido-enlazador-eribulina y propilenglicol. Se determinó el contenido de proteína final mediante ensayo BCA, según lo descrito en la sección 1.3.1 del ejemplo 1.

1.5 Caracterización biofísica

1.5.1 Análisis SEC-HPLC

[00399] Se analizó la agregación de ADC mediante cromatografía líquida de alto rendimiento y exclusión por tamaño (SEC-HPLC) utilizando una HPLC Agilent 1260. Se diluyó el ADC a 1 mg/mL en DPBS. Se inyectó el ADC (10 µL) en una columna protectora Advanced SEC 300A (4,6 mm x 3,5 cm, tamaño de poro 2,7 µm, Agilent), seguido de una columna AdvancedBio 300A (4,6 mm x 30 cm, tamaño de poro 2,7 µm). Se eluyó ADC de la columna con fosfato de sodio 0,1 M que contenía 0,15 M NaCl y 5 % IPA, pH 7,4 a una velocidad de flujo de 0,25 mL/min durante 28 min. Se analizaron todos los datos utilizando el software Agilent ChemStation. Se calculó la agregación porcentual como

$[PA_{agregación}/PA_{total}]*100$, en donde PA = área pico integrada.

1.5.2 Análisis HIC-HPLC de la proporción de fármaco a anticuerpo (DAR)

[00400] Se analizó DAR utilizando HPLC de interacción hidrófoba (HIC-HPLC). Se inyectaron las muestras en un TSKgel® butil-NP5, 4,6 mm ID x 3,5 µM, columna de tamaño no poroso 2,5 µM (Tosoh Bioscience), y se eluyeron con un equilibrio de 3 min en 100 % de la fase móvil A, un gradiente de 15 min (0-100 % B), un reposo de 5 min en 100 % B, un cambio de 1 min a 100 % A y un nuevo equilibrio de 5 min en 100 % de la fase móvil A, a 0,7 mL/min. La fase móvil A fue 25 mM de fosfato de sodio, sulfato de amonio 1,5 M, pH 7,0. La fase móvil B fue 25 mM de fosfato de sodio, isopropanol al 25 %, pH 7,0. Se realizó la detección a 280 nm (referencia 320 nm). Se determinó DAR mediante la fórmula:

$[AUC_{+1} + 2(AUC_{+2}) + 3(AUC_{+3}) + \ldots n(AUC_{+n})]/\Sigma AUC_{tot}]$

en donde AUC_{+1} es el área bajo la curva para el pico de anticuerpo que corresponde a ADC conjugado con una citotoxina, AUC_{+2} es el área bajo la curva para el pico de anticuerpo que corresponde a ADC conjugado con dos citotoxinas, etc. ΣAUC_{tot} es el área combinada bajo la curva para todos los picos.

1.5.3 Análisis de DAR LC-MS

[00401] DAR también se analizó utilizando un método LC-MS con una HPLC Waters Alliance con detección de SQD/PDA. Se inyectaron las muestras en una columna Proteomix RP-1000 (5 µM, 1000A, 4,6 mm x 15 cm, Sepax) a 65 ºC y se eluyeron con un equilibrio de 3 min en 25 % B, un gradiente lineal de 27 min de 25 %-55 % B, un reposo de 5 min a 55 % B, un cambio de 1 min a 90 % B, un reposo de 5 min a 90 % B, un nuevo cambio de 1 min a 25 % B y un reequilibrio de 5 min a 25 %B. La fase móvil A fue 0,1 % TFA en agua y la fase móvil B fue 0,1 % TFA en acetonitrilo. Se dividió el eluato (10:1) en los detectores PDA y SQD. El detector de SQD se configuró como ES positivo, el voltaje capilar a 3,2 kV, el voltaje de cono a 40 V, el extractor a 3 V y el lente RF a 0,2 V, la temperatura original a 150 ºC y la temperatura de desolvatación a 250 ºC. Los datos de masa se obtuvieron a 200-2000m/z durante 40 min, modo continuo, tiempo de escaneo de 1 segundo. Se analizaron los datos y se desconvolucionaron fuera de línea utilizando MassLynx y MaxEnt1. DAR se calculó utilizando la fórmula:

$2[[AUC_{LC+1} + 2(AUC_{LC+2}) + 3(AUC_{LC+3}) + \ldots n(AUC_{LC+n})]/\Sigma I_{LC}tot]+$

$2[[AUC_{HC+1} + 2(AUC_{HC+2}) + 3(AUC_{HC+3}) + \ldots n(AUC_{HC+n})]/\Sigma AUC_{HC}tot]$

en donde AUC_{LC+1} es el área bajo la curva del pico de cadena ligera conjugado con una citotoxina, AUC_{LC+2} es el área bajo la curva del pico de cadena ligera conjugado con dos citotoxinas, etc. AUC_{HC} es el área bajo la curva de las cadenas pesadas correspondientes y $\Sigma AUC_{LC}tot$ y $\Sigma AUC_{HC}tot$ son el área combinada bajo la curva de todas las cadenas ligeras y cadenas pesadas sin conjugar y conjugadas,

respectivamente.

1.5.4 Análisis de DAR UPLC/ESI-MS de ADC de LCcys80

[00402] Se redujo ADC (1 mg/mL) mediante el añadido de DTT hasta una concentración final de 20 mM, seguido de incubación a 60 ºC durante 3 min. Se analizaron las muestras utilizando una cromatografía líquida de ultrarrendimiento Waters Acquity y espectrómetro de masas Premier Q-Tof. Se inyectaron muestras (0,5-2 µg cada una) a una microcolumna desalinizante MassPrep a 65 ºC, se eluyeron de la columna con un equilibrio de 5 min en 95 % de la fase móvil A, un gradiente de 10 min (5-90 % B) y un nuevo equilibrio de 10 min en 95 % de la fase móvil A, a 0,05 mL/min. La fase móvil A fue ácido fórmico al 0,1 % en agua. La fase móvil B fue ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo. El espectrómetro de masas Q-Tof se ejecutó en modo V de ion positivo con detección en el intervalo de 500-4000 m/z. Los parámetros originales fueron los siguientes: voltaje capilar, 2,25 kV (anticuerpo intacto)-2,50 kV (anticuerpo reducido); voltaje de cono de muestreo, 65,0 V (anticuerpo intacto) o 50,0 V (anticuerpo reducido); temperatura original, 105 ºC; temperatura de desolvatación, 250 ºC; flujo de gas de desolvatación, 550 L/h. El pico de proteína de cadena ligera se desconvolucionó utilizando la función MaxEnt 1 MassLynx. Se utilizaron las intensidades relativas de las masas de cadena ligera sin conjugar y conjugada de forma única para calcular la DAR general utilizando la fórmula:

$2[LC_{+1}/\Sigma LC_{tot}]$

en donde LC_{+1} es la intensidad de masa de la cadena ligera conjugada con una citotoxina y ΣLC_{tot} son las intensidades combinadas de la cadena ligera sin conjugar y conjugada.

1.6 Caracterización de unión

1.6.1 BIAcore

[00403] Se ajustaron las concentraciones de anticuerpo a 2 µg/mL en amortiguador HBS-P+ (GE Healthcare). Se inyectaron anticuerpos sin modificar, o ADC, sobre un sensor de IgG antihumano en un BIAcore T100 (GE Healthcare) durante 1 min a una velocidad de flujo de 10 µL/min. Para registrar la asociación del antígeno con el anticuerpo capturado, se inyectó una serie de concentraciones crecientes de antígeno durante 300 seg a una velocidad de flujo de 30 µL/min. Para los anticuerpos anti-mesotelina, el intervalo de concentraciones fue de 10 nM – 0,041 nM. Para los ADC de MORAb-003 y MORAb-009, el intervalo de concentraciones fue 100 nM – 0,41 nM. Se monitorizó la disociación del antígeno durante 30 min a la misma velocidad de flujo. Se regeneró la superficie del sensor mediante inyección de 3 M $MgCl_2$ durante 2 x 30 seg a una velocidad de flujo de 30 µL/min. Se analizaron los sensogramas con el software Biacore T100 Evaluation utilizando un modelo de unión Langmuir 1:1.

1.6.2 ELISA - Receptor de folato alfa

[00404] Se diluyó el receptor de folato alfa humano recombinante a 115 ng/mL en amortiguador de cobertura (50 mM de amortiguador de carbonato-bicarbonato, pH 9,6) y se recubrió en placas negras Maxisorp de 96 pocillos (Thermo, N.º de cat. 43711, 100 µL/pocillo) a 4 ºC, durante la noche. Se descartó la solución de recubrimiento y se lavaron las placas tres veces utilizando 1X PBS con amortiguador Tween-20 (PBST) al 0,05 %. Se bloquearon las placas en 300 µL de amortiguador de bloqueo (1 % BSA en PBST) a temperatura ambiente durante 2 horas en un agitador orbital. Se diluyeron los ADC de MORAb-003 y MORAb-003 a 1000 ng/mL en amortiguador de bloqueo, después se diluyeron en serie 2 veces para obtener un intervalo de 1000 ng/mL a 0,98 ng/mL. Se descartó el amortiguador de bloqueo y se añadieron 100 µL/pocillo de anticuerpo diluido a las placas. Se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 2 horas en un agitador orbital. Se desechó la solución de anticuerpo y se lavaron las placas tres veces utilizando PBST. Se añadieron 100 µL/pocillo de solución de IgG anti-humana de cabra (H+L)-HRP (dilución 1:10.000 en amortiguador de bloqueo) a las placas y se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 1 hora en un agitador orbital. Se desechó la solución de anticuerpo secundario y se lavaron las placas tres veces utilizando PBST. Se añadieron 100 µL/pocillo de solución de trabajo de sustrato de peroxidasa fluorogénica QuantaBlu (Thermo, N.º de cat. 15169) a las placas y se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 30 min. Se leyó la fluorescencia a una excitación 325 nm/emisión 420 nm utilizando un SpectraMax M5 (Molecular Devices). Se analizaron los datos utilizando el software SoftMaxPro 5.4.2 con un ajuste de 4 parámetros.

1.6.3 ELISA - Mesotelina

[00405] Se diluyó mesotelina humana recombinante a 1 µg/mL en amortiguador de cobertura (50 mM de amortiguador de carbonato-bicarbonato, pH 9,6) y se recubrió en placas negras Maxisorp de 96 pocillos (Thermo, N.º de cat. 43711, 100 µL/pocillo) a 4 ºC, durante la noche. Se descartó la solución de recubrimiento y se lavaron las placas tres veces utilizando 1X PBS con amortiguador Tween-20 (PBST) al 0,05 %. Se bloquearon las placas en 300 µL de amortiguador de bloqueo (1 % BSA en PBST) a temperatura ambiente durante 2 horas en un agitador orbital. Se diluyeron los ADC de MORAb009 y MORAb-009 a 1000 ng/mL en amortiguador de bloqueo, después se diluyeron en serie 2,5 veces para obtener un intervalo de 1000 ng/mL a 0,105 ng/mL. Se descartó el amortiguador de bloqueo y se añadieron 100 µL/pocillo de anticuerpo diluido a las placas. Se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 2 horas en un agitador orbital. Se desechó la solución de anticuerpo y se lavaron las placas tres veces utilizando PBST. Se añadieron 100 µL/pocillo de solución de IgG anti-humana de

cabra (H+L)-HRP (dilución 1:10.000 en amortiguador de bloqueo) a las placas y se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 1 hora en un agitador orbital. Se desechó la solución de anticuerpo secundario y se lavaron las placas tres veces utilizando PBST. Se añadieron 100 µL/pocillo de solución de trabajo de sustrato de peroxidasa fluorogénica QuantaBlu (Thermo, N.º de cat. 15169) a las placas y se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 30 min. Se leyó la fluorescencia a una excitación 325 nm/emisión 420 nm utilizando un SpectraMax M5 (Molecular Devices). Se analizaron los datos utilizando el software SoftMaxPro 5.4.2 con un ajuste de 4 parámetros.

1.7 Análisis de citotoxicidad

1.7.1 Ensayo de cristal violeta

[00406] Se subcultivaron y se sembraron células IGROV1 (FR^{hi}, $MSLN^{neg}$), NCI-H2110 (FR^{med}, $MSLN^{med}$) y A431 (FR^{neg}, $MSLN^{neg}$) a 5.000 células/pocillo en medio de crecimiento completo en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos, se incubaron a 37 ºC, CO_2 al 5 % durante la noche (16 horas). Se diluyeron en serie los reactivos de prueba 1:3 en placas de dilución de pocillo profundo de 2 mL, partiendo de 200 nM (10 diluciones en total). Se añadieron las muestras diluidas (100 µL) a las placas de células (concentración de partida de las muestras de prueba a 100 nM). Se incubaron las placas a 37 ºC, CO_2 al 5 % durante otros 5 días. Se desechó el medio. Se lavaron las placas una vez con 200 µL de DPBS, se tiñeron con 50 µL de solución de cristal violeta al 0,2 % a temperatura ambiente durante 15 min y después se lavaron bien con agua del grifo. Se secaron al aire las placas y se disolvió cristal violeta con 200 µL de solución de SDS al 1 %. Se leyeron las placas a 570 nm. Se analizaron los datos utilizando GraphPad Prism 6.

2. Resultados

2.1 Caracterización biofísica de ADC de MORAb-003, MORAb-009 y trastuzumab

[00407] Se prepararon ADC de MORAb-003 (receptor de folato alfa anti-humano humanizado), MORAb-009 (mesotelina anti-humana quimérica de ratón-humano) y trastuzumab (her2 anti-humano humanizado) utilizando los compuestos de eribulina conjugables enumerados en la tabla 46 de acuerdo con uno de tres métodos de conjugación, incluidos: (1) reducción parcial de disulfuros entre cadenas de anticuerpo utilizando el TCEP reductor no tiol, seguido de conjugación utilizando construcciones de maleimido-espaciador-enlazador-eribulina reactivas a tiol; (2) conjugación directa con residuos de lisina de anticuerpo utilizando construcciones de succinimida (OSu)-espaciador-enlazador-eribulina; y (3) conjugación con residuos de lisina de anticuerpo utilizando un enfoque de dos etapas, mediante lo cual se conjugó primero OSu-PEG4-dibencilciclooctina con residuos de lisina, después se realizó

conjugación ortogonal de construcciones de azido-espaciador-enlazador-eribulina utilizando SPAAC.

[00408] Después de la purificación, se determinaron los niveles de agregación para todos los ADC de MORAb-003, MORAb-009 y trastuzumab mediante SEC-HPLC y se analizó la proporción de fármaco a anticuerpo (DAR) utilizando LC-MS de fase inversa y/o HIC-HPLC. Se analizó DAR para todos los ADC basados en maleimida utilizando LC-MS de fase inversa e HIC-HPLC. Se observó típicamente una diferencia en los valores de DAR de menos de 0,3 entre los dos métodos. En contraste, se analizó DAR para todos los ADC preparados mediante conjugación a través de residuos de lisina solo por LC-MS, ya que el alto grado de heterogeneidad de estos ADC impide la resolución de las especies de DAR individuales por HIC-HPLC. La unión al antígeno diana también se analizó utilizando ELISA para los ADC de MORAb-003 y MORAb-009. Los resultados de los análisis de DAR y de agregación se muestran en la tabla 47 junto al ADC respectivo.

Tabla 47.
Análisis biofísicos de ADC de MORAb-003, MORAb-009 y trastuzumab

					Análisis de DAR		**Análisis SEC-HPLC**			**Unión a antígenos**	
ADC	anticuerpo	química de conjugación	espaciador	química de escisión	DAR (LC-MS)	DAR (HIC-HPLC)	% de agr.	% de monómero	% de frag.	ELISA, EC_{50}, ng/mL	ELISA, EC_{50}, nM
MORAb003		N/A	N/A	N/A			3,62	96,38	0	6,29	0,04
MORAb009		N/A	N/A	N/A			0	100	0	42,60	0,28
trastuzumab		N/A	N/A	N/A			3,52	96,48	0	N/A	N/A
MORAb003-ER1159569 (lote NB3073-88L)	MORAb-003	maleimida	PEG2	val-cit-pAB	3,58	3,91	3,12	96,88	0	22,60	0,15
MORAb009-ER1159569 (lote NB3073-88F)	MORAb-009	maleimida	PEG2	val-cit-pAB	3,63	3,93	3,23	96,77	0	43,70	0,29

Tabla 47.
Análisis biofísicos de ADC de MORAb-003, MORAb-009 y trastuzumab

					Análisis de DAR		**Análisis SEC-HPLC**			**Unión a antígenos**	
ADC	anticuerpo	química de conjugación	espaciador	química de escisión	DAR (LC-MS)	DAR (HIC-HPLC)	% de agr.	% de monómero	% de frag.	ELISA, EC_{50}, ng/mL	ELISA, EC_{50}, nM
MORAb003-ER1159569 (lote NB3142-62A)	MORAb-003	maleimida	PEG2	val-cit-pAB	4,80	4,88	3,21	96,79	0	18,20	0,12
MORAb009-ER1159569 (lote NB3142-62D)	MORAb-009	maleimida	PEG2	val-cit-pAB	4,68	4,57	0,90	99,10	0	33,10	0,22
trastuzumab-ER1159569	trastuzumab	maleimida	PEG2	val-cit-pAB	3,10	3,11	1,26	98,74	0	N/A	N/A
MORAb003-ER1242	MORAb-003	maleimida	PEG8	val-cit-pAB	2,31	2,35	18,63	81,37	0	21,50	0,14

Tabla 47.
Análisis biofísicos de ADC de MORAb-003, MORAb-009 y trastuzumab

					Análisis de DAR		**Análisis SEC-HPLC**			**Unión a antígenos**	
ADC	anticuerpo	química de conjugación	espaciador	química de escisión	DAR (LC-MS)	DAR (HIC-HPLC)	% de agr.	% de monómero	% de frag.	ELISA, EC_{50}, ng/mL	ELISA, EC_{50}, nM
287											
MORAb009-ER1242287	MORAb-009	maleimida	PEG8	val-cit-pAB	1,13	2,00	11,24	88,76	0	58,60	0,39
MORAb003-ER1235638	MORAb-003	maleimida	pentilo	val-cit-pAB	3,65	3,89	3,95	96,05	0	15,30	0,10
MORAb009-ER1235638	MORAb-009	maleimida	pentilo	val-cit-pAB	3,99	4,10	4,5	95,5	0	65,60	0,44
MORAb003-ER1231679	MORAb-003	maleimida	PEG2	ala-ala-asn-pAB	3,60	3,83	3,09	96,91	0	18,30	0,12
MORAb009-ER1231679	MORAb-009	maleimida	PEG2	ala-ala-asn-pAB	3,27	3,94	4,39	95,61	0	41,40	0,28

Tabla 47.
Análisis biofísicos de ADC de MORAb-003, MORAb-009 y trastuzumab

					Análisis de DAR		**Análisis SEC-HPLC**			**Unión a antígenos**	
ADC	anticuerpo	química de conjugación	espaciador	química de escisión	DAR (LC-MS)	DAR (HIC-HPLC)	% de agr.	% de monómero	% de frag.	ELISA, EC_{50}, ng/mL	ELISA, EC_{50}, nM
MORAb003-ER1231690	MORAb-003	maleimida	PEG2	ala-ala-asn-pAB-ala-ala-asn-pAB	3,02	3,23	4,44	95,56	0	8,92	0,06
MORAb009-ER1231690	MORAb-009	maleimida	PEG2	ala-ala-asn-pAB-ala-ala-asn-pAB	2,36	3,17	6,22	93,78	0	58,70	0,39
MORAb003-ER1237504	MORAb-003	maleimida	PEG4-triazol-PEG3	disilfidil-dimetil-pAB	0,52	1,61	13,73	86,27	0	29,80	0,20
MORAb009-ER1237504	MORAb-009	maleimida	PEG4-triazol-PEG3	disilfidil-dimetil-pAB	0,72	1,03	9,78	90,22	0	55,90	0,37
MORAb003-ER1237	MORAb-003	maleimida	PEG4-triazol-PEG3	sulfonamida	1,85	3,88	5,72	94,28	0	18,30	0,12

Tabla 47.
Análisis biofísicos de ADC de MORAb-003, MORAb-009 y trastuzumab

					Análisis de DAR		**Análisis SEC-HPLC**			**Unión a antígenos**	
ADC	anticuerpo	química de conjugación	espaciador	química de escisión	DAR (LC-MS)	DAR (HIC-HPLC)	% de agr.	% de monómero	% de frag.	ELISA, EC_{50}, ng/mL	ELISA, EC_{50}, nM
505											
MORAb009-ER1237505	MORAb-009	maleimida	PEG4-triazol-PEG3	sulfonamida	2,33	3,91	5,44	94,56	0	61,00	0,41
MORAb003-PEG2-eribulina	MORAb-003	maleimida	PEG2	no escindible	4,15	4,49	3,97	96,03	0	6,96	0,05
MORAb009-PEG2-eribulina	MORAb-009	maleimida	PEG2	no escindible	4,55	4,30	1,15	97,11	1,74	8,84	0,06
MORAb003-PEG4-eribulina	MORAb-003	maleimida	PEG4	no escindible	4,70	4,79	9,84	89,76	0	9,31	0,06
MORAb009-PEG4-	MORAb-009	maleimida	PEG4	no escindible	4,48	4,57	1,03	97,13	1,84	11,60	0,08

Tabla 47.
Análisis biofísicos de ADC de MORAb-003, MORAb-009 y trastuzumab

					Análisis de DAR		**Análisis SEC-HPLC**			**Unión a antígenos**	
ADC	anticuerpo	química de conjugación	espaciador	química de escisión	DAR (LC-MS)	DAR (HIC-HPLC)	% de agr.	% de monómero	% de frag.	ELISA, EC_{50}, ng/mL	ELISA, EC_{50}, nM
eribulina											
MORAb003-ER1236940	MORAb-003	succinimida	PEG2	val-cit-pAB	0,72		3,65	96,35	0	17,00	0,11
MORAb009-ER1236940	MORAb-009	succinimida	PEG2	val-cit-pAB	0,89		2,75	97,25	0	66,30	0,44
MORAb003-ER1242288	MORAb-003	succinimida	PEG9	val-cit-pAB	0,00		2,85	97,15	0	14,40	0,10
MORAb009-ER1242288	MORAb-009	succinimida	PEG9	val-cit-pAB	0,21		1,69	98,31	0	15,30	0,10
MORAb003-ER1236	MORAb-003	succinimida	pentilo	val-cit-pAB	0,77		3,13	96,87	0	13,00	0,09

Tabla 47.
Análisis biofísicos de ADC de MORAb-003, MORAb-009 y trastuzumab

					Análisis de DAR		**Análisis SEC-HPLC**			**Unión a antígenos**	
ADC	anticuerpo	química de conjugación	espaciador	química de escisión	DAR (LC-MS)	DAR (HIC-HPLC)	% de agr.	% de monómero	% de frag.	ELISA, EC_{50}, ng/mL	ELISA, EC_{50}, nM
941											
MORAb009-ER1236941	MORAb-009	succinimida	pentilo	val-cit-pAB	0,93		3,04	96,96	0	44,60	0,30
MORAb003-ER1243700	MORAb-003	succinimida	PEG3-triazol-PEG3	val-cit-pAB	0,00		3,92	96,08	0	6,22	0,04
MORAb009-ER1243700	MORAb-009	succinimida	PEG3-triazol-PEG3	val-cit-pAB	0,06		1,97	98,03	0	46,70	0,31
MORAb003-ER1231691	MORAb-003	succinimida	PEG2	ala-ala-asn-pAB	0,37		3,46	96,54	0	11,50	0,08
MORAb009-ER1231691	MORAb-009	succinimida	PEG2	ala-ala-asn-pAB	0,29		2,45	97,55	0	43,30	0,29

Tabla 47.
Análisis biofísicos de ADC de MORAb-003, MORAb-009 y trastuzumab

					Análisis de DAR		**Análisis SEC-HPLC**			**Unión a antígenos**	
ADC	anticuerpo	química de conjugación	espaciador	química de escisión	DAR (LC-MS)	DAR (HIC-HPLC)	% de agr.	% de monómero	% de frag.	ELISA, EC_{50}, ng/mL	ELISA, EC_{50}, nM
MORAb003-ER1244129	MORAb-003	succinimida	PEG3-triazol-PEG3	disilfidil-dimetil-pAB	0,24		10,87	89,13	0	14,30	0,10
MORAb009-ER1244129	MORAb-009	succinimida	PEG3-triazol-PEG3	disilfidil-dimetil-pAB	0,47		12,79	87,21	0	57,70	0,38
MORAb003-ER1244623	MORAb-003	succinimida	PEG3-triazol-PEG3	sulfonamida	0,55		5,21	94,79	0	4,54	0,03
MORAb009-ER1244623	MORAb-009	succinimida	PEG3-triazol-PEG3	sulfonamida	1,14		0	100	0	39,00	0,26
MORAb003-DBCO-ER1237508	MORAb-003	succinimida/click	dibenciclooctenotriazol-PEG3	disilfidil-dimetil-pAB	2,19		4,1	95,9	0	24,10	0,16

Tabla 47.
Análisis biofísicos de ADC de MORAb-003, MORAb-009 y trastuzumab

					Análisis de DAR		**Análisis SEC-HPLC**			**Unión a antígenos**	
ADC	anticuerpo	química de conjugación	espaciador	química de escisión	DAR (LC-MS)	DAR (HIC-HPLC)	% de agr.	% de monómero	% de frag.	ELISA, EC_{50}, ng/mL	ELISA, EC_{50}, nM
MORAb009-DBCO-ER1237508	MORAb-009	succinimida/click	dibenciclooctino-triazol-PEG3	disilfidil-dimetil-pAB	2,33		0	100	0	53,80	0,36
MORAb003-DBCO-ER1138856	MORAb-003	succinimida/click	dibenciclooctino-triazol-PEG3	sulfonamida	1,82		3,49	96,51	0	15,00	0,10
MORAb009-DBCO-ER1138856	MORAb-009	succinimida/click	dibenciclooctino-triazol-PEG3	sulfonamida	1,59		0	100	0	44,70	0,30
MORAb003-DBCO-PEG4VCP eribulina	MORAb-003	succinimida/click	dibenciclooctino-triazol-PEG4	val-cit-pAB	3,09		2,87	97,13	0	16,00	0,11

Tabla 47.
Análisis biofísicos de ADC de MORAb-003, MORAb-009 y trastuzumab

					Análisis de DAR		**Análisis SEC-HPLC**			**Unión a antígenos**	
ADC	anticuerpo	química de conjugación	espaciador	química de escisión	DAR (LC-MS)	DAR (HIC-HPLC)	% de agr.	% de monómero	% de frag.	ELISA, EC_{50}, ng/mL	ELISA, EC_{50}, nM
MORAb009-DBCO-PEG4 VCP eribulina	MORAb-009	succinimida/click	dibenciclooctino-triazol-PEG4	val-cit-pAB	2,91		0,22	99,78	0	33,70	0,22
MORAb003-DBCO-PEG2 eribulina	MORAb-003	succinimida/click	dibenciclooctino-triazol-PEG2	no escindible	3,43		3,88	96,12	0	19,10	0,13
MORAb009-DBCO-PEG2 eribulina	MORAb-009	succinimida/click	dibenciclooctino-triazol-PEG2	no escindible	3,07		1,15	98,85	0	23,30	0,16
MORAb003-DBCO-PEG4 eribulina	MORAb-003	succinimida/click	dibenciclooctino-triazol-PEG4	no escindible	2,96		3,64	96,36	0	13,30	0,09

Tabla 47.
Análisis biofísicos de ADC de MORAb-003, MORAb-009 y trastuzumab

					Análisis de DAR		**Análisis SEC-HPLC**			**Unión a antígenos**	
ADC	anticuerpo	química de conjugación	espaciador	química de escisión	DAR (LC-MS)	DAR (HIC-HPLC)	% de agr.	% de monómero	% de frag.	ELISA, EC_{50}, ng/mL	ELISA, EC_{50}, nM
MORAb009-DBCO-PEG4 eribulina	MORAb-009	succinimida/click	dibenciclooctino-triazol-PEG4	no escindible	2,8		1,12	98,88	0	45,20	0,30

Abreviaturas: % de agr., % de agregación; % de frag., % de fragmentación.

2.1.1 ADC de MORAb-003, MORAb-009 y trastuzumab

[00409] No se observaron diferencias significativas entre MORAb-003, MORAb-009 y trastuzumab en términos de eficacia de conjugación y parámetros biofísicos. Todos los ADC demostraron valores de DAR y niveles de formación de agregados similares.

2.1.2 ADC basados en maleimida

[00410] Para los ADC basados en maleimida, los espaciadores de pentilo y PEG_2 emparejados con un sitio de escisión de val-cit-pAB y un espaciador PEG_2 emparejado con un sitio de escisión de ala-ala-asn-pAB, proporcionaron valores de DAR entre 3,5 y 4,0 según LC-MS de fase inversa e HIC-HPLC, además de niveles de agregados bajos (<5 %). Sin embargo, cuando el espaciador se alargó a PEG_8 (emparejado con un sitio de escisión de val-cit-pAB), los niveles de agregados aumentaron (11-18 %) y la eficacia de la conjugación disminuyó, lo que produjo valores de DAR entre 1,1 y 2,3. Véase, p. ej., agregación porcentual y valores de DAR de MORAb003/MORAb009-ER-001159569 (enlazador de PEG corto) y MORAb003/MORAb009-1242287 (enlazador de PEG largo) en la tabla 47.

[00411] Para los ADC preparados con un sitio de escisión de disulfidilo-pAB, se observaron valores de DAR bajos (1,0-1,6), junto con niveles de agregados relativamente altos (10-14 %). Se observaron valores de DAR significativamente inferiores cuando estos ADC se analizaron mediante LC-MS que mediante HIC-HPLC (véase, p. ej., valores de DAR de LC-MS/HIC-HPLC para MORAb003/MORAb009-ER1237504 y MORAb003/MORAb009-ER1237505 en la tabla 47). Este resultado sugiere que el sitio de escisión del enlazador presenta inestabilidad de pH, ya que la fase móvil del análisis LC-MS es aproximadamente 3,0, mientras que la fase móvil del análisis HIC-HPLC es neutra.

[00412] Para los ADC preparados con un sitio de escisión de sulfonamida, se observaron niveles de agregados bajos (< 5 %). De forma similar a los ADC de disulfidilo-pAB, se observaron valores de DAR más bajos cuando se analizaron por LC-MS (1,8-2,3) que mediante HIC-HPLC (3,9), lo que indica nuevamente que el sitio de escisión del enlazador presenta inestabilidad de pH.

[00413] Para los enlazadores no escindibles PEG_2 y PEG_4, se observó una conjugación eficaz, lo que produce valores de DAR de entre 4,0 y 4,7. Los ADC de MORAb-009 con estos enlazadores no escindibles también demostraron niveles de agregación bajos (< 2 %), mientras que se observaron niveles de agregación ligeramente más altos para los ADC de MORAb-003 correspondientes (4 % y 10 % para PEG_2 y PEG_4, respectivamente).

2.1.3 ADC basados en succinimida

[00414]Todos los ADC preparados utilizando succinimida acoplada con espaciador-enlazador-eribulina produjeron valores de DAR < 1,0. Para confirmar que esta eficacia de conjugación más baja (relativa a las maleimidas) no fue una consecuencia del procedimiento de conjugación mismo, se volvieron a realizar estos ADC utilizando una proporción más alta de compuesto:anticuerpo y se volvieron a analizar utilizando los mismos métodos de análisis de DAR. Se obtuvieron resultados similares, lo que sugiere, sin pretender limitarse por la teoría, que los valores de DAR más bajos son una propiedad inherente de la combinación de succinimida y eribulina, y que las maleimidas se pueden conjugar de forma más eficiente. La eficiencia de la conjugación de succinimida aumentó mediante el uso de un método de dos etapas, mediante lo cual DBCO se añadió en primer lugar al anticuerpo utilizando NHS-DBCO, seguido del añadido de los compuestos de azido. Este enfoque produce valores de DAR más altos, según lo medido por análisis HPLC de fase inversa, en comparación con la conjugación directamente con los resultados de lisina de anticuerpo. Para los ADC basados en succinimida que tienen enlazadores de sulfonamida (escindible), val-cit-PAB (escindible) o PEG_2/PEG_4 (no escindible), los valores de DAR resultado de la conjugación de dos etapas fueron similares a los determinados para los ADC basados en maleimida que tienen un sitio de escisión de sulfonamida. Sin pretender limitarse por la teoría, este resultado nuevamente sugiere que valores de DAR inferiores para las reacciones de conjugación de succinimida-espaciador-enlazador-eribulina son una propiedad inherente de la combinación de succinimida y eribulina.

2.2 Caracterización de unión de ADC de MORAb-003 y MORAb-009

[00415]Para los ADC de MORAb-003, no se observaron diferencias significativas entre los ADC de enlazador-eribulina basados en maleimida no escindibles y los MORAb-003 parentales en términos de unión al antígeno diana. Para otros ADC de MORAb-003 de enlazador-eribulina basados en maleimida, se observó típicamente una pérdida de 2 a 3 veces en la unión a antígeno diana con respecto a MORAb-003 parental mediante análisis ELISA. Sin embargo, no hubo una correlación evidente entre la longitud del enlazador o la composición del enlazador y los valores de EC_{50} más bajos. De forma similar, para los ADC de MORAb-003 de enlazador-eribulina basados en succinimida, se observó generalmente una pérdida de 0 a 3 veces en la unión a antígeno diana con respecto a MORAb-003 sin conjugar. Nuevamente, no hubo una correlación evidente entre la longitud del enlazador o la composición del enlazador y los valores de EC_{50} más bajos. Para los ADC de MORAb-009, todos los ADC tuvieron una disminución inferior a 2 veces en los valores de EC_{50}, con respecto al MORAb-009 parental.

2.3 Análisis de citotoxicidad *in vitro* de ADC de MORAb-003, MORAb-009 y trastuzumab

[00416] La potencia *in vitro* de ADC de MORAb-003, MORAb-009 y trastuzumab preparados se evaluó utilizando un ensayo de citotoxicidad basado en células de cristal violeta. Las líneas celulares seleccionadas para la detección de ADC de MORAb-003 y MORAb-009 fueron IGROV1, NCI-H2110 y A431. Las células IGROV1 son de origen de carcinoma epitelial de ovario humano y expresan niveles altos de receptor de folato alfa, pero no mesotelina (es decir, MORAb-003-reactivo). Las células NCI-H2110 son de origen de carcinoma pulmonar de células no pequeñas humanas y expresan niveles moderados de receptor de folato alfa y mesotelina (es decir, MORAb-003- y MORAb-009-reactivo). Las células de control A431 son de origen de carcinoma epidérmico humano y no expresan ninguno de los antígenos diana. Los resultados de esta detección se muestran en la tabla 48. Los ADC de MORAb-003, MORAb-009 y trastuzumab que comprendían enlazador-toxina maleimido-PEG2-val-cit-pAB-eribulina (VCP-eribulina) también se evaluaron en otras líneas celulares de cáncer de mama y gástrico, lo que incluye NCI-N87 (FR^{lo}, $MSLN^{med}$, $her2^{hi}$), BT-474 (FR^{neg}, $MSLN^{neg}$, $her2^{hi}$), ZR-75 (FR^{neg}, $MSLN^{neg}$, $her2^{med}$) y NUGC3 (FR^{neg}, $MSLN^{neg}$, $her2^{neg}$). Los resultados de esta detección se muestran en la tabla 49.

Tabla 48. Detección de la citotoxicidad (IC_{50}) de los ADC de MORAb-003 y MORAb-009 sobre células IGROV1, NCI-H2110 y A431

					Análisis de citotoxicidad					
					IGROV1 (FR^{hi}, $MSLN^{neg}$)		NCI-H2110 (FR^{med}, $MSLN^{med}$)		A431 (FR^{neg}, $MSLN^{neg}$)	
ADC	anticuerpo	química de conjugación	espaciador	química de escisión	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD
MORAb003		N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
MORAb009		N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
trastuzumab		N/A	N/A	N/A						
eribulina	N/A	N/A	N/A	N/A	0,320	0,212	0,199	0,034	0,653	0,159
MORAb003-ER1159569 (Lote NB3073-88L)	MORAb-003	maleimida	PEG2	val-cit-pAB	0,155	0,064	3,685	0,417	>100	
MORAb009-ER1159569 (Lote	MORAb-009	maleimida	PEG2	val-cit-pAB	9,450	2,093	14,945	1,747	>100	

Tabla 48. Detección de la citotoxicidad (IC_{50}) de los ADC de MORAb-003 y MORAb-009 sobre células IGROV1, NCI-H2110 y A431

					Análisis de citotoxicidad					
					IGROV1 (FR^{hi}, $MSLN^{neg}$)		NCI-H2110 (FR^{med}, $MSLN^{med}$)		A431 (FR^{neg}, $MSLN^{neg}$)	
ADC	anticuerpo	química de conjugación	espaciador	química de escisión	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD
NB3073-88F)										
MORAb003-ER1159569 (Lote NB3142-62A)	MORAb-003	maleimida	PEG2	val-cit-pAB	0,020		1,550		>100	
MORAb009-ER1159569 (Lote NB3142-62D)	MORAb-009	maleimida	PEG2	val-cit-pAB	5,687		6,784		>100	
trastuzumab-ER1159569	trastuzumab	maleimida	PEG2	val-cit-pAB						
MORAb0	MORA	maleim	PEG8	val-cit-	0,115	0,035	7,065	0,4	85,	

Tabla 48. Detección de la citotoxicidad (IC_{50}) de los ADC de MORAb-003 y MORAb-009 sobre células IGROV1, NCI-H2110 y A431

					Análisis de citotoxicidad					
					IGROV1 (FR^{hi}, $MSLN^{neg}$)		NCI-H2110 (FR^{med}, $MSLN^{med}$)		A431 (FR^{neg}, $MSLN^{neg}$)	
ADC	anticuerpo	química de conjugación	espaciador	química de escisión	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD
03-ER12422287	b-003	ida		pAB				17	960	
MORAb009-ER12422287	MORAb-009	maleimida	PEG8	val-cit-pAB	25,765	8,478	34,455	3,033	>100	
MORAb003-ER12356538	MORAb-003	maleimida	pentilo	val-cit-pAB	0,105	0,092	3,920	1,032	>100	
MORAb009-ER12356538	MORAb-009	maleimida	pentilo	val-cit-pAB	6,830	0,962	13,965	6,611	>100	
MORAb003-ER12316779	MORAb-003	maleimida	PEG2	ala-ala-asn-pAB	0,080	0,028	3,800	0,566	31,630	1,202
MORAb009-	MORAb-009	maleimida	PEG2	ala-ala-asn-pAB	8,890	0,976	7,080	1,867	34,390	3,536

Tabla 48. Detección de la citotoxicidad (IC_{50}) de los ADC de MORAb-003 y MORAb-009 sobre células IGROV1, NCI-H2110 y A431

					Análisis de citotoxicidad					
					IGROV1 (FR^{hi}, $MSLN^{neg}$)		NCI-H2110 (FR^{med}, $MSLN^{med}$)		A431 (FR^{neg}, $MSLN^{neg}$)	
ADC	anticuerpo	química de conjugación	espaciador	química de escisión	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD
ER12316 79										
MORAb0 03- ER12316 90	MORA b-003	maleim ida	PEG2	ala-ala-asn-pAB-ala-ala-asn-pAB	0,125	0,021	4,745	2,1 14	38, 555	0,4 03
MORAb0 09- ER12316 90	MORA b-009	maleim ida	PEG2	ala-ala-asn-pAB-ala-ala-asn-pAB	16,98 0	5,176	12,31 0	3,4 22	54, 960	5,3 60
MORAb0 03- ER12375 04	MORA b-003	maleim ida	PEG4-triazol-PEG3	disilfidil-dimetil-pAB	0,265	0,092	0,845	0,1 77	7,0 05	0,2 90
MORAb0 09- ER12375 04	MORA b-009	maleim ida	PEG4-triazol-PEG3	disilfidil-dimetil-pAB	6,375	2,751	1,220	0,3 25	8,1 30	0,6 08
MORAb0 03- ER12375	MORA b-003	maleim ida	PEG4-triazol-PEG3	sulfonam ida	0,370	0,269	0,690	0,2 83	6,8 00	0,8 34

Tabla 48. Detección de la citotoxicidad (IC_{50}) de los ADC de MORAb-003 y MORAb-009 sobre células IGROV1, NCI-H2110 y A431

					Análisis de citotoxicidad					
					IGROV1 (FR^{hi}, $MSLN^{neg}$)		NCI-H2110 (FR^{med}, $MSLN^{med}$)		A431 (FR^{neg}, $MSLN^{neg}$)	
ADC	anticuerpo	química de conjugación	espaciador	química de escisión	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD
05										
MORAb009-ER1237505	MORAb-009	maleimida	PEG4-triazol-PEG3	sulfonamida	6,370	3,012	0,990	0,453	9,030	1,527
MORAb003-PEG2-eribulina	MORAb-003	maleimida	PEG2	no escindible	0,330		38,300		>100	
MORAb009-PEG2-eribulina	MORAb-009	maleimida	PEG2	no escindible	42,770		50,040		>100	
MORAb003-PEG4-eribulina	MORAb-003	maleimida	PEG4	no escindible	0,277		21,630		>100	
MORAb009-PEG4-eribulina	MORAb-009	maleimida	PEG4	no escindible	76,320		31,600		>100	

Tabla 48. Detección de la citotoxicidad (IC_{50}) de los ADC de MORAb-003 y MORAb-009 sobre células IGROV1, NCI-H2110 y A431

					Análisis de citotoxicidad					
					IGROV1 (FR^{hi}, $MSLN^{neg}$)		NCI-H2110 (FR^{med}, $MSLN^{med}$)		A431 (FR^{neg}, $MSLN^{neg}$)	
ADC	anticuerpo	química de conjugación	espaciador	química de escisión	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD
MORAb003-ER1236940	MORAb-003	succinimida	PEG2	val-cit-pAB	0,325	0,106	30,545	3,132	>100	
MORAb009-ER1236940	MORAb-009	succinimida	PEG2	val-cit-pAB	31,915	2,510	36,500	11,031	90,060	
MORAb003-ER1242288	MORAb-003	succinimida	PEG9	val-cit-pAB	38,105	45,601	64,010	8,075	>100	
MORAb009-ER1242288	MORAb-009	succinimida	PEG9	val-cit-pAB	>100		>100		>100	
MORAb003-ER1236941	MORAb-003	succinimida	pentilo	val-cit-pAB	0,330	0,071	42,105	12,594	>100	
MORAb0	MORA	succini	pentilo	val-cit-	>100		49,48	13,	>10	

Tabla 48. Detección de la citotoxicidad (IC_{50}) de los ADC de MORAb-003 y MORAb-009 sobre células IGROV1, NCI-H2110 y A431

					Análisis de citotoxicidad					
					IGROV1 (FR^{hi}, $MSLN^{neg}$)		NCI-H2110 (FR^{med}, $MSLN^{med}$)		A431 (FR^{neg}, $MSLN^{neg}$)	
ADC	anticuerpo	química de conjugación	espaciador	química de escisión	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD
09-ER12369 41	b-009	mida		pAB			5	569	0	
MORAb0 03-ER12437 00	MORA b-003	succini mida	PEG3-triazol-PEG3	val-cit-pAB	1,150		>100		>10 0	
MORAb0 09-ER12437 00	MORA b-009	succini mida	PEG3-triazol-PEG3	val-cit-pAB	>100		>100		>10 0	
MORAb0 03-ER12316 91	MORA b-003	succini mida	PEG2	ala-ala-asn-pAB	12,32 0		31,79 5	4,4 48	>10 0	
MORAb0 09-ER12316 91	MORA b-009	succini mida	PEG2	ala-ala-asn-pAB	>100		20,00 0	5,9 54	>10 0	
MORAb0 03-	MORA b-003	succini mida	PEG3-triazol-	disilfidil-dimetil-	0,370	0,184	0,750	0,0 71	12, 005	1,5 34

Tabla 48. Detección de la citotoxicidad (IC_{50}) de los ADC de MORAb-003 y MORAb-009 sobre células IGROV1, NCI-H2110 y A431

					Análisis de citotoxicidad					
					IGROV1 (FR^{hi}, $MSLN^{neg}$)		NCI-H2110 (FR^{med}, $MSLN^{med}$)		A431 (FR^{neg}, $MSLN^{neg}$)	
ADC	anticuerpo	química de conjugación	espaciador	química de escisión	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD
ER1244129			PEG3	pAB						
MORAb009-ER1244129	MORAb-009	succinimida	PEG3-triazol-PEG3	disilfidil-dimetil-pAB	6,595	4,052	0,840	0,057	9,230	0,014
MORAb003-ER1244623	MORAb-003	succinimida	PEG3-triazol-PEG3	sulfonamida	0,980	0,396	1,820	0,410	37,235	15,733
MORAb009-ER1244623	MORAb-009	succinimida	PEG3-triazol-PEG3	sulfonamida	24,505	4,702	2,235	0,629	36,665	14,206
MORAb003-DBCO-ER1237508	MORAb-003	succinimida/click	dibencilciclooctено-triazol-PEG3	disilfidil-dimetil-pAB	0,545	0,389	0,900	0,071	9,670	0,382
MORAb009-	MORAb-009	succinimida/cl	dibencilciclooctено-	disilfidil-dimetil-	10,245	3,486	1,040	0,297	11,280	2,277

Tabla 48. Detección de la citotoxicidad (IC_{50}) de los ADC de MORAb-003 y MORAb-009 sobre células IGROV1, NCI-H2110 y A431

					Análisis de citotoxicidad					
					IGROV1 (FR^{hi}, $MSLN^{neg}$)		NCI-H2110 (FR^{med}, $MSLN^{med}$)		A431 (FR^{neg}, $MSLN^{neg}$)	
ADC	anticuerpo	química de conjugación	espaciador	química de escisión	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD
DBCO-ER1237508		ick	triazol-PEG3	pAB						
MORAb003-DBCO-ER1138856	MORAb-003	succinimida/click	dibencilciclooctenotriazol-PEG3	sulfonamida	1,775	1,421	1,655	0,007	24,990	2,022
MORAb009-DBCO-ER1138856	MORAb-009	succinimida/click	dibencilciclooctenotriazol-PEG3	sulfonamida	19,155	5,438	1,960	0,113	28,070	0,636
MORAb003-DBCO-PEG4 VCP eribulina	MORAb-003	succinimida/click	dibencilciclooctenotriazol-PEG4	val-cit-pAB	0,038		4,281		>100	
MORAb009-	MORAb-009	succinimida/cl	dibencilcicloocteno-	val-cit-pAB	12,960		31,400		>100	

Tabla 48. Detección de la citotoxicidad (IC_{50}) de los ADC de MORAb-003 y MORAb-009 sobre células IGROV1, NCI-H2110 y A431

					Análisis de citotoxicidad					
					IGROV1 (FR^{hi}, $MSLN^{neg}$)		NCI-H2110 (FR^{med}, $MSLN^{med}$)		A431 (FR^{neg}, $MSLN^{neg}$)	
ADC	anticuerpo	química de conjugación	espaciador	química de escisión	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD
DBCO-PEG4 VCP eribulina		ick	triazol-PEG4							
MORAb003-DBCO-PEG2 eribulina	MORAb-003	succinimida/click	dibencilciclooctenotriazol-PEG2	no escindible	4,250		38,070		>100	
MORAb009-DBCO-PEG2 eribulina	MORAb-009	succinimida/click	dibencilciclooctenotriazol-PEG2	no escindible	75,680		85,680		>100	
MORAb003-DBCO-PEG4 eribulina	MORAb-003	succinimida/click	dibencilciclooctenotriazol-PEG4	no escindible	1,323		46,280		>100	
MORAb009-	MORAb-009	succinimida/cl	dibencilciclooctenotriazol-	no escindibl	61,490		39,330		>100	

Tabla 48. Detección de la citotoxicidad (IC_{50}) de los ADC de MORAb-003 y MORAb-009 sobre células IGROV1, NCI-H2110 y A431					**Análisis de citotoxicidad**					
					IGROV1 (FR^{hi}, $MSLN^{neg}$)		NCI-H2110 (FR^{med}, $MSLN^{med}$)		A431 (FR^{neg}, $MSLN^{neg}$)	
ADC	anticuerpo	química de conjugación	espaciador	química de escisión	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD
DBCO-PEG4 eribulina		ick	triazol-PEG4	e						

Todos los valores de IC_{50} están en nM y representan valores promedio de experimentos replicados. SD – desviación estándar.

Tabla 49. Detección de citotoxicidad (IC_{50}) de ADC de MORAb-003, MORAb-009 y trastuzumab en células NCI-N87, BT-474, ZR-75 y NUGC3					**Análisis de citotoxicidad**			
					NCI-N87-Luc (FR^{lo}, $MSLN^{med}$, $her2^{hi}$)	BT-474 (FR^{neg}, $MSLN^{neg}$, $her2^{hi}$)	ZR-75-1 (FR^{neg}, $MSLN^{neg}$, $her2^{med}$)	NUGC3-Luc (FR^{neg}, $MSLN^{neg}$, $her2^{neg}$)
ADC	anticuerpo	química de conjugación	espaciador	química de escisión	IC_{50} (nM)	IC_{50} (nM)	IC_{50} (nM)	IC_{50} (nM)
MORAb0		N/A	N/A	N/A				

03								
MORAb009		N/A	N/A	N/A				
trastuzumab		N/A	N/A	N/A	0,78	0,641	>100	>100
eribulina	N/A	N/A	N/A	N/A	0,257	0,151	0,236	0,445
MORAb003-ER1159569 (Lote NB3073-88L)	MORAb-003	maleimida	PEG2	val-cit-pAB				
MORAb009-ER1159569 (Lote NB3073-88F)	MORAb-009	maleimida	PEG2	val-cit-pAB				
MORAb003-ER1159569 (Lote NB3142-62A)	MORAb-003	maleimida	PEG2	val-cit-pAB	4,528	11,46	14,74	20,45
MORAb009-ER1159569	MORAb-009	maleimida	PEG2	val-cit-pAB	0,013	10,21	12,8	29,93

(Lote NB3142-62D)								
trastuzumab-ER1159569	trastuzumab	maleimida	PEG2	val-cit-pAB	0,006	0,003	0,023	20,06

Todos los valores de IC_{50} están en nM y representan valores promedio de experimentos replicados. SD – desviación estándar.

2.3.1 Citotoxicidad de ADC basados en maleimida

[00417]Todos los ADC de MORAb-003 y MORAb-009 basados en maleimida mostraron citotoxicidad específica en las células IGROV1, con una diferencia de 2-3 órdenes de magnitud en la potencia observada entre los anticuerpos. Los ADC de MORAb-003 de val-cit-pAB-eribulina demostraron mayor potencia sobre la línea celular IGROV1 que los ADC de MORAb-003 no escindibles PEG_2 o PEG_4, pero la especificidad en veces no cambió. Se observaron tendencias similares para los ADC de MORAb-009, en donde los ADC de MORAb-009 no escindibles demostraron menor citotoxicidad sobre las células IGROV1 que los ADC de MORAb-009 de val-cit-pAB-eribulina.

[00418]Los ADC de MORAb-009 basados en maleimida con enlazadores basados en disulfidilo y sulfonamida demostraron mayor potencia sobre la línea celular NCI-H2110 que la línea celular IGROV1. Esto se puede deber a la posible inestabilidad de los enlazadores en cultivo, como se describe abajo. También se observó citotoxicidad potente con los ADC de MORAb-003 correspondientes. En cambio, los ADC de MORAb-003 y MORAb-009 basados en maleimida con enlazadores no escindibles demostraron una potencia relativamente baja sobre las células NCI-H2110. Sin pretender limitarse por la teoría, este resultado sugiere que con una expresión objetivo más baja, la escisión eficaz y la liberación de la carga útil pueden mejorar la citotoxicidad.

[00419]Los ADC con un enlazador escindible de enzima val-cit-pAB o un enlazador no escindible demostraron niveles bajos de destrucción fuera del objetivo sobre las células de control A431 (IC_{50} > 100 nM), mientras que los ADC con un enlazador escindible de enzima ala-ala-asn-pAB presentaron destrucción débil, pero detectable de estas células de control. Esto indica que los enlazadores escindibles de enzima val-cit-pAB pueden ser más estables en enlazadores escindibles de enzima ala-ala-asn-pAB

de cultivo. Además, los ADC de MORAb-009 con un espaciador PEG_2 más corto demostraron mayor citotoxicidad en las células IGROV1 que los ADC correspondientes con un espaciador PEG_8 más largo. Esta misma tendencia se observó en las células NCI-H2110 para los ADC de MORAb-003 y MORAb-009, con longitudes de espaciadores más cortas, lo que produce mayor citotoxicidad.

[00420]Los ADC con enlazadores basados en sulfonamida demostraron, generalmente, mayores valores de DAR y menores valores de agregados que los ADC correspondientes con enlazadores basados en disulfidilo. Sin embargo, se observó destrucción de nivel nM de las células de control A431 en ambas de estas categorías de ADC, lo que sugiere que los enlazadores basados en disulfidilo y sulfonamida fueron menos estables en cultivo que los enlazadores escindibles de enzima en las condiciones de ensayo analizadas.

[00421]La maleimido-PEG_2-val-cit-pAB-eribulina de enlazador-toxina específica (VCP-eribulina) se analizó adicionalmente en cuanto a la especificidad y la potencia en diferentes líneas celulares de cáncer gástrico y de mama. Se conjugó VCP-eribulina con MORAb-003 y MORAb-009, además del anticuerpo her2 anti-humano trastuzumab. MORAb-003-VCP-eribulina demostró una destrucción débil, pero específica, de las células NCI-N87, que expresan niveles bajos del receptor de folato alfa (FR), y destrucción baja de las tres líneas celulares negativas de FR restantes. MORAb-009-VCP-eribulina también demostró citotoxicidad potente sobre las células NCI-N87, que expresan niveles moderados de mesotelina. Trastuzumab-VCP-eribulina fue muy potente (3 – 6 pM, IC_{50}) sobre las células NCI-N87 y BT-474, las dos líneas celulares que expresan niveles altos de her2, y también fue potente sobre las células de cáncer de mama ZR-75, que solo expresan moderadamente her2. Los ADC de VCP-eribulina de MORAb-003, MORAb-009 y trastuzumab demostraron baja citotoxicidad sobre las células NUGC3, que no expresan FR, mesotelina o her2, los antígenos diana respectivos.

2.3.2 Citotoxicidad de ADC basados en succinimida

[00422]Las tendencias en la citotoxicidad de los ADC basados en succinimida fueron similares a los ADC basados en maleimida para las células IGROV1, en donde los ADC de espaciador de PEG_8 demostraron citotoxicidad baja además de valores de DAR bajos. Se observó citotoxicidad baja sobre las células IGROV1 y NCI-H2110 generalmente para los ADC basados en succinimida con enlazadores escindibles de enzima comparados con los ADC basados en maleimida correspondientes, lo que fue muy probablemente debido a sus valores de DAR más bajos. La destrucción fuera del objetivo de células A431 también se observó con los enlazadores basados en disulfidilo y sulfonamida, similar a los ADC basados en maleimida correspondientes. Esto apunta a una mayor inestabilidad que surge posiblemente

del sitio de escisión, más que la química de conjugación.

[00423] Cuando se realizó una conjugación de dos etapas, se observaron valores de DAR más altos con respecto a los obtenidos con el enfoque de conjugación de succinimida directa. Estos valores de DAR más altos se correlacionaron con una mayor potencia. Para el ADC de MORAb-003 de VCP-eribulina, se observó una citotoxicidad potente sobre las células IGROV1 y NCI-H2110. Mientras que los ADC de MORAb-003 no escindibles demostraron potencia sobre las células IGROV1 (1-4 nM), igualmente fueron menos potentes que los ADC de MORAb-003 de VCP-eribulina preparados con este método (38 pM), aunque los valores de DAR fueron similares. Además, los ADC de MORAb-003 no escindibles preparados utilizando el método de dos etapas fueron ligeramente menos potentes que los ADC basados en maleimida correspondientes sobre la línea celular IGROV1, lo que se puede deber a sus valores de DAR más bajos. De forma similar a sus contrapartes basadas en maleimida, los ADC no escindibles preparados utilizando el método de dos etapas también perdieron casi toda la citotoxicidad sobre las células NCI-2110.

2.4 Caracterización biofísica de ADC de mesotelina anti-humana (LCcys80)

[00424] Se conjugó MAL-PEG2-Val-Cit-PAB-eribulina (ER-001159569) con ocho anticuerpos de mesotelina anti-humanos diferentes (tabla 1). Las afinidades de unión de los anticuerpos parentales fueron determinadas mediante análisis BIAcore, como se describe arriba en la sección 1.6.1. Se determinaron los niveles de agregación para todos los ADC de mesotelina anti-humana mediante SEC-HPLC y se analizó la DAR utilizando HIC-HPLC. Se evaluó la potencia *in vitro* utilizando un ensayo de citotoxicidad basado en células de cristal violeta en células A3 (A431 transfectadas de forma estable con mesotelina humana (MSLN), $MSLN^{hi}$), OVCAR3 (ovario humano, $MSLN^{hi}$), HEC-251 (endometroide humano, $MSLN^{med}$), H226 (mesotelina de células escamosas de pulmón humano, $MSLN^{lo}$) y parentales A431 ($MSLN^{neg}$). Los resultados de los análisis de DAR, agregación y citotoxicidad se muestran en la tabla 50.

Tabla 50. Caracterización biofísica de ADC de mesotelina anti-humana (LCcys80)

		MAb parental			ADC								
		Afinidad			Carga útil	HIC	SEC-HPLC		Ensayo de citotoxicidad basado en células, EC50, nM				
		k_a (10^5 $M^{-1}sec^{-1}$)	k_d (10^{-5} sec^{-1})	K_D (10^{-9} M)	Fármaco-enlazador	DAR	% de agregado	% de monómero	A431	OVCAR3	HEC-251	H226	A3
33O11	xi				ER-001159569-000	1.92	8.97	91.03	40.67	0.008	3.950	>100	0.14
	zu	2.2	0.65	3.4	ER-001159569-000	1.69	1.42	98.58	~100	0.064	26.500	>100	0.28
111B10	xi	6.5	3.9	6.3	ER-001159569-000	1.90	4.25	95.75	38.10	0.004	13.960	~100	0.05
	zu	5.1	3	6.5	ER-001159569-000	1.81	3.64	96.36	68.92	0.014	27.42	>100	0.12
201C15	xi	2.4	0.26	1.1	ER-001159569-000	1.85	1.62	98.38	48.50	0.004	14.82	~100	0.27
	zu	3.1	1.1	4.2	ER-001159569-000	1.80	5.84	94.16	68.88	0.290	20.42	>100	0.41
346C6	xi	3.8	0.49	1.4	ER-001159569-000	1.56	5.28	94.72	34.49	0.087	5.73	~100	0.11
	zu	133	93	8.9	ER-001159569-000	1.63	4.48	95.52	72.86	1.180	32.54	>100	0.55

Abreviaturas: xi – quimérico; zu – humanizado.

[00425] Todos los ADC de mesotelina anti-humana mantuvieron niveles de agregación bajos (< 10 % de agregado) y demostraron potencia alta sobre las líneas celulares diana. Se observó potencia alta sobre A3 y OVCAR3, mientras que las células HEC-251 y H226 fueron relativamente resistentes a la citotoxicidad de ADC.

Secuencias seleccionadas:

ID DE SEC. NO.: 1 (cadena pesada de (HC) MORAb-003)

1 EVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCSASGFTFS GYGLSWVRQA PGKGLEWVAM

51 ISSGGSYTYY ADSVKGRFAI SRDNAKNTLF LQMDSLRPED TGVYFCARHG

101 DDPAWFAYWG QGTPVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD

151 YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSSVVTV PSSSLGTQTY

201 ICNVNHKPSN TKVDKKVEPK SCDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK

251 DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS

301 TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV

351 YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL

401 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK

ID DE SEC. NO.: 2 (CDR1 de HC de MORAb-003; Kabat): GYGLS

ID DE SEC. NO.: 3 (CDR2 de HC de MORAb-003; Kabat): MISSGGSYTYYADSVKG

ID DE SEC. NO.: 4 (CDR3 de HC de MORAb-003; Kabat): HGDDPAWFAY

ID DE SEC. NO.: 5 (secuencia de aminoácidos de preproteína de longitud completa de cadena pesada MORAb-003; secuencia líder subrayada)

1 MGWSCIILFL VATATGVHSE VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CSASGFTFSG

51 YGLSWVRQAP GKGLEWVAMI SSGGSYTYYA DSVKGRFAIS RDNAKNTLFL

101 QMDSLRPEDT GVYFCARHGD DPAWFAYWGQ GTPVTVSSAS TKGPSVFPLA

151 PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL

201 YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC

251 PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV

301 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP

351 APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV

401 EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH

451 EALHNHYTQK SLSLSPGK

ID DE SEC. NO.: 6 (cadena ligera de (LC) MORAb-003)

1 DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCSVSSSIS SNNLHWYQQK PGKAPKPWIY

51 GTSNLASGVP SRFSGSGSGT DYTFTISSLQ PEDIATYYCQ QWSSYPYMYT

101 FGQGTKVEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ

151 WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT

201 HQGLSSPVTK SFNRGEC

ID DE SEC. NO.: 7 (CDR1 de LC de MORAb-003; Kabat): SVSSSISSNNLH

ID DE SEC. NO.: 8 (CDR2 de LC de MORAb-003: Kabat): GTSNLAS

ID DE SEC. NO.: 9 (CDR3 de LC de MORAb-003; Kabat): QQWSSYPYMYT

ID DE SEC. NO.: 10 secuencia de aminoácidos de preproteína de longitud completa de cadena ligera MORAb-003 (secuencia líder subrayada)

1 MGWSCIILFL VATATGVHSD IQLTQSPSSL SASVGDRVTI TCSVSSSISS

51 NNLHWYQQKP GKAPKPWIYG TSNLASGVPS RFSGSGSGTD YTFTISSLQP

101 EDIATYYCQQ WSSYPYMYTF GQGTKVEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG

151 TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST

201 LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC

ID DE SEC. NO.: 11 (nt de HC de MORAb-003)

1 ATGGGATGGA GCTGTATCAT CCTCTTCTTG GTAGCAACAG CTACAGGTGT

51 CCACTCCGAG GTCCAACTGG TGGAGAGCGG TGGAGGTGTT GTGCAACCTG

101 GCCGGTCCCT GCGCCTGTCC TGCTCCGCAT CTGGCTTCAC CTTCAGCGGC

151 TATGGGTTGT CTTGGGTGAG ACAGGCACCT GGAAAAGGTC TTGAGTGGGT

201 TGCAATGATT AGTAGTGGTG GTAGTTATAC CTACTATGCA GACAGTGTGA

251 AGGGTAGATT TGCAATATCG CGAGACAACG CCAAGAACAC ATTGTTCCTG

301 CAAATGGACA GCCTGAGACC CGAAGACACC GGGGTCTATT TTTGTGCAAG

351 ACATGGGGAC GATCCCGCCT GGTTCGCTTA TTGGGGCCAA GGGACCCCGG

401 TCACCGTCTC CTCAGCCTCC ACCAAGGGCC CATCGGTCTT CCCCCTGGCA

451 CCCTCCTCCA AGAGCACCTC TGGGGGCACA GCGGCCCTGG GCTGCCTGGT

501 CAAGGACTAC TTCCCCGAAC CGGTGACGGT GTCGTGGAAC TCAGGCGCCC

551 TGACCAGCGG CGTGCACACC TTCCCGGCTG TCCTACAGTC CTCAGGACTC

601 TACTCCCTCA GCAGCGTGGT GACCGTGCCC TCCAGCAGCT TGGGCACCCA

651 GACCTACATC TGCAACGTGA ATCACAAGCC CAGCAACACC AAGGTGGACA

701 AGAAAGTTGA GCCCAAATCT TGTGACAAAA CTCACACATG CCCACCGTGC

751 CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCCAAA

801 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG

851 TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG

901 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA

951 CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG CACCAGGACT
1001 GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA
1051 GCCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC
1101 ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA TGAGCTGACC AAGAACCAGG
1151 TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG
1201 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC
1251 CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCTT ATATTCAAAG CTCACCGTGG
1301ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
1351 GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCCGG
1401 GAAATGA

ID DE SEC. NO.: 12 (nt de LC de MORAb-003)

1 ATGGGATGGA GCTGTATCAT CCTCTTCTTG GTAGCAACAG CTACAGGTGT
51 CCACTCCGAC ATCCAGCTGA CCCAGAGCCC AAGCAGCCTG AGCGCCAGCG
101 TGGGTGACAG AGTGACCATC ACCTGTAGTG TCAGCTCAAG TATAAGTTCC
151 AACAACTTGC ACTGGTACCA GCAGAAGCCA GGTAAGGCTC CAAAGCCATG
201 GATCTACGGC ACATCCAACC TGGCTTCTGG TGTGCCAAGC AGATTCAGCG
251 GTAGCGGTAG CGGTACCGAC TACACCTTCA CCATCAGCAG CCTCCAGCCA
301 GAGGACATCG CCACCTACTA CTGCCAACAG TGGAGTAGTT ACCCGTACAT
351 GTACACGTTC GGCCAAGGGA CCAAGGTGGA AATCAAACGA ACTGTGGCTG
401 CACCATCTGT CTTCATCTTC CCGCCATCTG ATGAGCAGTT GAAATCTGGA
451 ACTGCCTCTG TTGTGTGCCT GCTGAATAAC TTCTATCCCA GAGAGGCCAA
501 AGTACAGTGG AAGGTGGATA ACGCCCTCCA ATCGGGTAAC TCCCAGGAGA
551 GTGTCACAGA GCAGGACAGC AAGGACAGCA CCTACAGCCT CAGCAGCACC
601 CTGACGCTGA GCAAAGCAGA CTACGAGAAA CACAAAGTCT ACGCCTGCGA
651 AGTCACCCAT CAGGGCCTGA GCTCGCCCGT CACAAAGAGC TTCAACAGGG
701 GAGAGTGTTA A

ID DE SEC. NO.: 13 (CDR1 de HC de MORAb-003; IMGT): GFTFSGYG

ID DE SEC. NO.: 14 (CDR2 de HC de MORAb-003; IMGT): ISSGGSYT

ID DE SEC. NO.: 15 (CDR3 de HC de MORAb-003; IMGT): ARHGDDPAWFAY

ID DE SEC. NO.: 16 (CDR1 de LC de MORAb-003; IMGT): SSISSNN

ID DE SEC. NO.: 17 (CDR2 de LC de MORAb-003; IMGT): GTS

ID DE SEC. NO.: 18 (CDR3 de LC de MORAb-003; IMGT): QQWSSYPYMYT

ID DE SEC. NO.: 19 (FRA humano)

1 maqrmttqll lllvwvavvg eaqtriawar tellnvcmna khhkekpgpe dklheqcrpw

61 rknaccstnt sqeahkdvsy lyrfnwnhcg emapackrhf iqdtclyecs pnlgpwiqqv

121 dqswrkervl nvplckedce qwwedcrtsy tcksnwhkgw nwtsgfnkca vgaacqpfhf

181 yfptptvlcn eiwthsykvs nysrgsgrci qmwfdpaqgn pneevarfya aamsgagpwa

241 awpfllslal mllwlls

ID DE SEC. NO.: 20 (nucleótido de FRA humano)

1 cattccttgg tgccactgac cacagctctt tcttcaggga cagacatggc tcagcggatg

61 acaacacagc tgctgctcct tctagtgtgg gtggctgtag taggggaggc tcagacaagg

121 attgcatggg ccaggactga gcttctcaat gtctgcatga acgccaagca ccacaaggaa

181 aagccaggcc ccgaggacaa gttgcatgag cagtgtcgac cctggaggaa gaatgcctgc

241 tgttctacca acaccagcca ggaagcccat aaggatgttt cctacctata tagattcaac

301 tggaaccact gtggagagat ggcacctgcc tgcaaacggc atttcatcca ggacacctgc

361 ctctacgagt gctcccccaa cttggggccc tggatccagc aggtggatca gagctggcgc

421 aaagagcggg tactgaacgt gcccctgtgc aaagaggact gtgagcaatg gtgggaagat

481 tgtcgcacct cctacacctg caagagcaac tggcacaagg gctggaactg gacttcaggg

541 tttaacaagt gcgcagtggg agctgcctgc caacctttcc atttctactt ccccacaccc

601 actgttctgt gcaatgaaat ctggactcac tcctacaagg tcagcaacta cagccgaggg

661 agtggccgct gcatccagat gtggttcgac ccagcccagg gcaaccccaa tgaggaggtg

721 gcgaggttct atgctgcagc catgagtggg gctgggccct gggcagcctg gcctttcctg

781 cttagcctgg ccctaatgct gctgtggctg ctcagctgac ctccttttac cttctgatac

841 ctggaaatcc ctgccctgtt cagccccaca gctcccaact atttggttcc tgctccatgg

901 tcgggcctct gacagccact ttgaataaac cagacaccgc acatgtgtct tgagaattat

961 ttggaaaaaa aaaaaaaaaa aa

ID DE SEC. NO.: 21 (her2 humano)

1 melaalcrwg lllallppga astqvctgtd mklrlpaspe thldmlrhly qgcqvvqgnl

61 eltylptnas lsflqdiqev qgyvliahnq vrqvplqrlr ivrgtqlfed nyalavldng

121 dplnnttpvt gaspgglrel qlrslteilk ggvliqrnpq lcyqdtilwk difhknnqla

181 ltlidtnrsr achpcspmck gsrcwgesse dcqsltrtvc aggcarckgp lptdccheqc

241 aagctgpkhs dclaclhfnh sgicelhcpa lvtyntdtfe smpnpegryt fgascvtacp

301 ynylstdvgs ctlvcplhnq evtaedgtqr cekcskpcar vcyglgmehl revravtsan

361 iqefagckki fgslaflpes fdgdpasnta plqpeqlqvf etleeitgyl yisawpdslp

421 dlsvfqnlqv irgrilhnga ysltlqglgi swlglrslre lgsglalihh nthlcfvhtv

481 pwdqlfrnph qallhtanrp edecvgegla chqlcarghc wgpgptqcvn csqflrgqec

541 veecrvlqgl preyvnarhc lpchpecqpq ngsvtcfgpe adqcvacahy kdppfcvarc

601 psgvkpdlsy mpiwkfpdee gacqpcpinc thscvdlddk gcpaeqrasp ltsiisavvg

661 illvvvlgvv fgilikrrqq kirkytmrrl lqetelvepl tpsgampnqa qmrilketel

721 rkvkvlgsga fgtvykgiwi pdgenvkipv aikvlrents pkankeilde ayvmagvgsp

781 yvsrllgicl tstvqlvtql mpygclldhv renrgrlgsq dllnwcmqia kgmsyledvr

841 lvhrdlaarn vlvkspnhvk itdfglarll dideteyhad ggkvpikwma lesilrrrft

901 hqsdvwsygv tvwelmtfga kpydgipare ipdllekger lpqppictid vymimvkcwm

961 idsecrprfr elvsefsrma rdpqrfvviq nedlgpaspl dstfyrslle dddmgdlvda

1021 eeylvpqqgf fcpdpapgag gmvhhrhrss strsgggdlt lglepseeea prsplapseg

1081 agsdvfdgdl gmgaakglqs lpthdpsplq rysedptvpl psetdgyvap ltcspqpeyv

1141 nqpdvrpqpp spregplpaa rpagatlerp ktlspgkngv vkdvfafgga venpeyltpq

1201 ggaapqphpp pafspafdnl yywdqdpper gappstfkgt ptaenpeylg ldvpv

ID DE SEC. NO.: 22 (nucleótido de her2 humano)

1 ATGGAGCTGG CGGCCTTGTG CCGCTGGGGG CTCCTCCTCG CCCTCTTGCC CCCCGGAGCC

61 GCGAGCACCC AAGTGTGCAC CGGCACAGAC ATGAAGCTGC GGCTCCCTGC CAGTCCCGAG

121 ACCCACCTGG ACATGCTCCG CCACCTCTAC CAGGGCTGCC AGGTGGTGCA GGGAAACCTG

181 GAACTCACCT ACCTGCCCAC CAATGCCAGC CTGTCCTTCC TGCAGGATAT CCAGGAGGTG

241 CAGGGCTACG TGCTCATCGC TCACAACCAA GTGAGGCAGG TCCCACTGCA GAGGCTGCGG

301 ATTGTGCGAG GCACCCAGCT CTTTGAGGAC AACTATGCCC TGGCCGTGCT AGACAATGGA

361 GACCCGCTGA ACAATACCAC CCCTGTCACA GGGGCCTCCC CAGGAGGCCT GCGGGAGCTG

421 CAGCTTCGAA GCCTCACAGA GATCTTGAAA GGAGGGGTCT TGATCCAGCG GAACCCCCAG

481 CTCTGCTACC AGGACACGAT TTTGTGGAAG GACATCTTCC ACAAGAACAA CCAGCTGGCT

541 CTCACACTGA TAGACACCAA CCGCTCTCGG GCCTGCCACC CCTGTTCTCC GATGTGTAAG

601 GGCTCCCGCT GCTGGGGAGA GAGTTCTGAG GATTGTCAGA GCCTGACGCG CACTGTCTGT

661 GCCGGTGGCT GTGCCCGCTG CAAGGGGCCA CTGCCCACTG ACTGCTGCCA TGAGCAGTGT

721 GCTGCCGGCT GCACGGGCCC CAAGCACTCT GACTGCCTGG CCTGCCTCCA CTTCAACCAC

781 AGTGGCATCT GTGAGCTGCA CTGCCCAGCC CTGGTCACCT ACAACACAGA CACGTTTGAG

841 TCCATGCCCA ATCCCGAGGG CCGGTATACA TTCGGCGCCA GCTGTGTGAC TGCCTGTCCC

901 TACAACTACC TTTCTACGGA CGTGGGATCC TGCACCCTCG TCTGCCCCCT GCACAACCAA

961 GAGGTGACAG CAGAGGATGG AACACAGCGG TGTGAGAAGT GCAGCAAGCC CTGTGCCCGA

1021 GTGTGCTATG GTCTGGGCAT GGAGCACTTG CGAGAGGTGA GGGCAGTTAC CAGTGCCAAT

1081 ATCCAGGAGT TTGCTGGCTG CAAGAAGATC TTTGGGAGCC TGGCATTTCT GCCGGAGAGC

1141 TTTGATGGGG ACCCAGCCTC CAACACTGCC CCGCTCCAGC CAGAGCAGCT CCAAGTGTTT

1201 GAGACTCTGG AAGAGATCAC AGGTTACCTA TACATCTCAG CATGGCCGGA CAGCCTGCCT

1261 GACCTCAGCG TCTTCCAGAA CCTGCAAGTA ATCCGGGGAC GAATTCTGCA CAATGGCGCC

1321 TACTCGCTGA CCCTGCAAGG GCTGGGCATC AGCTGGCTGG GGCTGCGCTC

ACTGAGGGAA

1381 CTGGGCAGTG GACTGGCCCT CATCCACCAT AACACCCACC TCTGCTTCGT GCACACGGTG

1441 CCCTGGGACC AGCTCTTTCG GAACCCGCAC CAAGCTCTGC TCCACACTGC CAACCGGCCA

1501 GAGGACGAGT GTGTGGGCGA GGGCCTGGCC TGCCACCAGC TGTGCGCCCG AGGGCACTGC

1561 TGGGGTCCAG GGCCCACCCA GTGTGTCAAC TGCAGCCAGT TCCTTCGGGG CCAGGAGTGC

1621 GTGGAGGAAT GCCGAGTACT GCAGGGGCTC CCCAGGGAGT ATGTGAATGC CAGGCACTGT

1681 TTGCCGTGCC ACCCTGAGTG TCAGCCCCAG AATGGCTCAG TGACCTGTTT TGGACCGGAG

1741 GCTGACCAGT GTGTGGCCTG TGCCCACTAT AAGGACCCTC CCTTCTGCGT GGCCCGCTGC

1801 CCCAGCGGTG TGAAACCTGA CCTCTCCTAC ATGCCCATCT GGAAGTTTCC AGATGAGGAG

1861 GGCGCATGCC AGCCTTGCCC CATCAACTGC ACCCACTCCT GTGTGGACCT GGATGACAAG

1921 GGCTGCCCCG CCGAGCAGAG AGCCAGCCCT CTGACGTCCA TCATCTCTGC GGTGGTTGGC

1981 ATTCTGCTGG TCGTGGTCTT GGGGGTGGTC TTTGGGATCC TCATCAAGCG ACGGCAGCAG

2041 AAGATCCGGA AGTACACGAT GCGGAGACTG CTGCAGGAAA CGGAGCTGGT GGAGCCGCTG

2101 ACACCTAGCG GAGCGATGCC CAACCAGGCG CAGATGCGGA TCCTGAAAGA GACGGAGCTG

2161 AGGAAGGTGA AGGTGCTTGG ATCTGGCGCT TTTGGCACAG TCTACAAGGG CATCTGGATC

2221 CCTGATGGGG AGAATGTGAA AATTCCAGTG GCCATCAAAG TGTTGAGGGA AAACACATCC

2281 CCCAAAGCCA ACAAAGAAAT CTTAGACGAA GCATACGTGA TGGCTGGTGT GGGCTCCCCA

2341 TATGTCTCCC GCCTTCTGGG CATCTGCCTG ACATCCACGG TGCAGCTGGT GACACAGCTT

2401 ATGCCCTATG GCTGCCTCTT AGACCATGTC CGGGAAAACC GCGGACGCCT GGGCTCCCAG

2461 GACCTGCTGA ACTGGTGTAT GCAGATTGCC AAGGGGATGA GCTACCTGGA GGATGTGCGG

2521 CTCGTACACA GGGACTTGGC CGCTCGGAAC GTGCTGGTCA AGAGTCCCAA CCATGTCAAA

2581 ATTACAGACT TCGGGCTGGC TCGGCTGCTG GACATTGACG AGACAGAGTA CCATGCAGAT

2641 GGGGGCAAGG TGCCCATCAA GTGGATGGCG CTGGAGTCCA TTCTCCGCCG GCGGTTCACC

2701 CACCAGAGTG ATGTGTGGAG TTATGGTGTG ACTGTGTGGG AGCTGATGAC TTTTGGGGCC

2761 AAACCTTACG ATGGGATCCC AGCCCGGGAG ATCCCTGACC TGCTGGAAAA GGGGGAGCGG

2821 CTGCCCCAGC CCCCCATCTG CACCATTGAT GTCTACATGA TCATGGTCAA ATGTTGGATG

2881 ATTGACTCTG AATGTCGGCC AAGATTCCGG GAGTTGGTGT CTGAATTCTC CCGCATGGCC

2941 AGGGACCCCC AGCGCTTTGT GGTCATCCAG AATGAGGACT TGGGCCCAGC CAGTCCCTTG

3001 GACAGCACCT TCTACCGCTC ACTGCTGGAG GACGATGACA TGGGGGACCT GGTGGATGCT

3061 GAGGAGTATC TGGTACCCCA GCAGGGCTTC TTCTGTCCAG ACCCTGCCCC GGGCGCTGGG

3121 GGCATGGTCC ACCACAGGCA CCGCAGCTCA TCTACCAGGA GTGGCGGTGG GGACCTGACA

3181 CTAGGGCTGG AGCCCTCTGA AGAGGAGGCC CCCAGGTCTC CACTGGCACC

CTCCGAAGGG

3241 GCTGGCTCCG ATGTATTTGA TGGTGACCTG GGAATGGGGG CAGCCAAGGG GCTGCAAAGC

3301 CTCCCCACAC ATGACCCCAG CCCTCTACAG CGGTACAGTG AGGACCCCAC AGTACCCCTG

3361 CCCTCTGAGA CTGATGGCTA CGTTGCCCCC CTGACCTGCA GCCCCCAGCC TGAATATGTG

3421 AACCAGCCAG ATGTTCGGCC CCAGCCCCCT TCGCCCCGAG AGGGCCCTCT GCCTGCTGCC

3481 CGACCTGCTG GTGCCACTCT GGAAAGGCCC AAGACTCTCT CCCCAGGGAA GAATGGGGTC

3541 GTCAAAGACG TTTTTGCCTT TGGGGGTGCC GTGGAGAACC CCGAGTACTT GACACCCCAG

3601 GGAGGAGCTG CCCCTCAGCC CCACCCTCCT CCTGCCTTCA GCCCAGCCTT CGACAACCTC

3661 TATTACTGGG ACCAGGACCC ACCAGAGCGG GGGGCTCCAC CCAGCACCTT CAAAGGGACA

3721 CCTACGGCAG AGAACCCAGA GTACCTGGGT CTGGACGTGC CAGTGTGA

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de anticuerpo-fármaco de fórmula (I):

$Ab\text{-}(L\text{-}D)_p$ (I)

en donde Ab es un anticuerpo de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización de este que se dirige a una célula tumoral;

D es eribulina;

L es un enlazador escindible que une covalentemente Ab con D; y

p es un entero entre 1 y 20.

2. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1 en donde *p* es entre 1 y 8, o entre 1 y 6.

3. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1 o reivindicación 2 en donde *p* es entre 2 y 8, o entre 2 y 5.

4. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 3 en donde *p* es entre 3 y 4.

5. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 4 en donde *p* es 4.

6. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 5 en donde el enlazador escindible comprende un resto escindible que está posicionado de manera tal que ninguna parte del enlazador o el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno permanece unida a eribulina tras la escisión.

7. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 6 en donde el enlazador escindible comprende un resto de péptido escindible.

8. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 7 en donde el resto de péptido escindible es escindible por medio de una enzima.

9. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 7 o reivindicación 8 en donde el resto de péptido escindible es escindible por medio de catepsina.

10. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 7 a 9 en donde el resto de péptido escindible es escindible por medio de catepsina B.

11. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 10 en donde el resto de péptido escindible o enlazador escindible comprende una unidad de aminoácido.

12. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 11 en donde la unidad de aminoácido comprende valina-citrulina (Val-Cit).

13. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 11 en donde la unidad de aminoácido

comprende alanina-alanina-asparagina (Ala-Ala-Asn).

14. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 6 en donde el enlazador escindible comprende un resto de sulfonamida escindible.

15. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 6 en donde el enlazador escindible comprende un resto de disulfuro escindible.

16. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 14 o reivindicación 15 en donde el enlazador escindible es escindible en condiciones de reducción.

17. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 16 en donde el enlazador escindible comprende al menos una unidad espaciadora.

18. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 17 en donde la unidad espaciadora o enlazador escindible comprende un resto de polietilenglicol (PEG).

19. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 18 en donde el resto de PEG comprende -$(PEG)_m$- y *m* es un entero entre 1 y 10.

20. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 19 en donde *m* es entre 2 y 8.

21. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 19 o reivindicación 20 en donde *m* es entre 2 y 5.

22. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 19 a 21 en donde *m* es 2.

23. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 17 en donde la unidad espaciadora o enlazador escindible comprende un resto de alquilo.

24. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 23 en donde el resto de alquilo comprende -$(CH_2)_n$- y *n* es un entero entre 1 y 10.

25. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 24 en donde *n* es 5.

26. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 17 a 25 en donde la unidad espaciadora se une al anticuerpo o fragmento de unión al antígeno mediante un resto de maleimida (Mal).

27. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 26 en donde el Mal-unidad espaciadora es reactiva con un residuo de cisteína en el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno.

28. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 26 o reivindicación 27 en donde Mal-unidad espaciadora se une al anticuerpo o fragmento de unión al antígeno mediante un residuo de cisteína en el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno.

29. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 26 a 28 en donde el enlazador escindible comprende el Mal-unidad espaciadora y un resto de péptido escindible.

30. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 29 en donde el resto de péptido escindible comprende una unidad de aminoácido.

31. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 29 o reivindicación 30 en donde el resto de péptido escindible o unidad de aminoácido comprende Val-Cit.

32. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 29 o reivindicación 30 en donde el resto de péptido escindible o unidad de aminoácido comprende Ala-Ala-Asn.

33. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 26 a 28 en donde el enlazador escindible comprende el Mal-unidad espaciadora y un resto de sulfonamida escindible.

34. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 26 a 28 en donde el enlazador escindible comprende el Mal-unidad espaciadora y un resto de disulfuro escindible.

35. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 26 a 34 en donde el Mal-unidad espaciadora comprende un resto de PEG.

36. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 26 a 34 en donde el Mal-unidad espaciadora comprende un resto de alquilo.

37. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 26 a 36 en donde el Mal-unidad espaciadora une el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno con el resto escindible en el enlazador.

38. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 37 en donde el resto escindible en el enlazador comprende un resto de péptido escindible.

39. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 38 en donde el resto de péptido escindible comprende una unidad de aminoácido.

40. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 38 o reivindicación 39 en donde el resto de péptido escindible o unidad de aminoácido comprende Val-Cit o Ala-Ala-Asn.

41. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 37 a 40 en donde el enlazador escindible comprende Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit.

42. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 37 a 40 en donde el enlazador escindible comprende Mal-$(PEG)_8$-Val-Cit.

43. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 37 a 40 en donde el enlazador escindible comprende Mal-$(CH_2)_5$-Val-Cit.

44. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 37 a 40 en donde el enlazador escindible comprende Mal-$(PEG)_2$-Ala-Ala-Asn.

45. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 37 a 40 en donde el resto de péptido escindible o unidad de aminoácido comprende Val-Cit.

46. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 37 en donde el resto escindible en el enlazador comprende un resto de sulfonamida escindible.

47. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 46 en donde el enlazador escindible comprende Mal-$(PEG)_4$-triazol-$(PEG)_3$-sulfonamida.

48. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 37 en donde el resto escindible en el enlazador comprende un resto de disulfuro escindible.

49. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 48 en donde el enlazador escindible comprende Mal-$(PEG)_4$-triazol-$(PEG)_3$-disulfuro.

50. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 37 a 49 en donde el Mal-unidad espaciadora comprende un resto de PEG.

51. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 37 a 49 en donde el Mal-unidad espaciadora comprende un resto de alquilo.

52. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 17 a 25 en donde la unidad espaciadora se une al anticuerpo o fragmento de unión al antígeno mediante un resto de succinimida (OSu).

53. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 52 en donde el OSu-unidad espaciadora es reactiva con un residuo de lisina en el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno.

54. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 52 o reivindicación 53 en donde OSu-unidad espaciadora se une al anticuerpo o fragmento de unión al antígeno mediante un residuo de lisina.

55. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 52 a 54 en donde el enlazador escindible comprende el OSu-unidad espaciadora y un resto de péptido escindible.

56. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 55 en donde el resto de péptido escindible comprende una unidad de aminoácido.

57. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 55 o reivindicación 56 en donde el resto de péptido escindible o unidad de aminoácido comprende Val-Cit.

58. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 55 o reivindicación 56 en donde el resto de péptido escindible o unidad de aminoácido comprende Ala-Ala-Asn.q

59. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 52 a 54 en donde el enlazador escindible comprende el OSu-unidad espaciadora y un resto de sulfonamida escindible.

60. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 52 a 54 en donde el enlazador escindible comprende el OSu-unidad espaciadora y un resto de disulfuro escindible.

61. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 52 a 60 en donde el OSu-unidad espaciadora comprende un resto de PEG.

62. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 52 a 60 en donde el OSu-unidad espaciadora comprende un resto de alquilo.

63. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 52 a 62 en donde el OSu-unidad espaciadora une el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno con el resto escindible en el enlazador.

64. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 63 en donde el resto escindible en el enlazador comprende un resto de péptido escindible.

65. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 64 en donde el resto de péptido escindible comprende una unidad de aminoácido.

66. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 64 o reivindicación 65 en donde el resto de péptido escindible o unidad de aminoácido comprende Val-Cit o Ala-Ala-Asn.

67. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 63 a 66 en donde el enlazador escindible comprende OSu-$(PEG)_2$-Val-Cit.

68. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 63 a 66 en donde el enlazador escindible comprende OSu-$(PEG)_9$-Val-Cit.

69. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 63 a 66 en donde el enlazador escindible comprende OSu-$(PEG)_3$-triazol-$(PEG)_3$-Val-Cit.

70. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 63 a 66 en donde el enlazador escindible comprende OSu-$(CH_2)_5$-Val-Cit.

71. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 63 a 66 en donde el enlazador escindible comprende OSu-$(PEG)_2$-Ala-Ala-Asn.

72. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 63 a 66 en donde el resto de péptido escindible o unidad de aminoácido comprende Val-Cit.

73. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 63 en donde el resto escindible en el enlazador comprende un resto de sulfonamida escindible.

74. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 73 en donde el enlazador escindible comprende OSu-$(PEG)_3$-triazol-$(PEG)_3$-sulfonamida.

75. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 63 en donde el resto escindible en el enlazador comprende un resto de disulfuro escindible.

76. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 75 en donde el enlazador escindible comprende OSu-$(PEG)_3$-triazol-$(PEG)_3$-disulfuro.

77. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 63 a 76 en donde el OSu-unidad espaciadora comprende un resto de PEG.

78. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 63 a 76 en donde el OSu-unidad espaciadora comprende un resto de alquilo.

79. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 17 a 78 en donde el resto escindible en el enlazador se une directamente a eribulina o en donde una unidad espaciadora une el resto escindible en el enlazador con eribulina.

80. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 79 en donde la escisión del conjugado libera eribulina del anticuerpo y enlazador.

81. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 79 o reivindicación 80 en donde la unidad espaciadora que une el resto escindible en el enlazador a eribulina es autodestructiva.

82. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones 79 a 81 en donde la unidad espaciadora que une el resto escindible en el enlazador a eribulina comprende un p-aminobenciloxicarbonilo (pAB).

83. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 82 en donde el pAB une el resto escindible en el enlazador con eribulina.

84. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 82 o reivindicación 83 en donde el pAB se une covalentemente con eribulina mediante una amina C-35.

85. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 79 a 84 en donde el resto escindible en el enlazador comprende un resto de péptido escindible.

86. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 85 en donde el resto de péptido escindible comprende una unidad de aminoácido.

87. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 85 o reivindicación 86 en donde el resto de péptido escindible o unidad de aminoácido comprende Val-Cit o Ala-Ala-Asn.

88. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 85 a 87 en donde el

enlazador escindible comprende Val-Cit-pAB.

89. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 85 a 87 en donde el enlazador escindible comprende Ala-Ala-Asn-pAB.

90. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 85 a 87 en donde el resto de péptido escindible o unidad de aminoácido comprende Val-Cit.

91. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 79 a 84 en donde el resto escindible en el enlazador comprende un resto de sulfonamida escindible.

92. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 91 en donde el enlazador escindible comprende sulfonamida-pAB.

93. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 79 a 84 en donde el resto escindible en el enlazador comprende un resto de disulfuro escindible.

94. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 93 en donde el enlazador escindible comprende disulfuro-pAB.

95. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 94 en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es un anticuerpo anti-receptor de folato alfa.

96. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 95 en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:2 (HCDR1), ID DE SEC. NO.:3 (HCDR2) y ID DE SEC. NO.:4 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:7 (LCDR1), ID DE SEC. NO.:8 (LCDR2) y ID DE SEC. NO.:9 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración de Kabat; o tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:13 (HCDR1), ID DE SEC. NO.:14 (HCDR2) y ID DE SEC. NO.:15 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:16 (LCDR1), ID DE SEC. NO.:17 (LCDR2) y ID DE SEC. NO.:18 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración IMGT.

97. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 95 o reivindicación 96 en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:23 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:24.

98. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 94 en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es un anticuerpo anti-receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano (HER2).

99. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 98 en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:71 (HCDR1), ID DE SEC. NO.:72 (HCDR2) y ID DE SEC. NO.:73 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:74 (LCDR1), ID DE SEC. NO.:75 (LCDR2) y ID DE SEC. NO.:76 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración de Kabat; o tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:191 (HCDR1), ID DE SEC. NO.:192 (HCDR2) y ID DE SEC. NO.:193 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:194 (LCDR1), ID DE SEC. NO.:195 (LCDR2) y ID DE SEC. NO.:196 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración IMGT.

100. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 98 o reivindicación 99 en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:27 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:28.

101. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 94 en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es un anticuerpo anti-mesotelina.

102. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 101 en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:65 (HCDR1), ID DE SEC. NO.:66 (HCDR2) y ID DE SEC. NO.:67 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:68 (LCDR1), ID DE SEC. NO.:69 (LCDR2) y ID DE SEC. NO.:70 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración de Kabat; o tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:185 (HCDR1), ID DE SEC. NO.:186 (HCDR2) y ID DE SEC. NO.:187 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE

SEC. NO.:188 (LCDR1), ID DE SEC. NO.:189 (LCDR2) y ID DE SEC. NO.:190 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración IMGT.

103. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 101 o reivindicación 102 en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:25 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:26.

104. Un conjugado de anticuerpo-fármaco de fórmula (I):

$Ab\text{-}(L\text{-}D)_p$ (I)

en donde

(i) Ab es un anticuerpo anti-receptor de folato alfa de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización de este que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:2 (HCDR1), ID DE SEC. NO.:3 (HCDR2) y ID DE SEC. NO.:4 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:7 (LCDR1), ID DE SEC. NO.:8 (LCDR2) y ID DE SEC. NO.:9 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración de Kabat; o tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:13 (HCDR1), ID DE SEC. NO.:14 (HCDR2) y ID DE SEC. NO.:15 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:16 (LCDR1), ID DE SEC. NO.:17 (LCDR2) y ID DE SEC. NO.:18 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración IMGT;

(ii) D es eribulina;

(iii) L es un enlazador escindible que comprende Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB; y

(iv) *p* es un entero entre 1 y 8.

105. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 104 en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:23 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:24.

106. Un conjugado de anticuerpo-fármaco de fórmula (I):

$Ab\text{-}(L\text{-}D)_p$ (I)

en donde

(i) Ab es un anticuerpo anti-HER2 de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización de este que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:71 (HCDR1), ID DE SEC. NO.:72 (HCDR2) y ID DE SEC. NO.:73 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:74 (LCDR1), ID DE SEC. NO.:75 (LCDR2) y ID DE SEC. NO.:76 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración de Kabat; o tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:191 (HCDR1), ID DE SEC. NO.:192 (HCDR2) y ID DE SEC. NO.:193 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:194 (LCDR1), ID DE SEC. NO.:195 (LCDR2) y ID DE SEC. NO.:196 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración IMGT;

(ii) D es eribulina;

(iii) L es un enlazador escindible que comprende Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB; y

(iv) *p* es un entero entre 1 y 20.

107. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 106 en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:27 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:28.

108. Un conjugado de anticuerpo-fármaco de fórmula (I):

$Ab\text{-}(L\text{-}D)_p$ (I)

en donde

(i) Ab es un anticuerpo anti-mesotelina de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización de este que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:65 (HCDR1), ID DE SEC. NO.:66 (HCDR2) y ID DE SEC. NO.:67 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:68 (LCDR1), ID DE SEC. NO.:69 (LCDR2) y ID DE SEC. NO.:70 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración de Kabat; o tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:185 (HCDR1), ID DE SEC. NO.:186 (HCDR2) y ID DE SEC. NO.:187 (HCDR3); y tres regiones determinantes de

complementariedad de cadena ligera (LCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:188 (LCDR1), ID DE SEC. NO.:189 (LCDR2) y ID DE SEC. NO.:190 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración IMGT;

(ii) D es eribulina;

(iii) L es un enlazador escindible que comprende Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB; y

(iv) *p* es un entero entre 1 y 20.

109. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 108 en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:25 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:26.

110. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 104 a 109 en donde *p* es entre 1 y 8, o entre 1 y 6.

111. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 104 a 110 en donde *p* es entre 2 y 8, o entre 2 y 5.

112. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 104 a 111 en donde *p* es entre 3 y 4.

113. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 104 a 112 en donde *p* es 4.

114. Un conjugado de anticuerpo-fármaco de fórmula (I):

$$Ab\text{-}(L\text{-}D)_p \qquad (I)$$

en donde

(i) Ab es un anticuerpo anti-receptor de folato alfa de internalización o fragmento de unión al antígeno de este que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:23 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:24;

(ii) D es eribulina;

(iii) L es un enlazador escindible que comprende Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB; y

(iv) *p* es un entero entre 3 y 4.

115. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 114 en donde *p* es 4.

116. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 114 o reivindicación 115 en donde el anticuerpo comprende un dominio constante de cadena pesada de IgG1 humana y un dominio constante

de cadena ligera kappa de Ig humana.

117. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 116 en donde *p* se determina mediante cromatografía de interacción hidrofóbica-cromatografía líquida de alto rendimiento (HIC-HPLC).

118. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 116 en donde *p* se determina mediante cromatografía líquida de fase inversa-espectrometría de masas (LC-MS).

119. El conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 118 en donde el enlazador escindible se une de forma covalente a eribulina mediante una amina C-35.

120. Una composición que comprende múltiples copias del conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 119 en donde el *p* promedio de los conjugados de anticuerpo-fármaco en la composición es de entre aproximadamente 3,2 y aproximadamente 3,8.

121. Una composición que comprende múltiples copias del conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 95 a 97 en donde el *p* promedio de los conjugados de anticuerpo-fármaco en la composición es de entre aproximadamente 3,2 y aproximadamente 3,8.

122. Una composición que comprende múltiples copias del conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 119 en donde el *p* promedio de los conjugados de anticuerpo-fármaco en la composición es de entre aproximadamente 3,6 y aproximadamente 4,4.

123. Una composición que comprende múltiples copias del conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 95 a 97 en donde el *p* promedio de los conjugados de anticuerpo-fármaco en la composición es de entre aproximadamente 3,6 y aproximadamente 4,4.

124. Un método para tratar un paciente que padece o tiene riesgo de padecer un cáncer que expresa un antígeno diana que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 119 o la composición de cualquiera de las reivindicaciones de 120 a 123.

125. El método de la reivindicación 124 en donde el antígeno diana es receptor de folato alfa.

126. El método de la reivindicación 125 en donde el cáncer expresa un nivel elevado de receptor de folato alfa.

127. El método de la reivindicación 125 en donde el cáncer expresa un nivel moderado de receptor de folato alfa.

128. El método de la reivindicación 125 en donde el cáncer expresa un nivel bajo de receptor de folato alfa.

129. El método de cualquiera de las reivindicaciones de 125 a 128 en donde el cáncer que expresa receptor de folato alfa es un cáncer gástrico, un cáncer de ovario seroso, un cáncer de ovario de células claras, un cáncer de pulmón de células no pequeñas, un cáncer colorrectal, un cáncer de mama triple negativo, un cáncer endometrial, un carcinoma endometrial seroso, un carcinoide de pulmón o un osteosarcoma.

130. El método de cualquiera de las reivindicaciones de 125 a 129 en donde el paciente no responde o responde poco al tratamiento con (a) anticuerpo anti-receptor de folato alfa cuando se administra solo y/o (b) eribulina cuando se administra sola.

131. El método de cualquiera de las reivindicaciones de 125 a 130 en donde el paciente es intolerante, no responde o responde poco al tratamiento como eribulina cuando se administra sola.

132. El método de la reivindicación 124 en donde el antígeno diana es receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano.

133. El método de la reivindicación 132 en donde el cáncer expresa un nivel elevado del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano.

134. El método de la reivindicación 132 en donde el cáncer expresa un nivel moderado del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano.

135. El método de la reivindicación 132 en donde el cáncer expresa un nivel bajo del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano.

136. El método de cualquiera de las reivindicaciones de 132 a 135 en donde el cáncer que expresa receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano es un cáncer de mama, un cáncer gástrico, un cáncer de vejiga o un carcinoma de células uroteliales.

137. El método de cualquiera de las reivindicaciones de 132 a 136 en donde el paciente no responde o responde poco al tratamiento con (a) anticuerpo anti-receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano cuando se administra solo y/o (b) eribulina cuando se administra sola.

138. El método de cualquiera de las reivindicaciones de 132 a 137 en donde el paciente es intolerante, no responde o responde poco al tratamiento como eribulina cuando se administra sola.

139. El método de la reivindicación 124 en donde el antígeno diana es mesotelina.

140. El método de la reivindicación 139 en donde el paciente no responde o responde poco al tratamiento con (a) anticuerpo anti-mesotelina cuando se administra solo y/o (b) eribulina cuando se administra sola.

141. El método de la reivindicación 139 o reivindicación 140 en donde el paciente es intolerante, no

responde o responde poco al tratamiento como eribulina cuando se administra sola.

142. Un método para reducir o inhibir el crecimiento de un tumor que expresa el antígeno diana que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 119 o la composición de cualquiera de las reivindicaciones de 120 a 123.

143. El método de la reivindicación 142 en donde el antígeno diana es receptor de folato alfa.

144. El método de la reivindicación 143 en donde el tumor es un cáncer gástrico, cáncer de ovario seroso, cáncer de ovario de células claras, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer colorrectal, cáncer de mama triple negativo, cáncer endometrial, carcinoma endometrial seroso, carcinoide de pulmón o osteosarcoma que expresa receptor de folato alfa.

145. El método de la reivindicación 143 o reivindicación 144 en donde el tumor es resistente o refractario al tratamiento con un anticuerpo anti-receptor de folato alfa cuando se administra solo y/o el tratamiento con eribulina cuando se administra sola.

146. El método de la reivindicación 142 en donde el antígeno diana es receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano.

147. El método de la reivindicación 146 en donde el tumor es un cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer de vejiga o carcinoma de células uroteliales que expresa receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano.

148. El método de la reivindicación 146 o reivindicación 147 en donde el tumor es resistente o refractario al tratamiento con un anticuerpo anti-receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano cuando se administra solo y/o el tratamiento con eribulina cuando se administra sola.

149. El método de la reivindicación 142 en donde el antígeno diana es mesotelina.

150. El método de la reivindicación 149 en donde el tumor es resistente o refractario al tratamiento con un anticuerpo anti-mesotelina cuando se administra solo y/o el tratamiento con eribulina cuando se administra sola.

151. Un conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 119 o la composición de cualquiera de las reivindicaciones de 120 a 123 para su uso en el tratamiento de un cáncer que expresa el antígeno diana.

152. El conjugado de anticuerpo-fármaco para utilizar de la reivindicación 151 en donde el antígeno diana es receptor de folato alfa.

153. El conjugado de anticuerpo-fármaco para utilizar de la reivindicación 152 en donde el cáncer que

expresa receptor de folato alfa es un cáncer gástrico, un cáncer de ovario seroso, un cáncer de ovario de células claras, un cáncer de pulmón de células no pequeñas, un cáncer colorrectal, un cáncer de mama triple negativo, un cáncer endometrial, un carcinoma endometrial seroso, un carcinoide de pulmón o un osteosarcoma.

154. El conjugado de anticuerpo-fármaco para utilizar de la reivindicación 151 en donde el antígeno diana es receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano.

155. El conjugado de anticuerpo-fármaco para utilizar de la reivindicación 154 en donde el cáncer que expresa receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano es un cáncer de mama, un cáncer gástrico, un cáncer de vejiga o un carcinoma de células uroteliales.

156. El conjugado de anticuerpo-fármaco para utilizar de la reivindicación 151 en donde el antígeno diana es mesotelina.

157. Uso de un conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 119 o la composición de cualquiera de las reivindicaciones de 120 a 123 en el tratamiento de un cáncer que expresa el antígeno diana.

158. El uso de la reivindicación 157 en donde el antígeno diana es receptor de folato alfa.

159. El uso de la reivindicación 158 en donde el cáncer que expresa receptor de folato alfa es un cáncer gástrico, un cáncer de ovario seroso, un cáncer de ovario de células claras, un cáncer de pulmón de células no pequeñas, un cáncer colorrectal, un cáncer de mama triple negativo, un cáncer endometrial, un carcinoma endometrial seroso, un carcinoide de pulmón o un osteosarcoma.

160. El uso de la reivindicación 157 en donde el antígeno diana es receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano.

161. El uso de la reivindicación 160 en donde el cáncer que expresa receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano es un cáncer de mama, un cáncer gástrico, un cáncer de vejiga o un carcinoma de células uroteliales.

162. El uso de la reivindicación 157 en donde el antígeno diana es mesotelina.

163. Uso de un conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 119 o la composición de cualquiera de las reivindicaciones de 120 a 123 en un método para fabricar un medicamento para el tratamiento de un cáncer que expresa el antígeno diana.

164. El uso de la reivindicación 163 en donde el antígeno diana es receptor de folato alfa.

165. El uso de la reivindicación 164 en donde el cáncer que expresa receptor de folato alfa es un cáncer gástrico, un cáncer de ovario seroso, un cáncer de ovario de células claras, un cáncer de pulmón de

células no pequeñas, un cáncer colorrectal, un cáncer de mama triple negativo, un cáncer endometrial, un carcinoma endometrial seroso, un carcinoide de pulmón o un osteosarcoma.

166. El uso de la reivindicación 163 en donde el antígeno diana es receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano.

167. El uso de la reivindicación 166 en donde el cáncer que expresa receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano es un cáncer de mama, un cáncer gástrico, un cáncer de vejiga o un carcinoma de células uroteliales.

168. El uso de la reivindicación 163 en donde el antígeno diana es mesotelina.

169. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 119 o la composición de cualquiera de las reivindicaciones de 120 a 123, y un portador farmacéuticamente aceptable.

170. Un método para producir el conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 119 o la composición de cualquiera de las reivindicaciones de 120 a 123 que comprende hacer reaccionar un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno con un enlazador escindible unido a eribulina en condiciones que permiten la conjugación.

171. Un método para determinar si un paciente responde al tratamiento con el conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 119 o la composición de cualquiera de las reivindicaciones de 120 a 123 que comprende proporcionar una muestra biológica del paciente y ponerla en contacto con el conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 119 o la composición de cualquiera de las reivindicaciones de 120 a 123.

172. El método de la reivindicación 171 en donde la muestra biológica es una biopsia de tumor derivada de un paciente que padece o tiene riesgo de padecer un cáncer que expresa receptor de folato alfa en donde el cáncer es un cáncer gástrico, un cáncer de ovario seroso, un cáncer de ovario de células claras, un cáncer de pulmón de células no pequeñas, un cáncer colorrectal, un cáncer de mama triple negativo, un cáncer endometrial, un carcinoma endometrial seroso, un carcinoide de pulmón o un osteosarcoma.

173. El método de la reivindicación 171 en donde la muestra biológica es una biopsia de tumor derivada de un paciente que padece o tiene riesgo de padecer un cáncer que expresa receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano en donde el cáncer es un cáncer de mama, un cáncer gástrico, un cáncer de vejiga o un carcinoma de células uroteliales.

174. El método de la reivindicación 171 en donde la muestra biológica es una biopsia de tumor derivada de un paciente que padece o tiene riesgo de padecer un cáncer que expresa mesotelina.

175. Una composición que comprenden -L-D, en donde D es eribulina; y L es un enlazador escindible que se une mediante enlace covalente a D.

176. La composición de la reivindicación 175 en donde el enlazador escindible se une de forma covalente a eribulina mediante una amina C-35.

177. La composición de la reivindicación 175 o reivindicación 176 en donde el enlazador escindible comprende valina-citrulina (Val-Cit).

178. La composición de cualquiera de las reivindicaciones de 175 a 177 en donde el enlazador escindible comprende una unidad espaciadora de PEG.

179. La composición de cualquiera de las reivindicaciones de 175 a 178 en donde el enlazador escindible comprende Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB.

180. Una composición que comprende múltiples copias de un conjugado de anticuerpo-fármaco de Fórmula (I):

Ab-$(L\text{-}D)_p$ (I)

en donde

(i) Ab es un anticuerpo anti-receptor de folato alfa de internalización o fragmento de unión al antígeno de internalización de este que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:2 (HCDR1), ID DE SEC. NO.:3 (HCDR2) y ID DE SEC. NO.:4 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:7 (LCDR1), ID DE SEC. NO.:8 (LCDR2) e ID DE SEC. NO.:9 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración de Kabat; o tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:13 (HCDR1), ID DE SEC. NO.:14 (HCDR2) e ID DE SEC. NO.:15 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR) que comprenden secuencias de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:16 (LCDR1), ID DE SEC. NO.:17 (LCDR2) e ID DE SEC. NO.:18 (LCDR3), según lo definido por el sistema de numeración IMGT;

(ii) D es eribulina;

(iii) L es un enlazador escindible que comprende Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB; y

(iv) *p* es la cantidad promedio de restos -L-D por Ab, en donde el *p* promedio de los conjugados de anticuerpo-fármaco en la composición es de entre aproximadamente 3,6 y aproximadamente 4,4; y el *p* promedio se determina mediante cromatografía de interacción hidrofóbica-cromatografía líquida de alto

rendimiento (HIC-HPLC).

181. La composición de la reivindicación 180, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:23 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de ID DE SEC. NO.:24.

182. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 120 a 123, en donde el *p* promedio de los conjugados de anticuerpo-fármaco en la composición se determina mediante cromatografía de interacción hidrofóbica-cromatografía líquida de alto rendimiento (HIC-HPLC).

183. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 120 a 123, en donde el *p* promedio de los conjugados de anticuerpo-fármaco en la composición se determina mediante cromatografía líquida de fase inversa-espectrometría de masas (LC-MS).

RESUMEN

Se describen toxinas enlazadoras y conjugados de anticuerpo-fármaco que se unen a antígenos diana de oncología humana tal como receptor de folato alfa y/o proporcionan actividad de fármaco anti-tubulina. Las toxinas enlazadoras y conjugados de anticuerpo-fármaco comprenden un resto de fármaco de eribulina y se pueden internalizar en células que expresan el antígeno diana. La descripción además se refiere a métodos y composiciones para utilizar en el tratamiento de cáncer mediante la administración de los conjugados de anticuerpo-fármaco proporcionados en la presente.