

CONJUGADOS DE ANTICUERPO-FÁRMACO DE PIRROLOBENZODIAZEPINA Y MÉTODOS DE USO

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional estadounidense n.º 62/236429, presentada el 2 de octubre de 2015, solicitud que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia.

LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que fue enviado electrónicamente en formato ASCII y se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia. Dicha copia ASCII, creada el 30 de septiembre de 2016, se denomina P32858-WO__Sequence_Listing.txt y posee un tamaño de 56,520 bytes.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La invención hace referencia, en términos generales, a anticuerpos conjugados con intermedios de pirrolobenzodiazepina para formar conjugados de anticuerpo-fármaco con aplicaciones terapéuticas o de diagnóstico. Los anticuerpos se pueden modificar genéticamente con aminoácidos de cisteína libres, reactivos para la conjugación con los intermedios de pirrolobenzodiazepina. La invención también hace referencia a métodos de uso de compuestos de conjugado de anticuerpo-fármaco para el tratamiento de trastornos hiperproliferativos, como cáncer o diagnóstico *in vitro*, *in situ* e *in vivo* de dichos trastornos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

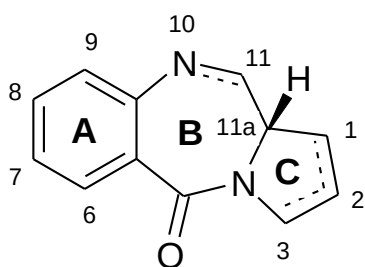
Los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC, por su sigla en

inglés) son moléculas quimioterapéuticas dirigidas que combinan las propiedades de anticuerpos y fármacos citotóxicos mediante direccionamiento de fármacos citotóxicos potentes a células tumorales con expresión de antígeno, internalización y liberación de fármaco, con lo cual se potencia su actividad antitumoral (Carter, P. y Senter, P. (2008) *The Cancer Jour.* 14(3):154-169). El desarrollo exitoso de ADC para un antígeno objetivo específico depende de la optimización de la selección de anticuerpos, el diseño y la estabilidad del enlazador, la potencia del fármaco citotóxico y el modo de conjugación de fármaco y enlazador con el anticuerpo (Dosio et ál (2011) *Toxins*, 3:848-883; Polakis, P. (2005) *Current Opinion in Pharmacology* 5:382-387).

Algunos compuestos de pirrolobenzodiazepina (PBD) tienen la capacidad de reconocer secuencias de ADN específicas y unirse a estas. La secuencia preferida es PuGPu (Pu = purina, como adenina A y guanina G). El primer antibiótico antitumoral de PBD, antramicina, se descubrió en 1965 (Leimgruber, et ál., *J. Am. Chem. Soc.*, 87:5793-5795 (1965); Leimgruber, et ál., *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 5791-5793 (1965)). Desde entonces, se han indicado diversos PBD de origen natural y análogos (Thurston, et ál., *Chem. Rev.* 1994, 433-465 (1994); Antonow, D. y Thurston, D.E., (2011) *Chem. Rev.* 111 (4):2815-2864). Los miembros de la familia incluyen abeimicina (Hochlowski, et al., (1987) *J. Antibiotics*, 40:145-148), quicamicina (Konishi, et ál., (1984) *J. Antibiotics*, 37:200-206), Thurston, et ál., (1990) *Chem. Brit.*, 26:767-772; Bose, et ál., (1992) *Tetrahedron*, 48:751-758), mazetramicina (Kuminoto, et ál., *J. Antibiotics*, 33, 665-667 (1980)), neotramicinas A y B (Takeuchi, et ál., *J. Antibiotics*, 29, 93-96 (1976)), porotramicina (Tsunakawa, et ál., (1988) *J. Antibiotics*, 41:1366-1373), protracarcina (Shimizu, et ál,

J. Antibiotics, (1982) 29:2492-2503; Langley y Thurston, (1987) J. Org. Chem., 52:91-97), sibanomicina, DC-102 (Hara, et ál., (1988) J. Antibiotics, 41:702-704; Itoh, et ál., J. Antibiotics, (1988) 41:1281-1284), sibiromicina (Leber, et al., (1988) J. Am. Chem. Soc., 110:2992-2993) y tomamicina (Arima, et al., (1972) J. Antibiotics, 25:437-444).

Las pirrolobenzodiazepinas tienen la estructura general:



y difieren en la cantidad, el tipo y la posición de los sustituyentes, tanto en los anillos A aromáticos como en los anillos C pirrolo, y en el grado de saturación del anillo C. En el anillo B hay una imina ($N=C$), una carbinolamina ($NH-CH(OH)$) o un éter metílico de carbinolamina ($NH-CH(OMe)$) en la posición N10-C11, con el centro electrofílico responsable por la alquilación del ADN. Todos los productos naturales conocidos tienen una configuración (S) en la posición C11a quiral, lo cual les brinda un giro hacia la derecha al observarse desde el anillo C hacia el anillo A y determina la forma tridimensional para la isohelicidad con la ranura menor del ADN de forma B, y esto conduce a un ajuste ceñido en el punto de unión (Kohn, en *Antibiotics III*. Springer-Verlag, Nueva York, páginas 3-11 (1975); Hurley y Needham-VanDevanter, (1986) Acc. Chem. Res., 19:230-237). La capacidad de las PBD de formar un aducto en la ranura menor les permite interferir en el procesamiento de ADN y, por lo tanto, se utilizan como agentes antitumorales. Los compuestos diméricos de pirrolobenzodiazepina en los que se unen de forma covalente dos estructuras de

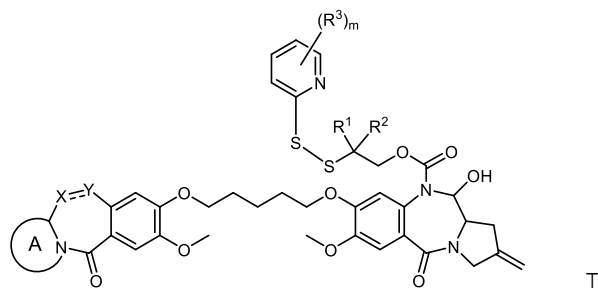
pirrolobenzodiazepina mediante un enlazador a través de la posición C8 de los anillos A pueden dialquilar y reticular ADN de cadena doble (WO 2005/085251).

Los compuestos de pirrolobenzodiazepina se pueden utilizar como profármacos mediante protección en la posición N10 con un grupo protector de nitrógeno, como un carbamato, que se puede extraer *in vivo* (WO 2000/12507; WO 2005/023814). Los grupos protectores se pueden extraer de la posición N10 del resto de PBD para dejar un enlace imina N10-C11. Se describe un espectro de grupos protectores, incluidos grupos que se pueden escindir mediante acción de enzimas.

Los conjugados de anticuerpo-fármaco en los que el dímero de pirrolobenzodiazepina (PBD) se enlaza a través de la posición N10 con un anticuerpo específico para un antígeno asociado con el tumor tienen eficacia *in vitro* e *in vivo* contra las células tumorales (WO 2011/130598). Los conjugados de anticuerpo-fármaco con restos de fármaco dimérico de PBD con grupos enlazadores para conexión con un agente de unión celular, como un anticuerpo, mediante el puente («enlace») que une las unidades de PBD monoméricas del dímero se encuentran ya descritos (WO 2007/085930). Los conjugados de anticuerpo-fármaco con restos de fármaco dimérico de PBD con grupos amida y amina en el anillo B en la posición N10-C11 se encuentran ya descritos (WO 2014/096368; WO 2013/177481; WO 2012/112708). Los conjugados de anticuerpo-fármaco que comprenden restos de fármaco dimérico de pirrolobenzodiazepina (PBD) dialquilador enlazados en N10 de la PBD mediante un enlace disulfuro con anticuerpos se encuentran ya descritos (WO2013/055987; Gregson et ál. (2001) J. Med. Chem. 44:1161-1174).

COMPENDIO

La invención incluye un intermedio enlazador-fármaco de la Fórmula I:



en la que $X=Y$ se selecciona de $\text{CH}_2\text{-CH}_2$, CH=CH , C(=O)-NH o $\text{CH}_2\text{-NH}$;

A es un anillo heterocíclico de 5 miembros o 6 miembros, opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado de F, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ o =C(R)_2 , donde R se selecciona independientemente de H, F, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ o fluoroalquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$,

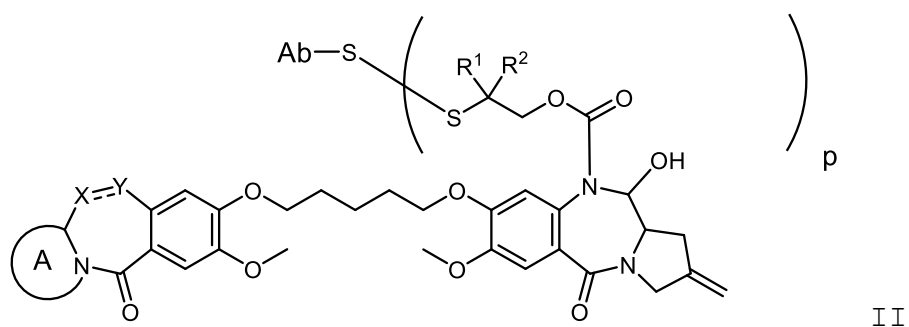
R^1 y R^2 se seleccionan independientemente de H o alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ o R^1 y R^2 forman un grupo heterocíclico o cicloalquilo de 3, 4, 5 o 6 miembros,

R^3 se selecciona independientemente de NO_2 , Cl, F, CN, CO_2H o Br y

m es 0, 1 o 2.

La invención incluye restos de fármaco de pirrolobenzodiazepina monoalquilador unidos de forma covalente a anticuerpos mediante un enlazador de disulfuro para formar compuestos de conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) con aplicaciones terapéuticas o de diagnóstico.

Otro aspecto de la invención es un compuesto de conjugado de anticuerpo-fármaco de la Fórmula II:



o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en la que:

$X=Y$ se selecciona de CH_2-CH_2 , $CH_2-C(=O)$, $CH=CH$ o CH_2-NH ;

A es un anillo heterocíclico de 5 miembros o 6 miembros, opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado de F, alquilo C_1-C_6 o $=C(R)_2$, donde R se selecciona independientemente de H, F, alquilo C_1-C_6 o fluoroalquilo C_1-C_6 ,

R^1 y R^2 se seleccionan independientemente de H o alquilo C_1-C_6 o R^1 y R^2 forman un grupo heterocíclico o cicloalquilo de 3, 4, 5 o 6 miembros,

p es un número entero de 1 a 8, y

Ab es un anticuerpo.

En un ejemplo de modalidad, el anticuerpo se une a uno o más antígenos asociados con tumor o receptores de superficie celular seleccionados de (1)-(53):

- (1) BMPR1B (receptor de proteínas morfogénicas óseas-tipo IB),
- (2) E16 (LAT1, SLC7A5),
- (3) STEAP1 (antígeno epitelial de seis transmembranas de la próstata),
- (4) MUC16 (0772P, CA125),
- (5) MPF (MPF, MSLN, SMR, factor que potencia megacariocitos, mesotelina),
- (6) Napi2b (NAPI-3B, NPTIIb, SLC34A2, familia portadora de

soluto 34 (fosfato de sodio), miembro 2, transportador de fosfato dependiente de sodio tipo II 3b),

(7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, semaforina 5b Hlog, dominio sema, siete repeticiones de trombospondina (tipo 1 y similar a tipo 1), dominio transmembrana (TM) y dominio citoplasmático corto, (semaforina) 5B),

(8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, ADNc RIKEN 2700050C12, gen de ADNc RIKEN 2700050C12),

(9) ETBR (receptor de endotelina tipo B),

(10) MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315),

(11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen 1 asociado al cáncer de próstata, próstata 1 asociada al cáncer de próstata, antígeno epitelial prostática de seis transmembrana 2, proteína prostática de seis transmembranas),

(12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, canal catiónico potencial de receptores transitorios, subfamilia M, miembro 4),

(13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma),

(14) CD21 (CR2 (receptor de complemento 2) o C3DR (C3d/receptor de virus de Epstein Barr) o Hs 73792),

(15) CD79b (CD79B, CD79 β , Igb (beta asociada con inmunoglobulina), B29),

(16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (dominio SH2 con proteína de anclaje fosfatasa 1a), SPAP1B, SPAP1C),

(17) HER2,

(18) NCA,

(19) MDP,

(20) IL20R α ,

(21) Brevican,

(22) EphB2R,

(23) ASLG659,

- (24) PSCA,
- (25) GEDA,
- (26) BAFF-R (receptor del factor que activa los linfocitos B, receptor 3 BLyS, BR3),
- (27) CD22 (isoforma CD22-B del receptor de linfocitos B),
- (28) CD79a (CD79A, CD79 α , alfa asociada con inmunoglobulina),
- (29) CXCR5 (receptor 1 de linfoma de Burkitt),
- (30) HLA-DOB (subunidad beta de molécula del MHC de clase II (antígeno Ia)),
- (31) P2X5 (canal iónico 5 regulado por ligando P2X del receptor purinérgico),
- (32) CD72 (antígeno de diferenciación de linfocitos B CD72, Lyb-2),
- (33) LY64 (antígeno linfocítico 64 (RP105), proteína de membrana tipo I de la familia de repetición rica en leucina (LRR, por su sigla en inglés)),
- (34) FcRH1 (proteína 1 similar al receptor de Fc),
- (35) FcRH5 (IRTA2, receptor 2 de la superfamilia de inmunoglobulina asociado con translocación),
- (36) TENB2 (proteoglicano de transmembrana putativo),
- (37) PMEL17 (homólogo de plata; SILV; D12S53E; PMEL17; SI; SIL),
- (38) TMEFF1 (proteína de transmembrana con dominios 1 tipo EGF y tipo dos folistatina, Tomorregulina-1),
- (39) GDNF-Ra1 (receptor alfa 1 de familia GDNF, GFRA1; GDNFR; GDNFRA; RETL1; TRNR1; RET1L; GDNFR-alfa1; GFR-ALPHA-1),
- (40) Ly6E (complejo del antígeno linfocítico 6, locus E; Ly67, RIG-E, SCA-2, TSA-1),
- (41) TMEM46 (homólogo shisa 2 (*Xenopus laevis*); SHISA2),
- (42) Ly6G6D (complejo de antígeno linfocítico 6, locus G6D; Ly6-D, MEGT1),
- (43) LGR5 (receptor 5 acoplado a proteína G con repetición rica en leucina; GPR49, GPR67),

- (44) RET (proto-oncogén ret; MEN2A; HSCR1; MEN2B; MTC1; PTC; CDHF12; Hs.168114; RET51; RET-ELE1),
- (45) LY6K (complejo de antígeno linfocítico 6, locus K; LY6K; HSJ001348; FLJ35226),
- (46) GPR19 (receptor 19 acoplado a proteína G; Mm.4787),
- (47) GPR54 (receptor KISS1; KISS1R; GPR54; HOT7T175; AXOR12),
- (48) ASPHD1 (dominio beta-hidroxilasa de aspartato con 1; LOC253982),
- (49) Tirosinasa (TYR; OCA1A; OCA1A; tirosinasa; SHEP3),
- (50) TMEM118 (proteína anular, transmembrana 2; RNFT2; FLJ14627),
- (51) GPR172A (receptor 172A acoplado a proteína G; GPCR41; FLJ11856; D15Erttd747e),
- (52) CD33 o
- (53) CLL-1.

Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende un compuesto de conjugado de anticuerpo-fármaco de la Fórmula II y un diluyente, portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la invención es el uso de un compuesto de conjugado de anticuerpo-fármaco de la Fórmula II en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer en un mamífero.

Otro aspecto de la invención es un método para tratar cáncer administrándole a un paciente una composición farmacéutica que comprende un compuesto de conjugado de anticuerpo-fármaco de la Fórmula II.

Otro aspecto de la invención es un método para realizar un compuesto de conjugado de anticuerpo-fármaco de la Fórmula

II.

Otro aspecto de la invención es un artículo de fabricación que comprende una composición farmacéutica que comprende un compuesto de conjugado de anticuerpo-fármaco de la Fórmula II, un envase y un prospecto o etiqueta que indique que la composición farmacéutica se puede utilizar para tratar el cáncer.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1A muestra una gráfica de viabilidad celular in vitro de células BJAB tratadas con ADC-107, ADC-103 y ADC-108 de control no objetivo.

La figura 1B muestra una gráfica de viabilidad celular in vitro de células WSU-DLCL2 tratadas con ADC-107, ADC-103 y ADC-108 de control no objetivo.

La figura 1C muestra una gráfica de viabilidad celular in vitro de células Jurkat tratadas con ADC-107, ADC-103 y ADC-108 de control no objetivo.

La figura 1D muestra una gráfica de viabilidad celular in vitro de células BJAB tratadas con ADC-101, ADC-113, ADC-103, ADC-111 y ADC-112.

La figura 1E muestra una gráfica de viabilidad celular in vitro de células WSU-DLCL2 tratadas con ADC-101, ADC-113, ADC-103, ADC-111 y ADC-112.

La figura 1F muestra una gráfica de viabilidad celular in vitro de células SK-BR-3 tratadas con ADC-108, ADC-102, ADC-203, ADC-201 y ADC-107.

La figura 1G muestra una gráfica de viabilidad celular *in vitro* de células KPL-4 tratadas con ADC-108, ADC-102, ADC-203, ADC-201 y ADC-107.

La figura 2 muestra la eficacia de conjugados de anticuerpo-fármaco en una gráfica del cambio de volumen tumoral ajustado *in vivo* en el tiempo en el modelo de xenoinjerto WSU-DLCL2 en ratones SCID Fox Chase CB-17, que recibieron una dosis IV con lo siguiente:

- 1) vehículo (amortiguador de histidina n.º 8), 100 µL
- 2) Tio Hu anti-CD22 10F4v3 LC K149C-(CLD-1), ADC-202, 0,5 mg/kg
- 3) Tio Hu anti-CD22 10F4v3 LC K149C-(CLD-1), ADC-202, 2 mg/kg
- 4) Tio Hu anti-CD22 10F4v3 LC K149C-(LD-51), monoamida, ADC-103, 2 mg/kg
- 5) Tio Hu anti-CD22 10F4v3 LC K149C-(LD-51), monoamida, ADC-103, 5 mg/kg
- 6) Tio Hu anti-CD22 10F4v3 LC K149C-(LD-51), monoamida, ADC-103, 10 mg/kg
- 7) Tio Hu anti-Her2 (hu7C2) LC K149C-(LD-51), monoamida, ADC-102, 10 mg/kg

La figura 3 muestra la eficacia de conjugados de anticuerpo-fármaco en una gráfica del cambio de volumen tumoral ajustado *in vivo* en el tiempo en el modelo de xenoinjerto Bjab-luc en ratones SCID Fox Chase CB-17, que recibieron una dosis IV con lo siguiente:

- 1) Vehículo (20mM de amortiguador de histidina n.º 8 HisAc, 240 mM de Sacarosa, TW-20 al 0,02 %, pH 5,5), 100 µL (microlitro)
- 2) Tio Hu anti-CD22 10F4v3 LC K149C-(CLD-1), ADC-202, 0,1 mg/kg
- 3) Tio Hu anti-CD22 10F4v3 LC K149C-(CLD-1), ADC-202, 0,2 mg/kg

- 4) Tio Hu anti-CD22 10F4v3 LC K149C-(C-LD1), ADC-202, 0,4 mg/kg
- 5) Tio Hu anti-CD22 10F4v3 LC K149C-(LD-51), monoamida, ADC-105, 1 mg/kg
- 6) Tio Hu anti-CD22 10F4v3 LC K149C-(LD-51), monoamida, ADC-105, 2 mg/kg
- 7) Tio Hu anti-CD22 10F4v3 LC K149C-(LD-51), monoamida, ADC-105, 4 mg/kg
- 8) Tio Hu anti-CD22 10F4v3 LC K149C-(LD-51), monoamida, ADC-105, 8 mg/kg
- 9) Tio Hu anti-Her2 hu7C2 LC K149C-(CLD-1) ADC-201, 0,4 mg/kg
- 10) Tio Hu anti-Her2 hu7C2 LC K149C-(LD-51), monoamida, ADC-104, 8 mg/kg

La figura 4 muestra la eficacia de conjugados de anticuerpo-fármaco en una gráfica del cambio de volumen tumoral ajustado *in vivo* en el tiempo en el modelo de ratón de línea celular humana WSU-DLCL2 que recibieron una dosis IV con lo siguiente:

- 1) vehículo (amortiguador de histidina n.º 8), 100 µL
- 2) Tio Hu anti-CD22 10F4v3 LC K149C-(LD-51), monoamida, ADC-105, 5 mg/kg
- 3) Tio Hu anti-CD22 10F4v3 LC K149C-(LD-52) monoamina, ADC-107, 0,5 mg/kg
- 4) Tio Hu anti-CD22 10F4v3 LC K149C-(LD-52) monoamina, ADC-107, 2 mg/kg
- 5) Tio Hu anti-CD22 10F4v3 LC K149C--(LD-52) monoamina, ADC-107, 5 mg/kg
- 6) Tio Hu anti-CD22 10F4v3 LC K149C-(LD-52) monoamina, ADC-107, 10 mg/kg
- 7) Tio Hu anti-CD22 10F4v3 LC K149C-(CLD-4) monoamina, ADC-204, 0,5 mg/kg
- 8) Tio Hu anti-CD22 10F4v3 LC K149C-(CLD-4) monoamina, ADC-204, 2 mg/kg

- 9) Tio Hu anti-CD22 10F4v3 LC K149C-(CLD-4) monoamina, ADC-204, 5 mg/kg
- 10) Tio Hu anti-CD22 10F4v3 LC K149C-(CLD-4) monoamina, ADC-204, 10 mg/kg
- 11) Tio Hu anti-Her2 hu7C2 LC K149C-(LD-52), monoamida, ADC-108, 2 mg/kg
- 12) Tio Hu anti-Her2 hu7C2 LC K149C-(CLD-4), monoamida, ADC-205, 2 mg/kg

La figura 5A muestra la eficacia de conjugados de anticuerpo-fármaco en una gráfica del cambio de volumen tumoral ajustado *in vivo* en el tiempo en el modelo tumoral HER2 KPL4 en ratones scid beige que recibieron una dosis IV con lo siguiente:

- 1) Vehículo
- 2) Tio-Her2 hu7C2 LC-K149C-(LD-51) monoamida, ADC-106, 1 mg/kg
- 3) Tio-Her2 hu7C2 LC-K149C-(LD-51) monoamida, ADC-106, 5 mg/kg
- 4) Tio-Her2 hu7C2 LC-K149C-(LD-52) monoamina, ADC-108, 0,5 mg/kg
- 5) Tio-Her2 hu7C2 LC-K149C-(LD-52) monoamina, ADC-108, 1 mg/kg
- 6) Tio-Her2 hu7C2 LC-K149C-(LD-52) monoamina, ADC-108, 2 mg/kg
- 7) Tio-Her2 hu7C2 LC-K149C-(LD-52) monoamina, ADC-108, 5 mg/kg
- 8) CD22 LC-K149C-(LD-52) monoamina, ADC-107, 1 mg/kg

La figura 5B muestra la eficacia de conjugados de anticuerpo-fármaco en una gráfica del cambio de volumen tumoral ajustado *in vivo* en el tiempo en el modelo tumoral HER2 KPL4 en ratones scid beige que recibieron una dosis IV con lo siguiente:

- 1) Vehículo
- 2) Tmab-DM1, ADC-211, 1 mg/kg
- 3) Tio-Her2 hu7C2 LC-K149C-(LD-51) monoamida, ADC-106, 1 mg/kg
- 4) Tio-Her2 hu7C2 LC-K149C-(LD-51) monoamida, ADC-106, 5 mg/kg
- 5) Tmab-DM1, ADC-211, 1 mg/kg + Tio-Her2 hu7C2 LC-K149C-(LD-51) monoamida, ADC-106, 1 mg/kg
- 6) Tmab-DM1, ADC-211, 1 mg/kg + Tio-Her2 hu7C2 LC-K149C-(LD-51) monoamida, ADC-106, 5 mg/kg

La figura 6 muestra la eficacia de conjugados de anticuerpo-fármaco en una gráfica del cambio de volumen tumoral ajustado *in vivo* en el tiempo en el modelo HER2 Fo5 en ratones nu/nu CRL, que recibieron una dosis IV con lo siguiente:

- 1) vehículo (amortiguador de histidina n.º 8), 100 µL
- 2) Tio-Her2 hu7C2 LC-K149C-(CLD-1), ADC-201, 0,5 mg/kg
- 3) Tio-Her2 hu7C2 LC-K149C-(CLD-1), ADC-201, 1 mg/kg
- 4) Tio-Her2 hu7C2 LC-K149C-(LD-51) monoamida, ADC-104, 5 mg/kg
- 5) Tio-Her2 hu7C2 LC-K149C-(LD-51) monoamida, ADC-104, 10 mg/kg
- 6) Tio-Her2 hu7C2 LC-K149C-(LD-51) monoamida, ADC-104, 15 mg/kg
- 7) anticuerpo no conjugado Tio-Her2 hu7C2 LC-K149C, 15 mg/kg
- 8) Tio-CD22 LC-K149C-(CLD-1), ADC-202, 1 mg/kg
- 9) Tio-CD22 LC-K149C-(LD-51) monoamida ADC-105, 15 mg/kg

La figura 7 muestra la eficacia de conjugados de anticuerpo-fármaco en una gráfica del cambio de volumen tumoral ajustado *in vivo* en el tiempo en el modelo tumoral HER2 KPL4 en ratones scid beige que recibieron una dosis IV con lo siguiente:

- 1) Vehículo

- 2) Tio-Her2 hu7C2 LC-K149C-(CLD-1), ADC-201, 1 mg/kg
- 3) Tio-Her2 hu7C2 LC-K149C-(CLD-1), ADC-201, 3 mg/kg
- 4) Tio-Her2 hu7C2 LC-K149C-(LD-51) monoamida, ADC-104, 3 mg/kg
- 5) Tio-Her2 hu7C2 LC-K149C-(LD-51) monoamida, ADC-104, 6 mg/kg
- 6) Tio-Her2 hu7C2 LC-K149C-(LD-51) monoamida, ADC-104, 10 mg/kg
- 7) anticuerpo no conjugado Tio-Her2 hu7C2 LC-K149C, 3 mg/kg
- 8) anticuerpo no conjugado Tio-Her2 hu7C2 LC-K149C, 10 mg/kg
- 9) Tio-CD22 LC-K149C-(CLD-1), ADC-202, 3 mg/kg
- 10) Tio-CD22 LC-K149C-(LD-51) monoamida ADC-105, 10 mg/kg

La figura 8 muestra la eficacia de conjugados de anticuerpo-fármaco en una gráfica del cambio de volumen tumoral ajustado *in vivo* en el tiempo en el modelo HER2 Fo5 en ratones nu/nu CRL, que recibieron una dosis IV con lo siguiente:

- 1) Vehículo
- 2) Tio-Her2 hu7C2 LC-K149C-(LD-51) monoamida, ADC-106, 5 mg/kg
- 3) Tio-Her2 hu7C2 LC-K149C-(LD-51) monoamida, ADC-106, 10 mg/kg
- 4) Tio-Her2 hu7C2 LC-K149C-(LD-52) monoamina, ADC-108, 0,5 mg/kg
- 5) Tio-Her2 hu7C2 LC-K149C-(LD-52) monoamina, ADC-108, 2 mg/kg
- 6) Tio-Her2 hu7C2 LC-K149C-(LD-52) monoamina, ADC-108, 5 mg/kg
- 7) Ctrl CD22 LC-K149C-(LD-52) monoamina, ADC-107, 2 mg/kg

La figura 9 muestra la eficacia de conjugados de anticuerpo-fármaco en una gráfica del cambio de volumen tumoral ajustado *in vivo* en el tiempo en el modelo de xenoinjerto WSU-DLCL2 en ratones SCID Fox Chase CB-17, que recibieron una dosis IV

con lo siguiente:

- 1) vehículo (amortiguador de histidina n.º 8), 100 uL
- 2) Tio Hu anti-CD22 LC-K149C-(LD-51), monoamida, ADC-104, 6 mg/kg
- 3) Tio Hu anti-CD22 LC-K149C-(LD-51), monoamida, ADC-104, 16,4 mg/kg
- 4) Tio Hu anti-CD22 LC-K149C-HC-L177C-(LD-51), monoamida, ADC-111, 3,3 mg/kg
- 5) Tio Hu anti-CD22 LC-K149C-HC-L177C-(LD-51), monoamida, ADC-111, 6 mg/kg
- 6) Tio Hu anti-CD22 LC-K149C-HC-L177C-(LD-51), monoamida, ADC-111, 9 mg/kg
- 7) Tio Hu anti-CD22 LC-K149C-HC-L177C-HC-Y376C-(LD-51), monoamida, ADC-112, 2,2 mg/kg
- 8) Tio Hu anti-CD22 LC-K149C-HC-L177C-HC-Y376C-(LD-51), monoamida, ADC-112, 6 mg/kg
- 9) Tio Hu anti-Her2 hu7C2 LC K149C-(LD-51), monoamida, ADC-106, 16,2 mg/kg
- 10) Tio Hu anti-Her2 4D5 LC K149C-HC L177C-(LD-51), monoamida, ADC-113, 8,3 mg/kg

La figura 10 muestra la eficacia de conjugados de anticuerpo-fármaco en una gráfica del cambio de volumen tumoral ajustado *in vivo* en el tiempo en un modelo de xenoinjerto HCC1569X2 en ratones SCID beige que recibieron una dosis IV con lo siguiente:

- 1) vehículo (amortiguador de histidina n.º 8), 100 uL
- 2) Tio Hu anti-Ly6E LC K149C-(CLD-1), ADC-212, 1 mg/kg
- 3) Tio Hu anti-Ly6E LC K149C-(CLD-1), ADC-212, 3 mg/kg
- 4) Tio Hu anti-Ly6E LC K149C-(LD-51) monoamida, ADC-115, 3 mg/kg
- 5) Tio Hu anti-Ly6E LC K149C-(LD-51) monoamida, ADC-115, 6 mg/kg
- 6) Tio Hu anti-Ly6E LC K149C-(LD-51) monoamida, ADC-115, 12

mg/kg

7) Tio Hu anti-Ly6E LC K149C-(LD-51) monoamida, ADC-115, 18 mg/kg

8) Tio Hu anti-CD22 10F4v3 LC K149C-(LD-51), monoamida, ADC-110, 12 mg/kg

9) Tio Hu anti-Ly6E LC K149C-(CLD-4) monoamina, ADC-210, 1 mg/kg

10) Tio Hu anti-Ly6E LC K149C-(CLD-4) monoamina, ADC-210, 3 mg/kg

11) Tio Hu anti-Ly6E LC K149C-(CLD-4) monoamina, ADC-210, 6 mg/kg

12) Tio Hu anti-CD22 10F4v3 LC K149C-(CLD-4) monoamina, ADC-204, 3 mg/kg

La figura 11 muestra interacciones putativas de un compuesto de pirrolobenzodiazepina (PBD) dialquilador y dos compuestos de pirrolobenzodiazepina monoalquilador con ADN.

La figura 12 muestra una comparación de eficacia en ratones y toxicología en monos cinomolgos de un ADC HER2 LC K149C LD-51 con un ADC HER2 LC K149C CLD-1.

La figura 13 muestra una exposición basada en una evaluación de índice terapéutico de un ADC HER2 LC K149C LD-51 con un ADC HER2 LC K149C CLD-1.

La figura 14 muestra datos de un ensayo de viabilidad celular con diversos ADC HER2 hu7C2 LC K149C con diferentes enlazadores.

La figura 15 muestra el volumen tumoral durante el tiempo para diversos ADC en un modelo de tumor de aloinjerto en ratones.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE EJEMPLOS DE MODALIDADES

A continuación se hará referencia de forma detallada a determinadas modalidades de la invención, cuyos ejemplos se ilustran en las estructuras y fórmulas adjuntas. Si bien la invención se describirá junto con las modalidades ilustradas, se entenderá que no se pretende limitar la invención a tales modalidades. Por el contrario, se pretende que la invención cubra todas las alternativas, modificaciones y equivalentes que se puedan incluir dentro del alcance de la presente invención, según se define en las reivindicaciones.

Un experto en la técnica podrá reconocer diversos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente que se podrían utilizar en la práctica de la presente invención. La presente invención no se encuentra limitada de forma alguna a los métodos y materiales descritos.

Salvo que se indique lo contrario, los términos técnicos y científicos que se utilizan en la presente tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención y son coherentes con: Singleton et ál (1994) Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2ª Ed., J. Wiley & Sons, Nueva York, NY; y Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) Immunobiology, 5ª Ed., Garland Publishing, Nueva York.

DEFINICIONES

Salvo que se indique lo contrario, se pretende que los siguientes términos y frases, según se usan en la presente, tengan los siguientes significados:

Cuando se utilizan marcas comerciales en la presente, los solicitantes pretenden incluir independientemente la formulación del producto de esa marca comercial, el fármaco genérico y el o los ingredientes farmacéuticos activos del producto de la marca comercial.

Un «marco humano acceptor» a efectos de la presente es un marco que comprende la secuencia de aminoácidos de un marco de dominio variable de cadena ligera (VL) o un marco de dominio variable de cadena pesada (VH) derivado de un marco de inmunoglobulina humana o de un marco de consenso humano, tal como se define a continuación. Un marco humano acceptor «derivado de» un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de este o puede contener cambios en las secuencias de aminoácidos. En algunas modalidades, la cantidad de cambios de aminoácidos es 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos o 2 o menos. En algunas modalidades, el marco humano acceptor de VL es idéntico en secuencia a la secuencia del marco de inmunoglobulina humana de VL o la secuencia del marco de consenso humano.

«Afinidad» se refiere a la fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (p. ej., un anticuerpo) y su compañero de unión (p. ej., un antígeno). Salvo que se indique lo contrario, tal como se usa en la presente, «afinidad de unión» se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (p. ej., anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X con respecto a su compañera Y puede estar representada generalmente por la constante de disociación (K_d). La afinidad puede medirse usando métodos comunes conocidos en

la técnica, que incluyen los descritos en la presente. A continuación se describen modalidades específicas ilustrativas y a modo de ejemplo para medir la afinidad de unión.

En determinadas modalidades, un anticuerpo según se describe en la presente tiene una constante de disociación (K_d) de $\geq 1\mu\text{M}$, $\geq 100\text{ nM}$, $\geq 10\text{ nM}$, $\geq 5\text{ nM}$, $\geq 4\text{ nM}$, $\geq 3\text{ nM}$, $\geq 2\text{ nM}$, $\geq 1\text{ nM}$, $\geq 0.1\text{ nM}$, $\geq 0.01\text{ nM}$ o $\geq 0.001\text{ nM}$ (p. ej., 10^{-8} M o menos, p. ej., de 10^{-8} M a 10^{-13} M , p. ej., de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

Un anticuerpo «con afinidad madurada» se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables (HVR), en comparación con un anticuerpo original que no posee tales alteraciones, donde tales alteraciones producen una mejora de la afinidad del anticuerpo para el antígeno.

El término «anticuerpo» se utiliza en la presente en el sentido más amplio y comprende diversas estructuras de anticuerpo que incluyen, de modo no taxativo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos, siempre que presenten la actividad de unión al antígeno deseada.

Un «fragmento de anticuerpo» se refiere a una molécula distinta a un anticuerpo intacto que comprende una parte de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al cual se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, de modo no taxativo, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos de cadena simple (p. ej., scFv) y

anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Los términos «cáncer» y «canceroso» se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente mediante un crecimiento/una proliferación celular no regulada. Un «tumor» comprende una o más células cancerosas. Los ejemplos de cáncer incluyen, de modo taxativo, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o neoplasias linfoides. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas (p. ej., cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón incluido cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico («NSCLC», por su sigla en inglés), adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, incluido cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándula salival, cáncer renal o de riñón, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, así como cáncer de cabeza y cuello.

Un cáncer «HER2-positivo» comprende células cancerosas con niveles de HER2 superiores a los normales. Los ejemplos de cáncer HER2-positivo incluyen cáncer de mama HER2-positivo y cáncer gástrico HER2-positivo. Opcionalmente, el cáncer HER2-positivo tiene una calificación inmunohistoquímica (ICH) de 2+ o 3+ y/o una relación de amplificación de hibridación *in situ* (ISH, por su sigla en inglés) $\leq 2,0$.

En la presente, se utilizan las expresiones «cáncer de mama en etapa temprana (EBC, por su sigla en inglés)» o «cáncer de mama temprano» para hacer referencia al cáncer de mama sin diseminación por fuera de las mamas o los ganglios linfáticos axilares. Esto incluye el carcinoma ductal *in situ* y cánceres de mama de etapa I, etapa IIA, etapa IIB y etapa IIIA.

La referencia a un tumor o cáncer como de «Etapa 0», «Etapa I», «Etapa II», «Etapa III» o «Etapa IV» y diversas subetapas en esta clasificación indica la clasificación del tumor o cáncer con métodos conocidos en la técnica de agrupamiento general por etapas o determinación de etapas expresada en números romanos. Aunque la etapa real del cáncer depende del tipo de cáncer, en general, un cáncer de Etapa 0 es una lesión *in situ*, un cáncer de Etapa I es un pequeño tumor localizado, un cáncer de Etapa II y III es un tumor local avanzado que exhibe afectación de los ganglios linfáticos locales y un cáncer de Etapa IV representa el cáncer metastásico. El médico experto conoce las etapas específicas para cada tipo de tumor.

La expresión «cáncer de mama metastásico» significa el estado del cáncer de mama en el que las células cancerosas se transmiten del lugar original a uno o más lugares distintos en el cuerpo, mediante los vasos sanguíneos o linfáticos, para formar uno o más tumores secundarios en uno o más órganos además de las mamas.

Un cáncer «avanzado» es uno diseminado fuera del lugar u órgano de origen, ya sea mediante invasión local o metástasis. Por consiguiente, la expresión cáncer «avanzado» incluye tanto la enfermedad con avance local como metastásica.

Un cáncer «recurrente» es uno que ha vuelto a crecer, ya sea en el lugar inicial o en otro lugar, luego de una respuesta a la terapia inicial, como una cirugía.

Un cáncer «con avance local» es un cáncer que regresa luego del tratamiento al mismo lugar que un cáncer previamente tratado.

Un cáncer «operable» o «extirpable» es un cáncer que se encuentra confinado al órgano primario y se adecua a la cirugía (resección).

Un cáncer «no extirpable» o «inextirpable» no se puede extraer (extirpar) mediante cirugía.

El término anticuerpo «quimérico» se refiere a un anticuerpo en el que una parte de la cadena pesada y/o ligera se deriva de un origen o una especie particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera se deriva de un origen o una especie diferente.

La «clase» de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante que posee su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varios de estos pueden dividirse además en subclases (isotipos), p. ej., IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ e μ , respectivamente.

El término «agente citotóxico», tal como se usa en la presente, se refiere a una sustancia que inhibe o evita una función celular y/o provoca destrucción o muerte celular.

Los agentes citotóxicos incluyen, de modo no taxativo, isótopos radioactivos (p. ej., At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radioactivos de Lu), agentes o fármacos quimioterapéuticos (p. ej., metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes), agentes inhibidores del crecimiento, enzimas y fragmentos de estas como enzimas nucleolíticas, antibióticos, toxinas como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, animal o vegetal, incluidos fragmentos y/o variantes de estos y los diversos agentes antitumorales o anticancerígenos descritos a continuación.

«Funciones efectoras» se refiere a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían según el isotipo de anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente de complementos (CDC); unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC, por su sigla en inglés); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de la superficie celular (p. ej., receptor de linfocitos B) y activación de linfocitos B.

Una «cantidad eficaz» de un agente, p. ej., una formulación farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado. La cantidad eficaz del fármaco para tratar el cáncer puede reducir la cantidad de células cancerosas, reducir el tamaño del tumor, inhibir (es decir, enlentecer en cierta medida y preferentemente detener) la infiltración de células

cancerosas en órganos periféricos, inhibir (es decir, enlentecer en cierta medida y preferentemente detener) la metástasis tumoral, inhibir en cierta medida el crecimiento del tumor y/o aliviar en cierta medida uno o más síntomas asociados con el cáncer. En la medida en que el fármaco pueda prevenir el crecimiento y/o destruir las células cancerosas existentes, este puede ser citostático y/o citotóxico. La cantidad eficaz puede extender la supervivencia libre de evolución (p. ej., según la medición de los Criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos, RECIST o las modificaciones de CA-125), generar una respuesta objetiva (incluida una respuesta parcial, PR, o una respuesta completa, CR), aumentar el tiempo de supervivencia general y/o mejorar uno o más síntomas del cáncer (p. ej., según la evaluación de FOSI).

El término «epítopo» se refiere al punto particular en una molécula antigénica al que se une un anticuerpo.

El «epítopo 4D5», «4D5 epítopo» o "4D5" es la región en el dominio extracelular de HER2 a la que se unen el anticuerpo 4D5 (ATCC CRL 10463) y trastuzumab. Este epítopo se encuentra cerca del dominio transmembrana de HER2 y dentro del dominio IV de HER2. Se puede llevar a cabo un ensayo de bloqueo cruzado de rutina para determinar los anticuerpos que se unen al epítopo 4D5, tal como se describe en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). De manera alternativa, se puede realizar la correspondencia de epítopos para evaluar si el anticuerpo se une al epítopo 4D5 de HER2 (p. ej., uno o más residuos cualesquiera en la región desde alrededor del residuo 550 hasta alrededor del residuo 610, inclusive, de HER2 (SEQ ID NO: 39)).

El «epítopo 2C4» o «2C4 epítopo» es la región en el dominio extracelular de HER2 a la que se une el anticuerpo 2C4. Se puede llevar a cabo un ensayo de bloqueo cruzado de rutina con el fin de determinar los anticuerpos que se unen al epítopo 2C4, tal como se describe en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). De manera alternativa, se puede realizar correspondencia del epítopo para evaluar si el anticuerpo se une al epítopo 2C4 de HER2. El epítopo 2C4 comprende residuos del dominio II en el dominio extracelular de HER2. El anticuerpo 2C4 y pertuzumab se unen al dominio extracelular de HER2 en la intersección de los dominios I, II y III (Franklin et ál. *Cancer Cell* 5:317-328 (2004)).

El anticuerpo de murino anti-HER2 7C2 se une a un epítopo en el dominio I de HER2. Remitirse, p. ej., a la publicación de estadounidense n.º WO 98/17797. El epítopo es distinto al epítopo que enlaza trastuzumab, que se une al dominio IV de HER2 y el epítopo que enlaza pertuzumab, que se une al dominio II de HER2. Al unirse al dominio IV, trastuzumab altera los complejos HER2-HER3 independientes del ligando y, de esa forma, inhibe la señalización corriente abajo (p. ej., PI3K/AKT). Por el contrario, la unión de pertuzumab al dominio II evita la interacción de HER2 impulsada por ligando con otros miembros de la familia de HER (p. ej., HER3, HER1 o HER4) y, de esa forma, también evita la transducción de señal corriente abajo. La unión de MAb 7C2 al dominio I no produce interferencia de la unión de trastuzumab o pertuzumab a los dominios IV y II, respectivamente, lo que ofrece el potencial de combinar MAb 7C2 ADC con trastuzumab, trastuzumab emtansina (T-DM-1) y/o pertuzumab. El anticuerpo murino 7C2, 7C2.B9, se describe en la publicación PCT n.º WO 98/17797. Se describe un anticuerpo humanizado anti-HER2 7C2 en WO2016/040723A1.

El término «región Fc» se utiliza en la presente para definir una región de extremo C de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una parte de la región constante. El término incluye regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. En una modalidad, una región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226 o desde Pro230 al extremo carboxilo de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina en el extremo C (Lys447) de la región Fc puede estar presente o no. Salvo que se indique lo contrario en la presente, la numeración de los residuos de aminoácidos en la región Fc o región constante se realiza de acuerdo con el sistema de numeración EU, también denominado índice EU, como se describe en Kabat et ál., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de la Salud, Bethesda, MD, 1991.

«Marco» o «FR» hacen referencia a residuos de dominio variable distintos a los residuos de la región hipervariable (HVR). La FR de un dominio variable consiste generalmente en cuatro dominios de FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. Por consiguiente, las secuencias de HVR y FR generalmente aparecen en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1 (L1)-FR2-H2 (L2)-FR3-H3 (L3)-FR4.

Los términos «anticuerpo de longitud completa», «anticuerpo intacto» y «anticuerpo entero» se usan en la presente de forma intercambiable para hacer referencia a un anticuerpo con una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo natural o con cadenas pesadas que contienen una región Fc como se define en la presente.

Los términos «célula hospedadora», «línea de células hospedadoras» y «cultivo de células hospedadoras» se usan de

manera intercambiable y se refieren a células en las que se introdujo ácido nucleico exógeno, incluida la progenie de dichas células. Las células hospedadoras incluyen «células transformantes» y «células transformadas» que incluyen la célula primaria transformada y la progenie derivada de esta independientemente de la cantidad de pasajes. Es posible que la progenie no sea completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula original, sino que puede contener mutaciones. En la presente se incluye una progenie mutante con la misma función o actividad biológica según la clasificación o selección en la célula originalmente transformada.

Un «anticuerpo humano» es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido mediante un ser humano o una célula humana o derivada de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias que codifican anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprenda residuos de unión a antígeno no humanos.

Un «marco de consenso humano» es un marco que representa los residuos de aminoácidos más comunes en una selección de secuencias marco de VL o VH de inmunoglobulina humana. Generalmente, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana se realiza a partir de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat et ál., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, publicación de NIH 91-3242, Bethesda MD (1991), tomos 1-3. En una modalidad, para el VL, el subgrupo es un subgrupo kappa I como en Kabat et ál., *supra*. En una modalidad, para el VH, el subgrupo es un subgrupo III como en Kabat et ál.,

supra.

Un anticuerpo «humanizado» se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos de aminoácidos de HVR no humanas y residuos de aminoácidos de FR humanos. En determinadas modalidades, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las HVR (p. ej., CDR) corresponden a las de un anticuerpo no humano y todas o sustancialmente todas las FR corresponden a las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado puede comprender opcionalmente al menos una parte de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una «forma humanizada» de un anticuerpo, p. ej., un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que experimentó humanización.

La expresión «región hipervariable» o «HVR», tal como se utiliza en la presente, hace referencia a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos («bucles hipervariables»). Generalmente, los anticuerpos naturales de cuatro cadenas comprenden seis HVR; tres en la VH (H1, H2, H3) y tres en la VL (L1, L2, L3). Las HVR generalmente comprenden residuos de aminoácidos de los bucles hipervariables y/o de las «regiones determinantes de complementariedad» (CDR), con estas últimas con la mayor variabilidad de secuencia y/o implicadas en el reconocimiento del antígeno. Los ejemplos de bucles hipervariables se producen en los residuos de aminoácidos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3). (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Los ejemplos de CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3) se producen en residuos de aminoácidos

24-34 de L1, 50-56 de L2, 89-97 de L3, 31-35B de H1, 50-65 de H2 y 95-102 de H3. (Kabat et ál., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de la Salud, Bethesda, MD, (1991).) A excepción de CDR1 en VH, las CDR generalmente comprenden los residuos de aminoácidos que forman los bucles hipervariables. Las CDR también comprenden «residuos determinantes de especificidad» o «SDR» (por su sigla en inglés), que son residuos que entran en contacto con el antígeno. Los SDR están incluidos en regiones de las CDR denominadas CDR abreviadas o a-CDR. Los ejemplos de a-CDR (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2 y a-CDR-H3) se producen en los residuos aminoácidos 31-34 de L1, 50-55 de L2, 89-96 de L3, 31-35B de H1, 50-58 de H2 y 95-102 de H3. (Remitirse a Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)). Salvo que se indique lo contrario, los residuos de HVR y otros residuos en el dominio variable (p. ej., residuos de FR) se enumeran en la presente de acuerdo con Kabat et ál., *supra*.

Un «inmunoconjugado» es un anticuerpo conjugado con una o más moléculas heterólogas, incluido de modo no taxativo, un agente citotóxico.

Un «paciente», «individuo» o «sujeto» es un mamífero. Los mamíferos incluyen, de modo no taxativo, animales domesticados (p. ej., vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (p. ej., seres humanos y primates no humanos, como monos), conejos y roedores (p. ej., ratones y ratas). En determinadas modalidades, el paciente, individuo o sujeto es un humano. En algunas modalidades, el paciente puede ser un «paciente con cáncer», es decir, alguien que padece o está en riesgo de padecer uno o más síntomas de cáncer, en particular cáncer de mama o gástrico.

Una «población de pacientes» hace referencia a un grupo de pacientes con cáncer. Dichas poblaciones se pueden utilizar para demostrar seguridad y/o eficacia estadísticamente significativa de un fármaco.

Un paciente «con recidiva» es uno que presenta signos o síntomas de cáncer tras la remisión. Opcionalmente, el paciente presenta recidiva luego de la terapia adyuvante o neoadyuvante.

Un cáncer o una muestra biológica que «presenta expresión, amplificación o activación de HER» es aquella que, en una prueba de diagnóstico, expresa (incluso sobreexpresa) un receptor de HER, amplificó un gen de HER y/o demuestran de otra forma activación o fosforilación de un receptor de HER.

En la presente, «terapia neoadyuvante» o «terapia preoperatoria» hacen referencia a una terapia previa a la cirugía. El objetivo de la terapia neoadyuvante es brindar un tratamiento sistémico inmediato que pueda erradicar la micrometástasis que de otra manera proliferaría si se siguiera la secuencia estándar de cirugía seguida por terapia sistémica. La terapia neoadyuvante también puede contribuir a la reducción del tamaño del tumor y, de esta manera, permitir la extracción de tumores inicialmente inextirpables o la conservación de partes del órgano y sus funciones. Además, la terapia neoadyuvante permite una evaluación in vivo de la eficacia del fármaco que puede guiar la elección de tratamientos posteriores.

En la presente, «terapia adyuvante» hace referencia a la terapia que se administra tras la cirugía definitiva, en la que no se detecta prueba alguna de enfermedad residual, a

modo de reducir el riesgo de reaparición de la enfermedad. El objetivo de la terapia adyuvante es prevenir la reaparición del cáncer y, por lo tanto, reducir la posibilidad de una muerte relacionada con el cáncer. En la presente, la terapia adyuvante excluye específicamente la terapia neoadyuvante.

La expresión «cirugía definitiva» se utiliza en la comunidad médica. La cirugía definitiva incluye, por ejemplo, procedimientos, quirúrgicos u otros, que producen la extracción o extirpación del tumor, incluidos los que producen la extracción o extirpación de todo el tumor visible en líneas generales. La cirugía definitiva incluye, por ejemplo, extracción completa o curativa o extracción general completa del tumor. La cirugía definitiva incluye procedimientos que tienen lugar en una o más etapas e incluye, por ejemplo, procedimientos quirúrgicos de etapas múltiples, en los que se realizan uno o más de los procedimientos quirúrgicos u otros antes de extraer el tumor. La cirugía definitiva incluye procedimientos para extraer o extirpar el tumor, incluidos órganos afectados, partes de órganos y tejidos, así como también órganos circundantes, tales como ganglios linfáticos, partes de órganos o tejidos. La extracción puede ser incompleta, de manera que pueden permanecer células tumorales aunque no se detecten.

La «supervivencia» hace referencia al paciente que continúa con vida e incluye la supervivencia libre de enfermedad (DFS, por su sigla en inglés), la supervivencia libre de avance (PFS, por su sigla en inglés) y la supervivencia general (OS, por su sigla en inglés). La supervivencia se puede calcular mediante el método Kaplan-Meier y cualquier diferencia en la supervivencia se calcula utilizando la prueba estratificada de rango logarítmico.

La «supervivencia libre de avance» (PFS) es el tiempo desde el primer día de tratamiento hasta el avance documentado de la enfermedad (incluido avance del SNC) o la muerte por cualquier causa en el estudio, lo que ocurra en primer lugar.

La «supervivencia libre de enfermedad» (DFS) hace referencia al paciente que continúa con vida, sin reaparición del cáncer, durante un período de tiempo definido, tal como alrededor de 1 año, alrededor de 2 años, alrededor de 3 años, alrededor de 4 años, alrededor de 5 años, alrededor de 10 años, etc., desde el inicio del tratamiento o desde el diagnóstico inicial. En un aspecto de la invención, la DFS se analiza conforme al principio de intención de tratar, es decir, los pacientes se evalúan según la terapia asignada. Los eventos que se utilizan en el análisis de DFS pueden incluir la reaparición local, regional y distante del cáncer, la ocurrencia de un cáncer secundario y la muerte de pacientes por cualquier causa sin un evento previo (p. ej., reaparición de cáncer de mama o segundo cáncer primario).

La «supervivencia global» hace referencia al paciente que continúa con vida durante un período de tiempo definido, tal como alrededor de 1 año, alrededor de 2 años, alrededor de 3 años, alrededor de 4 años, alrededor de 5 años, alrededor de 10 años, etc., desde el inicio del tratamiento o desde el diagnóstico inicial. En los estudios que subyacen a la invención, el evento utilizado para el análisis de supervivencia fue la muerte por cualquier causa.

«Prolongación de la supervivencia» indica el aumento de la DFS y/u OS en un paciente tratado con respecto a un paciente sin tratar o con respecto a un protocolo de tratamiento de control. La supervivencia se controla durante al menos seis

meses o al menos alrededor de 1 año, o al menos alrededor de 2 años, o al menos alrededor de 3 años, o al menos alrededor de 4 años, o al menos alrededor de 5 años o al menos alrededor de 10 años, etc., tras el inicio del tratamiento o tras el diagnóstico inicial.

«Monoterapia» hace referencia a régimen terapéutico que incluye un único agente terapéutico para el tratamiento del cáncer o tumor durante el transcurso del período de tratamiento.

«Terapia de mantenimiento» hace referencia a un régimen terapéutico que se administra para reducir la posibilidad de reaparición o avance de la enfermedad. La terapia de mantenimiento se puede brindar durante cualquier extensión de tiempo, incluidos períodos de tiempo prolongados hasta toda la vida del sujeto. La terapia de mantenimiento se puede proporcionar luego de la terapia inicial o junto con las terapias inicial o adicional. Las dosificaciones que se utilizan para la terapia de mantenimiento pueden variar e incluir menores dosificaciones en comparación con las dosificaciones que se utilizan en otros tipos de terapia.

Un «anticuerpo aislado» es uno separado de un componente de su entorno natural. En algunas modalidades, un anticuerpo se purifica hasta más del 95 % o 99 % de pureza, según se determina, p. ej., mediante electroforesis (p. ej., SDS-PAGE, enfoque isoeléctrico (IEF, por su sigla en inglés), electroforesis capilar) o cromatografía (p. ej., HPLC de intercambio iónico o de fase inversa). Para un análisis de los métodos de evaluación de la pureza de los anticuerpos, remitirse, p. ej., a Flatman et ál., *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007).

Un «ácido nucleico aislado» se refiere a una molécula de ácido nucleico que se separó de un componente de su entorno natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico incluida en células que comúnmente contienen la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente de forma extracromosómica o en una ubicación cromosómica diferente de su ubicación cromosómica natural.

«Ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo» se refiere a una o más moléculas de ácido nucleico que codifican cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo (o fragmentos de estas), incluidas dichas moléculas de ácido nucleico en un único vector o vectores separados y dichas moléculas de ácido nucleico presentes en una o más ubicaciones en una célula hospedadora.

El término «HER2», tal como se usa en la presente, se refiere a cualquier HER2 maduro y natural que resulte del procesamiento de una proteína precursora de HER2 en una célula. El término incluye HER2 de cualquier origen de vertebrado, incluidos mamíferos como primates (p. ej. seres humanos y monos cinomolgos) y roedores (p. ej., ratones y ratas), salvo que se indique lo contrario. El término también incluye variantes de HER2 de origen natural, p. ej., variantes de corte y empalme o variantes alélicas. La secuencia de aminoácidos de un ejemplo de proteína precursora de HER2 humana con secuencia de señal (con secuencia de señal, aminoácidos 1-22) se muestra en la SEQ ID NO: 64. La secuencia de aminoácidos de un ejemplo de HER2 humano maduro es los aminoácidos 23-1255 de la SEQ ID NO: 64.

El término «célula positiva para HER2» se refiere a una célula que expresa HER2 en su superficie.

El término «anticuerpo monoclonal», tal como se utiliza en la presente, hace referencia a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítopo, salvo por los posibles anticuerpos variantes, p. ej., que contienen mutaciones de origen natural o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales y dichas variantes generalmente están presentes en cantidades mínimas. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un único determinante en un antígeno. Por lo tanto, el modificador «monoclonal» indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea y no se debe interpretar que requiere producción del anticuerpo mediante ningún método específico. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se utilizan de acuerdo con la presente invención se pueden elaborar mediante diversas técnicas que incluyen, de modo no taxativo, el método de hibridomas, métodos de ADN recombinante, métodos de expresión en fagos y métodos que utilizan animales transgénicos que contienen todo o parte de los loci de la inmunoglobulina humana y en la presente se describen dichos métodos y otros ejemplos de métodos para elaborar anticuerpos monoclonales.

Un «anticuerpo sin conjugar» hace referencia a un anticuerpo que no está conjugado con un resto heterólogo (p. ej., un resto citotóxico) o radiomarcador. El anticuerpo sin conjugar puede estar presente en una formulación

farmacéutica.

«Anticuerpos naturales» se refiere a moléculas de inmunoglobulina de origen natural con estructuras variables. Por ejemplo, los anticuerpos de IgG naturales son glicoproteínas heterotetraméricas de alrededor de 150.000 daltons, compuestas por dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas enlazadas mediante disulfuro. Del extremo N al extremo C, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también denominada dominio variable pesado o dominio variable de cadena pesada, seguida por tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). De forma similar, del extremo N al extremo C, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también denominada dominio variable ligero o dominio variable de cadena ligera, seguida por un dominio ligero constante (CL). La cadena ligera de un anticuerpo puede asignarse a uno de dos tipos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), según la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

Un «frasco» es un recipiente adecuado para contener una preparación líquida o liofilizada. En una modalidad, el frasco es un frasco de uso único, p. ej., un frasco de uso único de 20 cc con un tapón.

El término «prospecto del envase» se usa para referirse a instrucciones que se suelen incluir en envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información acerca de las indicaciones, el uso, las dosis, la administración, la terapia de combinación, las contraindicaciones y/o advertencias referentes al uso de dichos productos terapéuticos.

El «porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos»

con respecto a una secuencia de polipéptidos de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de polipéptidos de referencia, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si fuera necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación a efectos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de varias formas conocidas por el experto en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de software informático disponible para el público, como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros adecuados para alinear las secuencias, incluido cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima en la longitud completa de las secuencias que se comparan. A los efectos de la presente, sin embargo, los valores del % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan mediante el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue creado por Genentech, Inc. y el código fuente se presentó con la documentación del usuario en la Oficina de derechos de autor de Estados Unidos, Washington D.C., 20559, donde se encuentra registrado con el n.º de registro de derechos de autor de Estados Unidos TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible para el público a través de Genentech, Inc., sur de San Francisco, California o puede compilarse a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, incluido UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias se establecen mediante el programa ALIGN-2 y no varían.

En las situaciones en las que se utiliza ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A específica para, con o contra una secuencia de aminoácidos B específica (que se puede expresar de forma alternativa como una secuencia de aminoácidos A específica que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos para, con o contra una secuencia de aminoácidos B específica) se calcula como se indica a continuación:

100 veces la fracción X/Y

donde X es la cantidad de residuos de aminoácido calificados como correspondencias idénticas mediante el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en la alineación del programa de A y B, y donde Y es la cantidad total de residuos de aminoácido en B. Se observará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. Salvo que se indique específicamente lo contrario, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos que se utilizan en la presente se obtienen como se describió en el párrafo inmediatamente anterior con el programa informático ALIGN-2.

El término «formulación farmacéutica» se refiere a una preparación de una forma tal que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo allí incluido sea eficaz y que no contiene ningún componente adicional que sea inaceptablemente tóxico para un sujeto al cual se le administraría la formulación.

Un «portador farmacéuticamente aceptable» hace referencia a un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinto a

un ingrediente activo, que es no tóxico para un sujeto. Un portador farmacéuticamente aceptable incluye, de modo no taxativo, un amortiguador, un excipiente, un estabilizador o un conservante.

Tal como se usa en la presente, «tratamiento» (y sus variaciones gramaticales como «tratar» o «tratando») se refiere a una intervención clínica en un intento por alterar el curso natural del individuo que se está tratando y se puede realizar ya sea para profilaxis o durante el desarrollo de la patología clínica. Los efectos deseados del tratamiento incluyen, de modo no taxativo, evitar la aparición o la reaparición de una enfermedad, aliviar los síntomas, disminuir cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, evitar la metástasis, disminuir la velocidad de avance de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad y remisión o mejora en el pronóstico. En algunas modalidades, se usan anticuerpos de la invención para retrasar la evolución de una enfermedad o para enlentecer el avance de una enfermedad.

«Administración conjunta» hace referencia a la administración intravenosa de dos (o más) fármacos durante la misma administración, en lugar de infusiones en secuencia de los dos o más fármacos. En general, esto implica la combinación de dos (o más) fármacos en la misma bolsa IV antes de su administración conjunta.

Un fármaco que se administra «de forma simultánea» con uno o más fármacos distintos se administra durante el mismo ciclo de tratamiento, en el mismo día de tratamiento que el o los fármacos distintos y, opcionalmente, al mismo tiempo que el o los fármacos distintos. Por ejemplo, en el caso de terapias contra el cáncer que se administran cada 3 semanas, cada uno

de los fármacos que se administran en forma simultánea se administra en el día 1 de un ciclo de 3 semanas.

Un «agente quimioterapéutico» se refiere a un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN®), alquilsulfonatos como busulfano, improsulfano y piposulfano, aziridinas como benzodopa, carbocadona, meturedopa y uredopa, etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida y trimetilolomelamina, acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona), delta-9-tetrahidrocanabinol (dronabinol, MARINOL®), beta-lapacona, lapacol, colchicinas, ácido betulínico, una camptotecina (incluido el análogo sintético topotecano (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecano, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina), briostatina, calistatina, CC-1065 (incluidos sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina), podofilotoxina, ácido podofilínico, teniposida, criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8), dolastatina, duocarmicina (incluidos los análogos sintéticos KW-2189 y CB1-TM1), eleuterobina, pancratistatina, una sarcodictina, espongistatina, mostazas de nitrógeno como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina, antibióticos como antibióticos de enediina (p. ej., caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma1I y caliqueamicina omega1I (remitirse, p. ej., a Nicolaou et ál., Angew. Chem

Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); CDP323, un inhibidor oral de integrina alfa-4, dinemicina, incluida dinemicina A, una esperamicina, así como neocarzinostatina cromóforo y cromóforos antibióticos de cromoproteína enediina relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinias, dactinomicina, daunorrubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluido ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina, inyección de liposoma de doxorubicina HCl (DOXIL®), doxorubicina liposomal TLC D-99 (MYOCET®), doxorubicina liposomal pegilada (CAELYX®) y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina, antimetabolitos como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), una epotilona y 5-fluorouracilo (5-FU), análogos de ácido fólico como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato, análogos de purina como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina, análogos de pirimidina como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, andrógenos como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolaton, antiadrenales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano, relleno de ácido fólico como ácido frolínico, aceglaton, glicósido de aldofosfamid, ácido aminolevulínico, eniluracilo, amsacrina, bestrabucil, bisantreno, edatraxato, defofamina, demecolcina, diazicuona, elfornitina, acetato de eliptinio, una epotilona,

etoglucida, nitrato de galio, hidroxurea, lentinano, lonidainina, maitansinoides como maitansina y ansamitocinas, mitoguazona, mitoxantrona, mopidanmol, nitraerina, pentostatina, fenamet, pirarrubicina, losoxantrona, 2-etilhidrazida, procarbazona, complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR), razoxano, rizoxina, sizofiran, espirogermanio, ácido tenuazónico, triazicuona, 2,2',2''-triclorotrietilamina, tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina), uretano, vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®), dacarbazina, manomustina, mitobronitol, mitolactol, pipobroman, gacitosina, arabinosida («Ara-C»), tiotepa, taxoide, p. ej., paclitaxel (TAXOL®), formulación de nanopartícula de paclitaxel modificada con albúmina (ABRAXANETM) y docetaxel (TAXOTERE®), cloranbucilo, 6-tioguanina, mercaptopurina, metotrexato, agentes de platino como cisplatino, oxaliplatino (p. ej., ELOXATIN®) y carboplatino, vincas que evitan que la polimerización de tubulina forme microtúbulos, incluidos vinblastina (VELBAN®), vincristina (ONCOVIN®), vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®) y vinorelbina (NAVELBINE®), etopósido (VP-16), ifosfamida, mitoxantrona, leucovovina, novantrona, edatrexato, daunomicina, aminopterina, ibandronato, inhibidor de topoisomerasa RFS 2000, difluorometilornitina (DMFO), retinoides como ácido retinoico, incluido bexaroteno (TARGRETIN®), bifosfonatos como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (AREDIA®), tiludronato (SKELID®) o risedronato (ACTONEL®), troxacitabina (un análogo de nucleósido citosina 1,3-dioxolano), oligonucleótidos antisentido, en particular los que inhiben la expresión de genes en vías de señalización implicadas en la proliferación de células aberrantes como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y receptor del factor de

crecimiento epidérmico (EGF-R), vacunas como vacuna THERATOPE® y vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®, inhibidor de topoisomerasa 1 (p. ej., LURTOTECAN®), rmRH (p. ej., ABARELIX®), BAY439006 (sorafenib; Bayer), SU-11248 (sunitinib, SUTENT®, Pfizer), perifosina, inhibidor de COX-2 (p. ej., celecoxib o etoricoxib), inhibidor de proteasoma (p. ej., PS341), bortezomib (VELCADE®), CCl-779, tipifarnib (R11577), orafenib, ABT510, inhibidor de Bcl-2 como oblimersen sódico (GENASENSE®), pixantrona; inhibidores del EGFR (remitirse a la definición a continuación), inhibidores de tirosina quinasa, inhibidores de serina-treonina cinasa como rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE®), inhibidores de farnesiltransferasa como lonafarnib (SCH 6636, SARASARTM) y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores, así como combinaciones de dos o más de los anteriores como CHOP, abreviatura de una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona y FOLFOX, abreviatura de un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATINTM) combinado con 5-FU y leucovorina.

Los agentes quimioterapéuticos como se definen en la presente incluyen «agentes antihormonales» o «agentes terapéuticos endócrinos» que actúan para regular, reducir o inhibir los efectos de las hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer. Pueden ser hormonas en sí mismos, incluidos de modo no taxativo: antiestrógenos con un perfil mixto de agonistas/antagonistas, incluidos, tamoxifeno (NOLVADEX®), 4-hidroxitamoxifeno, toremifeno (FARESTON®), idoxifeno, droloxifeno, raloxifeno (EVISTA®), trioxifeno, queoxifeno y moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERM, por su sigla en inglés) como SERM3, antiestrógenos puros sin propiedades agonistas, como fulvestrant (FASLODEX®) y EM800

(dichos agentes pueden bloquear la dimerización del receptor de estrógenos (ER, por su sigla en inglés), inhibir la unión al ADN, aumentar el recambio de ER y/o suprimir los niveles de ER), inhibidores de aromatasa, incluidos inhibidores esteroidales de aromatasa como formestano y exemestano (AROMASIN®) e inhibidores no esteroideos de aromatasa como anastrozol (ARIMIDEX®), letrozol (FEMARA®) y aminoglutetimida y otros inhibidores de aromatasa incluidos vorozol (RIVISOR®), acetato de megesterol (MEGASE®), fadrozol y 4(5)imidazoles, agonistas de hormonas de liberación de hormona luteinizante, incluidos leuprolida (LUPRON® y ELIGARD®), goserelina, buserelina y tripterelina, esteroides sexuales, incluidas progestinas como acetato de megesterol y acetato de medroxiprogesterona, estrógenos como dietilestilbestrol y premarina y andógenos/retinoides como fluoximesterona, todos los ácidos transretiónicos y fenretinida, onapristona, antiprogesteronas, reguladores de disminución del receptor de estrógeno (ERD, por su sigla en inglés), antiandrógenos como flutamida, nilutamida y bicalutamida y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores, así como combinaciones de dos o más de los anteriores.

El término «agente inmunosupresor», tal como se utiliza en la presente para terapia adicional se refiere a sustancias que suprimen o enmascaran el sistema inmunológico del mamífero que se trata en la presente. Esto incluiría sustancias que suprimen la producción de citocina, disminuye la regulación o suprime la expresión de antígenos propios o enmascaran los antígenos del MHC. Los ejemplos de estos agentes incluyen pirimidinas 2-amino-6-aril-5-sustituidas (remitirse a la patente estadounidense n.º 4,665,077), fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID, por su sigla en inglés), ganciclovir, tacrolimus, glucocorticoides

como cortisol o aldosterona, agentes antiinflamatorios como un inhibidor de ciclooxigenasa, un inhibidor de 5-lipoxigenasa o un antagonista del receptor de leucotrienos, antagonistas de purina como azatioprina o micofenolato mofetil (MMF, por su sigla en inglés), agentes alquilantes como ciclofosfamida, bromocriptina, danazol, dapsona, glutaraldehído (que enmascara los antígenos del MHC, como se describe en la patente estadounidense n.º 4,120,649), anticuerpos antiidiotípicos para antígenos del MHC y fragmentos del MHC, ciclosporina A, esteroides como corticosteroides o glucocorticosteroides o análogos de glucocorticoide, p. ej., prednisona, metilprednisolona, incluido el succinato de metilprednisolona sódico SOLU-MEDROL® y dexametasona, inhibidores de dihidrofolato reductasa como metotrexato (oral o subcutáneo), agentes antimalaria como cloroquina e hidroxicloroquina, sulfasalazina, leflunomida, citocina o anticuerpos del receptor de citocina incluidos anticuerpos antiinterferón-alfa, -beta o -gamma, anticuerpos anti-factor de necrosis tumoral (TNF, por su sigla en inglés)-alfa (infliximab (REMICADE®) o adalimumab), inmunoadhesina anti-TNF-alfa (etanercept), anticuerpos anti-TNF-beta, anticuerpos anti-interleucina-2 (IL-2) anticuerpos del receptor anti-IL-2 y anticuerpos y antagonistas del receptor anti-interleucina-6 (IL-6) (como ACTEMRA™ (tocilizumab)), anticuerpos anti-LFA-1, incluidos anticuerpos anti-CD11a y anti-CD18, anticuerpos anti-L3T4, glubulina antilinfocítica heteróloga, anticuerpos pan-T, preferentemente anticuerpos anti-CD3 o anti-CD4/CD4a, péptido soluble con un dominio de unión a LFA-3 (WO 90/08187 publicado el 26-jul-90), estreptocinasa, factor de crecimiento de transformación beta (TGF-beta), estreptodornasa, ARN o ADN del hospedador, FK506, RS-61443, clorambucilo, deoxispergualina, rapamicina, recetor de células T (Cohen et ál., patente estadounidense n.º

5,114,721), fragmentos del receptor de células T (Offner et ál., *Science*, 251: 430-432 (1991), WO 90/11294, Ianeway, *Nature*, 341: 482 (1989) y WO 91/01133), antagonistas BAFF como anticuerpos BAFF y anticuerpos BR3 y antagonistas de zTNF4 (para mayor detalles remitirse a Mackay y Mackay, *Trends Immunol.*, 23:113-5 (2002) y remitirse también a la definición a continuación), agentes biológicos que interfieren con señales del auxiliar de células T, como el receptor anti-CD40 o el ligando anti-CD40 (CD154), incluidos anticuerpos de bloqueo del ligando CD40-CD40 (p. ej., Durie et ál., *Science*, 261: 1328-30 (1993), Mohan et ál., *J. Immunol.*, 154: 1470-80 (1995)) y CTLA4-Ig (Finck et ál., *Science*, 265: 1225-7 (1994)) y anticuerpos del receptor de células T (EP 340,109) como T10B9. Algunos agentes inmunosupresores preferidos en la presente incluyen ciclofosfamida, clorambucilo, azatioprina, leflunomida, MMF o metotrexato.

El término «antagonista de unión al eje PD-1» se refiere a una molécula que inhibe la interacción de un compañero de unión al eje PD-1 con uno o más de sus compañeros de unión para retirar la disfunción de células T que resulta de la señalización en el eje de señalización de PD-1, con el resultado de la restauración o potenciación de la función de las células T (p. ej., proliferación, producción de citocinas, destrucción de células objetivo). Tal como se usa en la presente, un antagonista de la unión al eje PD-1 incluye un antagonista de unión a PD-1, un antagonista de unión de PD-L1 y un antagonista de unión a PD-L2.

El término «antagonista de unión a PD-1» se refiere a una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere con la transducción de señales que resultan de la interacción de PD-1 con uno o más de sus compañeros de unión, como PD-

L1, PD-L2. En algunas modalidades, el antagonista de unión a PD-1 es una molécula que inhibe la unión de PD-1 a uno o más de sus compañeros de unión. En un aspecto específico, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PD-L1 y/o PD-L2. Por ejemplo, los antagonistas de unión a PD-1 incluyen anticuerpos anti-PD-1, fragmentos de unión al antígeno de este, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren con la transducción de señal que resulta de la interacción de PD-1 con PD-L1 y/o PD-L2. En una modalidad, un antagonista de unión a PD-1 reduce la señal de estimulación conjunta negativa mediada a través de proteínas de la superficie celular expresadas en la señalización mediada por linfocitos T a través de PD-1 para hacer que un linfocito T disfuncional sea menos disfuncional (p. ej., potenciar las respuestas efectoras al reconocimiento de antígenos). En algunas modalidades, el antagonista de unión a PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1. En un aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es MDX-1106 (nivolumab) descrito en la presente. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es MK-3475 (lambrolizumab) descrito en la presente. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es CT-011 (pidilizumab) descrito en la presente. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es AMP-224 descrito en la presente.

El término «antagonista de unión a PD-L1» se refiere a una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere con la transducción de señales que resultan de la interacción de PD-L1 con uno o más de sus compañeros de unión, como PD-1, B7-1. En algunas modalidades, el antagonista de unión a PD-L1 es una molécula que inhibe la unión de PD-L1 a sus compañeros de unión. En un aspecto específico, el antagonista

de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-1 a PD-1 y/o B7-1. En algunas modalidades, los antagonistas de unión a PD-L1 incluyen anticuerpos anti-PD-L1, fragmentos de unión a antígenos de este, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren con la transducción de señal que resulta de la interacción de PD-L1 con uno o más de sus compañeros de unión, como PD-1, B7-1. En una modalidad, un antagonista de unión a PD-L1 reduce la señal de estimulación conjunta negativa mediada a través de proteínas de la superficie celular expresadas en la señalización mediada por linfocitos T a través de PD-L1 para hacer que un linfocito T disfuncional sea menos disfuncional (p. ej., potenciar las respuestas efectoras al reconocimiento de antígenos). En algunas modalidades, un antagonista de unión de PD-L1 es un anticuerpo anti-PD-L1. En un aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es YW243.55.S70 descrito en la presente. En otro aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es MDX-1105 descrito en la presente. En aun otro aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es MPDL3280A descrito en la presente. En aun otro aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es MEDI4736 descrito en la presente.

El término «antagonista de unión a PD-L2» se refiere a una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere con la transducción de señales que resultan de la interacción de PD-L2 con uno o más de sus compañeros de unión, como PD-1. En algunas modalidades, un antagonista de unión a PD-L2 es una molécula que inhibe la unión de PD-L2 a uno o más de sus compañeros de unión. En un aspecto específico, el antagonista de unión de PD-L2 inhibe la unión de PD-L2 a PD-1. En algunas modalidades, los antagonistas de PD-L2 incluyen anticuerpos anti-PD-L2, fragmentos de unión al antígeno de este, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y

otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren con la transducción de señal que resulta de la interacción de PD-L2 con uno o más de sus compañeros de unión, como PD-1. En una modalidad, un antagonista de unión a PD-L2 reduce la señal de estimulación conjunta negativa mediada a través de proteínas de la superficie celular expresadas en la señalización mediada por linfocitos T a través de PD-L2 para hacer que un linfocito T disfuncional sea menos disfuncional (p. ej., potenciar las respuestas efectoras al reconocimiento de antígenos). En algunas modalidades, un antagonista de unión a PD-L2 es una inmunoadhesina.

Una dosis «fija» o «uniforme» de un agente terapéutico en la presente hace referencia a una dosis que se administra a un paciente humano independientemente del peso (WT) o el área de superficie corporal (BSA, por su sigla en inglés) del paciente. Por lo tanto, la dosis fija o uniforme no se brinda como una dosis en mg/kg o una dosis en mg/m², sino como una cantidad absoluta del agente terapéutico.

En la presente, en general, una dosis «de carga» comprende una dosis inicial de un agente terapéutico que se administra al paciente, seguida por una o más dosis de mantenimiento de esta. En general, se administra una única dosis de carga, pero en la presente se contemplan múltiples dosis de carga. Normalmente la cantidad de dosis de carga que se administran supera la cantidad de dosis de mantenimiento que se administran y/o las dosis de carga se administran con mayor frecuencia que las dosis de mantenimiento, para lograr la concentración deseada del agente terapéutico en estado estacionario antes de lo que se puede lograr con la dosis de mantenimiento.

En la presente, una dosis «de mantenimiento» hace referencia a una o más dosis de un agente terapéutico que se administran al paciente durante un período de tratamiento. Normalmente, las dosis de mantenimiento se administran en intervalos de tratamiento separados, como aproximadamente cada semana, aproximadamente cada 2 semanas, aproximadamente cada 3 semanas o aproximadamente cada 4 semanas, preferentemente cada 3 semanas.

«Infusión» hace referencia a la introducción en el cuerpo por vía intravenosa de una solución que contiene fármacos con fines terapéuticos. En general, esto se logra a través de una bolsa intravenosa (IV).

Una «bolsa intravenosa» o «bolsa IV» es una bolsa que puede contener una solución que se puede administrar a un paciente por vía intravenosa. En una modalidad, la solución es una solución salina (p. ej., NaCl a alrededor del 0,9 % o alrededor del 0,45 %). Opcionalmente, la bolsa IV se fabrica a partir de poliolefina o cloruro de polivinal.

Los términos «región variable» o «dominio variable» se refieren al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo implicada en la unión del anticuerpo a un antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo natural tienen generalmente estructuras similares y cada dominio comprende cuatro regiones marco (FR, por su sigla en inglés) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR, por su sigla en inglés). (Remitirse, p. ej., a Kindt et ál. *Kuby Immunology*, 6ª ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007).) Un único dominio de VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión al antígeno. Además, los anticuerpos que se unen a un antígeno específico se pueden

aislar usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para evaluar una clasificar de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Remitirse, p. ej., a Portolano et ál., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et ál., *Nature* 352:624-628 (1991).

El término «vector», tal como se utiliza en la presente, se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede propagar otro ácido nucleico al cual se encuentra enlazado. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico de autorreplicación, así como el vector incorporado en el genoma de una célula hospedadora en la que se introdujo. Determinados vectores pueden dirigir la expresión de ácidos nucleicos a los que se encuentran enlazados de forma operativa. En la presente se hace referencia a dichos vectores como «vectores de expresión».

Un «aminoácido libre de cisteína» hace referencia a un residuo aminoácido de cisteína modificado como anticuerpo original, con un grupo funcional tiol (-SH) y que no se encuentra emparejado como un puente disulfuro intermolecular o intramolecular.

«Enlazador», «unidad enlazadora» o «enlace» indican un resto químico que comprende una cadena de átomos que une de forma covalente un anticuerpo a un resto de fármaco.

Cuando se indica la cantidad de sustituyentes, la expresión «uno o más» hace referencia al intervalo de un sustituyente a la mayor cantidad posible de sustitución, es decir, remplazo de un hidrógeno hasta remplazo de todos los hidrógenos con los sustituyentes. El término «sustituyente» indica un átomo o un grupo de átomos que remplazan un átomo de hidrógeno en una molécula original. El término

«sustituido» indica que un grupo especificado cuenta con uno o más sustituyentes. Cuando cualquier grupo puede llevar múltiples sustituyentes y se proporcionan diversos posibles sustituyentes, los sustituyentes se seleccionan de forma independiente y no es necesario que sean iguales. El término «no sustituido» significa que el grupo específico no tiene sustituyentes. El término «opcionalmente sustituido» significa que el grupo específico se encuentra no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes, que se seleccionan de forma independiente del grupo de posibles sustituyentes. Cuando se indica la cantidad de sustituyentes, la expresión «uno o más» significa de un sustituyente a la mayor cantidad posible de sustitución, es decir, remplazo de un hidrógeno hasta remplazo de todos los hidrógenos con los sustituyentes.

El término «alquilo», tal como se utiliza en la presente, hace referencia a un radical hidrocarburo monovalente de cadena ramificada o lineal saturado de cualquier extensión desde uno a doce átomos de carbono (C_1 - C_{12}), en el que el radical alquilo se puede sustituir opcionalmente de forma independiente con uno o más sustituyentes descritos a continuación. En otra modalidad, un radical alquilo es uno a ocho átomos de carbono (C_1 - C_8) o uno a seis átomos de carbono (C_1 - C_6). Los ejemplos de grupos alquilo incluyen, de modo no taxativo, metilo (Me, $-CH_3$), etilo (Et, $-CH_2CH_3$), 1-propilo (n-Pr, n-propilo, $-CH_2CH_2CH_3$), 2-propilo (i-Pr, i-propilo, $-CH(CH_3)_2$), 1-butilo (n-Bu, n-butilo, $-CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2-metil-1-propilo (i-Bu, i-butilo, $-CH_2CH(CH_3)_2$), 2-butilo (s-Bu, s-butilo, $-CH(CH_3)CH_2CH_3$), 2-metil-2-propilo (t-Bu, t-butilo, $-C(CH_3)_3$), 1-pentilo (n-pentilo, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2-pentilo ($-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_3$), 3-pentilo ($-CH(CH_2CH_3)_2$), 2-metil-2-butilo ($-C(CH_3)_2CH_2CH_3$), 3-metil-2-butilo ($-CH(CH_3)CH(CH_3)_2$), 3-metil-1-butilo ($-CH_2CH_2CH(CH_3)_2$), 2-metil-1-butilo ($-CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$), 1-hexilo ($-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$),

2-hexilo $(-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)$, 3-hexilo $(-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3))$, 2-metil-2-pentilo $(-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)$, 3-metil-2-pentilo $(-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3)$, 4-metil-2-pentilo $(-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2)$, 3-metil-3-pentilo $(-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2)$, 2-metil-3-pentilo $(-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)_2)$, 2,3-dimetil-2-butilo $(-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2)$, 3,3-dimetil-2-butilo $(-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{CH}_3)_3)$, 1-heptilo, 1-octilo y similares.

El término «alquilenos», tal como se utiliza en la presente, hace referencia a un radical hidrocarburo divalente de cadena ramificada o lineal saturado de cualquier extensión desde uno a doce átomos de carbono ($\text{C}_1\text{--C}_{12}$), en el que el radical alquilenos se puede sustituir opcionalmente de forma independiente con uno o más sustituyentes descritos a continuación. En otra modalidad, un radical alquilenos es uno a ocho átomos de carbono ($\text{C}_1\text{--C}_8$) o uno a seis átomos de carbono ($\text{C}_1\text{--C}_6$). Los ejemplos de grupos alquilenos incluyen, de modo no taxativo, metileno $(-\text{CH}_2-)$, etileno $(-\text{CH}_2\text{CH}_2-)$, propileno $(-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-)$ y similares.

El término «alqueniolo» hace referencia a un radical hidrocarburo monovalente de cadena ramificada o lineal de cualquier extensión entre dos y ocho átomos de carbono ($\text{C}_2\text{--C}_8$) con al menos un punto de insaturación, es decir, un enlace doble sp^2 carbono-carbono, en el que el radical alqueniolo se puede sustituir opcionalmente de forma independiente con uno o más sustituyentes descritos en la presente e incluye radicales con orientaciones «cis» y «trans» o, de forma alternativa, orientaciones «E» o «Z». Los ejemplos incluyen, de modo no taxativo, etilenilo o vinilo $(-\text{CH}=\text{CH}_2)$, alilo $(-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2)$ y similares.

El término «alqueniolenos» hace referencia a un radical

hidrocarburo divalente de cadena ramificada o lineal de cualquier extensión entre dos y ocho átomos de carbono (C_2-C_8) con al menos un punto de insaturación, es decir, un enlace doble sp^2 carbono-carbono, en el que el radical alquénileno se puede sustituir opcionalmente de forma independiente con uno o más sustituyentes descritos en la presente e incluye radicales con orientaciones «cis» y «trans» o, de forma alternativa, orientaciones «E» o «Z». Los ejemplos incluyen, de modo no taxativo, etilenileno o vinileno ($-CH=CH-$), alilo ($-CH_2CH=CH-$) y similares.

El término «alquinilo» hace referencia a un radical hidrocarburo monovalente lineal o ramificado de cualquier extensión entre dos y ocho átomos de carbono (C_2-C_8) con al menos un punto de insaturación, es decir, un enlace triple sp carbono-carbono, en el que el radical alquinilo se puede sustituir opcionalmente de forma independiente con uno o más sustituyentes descritos en la presente. Los ejemplos incluyen, de modo no taxativo, etinilo ($-C\equiv CH$), propinilo (propargilo, $-CH_2C\equiv CH$) y similares.

El término «alquinileno» hace referencia a un radical hidrocarburo divalente lineal o ramificado de cualquier extensión entre dos y ocho átomos de carbono (C_2-C_8) con al menos un punto de insaturación, es decir, un enlace triple sp carbono-carbono, en el que el radical alquinileno se puede sustituir opcionalmente de forma independiente con uno o más sustituyentes descritos en la presente. Los ejemplos incluyen, de modo no taxativo, etinileno ($-C\equiv C-$), propinileno (propargileno, $-CH_2C\equiv C-$) y similares.

Los términos «carbociclo», «carbociclilo», «anillo carbocíclico» y «cicloalquilo» hacen referencia a un anillo

saturado o parcialmente insaturado, no aromático y monovalente con 3 a 12 átomos de carbono (C_3-C_{12}) como anillo monocíclico o 7 a 12 átomos de carbono como anillo bicíclico. Los carbociclos bicíclicos con 7 a 12 átomos se pueden disponer, por ejemplo, como un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6] y los carbociclos bicíclicos con 9 o 10 átomos de anillo se pueden disponer como un sistema biciclo [5,6] o [6,6] o como sistemas puenteados como biciclo[2.2.1]heptano, biciclo[2.2.2]octano y biciclo[3.2.2]nonano. Los restos espiro también están incluidos dentro del alcance de esta definición. Los ejemplos de carbociclos monocíclicos incluyen, de modo no taxativo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, 1-ciclopent-1-enilo, 1-ciclopent-2-enilo, 1-ciclopent-3-enilo, ciclohexilo, 1-ciclohex-1-enilo, 1-ciclohex-2-enilo, 1-ciclohex-3-enilo, ciclohexadienilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclonoñilo, ciclodecilo, cicloundecilo, ciclododecilo y similares. Los grupos carbociclilo se encuentran opcionalmente sustituidos de forma independiente con uno o más sustituyentes descritos en la presente.

«Arilo» significa un radical hidrocarburo aromático monovalente de 6-20 átomos de carbono (C_6-C_{20}) derivado mediante eliminación de un átomo de hidrógeno de un único átomo de carbono de un sistema anular aromático original. Algunos grupos arilo se representan en los ejemplos de estructuras como «Ar». Arilo incluye radicales bicíclicos que comprenden un anillo aromático fusionado a un anillo saturado, parcialmente insaturado o un anillo carbocíclico aromático. Los grupos arilo típicos incluyen, de modo no taxativo, radicales derivados de benceno (fenilo), bencenos sustituidos, naftaleno, antraceno, bifenilo, indenilo, indanilo, 1,2-dihidronaftaleno, 1,2,3,4-tetrahidronaftilo y similares. Los grupos arilo se encuentran opcionalmente

sustituidos de forma independiente con uno o más sustituyentes descritos en la presente.

«Arileno» significa un radical hidrocarburo aromático divalente de 6-20 átomos de carbono (C_6-C_{20}) derivado mediante eliminación de dos átomos de hidrógeno de dos átomos de carbono de un sistema anular aromático original. Algunos grupos arileno se representan en los ejemplos de estructuras como «Ar». Arileno incluye radicales bicíclicos que comprenden un anillo aromático fusionado a un anillo saturado, parcialmente insaturado o un anillo carbocíclico aromático. Los grupos arileno típicos incluyen, de modo no taxativo, radicales derivados de benceno (fenileno), bencenos sustituidos, naftaleno, antraceno, bifenileno, indenileno, indanileno, 1,2-dihidronaftaleno, 1,2,3,4-tetrahidronaftilo y similares. Los grupos arileno se encuentran opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes descritos en la presente.

Las expresiones «heterociclo», «heterociclilo» y «anillo heterocíclico» se utilizan de manera intercambiable en la presente y hacen referencia a un radical carbocíclico saturado o parcialmente insaturado (es decir, con uno o más enlaces dobles y/o triples dentro del anillo) de 3 a 20 átomos en el anillo, en el que al menos un átomo del anillo es un heteroátomo seleccionado de nitrógeno, oxígeno, fósforo y azufre y los átomos restantes del anillo son C, donde uno o más átomos del anillo se sustituyen opcionalmente de forma independiente con uno o más sustituyentes descritos a continuación. Un heterociclo puede ser un monociclo con 3 a 7 miembros del anillo (de 2 a 6 átomos de carbono y de 1 a 4 heteroátomos que se seleccionan de N, O, P, y S) o un biciclo con 7 a 10 miembros del anillo (4 a 9 átomos de carbono y 1 a 6 heteroátomos que se seleccionan de N, O, P,

y S), por ejemplo: un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6], o [6,6]. Se describen heterociclos, p. ej., en Paquette, Leo A., "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, Nueva York, 1968), en particular en los capítulos 1, 3, 4, 6, 7, y 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, Nueva York, 1950 al presente), en particular Tomos 13, 14, 16, 19, y 28; y J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566. «Heterociclilo» también incluye radicales en los que los radicales heterociclo se fusionan con un anillo saturado, particularmente insaturado o un anillo heterocíclico o carbocíclico aromático. Los ejemplos de anillos heterocíclicos incluyen, de modo no taxativo, morfolin-4-ilo, piperidin-1-ilo, piperazinilo, piperazin-4-il-2-ona, piperazin-4-il-3-ona, pirrolidin-1-ilo, tiomorfolin-4-ilo, S-dioxotiomorfolin-4-ilo, azocan-1-ilo, azetidin-1-ilo, octahidropirido[1,2-a]pirazin-2-ilo, [1,4]diazepan-1-ilo, pirrolidinilo, tetrahidrofuranilo, dihidrofuranilo, tetrahidrotienilo, tetrahidropiranilo, dihidropiranilo, tetrahidrotiopiranilo, piperidino, morfolino, tiomorfolino, tioxanilo, piperazinilo, homopiperazinilo, azetidino, oxetanilo, tietanilo, homopiperidinilo, oxepanilo, tiepanilo, oxazepinilo, diazepinilo, tiazepinilo, 2-pirrolinilo, 3-pirrolinilo, indolinilo, 2H-piranilo, 4H-piranilo, dioxanilo, 1,3-dioxolanilo, pirazolinilo, ditianilo, ditiolanilo, dihidropiranilo, dihidrotienilo, dihidrofuranilo, pirazolidinilimidazolinilo, imidazolidinilo, 3-azabiccico[3.1.0]hexanilo, 3-azabicciclo[4.1.0]heptanilo, azabicciclo[2.2.2]hexanilo 3H-indolio, quinolizininilo y N-piridil ureas. Los restos espiro también están incluidos dentro del alcance de esta definición. Los ejemplos de grupo heterocíclico en los que 2 átomos del anillo se sustituyen con restos de oxo (=O) son pirimidionilo y 1,1-dioxo-tiomorfolinilo. Los grupos heterociclo en la presente se

encuentran opcionalmente sustituidos de forma independiente con uno o más sustituyentes descritos en la presente.

El término «heteroarilo» hace referencia a un radical aromático monovalente de anillos de 5, 6 o 7 miembros e incluye sistemas de anillos fusionados (al menos uno de los cuales es aromático) de 5-20 átomos, con uno o más heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno y azufre. Los ejemplos de grupos heteroarilo son piridinilo (incluido, por ejemplo, 2-hidroxipiridinilo), imidazolilo, imidazopiridinilo, 1-metil-1H-benzo[d]imidazol, [1,2,4]triazolo[1,5-a]piridina, pirimidinilo (incluido, por ejemplo, 4-hidroxipirimidinilo), pirazolilo, triazolilo, pirazinilo, tetrazolilo, furilo, tienilo, isoxazolilo, tiazolilo, oxadiazolilo, oxazolilo, isotiazolilo, pirrolilo, quinolinilo, isoquinolinilo, tetrahidroisoquinolinilo, indolilo, bencimidazolilo, benzofuranilo, cinolinilo, indazolilo, indolizininilo, ftalazinilo, piridazinilo, triazinilo, isoindolilo, pteridinilo, purinilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, tiadiazolilo, furazanilo, benzofurazanilo, benzotiofenilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, naftiridinilo y fuopiridinilo. Los grupos heteroarilo se sustituyen opcionalmente de forma independiente con uno o más sustituyentes descritos en la presente.

Los grupos heterociclo o heteroarilo pueden estar unidos mediante carbono (enlazados por carbono) o nitrógeno (enlazados por nitrógeno), cuando sea posible. A modo de ejemplo y de forma no taxativa, los heterociclos o heteroarilos unidos por carbono están unidos en la posición 2, 3, 4, 5 o 6 de una piridina, la posición 3, 4, 5 o 6 de una piridazina, la posición 2, 4, 5 o 6 de una pirimidina,

la posición 2, 3, 5 o 6 de una pirazina, la posición 2, 3, 4 o 5 de un furano, tetrahidrofurano, tiofurano, tiofeno, pirrol o tetrahidropirrol, la posición 2, 4 o 5 de un oxazol, imidazol o tiazol, la posición 3, 4 o 5 de un isoxazol, pirazol o isotiazol, la posición 2 o 3 de una aziridina, la posición 2, 3 o 4 de una azetidina, la posición 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de una quinolina o la posición 1, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de una isoquinolina.

A modo de ejemplo y de forma no taxativa, los heterociclos o heteroarilos unidos por nitrógeno están unidos en la posición 1 de una aziridina, azetidina, pirrolo, pirrolidina, 2-pirrolina, 3-pirrolina, imidazol, imidazolidina, 2-imidazolina, 3-imidazolina, pirazol, pirazolina, 2-pirazolina, 3-pirazolina, piperidina, piperazina, indol, indolina, 1H-indazol, la posición 2 de un isoindol o isoindolina, la posición 4 de una morfolina y la posición 9 de un carbazol o una β -carbolina.

El término «quiral» se refiere a moléculas con la propiedad de no superponerse al compañero de imagen especular, mientras que el término «aquiral» hace referencia a moléculas que se pueden superponer a su compañero de imagen especular.

El término «estereoisómeros» se refiere a compuestos con una constitución química idéntica, pero que difieren en cuanto a la disposición de los átomos o grupos en el espacio.

«Diastereómero» se refiere a un estereoisómero con dos o más centros de quiralidad y cuyas moléculas no son imágenes especulares entre sí. Los diastereómeros tienen diferentes propiedades físicas, p. ej., puntos de fusión, puntos de ebullición, propiedades espectrales y reactividades. Las mezclas de diastereómeros se pueden separar en

procedimientos analíticos de alta resolución, como electroforesis y cromatografía.

«Enantiómeros» se refiere a dos estereoisómeros de un compuesto que son imágenes especulares que no se pueden superponer entre sí.

Las definiciones y convenciones estereoquímicas que se utilizan en la presente siguen en general a S. P. Parker, Ed., *McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (1984) McGraw-Hill Book Company, Nueva York; y Eliel, E. y Wilen, S., *Stereochemistry of Organic Compounds* (1994) John Wiley & Sons, Inc., Nueva York. Muchos compuestos orgánicos existen en formas ópticamente activas, es decir, tienen la capacidad de girar el plano de la luz polarizada en plano. Para describir un compuesto ópticamente activo, se utilizan los prefijos D y L o R y S, para indicar la configuración absoluta de la molécula sobre su centro o centros quirales. Los prefijos d y l o (+) y (-) se utilizan para indicar el signo de rotación de luz polarizada en plano por parte del compuesto, donde (-) o l indican que el compuesto es levógiro. Un compuesto con el prefijo (+) o d es dextrógiro. Para una estructura química dada, estos estereoisómeros son idénticos, salvo porque son imágenes especulares entre sí. También se puede hacer referencia a un estereoisómero específico como un enantiómero y una mezcla de estos isómeros a menudo se denomina mezcla enantiomérica. Una mezcla 50:50 de enantiómeros se denomina mezcla racémica o racemato, lo cual puede tener lugar cuando no ha habido estereoselección o estereoespecificidad en una reacción o un proceso químico. Los términos «mezcla racémica» y «racemato» se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, sin actividad óptica.

La frase «sal farmacéuticamente aceptable», tal como se utiliza en la presente, hace referencia a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC). Los ejemplos de sales incluyen, de modo no taxativo, sales de sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, *p*-toluenosulfonato y pamoato (es decir, 1,1'-metilenbis-(2-hidroxi-3-naftoato)). Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula tal como un ion de acetato, un ion de succinato u otro contraión. El contraión puede ser cualquier resto orgánico o inorgánico que estabilice la carga del compuesto original. Además, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo con carga en su estructura. Los casos en los que átomos con carga múltiple son parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden tener múltiples contraiones. Por consiguiente, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos con carga y/o uno o más contraiones.

En la presente se utilizan las siguientes abreviaturas y tienen las definiciones indicadas: BME es beta-mercaptoetanol, Boc es *N*-(*t*-butoxicarbonilo), cit es citrulina (ácido 2-amino-5-ureido pentanoico), DCC es 1,3-diciclohexilcarbodiimida, DCM es diclorometano, DEA es dietilamina, DEAD es dietilazodicarboxilato, DEPC es dietilfosforilcianidato, DIAD es diisopropilazodicarboxilato, DIEA es *N,N*-diisopropiletilamina, DMA es dimetilacetamida, DMAP es 4-

dimetilaminopiridina, DME es éter dimetílico de etilenglicol (o 1,2-dimetoxietano), DMF es *N,N*-dimetilformamida, DMSO es dimetilsulfóxido, DTT es ditioneitol, EDCI es clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida, EEDQ es 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina, ES-MS es espectrometría de masa por electroaspersión, EtOAc es acetato de etilo, Fmoc es *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonilo), gly es glicina, HATU es hexafluorofosfato de *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio, HOBt es 1-hidroxibenzotriazol, HPLC es cromatografía líquida de alta presión, ile es isoleucina, lys es lisina, MeCN (CH₃CN) es acetonitrilo, MeOH es metanol, Mtr es 4-anisildifenilmetilo (o 4-metoxitritilo), NHS es *N*-hidroxisuccinimida, PBS es solución salina amortiguada con fosfato (pH 7), PEG es polietilenglicol o una unidad de etilenglicol (-OCH₂CH₂-), Ph es fenilo, Pnp es *p*-nitrofenilo, MC es 6-maleimidocaproilo, phe es *L*-fenilalanina, PyBrop es hexafluorofosfato de bromo *tris*-pirrolidinofosfonio, SEC es cromatografía por exclusión de tamaño, Su es succinimida, TFA es ácido trifluoroacético, TLC es cromatografía de capa fina, UV es ultravioleta y val es valina.

ANTÍGENOS ASOCIADOS AL TUMOR

(1) BMPR1B (receptor de proteína morfogenética ósea tipo IB, n.º de registro GenBank NM_001203)
ten Dijke, P., et al Science 264 (5155):101-104 (1994),
Oncogene 14 (11):1377-1382 (1997)); WO2004063362
(reivindicación 2); WO2003042661 (reivindicación 12);
US2003134790-A1 (páginas 38-39); WO2002102235
(reivindicación 13; página 296); WO2003055443 (páginas 91-
92); WO200299122 (ejemplo 2; páginas 528-530); WO2003029421
(reivindicación 6); WO2003024392 (reivindicación 2; Fig
112); WO200298358 (reivindicación 1; página 183);

WO200254940 (página 100-101); WO200259377 (páginas 349-350);
WO200230268 (reivindicación 27; página 376); WO200148204
(ejemplo; Fig 4)

NP_001194 receptor de proteína morfogenética ósea, tipo IB
/pid=NP_001194.1 -

Referencias cruzadas: MIM:603248; NP_001194.1; AY065994

(2) E16 (LAT1, SLC7A5, n.º de registro GenBank NM_003486)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 255 (2), 283-288 (1999),
Nature 395 (6699):288-291 (1998), Gaugitsch, H.W., et ál
(1992) J. Biol. Chem. 267 (16):11267-11273); WO2004048938
(ejemplo 2); WO2004032842 (ejemplo IV); WO2003042661
(reivindicación 12); WO2003016475 (reivindicación 1);
WO200278524 (ejemplo 2); WO200299074 (reivindicación 19;
página 127-129); WO200286443 (reivindicación 27; páginas
222, 393); WO2003003906 (reivindicación 10; página 293);
WO200264798 (reivindicación 33; página 93-95); WO200014228
(reivindicación 5; página 133-136); US2003224454 (Fig. 3);
WO2003025138 (reivindicación 12; página 150);

NP_003477 familia portadora de solutos 7 (transportador de
aminoácidos catiónicos, sistema y+),

miembro 5 /pid=NP_003477.3 - Homo sapiens

Referencias cruzadas: MIM:600182; NP_003477.3; NM_015923;
NM_003486_1

(3) STEAP1 (antígeno epitelial prostático de seis
transmembranas, n.º de acceso de GenBank NM_012449)

Cancer Res. 61 (15), 5857-5860 (2001), Hubert, R.S., et ál
(1999) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA. 96 (25):14523-14528);
WO2004065577 (reivindicación 6); WO2004027049 (Fig 1L);
EP1394274 (ejemplo 11); WO2004016225 (reivindicación 2);
WO2003042661 (reivindicación 12); US2003157089 (ejemplo 5);
US2003185830 (ejemplo 5); US2003064397 (Fig 2); WO200289747
(ejemplo 5; página 618-619); WO2003022995 (ejemplo 9; Fig

13A, ejemplo 53; página 173, ejemplo 2; Fig 2A);

NP_036581 antígeno epitelial prostático de seis transmembranas

Referencias cruzadas: MIM:604415; NP_036581.1; NM_012449_1

(4) 0772P (CA125, MUC16, n.º de registro de GenBank AF361486) J. Biol. Chem. 276 (29):27371-27375 (2001)); WO2004045553 (reivindicación 14); WO200292836 (reivindicación 6; Fig 12); WO200283866 (reivindicación 15; páginas 116-121); US2003124140 (ejemplo 16); US 798959. Referencias cruzadas: GI:34501467; AAK74120.3; AF361486_1

(5) MPF (MPF, MSLN, SMR, factor que potencia megacariocitos, mesotelina, n.º de registro GenBank NM_005823) Yamaguchi, N., et ál Biol. Chem. 269 (2), 805-808 (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. EUA. 96 (20):11531-11536 (1999), Proc. Natl. Acad. Sci. EUA. 93 (1):136-140 (1996), J. Biol. Chem. 270 (37):21984-21990 (1995)); WO2003101283 (reivindicación 14); (WO2002102235 (reivindicación 13; páginas 287-288); WO2002101075 (reivindicación 4; páginas 308-309); WO200271928 (páginas 320-321); WO9410312 (páginas 52-57); Referencias cruzadas: MIM:601051; NP_005814.2; NM_005823_1

(6) Napi2b (Napi3b, NAPI-3B, NPTIIb, SLC34A2, familia portadora de soluto 34 (fosfato de sodio), miembro 2, transportador de fosfato dependiente de sodio tipo II 3b, n.º de registro Genbank NM_006424), J. Biol. Chem. 277 (22):19665-19672 (2002), Genomics 62 (2):281-284 (1999), Feild, J.A., et ál (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 258 (3):578-582); WO2004022778 (reivindicación 2); EP1394274 (ejemplo 11); WO2002102235 (reivindicación 13; página 326); EP875569 (reivindicación 1; páginas 17-19); WO200157188 (reivindicación 20; página 329); WO2004032842 (ejemplo IV); WO200175177 (reivindicación 24;

páginas 139-140);

Referencias cruzadas: MIM:604217; NP_006415.1; NM_006424_1

(7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, semaforina 5b Hlog, dominio sema, siete repeticiones de trombospondina (tipo 1 y similar a tipo 1), dominio transmembrana (TM) y dominio citoplasmático corto, (semaforina) 5B, n.º de registro Genbank AB040878)

Nagase T., et ál (2000) DNA Res. 7 (2):143-150); WO2004000997 (reivindicación 1); WO2003003984 (reivindicación 1); WO200206339 (reivindicación 1; página 50); WO200188133 (reivindicación 1; página 41-43, 48-58); WO2003054152 (reivindicación 20); WO2003101400 (reivindicación 11);

Registro: Q9P283; EMBL; AB040878; BAA95969.1. Genew; HGNC:10737;

(8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008016Rik, ADNc RIKEN 2700050C12, gen de ADNc RIKEN 2700050C12, n.º de registro Genbank AY358628); Ross et ál (2002) Cancer Res. 62:2546-2553; US2003129192 (reivindicación 2); US2004044180 (reivindicación 12); US2004044179 (reivindicación 11); US2003096961 (reivindicación 11); US2003232056 (ejemplo 5); WO2003105758 (reivindicación 12); US2003206918 (ejemplo 5); EP1347046 (reivindicación 1); WO2003025148 (reivindicación 20);

Referencias cruzadas: GI:37182378; AAQ88991.1; AY358628_1

(9) ETBR (receptor de endotelina tipo B, n.º de registro Genbank AY275463);

Nakamuta M., et ál Biochem. Biophys. Res. Commun. 177, 34-39, 1991; Ogawa Y., et ál. Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 248-255, 1991; Arai H., et ál Jpn. Circ. J. 56, 1303-1307, 1992; Arai H., et ál J. Biol. Chem. 268, 3463-3470, 1993; Sakamoto A., Yanagisawa M., et ál Biochem. Biophys.

Res. Commun. 178, 656-663, 1991; Elshourbagy N.A., et ál J. Biol. Chem. 268, 3873-3879, 1993; Haendler B., et ál J. Cardiovasc. Pharmacol. 20, s1-S4, 1992; Tsutsumi M., et ál Gene 228, 43-49, 1999; Strausberg R.L., et ál Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 99, 16899-16903, 2002; Bourgeois C., et ál J. Clin. Endocrinol. Metab. 82, 3116-3123, 1997; Okamoto Y., et ál Biol. Chem. 272, 21589-21596, 1997; Verheij J.B., et ál Am. J. Med. Genet. 108, 223-225, 2002; Hofstra R.M.W., et ál Eur. J. Hum. Genet. 5, 180-185, 1997; Puffenberger E.G., et ál Cell 79, 1257-1266, 1994; Attie T., et ál, Hum. Mol. Genet. 4, 2407-2409, 1995; Auricchio A., et ál Hum. Mol. Genet. 5:351-354, 1996; Amiel J., et ál Hum. Mol. Genet. 5, 355-357, 1996; Hofstra R.M.W., et ál Nat. Genet. 12, 445-447, 1996; Svensson P.J., et ál Hum. Genet. 103, 145-148, 1998; Fuchs S., et ál Mol. Med. 7, 115-124, 2001; Pingault V., et ál (2002) Hum. Genet. 111, 198-206; WO2004045516 (reivindicación 1); WO2004048938 (ejemplo 2); WO2004040000 (reivindicación 151); WO2003087768 (reivindicación 1); WO2003016475 (reivindicación 1); WO2003016475 (reivindicación 1); WO200261087 (Fig 1); WO2003016494 (Fig 6); WO2003025138 (reivindicación 12; página 144); WO200198351 (reivindicación 1; páginas 124-125); EP522868 (reivindicación 8; Fig 2); WO200177172 (reivindicación 1; páginas 297-299); US2003109676; US6518404 (Fig 3); US5773223 (reivindicación 1a; Col 31-34); WO2004001004;

(10) MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315, n.º de registro de Genbank NM_017763);

WO2003104275 (reivindicación 1); WO2004046342 (ejemplo 2); WO2003042661 (reivindicación 12); WO2003083074 (reivindicación 14; página 61); WO2003018621 (reivindicación 1); WO2003024392 (reivindicación 2; Fig 93); WO200166689 (ejemplo 6);

Referencias cruzadas: LocusID:54894; NP_060233.2;

NM_017763_1

(11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen 1 asociado al cáncer de próstata, próstata 1 asociada al cáncer de próstata, antígeno epitelial prostática de seis transmembrana 2, proteína prostática de seis transmembranas, n.º de registro Genbank AF455138), Lab. Invest. 82 (11):1573-1582 (2002)); WO2003087306; US2003064397 (reivindicación 1; Fig 1); WO200272596 (reivindicación 13; páginas 54-55); WO200172962 (reivindicación 1; Fig 4B); WO2003104270 (reivindicación 11); WO2003104270 (reivindicación 16); US2004005598 (reivindicación 22); WO2003042661 (reivindicación 12); US2003060612 (reivindicación 12; Fig 10); WO200226822 (reivindicación 23; Fig 2); WO200216429 (reivindicación 12; Fig 10);

Referencias cruzadas: GI:22655488; AAN04080.1; AF455138_1

(12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, canal catiónico potencial de receptores transitorios, subfamilia M, miembro 4, n.º de registro Genbank NM_017636), Xu, X.Z., et ál Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 98 (19):10692-10697 (2001), Cell 109 (3):397-407 (2002), J. Biol. Chem. 278 (33):30813-30820 (2003)); US2003143557 (reivindicación 4); WO200040614 (reivindicación 14; páginas 100-103); WO200210382 (reivindicación 1; Fig 9A); WO2003042661 (reivindicación 12); WO200230268 (reivindicación 27; página 391); US2003219806 (reivindicación 4); WO200162794 (reivindicación 14; Fig 1A-D);

Referencias cruzadas: MIM:606936; NP_060106.2; NM_017636_1

(13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma, n.º de registro Genbank NP_003203 o NM_003212)

Ciccodicola, A., et ál EMBO J. 8 (7):1987-1991 (1989), Am. J. Hum. Genet. 49 (3):555-565 (1991)); US2003224411 (reivindicación 1); WO2003083041 (ejemplo 1); WO2003034984 (reivindicación 12); WO200288170 (reivindicación 2; páginas 52-53); WO2003024392 (reivindicación 2; Fig 58); WO200216413 (reivindicación 1; página 94-95, 105); WO200222808 (reivindicación 2; Fig 1); US5854399 (ejemplo 2; Col 17-18); US5792616 (Fig 2);

Referencias cruzadas: MIM:187395; NP_003203.1; NM_003212_1

(14) CD21 (CR2 (receptor de complemento 2) o C3DR (receptor de virus C3d/Epstein Barr) o Hs.73792 n.º de registro Genbank M26004)

Fujisaku et ál (1989) J. Biol. Chem. 264 (4):2118-2125); Weis J.J., et ál J. Exp. Med. 167, 1047-1066, 1988; Moore M., et ál Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 84, 9194-9198, 1987; Barel M., et ál Mol. Immunol. 35, 1025-1031, 1998; Weis J.J., et ál Proc. Natl. Acad. Sci. EUA. 83, 5639-5643, 1986; Sinha S.K., et ál (1993) J. Immunol. 150, 5311-5320; WO2004045520 (ejemplo 4); US2004005538 (ejemplo 1); WO2003062401 (reivindicación 9); WO2004045520 (ejemplo 4); WO9102536 (Fig 9.1-9.9); WO2004020595 (reivindicación 1);

Registro: P20023; Q13866; Q14212; EMBL; M26004; AAA35786.1.

(15) CD79b (CD79B, CD79 β , Igb (beta asociada con inmunoglobulina), B29, n.º de registro Genbank NM_000626 o 11038674)

Proc. Natl. Acad. Sci. EUA (2003) 100 (7):4126-4131, Blood (2002) 100 (9):3068-3076, Muller et ál (1992) Eur. J. Immunol. 22 (6):1621-1625); WO2004016225 (reivindicación 2, Fig 140); WO2003087768, US2004101874 (reivindicación 1, página 102); WO2003062401 (reivindicación 9); WO200278524 (ejemplo 2); US2002150573 (reivindicación 5, página 15); US5644033; WO2003048202 (reivindicación 1, páginas 306 y

309); WO 99/558658, US6534482 (reivindicación 13, Fig 17A/B); WO200055351 (reivindicación 11, páginas 1145-1146); Referencias cruzadas: MIM:147245; NP_000617.1; NM_000626_1

(16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (dominio SH2 que contiene proteína de anclaje fosfatasa 1a), SPAP1B, SPAP1C, n.º de registro de Genbank NM_030764, AY358130)

Genome Res. 13 (10):2265-2270 (2003), Immunogenetics 54 (2):87-95 (2002), Blood 99 (8):2662-2669 (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. EUA. 98 (17):9772-9777 (2001), Xu, M.J., et ál (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 280 (3):768-775; WO2004016225 (reivindicación 2); WO2003077836; WO200138490 (reivindicación 5; Fig 18D-1-18D-2); WO2003097803 (reivindicación 12); WO2003089624 (reivindicación 25);

Referencias cruzadas: MIM:606509; NP_110391.2; NM_030764_1

(17) HER2 (ErbB2, n.º de registro Genbank M11730)

Coussens L., et ál Science (1985) 230(4730):1132-1139; Yamamoto T., et ál Nature 319, 230-234, 1986; Semba K., et ál Proc. Natl. Acad. Sci. EUA. 82, 6497-6501, 1985; Swiercz J.M., et ál J. Cell Biol. 165, 869-880, 2004; Kuhns J.J., et ál J. Biol. Chem. 274, 36422-36427, 1999; Cho H.-S., et ál Nature 421, 756-760, 2003; Ehsani A., et ál (1993) Genomics 15, 426-429; WO2004048938 (ejemplo 2); WO2004027049 (Fig 1I); WO2004009622; WO2003081210; WO2003089904 (reivindicación 9); WO2003016475 (reivindicación 1); US2003118592; WO2003008537 (reivindicación 1); WO2003055439 (reivindicación 29; Fig 1A-B); WO2003025228 (reivindicación 37; Fig 5C); WO200222636 (ejemplo 13; páginas 95-107); WO200212341 (reivindicación 68; Fig 7); WO200213847 (páginas 71-74); WO200214503 (páginas 114-117); WO200153463 (reivindicación 2; páginas 41-46); WO200141787 (página 15); WO200044899 (reivindicación 52; Fig 7); WO200020579 (reivindicación 3; Fig 2); US5869445 (reivindicación 3; Col

31-38); WO9630514 (reivindicación 2; páginas 56-61); EP1439393 (reivindicación 7); WO2004043361 (reivindicación 7); WO2004022709; WO200100244 (ejemplo 3; Fig 4); Registro: P04626; EMBL; M11767; AAA35808.1. EMBL; M11761; AAA35808.1.

(18) NCA (CEACAM6, n.º de registro Genbank M18728); Barnett T., et ál Genomics 3, 59-66, 1988; Tawaragi Y., et ál Biochem. Biophys. Res. Commun. 150, 89-96, 1988; Strausberg R.L., et ál Proc. Natl. Acad. Sci. EUA. 99:16899-16903, 2002; WO2004063709; EP1439393 (reivindicación 7); WO2004044178 (ejemplo 4); WO2004031238; WO2003042661 (reivindicación 12); WO200278524 (ejemplo 2); WO200286443 (reivindicación 27; página 427); WO200260317 (reivindicación 2); Registro: P40199; Q14920; EMBL; M29541; AAA59915.1. EMBL; M18728;

(19) MDP (DPEP1, n.º de registro Genbank BC017023) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA. 99 (26):16899-16903 (2002)); WO2003016475 (reivindicación 1); WO200264798 (reivindicación 33; páginas 85-87); JP05003790 (Fig 6-8); WO9946284 (Fig 9); Referencias cruzadas: MIM:179780; AAH17023.1; BC017023_1

(20) IL20R α (IL20Ra, ZCYTOR7, n.º de registro Genbank AF184971); Clark H.F., et ál Genome Res. 13, 2265-2270, 2003; Mungall A.J., et ál Nature 425, 805-811, 2003; Blumberg H., et ál Cell 104, 9-19, 2001; Dumoutier L., et ál J. Immunol. 167, 3545-3549, 2001; Parrish-Novak J., et ál J. Biol. Chem. 277, 47517-47523, 2002; Pletnev S., et ál (2003) Biochemistry 42:12617-12624; Sheikh F., et ál (2004) J. Immunol. 172, 2006-2010; EP1394274 (ejemplo 11); US2004005320 (ejemplo 5); WO2003029262 (páginas 74-75); WO2003002717 (reivindicación

2; página 63); WO200222153 (páginas 45-47); US2002042366 (páginas 20-21); WO200146261 (páginas 57-59); WO200146232 (páginas 63-65); WO9837193 (reivindicación 1; páginas 55-59);

Registro: Q9UHF4; Q6UWA9; Q96SH8; EMBL; AF184971; AAF01320.1.

(21) Brevican (BCAN, BEHAB, n.º de registro Genbank AF229053) Gary S.C., et ál Gene 256, 139-147, 2000; Clark H.F., et ál Genome Res. 13, 2265-2270, 2003; Strausberg R.L., et ál Proc. Natl. Acad. Sci. EUA. 99, 16899-16903, 2002; US2003186372 (reivindicación 11); US2003186373 (reivindicación 11); US2003119131 (reivindicación 1; Fig 52); US2003119122 (reivindicación 1; Fig 52); US2003119126 (reivindicación 1); US2003119121 (reivindicación 1; Fig 52); US2003119129 (reivindicación 1); US2003119130 (reivindicación 1); US2003119128 (reivindicación 1; Fig 52); US2003119125 (reivindicación 1); WO2003016475 (reivindicación 1); WO200202634 (reivindicación 1);

(22) EphB2R (DRT, ERK, Hek5, EPHT3, Tyro5, n.º de registro Genbank NM_004442)

Chan, J. y Watt, V.M., Oncogene 6 (6), 1057-1061 (1991) Oncogene 10 (5):897-905 (1995), Annu. Rev. Neurosci. 21:309-345 (1998), Int. Rev. Cytol. 196:177-244 (2000)); WO2003042661 (reivindicación 12); WO200053216 (reivindicación 1; página 41); WO2004065576 (reivindicación 1); WO2004020583 (reivindicación 9); WO2003004529 (página 128-132); WO200053216 (reivindicación 1; página 42);

Referencias cruzadas: MIM:600997; NP_004433.2; NM_004442_1

(23) ASLG659 (B7h, n.º de registro Genbank AX092328)

US20040101899 (reivindicación 2); WO2003104399 (reivindicación 11); WO2004000221 (Fig 3); US2003165504

(reivindicación 1); US2003124140 (ejemplo 2); US2003065143 (Fig 60); WO2002102235 (reivindicación 13; página 299); US2003091580 (ejemplo 2); WO200210187 (reivindicación 6; Fig 10); WO200194641 (reivindicación 12; Fig 7b); WO200202624 (reivindicación 13; Fig 1A-1B); US2002034749 (reivindicación 54; páginas 45-46); WO200206317 (ejemplo 2; páginas 320-321, reivindicación 34; página 321-322); WO200271928 (páginas 468-469); WO200202587 (ejemplo 1; Fig 1); WO200140269 (ejemplo 3; páginas 190-192); WO200036107 (ejemplo 2; páginas 205-207); WO2004053079 (reivindicación 12); WO2003004989 (reivindicación 1); WO200271928 (páginas 233-234, 452-453); WO 0116318;

(24) PSCA (precursor antigénico de células madre prostática, n.º de registro de Genbank AJ297436)

Reiter R.E., et ál Proc. Natl. Acad. Sci. EUA. 95, 1735-1740, 1998; Gu Z., et ál Oncogene 19, 1288-1296, 2000; Biochem. Biophys. Res. Commun. (2000) 275(3):783-788; WO2004022709; EP1394274 (ejemplo 11); US2004018553 (reivindicación 17); WO2003008537 (reivindicación 1); WO200281646 (reivindicación 1; página 164); WO2003003906 (reivindicación 10; página 288); WO200140309 (ejemplo 1; Fig 17); US2001055751 (ejemplo 1; Fig 1b); WO200032752 (reivindicación 18; Fig 1); WO9851805 (reivindicación 17; página 97); WO9851824 (reivindicación 10; página 94); WO9840403 (reivindicación 2; Fig 1B);
Registro: O43653; EMBL; AF043498; AAC39607.1.

(25) GEDA (n.º de registro Genbank AY260763);

AAP14954 proteína similar a compañero de fusión de lipoma HMGIC /pid=AAP14954.1 - Homo sapiens

Especie: Homo sapiens (humano)

WO2003054152 (reivindicación 20); WO2003000842 (reivindicación 1); WO2003023013 (ejemplo 3, reivindicación

20); US2003194704 (reivindicación 45);

Referencias cruzadas: GI:30102449; AAP14954.1; AY260763_1

(26) BAFF-R (receptor del factor de activación de linfocitos B, receptor BLyS 3, BR3, n.º de registro Genbank AF116456); receptor BAFF /pid=NP_443177.1 - Homo sapiens Thompson, J.S., et ál Science 293 (5537), 2108-2111 (2001); WO2004058309; WO2004011611; WO2003045422 (ejemplo; páginas 32-33); WO2003014294 (reivindicación 35; Fig 6B); WO2003035846 (reivindicación 70; páginas 615-616); WO200294852 (Col 136-137); WO200238766 (reivindicación 3; página 133); WO200224909 (ejemplo 3; Fig 3);

Referencias cruzadas: MIM:606269; NP_443177.1; NM_052945_1; AF132600

(27) CD22 (isoforma CD22-B del receptor de linfocitos B, BL-CAM, Lyb-8, Lyb8, SIGLEC-2, FLJ22814, n.º de registro Genbank AK026467);

Wilson et ál (1991) J. Exp. Med. 173:137-146; WO2003072036 (reivindicación 1; Fig 1);

Referencias cruzadas: MIM:107266; NP_001762.1; NM_001771_1

(28) CD79a (CD79A, CD79 α , alfa asociada con inmunoglobulina, una proteína específica de linfocitos B que interactúa de forma covalente con Ig beta (CD79B) y forma un complejo en la superficie con moléculas de Ig M, transduce una señal implicada en la diferenciación de linfocitos B), pI: 4.84, MW: 25028 TM: cromosoma del gen 2 [P]: 19q13.2, n.º de registro Genbank NP_001774.10)

WO2003088808, US20030228319; WO2003062401 (reivindicación 9); US2002150573 (reivindicación 4, páginas 13-14); WO9958658 (reivindicación 13, Fig 16); WO9207574 (Fig 1); US5644033; Ha et ál (1992) J. Immunol. 148(5):1526-1531; Mueller et ál (1992) Eur. J. Biochem. 22:1621-1625; Hashimoto

et ál (1994) Immunogenetics 40(4):287-295; Preud'homme et ál (1992) Clin. Exp. Immunol. 90(1):141-146; Yu et ál (1992) J. Immunol. 148(2) 633-637; Sakaguchi et ál (1988) EMBO J. 7(11):3457-3464;

(29) CXCR5 (receptor de linfoma de Burkitt 1, un receptor acoplado a la proteína G que se activa mediante la quimiocina CXCL13, funciona en la migración de linfocitos y la defensa humoral, participa en la infección por HIV-2 y quizás el desarrollo del SIDA, linfoma, mieloma y leucemia); 372 aa, pI: 8,54 MW: 41959 TM: cromosoma del gen 7 [P]: 11q23.3, n.º de registro Genbank NP_001707.1)

WO2004040000; WO2004015426; US2003105292 (ejemplo 2); US6555339 (ejemplo 2); WO200261087 (Fig 1); WO200157188 (reivindicación 20, página 269); WO200172830 (páginas 12-13); WO200022129 (ejemplo 1, páginas 152-153, ejemplo 2, páginas 254-256); WO9928468 (reivindicación 1, página 38); US5440021 (ejemplo 2, col 49-52); WO9428931 (páginas 56-58); WO9217497 (reivindicación 7, Fig 5); Dobner et ál (1992) Eur. J. Immunol. 22:2795-2799; Barella et ál (1995) Biochem. J. 309:773-779;

(30) HLA-DOB (subunidad beta de molécula de MHC clase II (antígeno Ia) que une péptidos y los presenta a los linfocitos T CD4+); 273 aa, pI: 6,56 MW: 30820 TM: cromosoma del gen 1 [P]: 6p21.3, n.º de registro Genbank NP_002111.1) Tonnellet et ál (1985) EMBO J. 4(11):2839-2847; Jonsson et ál (1989) Immunogenetics 29(6):411-413; Beck et ál (1992) J. Mol. Biol. 228:433-441; Strausberg et ál (2002) Proc. Natl. Acad. Sci USA 99:16899-16903; Serenius et ál (1987) J. Biol. Chem. 262:8759-8766; Beck et ál (1996) J. Mol. Biol. 255:1-13; Naruse et ál (2002) Tissue Antigens 59:512-519; WO9958658 (reivindicación 13, Fig 15); US6153408 (Col 35-38); US5976551 (col 168-170); US6011146 (col 145-146); Kasahara

et ál (1989) Immunogenetics 30(1):66-68; Larhammar et ál (1985) J. Biol. Chem. 260(26):14111-14119.

(31) P2X5 (receptor purinérgico P2X del canal de iones regulado por ligandos 5, un canal de iones regulado por ATP extracelular puede estar implicado en la transmisión sináptica y la neurogénesis, la deficiencia puede contribuir a la patofisiología de la inestabilidad del detrusor idiopático); 422 aa), pI: 7,63, MW: 47206 TM: cromosoma del gen 1 [P]: 17p13.3, n.º de registro Genbank NP_002552.2) Le et ál (1997) FEBS Lett. 418(1-2):195-199; WO2004047749; WO2003072035 (reivindicación 10); Touchman et ál (2000) Genome Res. 10:165-173; WO200222660 (reivindicación 20); WO2003093444 (reivindicación 1); WO2003087768 (reivindicación 1); WO2003029277 (página 82);

(32) CD72 (antígeno de diferenciación de linfocitos B CD72, Lyb-2) SECUENCIA DE PROTEÍNA Resto completo...tafrfpd (1..359; 359 aa), pI: 8,66, MW: 40225 TM: cromosoma del gen 1 [P]: 9p13.3, n.º de registro Genbank NP_001773.1) WO2004042346 (reivindicación 65); WO2003026493 (páginas 51-52, 57-58); WO200075655 (páginas 105-106); Von Hoegen et ál (1990) J. Immunol. 144(12):4870-4877; Strausberg et ál (2002) Proc. Natl. Acad. Sci EUA 99:16899-16903;

(33) LY64 (antígeno de linfocito 64 (RP105), proteína de membrana tipo I de la familia de repetición rica en leucina (LRR, por su sigla en inglés), regula la activación y apoptosis de linfocitos B, la pérdida de función se encuentra asociada al aumento de actividad de la enfermedad en pacientes con lupus eritematoso sistémico); 661 aa, pI: 6,20, MW: 74147 TM: cromosoma del gen 1 [P]: 5q12, n.º de registro Genbank NP_005573.1) US2002193567; WO9707198 (reivindicación 11, páginas 39-42);

Miura et ál (1996) Genomics 38(3):299-304; Miura et ál (1998) Blood 92:2815-2822; WO2003083047; WO9744452 (reivindicación 8, páginas 57-61); WO200012130 (páginas 24-26);

(34) FcRH1 (proteína similar al receptor Fc 1, un receptor putativo para el dominio Fc de inmunoglobulina con dominios ITAM y similares a Ig de tipo C2, puede participar en la diferenciación de linfocitos B); 429 aa, pI: 5,28, MW: 46925 TM: cromosoma del gen 1 [P]: 1q21-1q22, n.º de registro Genbank NP_443170.1)

WO2003077836; WO200138490 (reivindicación 6, Fig 18E-1-18-E-2); Davis et ál (2001) Proc. Natl. Acad. Sci EUA 98(17):9772-9777; WO2003089624 (reivindicación 8); EP1347046 (reivindicación 1); WO2003089624 (reivindicación 7);

(35) IRTA2 (traslocación del receptor de la superfamilia de inmunoglobulinas asociada 2, un inmunorreceptor putativo con posibles funciones en el desarrollo de linfocitos B y linfomagénesis; se produce desregulación del gen mediante translocación en algunas neoplasias malignas de linfocitos B); 977 aa, pI: 6,88 MW: 106468 TM: cromosoma del gen 1 [P]: 1q21, n.º de registro Genbank humano:AF343662, AF343663, AF343664, AF343665, AF369794, AF397453, AK090423, AK090475, AL834187, AY358085; ratón:AK089756, AY158090, AY506558; NP_112571.1

WO2003024392 (reivindicación 2, Fig 97); Nakayama et ál (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 277(1):124-127; WO2003077836; WO200138490 (reivindicación 3, Fig 18B-1-18B-2);

(36) TENB2 (TMEFF2, tomorregulina, TPEF, HPP1, TR, proteoglicano de transmembrana putativa vinculado con la familia de EGF/herregulina de factores de crecimiento y folistatina); 374 aa, registro de NCBI: AAD55776, AAF91397,

AAG49451, NCBI RefSeq: NP_057276; gen de NCBI: 23671; OMIM: 605734; SwissProt Q9UIK5; n.º de registro Genbank AF179274; AY358907, CAF85723, CQ782436

WO2004074320 (SEQ ID NO 810); JP2004113151 (SEQ ID NOS 2, 4, 8); WO2003042661 (SEQ ID NO 580); WO2003009814 (SEQ ID NO 411); EP1295944 (páginas 69-70); WO200230268 (página 329); WO200190304 (SEQ ID NO 2706); US2004249130; US2004022727; WO2004063355; US2004197325; US2003232350; US2004005563; US2003124579; Horie et ál (2000) Genomics 67:146-152; Uchida et ál (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 266:593-602; Liang et ál (2000) Cancer Res. 60:4907-12; Glynne-Jones et ál (2001) Int J Cancer. Oct 15;94(2):178-84;

(37) PMEL17 (homólogo de plata; SILV; D12S53E; PMEL17; SI; SIL); ME20; gp100) BC001414; BT007202; M32295; M77348; NM_006928; McGlinchey, R.P. et ál (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA. 106 (33), 13731-13736; Kummer, M.P. et ál (2009) J. Biol. Chem. 284 (4), 2296-2306.

(38) TMEFF1 (proteína de transmembrana con dominios similares a EGF y dos dominios similares a folistatina 1; Tomorregulina-1; H7365; C9orf2; C9ORF2; U19878; X83961) NM_080655; NM_003692; Harms, P.W. (2003) Genes Dev. 17 (21), 2624-2629; Gery, S. et ál (2003) Oncogene 22 (18):2723-2727;

(39) GDNF-Ra1 (receptor de la familia de GDNF alfa 1; GFRA1; GDNFR; GDNFRA; RETL1; TRNR1; RET1L; GDNFR-alfa1; GFR-ALPHA-1; U95847; BC014962; NM_145793) NM_005264; Kim, M.H. et ál (2009) Mol. Cell. Biol. 29 (8), 2264-2277; Treanor, J.J. et ál (1996) Nature 382 (6586):80-83;

(40) Ly6E (complejo de antígeno linfocítico 6, locus E; Ly67, RIG-E, SCA-2, TSA-1) NP_002337.1; NM_002346.2; de Nooij-van Dalen, A.G. et ál (2003) Int. J. Cancer 103 (6), 768-

774; Zammit, D.J. et ál (2002) Mol. Cell. Biol. 22 (3):946-952; WO 2013/17705;

(41) TMEM46 (homólogo de shisa 2 (*Xenopus laevis*); SHISA2) NP_001007539.1; NM_001007538.1; Furushima, K. et ál (2007) Dev. Biol. 306 (2), 480-492; Clark, H.F. et ál (2003) Genome Res. 13 (10):2265-2270;

(42) Ly6G6D (complejo de antígeno linfocítico 6, locus G6D; Ly6-D, MEGT1) NP_067079.2; NM_021246.2; Mallya, M. et ál (2002) Genomics 80 (1):113-123; Ribas, G. et ál (1999) J. Immunol. 163 (1):278-287;

(43) LGR5 (receptor acoplado a la proteína G que contiene repeticiones ricas en leucina 5; GPR49, GPR67) NP_003658.1; NM_003667.2; Salanti, G. et ál (2009) Am. J. Epidemiol. 170 (5):537-545; Yamamoto, Y. et ál (2003) Hepatology 37 (3):528-533;

(44) RET (protooncogén ret; MEN2A; HSCR1; MEN2B; MTC1; PTC; CDHF12; Hs.168114; RET51; RET-ELE1) NP_066124.1; NM_020975.4; Tsukamoto, H. et ál (2009) Cancer Sci. 100 (10):1895-1901; Narita, N. et ál (2009) Oncogene 28 (34):3058-3068;

(45) LY6K (complejo de antígeno linfocítico 6, locus K; LY6K; HSJ001348; FLJ35226) NP_059997.3; NM_017527.3; Ishikawa, N. et ál (2007) Cancer Res. 67 (24):11601-11611; de Nooij-van Dalen, A.G. et ál (2003) Int. J. Cancer 103 (6):768-774;

(46) GPR19 (receptor acoplado a la proteína G 19; Mm.4787) NP_006134.1; NM_006143.2; Montpetit, A. y Sinnett, D. (1999) Hum. Genet. 105 (1-2):162-164; O'Dowd, B.F. et ál (1996) FEBS Lett. 394 (3):325-329;

(47) GPR54 (receptor KISS1; KISS1R; GPR54; HOT7T175; AXOR12) NP_115940.2; NM_032551.4; Navenot, J.M. et ál (2009) *Mol. Pharmacol.* 75 (6):1300-1306; Hata, K. et ál (2009) *Anticancer Res.* 29 (2):617-623;

(48) ASPHD1 (dominio de aspartato beta hidroxilasa con 1; LOC253982) NP_859069.2; NM_181718.3; Gerhard, D.S. et ál (2004) *Genome Res.* 14 (10B):2121-2127;

(49) Tirosinasa (TYR; OCA1A; OCA1A; tirosinasa; SHEP3) NP_000363.1; NM_000372.4; Bishop, D.T. et ál (2009) *Nat. Genet.* 41 (8):920-925; Nan, H. et ál (2009) *Int. J. Cancer* 125 (4):909-917;

(50) TMEM118 (proteína anular, transmembrana 2; RNFT2; FLJ14627) NP_001103373.1; NM_001109903.1; Clark, H.F. et ál (2003) *Genome Res.* 13 (10):2265-2270; Scherer, S.E. et ál (2006) *Nature* 440 (7082):346-351

(51) GPR172A (receptor acoplado a la proteína G 172A; GPCR41; FLJ11856; D15Ertd747e) NP_078807.1; NM_024531.3; Ericsson, T.A. et ál (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA.* 100 (11):6759-6764; Takeda, S. et ál (2002) *FEBS Lett.* 520 (1-3):97-101.

(52) CD33, un miembro de la unión de ácido siálico, familia de lectina tipo inmunoglobulina, es una proteína transmembrana glicosilada de 67-kDa. CD33 se expresa en la mayoría de las células leucémicas mieloides y monocíticas, además de células progenitoras eritroides y mielomonocíticas comprometidas. No se observa en células madre pluripotentes más tempranas, granulocitos maduros, células linfoides o células no hematopoyéticas (Sabbath et al., (1985) *J. Clin. Invest.* 75:756-56; Andrews et ál., (1986) *Blood* 68:1030-5).

CD33 contiene dos residuos de tirosina en su cola citoplásmica, cada uno de los cuales está seguido por residuos hidrofóbicos similares al motivo inhibidor de inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM, por su sigla en inglés) que se observa en diversos receptores inhibitorios.

(53) CLL-1 (CLEC12A, MICL y DCAL2) codifica un miembro de la superfamilia del dominio de lectina tipo C/tipo lectina tipo C (CTL/CTLD, por su sigla en inglés). Los miembros de esta familia comparten un plegamiento proteico común y tienen diversas funciones, como adhesión celular, señalización entre células, recambio de glicoproteína e incidencias en la inflamación y la respuesta inmunitaria. La proteína codificada por este gen es un regulador negativo de la función de granulocitos y monocitos. Se han descrito diversas variantes de transcripción con corte y empalme alternativo de este gen, pero no se ha determinado la naturaleza completa de algunas de estas variantes. Este gen tiene un vínculo estrecho con otros miembros de la superfamilia CTL/CTLD en la región del complejo de gen citolítico natural en el cromosoma 12p13 (Drickamer K (1999) Curr. Opin. Struct. Biol. 9 (5):585-90; van Rhenen A, et ál., (2007) Blood 110 (7):2659-66; Chen CH, et ál. (2006) Blood 107 (4):1459-67; Marshall AS, et ál. (2006) Eur. J. Immunol. 36 (8):2159-69; Bakker AB, et ál (2005) Cancer Res. 64 (22):8443-50; Marshall AS, et ál (2004) J. Biol. Chem. 279 (15):14792-802). Se ha demostrado que CLL-1 es un receptor transmembrana tipo II que comprende un único dominio tipo lectina tipo C (que no se prevé que enlace calcio o azúcar), una región de tallo, un dominio transmembrana y una cola citoplásmica corta con un motivo ITIM.

Anticuerpos anti-CD22

En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD22 de

ADC en las Tablas 3A y 3B comprenden tres regiones hipervariables de cadena ligera (HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3) y tres regiones hipervariables de cadena pesada (HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3), de acuerdo con US 8226945:

HVR-L1	RSSQSIVHSVGNTFLE	(SEQ ID NO:1)
HVR-L2	KVSNRFS	(SEQ ID NO:2)
HVR-L3	FQGSQFPYT	(SEQ ID NO:3)
HVR-H1	GYEFSRSWMN	(SEQ ID NO:4)
HVR-H2	GRIYPGDGDTNYSKGKFG	(SEQ ID NO:5)
HVR-H3	DGSSWDWYFDV	(SEQ ID NO:6)

Anticuerpos anti-Ly6E

En determinadas modalidades, los ADC de las Tablas 3A y 3B comprenden anticuerpos anti-Ly6E. El locus E del complejo del antígeno 6 linfocítico (Ly6E), también conocido como gen E inducido por ácido retinoico (RIG-E) y antígeno 2 de células madre (SCA-2). Es una proteína unida a GPI, de 131 aminoácidos de longitud y ~8,4 kDa de función desconocida, sin compañeros de unión conocidos. Se identificó inicialmente como una transcripción expresada en timocitos inmaduros, células epiteliales medulares tímicas en ratones (Mao, et ál. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*. 93:5910-5914). En algunas modalidades, la invención proporciona un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo anti-Ly6E descrito en la publicación PCT n.º WO 2013/177055.

En algunas modalidades, la invención proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo anti-Ly6E con al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13, (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la

SEQ ID NO: 14, (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.

En un aspecto, la invención proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo con al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR VH seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14. En otra modalidad, el anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14.

En otro aspecto, la invención proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo con al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR VL seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11. En una modalidad, el anticuerpo comprende (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.

En otro aspecto, un conjugado de anticuerpo-fármaco de la invención comprende un anticuerpo con (a) un dominio VH que

comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR VH seleccionadas de (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 14 y (b) un dominio VL que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VL que se seleccionan de (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.

En otro aspecto, la invención proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo con (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13, (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14, (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.

En cualquiera de las modalidades que anteceden, se humaniza un anticuerpo anti-Ly6E de un conjugado de anticuerpo-fármaco. En una modalidad, un anticuerpo anti-Ly6E comprende HVR en cualquiera de las modalidades anteriores y comprende adicionalmente un marco aceptor humano, p. ej., un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-Ly6E del conjugado de anticuerpo-fármaco comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada (VH) con al menos 90 %, 91 %, 92

%, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8. En determinadas modalidades, una secuencia de VH con al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:8 contiene sustituciones (p. ej., sustituciones conservadoras), inserciones o eliminaciones respecto de la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-Ly6E que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse a Ly6E. En determinadas modalidades, se sustituyó, insertó y/o eliminó un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 8. En determinadas modalidades, se sustituyó, se insertó y/o se eliminó un total de 1 a 5 aminoácidos en la SEQ ID NO: 8. En determinadas modalidades, las sustituciones, inserciones o eliminaciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-Ly6E comprende la secuencia de VH de la SEQ ID NO: 8 que incluye modificaciones postraducción de esa secuencia. En una modalidad particular, el VH comprende una, dos o tres HVR que se seleccionan de: (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14.

En otro aspecto, se proporciona anticuerpo anti-Ly6E de un conjugado de anticuerpo-fármaco, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7. En determinadas modalidades, una secuencia de VL con al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:7 contiene

sustituciones (p. ej., sustituciones conservadoras), inserciones o eliminaciones respecto de la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-Ly6E que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse a Ly6E. En determinadas modalidades, se sustituyó, se insertó y/o se eliminó un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 7. En determinadas modalidades, se sustituyó, se insertó y/o se eliminó un total de 1 a 5 aminoácidos en la SEQ ID NO: 7. En determinadas modalidades, las sustituciones, inserciones o eliminaciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-Ly6E comprende la secuencia de VL de la SEQ ID NO: 7 que incluye modificaciones postraducción de esa secuencia. En una modalidad particular, el VL comprende una, dos o tres HVR que se seleccionan de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.

En otro aspecto, se proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo anti-Ly6E, en el que el anticuerpo comprende un VH tal como se describió en cualquiera de las modalidades anteriores y un VL tal como se describió en cualquiera de las modalidades anteriores.

En una modalidad, se proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco, en el que el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en la SEQ ID NO: 8 y la SEQ ID NO: 7, respectivamente, que incluye las modificaciones postraducción de esas secuencias.

En un aspecto adicional, en la presente se proporcionan conjugados de anticuerpo-fármaco que comprenden anticuerpos

que se unen al mismo epítopo que un anticuerpo anti-Ly6E proporcionado en la presente. Por ejemplo, en determinadas modalidades, se proporciona un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo que se une al mismo epítopo que un anticuerpo anti-Ly6E que comprende una secuencia de VH de la SEQ ID NO: 8 y una secuencia de VL de la SEQ ID NO: 7, respectivamente.

En un aspecto adicional de la invención, un anticuerpo anti-Ly6E de un conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquier de las modalidades que anteceden es un anticuerpo monoclonal, incluido un anticuerpo humano. En una modalidad, un anticuerpo anti-Ly6E de un conjugado de anticuerpo-fármaco es un fragmento de anticuerpo, p. ej., un Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo o fragmento F(ab')₂. En otra modalidad, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud sustancialmente completa, p. ej., un anticuerpo de IgG1, un anticuerpo de IgG2a u otra clase o isotipo de anticuerpo como se define en la presente. En algunas modalidades, un inmunoconjugado (ADC) comprende un anticuerpo anti-Ly6E que comprende una cadena pesada y una cadena ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 16 y 15, respectivamente.

Tabla de secuencias de anticuerpo Ly6E

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
7	región variable de cadena ligera v12 de anticuerpo anti-Ly6E hu9B12	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQGIS NYLNWYQQKP GKTVKLLIYY TSNLHSGVPS RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSELPWTFGQ GTKVEIK

8	región variable de cadena pesada v12 de anticuerpo anti-Ly6E hu9B12	EVQLVESGPA LVKPTQTLTL TCTVSGFSLT GYSVNWIRQPPGKAL EWLGMWGDG STDYNSALKS RLTISKDTSK NQVVLMTNM DPVDTATYYC ARDYYFNYAS WFAYWGQGTLL VTVSS
9	HVR-L1 v12 de anticuerpo anti-Ly6E hu9B12	SASQGISNYLN
10	HVR-L2 v12 de anticuerpo anti-Ly6E hu9B12	YTSNLHS
11	HVR-L3 v12 de anticuerpo anti-Ly6E hu9B12	QQYSELPWT
12	HVR-H1 v12 de anticuerpo anti-Ly6E hu9B12	GFSLTGYSVN

	anticuerpo anti-Ly6E hu9B12	
14	HVR-H3 v12 de anticuerpo anti-Ly6E hu9B12	DYYVNYASWFAY
15	cadena ligera kappa K149C v12 de anticuerpo anti-Ly6E hu9B12	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQGIS NYLNWYQQKP GKTVKLLIYY TSNLHSGVPS RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSELPWTFGQ GTKVEIK RTVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVCLLN FYPREAKVQW CVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC

16	cadena pesada de IgG1 v12 de anticuerpo anti-Ly6E hu9B12	EVQLVESGPA	LVKPTQTLTL	TCTVSGFSLT
		GYSVNWIRQP		
		PGKALEWLGM	IWGDGSTDYN	SALKSRLTIS
		KDTSKNQVVL		
		TMTNMDPVDT	ATYYCARDYY	FNYASWFAYW
		GQGTLVTVSS		
		ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK
		DYFPEPVTVS		
		WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	GLYSLSSVVT
		VPSSSLGTQT		
		YICNVNHKPS	NTKVDDKKVEP	KSCDKTHTCP
		PCPAPELLGG		
		PSVFLFPPKP	KDTLMIS RTP	EVTCVVVDVS
		HEDPEVKFNW		
		YVDGVEVHNA	KTKPREEQYN	STYRVVSVLT
		VLHQDWLNGK		
		EYKCKVSNKA	LPAPIEKTIS	KAKGQPREPQ
		VYTLPPSREE		
		MTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP
		ENNYKTTPPV		
		LDSDGSFFLY	SKLTVDKSRW	QQGNVFSCSV
		MHEALHNHYT		
		QKSLSLSPGK		

Anticuerpos anti-HER2

En determinadas modalidades, los ADC de las Tablas 3A y 3B comprenden anticuerpos anti-HER2. En una modalidad de la invención, un anticuerpo anti-HER2 de un ADC de la invención comprende un anticuerpo anti-HER2 humanizado, p. ej., huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 y huMAb4D5-8, como se describe en la Tabla 3 de US 5821337, que se incorpora específicamente a la presente mediante esta referencia. Dichos anticuerpos contienen regiones marco humanas con las regiones determinantes de complementariedad de un anticuerpo murino (4D5) que se une a HER2. El anticuerpo humanizado huMAb4D5-8 también se indica como trastuzumab y se encuentra comercialmente disponible con la marca HERCEPTIN®. En otra modalidad de la invención, un anticuerpo anti-HER2 de un ADC de la invención comprende un anticuerpo anti-HER2

humanizado, p. ej., 2C4 humanizado, como se describe en US7862817. Un ejemplo de anticuerpo 2C4 humanizado es pertuzumab, comercialmente disponible con la marca PERJETA®.

En otra modalidad de la invención, un anticuerpo anti-HER2 de un ADC de la invención comprende un anticuerpo anti-HER2 7C2 humanizado. Un anticuerpo 7C2 humanizado es un anticuerpo anti-HER2.

En algunas modalidades, la invención proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo anti-HER2 con al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 23, 27 o 28, (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 24 o 29, (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19, (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21. En algunas modalidades, la invención proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo anti-HER2 con al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23, (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24, (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19, (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21.

En un aspecto, la invención proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo con al menos

una, al menos dos o las tres secuencias de HVR VH seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 23, 27 o 28 y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 24 o 29. En un aspecto, la invención proporciona un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo con al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR VH seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23 y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24. En otra modalidad, el anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 23, 27 o 28 y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 24 o 29. En otra modalidad, el anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23 y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24.

En otro aspecto, la invención proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo con al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR VL seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19, (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21. En una modalidad, el anticuerpo comprende (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19, (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de

aminoácidos de la SEQ ID NO: 21.

En otro aspecto, un conjugado de anticuerpo-fármaco de la invención comprende un anticuerpo con (a) un dominio VH que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR VH seleccionadas de (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 23, 27 o 28 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona de las SEQ ID NO: 24 o 29 y (b) un dominio VL que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VL que se seleccionan de (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21. En otro aspecto, un conjugado de anticuerpo-fármaco de la invención comprende un anticuerpo con (a) un dominio VH que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR VH seleccionadas de (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 24 y (b) un dominio VL que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VL que se seleccionan de (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21.

En otro aspecto, la invención proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo con (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID

NO: 22, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23, 27 o 28, (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 24 o 29, (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19, (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21. En otro aspecto, la invención proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo con (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23, (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24, (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19, (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21.

En cualquiera de las modalidades que anteceden, se humaniza un anticuerpo anti-HER2 de un conjugado de anticuerpo-fármaco. En una modalidad, un anticuerpo anti-HER2 de un conjugado de anticuerpo-fármaco comprende HVR en cualquiera de las modalidades anteriores y comprende adicionalmente un marco aceptor humano, p. ej., un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-HER2 del conjugado de anticuerpo-fármaco comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada (VH) con al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18. En determinadas modalidades, una secuencia de VH que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con

respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 contiene sustituciones (p. ej., sustituciones conservadoras), inserciones o eliminaciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-HER2 que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse a HER2. En determinadas modalidades, se sustituyó, se insertó y/o se eliminó un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 18. En determinadas modalidades, se sustituyó, se insertó y/o se eliminó un total de 1 a 5 aminoácidos en la SEQ ID NO: 18. En determinadas modalidades, las sustituciones, inserciones o eliminaciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-HER2 comprende la secuencia de VH de la SEQ ID NO: 18 que incluye modificaciones postraducción de esa secuencia. En una modalidad particular, el VH comprende una, dos o tres HVR que se seleccionan de: (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23 y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24.

En otro aspecto, se proporciona anticuerpo anti-HER2 de un conjugado de anticuerpo-fármaco, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17. En determinadas modalidades, una secuencia de VL que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17 contiene sustituciones (p. ej., sustituciones conservadoras), inserciones o eliminaciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-HER2 que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse a

HER2. En determinadas modalidades, se sustituyó, se insertó y/o se eliminó un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 17. En determinadas modalidades, se sustituyó, se insertó y/o se eliminó un total de 1 a 5 aminoácidos en la SEQ ID NO: 17. En determinadas modalidades, las sustituciones, inserciones o eliminaciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-HER2 comprende la secuencia de VL de la SEQ ID NO: 17 que incluye modificaciones postraducción de esa secuencia. En una modalidad particular, el VL comprende una, dos o tres HVR que se seleccionan de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19, (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21.

En otro aspecto, se proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo anti-HER2, en el que el anticuerpo comprende un VH tal como se describió en cualquiera de las modalidades anteriores y un VL tal como se describió en cualquiera de las modalidades anteriores.

En una modalidad, se proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo, en el que el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en la SEQ ID NO: 18 y la SEQ ID NO: 17, respectivamente, que incluye las modificaciones postraducción de esas secuencias.

En una modalidad, se proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo, en el que el anticuerpo comprende la secuencia de cadena ligera kappa K149C de 7C2.v2.2.LA humanizado (hu7C2) de la SEQ ID NO: 30

En una modalidad, se proporciona un conjugado de anticuerpo-

fármaco que comprende un anticuerpo, en el que el anticuerpo comprende la secuencia de cadena pesada de IgG1 A118C de Hu7C2 de la SEQ ID NO: 31

En un aspecto adicional, en la presente se proporcionan conjugados de anticuerpo-fármaco que comprenden anticuerpos que se unen al mismo epítipo que un anticuerpo anti-HER2 proporcionado en la presente. Por ejemplo, en determinadas modalidades, se proporciona un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo anti-HER2 que comprende una secuencia de VH de la SEQ ID NO: 18 y una secuencia de VL de la SEQ ID NO: 17, respectivamente.

En un aspecto adicional de la invención, un anticuerpo anti-HER2 de un conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquier de las modalidades que anteceden es un anticuerpo monoclonal, incluido un anticuerpo humano. En una modalidad, un anticuerpo anti-HER2 de un inmunoconjugado es un fragmento de anticuerpo, p. ej., un Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo o fragmento F(ab')₂. En otra modalidad, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo que es un anticuerpo de longitud sustancialmente completa, p. ej., un anticuerpo de IgG1, un anticuerpo de IgG2a u otra clase o isotipo de anticuerpo como se define en la presente.

Tabla de secuencias de anticuerpo anti-HER2 7C2 humanizado

SEQ. ID NO:	Descripción	Secuencia		
17	Región variable de cadena ligera de 7C2.v2.2.LA humanizado («hu7C2»)	DIVMTQSPDS GSRFTYMHY GVPDRFSGSG YCQHSWEIPP	LAVSLGERAT QQKPGQPPKL SGTDFTLTIS WTFGQGTKVE	INCRASQSVS LIKYASILES SLQAEDVAVY IK
18	Región variable de cadena pesada de 7C2.v2.2.LA humanizado («hu7C2»)	EVQLVQSGAE GYWMNWVRQA NQKFRDRVTI TAVYYCARGT	VKKPGASVKV PGQGLEWIGM TVDTSTSTAY YDGGFEYWGQ	SCKASGYSFT IHPLDAEIRA LELSSLRSED GTLVTVSS
19	HVR-L1 de hu7C2	RASQSVSGSRFTYMH		
20	HVR-L2 de hu7C2	YASILES		
21	HVR-L3 de hu7C2	QHSWEIPPWT		
22	HVR-H1 de hu7C2	GYWMN		
23	HVR-H2 de hu7C2	MIHPLDAEIRANQKFRD		
24	HVR-H3 de hu7C2	GTYDGGFEY		
25	Cadena ligera kappa de 7C2.v2.2.LA humanizado (hu7C2)	DIVMTQSPDS GSRFTYMHY GVPDRFSGSG YCQHSWEIPP FIFPPSDEQL VQWKVDNALQ SSTLTLSKAD TKSFNRGEC	LAVSLGERAT QQKPGQPPKL SGTDFTLTIS WTFGQGTKVE KSGTASVVCL SGNSQESVTE YEKHKVYACE	INCRASQSVS LIKYASILES SLQAEDVAVY IKRTVAAPSV LNNFYBREAK QDSKDSTYSL VTHQGLSSPV

26	Cadena pesada de IgG1 de 7C2.v2.2.LA humanizado (hu7C2)	EVQLVQSGAE GYWMNWVRQA NQKFRDRVTI TAVYYCARGT TKGPSVFPLA FPEPVTVSWN YSLSSVVTVP KVDKKVEPKS VFLFPPKPKD DPEVKFNWYV YRVVSVLTVL APIEKTISKA KNQVSLTCLV NYKTTTPVLD GNVFSCSVMH	VKKPGASVKV PGQGLEWIGM TVDTSTSTAY YDGGFEYWGQ PSSKSTSGGT SGALTSGVHT SSSLGTQTYI CDKTHTCPPC TLMISRTPEV DGVEVHNAKT HQDWLNGKEY KGQPREPQVY KGFYPSDIAV SDGSFFLYSK EALHNHYTQK	SCKASGYSFT IHPLDAEIRA LELSSLRSED GTLVTVSSAS AALGCLVKDY FPAVLQSSGL CNVNHKPSNT PAPELLGGPS TCVVVDVSHE KPREEQYNST KCKVSNKALP TLPPSREEMT EWESNGQPEN LTVDKSRWQQ SLSLSPGK
27	HVR-H2 de Hu7C2.v2.1.S53M	MIHPMDSEIRANQKFRD		
28	HVR-H2 de Hu7C2.v2.1.S53L	MIHPLDSEIRANQKFRD		
29	HVR-H3 de Hu7C2.v2.1.E101K	GTYDGGFKY		

30	Cadena ligera kappa K149C de 7C2.v2.2.LA humanizado (hu7C2)	DIVMTQSPDS GSRFTYMHY GVPDRFSGSG YCQHSWEIPP FIFPPSDEQL VQWCVDNALQ SSTLTLSKAD TKSFNRGEC	LAVSLGERAT QQKPGQPPKL SGTDFTLTIS WTFGQGTKVE KSGTASVVCL SGNSQESVTE YEKHKVYACE	INCRASQSVS LIKYASILES SLQAEDVAVY IKRTVAAPSV LNNFYBREAK QDSKDSTYSL VTHQGLSSPV
31	Cadena pesada de IgG1 A118C de 7C2.v2.2LA humanizado (hu7C2)	EVQLVQSGAE GYWMNWVRQA NQKFRDRVTI TAVYYCARGT TKGPSVFPLA FPEPVTVSWN YSLSSVVTVP KVDKKVEPKS VFLFPPKPKD DPEVKFNWYV YRVVSVLTVL APIEKTISKA KNQVSLTCLV NYKTTTPVLD GNVFSCSVMH	VKKPGASVKV PGQGLEWIGM TVDTSTSTAY YDGGFEYWGQ PSSKSTSGGT SGALTSGVHT SSSLGTQTYI CDKTHTCPPC TLMISRTPEV DGVEVHNAKT HQDWLNGKEY KGQPREPQVY KGFYPSDIAV SDGSFFLYSK EALHNHYTQK	SCKASGYSFT IHPLDAEIRA LELSSLRSED GTLVTVSSCS AALGCLVKDY FPAVLQSSGL CNVNHKPSNT PAPELLGGPS TCVVVDVSHE KPREEQYNST KCKVSNKALP TLPPSREEMT EWESNGQPEN LTVDKSRWQQ SLSLSPGK

64	Ejemplo de proteína precursora de HER2 humano con secuencia de señal	MELAALCRWG MKLRLPASPE ELTYLPTNAS VRQVPLQRLR DPLNNTTPVT GGVLIQRNPQ LTLIDTNRSR DCQSLTRTVC AAGCTGPKHS LVTYNTDTFE YNYLSTDVGS CEKCSKPCAR IQEFAGCKKI PLQPEQLQVF DLSVFQNLQV SWLGLRSLRE PWDQLFRNPH CHQLCARGHC VEECRVLQGL NGSVTCFGPE PSGVKPDLSY THSCVDLDDK	LLLALLPPGA THLDMLRHLY LSFLQDIQEV IVRGTQLFED GASPGGLREL LCYQDTILWK ACHPCSPMCK AGGCARCKGP DCLACLHFNH SMPNPEGRYT CTLVCPLHNQ VCYGLGMEHL FGSLAFLPES ETLEEITGYL IRGRILHNGA LGSGLALIHH QALLHTANRP WPGPTQCVN PREYVNARHC ADQCVACAHY MPIWKFPDEE GCPAEQRASP	ASTQVCTGTD QGCQVVQGNL QGYVLIAHNQ NYALAVLDNG QLRSLTEILK DIFHKNNQLA GSRCWGESSE LPTDCCHEQC SGICELHCPA FGASCVTACP EVTAEEDGTQR REVRAVTSAN FDGDPASNTA YISAWPDSLP YSLTLQGLGI NTHLCFVHTV EDECVGEGLA CSQFLRGQEC LPCHPECQPQ KDPPFCVARC GACQPCPINC LTSIIISAVVG
		ILLVVVLGVV LQETELVEPL RKVKVLGSGA AIKVLRENTS YVSRLLGICL RENRGRLGSQ LVHRDLAARN DIDETEHAD HQSDVWSYGV IPDLLEKGER IDSECRPRFR NEDLGPASPL EEYLVPQQGF STRSGGGDLT AGSDVFDGDL RYSEDPTVPL NQPDVRPQPP KTLSPGKNGV GGAAPQPHPP GAPPSTFKGT	FGILIKRRQQ TPSGAMPNQA FGTVYKGIWI PKANKEILDE TSTVQLVTQL DLLNWCMQIA VLVKSPNHVK GGKVPIKWMA TVWELMTFGA LPQPPICTID ELVSEFSRMA DSTFYRSLE FCPDPAPGAG LGLEPSEEEA GMGAAKGLQS PSETDGYVAP SPREGPLPAA VKDVFAFGGA PAFSPAFDNL PTAENPEYLG	KIRKYTMRRL QMRILKETEL PDGENVKIPV AYVMAGVGSP MPYGCLLDHV KGMSYLEDVR ITDFGLARLL LESILRRRFT KPYDGIPARE VYMIMVKCWM RDPQRFVVIQ DDDMGDLVDA GMVHHRHRSS PRSP LAPSEG LPTHDPSP LQ LTCSPQPEYV RPAGATLERP VENPEYLTPQ YYWDQDPPER LDVPV

Anticuerpos anti-MUC16

En determinadas modalidades, los ADC de las Tablas 3A y 3B comprenden anticuerpos anti-MUC16.

En algunas modalidades, la invención proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo anti-MUC16 con al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36, (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37, (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32, (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33 y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34.

En un aspecto, la invención proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo con al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR VH seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36, (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37. En otra modalidad, el anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36, (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37.

En otro aspecto, la invención proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo con al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR VL seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32, (b) HVR-L2 que comprende la

secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33 y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34. En una modalidad, el anticuerpo comprende (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33 y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34.

En otro aspecto, un conjugado de anticuerpo-fármaco de la invención comprende un anticuerpo con (a) un dominio VH que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR VH seleccionadas de (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 37 y (b) un dominio VL que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VL que se seleccionan de (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33 y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34.

En otro aspecto, la invención proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo con (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36, (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37, (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32, (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33 y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34.

En cualquiera de las modalidades que anteceden, se humaniza un anticuerpo anti-MUC16 de un conjugado de anticuerpo-fármaco. En una modalidad, un anticuerpo anti-MUC16 comprende HVR en cualquiera de las modalidades anteriores y comprende adicionalmente un marco aceptor humano, p. ej., un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-MUC16 del conjugado de anticuerpo-fármaco comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada (VH) con al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39. En determinadas modalidades, una secuencia de VH que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39 contiene sustituciones (p. ej., sustituciones conservadoras), inserciones o eliminaciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-MUC16 que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse a MUC16. En determinadas modalidades, se sustituyó, se insertó y/o se eliminó un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 39. En determinadas modalidades, se sustituyó, se insertó y/o se eliminó un total de 1 a 5 aminoácidos en la SEQ ID NO: 39. En determinadas modalidades, las sustituciones, inserciones o eliminaciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-MUC16 comprende la secuencia de VH de la SEQ ID NO: 39 que incluye modificaciones postraducción de esa secuencia. En una modalidad particular, el VH comprende una, dos o tres HVR que se seleccionan de: (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35, (b) HVR-H2 que comprende

la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36 y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37.

En otro aspecto, se proporciona anticuerpo anti-MUC16 de un conjugado de anticuerpo-fármaco, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38. En determinadas modalidades, una secuencia de VL con al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO:38 contiene sustituciones (p. ej., sustituciones conservadoras), inserciones o eliminaciones respecto de la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-MUC16 que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse a MUC16. En determinadas modalidades, se sustituyó, se insertó y/o se eliminó un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 38. En determinadas modalidades, se sustituyó, se insertó y/o se eliminó un total de 1 a 5 aminoácidos en la SEQ ID NO: 38. En determinadas modalidades, las sustituciones, inserciones o eliminaciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-MUC16 comprende la secuencia de VL de la SEQ ID NO: 38 que incluye modificaciones postraducción de esa secuencia. En una modalidad particular, el VL comprende una, dos o tres HVR que se seleccionan de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32, (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33 y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34.

En otro aspecto, se proporciona un conjugado de anticuerpo-

fármaco que comprende un anticuerpo anti-MUC16, en el que el anticuerpo comprende un VH tal como se describió en cualquiera de las modalidades anteriores y un VL tal como se describió en cualquiera de las modalidades anteriores.

En una modalidad, se proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco, en el que el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en la SEQ ID NO: 39 y la SEQ ID NO: 38, respectivamente, que incluye las modificaciones postraducción de esas secuencias.

En un aspecto adicional, en la presente se proporcionan conjugados de anticuerpo-fármaco que comprenden anticuerpos que se unen al mismo epítipo que un anticuerpo anti-MUC16 proporcionado en la presente. Por ejemplo, en determinadas modalidades, se proporciona un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo anti-MUC16 que comprende una secuencia de VH de la SEQ ID NO: 39 y una secuencia VL de la SEQ ID NO: 38, respectivamente.

En un aspecto adicional de la invención, un anticuerpo anti-MUC16 de un conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquier de las modalidades que anteceden es un anticuerpo monoclonal, incluido un anticuerpo humano. En una modalidad, un anticuerpo anti-MUC16 de un conjugado de anticuerpo-fármaco es un fragmento de anticuerpo, p. ej., un Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo o fragmento F(ab')₂. En otra modalidad, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud sustancialmente completa, p. ej., un anticuerpo de IgG1, un anticuerpo de IgG2a u otra clase o isotipo de anticuerpo como se define en la presente.

Tabla de secuencias de anticuerpo MUC16

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
32	HVR-L1 de anticuerpo anti-Muc16	KASDLIHNWL A
33	HVR-L2 de anticuerpo anti-Muc16	YGATSLET
34	HVR-L3 de anticuerpo anti-Muc16	QQYWTFPT
35	HVR-H1 de anticuerpo anti-Muc16	GYSITNDYAW N
36	HVR-H2 de anticuerpo anti-Muc16	GYISYSGYTT YNPSLKS
37	HVR-H3 de anticuerpo anti-Muc16	ARWASGLDY
38	Región variable de cadena ligera de anticuerpo anti-Muc16	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASDLIH NWLAWYQQKP GKAPKLLIYG ATSLETGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YWTFPTFGQ GTKVEIKR
39	Región variable de cadena pesada de anticuerpo anti-Muc16	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYSIT NDYAWNWRQ APGKGLEWVG YISYSGYT NPSLKSRTI SRDTSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARWA SGLDYWGQGT LTVSS

Anticuerpos anti-STEAP-1

En determinadas modalidades, los ADC de las Tablas 3A y 3B comprenden anticuerpos anti-STEAP-1.

En algunas modalidades, la invención proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo anti-STEAP-1 con al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la

secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41, (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42, (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43, (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44 y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45.

En un aspecto, la invención proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo con al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR VH seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41, (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42. En otra modalidad, el anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41, (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42.

En otro aspecto, la invención proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo con al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR VL seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43, (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44 y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45. En una modalidad, el anticuerpo comprende (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43, (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44 y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45.

En otro aspecto, un conjugado de anticuerpo-fármaco de la invención comprende un anticuerpo con (a) un dominio VH que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR VH seleccionadas de (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 42 y (b) un dominio VL que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VL que se seleccionan de (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44 y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45.

En otro aspecto, la invención proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo con (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41, (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42, (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43, (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44 y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45.

En cualquiera de las modalidades que anteceden, se humaniza un anticuerpo anti-STEAP-1 de un conjugado de anticuerpo-fármaco. En una modalidad, un anticuerpo anti-STEAP-1 comprende HVR en cualquiera de las modalidades anteriores y comprende adicionalmente un marco aceptor humano, p. ej., un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-STEAP-1 del conjugado de anticuerpo-fármaco comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada (VH) con al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46. En determinadas modalidades, una secuencia de VH que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46 contiene sustituciones (p. ej., sustituciones conservadoras), inserciones o eliminaciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-STEAP-1 que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse a STEAP-1. En determinadas modalidades, se sustituyó, se insertó y/o se eliminó un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 46. En determinadas modalidades, se sustituyó, se insertó y/o se eliminó un total de 1 a 5 aminoácidos en la SEQ ID NO: 46. En determinadas modalidades, las sustituciones, inserciones o eliminaciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-STEAP-1 comprende la secuencia de VH de la SEQ ID NO: 46 que incluye modificaciones postraducción de esa secuencia. En una modalidad particular, el VH comprende una, dos o tres HVR que se seleccionan de: (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41 y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42.

En otro aspecto, se proporciona anticuerpo anti-STEAP-1 de un conjugado de anticuerpo-fármaco, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que tiene

al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47. En determinadas modalidades, una secuencia de VL que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47 contiene sustituciones (p. ej., sustituciones conservadoras), inserciones o eliminaciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-STEAP-1 que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse a STEAP-1. En determinadas modalidades, se sustituyó, se insertó y/o se eliminó un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 47. En determinadas modalidades, se sustituyó, se insertó y/o se eliminó un total de 1 a 5 aminoácidos en la SEQ ID NO: 47. En determinadas modalidades, las sustituciones, inserciones o eliminaciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-STEAP-1 comprende la secuencia de VL de la SEQ ID NO: 47 que incluye modificaciones postraduccionales de esa secuencia. En una modalidad particular, el VL comprende una, dos o tres HVR que se seleccionan de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43, (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44 y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45.

En otro aspecto, se proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo anti-STEAP-1, en el que el anticuerpo comprende un VH tal como se describió en cualquiera de las modalidades anteriores y un VL tal como se describió en cualquiera de las modalidades anteriores.

En una modalidad, se proporciona un conjugado de anticuerpo-

fármaco, en el que el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en la SEQ ID NO: 46 y la SEQ ID NO: 47, respectivamente, que incluye las modificaciones postraduccion de esas secuencias.

En un aspecto adicional, en la presente se proporcionan conjugados de anticuerpo-fármaco que comprenden anticuerpos que se unen al mismo epítipo que un anticuerpo anti-STEAP-1 proporcionado en la presente. Por ejemplo, en determinadas modalidades, se proporciona un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo anti-STEAP-1 que comprende una secuencia de VH de la SEQ ID NO: 46 y una secuencia VL de la SEQ ID NO: 47, respectivamente.

En un aspecto adicional de la invención, un anticuerpo anti-STEAP-1 de un conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquier de las modalidades que anteceden es un anticuerpo monoclonal, incluido un anticuerpo humano. En una modalidad, un anticuerpo anti-STEAP-1 de un conjugado de anticuerpo-fármaco es un fragmento de anticuerpo, p. ej., un Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo o fragmento F(ab')₂. En otra modalidad, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud sustancialmente completa, p. ej., un anticuerpo de IgG1, un anticuerpo de IgG2a u otra clase o isotipo de anticuerpo como se define en la presente.

Tabla de secuencias de anticuerpo STEAP

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
40	HVR-H1 de anti-STEAP-1	GYSITSDYAW N
41	HVR-H2 de anti-STEAP-1	GYISNSGSTS YNPSLKS
42	HVR-H3 de anti-STEAP-1	ERNYDYDDYY YAMDY
43	HVR-L1 de anti-STEAP-1	KSSQSLLYRS NQKNYLA
44	HVR-L2 de anti-STEAP-1	WASTRES
45	HVR-L3 de anti-STEAP-1	QQYYNYPRT
46	Región variable de cadena pesada de anti-STEAP1	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGYSIT SDYAWNWRQ APGKGLEWVG YISNSGSTSY NPSLKSRTFI SRDTSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARER NYDYDDYYA MDYWGQGTLV TVSS
47	Región variable de cadena ligera de anti-STEAP1	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKSSQSLL YRSNQKNYLA WYQQKPGKAP KLLIYWASTR ESGVPSRFSG SSGTDFTLT ISSLPEDFA TYYCQQYYNY PRTFGQGTKV EIK

Anticuerpos anti-NaPi2b

En determinadas modalidades, los ADC de las Tablas 3A y 3B comprenden anticuerpos anti-NaPi2b.

En algunas modalidades, la invención proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo anti-NaPi2b con al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 48, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49,

(c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 50, (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51, (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52 y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 53.

En un aspecto, la invención proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo con al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR VH seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 48, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49, (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 50. En otra modalidad, el anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49, (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 50.

En otro aspecto, la invención proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo con al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR VL seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51, (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52 y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 53. En una modalidad, el anticuerpo comprende (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52 y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 53.

En otro aspecto, un conjugado de anticuerpo-fármaco de la

invención comprende un anticuerpo con (a) un dominio VH que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR VH seleccionadas de (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 48, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 50 y (b) un dominio VL que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VL que se seleccionan de (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52 y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 53.

En otro aspecto, la invención proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo con (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 48, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49, (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 50, (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51, (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52 y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 53.

En cualquiera de las modalidades que anteceden, se humaniza un anticuerpo anti-NaPi2b de un conjugado de anticuerpo-fármaco. En una modalidad, un anticuerpo anti-NaPi2b comprende HVR en cualquiera de las modalidades anteriores y comprende adicionalmente un marco aceptor humano, p. ej., un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-NaPi2b del conjugado de

anticuerpo-fármaco comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada (VH) con al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 54. En determinadas modalidades, una secuencia de VH que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 54 contiene sustituciones (p. ej., sustituciones conservadoras), inserciones o eliminaciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-NaPi2b que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse a NaPi2b. En determinadas modalidades, se sustituyó, se insertó y/o se eliminó un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 54. En determinadas modalidades, se sustituyó, se insertó y/o se eliminó un total de 1 a 5 aminoácidos en la SEQ ID NO: 54. En determinadas modalidades, las sustituciones, inserciones o eliminaciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-NaPi2b comprende la secuencia de VH de la SEQ ID NO: 54 que incluye modificaciones postraducción de esa secuencia. En una modalidad particular, el VH comprende una, dos o tres HVR que se seleccionan de: (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 48, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49 y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 50.

En otro aspecto, se proporciona anticuerpo anti-NaPi2b de un conjugado de anticuerpo-fármaco, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con respecto a la

secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 55. En determinadas modalidades, una secuencia de VL que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 55 contiene sustituciones (p. ej., sustituciones conservadoras), inserciones o eliminaciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-NaPi2b que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse a anti-NaPi2b. En determinadas modalidades, se sustituyó, se insertó y/o se eliminó un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 55. En determinadas modalidades, se sustituyó, se insertó y/o se eliminó un total de 1 a 5 aminoácidos en la SEQ ID NO: 55. En determinadas modalidades, las sustituciones, inserciones o eliminaciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-NaPi2b comprende la secuencia de VL de la SEQ ID NO: 55 que incluye modificaciones postraducción de esa secuencia. En una modalidad particular, el VL comprende una, dos o tres HVR que se seleccionan de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51, (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52 y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 53.

En otro aspecto, se proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo anti-NaPi2b, en el que el anticuerpo comprende un VH tal como se describió en cualquiera de las modalidades anteriores y un VL tal como se describió en cualquiera de las modalidades anteriores.

En una modalidad, se proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco, en el que el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en la SEQ ID NO: 54 y la SEQ ID NO: 55,

respectivamente, que incluye las modificaciones postraducción de esas secuencias.

En un aspecto adicional, en la presente se proporcionan conjugados de anticuerpo-fármaco que comprenden anticuerpos que se unen al mismo epítopo que un anticuerpo anti-NaPi2b proporcionado en la presente. Por ejemplo, en determinadas modalidades, se proporciona un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo que se une al mismo epítopo que un anticuerpo anti-NaPi2b que comprende una secuencia de VH de la SEQ ID NO: 54 y una secuencia VL de la SEQ ID NO: 55, respectivamente.

En un aspecto adicional de la invención, un anticuerpo anti-NaPi2b de un conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquier de las modalidades que anteceden es un anticuerpo monoclonal, incluido un anticuerpo humano. En una modalidad, un anticuerpo anti-NaPi2b de un conjugado de anticuerpo-fármaco es un fragmento de anticuerpo, p. ej., un Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo o fragmento F(ab')₂. En otra modalidad, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud sustancialmente completa, p. ej., un anticuerpo de IgG1, un anticuerpo de IgG2a u otra clase o isotipo de anticuerpo como se define en la presente.

Tabla de secuencias de anticuerpo NaPi2b

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
48	HVR-H1 anti-NaPi2b	GFSFSDFAMS
49	HVR-H2 anti-NaPi2b	ATIGRVAFHYYPD SMKG
50	HVR-H3 anti-NaPi2b	ARHRGFDVGHFDF

51	HVR-L1 anti-NaPi2b	RSSETLVHSSGNTYLE
52	HVR-L2 anti-NaPi2b	RVSNRFS
53	HVR-L3 anti-NaPi2b	FQGSFNPLT
54	Región variable de cadena pesada de anti-NaPi2b	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSDFAMSWVRQAP GKGLEWVATIGRVAFTYYPD SMKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARHRGFDVGHFDFWGQGT LTVSS
55	Región variable de cadena ligera de anti-NaPi2b	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSETLVHSSGNTYLEWY QQKPGKAPKLLIYRVSNRFS GVPSRFSGSGSGTDFTLT ISS LQPEDFATYYCFQGSFNPLTFGQGT KVEIKR

Anticuerpo anti-CD79b

En determinadas modalidades, los ADC de las Tablas 3A y 3B comprenden anticuerpos anti-CD79b.

En algunas modalidades, la invención proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo anti-CD79b con al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 58, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 59, (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60, (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 61, (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 62 y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63.

En un aspecto, la invención proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo con al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR VH seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 58, (b) HVR-H2 que comprende la

secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 59 y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60. En otra modalidad, el anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 59 y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60.

En otro aspecto, la invención proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo con al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR VL seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 61, (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 62 y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63. En una modalidad, el anticuerpo comprende (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 62 y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63.

En otro aspecto, un conjugado de anticuerpo-fármaco de la invención comprende un anticuerpo con (a) un dominio VH que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR VH seleccionadas de (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 58, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 59 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 60 y (b) un dominio VL que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VL que se seleccionan de (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 62 y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos

de la SEQ ID NO: 63.

En otro aspecto, la invención proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo con (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 58, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 59, (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60, (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 61, (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 62 y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63.

En cualquiera de las modalidades que anteceden, se humaniza un anticuerpo anti-CD79b de un conjugado de anticuerpo-fármaco. En una modalidad, un anticuerpo anti-CD79b comprende HVR en cualquiera de las modalidades anteriores y comprende adicionalmente un marco aceptor humano, p. ej., un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-CD79b del conjugado de anticuerpo-fármaco comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada (VH) con al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 56. En determinadas modalidades, una secuencia de VH que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 56 contiene sustituciones (p. ej., sustituciones conservadoras), inserciones o eliminaciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-CD79b que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse

a CD79b. En determinadas modalidades, se sustituyó, se insertó y/o se eliminó un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 56. En determinadas modalidades, se sustituyó, se insertó y/o se eliminó un total de 1 a 5 aminoácidos en la SEQ ID NO: 56. En determinadas modalidades, las sustituciones, inserciones o eliminaciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-CD79b comprende la secuencia de VH de la SEQ ID NO: 8 que incluye modificaciones postraducción de esa secuencia. En una modalidad particular, el VH comprende una, dos o tres HVR que se seleccionan de: (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 58, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 59 y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60.

En otro aspecto, se proporciona anticuerpo anti-CD79b de un conjugado de anticuerpo-fármaco, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 57. En determinadas modalidades, una secuencia de VL que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 57 contiene sustituciones (p. ej., sustituciones conservadoras), inserciones o eliminaciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-Ly6E que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse a CD79b. En determinadas modalidades, se sustituyó, se insertó y/o se eliminó un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 57. En determinadas modalidades, se sustituyó, se insertó y/o se eliminó un total de 1 a 5 aminoácidos en la SEQ ID NO: 57. En determinadas modalidades, las sustituciones,

inserciones o eliminaciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-CD79b comprende la secuencia de VL de la SEQ ID NO: 57 que incluye modificaciones postraducción de esa secuencia. En una modalidad particular, el VL comprende una, dos o tres HVR que se seleccionan de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 61, (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 62 y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63.

En otro aspecto, se proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo anti-CD79b, en el que el anticuerpo comprende un VH tal como se describió en cualquiera de las modalidades anteriores y un VL tal como se describió en cualquiera de las modalidades anteriores.

En una modalidad, se proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco, en el que el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en la SEQ ID NO: 56 y la SEQ ID NO: 57, respectivamente, que incluye las modificaciones postraducción de esas secuencias.

En un aspecto adicional, en la presente se proporcionan conjugados de anticuerpo-fármaco que comprenden anticuerpos que se unen al mismo epítipo que un anticuerpo anti-CD79b proporcionado en la presente. Por ejemplo, en determinadas modalidades, se proporciona un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo anti-CD79b que comprende una secuencia de VH de la SEQ ID NO: 56 y una secuencia VL de la SEQ ID NO: 57, respectivamente.

En un aspecto adicional de la invención, un anticuerpo anti-

CD79b de un conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquier de las modalidades que anteceden es un anticuerpo monoclonal, incluido un anticuerpo humano. En una modalidad, un anticuerpo anti-CD79b de un conjugado de anticuerpo-fármaco es un fragmento de anticuerpo, p. ej., un Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo o fragmento F(ab')₂. En otra modalidad, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud sustancialmente completa, p. ej., un anticuerpo de IgG1, un anticuerpo de IgG2a u otra clase o isotipo de anticuerpo como se define en la presente.

Tabla de secuencias de anticuerpo CD79b

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia		
56	Región variable de cadena pesada de huMA 79bv28 anti-CD79b	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYTFS
		SYWIEWVRQA	PGKGLEWIGE	ILPGGGDTNY
		NEIFKGRATF	SADTSKNTAY	LQMNSLRAED
		TAVYYCTRRV	PIRLDYWGQG	TLVTVSS

57	Región variable de cadena ligera de huMA 79bv28 anti-CD79b	DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQSVD YEGDSFLNWWY QKPGKAPKL LIYAASNLES GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQSNEDPL TFGQGTKVEI KR
58	HVR H1 de huMA79bv28 anti-CD79b	GYTFSSYWIE
59	HVR H2 de huMA79bv28 anti-CD79b	GEILPGGGDTNYNEIFKG
60	HVR H3 de huMA79bv28 anti-CD79b	TRRVPIRLDY
61	HVR L1 de huMA79bv28 anti-CD79b	KASQSVDYEGDSFLN
62	HVR L2 de huMA79bv28 anti-CD79b	AASNLES
63	HVR L3 de huMA79bv28 anti-CD79b	QQSNEDPLT

Afinidad de anticuerpos

En determinadas modalidades, un anticuerpo que se proporciona en la presente tiene una constante de disociación (Kd) de $\geq 1 \mu\text{M}$, $\geq 100 \text{ nM}$, $\geq 50 \text{ nM}$, $\geq 10 \text{ nM}$, $\geq 5 \text{ nM}$, $\geq 1 \text{ nM}$, $\geq 0,1 \text{ nM}$, $\geq 0,01 \text{ nM}$ o $\geq 0,001 \text{ nM}$ y opcionalmente es $\leq 10^{-13} \text{ M}$. (p. ej., 10^{-8} M o menos, p. ej., de 10^{-8} M a 10^{-13} M , p. ej., de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

En una modalidad, la Kd se mide mediante un ensayo de unión de antígenos radiomarcados (RIA) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno como se describe en el siguiente ensayo. La afinidad de unión en solución de Fabs con respecto un antígeno se mide equilibrando el Fab con una concentración mínima de un

antígeno marcado con (^{125}I) con una serie de titulación de un antígeno sin marcar y luego capturando al antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpos anti-Fab (remitirse, p. ej., Chen et ál., *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999)). Para establecer las condiciones para el ensayo, se recubren placas de múltiples pocillos MICROTITER® (Thermo Scientific) durante la noche con 5 $\mu\text{g/ml}$ de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato de sodio 50 mM (pH 9,6), y luego se bloquean con albúmina de suero bovino al 2 % (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no adsorbente (Nunc #269620) se mezclan 100 pM o 26 pM de antígeno [^{125}I] con diluciones en serie de un Fab de interés (p. ej., coherentes con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta et ál., *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)). El Fab de interés luego se incuba durante la noche. No obstante, la incubación puede continuar por un período más prolongado (p. ej., alrededor de 65 horas) para asegurar de que se alcance el equilibrio. Luego, las mezclas se transfieren a la placa de captura para incubación a temperatura ambiente (p. ej., durante una hora). Luego se retira la solución y la placa se lava ocho veces con polisorbato 20 (TWEEN-20®) al 0,1 % en PBS. Una vez secas las placas, se agregan 150 μl /pocillo de centelleante (MICROSCINT-20™; Packard) y se realiza conteo de placas en un contador gamma TOPCOUNT™ (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que producen menos o el equivalente a 20 % de la unión máxima se eligen para uso en ensayos de unión competitiva.

De acuerdo con otra modalidad, la K_d se mide utilizando ensayos de resonancia de plasmones superficiales utilizando un BIACORE®-2000 o BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (RU, por su sigla en inglés). En

resumen, se activan chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC, por su sigla en inglés) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con 10 mM de acetato de sodio, pH 4,8, a 5 µg/ml (~ 0,2 µM) antes de la inyección a una velocidad de flujo de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de la proteína acoplada. Tras la inyección de antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para mediciones cinéticas, se inyectan diluciones dobles en serie de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con tensioactivo polisorbato 20 (TWEEN-20™) (PBST) al 0,05 % a 25 °C a una velocidad de flujo de aproximadamente 25 µl/min. Las velocidades de asociación (k_{on}) y velocidades de disociación (k_{off}) se calculan utilizando un modelo de unión simple de Langmuir uno a uno (software de evaluación BIAcore® versión 3.2) mediante ajuste simultáneo de sensogramas de asociación y disociación. La constante de equilibrio de disociación (K_d) se calcula como la relación k_{off}/k_{on} . Remitirse, p. ej., a Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999). Si la velocidad de asociación supera $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ en el ensayo de resonancia de plasmones superficiales mencionado anteriormente, entonces la velocidad de asociación puede determinarse usando una técnica de inactivación fluorescente que mide el aumento o la disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, 16 nm de pasaje de banda) a 25°C de 20 nM de anticuerpo antiantígeno (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno según la medición en un espectrómetro, como un espectrofotómetro equipado con detención de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO™ serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta

agitada.

Fragmentos de anticuerpo

En determinadas modalidades, un anticuerpo que se proporciona en la presente es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, de modo no taxativo, fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv y scFv y otros fragmentos que se describen a continuación. Se puede encontrar un análisis de determinados fragmentos de anticuerpo en Hudson et ál. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003). Se puede encontrar un análisis de fragmentos scFv, por ejemplo, en Pluckthün, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, tomo 113, Rosenberg y Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York), páginas 269-315 (1994); remitirse también a WO 93/16185 y las patentes estadounidenses n.º 5,571,894 y 5,587,458. Se puede encontrar una mención sobre fragmentos Fab y F(ab')₂ que comprenden residuos de epítipo de unión al receptor de rescate y que tienen mayor semivida in vivo en la patente estadounidense n.º 5.869.046.

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos puntos de unión al antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Remitirse, p. ej., a EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et ál., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003) y Hollinger et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 90: 6444-6448 (1993)). Los triacuerpos y tetracuerpos se describen también en Hudson et ál., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

Los anticuerpos de un solo dominio son fragmentos de anticuerpos que comprenden la totalidad o una parte del dominio variable de cadena pesada o la totalidad o una parte del dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo. En determinadas modalidades, un anticuerpo de un solo dominio es un anticuerpo de un solo dominio humano (Domantis, Inc.,

Waltham, MA; remitirse, p. ej., a la patente estadounidense n.º 6,248,516 B1).

Los fragmentos de anticuerpos pueden elaborarse mediante diversas técnicas que incluyen, de modo no taxativo, digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como también producción mediante células hospedadoras recombinantes (p. ej., *E. coli* o fago), como se describe en la presente.

Anticuerpos quiméricos y humanizados

En determinadas modalidades, un anticuerpo que se proporciona en la presente es un anticuerpo quimérico. Se describen determinados anticuerpos quiméricos, p. ej., en la patente estadounidense n.º 4,816,567; y en Morrison et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 81:6851-6855 (1984)). En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (p. ej., una región variable derivada de un ratón, una rata, un hámster, un conejo o un primate no humano, como un mono) y una región constante humana. En un ejemplo adicional, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo con «cambio de clase» en el que la clase o subclase cambió con respecto a la del anticuerpo original. Los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de unión al antígeno de estos.

En determinadas modalidades, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Normalmente, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenicidad en humanos, a la vez que mantiene la especificidad y la afinidad del anticuerpo no humano original. Generalmente, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR, p. ej., las CDR (o partes de estas) se derivan de un anticuerpo no humano y las FR (o partes de estas) se derivan de secuencias de anticuerpo humano. Un anticuerpo

humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante humana. En algunas modalidades, algunos residuos de FR en un anticuerpo humanizado se sustituyen con residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (p. ej., el anticuerpo del cual se derivan los residuos de HVR), p. ej., para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad de un anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados y los métodos para elaborarlos se analizan, p. ej., en Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008), y se describen con mayor detalle, p. ej., en Riechmann et ál., *Nature* 332:323-329 (1988); Queen et ál., *Proc. Nat'l Acad. Sci. EUA* 86:10029-10033 (1989), patentes estadounidenses n.º 5, 821,337, 7,527,791, 6,982,321 y 7,087,409, Kashmiri et ál., *Methods* 36:25-34 (2005) (que describe la realización de injertos de SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (que describe la «recomposición de superficie»); Dall'Acqua et ál., *Methods* 36:43-60 (2005) (que describe la «transposición de FR») y Osbourn et ál., *Methods* 36:61-68 (2005) y Klimka et ál., *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (que describen el enfoque de «selección guiada» para transposición de FR).

Las regiones marco humanas que pueden usarse para humanización incluyen, de modo no taxativo: regiones marco que se seleccionan utilizando el método «de mejor ajuste» (remitirse, p. ej., Sims et ál. *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); regiones marco derivadas de la secuencia de consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de cadena ligera o pesada (remitirse, p. ej., a Carter et ál. *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 89:4285 (1992); y Presta et ál. *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); regiones marco humanas maduras (con mutación somática) o regiones marco de línea germinal humana (remitirse, p. ej., a Almagro y

Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)) y regiones marco derivadas de clasificación de genotecas de FR (remitirse, p. ej., Baca et ál., *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) y Rosok et ál., *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

Anticuerpos humanos

En determinadas modalidades, un anticuerpo que se proporciona en la presente es un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos se pueden producir usando diversos métodos conocidos en la técnica. En términos generales, los anticuerpos humanos se describen en van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) y Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008).

Los anticuerpos humanos se pueden preparar administrándole un inmunógeno a un animal transgénico modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a un estímulo antigénico. Estos animales contienen normalmente la totalidad o parte de los loci de inmunoglobulina humana, los cuales remplazan los loci de inmunoglobulina endógena o están presentes de forma extracromosómica o integrados de forma aleatoria en los cromosomas del animal. En tales ratones transgénicos, los loci de inmunoglobulina endógena se encuentran generalmente inactivados. Se pueden encontrar menciones de métodos para obtener anticuerpos humanos a partir de animales transgénicos en Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005). Remitirse también, p. ej., a las patentes estadounidenses n.º 6,075,181 y 6,150,584 que describen la tecnología XENOMOUSE™; la patente estadounidense n.º 5,770,429 que describe la tecnología HUMAB®; la patente estadounidense n.º 7,041,870 que describe la tecnología K-M MOUSE® y la publicación de solicitud de

patente estadounidense n.º US 2007/0061900, que describe la tecnología VELOCIMOUSE®). Las regiones variables humanas de anticuerpos intactos generados mediante estos animales pueden modificarse de forma adicional mediante, p. ej., mediante una combinación con una región constante humana diferente.

Los anticuerpos humanos también se pueden elaborar con métodos a base de hibridomas. Se describieron líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma humano-de ratón para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Remitirse, p. ej., a Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984), Brodeur et ál., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987), y Boerner et ál., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991). También se describen anticuerpos humanos generados mediante tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos en Li et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 103:3557-3562 (2006). Los métodos adicionales incluyen los descritos, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 7,189,826 (que describe la producción de anticuerpos IgM humanos monoclonales de líneas celulares de hibridoma) y Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) (que describe hibridomas humano-humano). También se describe la tecnología de hibridoma humano (tecnología de trioma) en Vollmers y Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) y Vollmers y Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005).

También pueden generarse anticuerpos humanos mediante aislamiento de secuencias de dominio variable del clon de Fv que se seleccionan de genotecas de expresión en fagos derivados de humanos. Estas secuencias de dominio variable luego se pueden combinar con un dominio constante humano

deseado. A continuación se describen técnicas para seleccionar anticuerpos humanos de genotecas de anticuerpos.

Anticuerpos derivados de genotecas

Los anticuerpos de la invención se pueden aislar mediante análisis de genotecas de combinación para determinar los anticuerpos con la o las actividades deseadas. Por ejemplo, en la técnica se conocen diversos métodos para generar genotecas de expresión en fagos y analizar dichas genotecas para determinar anticuerpos con las características de unión deseadas. Dichos métodos se analizan, p. ej., en Hoogenboom et ál. en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et ál., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y se describen adicionalmente, p. ej., en McCafferty et ál., *Nature* 348:552-554; Clackson et ál., *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks et ál., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks y Bradbury, en *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et ál., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et ál., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee et ál., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004).

En determinados métodos de expresión en fagos, se clonan repertorios de genes de VH y VL por separado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por su sigla en inglés) y se recombinan de forma aleatoria en genotecas de fagos que luego pueden analizarse para determinar fagos de unión a antígenos, como se describe en Winter et ál., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Típicamente, los fagos expresan fragmentos de anticuerpos, como fragmentos Fv de cadena simple (scFv) o como fragmentos Fab. Las genotecas de orígenes inmunizados le proporcionan al inmunógeno anticuerpos de alta afinidad sin el requisito de construcción

de hibridomas. De manera alternativa, el repertorio sin inmunización puede clonarse (p. ej., a partir de un humano) para proporcionar un único origen de anticuerpos para un amplio espectro de xenoantígenos y autoantígenos sin ningún tipo de inmunización, como se describe en Griffiths et ál., *EMBO J*, 12: 725-734 (1993). Por último, las genotecas sin inmunización también se pueden elaborar de forma sintética clonando segmentos génicos V sin reorganización de células madre y utilizando cebadores de PCR que contienen secuencias aleatorias para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para lograr la reorganización *in vitro*, como se describe en Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Las publicaciones de patente que describen genotecas de fagos de anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo: la patente estadounidense n.º 5,750,373 y las publicaciones de patentes estadounidenses n.º 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 y 2009/0002360.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo aislados de genotecas de anticuerpos humanos se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpo humano en la presente.

Anticuerpos multiespecíficos

En determinadas modalidades, un anticuerpo que se proporciona en la presente es un anticuerpo multiespecífico, p. ej., un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales con especificidades de unión con respecto a al menos dos puntos diferentes. En determinadas modalidades, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítomos del mismo objetivo. Los anticuerpos biespecíficos también pueden utilizarse para localizar agentes citotóxicos de células que expresan el objetivo. Los anticuerpos biespecíficos se

pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos.

Las técnicas para realizar anticuerpos multiespecíficos incluyen, de modo no taxativo, expresión conjunta recombinante de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina con diferentes especificidades (remitirse a Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)), WO 93/08829, y Traunecker et ál., *EMBO J.* 10: 3655 (1991)) y modificación de «botón en ojal» (remitirse, p. ej., a la patente estadounidense n.º 5,731,168). Según se utiliza en la presente, la expresión «botón en ojal» o «KnH», por su sigla en inglés, hace referencia a la tecnología dirigida a emparejar dos polipéptidos entre sí in vitro o in vivo introduciendo una protuberancia (botón) en un polipéptido y una cavidad (ojal) en el otro polipéptido en una interfaz en la que interactúan. Por ejemplo, los KnH se han introducido en las interfaces de unión Fc:Fc, interfaces CL:CH1 o interfaces VH/VL de anticuerpos (remitirse, p. ej., a US 2011/0287009, US2007/0178552, WO 96/027011, WO 98/050431, Zhu et ál., 1997, *Protein Science* 6:781-788 y WO2012/106587). En algunas modalidades, los KnH accionan el emparejamiento de dos cadenas pesadas diferentes durante la fabricación de anticuerpos multiespecíficos. Por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos con KnH en sus regiones Fc pueden comprender además dominios de variable simple enlazados a cada región Fc o comprender además dominios variables de cadena pesada diferentes que se emparejan con dominios variables de cadena ligera similares o diferentes. También se puede utilizar la tecnología de KnH para emparejar dos dominios extracelulares de receptores diferentes en cualquier otra secuencia polipeptídica que comprenda secuencias de reconocimiento de objetivo diferentes (p. ej., incluidos afficuerpos, pepticuerpos y otras fusiones de Fc).

La expresión «mutación de botón», tal como se utiliza en la presente, hace referencia a una mutación que introduce una protuberancia (botón) en un polipéptido en una interfaz en la que el polipéptido interactúa con otro polipéptido. En algunas modalidades, el otro polipéptido tiene una mutación de ojal.

La expresión «mutación de ojal», tal como se utiliza en la presente, hace referencia a una mutación que introduce una cavidad (ojal) en un polipéptido en una interfaz en la que el polipéptido interactúa con otro polipéptido. En algunas modalidades, el otro polipéptido tiene una mutación de botón. A continuación se brinda una descripción breve y no taxativa. Una «protuberancia» hace referencia a al menos una cadena lateral de aminoácido que se proyecta desde la interfaz de un primer polipéptido y, por lo tanto, se puede colocar en una cavidad de compensación en la interfaz adyacente (es decir, la interfaz de un segundo polipéptido) para estabilizar el heteromultímero y así favorecer la formación de heteromultímeros con respecto a la formación de homomultímeros, por ejemplo. La protuberancia puede existir en la interfaz original o puede introducirse de forma sintética (p. ej., alterando el ácido nucleico que codifica la interfaz). En algunas modalidades, el ácido nucleico que codifica la interfaz del primer polipéptido se altera para codificar la protuberancia. Para lograr esto, el ácido nucleico que codifica al menos un residuo de aminoácido «original» en la interfaz del primer polipéptido se reemplaza con ácido nucleico que codifica al menos un residuo de aminoácido «importado» con un mayor volumen de cadena lateral que el residuo de aminoácido original. Se observará que puede haber más de un residuo original e importado correspondiente. Los volúmenes de cadena lateral de los

diversos aminoácidos se muestran, por ejemplo, en la Tabla 1 de US2011/0287009. Una mutación para introducir una «protuberancia» se puede indicar como una «mutación de botón».

En algunas modalidades, los residuos importados para la formación de una protuberancia son residuos de aminoácido de origen natural seleccionado de arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W). En algunas modalidades, un residuo importado es triptófano o tirosina. En algunas modalidades, el residuo original para la formación de la protuberancia tiene un volumen de cadena lateral pequeño, como alanina, asparagina, ácido aspártico, glicina, serina, treonina o valina.

Una «cavidad» hace referencia a al menos una cadena lateral de aminoácido que se embute de la interfaz de un segundo polipéptido y, por lo tanto, puede recibir una protuberancia correspondiente en la interfaz adyacente de un primer polipéptido. La cavidad puede existir en la interfaz original o puede introducirse de forma sintética (p. ej., alterando el ácido nucleico que codifica la interfaz). En algunas modalidades, el ácido nucleico que codifica la interfaz del segundo polipéptido se altera para codificar la cavidad. Para lograr esto, el ácido nucleico que codifica al menos un residuo de aminoácido «original» en la interfaz del segundo polipéptido se reemplaza con ADN que codifica al menos un residuo de aminoácido «importado» con un menor volumen de cadena lateral que el residuo de aminoácido original. Se observará que puede haber más de un residuo original e importado correspondiente. En algunas modalidades, los residuos importados para la formación de una cavidad son residuos de aminoácido de origen natural seleccionado de alanina (A), serina (S), treonina (T) y valina (V). En

algunas modalidades, un residuo importado es serina, alanina o treonina. En algunas modalidades, el residuo original para la formación de la cavidad tiene un volumen de cadena lateral considerable, como tirosina, arginina, fenilalanina o triptófano. Una mutación para introducir una «cavidad» se puede indicar como una «mutación de ojal».

La protuberancia se «puede colocar» en la cavidad, lo que significa que la ubicación espacial de la protuberancia y la cavidad en la interfaz de un primer polipéptido y un segundo polipéptido, respectivamente, y los tamaños de la protuberancia y la cavidad son tales que la protuberancia puede ubicarse en la cavidad sin alterar de forma considerable la asociación normal del primer y el segundo polipéptido en la interfaz. Dado que las protuberancias como Tyr, Phe y Trp no se extienden típicamente de forma perpendicular desde el eje de la interfaz y tienen conformaciones preferidas, la alineación de una protuberancia con una cavidad correspondiente puede, en algunos casos, basarse en la realización de un modelo del par de protuberancia/cavidad según una estructura tridimensional como la obtenida mediante cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear (NMR, por su sigla en inglés). Esto se puede lograr utilizando diversos métodos aceptados en la técnica.

En algunas modalidades, una mutación de botón en una región constante de IgG1 es T366W (numeración EU). En algunas modalidades, una mutación de ojal en una región constante de IgG1 comprende una o más mutaciones seleccionadas de T366S, L368A e Y407V (mutación EU). En algunas modalidades, una mutación de ojal en una región constante de IgG1 comprende T366S, L368A e Y407V (mutación EU).

En algunas modalidades, una mutación de botón en una región constante de IgG4 es T366W (numeración EU). En algunas modalidades, una mutación de ojal en una región constante de IgG4 comprende una o más mutaciones seleccionadas de T366S, L368A e Y407V (mutación EU). En algunas modalidades, una mutación de ojal en una región constante de IgG4 comprende T366S, L368A e Y407V (mutación EU).

Los anticuerpos multiespecíficos también pueden crearse modificando los efectos de direccionamiento electroestático para crear moléculas heterodiméricas de Fc de anticuerpo (WO 2009/089004A1), reticulando dos o más anticuerpos o fragmentos (remitirse, p. ej., a la patente estadounidense n.º 4,676,980, y Brennan et ál., *Science*, 229: 81 (1985)), utilizando cremalleras de leucina para producir anticuerpos biespecíficos (remitirse, p. ej., Kostelny et ál., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)), utilizando tecnología de «diacuerpos» para crear fragmentos de anticuerpo biespecíficos (remitirse, p. ej., a Hollinger et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 90:6444-6448 (1993)) y utilizando dímeros de Fv de cadena simple (sFv) (remitirse, p. ej., Gruber et ál., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); y preparando anticuerpos triespecíficos como se describe, p. ej., en Tutt et ál. *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

También se incluyen en la presente anticuerpos modificados genéticamente con tres o más puntos de unión a antígenos funcionales, que incluyen «anticuerpos de pulpo», (remitirse, p. ej., a US 2006/0025576A1).

El anticuerpo o fragmento en la presente incluye también un «FAB de doble acción» o «DAF» que comprende un punto de unión al antígeno que se une al objetivo, así como a otro antígeno diferente (remitirse, p. ej., a US 2008/0069820).

Variantes de anticuerpos

En determinadas modalidades, se contemplan variantes de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos que se proporcionan en la presente. Por ejemplo, puede que sea deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencias de aminoácidos de un anticuerpo se pueden preparar mediante introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica al anticuerpo o mediante síntesis de péptidos. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, eliminaciones y/o inserciones y/o sustituciones de residuos en las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se puede realizar cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución puede realizarse para lograr la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, p. ej., la unión a antígenos.

Variantes de sustitución, inserción y eliminación

En determinadas modalidades, se proporcionan variantes de anticuerpos con una o más sustituciones de aminoácidos. Los puntos de interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las HVR y las FR. Las sustituciones conservadoras se muestran en la tabla 1 con el título «sustituciones preferidas». Se proporcionan cambios más sustanciales en la tabla 1 con el título «ejemplos de sustituciones» y como se describe posteriormente con respecto a las clases de cadenas laterales de aminoácidos. Se pueden introducir sustituciones de aminoácidos en un anticuerpo de interés y analizar los productos para determinar una actividad deseada, p. ej., mejor unión a antígenos/retención de unión a antígenos, menor inmunogenicidad o mejor ADCC o CDC.

TABLA 1

Residuo original	Ejemplos de sustituciones	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Los aminoácidos se pueden agrupar según propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) hidrofóbicos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrofílicos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras implican intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

Un tipo de variante de sustitución implica sustitución de uno o más residuos de regiones hipervariables de un anticuerpo original (p. ej., un anticuerpo humano o humanizado). En general, la o las variantes resultantes seleccionadas para estudios adicionales tendrán modificaciones (p. ej., mejoras) en determinadas propiedades biológicas (p. ej., aumento de la afinidad, disminución de la inmunogenicidad) en comparación con el anticuerpo original y/o mantendrán sustancialmente determinadas propiedades biológicas del anticuerpo original. Un ejemplo de variante de sustitución es un anticuerpo con maduración de afinidad, que puede generarse de manera conveniente, p. ej., con técnicas de maduración de afinidad basadas en la expresión en fagos, como las que se describen en la presente. En resumen, se mutan uno o más residuos de HVR y los anticuerpos variantes se expresan en fagos y se analizan para determinar una actividad biológica particular (p. ej., afinidad de unión).

Se pueden realizar alteraciones (p. ej., sustituciones) en las HVR, p. ej., para mejorar la afinidad de los anticuerpos. Estas alteraciones pueden realizarse en «puntos de interés» de HVR, es decir, residuos codificados mediante codones que experimentan una mutación a una frecuencia elevada durante el proceso de maduración somática (remitirse, p. ej., a Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)) y/o SDR (a-CDR), con análisis del VH o VL variante resultante para determinar la afinidad de unión. La maduración de afinidad mediante construcción y nueva selección de genotecas

secundarias se ha descrito, p. ej., en Hoogenboom et ál. en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et ál., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)). En algunas modalidades de la maduración de afinidad, se introduce diversidad en los genes variables seleccionados para maduración mediante cualquiera de diversos métodos (p. ej., PCR susceptible a errores, transposición de cadena o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos). Luego se crea una segunda biblioteca. La genoteca luego se analiza para identificar cualquier variante de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro método para introducir diversidad implica enfoques dirigidos a HVR, en los que se distribuyen de forma aleatoria diversos residuos de HVR (p. ej., 4-6 residuos por vez). Los residuos de HVR implicados en la unión a antígeno pueden identificarse de forma específica, p. ej., utilizando realización de modelos o mutagénesis con barrido de alanina. En particular, a menudo se seleccionan como objetivos CDR-H3 y CDR-L3.

En determinadas modalidades, pueden producirse sustituciones, inserciones o eliminaciones en una o más HVR, siempre que dichas alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo de unirse a un antígeno. Por ejemplo, pueden generarse alteraciones conservadoras (p. ej., sustituciones conservadoras como se indica en la presente) que no reduzcan sustancialmente la afinidad de unión en las HVR. Tales alteraciones pueden encontrarse fuera de los «puntos de interés» de HVR o SDR. En determinadas modalidades de las secuencias de VH y VL variantes indicadas anteriormente, cada HVR se encuentra inalterada o contiene no más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

Un método útil para identificar residuos o regiones de un anticuerpo que pueden elegirse como objetivos para la mutagénesis se denomina «mutagénesis de barrido de alanina»,

como describen Cunningham y Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. En este método, un residuo o grupo de residuos objetivo (p. ej., residuos cargados como arg, asp, his, lys y glu) se identifican y remplazan con un aminoácido neutro o con carga negativa (p. ej., alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno se ve afectada. Se pueden introducir otras sustituciones en las ubicaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional con respecto a las sustituciones iniciales. De manera alternativa o adicional, se utiliza una estructura cristalina de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Tales residuos de contacto y residuos circundantes pueden seleccionarse como objetivo o eliminarse como candidatos para sustitución. Se pueden analizar las variantes para determinar si contienen las propiedades deseadas o no.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones de extremos amino y/o carboxilo que varían en cuanto a longitud de un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como también inserciones intrasecuencia de un único o de múltiples residuos de aminoácidos. Los ejemplos de inserciones en extremos incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo en el extremo N. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión a los extremos N o C del anticuerpo de una enzima (p. ej., para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida del anticuerpo en suero.

Variantes de glicosilación

En determinadas modalidades, un anticuerpo proporcionado en la presente se altera para aumentar o disminuir la cantidad de glicosilación del anticuerpo. La adición o eliminación de

puntos de glicosilación a un anticuerpo se puede lograr de forma conveniente alterando la secuencia de aminoácidos de modo de crear o eliminar uno o más puntos de glicosilación.

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, el carbohidrato unido a este puede modificarse. Los anticuerpos naturales producidos mediante células de mamíferos típicamente comprenden un oligosacárido ramificado y de doble antena generalmente enlazado mediante un enlace N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Remitirse, *p. ej.*, a Wright et ál. *TIBTECH* 15:26-32 (1997). El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, *p. ej.*, manosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a una GlcNAc en el «tallo» de la estructura del oligosacárido de dos antenas. En algunas modalidades, las modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención pueden realizarse para crear variantes de anticuerpos con determinadas propiedades mejoradas.

En una modalidad, se proporcionan variantes de anticuerpos que tienen una estructura de carbohidrato que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en tal anticuerpo puede ser de 1 % a 80 %, de 1 % a 65 %, de 5 % a 65 % o de 20 % a 40 %. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297, en comparación con la suma de todas las glicoestructuras unidas a Asn 297 (*p. ej.*, estructuras complejas, híbridas y altas en manosa), según la medición con un espectrómetro de masas MALDI-TOF, como se describe, *p. ej.*, en WO 2008/077546. Asn297 se refiere al residuo de asparagina ubicado aproximadamente en la posición 297 en la región Fc (numeración Eu de residuos de la región Fc). No obstante, Asn297 también puede ubicarse aproximadamente ± 3

aminoácidos corriente arriba o corriente abajo de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a pequeñas variaciones de secuencia en los anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación pueden tener mejor función de ADCC. Remitirse, p. ej., a las publicaciones de patentes estadounidenses n.º US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpos «desfucosilados» o «deficientes en fucosa» incluyen: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et ál. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et ál. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Los ejemplos de líneas celulares que pueden producir anticuerpos desfucosilados incluyen células CHO Lec13 con deficiencia de fucosilación proteica (Ripka et ál. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); solicitud de patente estadounidense n.º US 2003/0157108 A1, Presta, L y WO 2004/056312 A1, Adams et ál., especialmente en el Ejemplo 11) y líneas celulares inactivadas, como el gen alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8*, células CHO inactivadas (remitirse, p. ej., a Yamane-Ohnuki et ál. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. et ál., *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); y WO2003/085107).

Además se proporcionan variantes de anticuerpos con oligosacáridos bisecados, p. ej., en los que un oligosacárido con dos antenas unido a la región Fc del anticuerpo se biseca mediante GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpos pueden tener menor fucosilación y/o mejor función de ADCC. Los ejemplos de dichas variantes de anticuerpos se describen, p. ej., en WO 2003/011878 (Jean-Mairet et ál.); patente

estadounidense n.º 6.602.684 (Umana et ál) y US 2005/0123546 (Umana et ál). También se proporcionan variantes de anticuerpos con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener mejor función de CDC. Dichas variantes de anticuerpo se describen, p. ej., en WO 1997/30087 (Patel et ál.); WO 1998/58964 (Raju, S.) y WO 1999/22764 (Raju, S.).

Variantes de región Fc

En determinadas modalidades, se pueden introducir una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en la presente, lo que genera una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (p. ej., una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácidos (p. ej., una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos.

En determinadas modalidades, la invención contempla una variante de anticuerpo con algunas, pero no todas las funciones efectoras, lo cual la convierte en un candidato deseable para aplicaciones en las que es importante la semivida del anticuerpo *in vivo*, pero determinadas funciones efectoras (tales como el complemento y ADCC) son innecesarias o perjudiciales. Se pueden realizar ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/el agotamiento de actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, se pueden realizar ensayos de unión al receptor de Fc (FcR) para asegurar que el anticuerpo carezca de unión a FcγR (y, por ende, probablemente carezca de actividad de ADCC), pero conserve la capacidad de unión a FcRn. Las principales células para mediar ADCC, las células NK, solamente expresan Fc(RIII), mientras que los monocitos expresan Fc(RI, Fc(RII y

Fc(RIII). La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). Se describen ejemplos no taxativos de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés en la patente estadounidense n.º 5,500,362 (remitirse, p. ej., a Hellstrom, I. et ál. *Proc. Nat'l Acad. Sci. EUA* 83:7059-7063 (1986)) y Hellstrom, I et ál., *Proc. Nat'l Acad. Sci. EUA* 82:1499-1502 (1985); 5,821,337 (véase Bruggemann, M. et ál., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). De manera alternativa, se pueden utilizar métodos de ensayos no radioactivos (remitirse, por ejemplo, al ensayo de citotoxicidad no radioactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA, y el ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células citolíticas naturales (NK, por su sigla en inglés). De manera alternativa o adicional, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, p. ej., en un modelo animal, tal como el descrito en Clynes et ál. *Proc. Nat'l Acad. Sci. EUA* 95:652-656 (1998). También se pueden llevar a cabo ensayos de unión a Clq para confirmar que el anticuerpo no se puede unir a Clq y, por lo tanto, carece de actividad de CDC. Remitirse, p. ej., a ELISA de unión a Clq y C3c en WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación de complementos, se puede realizar un ensayo de CDC (remitirse, por ejemplo, a Gazzano-Santoro et ál., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. et ál., *Blood* 101:1045-1052 (2003); y Cragg, M.S. y M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)). También se pueden realizar determinaciones de depuración/semivida *in vivo* y unión al FcRn utilizando métodos conocidos en la técnica (remitirse, p. ej., a Petkova, S.B. et ál., *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-

En algunas modalidades, se pueden introducir una o más modificaciones de aminoácidos en la parte Fc del anticuerpo que se proporciona en la presente para aumentar la unión de IgG al receptor Fc neonatal. En determinadas modalidades, el anticuerpo comprende las siguientes tres mutaciones, de acuerdo con la numeración EU: M252Y, S254T y T256E (la «mutación YTE») (patente estadounidense n.º 8,697,650; remitirse también a Dall'Acqua et ál., Journal of Biological Chemistry 281(33):23514-23524 (2006). En determinadas modalidades, la mutación de YTE no afecta la capacidad del anticuerpo de unirse a su antígeno cognado. En determinadas modalidades, la mutación de YTE aumenta la semivida en suero del anticuerpo en comparación con el anticuerpo natural (es decir, no mutante YTE). En algunas modalidades, la mutación de YTE aumenta la semivida en suero del anticuerpo tres veces en comparación con el anticuerpo natural (es decir, no mutante YTE). En algunas modalidades, la mutación de YTE aumenta la semivida en suero del anticuerpo dos veces en comparación con el anticuerpo natural (es decir, no mutante YTE). En algunas modalidades, la mutación de YTE aumenta la semivida en suero del anticuerpo cuatro veces en comparación con el anticuerpo natural (es decir, no mutante YTE). En algunas modalidades, la mutación de YTE aumenta la semivida en suero del anticuerpo al menos cinco veces en comparación con el anticuerpo natural (es decir, no mutante YTE). En algunas modalidades, la mutación de YTE aumenta la semivida en suero del anticuerpo al menos diez veces en comparación con el anticuerpo natural (es decir, no mutante YTE). Remitirse, p. ej., a la patente estadounidense n.º 8,697,650 y remitirse también a Dall'Acqua et ál., Journal of Biological Chemistry 281(33):23514-23524 (2006).

En determinadas modalidades, el mutante YTE brinda un medio para modular la actividad citotóxica mediada por células dependientes del anticuerpo (ADCC, por su sigla en inglés) del anticuerpo. En determinadas modalidades, el mutante YTEO brinda un medio para modular la actividad ADCC de un anticuerpo de IgG humanizado dirigido contra un antígeno humano. Remitirse, p. ej., a la patente estadounidense n.º 8,697,650 y remitirse también a Dall'Acqua et ál., Journal of Biological Chemistry 281(33):23514-23524 (2006).

En determinadas modalidades, el mutante YTE permite la modulación simultánea de la semivida en suero, la distribución tisular y la actividad del anticuerpo (p. ej., la actividad ADCC de un anticuerpo de IgG). Remitirse, p. ej., a la patente estadounidense n.º 8,697,650 y remitirse también a Dall'Acqua et ál., Journal of Biological Chemistry 281(33):23514-23524 (2006).

Los anticuerpos con menor función efectora incluyen los que tienen sustitución de uno o más residuos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (patente estadounidense n.º 6,737,056). Dichos mutantes Fc incluyen los mutantes Fc con sustituciones en dos o más posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, incluido el mutante Fc denominado «DANA» con sustitución de los residuos 265 y 297 con alanina (patente estadounidense n.º 7,332,581).

En determinadas modalidades, la prolina en la posición 329 (numeración EU) (P329) de una región Fc humana de tipo salvaje se sustituye con glicina o arginina o un residuo de aminoácido lo suficientemente grande para destruir el intercalado de prolina en la interfaz del receptor de Fc/Fc.gamma que se forma entre la P329 de la Fc y los residuos de triptófano W87 y W110 de FcγRIII (Sondermann et ál. Nature

406, 267-273 (20 de julio de 2000)). En otra modalidad, al menos una sustitución de aminoácido adicional en la variante de Fc es S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D o P331S y, en aun otra modalidad, dicha sustitución de aminoácido adicional es L234A y L235A de la región Fc de IgG1 humana o S228P y L235E de la región Fc de IgG4 humana, todo según la numeración EU (patente estadounidense n.º 8,969,526, que se incorpora en su totalidad mediante esta referencia).

En determinadas modalidades, un polipéptido comprende una variante de Fc de una región Fc de IgG humana de tipo salvaje, en la que el polipéptido tiene P329 de Fc de IgG humana sustituida con glicina y en la que la variante de Fc comprende al menos dos sustituciones de aminoácidos adicionales en L234A y L235A de la región Fc de IgG1 humana o S228P y L235E de la región Fc de IgG4 humana y en la que los residuos se numeran de acuerdo con la numeración EU (patente estadounidense n.º 8,969,526, que se incorpora en su totalidad mediante esta referencia). En determinadas modalidades, el polipéptido que comprende las sustituciones P329G, L234A y L235A (numeración EU) presenta menor afinidad con respecto a FcγRIIIA y FcγRIIA humano, para modulación en disminución de ADCC de hasta un 20 % de la ADCC inducida por el polipéptido que comprende la región Fc de IgG de tipo salvaje y/o para modulación en disminución de ADCP (patente estadounidense n.º 8,969,526, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia).

En una modalidad específica, el polipéptido que comprende una variante Fc de un polipéptido Fc humano de tipo salvaje comprende una mutación triple: una sustitución de aminoácido en la posición Pro329, una mutación L234A y una mutación L235A de acuerdo con la numeración EU (P329 / LALA) (patente

estadounidense n.º 8,969,526, que se incorpora en su totalidad mediante esta referencia). En modalidades específicas, el polipéptido comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos: P329G, L234A y L235A según la numeración EU.

Se describen determinadas variantes de anticuerpos con mejor o menor unión a FcR. (Remitirse, p. ej., a la patente estadounidense n.º 6,737,056; WO 2004/056312, y Shields et ál., *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001)).

En determinadas modalidades, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran la ADCC, p. ej., sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU de residuos).

En algunas modalidades, se realizan alteraciones en la región Fc que producen unión a C1q modificada (es decir, mejorada o disminuida) y/o citotoxicidad dependiente de complementos (CDC), p. ej., como se describe en la patente estadounidense n.º 6,194,551, WO 99/51642 e Idusogie et ál. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Se describen anticuerpos con mayores semividas y mejor unión al receptor de Fc neonatal (FcRn) que es responsable de la transferencia de IgG materno al feto (Guyer et ál., *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim et ál., *J. Immunol.* 24:249 (1994)), se describen en US2005/0014934A1 (Hinton et ál.). Esos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en esta que mejoran la unión de la región Fc al FcRn. Dichas variantes de Fc incluyen las que tienen sustituciones en uno o más de los residuos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340,

356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, p. ej., sustitución del residuo 434 de la región Fc (patente estadounidense n.º 7,371,826).

Remitirse también a Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); patente estadounidense No. 5,648,260; patente estadounidense No. 5,624,821; y WO 94/29351 con respecto a otros ejemplos de variantes de la región Fc.

Variantes de anticuerpos modificados genéticamente con cisteína

En determinadas modalidades, puede ser deseable crear anticuerpos modificados genéticamente con cisteína, p. ej., un «THIOMAB™» o TDC, en los que uno o más residuos de un anticuerpo se sustituyen con residuos de cisteína. En modalidades particulares, los residuos sustituidos se producen en puntos del anticuerpo disponibles para conjugación. Al sustituir esos residuos con cisteína, se ubican grupos tiol reactivos en sitios accesibles del anticuerpo y se pueden utilizar para conjugar el anticuerpo con otros restos, como restos de fármacos o restos enlazadores de fármacos, para crear un inmunoconjugado, como se describe adicionalmente en el presente. En determinadas modalidades, uno o más cualesquiera de los siguientes residuos se puede sustituir con cisteína: K149 (numeración Kabat) de la cadena ligera, V205 (numeración Kabat) de la cadena ligera, A118 (numeración EU) de la cadena pesada, A140 (numeración EU) de la cadena pesada, L174 (numeración EU) de la cadena pesada, Y373 (numeración EU) de la cadena pesada y S400 (numeración EU) de la región Fc de cadena pesada. En modalidades específicas, los anticuerpos descritos en la presente comprenden la sustitución de cisteína HC-A140C (numeración EU). En modalidades específicas, los anticuerpos descritos en la presente

comprenden la sustitución de cisteína LC-K149C (numeración Kabat). En modalidades específicas, los anticuerpos descritos en la presente comprenden la sustitución de cisteína HC-A118C (numeración EU). Los anticuerpos modificados genéticamente con cisteína pueden generarse como se describe, p. ej., en la patente estadounidense n.º 7,521,541.

En determinadas modalidades, el anticuerpo comprende una de las siguientes sustituciones de cisteína de cadena pesada:

Cadena (HC/LC)	Residuo	N.º de punto de mutación EU	N.º de punto de mutación Kabat
HC	T	114	110
HC	A	140	136
HC	L	174	170
HC	L	179	175
HC	T	187	183
HC	T	209	205
HC	V	262	258
HC	G	371	367
HC	Y	373	369
HC	E	382	378
HC	S	424	420
HC	N	434	430
HC	Q	438	434

En determinadas modalidades, el anticuerpo comprende una de las siguientes sustituciones de cisteína de cadena ligera:

Cadena (HC/LC)	Residuo	N.º de punto de mutación EU	N.º de punto de mutación Kabat
LC	I	106	106
LC	R	108	108
LC	R	142	142
LC	K	149	149
LC	V	205	205

Un ejemplo no taxativo de cadena ligera (LC) de hu7C2.v2.2.LA K149C THIOMAB™ tiene las secuencias de aminoácidos de cadena pesada y cadena ligera de las SEQ ID NO: 26 y 30, respectivamente. Un ejemplo no taxativo de cadena pesada (HC) de hu7C2.v2.2.LA A118C THIOMAB™ tiene las secuencias de aminoácidos de cadena pesada y cadena ligera de las SEQ ID NO: 31 y 25, respectivamente.

Derivados de anticuerpos

En determinadas modalidades, se puede modificar adicionalmente un anticuerpo proporcionado en la presente para contener restos no proteínáceos adicionales que se conocen en la técnica y se encuentran fácilmente disponibles. Los restos adecuados para la derivación del anticuerpo incluyen, de modo no taxativo, polímeros solubles en agua. Los ejemplos no taxativos de polímeros solubles en agua incluyen, de modo no taxativo, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol,

carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1, 3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímeros de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinil pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (p. ej., glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de estos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas de fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede tener cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no ramificado. La cantidad de polímeros unidos al anticuerpo puede variar y, en caso de unión de más de un polímero, estos pueden ser la misma molécula o moléculas diferentes. En general, la cantidad y/o el tipo de polímeros utilizados para la derivación se puede determinar en función de consideraciones que incluyen, de modo no taxativo, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que se desea mejorar, ya sea que el derivado de anticuerpo se utilice en una terapia en condiciones definidas, etc.

En otra modalidad, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y resto no proteináceo que se pueden calentar de forma selectiva mediante exposición a radiación. En una modalidad, el resto no proteináceo es un nanotubo de carbono (Kam et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede tener cualquier longitud de onda e incluye, de modo no taxativo, longitudes de onda que no dañan las células comunes, pero que calientan el resto no proteináceo hasta una temperatura en la que se destruyen las células cercanas al resto no proteináceo del anticuerpo.

Composiciones y métodos recombinantes

Los anticuerpos se pueden producir utilizando composiciones

y métodos recombinantes, p. ej., como se describe en la patente estadounidense n.º 4,816,567. En una modalidad, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo descrito en la presente. Dicho ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende el VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo (p. ej., las cadenas ligera y/o pesada del anticuerpo). En otra modalidad, se proporcionan uno o más vectores (p. ej., vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En una modalidad adicional, se proporciona una célula hospedadora que comprende dicho ácido nucleico. En dicha modalidad, una célula hospedadora comprende (p. ej., se transformó con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo. En una modalidad, la célula hospedadora es eucariota, p. ej., una célula de ovario de hámster chino (CHO, por su sigla en inglés) o una célula linfoide (p. ej., célula Y0, NS0, Sp20). En una modalidad, se proporciona un método para elaborar un anticuerpo, en el que el método comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, como se describió anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo y, opcionalmente, recuperar el anticuerpo de la célula hospedadora (o el medio de cultivo de células hospedadoras).

Para la producción recombinante de un anticuerpo, se aísla un ácido nucleico que codifica un anticuerpo, p. ej., como

se describió anteriormente, y se inserta en uno o más vectores para clonación y/o expresión adicional en una célula hospedadora. Dicho ácido nucleico puede aislarse y secuenciarse fácilmente mediante procedimientos convencionales (p. ej., utilizando sondas de oligonucleótidos que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo).

Las células hospedadoras adecuadas para clonación o expresión de vectores que codifican anticuerpos incluyen células procariotas o eucariotas descritas en la presente. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden producir en bacterias, en particular cuando no son necesarias la glicosilación y la función efectora de Fc. Para la expresión de fragmentos y polipéptidos de anticuerpos en bacterias, remitirse, p. ej., a las patentes estadounidenses n.º 5,648,237, 5,789,199 y 5,840,523. (Remitirse también a Charlton, *Methods in Molecular Biology*, tomo. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), páginas 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpos en *E. coli*). Después de la expresión, el anticuerpo se puede aislar de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y se puede purificar adicionalmente.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas tales como los hongos filamentosos o la levadura son hospedadores de clonación o de expresión adecuados para los vectores que codifican anticuerpos, incluidas cepas de hongos y levadura cuyas vías de glicosilación se encuentran «humanizadas», lo que genera la producción de un anticuerpo con un patrón de glicosilación parcial o completamente humano. Remitirse a Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004) y Li et ál., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión del anticuerpo glicosilado también se derivan de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insectos. Se han identificado diversas cepas de baculovirus que se pueden utilizar junto con células de insectos, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

También se pueden utilizar cultivos de células vegetales como hospedadoras. Remitirse, p. ej., a las patentes estadounidenses n.º 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978 y 6,417,429 (que describen la tecnología de PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

También se pueden utilizar como hospedadoras las células de vertebrados. Por ejemplo, las líneas celulares de mamíferos que se adaptan para crecimiento en suspensión pueden ser útiles. Otros ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamíferos útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada con SV40 (COS-7), la línea embrionaria humana de riñón (293 o células 293 como se describe, p. ej., en Graham et ál., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977), células de riñón de hámster bebé (BHK, por su sigla en inglés), células de sertoli de ratón (células TM4, como se describió, p. ej., en Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980), células de riñón de mono (CV1), células de riñón de mono verde africano (VERO-76), células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, por su sigla en inglés), células de riñón canino (MDCK; células de hígado de rata y búfalo (BRL 3A), células de pulmón humano (W138), células de hígado humano (Hep G2), tumor de mama de ratón (MMT 060562), células TRI, como se describe, p. ej., en Mather et ál., *Annals N.Y. Acad. Sci.*

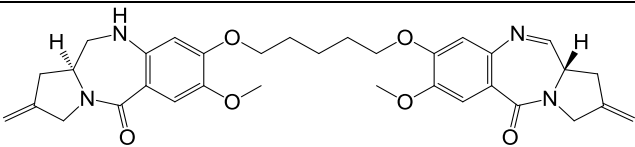
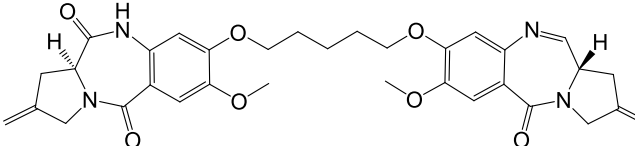
383:44-68 (1982), células MRC 5 y células FS4. Otras líneas celulares hospedadoras de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluidas células CHO DHFR- (Urlaub et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 77:4216 (1980)) y líneas celulares de mieloma tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Se puede encontrar un análisis de determinadas líneas celulares hospedadoras de mamíferos adecuadas para la producción de anticuerpos, p. ej., en Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, tomo 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

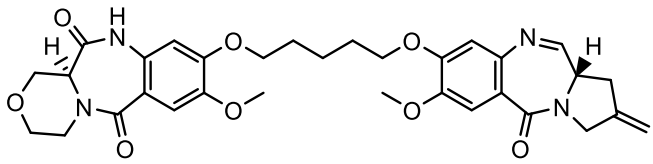
RESTOS DE FÁRMACO DE PIRROLOBENZODIAZEPINA MONOALQUILADOR

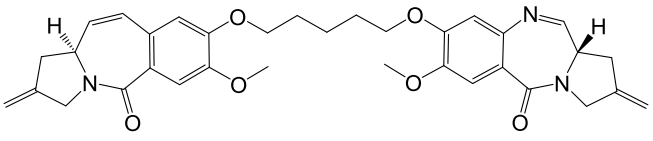
Un compuesto de conjugado de anticuerpo-fármaco de la invención comprende un resto de fármaco de pirrolobenzodiazepina monoalquilador derivado en el grupo N10 con un enlazador disulfuro en el anticuerpo.

Se elaboraron ejemplos de restos de fármaco de pirrolobenzodiazepina (PBD) monoalquilador, que se muestran en la Tabla 1a.

Tabla 1a Restos de fármaco de pirrolobenzodiazepina monoalquilador

N.º	Estructura	Nombre IUPAC	LC/MS M+H
DM-1		(S)-7-metoxi-8-((5-((S)-7-metoxi-2-metileno-5-oxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-2-metileno-2,3-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-5(11aH)-ona	587
DM-2		(S)-7-metoxi-8-((5-((S)-7-metoxi-2-metileno-5-oxo-2,3,5,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-2-metileno-2,3-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepina-5,11(10H,11aH)-diona	601

DM- 3		(S)-8-metoxi-9- ((5-(((S)-7- metoxi-2- metileno-5-oxo- 2,3,5,11a- tetrahidro-1H- benzo[e]pirrolo [1,2- a][1,4]diazepin -8- il)oxi)pentil)o xi)-1,3,4,12a- tetrahidro-6H- benzo[e][1,4]ox azino[4,3- a][1,4]diazepin a-6,12(11H)- diona	605
----------	--	---	-----

DM- 4		(S)-7-metoxi-8- ((5-(((S)-7- metoxi-2- metileno-5-oxo- 2,3,5,11a- tetrahidro-1H- benzo[e]pirrolo [1,2-a]azepin- 8- il)oxi)pentil)o xi)-2-metileno- 1,2,3,11a- tetrahidro-5H- benzo[e]pirrolo [1,2- a][1,4]diazepin -5-ona	584
----------	--	---	-----

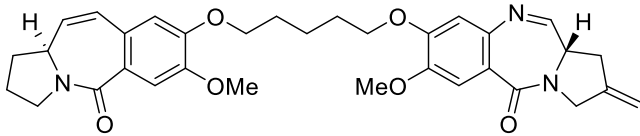
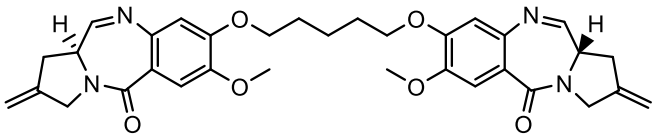
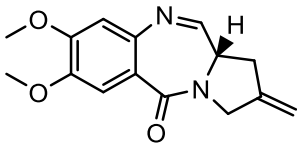
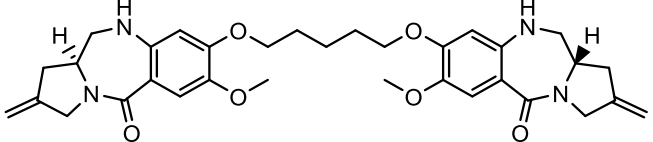
DM-5		(S)-7-metoxi-8-((5-((S)-7-metoxi-2,3,5,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a]azepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-2-metilen-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-5-ona	572
------	--	--	-----

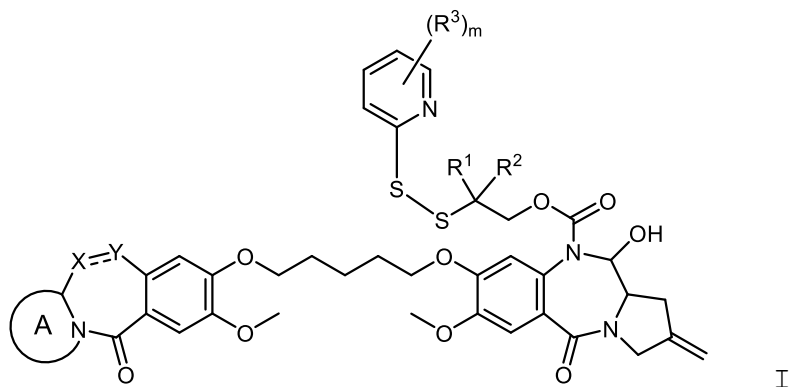
Tabla 1b Restos de fármaco comparador

com puesto n.º	Estructura	Nombre IUPAC
C-1		(11aS,11a'S)-8,8'-(pentano-1,5-diilbis(oxi))bis(7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-5-ona)
C-2		(S)-7,8-dimetoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-5-ona
C-3		(11aS,11a'S)-8,8'-(pentano-1,5-diilbis(oxi))bis(7-metoxi-2-metileno-1,2,3,10,11,11a-hexahidro-5H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-5-ona)

INTERMEDIOS DE ENLAZADOR-FÁRMACO DE PIRROLOBENZODIAZEPINA MONOALQUILADOR

Se puede preparar un compuesto de conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención mediante conjugación de un intermedio enlazador-fármaco de pirrolobenzodiazepina monoalquilador con un anticuerpo. El grupo tiopiridilo del intermedio enlazador-fármaco se desplaza mediante una tiol cisteína del anticuerpo para formar un ADC enlazado con disulfuro.

El intermedio enlazador-fármaco de pirrolobenzodiazepina monoalquilador tiene la Fórmula I:



en la que $X=Y$ se selecciona de $\text{CH}_2\text{-CH}_2$, CH=CH , C(=O)-NH y $\text{CH}_2\text{-NH}$;

A es un anillo heterocíclico de 5 miembros o 6 miembros, opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado de F, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ y $=\text{C(R)}_2$, donde R se selecciona independientemente de H, F, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ y fluoroalquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$,

R^1 y R^2 se seleccionan independientemente de H y alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ o R^1 y R^2 forman un grupo heterocíclico o cicloalquilo de 3, 4, 5 o 6 miembros,

R^3 se selecciona independientemente de NO_2 , Cl, F, CN, CO_2H y Br y

m es 0, 1 o 2.

En un ejemplo de modalidad, A es un anillo de 5 miembros.

En un ejemplo de modalidad, A es un anillo de 5 miembros sustituido con un grupo metileno exocíclico, =CH₂.

En un ejemplo de modalidad, A es un anillo de 6 miembros.

En un ejemplo de modalidad, A es un anillo de morfolinilo.

En un ejemplo de modalidad, R¹ es -CH₃ y R² es H.

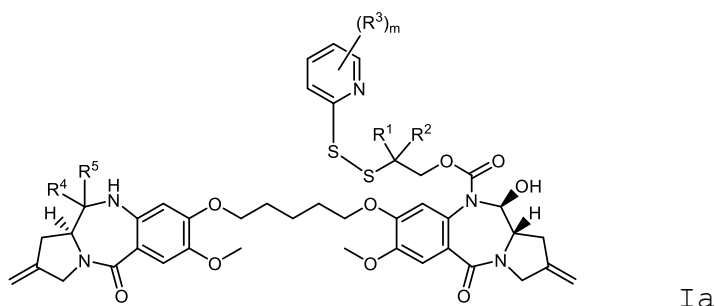
En un ejemplo de modalidad, R¹ y R² forman ciclopropilo o ciclobutilo.

En un ejemplo de modalidad, R³ es -NO₂ y m es 1.

En un ejemplo de modalidad, X==Y es CH₂-CH₂ o CH=CH.

En un ejemplo de modalidad, X==Y es C(=O)-NH o CH₂-NH.

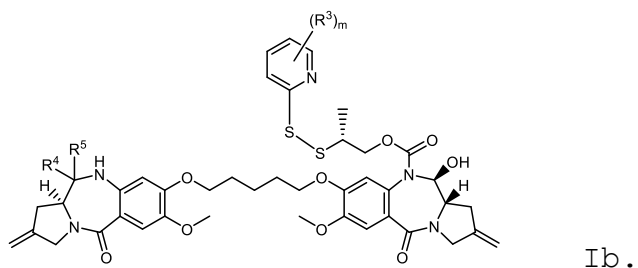
Un ejemplo de modalidad de intermedio enlazador-fármaco de pirrolobenzodiazepina monoalquilador es la Fórmula Ia:



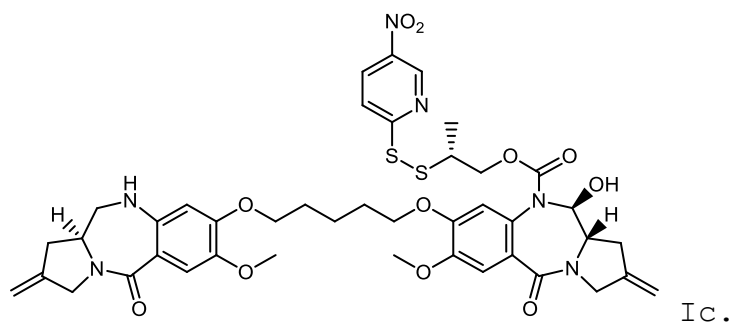
En un ejemplo de modalidad, cada uno de R⁴ y R⁵ es H.

En un ejemplo de modalidad, R⁴ y R⁵ son =O.

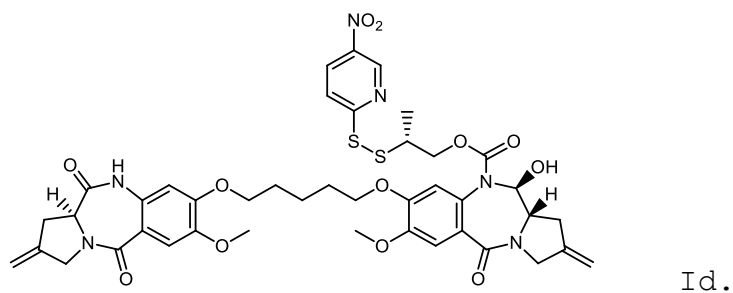
Un ejemplo de modalidad de un intermedio enlazador-fármaco de pirrolobenzodiazepina monoalquilador es la Fórmula Ib:



Un ejemplo de modalidad de un intermedio enlazador-fármaco de pirrolobenzodiazepina monoalquilador es la Fórmula Ic:



Un ejemplo de modalidad de un intermedio enlazador-fármaco de pirrolobenzodiazepina monoalquilador es la Fórmula Id:



Sin deseo de limitarse a ningún mecanismo o efecto

particular, la presencia de un grupo aceptor de electrones R^3 como NO_2 , Cl , F , CN , CO_2H o Br en el anillo piridilo del intermedio enlazador de pirrolobenzodiazepina monoalquilador acelera la reacción con una cisteína tiol de un anticuerpo modificado con cisteína. Cuando se introduce la cisteína tiol en el punto menos reactivo o afectado en el anticuerpo, dicho intermedio enlazador de pirrolobenzodiazepina monoalquilador puede brindar una reacción de conjugación más eficaz con un anticuerpo en relación a un análogo de piridilo no sustituido correspondiente ($R^3 = \text{H}$).

Se muestran ejemplos de intermedios de enlazador-fármaco de pirrolobenzodiazepina monoalquilador en la Tabla 2A. Se muestran intermedios de enlazador-fármaco de pirrolobenzodiazepina dialquilador comparadores en la Tabla 2B. En los ejemplos se describe la síntesis de comparadores e intermedios de enlazador-fármaco.

Tabla 2A Intermedio enlazador-fármaco de pirrolobenzodiazepina monoalquilador

LD	Estructura	Nombre IUPAC
N.º		

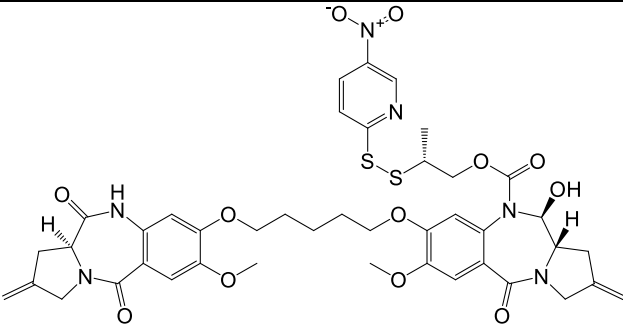
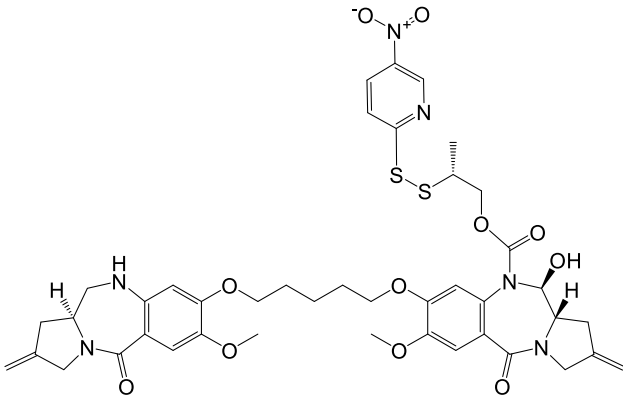
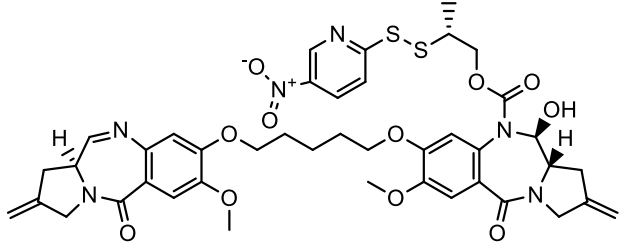
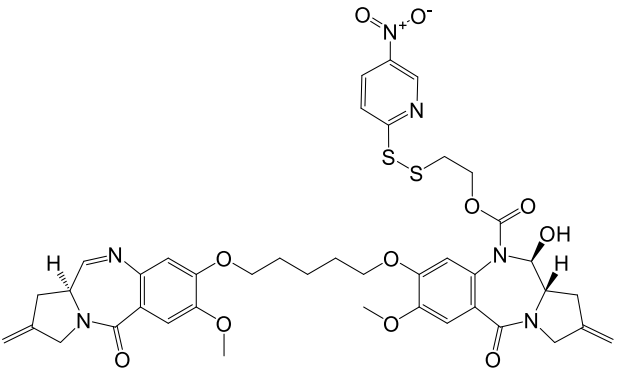
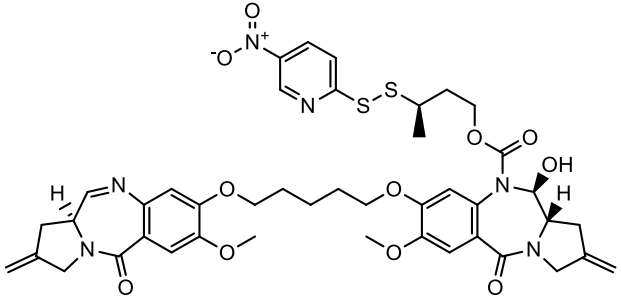
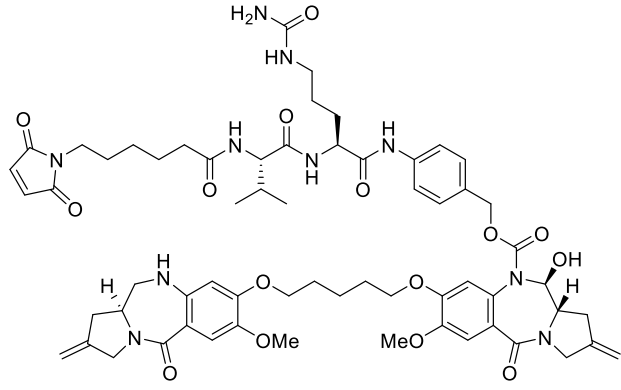
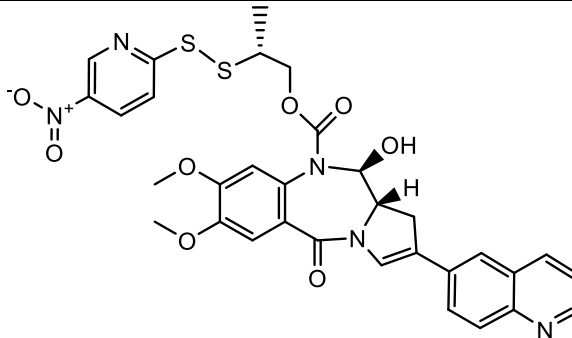
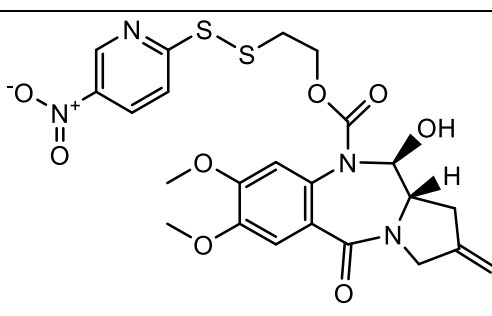
LD-51		11-hidroxi-7-metoksi-8-((5-((S)-7-metoksi-2-metileno-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-2-metileno-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepina-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-(R)-2-((5-nitropiridin-2-il)disulfanil)propil o
LD-52		11-hidroxi-7-metoksi-8-((5-((S)-7-metioxi-2-metileno-5-oxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-2-metileno-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepina-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-(R)-2-((5-nitropiridin-2-il)disulfanil)propil o

Tabla 2B Intermedios enlazador-fármaco de
pirrolobenzodiazepina comparador

N.º	Estructura	Nombre IUPAC
CLD-1		11-hidroxi-7-metoxi-8-((5-((S)-7-metoxi-2-metileno-5-oxo-2,3,5,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-2-metileno-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepina-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-I-2-((5-nitropiridin-2-il)disulfanil)propil o
CLD-2		(11S,11aS)-11-hidroxi-7-metoxi-8-((5-((S)-7-metoxi-2-metileno-5-oxo-2,3,5,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-2-metileno-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepina-10(5H)-carboxilato de 2-((5-nitropiridin-2-il)disulfanil)etilo

CLD-3		11-hidroxi-7-metoxi-8-((5-((S)-7-metoxi-2-metileno-5-oxo-2,3,5,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-2-metileno-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepina-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-I-3-((5-nitopiridin-2-il)disulfanil)butilo
-------	--	--

CLD-4		(11S,11aS)-11-hidroxi-7-metoxi-8-((5-((S)-7-metoxi-2-metileno-5-oxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-2-metileno-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepina-10(5H)-carboxilato de 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)benzilo
-------	---	--

CLD-5		(11S,11aS)-11-hidroxi-7,8-dimetoxi-5-oxo-2-(quinolin-6-il)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepina-10(5H)-carboxilato de (R)-2-((5-nitropiridin-2-il)disulfanil)propilo
CLD-6		(11S,11aS)-11-hidroxi-7,8-dimetoxi-2-metileno-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepina-10(5H)-carboxilato de 2-((5-nitropiridin-2-il)disulfanil)etilo

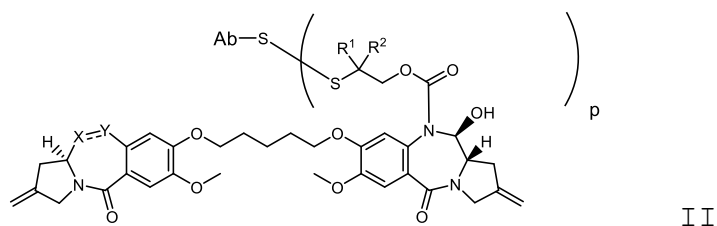
CONJUGADOS DE ANTICUERPO-FÁRMACO (ADC)

Los compuestos de conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención comprenden un anticuerpo específico para un antígeno asociado con tumor unido de forma covalente, enlazado a un resto de fármaco de pirrolobenzodiazepina monoalquilador potente derivado en el grupo N10 con un enlazador disulfuro, e incluyen los que tienen actividad biológica. Los ADC de la invención pueden tener actividad terapéutica y ser eficaces contra diversos trastornos hiperproliferativos, incluido cáncer. La actividad biológica del resto de fármaco de pirrolobenzodiazepina monoalquilador se modula mediante conjugación con un anticuerpo. Los ADC de la invención administran selectivamente una dosis eficaz del fármaco de pirrolobenzodiazepina monoalquilador o la toxina a una célula tumoral o un punto, con lo cual se puede lograr mayor selectividad, es decir, una dosis eficaz menor, a la vez que se aumenta el índice terapéutico («ventana

terapéutica»). En un ejemplo de modalidad, los compuestos de ADC incluyen un anticuerpo modificado con cisteína conjugado, es decir, unido de forma covalente mediante un enlazador, al resto de fármaco de pirrolobenzodiazepina monoalquilador.

Se debe comprender que cuando más de un grupo cisteína tiol nucleofílico de un anticuerpo reacciona con un intermedio enlazador-fármaco o reactivo enlazador, entonces el producto resultante es una mezcla de compuestos ADC con una distribución de uno o más restos de fármaco unidos a un anticuerpo. Se puede calcular la cantidad promedio de fármacos por anticuerpo (DAR, por su sigla en inglés) en la mezcla mediante un ensayo de anticuerpo ELISA doble, que es específico para el anticuerpo y específico para el fármaco. Se pueden identificar moléculas de ADC individuales en la mezcla mediante espectroscopia de masas y separar mediante HPLC, p. ej., cromatografía de interacción hidrofóbica (remitirse, p. ej., a McDonagh et ál. (2006) *Prot. Engr. Design & Selection* 19(7):299-307; Hamblett et ál (2004) *Clin. Cancer Res.* 10:7063-7070; Hamblett, K.J., et ál. "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate," Resumen n.º 624, Asociación estadounidense para investigación del cáncer, reunión anual de 2004, 27-31 de marzo de 2004, actas de la AACR, tomo 45, marzo de 2004; Alley, S.C., et ál. "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates," Resumen n.º 627, Asociación estadounidense para investigación del cáncer, reunión anual de 2004, 27-31 de marzo de 2004, actas de la AACR, tomo 45, marzo de 2004). En determinadas modalidades, se puede aislar de la mezcla de conjugación un ADC homogéneo con un valor de carga único mediante electroforesis o cromatografía.

Un compuesto de conjugado de anticuerpo-fármaco de la invención tiene la estructura de la Fórmula II:



o una sal farmacéuticamente aceptable de esta, en la que:
en la que:

X=Y se selecciona de CH₂-CH₂, CH₂-C(=O), CH=CH o CH₂-NH;

R¹ y R² se seleccionan independientemente de H o alquilo C₁-C₆ o R¹ y R² forman un grupo heterocíclico o cicloalquilo de 3, 4, 5 o 6 miembros,

p es un número entero de 1 a 8, y

Ab es un anticuerpo.

En un ejemplo de modalidad, el anticuerpo se une a uno o más antígenos asociados con tumor o receptores de superficie celular seleccionados de (1)-(53):

(1) BMPR1B (receptor de proteínas morfogénicas óseas-tipo IB),

(2) E16 (LAT1, SLC7A5),

(3) STEAP1 (antígeno epitelial de seis transmembranas de la próstata),

(4) MUC16 (0772P, CA125),

(5) MPF (MPF, MSLN, SMR, factor que potencia megacariocitos, mesotelina),

(6) Napi2b (NAPI-3B, NPTIIb, SLC34A2, familia portadora de soluto 34 (fosfato de sodio), miembro 2, transportador de fosfato dependiente de sodio tipo II 3b),

(7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, semaforina 5b Hlog, dominio sema, siete repeticiones de

trombospondina (tipo 1 y similar a tipo 1), dominio transmembrana y dominio citoplasmático corto, (semaforina 5B),

(8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, ADNc RIKEN 2700050C12, gen de ADNc RIKEN 2700050C12),

(9) ETBR (receptor de endotelina tipo B),

(10) MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315),

(11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen 1 asociado al cáncer de próstata, próstata 1 asociada al cáncer de próstata, antígeno epitelial prostática de seis transmembrana 2, proteína prostática de seis transmembranas),

(12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, canal catiónico potencial de receptores transitorios, subfamilia M, miembro 4),

(13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma),

(14) CD21 (CR2 (receptor de complemento 2) o C3DR (C3d/receptor de virus de Epstein Barr) o Hs 73792),

(15) CD79b (CD79B, CD79 β , Igb (beta asociada con inmunoglobulina), B29),

(16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (dominio SH2 con proteína de anclaje fosfatasa 1a), SPAP1B, SPAP1C),

(17) HER2,

(18) NCA,

(19) MDP,

(20) IL20R α ,

(21) Brevican,

(22) EphB2R,

(23) ASLG659,

(24) PSCA,

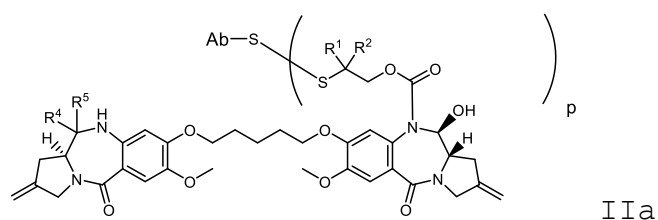
(25) GEDA,

(26) BAFF-R (receptor del factor que activa los linfocitos B, receptor 3 BlyS, BR3),

(27) CD22 (isoforma CD22-B del receptor de linfocitos B),
(28) CD79a (CD79A, CD79 α , alfa asociada con inmunoglobulina),
(29) CXCR5 (receptor 1 de linfoma de Burkitt),
(30) HLA-DOB (subunidad beta de molécula del MHC de clase II (antígeno Ia)),
(31) P2X5 (canal iónico 5 regulado por ligando P2X del receptor purinérgico),
(32) CD72 (antígeno de diferenciación de linfocitos B CD72, Lyb-2),
(33) LY64 (antígeno linfocítico 64 (RP105), proteína de membrana tipo I de la familia de repetición rica en leucina (LRR, por su sigla en inglés)),
(34) FcRH1 (proteína 1 similar al receptor de Fc),
(35) FcRH5 (IRTA2, receptor 2 de la superfamilia de inmunoglobulina asociado con translocación),
(36) TENB2 (proteoglicano de transmembrana putativo),
(37) PMEL17 (homólogo de plata; SILV; D12S53E; PMEL17; SI; SIL),
(38) TMEFF1 (proteína de transmembrana con dominios 1 tipo EGF y tipo dos folistatina, Tomorregulina-1),
(39) GDNF-Ra1 (receptor alfa 1 de familia GDNF, GFRA1; GDNFR; GDNFRA; RETL1; TRNR1; RET1L; GDNFR-alfa1; GFR-ALPHA-1),
(40) Ly6E (complejo del antígeno linfocítico 6, locus E; Ly67, RIG-E, SCA-2, TSA-1),
(41) TMEM46 (homólogo shisa 2 (*Xenopus laevis*); SHISA2),
(42) Ly6G6D (complejo de antígeno linfocítico 6, locus G6D; Ly6-D, MEGT1),
(43) LGR5 (receptor 5 acoplado a proteína G con repetición rica en leucina; GPR49, GPR67),
(44) RET (proto-oncogén ret; MEN2A; HSCR1; MEN2B; MTC1; PTC; CDHF12; Hs.168114; RET51; RET-ELE1),
(45) LY6K (complejo de antígeno linfocítico 6, locus K; LY6K; HSJ001348; FLJ35226),

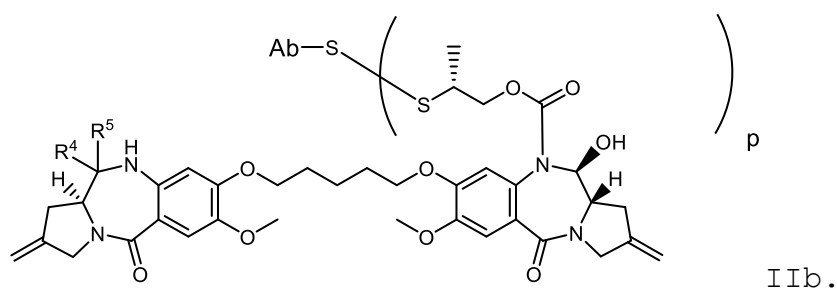
- (46) GPR19 (receptor 19 acoplado a proteína G; Mm.4787),
 (47) GPR54 (receptor KISS1; KISS1R; GPR54; HOT7T175; AXOR12),
 (48) ASPHD1 (dominio beta-hidroxilasa de aspartato con 1; LOC253982),
 (49) Tirosinasa (TYR; OCA1A; OCA1A; tirosinasa; SHEP3),
 (50) TMEM118 (proteína anular, transmembrana 2; RNFT2; FLJ14627),
 (51) GPR172A (receptor 172A acoplado a proteína G; GPCR41; FLJ11856; D15Erttd747e),
 (52) CD33 o
 (53) CLL-1.

Los ejemplos de compuestos de conjugado de anticuerpo-fármaco incluyen la Fórmula IIa:



Los ejemplos de compuestos de conjugado de anticuerpo-fármaco de la Fórmula IIa incluyen aquellos en los que cada uno de R⁴ y R⁵ es H o R⁴ y R⁵ son =O.

Los ejemplos de compuestos de conjugado de anticuerpo-fármaco incluyen la Fórmula IIb:



Se prepararon conjugados de fármaco-anticuerpo ADC-101 - ADC-119 de la Tabla 3A conjugando un intermedio enlazador-fármaco de pirrolobenzodiazepina monoalquilador LD-51 o LD-52 de la Tabla 2A, con un anticuerpo, incluido un anticuerpo modificado con cisteína. Se prepararon conjugados de fármaco-anticuerpo comparador ADC-201 - ADC-211 de la Tabla 3B conjugando un intermedio enlazador-fármaco de pirrolobenzodiazepina comparador CLD-1-6 de la Tabla 2B, con un anticuerpo, incluido un anticuerpo modificado con cisteína.

Tabla 3A Conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de disulfuro monoalquilador

ADC	Fórmula de ADC	Enlazador-fármaco LD n.º (Tabla 2A)	DAR*
ADC-101	Tio anti-Her2 hu7C2 LC K149C-(LD-51)	51	1,9
ADC-102	Tio anti-Her2 hu7C2 LC K149C-(LD-51)	51	1,9
ADC-103	Tio Hu Anti-CD22 10F4v3 LC K149C- (LD-51)	51	2,0
ADC-104	Tio anti-Her2 hu7C2 LC K149C-(LD-51)	51	1,9
ADC-105	Tio Hu Anti-CD22 10F4v3 LC K149C- (LD-51)	51	2,0
ADC-106	Tio anti-Her2 hu7C2 LC K149C-(LD-51)	51	2,0

ADC-107	Tio Hu Anti-CD22 10F4v3 LC K149C -(LD-52)	52	1,95
ADC-108	Tio Hu-Anti-Her2 hu7C2 LC K149C-(LD-52)	52	1,99
ADC-109	Tio anti-Her2 hu7C2 LC K149C-(LD-51)	51	2,0
ADC-110	Tio Hu Anti-CD22 10F4v3 LC K149C -(LD-51)	51	1,98
ADC-111	Tio Hu Anti-CD22 10F4v3 LC K149C HC L177C -(LD-51)	51	3,6
ADC-112	Tio Hu Anti-CD22 10F4v3 LC K149C HC L177C HC Y376C -(LD-51)	51	5,4
ADC-113	Tio Hu Anti-HER2 4D5 LC K149C HC L177C -(LD-51)	51	3,9

ADC-114	Tio Hu Anti-HER2 4D5 LC K149C HC L177C HC Y376C -(LD-51)	51	
ADC-115	Tio Hu Anti-Ly6E 9B12.v12 LC K149C -(LD-51)	51	2,0
ADC-116	Tio Hu Anti-CD22 10F4v3 HC L177C -(LD-51)	51	
ADC-117	Tio Hu Anti-HER2 hu7C2 HC L177C -(LD-51)	51	
ADC-118	Tio Hu Anti-CD22 10F4v3 HC Y376C -(LD-51)	51	
ADC-119	Tio Hu Anti-HER2 hu7C2 HC Y376C -(LD-51)	51	

Tabla 3B Conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) comparadores

ADC	Fórmula de ADC	Enlazador-fármaco (Tabla 2B)	DAR*
ADC-201	Tio anti-Her2 hu7C2 LC K149C- (CLD-1)	CLD-1	1,84
ADC-202	Tio Hu Anti-CD22 10F4v3 - (CLD-1)	CLD-1	1,8
ADC-203	Tio Anti-Her2 hu7C2 LC K149C- (CLD-3)	CLD-3	2,0
ADC-204	Tio Hu Anti-CD22 10F4v3 LC K149C-MC-vc-PAB-PBD mono-amina- (CLD-4)	CLD-4	2,0
ADC-205	tio Anti-Her2 hu7C2 LC K149C-MC-vc-PAB-PBD mono-amina- (CLD-4)	CLD-4	1,9
ADC-206	Tio Hu Anti-CD22 10F4v3 LC K149C- (CLD-4)	CLD-4	2,0
ADC-207	Tio Hu Anti-CD22 10F4v3 LC K149C- (CLD-2)	CLD-2	1,96
ADC-208	Tio Hu Anti-NaPi2b 10H1.11.4B LC K149C- (CLD-2)	CLD-2	1,96
ADC-209	Tio Hu Anti-gD 5B6 LC K149C- (CLD-4)	CLD-4	
ADC-210	Tio Hu Anti-Ly6E 9B12.v12 LC K149C- (CLD-4)	CLD-4	2,0
ADC-211	Tmab-DM1 (trastuzumab emtansina)	DM1	3,8
ADC-212	Tio Hu anti-Ly6E LC K149C- (CLD-1)	CLD-1	

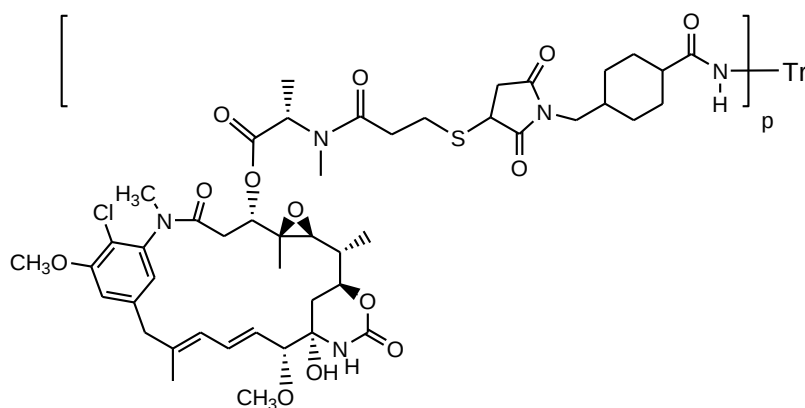
A118C (numeración EU) = A121C (numeración en secuencia) = A114C (numeración Kabat)

K149C (numeración Kabat) de cadena ligera

Anticuerpo mutante modificado con cisteína («tio»), tipo salvaje («WT», por su sigla en inglés), cadena ligera («LC»), cadena pesada («HC»), 6-maleimidocaproilo («MC»), maleimidopropanoilo («MP»), valina-citrulina («val-cit» o «vc»), alanina-fenilalanina («ala-phe»), p-aminobencilo

(«PAB») y p-aminobenciloxicarbonilo («PABC»).

El ADC-211 comparador, trastuzumab emtansina (KADCYLA®, trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1, Tmab-DM1), es un conjugado de anticuerpo-fármaco (n.º de reg. CAS 139504-50-0; Phillips G. et ál. (2008) Cancer Res. 68:9280-90; US 8142784) y tiene la estructura:



en la que Tr es el anticuerpo anti-HER2 trastuzumab.

ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR IN VITRO

En general, la actividad citotóxica o citostática de un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) se mide de la siguiente forma: exponiendo células de mamífero con expresión de proteínas receptoras, p. ej., HER2, al anticuerpo del ADC en un medio de cultivo celular, cultivando las células durante un período de alrededor de 6 horas a alrededor de 5 días y midiendo la viabilidad celular. Se utilizaron ensayos *in vitro* a base de células para medir la viabilidad (proliferación), citotoxicidad e inducción de apoptosis (activación de caspasa) del ADC de la invención.

La potencia *in vitro* de conjugados de anticuerpo-fármaco

(ADC) se midió con un ensayo de proliferación celular (Ejemplo 6). El ADC de la invención mostró una potencia sorprendente e inesperada en la inhibición de la proliferación de células tumorales. La potencia del ADC se correlacionó con la expresión de antígenos objetivo de las células. Los conjugados analizados pueden unirse al antígeno específico expresado en la superficie de células y provocar la muerte de dichas células *in vitro*.

El ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® es un método de ensayo homogéneo comercialmente disponible (Promega Corp., Madison, WI) en base a la expresión recombinante de luciferasa *Coleoptera* (US 5583024; US5674713; US5700670). Este ensayo de proliferación celular determina la cantidad de células viables en el cultivo según la cuantificación del ATP presente, un indicador de células metabólicamente activas (Crouch et ál (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88; US 6602677). El ensayo CellTiter-Glo® se realizó en formato de 96 pocillos, lo que lo hace susceptible de análisis de alto rendimiento (HTS, por su sigla en inglés) automático (Cree et ál (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404). El procedimiento de ensayo homogéneo implica agregar el único reactivo (reactivo CellTiter-Glo®) directamente a las células cultivadas en medio complementado con suero. No se necesita lavado celular, extracción del medio ni múltiples etapas de colocación con pipeta. El sistema detecta hasta 15 células/pocillo en un formato de 384 pocillos en 10 minutos tras la adición del reactivo y la mezcla. Las células se pueden tratar de forma continua con ADC o se pueden tratar y separar del ADC. Generalmente, las células con tratamiento breve, es decir, 3 horas, mostraron los mismos efectos de potencia que las células tratadas de forma continua.

El formato homogéneo de «adición-mezcla-medición» produce

lisis celular y generación de una señal luminiscente proporcional a la cantidad de ATP presente. La cantidad de ATP es directamente proporcional a la cantidad de células presentes en el cultivo. El ensayo CellTiter-Glo® genera una señal luminiscente «tipo brillo», producida mediante la reacción de luciferasa, que tiene una semivida generalmente superior a cinco horas, dependiendo del tipo de célula y el medio utilizado. Las células viables se reflejan en unidades de luminiscencia relativa (RLU, por su sigla en inglés). El sustrato, luciferina de escarabajo, se descarboxila de forma oxidativa mediante luciferasa de luciérnaga recombinante con conversión concomitante de ATP en AMP y generación de fotones.

Se utilizan ensayos *in vitro* a base de células para medir la viabilidad (proliferación), citotoxicidad e inducción de apoptosis (activación de caspasa) del ADC de la invención. En general, la actividad citotóxica o citostática de un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) se mide de la siguiente forma: exponiendo células de mamífero con expresión de antígeno, como polipéptidos Her2 o MUC16, a ADC en un medio de cultivo celular, cultivando las células durante un período de alrededor de 6 horas a alrededor de 5 días y midiendo la viabilidad celular. Las células de mamífero útiles para ensayos de proliferación celular para ADC anti-MUC16 incluyen: (1) una línea celular con expresión del polipéptido MUC16 OVCAR-3; (2) una línea celular derivada de PC3 modificada genéticamente para expresar de forma estable una parte del polipéptido MUC16 en su superficie celular (PC3/MUC16); (3) la línea celular PC3 original que no expresa el polipéptido MUC16, y (4) una línea celular PC3 que no expresa el polipéptido MUC16 pero transporta el vector que se utiliza para impulsar la expresión de MUC16 exógeno (PC3/neo).

Las figuras 1A, 1B, 1C muestran monoamina de ADC-107 Tio Hu Anti-CD22 10F4v3 LC K149C-(LD-52) con una potencia de un solo dígito de nM con una diferencia de alrededor de 4 veces con respecto al ADC-108 de control no objetivo en BJAB (Fig. 1A), una diferencia de alrededor de 7 veces con respecto al control no objetivo en WSU-DLCL2 (Fig. 1B) y una potencia alrededor de 5 veces mayor que el ADC-108 de control no objetivo en Jurkat (Fig. 1C). ADC-107 monoamina es alrededor de 10 veces y alrededor de 22 veces más potente que ADC-103 Tio Hu Anti-CD22 10F4v3 LC K149C-(LD-51) mono-amida y ADC-108 de control no objetivo en BJAB y WSU-DLCL2, respectivamente (Figuras 1A-C).

Tabla 4 Ensayo de proliferación celular *in vitro* de conjugados de anticuerpo-fármaco (Figuras 1F,1G)

ADC	Enlazador-fármaco	Objetivo	% de acumulación	DAR	SK-BR-3 IC ₅₀ (ng/mL)	KPL-4 IC ₅₀ (ng/mL)
108	LD-52	HER2 (hu7C2)	2,28	1,99	0,6	1,0
107		CD22	2,24	1,95	44,5	57,4
102	LD-52	HER2 (hu7C2)	2,9	1,9	3,3	103
203	CLD-3	HER2 (hu7C2)	3,2	2,0	>1000	>1000
201	CLD-1	HER2 (hu7C2)	3,6	1,84	0,1	0,3

Tabla 5 Potencia *in vitro* (Figuras 1A, 1B, 1C)

ADC	DAR	BJAB IC50		WSU-DLCL2 IC50		Jurkat IC50	
		nM	ng/mL	nM	ng/mL	nM	ng/mL
103	2	17,68	2650,34	34,39	5156,08	42,92	6434,14
107	1,95	1,70	254,20	1,56	234,11	8,70	1303,63
108	1,99	8,46	1268,70	11,27	1689,31	8,96	1342,60

EFICACIA IN VIVO

La eficacia *in vivo* de conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) se midió a través de inhibición del crecimiento tumoral en ratones (Ejemplo 7). El ADC de la invención mostró una potencia sorprendente e inesperada en la inhibición del crecimiento tumoral. La eficacia del ADC se correlacionó con la expresión de antígenos objetivo de las células tumorales.

La eficacia de los conjugados de anticuerpo-fármaco se midió *in vivo* implantando aloinjertos o xenoinjertos de células cancerosas en roedores y tratando los tumores con ADC. Se prevén resultados variables dependiendo de la línea celular, la especificidad de la unión de anticuerpo del ADC a los receptores presentes en las células cancerosas, el régimen de dosificación y otros factores. La eficacia *in vivo* del ADC se midió utilizando un modelo de ratón de explante transgénico que expresa niveles moderados a elevados de antígeno asociado con tumor, como Her2, CD22 y Ly6E. Los sujetos se trataron una vez con ADC y se controlaron durante 3-6 semanas para medir el tiempo hasta la duplicación del tumor, la destrucción celular logarítmica y el encogimiento del tumor. Se realizaron experimentos de seguimiento de dosis

múltiple y respuesta a la dosis.

Por ejemplo, la eficacia *in vivo* de un ADC anti-HER-2 de la invención se puede medir con un modelo de ratón de explante transgénico con expresión elevada de HER2 (Phillips et al (2008) Cancer Res. 68:9280-90). Se propaga un aloinjerto del ratón transgénico mmtv Fo5 que no responde o que responde poco a la terapia con HERCEPTIN®. Los sujetos se trataron una vez con ADC a determinados niveles de dosis (mg/kg) y control de amortiguador con placebo (vehículo) y se controlaron durante dos semanas o más para medir el tiempo hasta la duplicación tumoral, la destrucción celular logarítmica y el encogimiento del tumor.

La figura 2 muestra la eficacia de conjugados de anticuerpo-fármaco ADC-202, ADC-103, and ADC-102 en una gráfica del cambio de volumen tumoral ajustado *in vivo* en el tiempo en el modelo de xenoinjerto WSU-DLCL2 en ratones SCID Fox Chase CB-17.

La figura 3 muestra la eficacia de conjugados de anticuerpo-fármaco en una gráfica del cambio de volumen tumoral ajustado *in vivo* en el tiempo en el modelo de xenoinjerto Bjab-luc en ratones SCID Fox Chase CB-17. Las dosis de 0,2 y 0,4 mg/kg de ADC-202 comparador producen regresión tumoral y la dosis de 0,1 mg/kg produce un TGI del 62 %. El espectro de TGI de 40-58 % en las dosis de 1, 2 y 4 mg/kg de ADC-105 monoamida indica que estos niveles de dosis tienen una respuesta similar y solamente la mayor dosis de 8 mg/kg muestra actividad considerable, TGI del 89 %. Asimismo, la actividad a 8 mg/kg cae entre las dosis de 0,1 y 0,2 mg/kg de ADC-202 dialquilador comparador, lo que produce una potencia ~50x menor. El ADC-104 monoamida anti-Her2 hu7C2 de control fuera de objetivo a 8 mg/kg mostró una actividad 2 veces menor que

el control fuera de objetivo de ADC-201 anti-Her2 hu7C2 comparador a 0,4 mg/kg, 18 v. 36 % de TGI. En la evaluación de seguridad del peso corporal, todos los grupos presentaron aumento de peso.

La figura 4 muestra la eficacia de conjugados de anticuerpo-fármaco en una gráfica del cambio de volumen tumoral ajustado *in vivo* en el tiempo en el modelo de ratón de línea celular humana WSU-DLCL2. Se evaluaron la eficacia para ADC-107 monoamida anti-CD22 en el objetivo y ADC-204 con enlace vacit a dosis de 0,5-10 mg/kg. Se incluyó ADC-105 monoamida para comparación. Se utilizaron ADC-205 y ADC-108 monoamida anti-Her2 fuera de objetivo para controles. La actividad de ADC-204 y ADC-107 monoamida parece ser similar. La dosis eficaz mínima (MED, por su sigla en inglés) para ambos es de entre 0,5 y 2 mg/kg. A la mayor dosis de 10 mg/kg, ambos produjeron respuestas completas en 5/5 animales, un resultado que no se observó con ADC monoamida. Asimismo, ADC monoamina produce una actividad de >10 veces en comparación con ADC monoamida (comparación de respuesta con dosis de 0,5 mg/kg de monoamina v. dosis de 5 mg/kg de monoamida). Ambos controles con Her2 administrados a 2 mg/kg tuvieron una respuesta similar (~30 % de TGI). No hubo pérdida de peso considerable en ninguno de los grupos.

La figura 5A muestra la eficacia de conjugados de anticuerpo-fármaco ADC-106, ADC-108 y ADC-107 en una gráfica del cambio de volumen tumoral ajustado *in vivo* en el tiempo en el modelo tumoral HER2 KPL4 en ratones scid beige.

La figura 5B muestra la eficacia de conjugados de anticuerpo-fármaco en una gráfica del cambio de volumen tumoral ajustado *in vivo* en el tiempo en el modelo tumoral HER2 KPL4 en ratones scid beige. Se midió la eficacia de Tio-Her2 hu7C2

LC-K149C-(LD-51) monoamida, ADC-106 y ADC-106, en combinación con Tmab-DM1.

La figura 6 muestra la eficacia de conjugados de anticuerpo-fármaco, ADC-201, ADC-104, ADC-202 y ADC-105 y un anticuerpo sin conjugar hu7C2, en una gráfica del cambio de volumen tumoral ajustado *in vivo* en el tiempo en el modelo HER2 Fo5 en ratones nu/nu CRL, que recibieron una dosis IV. ADC-201 y ADC-104 en el objetivo mostraron inhibición tumoral y efectos dependientes de la dosis. ADC-202, ADC-105 y el anticuerpo sin conjugar hu7C2 fuera del objetivo no muestran inhibición tumoral.

La figura 7 muestra la eficacia de conjugados de anticuerpo-fármaco, ADC-201, ADC-104, ADC-202, ADC-105 y un anticuerpo sin conjugar hu7C2, en una gráfica del cambio de volumen tumoral ajustado *in vivo* en el tiempo en un modelo tumoral HER2 KPL4 en ratones scid beige. ADC-201 y ADC-104 en el objetivo mostraron inhibición tumoral y efectos dependientes de la dosis. ADC-202, ADC-105 y el anticuerpo sin conjugar hu7C2 fuera del objetivo muestran escasa o nula inhibición tumoral.

La figura 8 muestra la eficacia de conjugados de anticuerpo-fármaco ADC-106, ADC-18 y ADC-17 en una gráfica del cambio de volumen tumoral ajustado *in vivo* en el tiempo en el modelo de HER2 Fo5 en ratones CRL nu/nu. ADC-106 y ADC-108 en el objetivo mostraron inhibición tumoral y efectos dependientes de la dosis. ADC-107 fuera del objetivo muestra escasa o nula inhibición tumoral.

La figura 9 muestra la eficacia de conjugados de anticuerpo-fármaco ADC-104, ADC-111, ADC-112, ADC-106 y ADC-113 en una gráfica del cambio de volumen tumoral ajustado *in vivo* en el

tiempo en un modelo de xenoinjerto WSU-DLCL2 con expresión de CD22 en ratones SCID Fox Chase CB-17. ADC-104, ADC-111, ADC-112 en el objetivo muestran inhibición tumoral y efectos dependientes de la dosis. ADC-106 y ADC-133 fuera del objetivo muestran escasa o nula inhibición tumoral.

La figura 10 muestra la eficacia de conjugados de anticuerpo-fármaco en una gráfica del cambio de volumen tumoral ajustado *in vivo* en el tiempo en el modelo de xenoinjerto HCC1569X2. Ly6E-SG3451-monoamida tiene actividad dependiente de la dosis, con un retraso en el crecimiento a 6 y 12 mg/kg y tumores aproximadamente en estasis al dosificarse a 18 mg/kg. Se observa regresión tumoral con Ly6E-SG3451 dosificado a 1 y 3 mg/kg y Ly6E-SG3203-monoamida, dosificado a 1, 3, 6 mg/kg. Los grupos Ly6E SG3451 y SG3203-monoamina se agrupan entre sí.

ENSAYO DE ALQUILACIÓN/UNIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Se sabe que los compuestos de pirrolobenzodiazepina (PBD) forman aductos monoalquilados y reticulados con ADN intracatenario dependiente de secuencia, además de reticulaciones intercatenarias (Rahman KM, et al (2009) *J Am Chem Soc* 131:13756-13766). Las PBD tienen una posición quiral C11a(S) que les brinda una forma adecuada para ajustarse de forma segura en la ranura menor del ADN. Asimismo, un resto N10-C11 electrofílico (es decir, funcionalidades de éter metílico de carbinolamina, carbinolamina o imina interconvertible) puede formar un enlace aminor al covalente entre su posición C11 y el grupo C2-NH₂ nucleofílico de una nucleobase de guanina. Se estudió la interacción de compuestos de pirrolobenzodiazepina con oligonucleótidos formadores de estructuras dobles de diversas longitudes y secuencias con secuencias de Pu-GAATG-Py > Pu-GATC-Py >> Pu-GATG-Py o Pu-GAATC-Py para determinar la reticulación

intracatenaria e intercatenaria previamente identificada (Ejemplo 8). El ensayo de unión y alquilación de oligonucleótidos es un modelo sencillo para evaluar la posible unión de restos de fármacos de pirrolobenzodiazepina en ADC a ácidos nucleicos mediante separación con HPLC y detección de MS (Narayanaswamy M. et ál (2008) Anal. Biochem. 374:173-181). Por lo tanto, se puede realizar una correlación y predicción de la potencia y eficacia de ADC. Los restos de fármacos de pirrolobenzodiazepina monoalquiladores se pueden diferenciar, como monoamida DM-3 de monoamida DM-1 y los monoalquiladores de la Tabla 1a de restos de fármacos de pirrolobenzodiazepina dialquiladores comparadores de la Tabla 1b, como C-1 (Ejemplo 8).

La frecuencia con que se producen secuencias de oligonucleótidos seleccionadas que unirían/alquilarían compuestos de pirrolobenzodiazepina es muy elevada y no es directamente proporcional al tamaño de los cromosomas en los que se producen. Los compuestos de pirrolobenzodiazepina en este estudio incluyen restos de fármacos de pirrolobenzodiazepina monoalquiladores de la Tabla 1a y restos de fármacos comparadores de la Tabla 1b. El estudio mostró niveles diferenciales de alquilación del fármaco de oligonucleótidos de cadena doble y el potencial de alquilación se puede evaluar de forma correcta mediante desaparición de los oligonucleótidos iniciales de estructura doble, Pu-GAAATC-Py y Pu-GAAATG-Py, en los que Pu es un nucleótido de purina A o G y Py es un nucleótido de pirimidina C o T. PBD monoamida DM2 (Tabla 1a) fue aproximadamente 8 veces menos eficaz en la unión/alquilación de los oligonucleótidos de estructura doble que el PBD monoamina DM-1. El dialquilador comparador C-1 (Tabla 1b) muestra 2-3 veces más eficacia en la alquilación covalente de los oligonucleótidos de estructura doble que DM-1 monoamida. El

monómero de PBD C-2 muestra >50 veces menos eficacia en la alquilación covalente de los oligonucleótidos de estructura doble que el dímero C-1. La reducción en los enlaces imina de C-1 para formar C-3 elimina por completo la unión a ADN. Se formaron diversos aductos de oligo-PBD con diferentes alquiladores, se separaron mediante HPLC y se caracterizaron en masa mediante análisis de MS.

La figura 11 muestra aductos putativos tras reacciones de un compuesto dimérico de pirrolobenzodiazepina (PBD) dialquilador CLD-1 (parte superior) y dos compuestos diméricos de pirrolobenzodiazepina monoalquiladores, monoamina DM-1 (parte media) y monoamida DM-2 (parte inferior) con ADN (Rahman KM, et ál (2009) *J Am Chem Soc* 131:13756-13766). Los compuestos diméricos de PBD dialquiladores pueden formar dos uniones covalentes (reticulación) con el grupo C2-NH₂ de una nucleobase de guanina en cadenas opuestas de una estructura doble de ADN. Los compuestos diméricos de PBD monoalquilador solo pueden formar un enlace covalente con una nucleobase de guanina y, por lo tanto, afectan la cinética de unión de asociación/disociación y alteración la división celular.

DM-2 monoamida muestra 8-10 veces menos unión/alquilación que DM-1 monoamina con respecto a oligonucleótidos de estructura doble, lo cual tiene correlación con la potencia y eficacia de sus ADC en líneas celulares de cáncer y modelos de xenoinjerto tumoral *in vivo*. El menor nivel de alquilación de ADN de monoamida avala la eficacia con menor toxicidad y puede demostrar un mejor índice terapéutico. En líneas generales, el grado de unión/alquilación de ADN tiene correlación con la eficacia de análogos de PBD y diferencia monoamida de PBD monoamina y de PBD dialquiladores. Los índices terapéuticos (TI, por su sigla en inglés) optimizados

de PBD-ADC pueden obtenerse modulando actividades de alquilación/unión de ADN de monoalquiladores y se puede utilizar el método de alquilación/unión de oligo para guiar el diseño y la evaluación de análogos de PBD con eficacia antitumoral óptima y seguridad aceptable.

PROPIEDADES DE SEGURIDAD/TOXICIDAD

Se estudiaron los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención y ADC comparadores para determinar sus propiedades vinculadas con la seguridad y la toxicidad.

El anticuerpo anti-HER2 hu7C2 ADC-108 con monoalquilador monoamina (LD-52) mostró mejor tolerancia en ratones CD-1 y mejor índice terapéutico (TI) con respecto al anticuerpo anti-HER2 hu7C2 correspondiente ADC-201 con dialquilador imina (C-1), según el cálculo del cambio en el porcentaje de peso corporal durante 45 días tras la dosificación (50, 75, 125 µg (microgramos) por kg en los días 0, 7, 14. La dosis máxima tolerada (MTD, por su sigla en inglés) para ADC-108 es de 200 µg/kg, mientras que la MTD para ADC-201 es de 75 µg/kg. Las señales de toxicidad en ratas (Sprague-Dawley) y monos cinomolgos pueden incluir disminución transitoria en los reticulocitos, descoloración epitelial menor y descamación cerca del lugar de la inyección, pérdida vascular, enzimas hepáticas elevadas, degeneración nerviosa, agotamiento linfoide/de médula ósea, observaciones renales, oculares y pulmonares y morbilidad.

Los datos preliminares de seguridad sugieren un beneficio considerable de los ADC de la invención con respecto al ADC comparador.

FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

Normalmente, se preparan las formulaciones farmacéuticas de

conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) terapéuticos de la invención para la administración parenteral, es decir, inyección en bolo, intravenosa, intratumoral con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable y en una forma inyectable de dosis unitaria. Un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) con el grado deseado de pureza se mezcla opcionalmente con estabilizadores, excipientes, portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences (1980) 16.^a edición, Osol, A. Ed.) en forma de una formulación liofilizada o una solución acuosa.

MÉTODOS DE TRATAMIENTO CON CONJUGADOS DE ANTICUERPO-FÁRMACO
Se contempla la posibilidad de utilizar los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de la presente invención para tratar diversas enfermedades o trastornos, p. ej., aquellos caracterizados por sobreexpresión de un antígeno tumoral. Los ejemplos de afecciones o trastornos hiperproliferativos incluyen tumores sólidos malignos o benignos y trastornos hematológicos tales como leucemia y neoplasia maligna linfoide. Otros incluyen trastornos neuronales, gliales, astrocitales, hipotalámicos, glandulares, macrofágicos, epitealiales, estromales, blastocélicos, inflamatorios, angiogénicos e inmonológicos, incluidos trastornos autoinmunes.

Los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención se pueden administrar mediante cualquier vía adecuada para la afección que se desea tratar. Los ADC se administran típicamente por vía parenteral, es decir, infusión, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal y epidural.

En general, la enfermedad o el trastorno que se trata es una

enfermedad hiperproliferativa, como el cáncer. Los ejemplos de cánceres que se tratan incluyen, de modo taxativo, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o neoplasias malignas linfoides. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas (p. ej., cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón incluido cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, incluido cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándula salival, cáncer renal o de riñón, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, así como cáncer de cabeza y cuello.

Las enfermedades autoinmunes para las que se pueden utilizar compuestos de ADC en el tratamiento incluyen trastornos reumatológicos (tales como, por ejemplo, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, esclerodermia, lupus, tal como lupus sistémico eritematoso (SLE, por su sigla en inglés) y nefritis lúpica, polimiositis/dermatomiositis, crioglobulinemia, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos y artritis psoriásica), osteoartritis, trastornos gastrointestinales y hepáticos autoinmunitarios (tales como, por ejemplo, enfermedades intestinales inflamatorias (p. ej., colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn), anemia perniciosa y gastritis autoinmune, hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria y enfermedad celíaca), vasculitis (tal como, por ejemplo, vasculitis asociada a ANCA, incluida vasculitis de Churg-

Strauss, granulomatosis de Wegener y poliarteriitis), trastornos neurológicos autoinmunes (tales como, por ejemplo, esclerosis múltiple, síndrome de opsoclono mioclono, miastenia gravis, neuromielitis óptica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y polineuropatías autoinmunes), trastornos renales (tales como, por ejemplo, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture y enfermedad de Berger), trastornos dermatológicos autoinmunes (tales como, por ejemplo, psoriasis, urticaria, erupciones, pénfigo vulgar, pénfigo buloso y lupus cutáneo eritematoso), trastornos hematológicos (tales como, por ejemplo, púrpura trombocitopénica, púrpura trombocitopénica trombótica, púrpura postransfusional y anemia hemolítica autoinmunitaria), ateroesclerosis, uveítis, enfermedades auditivas autoinmunes (tales como, por ejemplo, enfermedades del oído interno y pérdida auditiva), enfermedad de Behcet, síndrome de Raynaud, trasplante de órganos y trastornos endócrinos autoinmunes (tales como, por ejemplo, trastornos autoinmunes relativos a la diabetes, tales como diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM, por su sigla en inglés), enfermedad de Addison y enfermedades tiroideas autoinmunes (p. ej., tiroiditis y enfermedad de Graves)). Las enfermedades más preferidas de estas incluyen, por ejemplo, artritis reumatoide, colitis ulcerativa, vasculitis asociada a ANCA, lupus, esclerosis múltiple, síndrome de Sjögren, enfermedad de Graves, IDDM, anemia perniciosa, tiroiditis y glomerulonefritis.

La dosis adecuada de un ADC para la prevención o el tratamiento de una enfermedad dependerá del tipo de enfermedad que se desee tratar, como se definió anteriormente, la gravedad y la evolución de la enfermedad, el hecho de que la molécula se administre con fines

preventivos o terapéuticos, los tratamientos previos, el historial clínico del paciente y la respuesta al anticuerpo, así como del criterio del médico tratante. Se administra la molécula en forma adecuada al paciente en un momento o en una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, una dosis de alrededor de 1 µg/kg a 15 mg/kg (p. ej., 0,1-20 mg/kg) de molécula es una dosis inicial candidata para administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones independientes o mediante infusión continua. Una dosis diaria normal puede oscilar entre alrededor de 1 µg/kg y 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores anteriormente mencionados. Un ejemplo de dosis de ADC para administración a un paciente se encuentra en el intervalo de alrededor de 0,1 a alrededor de 10 mg/kg de peso del paciente.

Los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención pueden usarse ya sea solos o en combinación con otros agentes en una terapia. Por ejemplo, un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención puede administrarse conjuntamente con al menos un agente terapéutico adicional.

En algunas modalidades, un conjugado de anticuerpo-fármaco hu7C2.v.2.2.LA (ADC hu7C2) se administra conjuntamente con un agente terapéutico adicional que es otro anticuerpo o inmunoconjugado que se une a HER2. En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional es (i) un anticuerpo o inmunoconjugado que se une al dominio II de HER2 y/o (ii) un anticuerpo o inmunoconjugado que se une al dominio IV de HER2. En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional es (i) un anticuerpo o inmunoconjugado que se une al epítipo 2C4 y/o (ii) un anticuerpo o inmunoconjugado que se une al epítipo 4D5.

En algunas modalidades, un conjugado de anticuerpo-fármaco hu7C2.v.2.2.LA (ADC hu7C2) se administra de forma conjunta con uno o más agentes terapéuticos adicionales seleccionados de trastuzumab (Herceptin®), T-DM1 (Kadcyla®) y pertuzumab (Perjeta®). En algunas modalidades, un ADC hu7C2 se administra conjuntamente con trastuzumab. En algunas modalidades, un ADC hu7C2 se administra conjuntamente con T-DM1. En algunas modalidades, un ADC hu7C2 se administra conjuntamente con pertuzumab. En algunas modalidades, un ADC hu7C2 se administra conjuntamente con trastuzumab y pertuzumab. En algunas modalidades, un ADC hu7C2 se administra conjuntamente con T-DM1 y pertuzumab.

En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional es un antagonista de unión al eje de PD-1, como un antagonista de unión a PD-L1.

Dichas terapias de combinación indicadas anteriormente comprenden administración combinada (en la que dos o más agentes terapéuticos se incluyen en la misma formulación o en formulaciones separadas) y administración separada, en cuyo caso la administración del anticuerpo o inmunoconjugado de la invención puede producirse antes, al mismo tiempo y/o después de la administración del agente terapéutico adicional y/o adyuvante. Los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención pueden usarse también en combinación con terapia de radiación.

Un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) puede administrarse usando cualquier medio adecuado, incluida administración parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea, tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración

intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede ser mediante cualquier vía adecuada, p. ej., mediante inyecciones, como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. En la presente se contemplan diversos cronogramas de dosificación que incluyen, de modo no taxativo, administraciones simples o múltiples en diversos momentos, administración en bolo e infusión por impulso.

Los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención se formularán, dosificarán y administrarán de una manera coherente con la buena práctica médica. Los factores que deben considerarse en este contexto incluyen el trastorno particular que se esté tratando, el mamífero particular que se esté tratando, la condición médica del paciente individual, la causa del trastorno, el lugar de administración del agente, el método de administración, el cronograma de administración y otros factores conocidos por los médicos. El anticuerpo o inmunoconjugado se formula opcionalmente con uno o más agentes que se utilicen actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión, aunque esto no es necesario. La cantidad eficaz de dichos agentes adicionales depende de la cantidad de anticuerpo o inmunoconjugado presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores mencionados anteriormente. Estos se utilizan generalmente en las mismas dosificaciones y mediante las mismas vías de administración que se describen en la presente o alrededor de 1 a 99 % de las dosificaciones descritas en la presente o en cualquier dosificación y mediante cualquier vía que se determine adecuada de forma empírica/clínica.

Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la

dosis adecuada de un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención (cuando se usa solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que se trate, el tipo de anticuerpo o inmunoconjugado, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si el anticuerpo o inmunoconjugado se administra con fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, la historia clínica del paciente, la respuesta al anticuerpo o inmunoconjugado y el criterio del médico tratante. El anticuerpo o inmunoconjugado se administra de forma adecuada al paciente una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, una dosis de alrededor de 1 µg/kg a 15 mg/kg (p. ej., 0,1 mg/kg-10 mg/kg) de anticuerpo o inmunoconjugado puede ser una dosis inicial candidata para administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones independientes o mediante infusión continua. Una dosis diaria normal puede oscilar entre alrededor de 1 µg/kg y 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores anteriormente mencionados. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantendrá generalmente hasta que se produzca la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Un ejemplo de dosificación del anticuerpo o inmunoconjugado oscila entre alrededor de 0,05 mg/kg y alrededor de 10 mg/kg. Por lo tanto, pueden administrarse al paciente una o más dosis de alrededor de 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de estas). Dichas dosis pueden administrarse de manera intermitente, p. ej., cada semana o cada tres semanas (p. ej., de manera que el paciente reciba entre alrededor de dos y alrededor de veinte, p. ej., alrededor de seis dosis del anticuerpo). Se puede administrar una dosis de carga inicial mayor, seguida por una o más dosis menores. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de

dosificación. Se puede controlar la evolución de esta terapia mediante ensayos y técnicas convencionales.

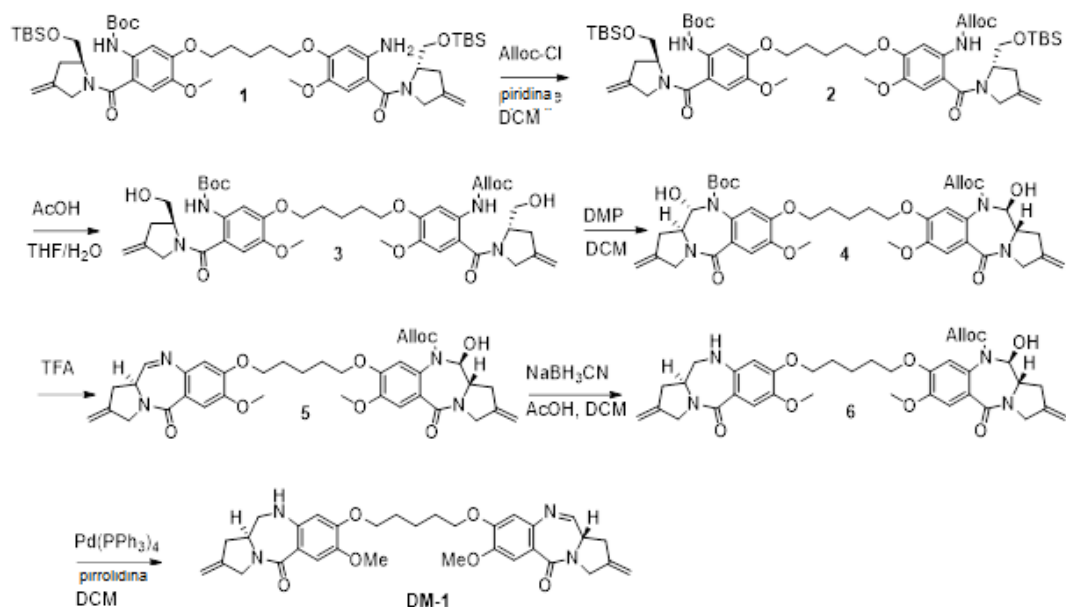
ARTÍCULOS PARA LA ELABORACIÓN

En otra modalidad de la invención, se proporciona un artículo de fabricación o «kit» que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en el envase o asociado a este. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, frascos, jeringas, envases de burbujas, etc. Los envases se pueden elaborar a partir de una variedad de materiales como vidrio o plástico. El recipiente porta una composición de conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) que es eficaz para tratar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa o un frasco de solución intravenosa con un tapón que pueda perforarse mediante una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un ADC. La etiqueta o el prospecto indican que la composición se utiliza en el tratamiento de la afección seleccionada, como el cáncer. De manera alternativa o adicional, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprenda un amortiguador farmacéuticamente aceptable, como agua bacteriostática para inyección (BWFI, por su sigla en inglés), solución salina amortiguada con fosfato, solución de Ringer o solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluidos otros amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 Preparación de restos de fármaco de pirrolobenzodiazepina monoalquilador (Tabla 1a)

Síntesis de (S)-7-metoxi-8-((5-((S)-7-metoxi-2-metileno-5-oxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-2-metileno-2,3-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-5(11aH)-ona
DM-1



A una solución de (5-((5-(5-amino-4-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenpirrolidina-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)pentil)oxi)-2-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenpirrolidina-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbamato de terc-butilo **1** (0,50 g, 0,524 mmol) en DCM (5,0 mL) se le agregó piridina (83 mg, 1,05 mmol), seguido por cloroformiato de alilo, Alloc-Cl (95 mg, 0,786 mmol, Sigma Aldrich, número CAS 2937-50-0) a 16 °C. La mezcla se agitó durante 12 h. La mezcla se diluyó con DCM (30 mL) y se lavó con HCl acuoso (1N, 5,0 mL x 2), seguido por NaHCO₃ acuoso (5 mL x 2). La capa orgánica se concentró para brindar el producto bruto, que se purificó mediante columna ultrarrápida (EtOAc al 20 % en éter de petróleo) para proporcionar (5-((5-(5-

((aliloxi)carbonil)amino)-4-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenpirrolidina-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)pentil)oxi)-2-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenpirrolidina-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbamato de terc-butilo **2** (500 mg, 92 %) como un aceite incoloro. LCMS: (ESI, 10-80, AB, 1,5 min), RT = 1,200 min, m/z = 1037 [M+1]⁺.

Una solución del compuesto **2** (500 mg, 0,48 mmol) en HOAc/THF/H₂O (6 mL/3 mL/2 mL) se agitó a r.t. durante 1 día. La solución se diluyó con EtOAc (60 mL), se lavó con H₂O (20 mL × 4), NaHCO₃ ac. (20 mL × 2) y H₂O (20 mL). La capa orgánica se secó en Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío para proporcionar (5-((5-(5-(((aliloxi)carbonil)amino)-4-((S)-2-(hidroximetil)-4-metilenpirrolidina-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)pentil)oxi)-2-((S)-2-(hidroximetil)-4-metilenpirrolidina-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbamato **3** (390 g, 100 %) como un aceite.

A una solución agitada del compuesto **3** (200 mg, 0,247 mmol) en DCM anhidro (15 mL) se le agregó periodinano de Dess Martin (419 mg, 0,988 mmol). La mezcla de reacción se agitó a r.t. durante 2 h y se inactivó con solución de Na₂CO₃ ac. (30 mL) a 0 °C y extrajo con DCM (20 mL×3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (20 mL), se secaron en Na₂SO₄, se filtraron y concentraron. El residuo se purificó mediante prep-TLC (DCM/MeOH = 20:1) para proporcionar (11S,11aS)-8-((5-(((11S,11aS)-10-(terc-butoxicarbonil)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepina-10(5H)-carboxilato de alilo **4** (80 mg, 40,2 %) como un sólido incoloro. LCMS (ESI): RT = 0,709 min, M-

$\text{Boc-H}_2\text{O} + \text{H}^+ = 687,1$. Método = 5-95AB /1,5 min.

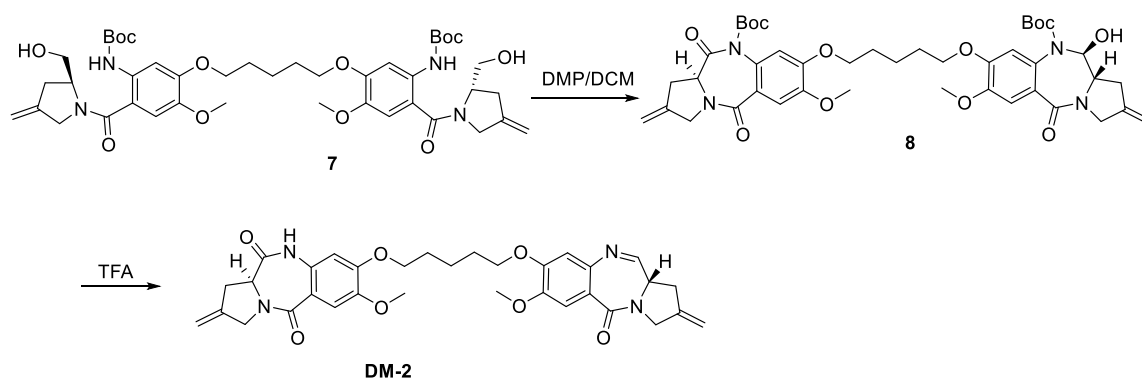
Una solución del compuesto **4** (80 mg, 0,099 mmol) en TFA (2,0 mL) se agitó a 0 °C durante 0,5 h. La solución se agregó por goteo en una solución de NaHCO_3 saturada (120 mL) a 0 °C. La mezcla se extrajo con DCM (20 mL x 3) y la capa orgánica combinada se secó en Na_2SO_4 , se filtró y concentró para proporcionar (11S,11aS)-11-hidroxi-7-metoxi-8-((5-((S)-7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,5,11a-tetrahydro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-2-metilen-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahydro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepina-10(5H)-carboxilato de alilo bruto **5** (50 mg, 73,5 %).

A una solución agitada del compuesto **5** (50 mg, 0,073 mmol) en DCM anhidro (4,0 mL) se le agregó HOAc (13 mg, 0,219 mmol), seguido por NaBH_3CN (23 mg, 0,365 mmol). La mezcla de reacción se agitó a r.t. durante la noche. Luego, la mezcla se concentró al vacío y se purificó mediante prep-TLC (DCM/MeOH = 9:1) para proporcionar (11S,11aS)-11-hidroxi-7-metoxi-8-((5-((S)-7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-2-metilen-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahydro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepina-10(5H)-carboxylato de alilo **6** (40 mg, 80,0 %) como un sólido incoloro. LCMS (ESI): RT = 3,085 min, $\text{M} + \text{H}^+ = 689,1$. Método = 10-80AB /7 min.

A una solución agitada del compuesto **6** (40 mg, 0,058 mmol) en DCM anhidro (3,0 mL) se le agregó pirrolidina (21 mg, 0,29 mmol), seguido por $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (7,0 mg, 0,006 mmol). La mezcla de reacción se agitó a r.t. con N_2 durante 2 h. Luego la mezcla se concentró al vacío y purificó mediante prep-TLC (DCM/MeOH = 1:1) para proporcionar **DM-1** (12 mg, 35,3 %) como

un sólido blanquecino. LCMS (ESI): RT = 0,651 min, M + H⁺ = 587,1. Método = 5-95AB /1,5 min. ¹H NMR (400 MHz, DCCl₃) δ 7,67 (d, J = 4,4 Hz, 1H), 7,57 (s, 1H), 7,49 (s, 1H), 6,79 (s, 1H), 6,04 (s, 1H), 5,18 (d, J = 11,6 Hz, 2H), 5,04 (d, J = 11,2 Hz, 2H), 4,41 - 4,37 (m, 1H), 4,28 - 4,25 (m, 3H), 4,13 - 4,00 (m, 3H), 3,98 - 3,95 (m, 2H), 3,93 (s, 3H), 3,89 - 3,85 (m, 1H), 3,82 (s, 3H), 3,54 (d, J = 30 Hz, 1H), 3,34 - 3,28 (dd, J = 12,4, 9,2 Hz, 1H), 3,15 - 3,08 (m, 1H), 2,96 - 2,86 (m, 2H), 2,44 - 2,39 (dd, J = 15,2, 6,0 Hz, 1H), 1,95 - 1,90 (m, 4H), 1,67 - 1,62 (m, 2H).

Síntesis de (S)-7-metoxi-8-((5-(((S)-7-metoxi-2-metileno-5-oxo-2,3,5,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-2-metileno-2,3-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepina-5,11(10H, 11aH)-diona **DM-2**

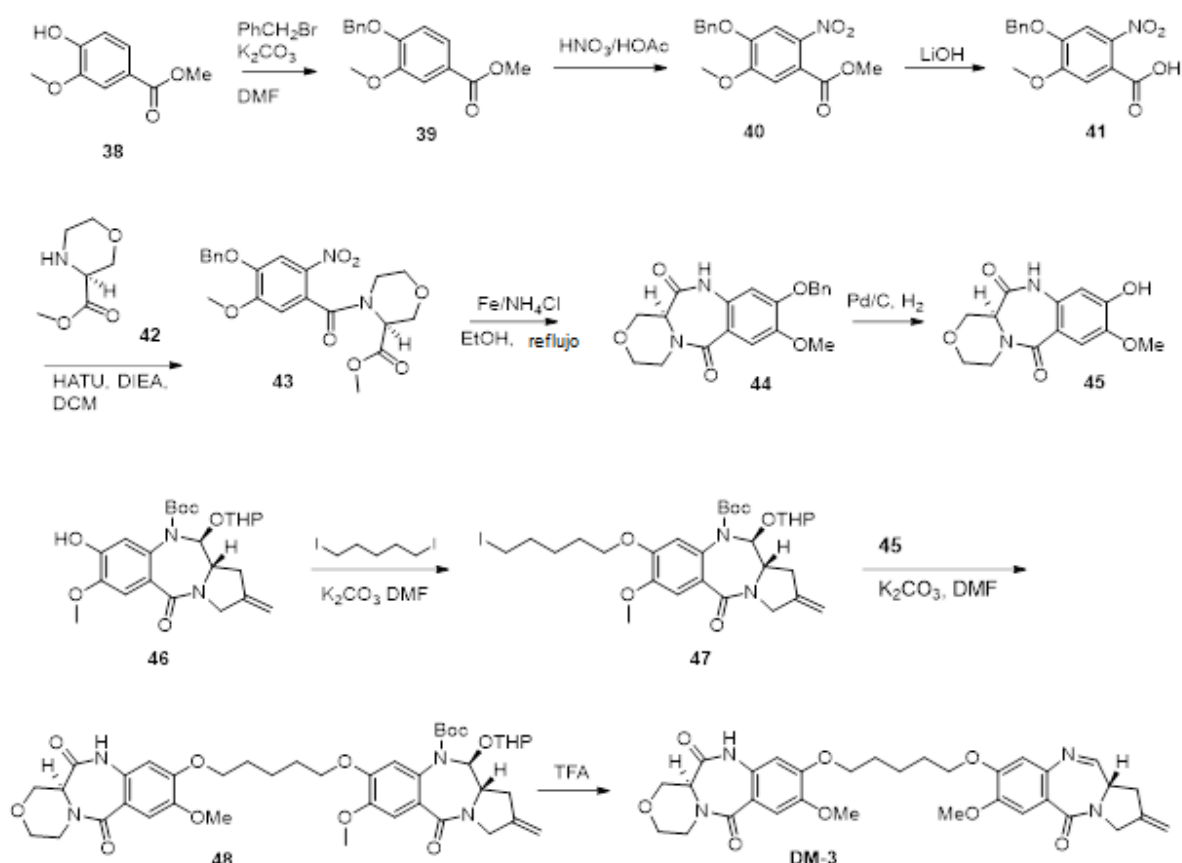


A una solución agitada de ((pentano-1,5-diilbis(oxi))bis(6-((S)-2-(hidroximetil)-4-metilenpirrolidina-1-carbonil)-4-metioxi-3,1-fenileno))dicarbamato de di-terc-butilo **7** (200 mg, 0,24 mmol) en DCM anhidro (20 mL) se le agregó DMP (610 mg, 1,44 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a r.t. durante 3 h. La mezcla se diluyó con EtOAc (100 mL) y se inactivó con solución de Na₂SO₃ ac. (30 mL) a 0 °C. La capa orgánica se lavó con H₂O (30 mL x 3), solución de NaHCO₃ ac.

(30 mL) y H₂O (30 mL) y se secó en (Na₂SO₄), se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante prep-TLC para proporcionar (S)-8-((5-(((11S,11aS)-10-(terc-butoxicarbonil)-11-hidroxio-7-metoxio-2-metilen-5-oxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-7-metoxio-2-metilen-5,11-dioxo-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepina-10(5H)-carboxilato de terc-butilo **8** (58 mg, 30,0 %) como un sólido blanco. LCMS (ESI): RT = 0,748 min, M + Na⁺ = 841,4. Método = 5-95AB /1,5 min.

Una solución del compuesto **8** (58 mg, 0,07 mmol) en TFA al 95 %/H₂O (2,0 mL) se agitó a 0 °C durante 2 h. Luego, la solución se agregó por goteo en una solución de NaHCO₃ saturada (120 mL) a 0 °C. La mezcla se extrajo con DCM (20 mL x 3). La capa orgánica combinada se secó en Na₂SO₄, se filtró, concentró y purificó mediante prep-HPLC para proporcionar **DM-2** (15,7 mg, 38 %) como un sólido blanco. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1,65 - 1,73 (m, 2 H) 1,89 - 2,00 (m, 4 H) 2,77 - 2,89 (m, 1 H) 2,91 - 3,00 (m, 1 H) 3,08 - 3,19 (m, 1 H) 3,46 (d, J = 16,6 Hz, 1 H) 3,91 (s, 3 H) 3,94 (s, 3 H) 4,02 (t, J = 6,5 Hz, 2 H) 4,06 - 4,19 (m, 2 H) 4,20 - 4,26 (m, 2 H) 4,30 (s, 2 H) 4,43 (d, J = 15,6 Hz, 1 H) 5,09 - 5,26 (m, 4 H) 6,41 (s, 1 H) 6,80 (s, 1 H) 7,43 (s, 1 H) 7,51 (s, 1 H) 7,71 (d, J = 4,5 Hz, 1 H) 7,83 (s, 1 H).

Síntesis de (S)-8-metoxio-9-((5-(((S)-7-metoxio-2-metilen-5-oxo-2,3,5,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-1,3,4,12a-tetrahidro-6H-benzo[e][1,4]oxazino[4,3-a][1,4]diazepina-6,12(11H)-diona **DM-3**



A una solución de 4-hidroxí-3-metioxibenzoato de metilo **38** (3,0 g, 16,5 mmol) en DMF (100 mL) se le agregó bromuro de bencilo (4,22 g, 24,7 mmol) y K₂CO₃ (4,56 g, 32,9 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 100 °C durante 3 h. La mezcla se concentró al vacío y se disolvió en agua (50 mL), se extrajo con EtOAc (30 mL x 2), se lavó con NaCl (30 mL) y se secó en Na₂SO₄. Se concentró y purificó mediante cromatografía en sílice (EtOAc 0-30 % en éter de petróleo) para brindar 4-(benciloxi)-3-metoxibenzoato de metilo **39** (3,8 g, 13,5 mmol, 82,2 % de rendimiento) como un sólido blanco. LCMS (5-95AB/1,5 min): RT = 0,787 min, [M+H]⁺272,9.

Una solución de **39** (2,0 g, 7,34 mmol) en HOAc (5,0 mL) se agregó a una mezcla de HOAc (5,0 mL) y HNO₃ (20,6 mL, 441 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a 20 °C durante 30 min. La mezcla se vertió en agua helada (100 mL) y se

ajustó hasta pH 5-6. La mezcla se filtró y los filtrados se concentraron para proporcionar 4-(benciloxi)-5-metoxi-2-nitrobenzoato de metilo **40** (2,3g, 7,25 mmol, 98,7 % de rendimiento) como un sólido amarillo.

A una solución de **40** (2,3 g, 7,25 mmol) en MeOH (20 mL) se le agregó una solución de LiOH (2,25 mL, 36,24 mmol) en agua (5 mL). La mezcla de reacción se agitó a 20 °C durante 2 h. La mezcla se vertió en agua (50 mL) y se lavó con EtOAc (50 mL). La fase acuosa se ajustó hasta un pH de 3-4 con HCl 2 N y se extrajo con EtOAc (50 mL x 3). Se lavó con NaCl (25 mL), se secó en Na₂SO₄ y se concentró al vacío para proporcionar ácido 4-(benciloxi)-5-metoxi-2-nitrobenzoico bruto **41** (2,0 g, 6,59 mmol, 91 % de rendimiento) como un sólido blanco.

A una mezcla de **41** (460,0 mg, 1,52 mmol) y (S)-morfolina-3-carboxilato de metilo **42**, n.º de reg. CAS 741288-31-3, Hicks, F. et ál, (2013) Organic Process Research & Development, 17(5):829-837, (330 mg, 2,28 mmol) y diisopropiletilamina, DIEA (392 mg, 3,03 mmol) en DCM (30 mL) se le agregó HATU (865 mg, 2,28 mmol). La solución de reacción se agitó a 20 °C durante 8 h. La solución se concentró al vacío y se purificó mediante cromatografía en sílice (EtOAc 0-50 % en éter de petróleo) para proporcionar (S)-4-(4-(benciloxi)-5-metoxi-2-nitrobenzoil)morfolina-3-carboxilato de metilo **43** (520 mg, 1,21 mmol, 79,7 % de rendimiento) como un aceite amarillo. LCMS (5-95AB/1,5 min): R_T = 0,731min, [M+Na]⁺ = 453,0.

A una solución de NH₄Cl (646 mg, 12,1 mmol) en EtOH (20 mL) y agua (15 mL) se le agregó **43** (520 mg, 1,21 mmol) y hierro (539 mg, 9,67 mmol). Luego de agitar la mezcla de reacción a 90 °C durante 12 h, esta se filtró y los filtrados se

extrajerón con EtOAc (50 mL x 3), se lavaron con NaI (20 mL), se secaron en Na₂SO₄ y se concentraron al vacío. La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía en sílice (EtOAc 0-30 % en éter de petróleo) para proporcionar (S)-9-(benciloxi)-8-metoxi-1,3,4,12a-tetrahidro-6H-benzo[e][1,4]oxazino[4,3-a][1,4]diazepina-6,12(11H)-diona **44** (320 mg, 0,84 mmol, 69,7 % de rendimiento) como un sólido blanco. LCMS (5-95AB/1,5 min): RT = 0,638min, [M+H]⁺368,9.

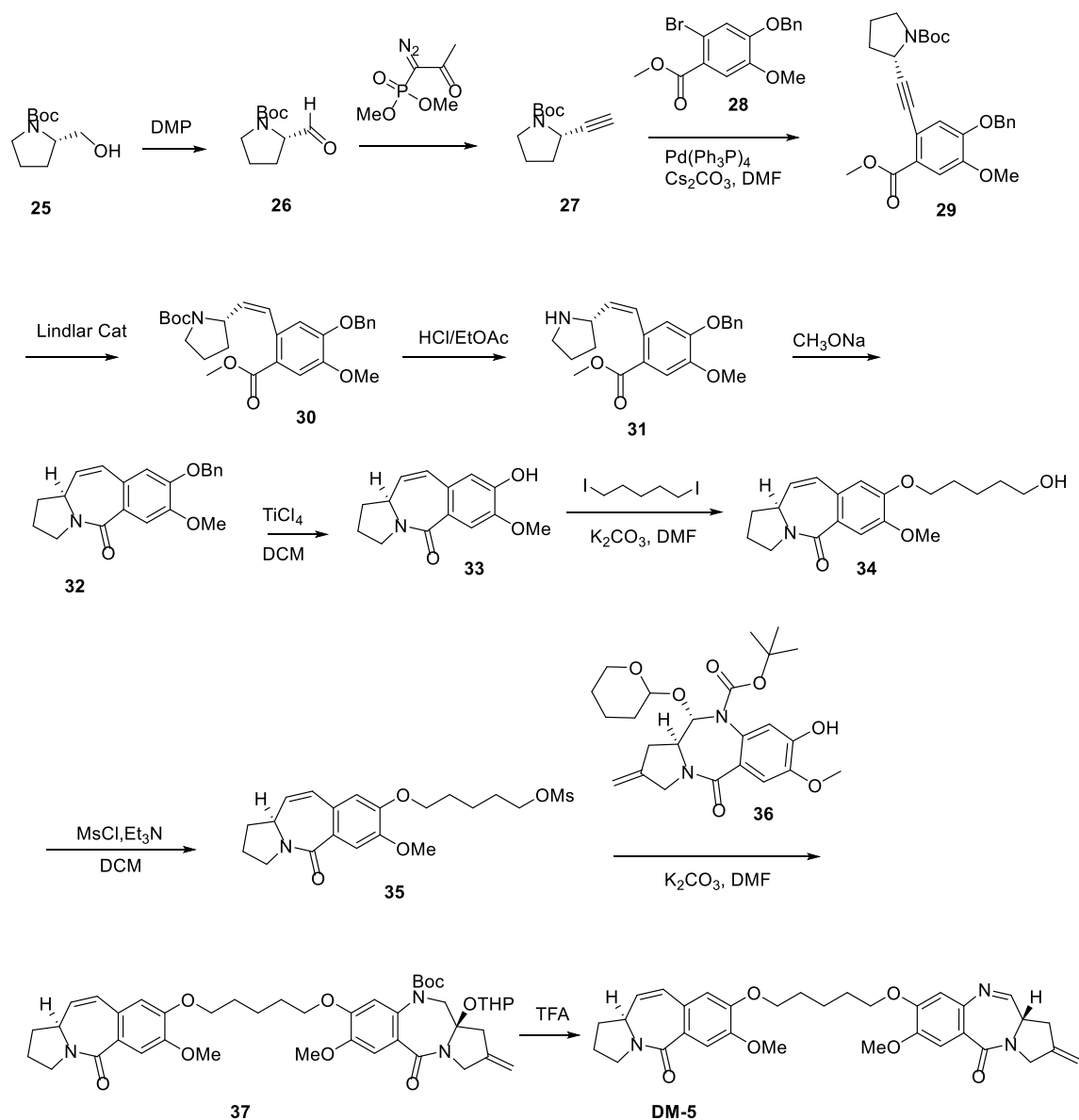
A una solución de **44** (260 mg, 0,71 mmol) en DCM (10 mL) y MeOH (1,0 mL) se le agregó paladio sobre carbono al 10 % (26,0 mg, 0,020 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 18 °C durante 1 h en H₂ (15 psi). La mezcla de reacción se filtró y concentró al vacío para proporcionar (S)-9-hidroxi-8-metoxi-1,3,4,12a-tetrahidro-6H-benzo[e][1,4]oxazino[4,3-a][1,4]diazepina-6,12(11H)-diona **45** (100 mg, 0,359 mmol, 50,9 % de rendimiento) como un sólido blanco.

A una solución de (11S,11aS)-8-hidroxi-7-metoxi-2-metileno-5-oxo-11-((tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepina-10(5H)-carboxilato de terc-butilo **46** (200 mg, 0,43 mmol) en DMF (5,0 mL) se le agregó K₂CO₃ (60 mg, 0,43 mmol) y 1,5-diiodopentano (703 mg, 2,17mmol). La mezcla de reacción se agitó a 90 °C durante 12 h. La mezcla de reacción se concentró y purificó mediante cromatografía en sílice (EtOAc 0-50 % en éter de petróleo) para proporcionar (11S,11aS)-8-((5-iodopentil)oxi)-7-metoxi-2-metileno-5-oxo-11-((tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepina-10(5H)-carboxilato de terc-butilo **47** (129 mg, 0,191 mmol, 43,9 % de rendimiento) como un aceite amarillo. LCMS (5-95AB/1,5 min): RT = 0,907min, [M+H]⁺657,1.

Una mezcla de **47** (100 mg, 0,150 mmol), **45** (50,9 mg, 0,18 mmol) y K₂CO₃ (31,6 mg, 0,23 mmol) en DMF (5,0 mL). La mezcla se agitó a 90 °C durante 3 h. La mezcla se concentró al vacío y purificó mediante cromatografía (MeOH 0-5% en DCM Rf= 0,4) para proporcionar (11S,11aS)-7-metoxi-8-((5-((S)-8-metoxi-6,12-dioxo-3,4,6,11,12,12a-hexahidro-1H-benzo[e][1,4]oxazino[4,3-a][1,4]diazepin-9-il)oxi)pentil)oxi)-2-metileno-5-oxo-11-((tetrahydro-2H-piran-2-il)oxi)-2,3,11,11a-tetrahydro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepina-10(5H)-carboxilato de terc-butilo **48** (75 mg, 0,093 mmol, 61 % de rendimiento) como un aceite incoloro.

Al compuesto **48** (75,0 mg, 0,090 mmol) se agregó TFA (1,9 mL) y agua (0.10 mL) a 0 °C. La mezcla se agitó a 17 °C durante 1 h. La mezcla de reacción se vertió en NaHCO₃ saturado (200 mL) y se extrajo con DCM (100 mL x 3), se lavó con salmuera (50 mL), se secó y purificó mediante prep-TLC (metanol al 4 % en DCM Rf= 0,5) para proporcionar **DM-3** (18,9 mg, 0,030 mmol, 32,3 % de rendimiento) como un sólido blanco. LCMS (5-95AB/1,5 min): RT = 0,633 min, [M+H]⁺ 605,2 ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,16 (s, 1H), 7,64 (d, J = 4,4 Hz, 1H), 7,43 (s, 1H), 7,22 (d, J = 23,2 Hz, 1H), 6,73 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 6,35 (d, J = 2,8 Hz, 1H), 5,11 (d, J = 10,8 Hz, 2H), 4,41 (s, 3H), 4,38 (s, 2H), 4,22 (s, 3H), 4,05 (s, 3H), 4,04 (s, 3H), 4,02 (s, 3H), 3,95-3,92 (m, 1H), 3,86 (s, 1H), 3,83-3,62 (m, 1H), 3,18 (s, 1H), 2,88 (d, J = 30,8 Hz, 1H), 1,86 (s, 4H) 1,79-1,62 (m, 2H).

Síntesis de (S)-7-metoxi-8-((5-((S)-7-metoxi-5-oxo-2,3,5,11a-tetrahydro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a]azepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-5-ona **DM-5**



A una solución de (S)-2-(hidroximetil)pirrolidina-1-carboxilato de terc-butilo **25** (3,0 g, 14,9 mmol) en DCM (80 mL) se le agregó periodinano de Dess-Martin, DMP (9,48 g, 22,4 mmol). Luego de haber agitado la mezcla a 0 °C durante 1 h, se le agregó $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (50 mL)/ NaHCO_3 (50 mL) y MTBE (130 mL). La fase orgánica se lavó con agua (60 mL x 3) y se concentró para brindar (S)-2-formilpirrolidina-1-carboxilato de terc-butilo **26** (2,9 g, 14,6 mmol, 97,6 % rendimiento) como un aceite incoloro.

A una solución del compuesto **26** (2,9 g, 14,6 mmol) y (1-diazo-2-oxo-propil) fosfonato de dimetilo en MeOH (20 mL) se le agregó K₂CO₃ (6,03 g, 43,7 mmol). Luego de haber agitado la mezcla de reacción a 20 °C durante 1 h, se concentró al vacío, el residuo se purificó mediante cromatografía en columna (EtOAc al 10 % en PE) para brindar (S)-2-etinilpirrolidina-1-carboxilato de terc-butilo **27** (2,0 g, 10,24 mmol, 70,4 % de rendimiento) como un aceite incoloro.

A una solución del compuesto **27** (2,0 g, 10,2 mmol) y 4-(benciloxi)-2-bromo-5-metoxibenzoato de metilo **28** (5,4 g, 15,4 mmol) en DMF (50 mL) se le agregó Cs₂CO₃ (3,97 g, 20,5 mmol) y Pd(PPh₃)₄ (785 mg, 1,54 mmol). La mezcla se agitó a 95 °C con N₂ durante 1 h. La mezcla se concentró y purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (EtOAc al 20 % en PE) para brindar (S)-2-((5-(benciloxi)-4-metoxi-2-(metoxicarbonil)fenil)etinil)pirrolidina-1-carboxilato de terc-butilo **29** (1,60 g, 2,44 mmol, 23,8 % de rendimiento) como un aceite incoloro. LCMS (5-95AB/1,5 min): RT = 0,994 min, [M+H-56]⁺ 410,0.

A una solución del Compuesto **29** (2,0 g, 4,3 mmol) en MeOH (10 mL) se le agregó Pd/CaCO₃ (200,0 mg, 21,5 mmol). La mezcla se agitó a 30 °C durante 1 h en H₂ (1 atm). La mezcla se filtró y el filtrado se concentró para brindar el producto bruto, que se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (EtOAc al 10 % en PE) para dar (S,Z)-2-(5-(benciloxi)-4-metoxi-2-(metoxicarbonil)estiril)pirrolidina-1-carboxilato de terc-butilo **30** (1,0 g, 2,14 mmol, 49,8% de rendimiento) como un sólido blanco. LCMS (5-95AB/1,5 min): RT = 0,983 min, [M+Na]⁺ 490,1.

A una solución del Compuesto **30** (0,9 g, 1,92 mmol) en EtOAc (10 mL) se le agregó HCl/EtOAc (6,0 mL). Luego de haber

agitado la mezcla a 25 °C durante 1 h, se concentró para brindar (S,Z)-4-(benciloxi)-5-metoxi-2-(2-(pirrolidin-2-il)vinil)benzoato de metilo **31** (0,77 g, 1,90 mmol, 99 % de rendimiento) como un sólido blanco.

A una solución del **Compuesto 31** (0,77 g, 1,91 mmol) en MeOH (30 mL) se le agregó NaOMe (1,03 g, 19,06 mmol). La mezcla se agitó a 30 °C durante 2 h. La mezcla se concentró y purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (EtOAc al 25 %-75 % en PE) para brindar (S)-8-(benciloxi)-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-benzo[e]pirrolo[1,2-alazepin-5-ona **32** (0,60 g, 1,79 mmol, 93,8 % de rendimiento) como un aceite amarillo. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1,89 - 2,11 (m, 3 H) 2,18 - 2,33 (m, 1 H) 3,59 (dt, *J* = 12,0, 7,6 Hz, 1 H) 3,80 (dt, *J* = 11,5, 5,8 Hz, 1 H) 3,90 - 3,96 (m, 1 H) 3,97 (s, 3 H) 5,19 (s, 2 H) 5,86 (dd, *J* = 10,0, 4,8 Hz, 1 H) 6,53 (dd, *J* = 10,0, 2,0 Hz, 1 H) 6,69 (s, 1 H) 7,29 - 7,35 (m, 1 H) 7,36 - 7,41 (m, 2 H) 7,42 - 7,48 (m, 2 H) 7,62 (s, 1 H)

A una solución del **Compuesto 32** (580 mg, 1,73 mmol) en DCM (50 mL) se le agregó TiCl₄ (656 mg, 3,46 mmol). La mezcla se agitó a 30 °C durante 12 h. A la mezcla se le agregó HCl 1 M (20 mL) y EtOAc (100 mL). La capa orgánica se lavó con agua (50 mL x 3) y se concentró para brindar (S)-8-hidroxi-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-benzo[e]pirrolo[1,2-alazepin-5-ona **33** (250 mg, 0,44 mmol, 25,3 % de rendimiento) como un sólido amarillo.

A una solución del **Compuesto 33** (50,0 mg, 0,20 mmol) en DMF (5,0 mL) se le agregó K₂CO₃ (42,26 mg, 0,31 mmol) y 1,5-diiodopentano (333 mg, 1,0 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 90 °C durante 3 h. La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía en sílice (EtOAc 0-50 % en éter de

petróleo) para proporcionar (S)-8-((5-hidroxipentil)oxi)-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-benzo[e]pirrolo[1,2-a]azepin-5-ona **34** (60 mg, 0,178 mmol, 87,6 % de rendimiento) como un aceite. LCMS (5-95AB/1,5 min): RT = 0,765 min, [M+H]⁺ 332,0.

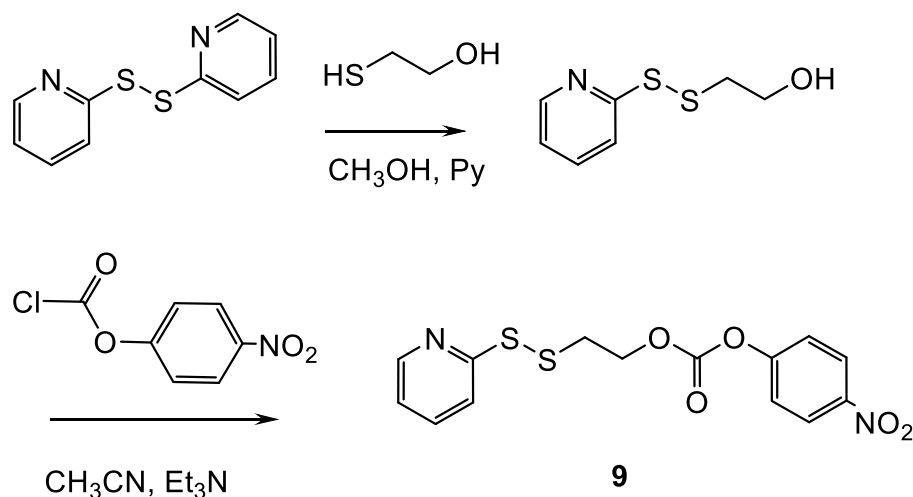
A una solución del Compuesto **34** (60,0 mg, 0,18 mmol) en DCM (6,0 mL) se le agregó trietilamina (55 mg, 0,54 mmol) y cloruro de metanosulfonilo, MsCl (41 mg, 0,36 mmol). Luego de haber agitado la mezcla a 35 °C durante 1 h, EtOAc (80 mL) y se lavó con agua (50 mL x 3). La capa orgánica se concentró para brindar metanosulfonato de (S)-5-((7-metoxi-5-oxo-2,3,5,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a]azepin-8-il)oxi)pentilo **35** (70 mg) como un aceite incoloro. LCMS (5-95AB/1,5 min): RT = 0,679 min, [M+H]⁺ 410,0.

A una solución del compuesto **35** (70 mg, 0,17 mmol) y (11S,11aS)-8-hidroxi-7-metoxi-2-metileno-5-oxo-11-((tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepina-10(5H)-carboxilato de terc-butilo **36** (87 mg, 0,19 mmol) en DMF (5,0 mL) se le agregó K₂CO₃ (47 mg, 0,34 mmol) y KI (5,68 mg, 0,030 mmol). La mezcla se agitó a 90 °C durante 3 h y se purificó mediante prep-HPLC (HCOOH) para proporcionar (11aR)-7-metoxi-8-((5-((S)-7-metoxi-5-oxo-2,3,5,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a]azepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-2-metileno-5-oxo-11a-((tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepina-10(5H)-carboxilato de terc-butilo **37** (70 mg, 0,084 mmol, 49,2 % de rendimiento) como un sólido blanco. LCMS (5-95AB/1,5 min): RT = 0,845 min, [M+H]⁺ 774,4.

Se agitó una solución del Compuesto **37** (50 mg, 0,060 mmol) en TFA (1,9 mL) y agua (0,10 mL) a 35 °C durante 1 h. La

mezcla se separó entre sat. NaHCO₃ (30 mL) y EtOAc (50 mL). Se lavó la capa orgánica con agua (30 mL x 2) y salmuera (30 mL) y se secó en Na₂SO₄. Se concentró y purificó mediante prep-TLC (MeOH al 5 % en DCM, R_f = 0,5) para brindar **DM-5** (20 mg, 0,034 mmol, 53,1 % de rendimiento) como un sólido blanco. LCMS (5-95AB/1,5 min): RT = 0,825 min, [M+H]⁺ 572,1 ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δppm 1,65 - 1,75 (m, 3 H) 1,88 - 2,10 (m, 8 H) 2,19 - 2,31 (m, 1 H) 2,82 - 3,29 (m, 2 H) 3,60 (dt, *J* = 11,9, 7,5 Hz, 1 H) 3,81 (dt, *J* = 11,6, 5,9 Hz, 1 H) 3,86 - 3,91 (m, 1 H) 3,94 (s, 6 H) 3,97 (br, s, 1 H) 4,01 - 4,18 (m, 4 H) 4,30 (s, 2 H) 5,19 (d, *J* = 10,6 Hz, 2 H) 5,89 (dd, *J* = 9,9, 5,1 Hz, 1 H) 6,53 - 6,63 (m, 1 H) 6,66 (s, 1 H) 6,81 (s, 1 H) 7,51 (s, 1 H) 7,59 (s, 1 H) 7,68 (d, *J* = 4,4 Hz, 1 H).

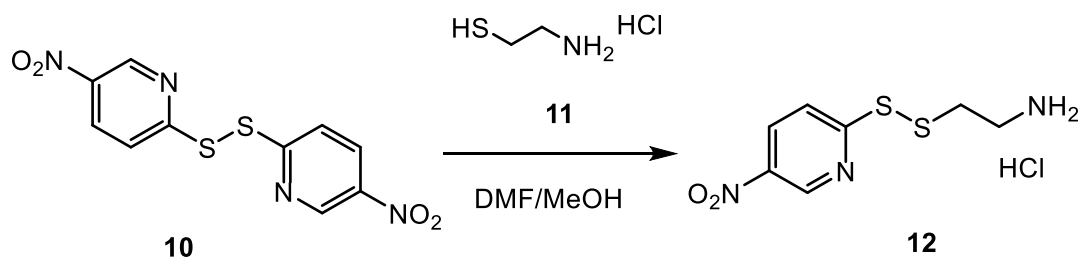
Ejemplo 2 Preparación de intermedios de enlazador-fármaco de pirrolobenzodiazepina monoalquilador (Tabla 2A)



Se hicieron reaccionar 1,2-di(piridin-2-il)disulfano y 2-mercaptoetanol en piridina y metanol a temperatura ambiente para brindar 2-(piridin-2-ildisulfanil)etanol. La acilación con carbonocloridato de 4-nitrofenilo en trietilamina y acetonitrilo brindó 2-(piridin-2-ildisulfanil)etil

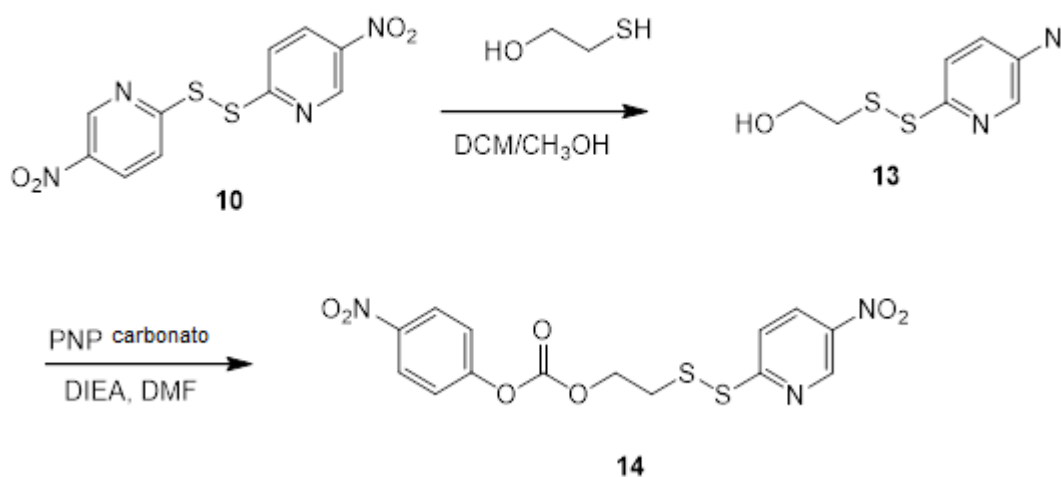
carbonato de 4-nitrofenilo **9**.

A una mezcla de 1,2-bis(5-nitropiridin-2-il)disulfano **10** (1,0 g, 3,22 mmol) en DMF/MeOH anhidro (25 mL/25 mL) se le agregó HOAc (0.1 mL), seguido por clorhidrato de 2-aminoetanotiol **11** (183 mg, 1,61 mmol). Luego de haber agitado la mezcla de reacción a r.t. durante la noche, se concentró al vacío para extraer el solvente y el residuo se lavó con DCM (30 mL x 4) para proporcionar clorhidrato de 2-((5-nitropiridin-2-il)disulfanil)etanamina **12** como un sólido amarillo pálido (300 mg, 69,6 %). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9,28 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 8,56 (dd, J = 8,8, 2,4 Hz, 1H), 8,24 (s, 4H), 8,03 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 3,15 - 3,13 (m, 2H), 3,08 - 3,06 (m, 2H)

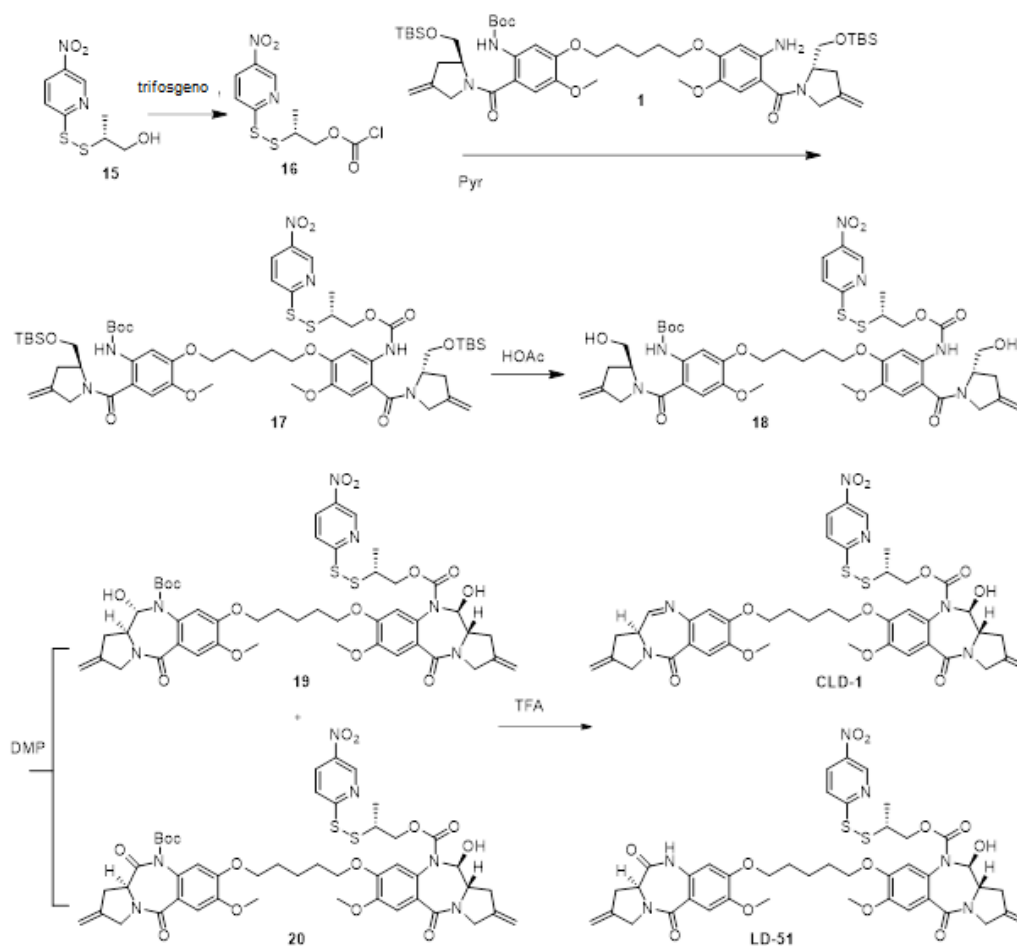


Una solución de 1,2-bis(5-nitropiridin-2-il)disulfano **10** (9,6 g, 30,97 mmol) y 2-mercaptoetanol (1,21 g, 15,49 mmol) en DCM anhidro/CH₃OH (250 mL/250 mL) se agitó a r.t. con N₂ durante 24 h. Luego de haber concentrado la mezcla al vacío, el residuo se diluyó con DCM (300 mL). Se agregó MnO₂ (10 g) y la mezcla se agitó a r.t. durante otra 0,5 h. La mezcla se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (DCM/MeOH = 100/1 a 100/1) para proporcionar 2-((5-nitropiridin-2-il)disulfanil)etanol **13** (2,2 g, 61,1 %) como un aceite café. ^1H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9,33 (d, J = 2,8 Hz, 1H), 8,38 - 8,35 (dd, J = 9,2, 2,8 Hz, 1H), 7,67 (d, J = 9,2 Hz, 1H), 4,10 (t, J = 7,2 Hz, 1H), 3,81 - 3,76 (q, 2H), 3,01 (t, J = 5,2 Hz, 2H).

A una solución de **13** (500 mg, 2,15 mmol) en DMF anhidro (10 mL) se le agregó DIEA (834 mg, 6,45 mmol), seguido por (bis(4-nitrofenil)carbonato de PNP carbonato (1,31g, 4,31 mmol). La solución de reacción se agitó a r.t. durante 4 h y la mezcla se purificó mediante prep-HPLC (FA) para proporcionar 2-((5-nitropiridin-2-il)disulfanil)etil carbonato de 4-nitrofenilo **14** (270 mg, 33,1 %) como un aceite café claro. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9,30 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 8,43 - 8,40 (dd, *J* = 8,8, 2,4 Hz, 1H), 8,30 - 8,28 (m, 2H), 7,87 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 7,39 - 7,37 (m, 2H), 4,56 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H), 3,21 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H).



Síntesis de 11-hidroxi-7-metoxi-8-((5-((S)-7-metoxi-2-metileno-5,11-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-2-metileno-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepina-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-(R)-2-((5-nitropiridin-2-il)disulfanil)propilo (**LD-51**)



Se agregó cloruro de sulfurilo (2,35 mL de una solución 1,0 M en DCM, 2,35 mmol) por goteo a una suspensión agitada de 5-nitropiridina-2-tiol (334 mg, 2,14 mmol) en DCM seco (7,5 mL) a 0 °C (hielo/acetona) en una atmósfera de argón. La mezcla de reacción cambió de una suspensión amarilla a una solución amarilla y se dejó calentar hasta temperatura ambiente y luego se agitó durante 2 horas, tras lo cual se retiró el solvente mediante evaporación *al vacío* para brindar un sólido amarillo. El sólido se volvió a disolver en DCM (15 mL) y se trató por goteo con una solución de (R)-2-mercaptopropan-1-ol (213 mg, 2,31 mmol) en DCM seco (7,5 mL)

a 0 °C con una atmósfera de argón. La mezcla de reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente y se agitó durante 20 horas, tras lo cual el análisis LC/MS reveló formación sustancial de producto con un tiempo de retención de 1,41 minutos (ES+) m/z 247 ($[M+H]^+$, ~100 % de intensidad relativa). Se retiró el filtrado mediante filtración y dicho filtrado se evaporó al vacío para brindar un sólido anaranjado que se trató con H₂O (20 mL) y se hizo básico con solución de hidróxido de amonio. La mezcla se extrajo con DCM (3 x 25 mL) y los extractos combinados se lavaron con H₂O (20 mL), salmuera (20 mL), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó al vacío para brindar el producto bruto. La purificación mediante cromatografía ultrarrápida (elución con gradiente en aumentos de 1 %: DCM al 100 % a 98:2 v/v DCM/MeOH) brindó (R)-2-((5-nitropiridin-2-il)disulfanil)propan-1-ol **15** como un aceite (111 mg, 21 % de rendimiento).

A una solución de trifosgeno, Cl₃COCOCCl₃, Sigma Aldrich, reg. CAS n.º 32315-10-9 (241 mg, 0,812 mmol) en DCM (10 mL) se le agregó una solución de (R)-2-((5-nitropiridin-2-il)disulfanil)propan-1-ol **15** (500 mg, 2,03 mmol) y piridina (153 mg, 1,93 mmol) en DCM (10 mL) por goteo a 20 °C. Luego de haber agitado la mezcla de reacción a 20 °C durante 30 min, se concentró y se utilizó carbonocloridato de (R)-2-((5-nitropiridin-2-il)disulfanil)propilo **16** directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Una solución del compuesto **16** (626 mg, 2,03 mmol) en DCM (10 mL) se agregó por goteo a una solución de (5-((5-(5-amino-4-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenopirrolidina-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)pentil)oxi)-2-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenopirrolidina-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbamato de

terc-butilo **1** (1,50 g, 1,57 mmol) y piridina (161 mg, 2,05 mmol) a 20 °C. La mezcla de reacción se agitó a 20 °C durante 3 h. El solvente se retiró y el residuo se purificó mediante columna ultrarrápida (EtOAc en éter de petróleo 0~30 %) para brindar (2-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenopirrolidina-1-carbonil)-5-((5-(4-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenopirrolidina-1-carbonil)-2-metoxi-5-(((R)-2-((5-nitropiridin-2-il)disulfanil)propoxi)carbonil)amino)fenoxi)pentil)oxi)-4-metoxifenil)carbamato de terc-butilo **17** (1,6 g, 83 %) como una espuma amarilla. LCMS (5-95AB/1,5 min): RT = 1,360min, [M+Na]⁺ 1247,4.

A una solución del compuesto **17** (900 mg, 0,734 mmol) en THF/H₂O (10 mL/10 mL) se le agregó HOAc (15 mL) a 20 °C. La mezcla de reacción se agitó a 20 °C durante 24 h. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (50 mL) y se lavó con agua (2 x 20 mL), NaHCO₃ ac. saturado (30 mL) y salmuera (30 mL). Se secó y concentró para brindar el producto bruto que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (DCM:MeOH = 100:1~20:1) para brindar (2-((S)-2-(hidroximetil)-4-metilenopirrolidina-1-carbonil)-5-((5-(4-((S)-2-(hidroximetil)-4-metilenopirrolidina-1-carbonil)-2-metoxi-5-(((R)-2-((5-nitropiridin-2-il)disulfanil)propoxi)carbonil)amino)fenoxi)pentil)oxi)-4-metoxifenil)carbamato de terc-butilo **18** (700 mg, 95,6 %) como una espuma amarilla. LCMS (5-95AB/1,5 min): RT = 0,978min, [M+H]⁺ 997,6.

A una solución del compuesto **18** (700 mg, 0,702 mmol) en DCM (40 mL) se le agregó periodinano de Dess-Martin, DMP, 1,1,1-Tris(acetiloxi)-1,1-dihidro-1,2-benziodoxol-3-(1H)-ona, Sigma Aldrich, n.º de reg. CAS 87413-09-0 (1,19 mg, 2,81 mmol) a 20 °C. La mezcla de reacción se agitó a 20 °C durante

1 h. La reacción se inactivó con una solución saturada de $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{SO}_3$ (20 mL/20 mL) y se extrajo con DCM (3 x 10 mL). La capa orgánica combinada se lavó con $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{SO}_3$ (10 mL/10 mL), salmuera (20 mL), se secó y concentró para brindar una mezcla de (11S,11aS)-11-hidroxi-8-((5-((11S,11aS)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metileno-10-((R)-2-((5-nitropiridin-2-il)disulfanil)propoxi)carbonil)-5-oxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-7-metoxi-2-metileno-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepina-10(5H)-carboxilato de terc-butilo **19** (LCMS (5-95AB/1,5 min): RT = 0,912 min, $[\text{M}+\text{Na}]^+ 1015.3$) and (S)-8-((5-((11S,11aS)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metileno-10-((R)-2-((5-nitropiridin-2-il)disulfanil)propoxi)carbonil)-5-oxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-7-metoxi-2-metileno-5,11-dioxo-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepina-10(5H)-carboxilato de terc-butilo **20**, que se utilizó directamente en la siguiente etapa.

Se agregó TFA frío (8 mL) a una mezcla bruta de **19** y **20** (600 mg, 0,604 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 30 min. La mezcla de reacción se agregó por goteo a NaHCO_3 ac. saturado (150 mL) a 0 °C y se extrajo con DCM (4 x 40 mL). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (50 mL), se secó y concentró para brindar el producto bruto que se purificó mediante pre-TLC (DCM:MeOH = 15:1) para separar **LD-51** puro (28 mg, 5,2 %) como una espuma amarilla. LCMS: (5-95, AB, 1,5 min), 0,739 min, $m/z = 891,2$ (M+1). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9,26 (s, 1H), 8,31 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H), 8,18 (s, 1H), 7,62 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 7,41 (s, 1H), 7,18 (s, 1H), 6,77 (s, 1H), 6,41 (s, 1H), 5,60 (d, $J = 10,0$ Hz, 1H), 5,20-5,06 (m, 4H), 4,50-3,81 (m, 18H), 3,70-3,60 (m, 1H), 3,50-3,40 (m, 1H), 3,18 (br, 1H), 2,98-2,62 (m,

6H), 1,95-1,86 (m, 4H), 1,70-1,52 (m, 2H), 1,17 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H).

Síntesis de 11-hidroxi-7-metoxi-8-((5-((S)-7-metoxi-2-metileno-5-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-2-metileno-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepina-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-(R)-2-((5-nitropiridin-2-il)disulfanil)propilo (**LD-52**)

A una solución de **CLD-1** (45 mg, 0,050 mmol) en THF (3,0 mL) se le agregó NaBH₃CN (3 mg, 0,050 mmol) y HOAc (0,05 mL) a 0 °C. La mezcla se agitó a 0 °C durante 2 min. La solución de reacción se purificó mediante prep-TLC (metanol al 7 % en DCM, R_f = 0,5) para brindar **LD-52** (20 mg, 0,022 mmol, 42,1 % de rendimiento) como un sólido blanco. LCMS (5-95AB/1,5 min): RT = 0,878 min, [M+H]⁺ 877,2. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9,19 (s, 1H), 8,27 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H), 7,58 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 7,53 (s, 1H), 7,24 (s, 1H), 6,69 (s, 1H), 6,02 (s, 1H), 5,56 (d, $J = 9,7$ Hz, 1H), 5,12 (s, 2H), 5,05 (d, $J = 11,2$ Hz, 2H), 4,54 (br,s, 1H), 4,42-4,38 (m, 1H), 4,29-4,22 (m, 4H), 4,13-4,09 (m, 1H), 4,02-3,39 (m, 8H), 3,79 (s, 3H), 3,63 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H), 3,53 (d, $J = 11,9$ Hz, 1H), 3,37-3,31 (m, 1H), 3,16-3,14 (m, 1H), 2,94-2,88 (m, 2H), 2,74-2,71 (m, 1H), 2,44-2,39 (m, 1H), 1,93-1,85 (m, 4H), 1,66-1,56 (m, 2H), 1,24-1,14 (m, 3H).

Ejemplo 3 Preparación de intermedios de enlazador-fármaco de pirrolobenzodiazepina comparador (Tabla 2B)

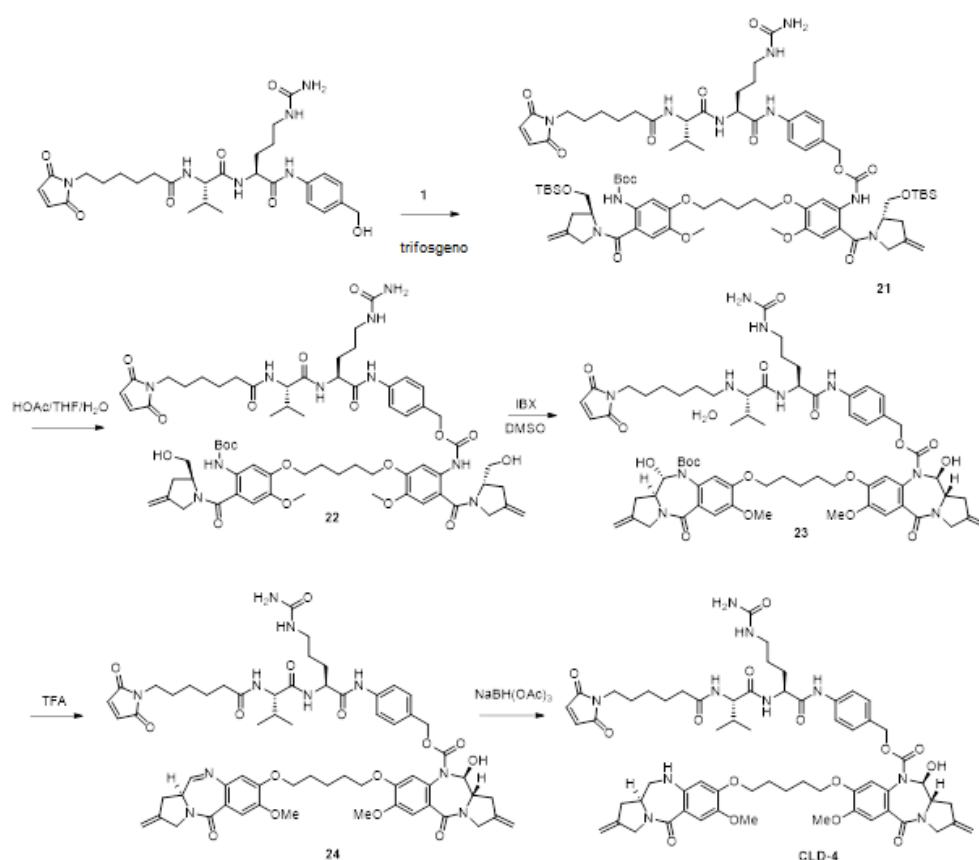
Síntesis de (11S,11aS)-11-hidroxi-7-metoxi-8-((5-((S)-7-metoxi-2-metileno-5-dioxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-2-metileno-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepina-10(5H)-carboxilato de

(R)-2-((5-nitropiridin-2-il)disulfanil)propilo (**CLD-1**)

A una solución de **18** (50 mg, 0,050 mmol) en DCM (2,0 mL) se le agregó DMP (149 mg, 0,35 mmol) a 25 °C. La mezcla de reacción se agitó a 25 °C durante 2 h. La reacción se diluyó con DCM (5 mL) y se inactivó con una solución saturada de NaHCO₃/Na₂SO₃ (2 mL/2 mL) y se extrajo con DCM (2 x 5 mL). La capa orgánica combinada se lavó con NaHCO₃/Na₂SO₃ (2 mL/2 mL), salmuera (5 mL), se secó y concentró. El residuo se purificó mediante pre-TLC (DCM:MeOH = 20:1) para brindar (11S, 11aS)-11-hidroxi-8-((5-((11S,11aS)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metileno-10-((R)-2-((5-nitropiridin-2-il)disulfanil)propoxi)carbonil)-5-oxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-7-metoxi-2-metileno-5-dioxo-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepina-10(5H)-carboxilato de terc-butilo **19**, que se utilizó directamente en la siguiente etapa. LCMS: (5-95, AB, 1,5 min), 0,830 min, m/z = 1013,4 (M+23).

Se agregó TFA frío (1 mL) a **19** (20 mg, 0.020 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 20 min. La mezcla de reacción se agregó por goteo a NaHCO₃ ac. saturado (20 mL) a 0 °C y se extrajo con DCM (3 x 15 mL). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (15 mL), se secó y concentró para brindar el producto bruto que se purificó mediante pre-TLC (DCM:MeOH = 15:1) para brindar **CLD-1** (4 mg, 23 %) como un sólido gris. LCMS: (5-95, AB, 1,5 min), 0,89 min, m/z = 873,6 (M+1). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9,22 (s, 1H), 8,38 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 7,78 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 7,68 (d, J = 4,4 Hz, 1H), 7,49 (s, 1H), 7,33 (s, 1H), 6,82 (s, 1H), 6,77 (s, 1H), 5,20-5,13 (m, 4H), 4,36-4,26 (m, 5H), 4,20-3,95 (m, 7H), 4,89-3,70 (m, 8H), 3,50-2,70 (m, 5H), 2,05-1,82 (m, 4H), 1,40-1,15 (m, 3H).

Síntesis de (11S,11aS)-11-hidroxi-7-metoxi-8-((5-((S)-7-metoxi-2-metileno-5-oxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-2-metileno-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepina-10(5H)-carboxilato de 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencilo **CLD-4**



A una solución de trifosgeno (156 mg, 0,52 mmol) en DCM (20 mL) se le agregó una solución de **1** (1,0 g, 1,05 mmol) y Et₃N (318 mg, 3,15 mmol) en DCM (5,0 mL). La mezcla se agitó a 0 °C durante 1 h y se concentró para brindar el intermedio bruto, que se agregó (0,88 g, 1,53 mmol) en DCM (20 mL) a una mezcla de trietilamina (310 mg, 3,07 mmol) y 6-(2,5-

dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-((S)-1-(((S)-1-((4-(hidroximetil)fenil)amino)-1-oxo-5-ureidopentan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)hexanamida, MC-VC-PAB (1,0 g, 1,02 mmol) en DMF (10 mL) a 0 °C. La mezcla se diluyó con DCM (40 mL) y se lavó con agua (2 x 30 mL). La capa orgánica se secó en Na₂SO₄, se concentró y se purificó mediante cromatografía en sílice (MeOH 0-10 % en DCM) para brindar (2-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenopirrolidina-1-carbonil)-5-((5-(4-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenopirrolidina-1-carbonil)-5-((((4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)oxi)carbonil)amino)-2-metoxifenoxi)pentil)oxi)-4-metoxifenil)carbamato de terc-butilo **21** (1,0 g, 0,64 mmol, 62,4 % de rendimiento) como un sólido amarillo.

A una solución del Compuesto **21** (1,0 g, 0,64 mmol) en THF (6,0 mL) se le agregó agua (6,0 mL) y ácido acético (9,0 mL). La mezcla se agitó a 20 °C durante 12 h. A la mezcla se le agregó EtOAc (100 mL) y la capa orgánica se lavó con agua (50 mL x 3) y NaHCO₃ sat. (50 mL) y se concentró para brindar (5-((5-(5-((((4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)oxi)carbonil)amino)-4-((S)-2-(hidroximetil)-4-metilenopirrolidina-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)pentil)oxi)-2-((S)-2-(hidroximetil)-4-metilenopirrolidina-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbamato de terc-butilo **22** (700 mg, 0,53 mmol, 82,1 % de rendimiento) como un sólido blanco.

A una solución de **22** (597 mg, 0,45 mmol) en DMSO (5,0 mL) se le agregó ácido 2-iodoxibenzoico, IBX (126 mg, 0,45 mmol) a 18 °C. La mezcla de reacción se agitó a 37 °C durante 8 h y

se purificó mediante prep-HPLC (40-70 % de acetonitrilo/FA al 0,225 % en agua) para brindar hidrato de (11S,11aS)-8-((5-(((11S,11aS)-10-(((4-((S)-2-((S)-2-((6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)oxi)carbonil)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metileno-5-oxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metileno-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepina-10(5H)-carboxilato de terc-butilo **23** (120 mg, 0,089 mmol, 19,8 % de rendimiento) como un sólido blanco.

Se agitó una solución de **23** (100 mg, 0,080 mmol) en TFA (4,0 mL) a 0 °C durante 30 min y luego se agregó a sat.NaHCO₃ frío (40 mL). Se extrajo el residuo con EtOAc (60 mL x 3). Las capas orgánicas combinadas se concentraron para brindar (11S,11aS)-11-hidroxi-7-metoxi-8-((5-((S)-7-metoxi-2-metileno-5-oxo-2,3,5,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-2-metileno-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepina-10(5H)-carboxilato de 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencilo **24** (90 mg) como un sólido amarillo, lo cual se utilizó directamente en la siguiente etapa.

A una solución del Compuesto **24** (90 mg, 0,070 mmol) en DMF (4,0 mL) se le agregó triacetoxiborohidruro de sodio (9,42 mg, 0,1500 mmol). También se utilizó cianoborohidruro de sodio como agente reductor. La mezcla se agitó a 20 °C durante 30 min. El residuo resultante se purificó mediante prep-TLC (acetonitrilo 0-40/HCl al 0,1 % en agua) para brindar **CLD-4** (28 mg, 0,022 mmol, 29,5 % de rendimiento) como un sólido blanco. LCMS: (5-95, AB, 1,5 min), 0,832 min,

$m/z = 602,7, 1203,6 (M+1)$.

Ejemplo 4 Preparación de anticuerpos modificados por cisteína para conjugación mediante reducción y reoxidación. Los aminoácidos de cadena ligera se numeran de acuerdo con Kabat (Kabat et ál., *Sequences of proteins of immunological interest*, (1991) 5.^a ed., Departamento de salud y servicios humanos de Estados Unidos, Institutos nacionales de la salud, Bethesda, MD). Los aminoácidos de cadena pesada se numeran de acuerdo con el sistema de numeración EU (Edelman et ál (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 63(1):78-85), salvo los indicados como el sistema Kabat. Se utilizan abreviaturas de aminoácidos de una letra.

Los anticuerpos monoclonales modificados con cisteína de longitud completa (THIOMAB™) expresados en células CHO presentan aductos de cisteína (cistinas) o se glutationilan en las cisteínas modificadas debido a las condiciones de cultivo celular. De esta forma, THIOMAB™ purificado a partir de células CHO se puede conjugar con intermedio de enlazador-fármaco que reacciona con Cys. Se pueden realizar anticuerpos modificados con cisteína reactivos para conjugación con intermedios de fármaco-enlazador de la invención, como los de la Tabla 2A, mediante tratamiento con un agente de reducción como DTT (reactivo de Cleland, ditioneitol) o TCEP clorhidrato de (tris(2-carboxietil)fosfina; Getz et ál. (1999) *Anal. Biochem.* tomo 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA) seguido por reformación de los enlaces disulfuro intercatenarios (reoxidación) con un oxidante leve, como ácido deshidroascórbico. Los anticuerpos monoclonales modificados con cisteína de longitud completa (THIOMAB™) expresados en células CHO (Gomez et ál (2010) *Biotechnology and Bioeng.* 105(4):748-760; Gomez et ál (2010) *Biotechnol. Prog.* 26:1438-1445) se redujeron, por ejemplo, con a un

exceso de alrededor de 50 veces de DTT durante la noche en 50 mM de Tris, pH 8,0 con 2 mM de EDTA a temperatura ambiente, lo que elimina los aductos de Cys y glutatona y reduce los enlaces disulfuro intercatenarios en el anticuerpo. El retiro de los aductos se controló mediante LCMS de fase inversa utilizando una columna de PLRP-S. El THIOMAB™ reducido se diluyó y acidificó mediante adición a al menos cuatro volúmenes de 10 mM de succinato de sodio, amortiguador a pH 5.

De forma alternativa, el anticuerpo se diluyó y acidificó agregando al menos cuatro volúmenes de 10 mM de succinato, pH 5 y titulación con ácido acético al 10 % hasta que el pH era de aproximadamente cinco. El THIOMAB™ diluido y con menor pH se cargó posteriormente en una columna de intercambio catiónico HiTrap S, se lavó con varios volúmenes de columna de 10 mM de acetato de sodio, pH 5 y se eluyó con 50 mM de Tris, pH 8,0, 150 mM de cloruro de sodio. Los enlaces disulfuro entre residuos de cisteína presentes en el Mab original se reestablecieron mediante reoxidación. El THIOMAB™ eluido y reducido descrito anteriormente se trató con ácido deshidroascórbico (DHAA, por su sigla en inglés) 15X durante alrededor de 3 horas o, de forma alternativa, con 200 nM a 2 mM de sulfato de cobre acuoso (CuSO_4) a temperatura ambiente durante la noche. Es posible utilizar otros oxidantes, es decir, agentes oxidantes, y condiciones de oxidación conocidos en la técnica. La oxidación en aire ambiente también puede ser eficaz. Esta etapa de reoxidación parcial leve forma disulfuros intracatenarios de forma eficaz con fidelidad elevada. La reoxidación se controló mediante LCMS de fase inversa utilizando una columna de PLRP-S. El THIOMAB™ reoxidado se diluyó con amortiguador de succinato como se describió anteriormente para alcanzar un pH de aproximadamente 5 y la purificación en una columna S

se realizó como se describió anteriormente, salvo porque la elución se realizó con un gradiente de 10 mM de succinato, pH 5, 300 mM de cloruro de sodio (amortiguador B) en 10 mM de succinato, pH 5 (amortiguador A). Al THIAMAB™ eluido se le agregó EDTA hasta una concentración final de 2 mM y se concentró, en caso de ser necesario, para alcanzar una concentración final de más de 5 mg/mL. El THIAMAB™ resultante, listo para conjugación, se almacenó a -20 °C en alícuotas. El análisis espectrométrico de masa/la cromatografía líquida se realizaron en un TOF serie 6200 o LC/MS QTOF Agilent. Las muestras se sometieron a cromatografía en una columna mcrobore PRLP-S®, 1000 Å (50mm × 2,1mm, Polymer Laboratories, Shropshire, Reino Unido) que se calentó hasta 80 °C. Se utilizó un gradiente lineal de 30-40 % B (solvente A: TFA al 0,05 % en agua, solvente B: TFA al 0,04 % en acetonitrilo) y el eluyente se ionizó directamente con la fuente de electroaspersión. Se recopilaron datos y se sometieron a desconvolución con software MassHunter. Antes del análisis de LC/MS, los conjugados de anticuerpo o fármaco (50 microgramos) se trataron con PNGasa F (2 unidades/ml; PROzyme, San Leandro, CA) durante 2 horas a 37 °C para eliminar los carbohidratos con enlace a N.

De forma alternativa, los conjugados de anticuerpo o fármaco se digirieron de forma parcial con LysC (0,25 µg por 50 µg (microgramo) de anticuerpo o conjugado) durante 15 minutos a 37 °C para brindar un fragmento Fc o Fab para análisis mediante LCMS. Se asignaron y cuantificaron picos en los espectros de LCMS desconvolucionados. Se calcularon las relaciones de fármaco a anticuerpo (DAR) calculando la relación de intensidades de pico a pico correspondientes al anticuerpo conjugado con fármaco con respecto a todos los picos observados.

Ejemplo 5 Conjugación de intermedios de enlazador-fármaco con anticuerpos

Tras los procedimientos de reducción y reoxidación del Ejemplo 2, se ajusta el pH del anticuerpo modificado con cisteína (THIOMAB™) en 10 mM de succinato, pH 5, 150 mM de NaCl, 2 mM de EDTA, hasta un pH de 7,5-8,5 con Tris 1M. Se disuelve un exceso de alrededor de 3 molar a 20 equivalentes de un intermedio de enlazador-fármaco con un grupo disulfuro de piridilo que reacciona con tiol, incluidos, de modo no taxativo, los de la Tabla 2A, en DMF o DMA y se agrega al anticuerpo reducido, reoxidado y con ajuste de pH. La reacción se incuba a temperatura ambiente o 37 C y se controla hasta la terminación (1 a alrededor de 24 horas), según la determinación con análisis de LC-MS de la mezcla de reacción. Al completar la reacción, el conjugado se purifica mediante uno o cualquier combinación de diversos métodos, con la meta de retirar el resto de intermedio de enlazador-fármaco sin reaccionar y la proteína acumulada (si estuviera presente en niveles considerables). Por ejemplo, el conjugado se puede diluir con 10 mM de histidina-acetato, pH 5,5, hasta un pH final de aproximadamente 5,5 y purificarse mediante cromatografía de intercambio catiónico S con columnas HiTrap S conectadas a un sistema de purificación Akta (GE Healthcare) o columnas de centrifugado S maxi (Pierce). De forma alternativa, el conjugado se puede purificar mediante cromatografía de filtración de gel con una columna S200 conectada a un sistema de purificación Akta o columnas de centrifugado Zeba. De forma alternativa, se puede utilizar diálisis. Los conjugados de fármaco THIOMAB se formularon en 20 mM de His/acetato, pH 5, con 240 mM de sacarosa utilizando filtración en gel o diálisis. El conjugado purificado se concentró mediante ultrafiltración con centrifugado y se filtró a través de un filtro de 0,2-

µm en condiciones estériles y se congeló para almacenamiento. Los conjugados de anticuerpo-fármaco se caracterizaron mediante un ensayo de BCA para determinar la concentración de proteína, SEC (cromatografía de exclusión por tamaño) analítica para análisis de acumulación y LC-MS tras el tratamiento con endopeptidasa Lisina C (LysC) para calcular la DAR.

Se realiza cromatografía de exclusión por tamaño en los conjugados utilizando una columna Shodex KW802,5 en fosfato de potasio 0,2 M a pH 6,2 con 0,25 mM de cloruro de potasio e IPA al 15 % a una velocidad de flujo de 0,75 ml/min. Se determinó el estado de acumulación mediante integración de la absorbancia del área pico eludida a 280 nm.

El análisis de LC-MS se puede realizar en ADC utilizando un instrumento ESI QTOF 6520 de Agilent. A modo de ejemplo, el conjugado de anticuerpo-fármaco se trata con 1:500 p/p de Endoproteinasa Lys C (Promega) en Tris, pH 7,5, durante 30 min a 37 °C. Los fragmentos de escisión resultantes se cargan en una columna de PLRP-S (poliestireno altamente reticulado) de 1000Å (Angstrom), 8 µm (micrones) que se calienta hasta 80 °C y se eluye con un gradiente de 30 % de B a 40 % de B en 5 minutos. La fase móvil A fue H₂O con TFA al 0,05 % y la fase móvil B fue acetonitrilo con TFA al 0,04 %. La velocidad de flujo fue de 0,5 ml/min. La elución de proteína se controló mediante detección de absorbancia UV a 280 nm antes de la ionización por electroaspersión y análisis de MS. Normalmente se logró la resolución cromatográfica del fragmento Fc sin conjuguar, el Fab residual sin conjuguar y el Fab sin fármaco. Los espectros m/z obtenidos se sometieron a desconvolución utilizando el software Mass Hunter™ (Agilent Technologies) para calcular la masa de los fragmentos de anticuerpo.

Con estos procedimientos se elaboraron los conjugados de anticuerpo-fármaco modificados con cisteína de la Tabla 3A y 3B.

Ejemplo 6 Ensayo de proliferación celular *in vitro*

Se midió la eficiencia de ADC en un ensayo de proliferación celular con el siguiente protocolo (Ensayo de viabilidad celular luminiscente CELLTITER GLO™, Promega Corp. Boletín técnico TB288; Mendoza et ál (2002) Cancer Res. 62:5485-5488). El protocolo es una modificación del ensayo celular luminiscente CELLTITER GLO™:

1. Se depositó una alícuota de 100 µl de cultivo celular con alrededor de 10^4 células (SKBR-3, BT474, MCF7 o MDA-MB-468) en medio en cada pocillo de una placa de paredes opacas de 96 pocillos.
2. Se prepararon pocillos de control con medio y sin células.
3. Se agregaron ADC a los pocillos experimentales y se incubaron durante 3-5 días.
4. Se equilibraron las placas hasta temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos.
5. Se agregó un volumen de reactivo CELLTITER GLO™ igual al volumen de medio de cultivo celular presente en cada pocillo.
6. Se mezcló el contenido durante 2 minutos en un agitador orbital para inducir la lisis celular.
7. Se incubó la placa a temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilizar la señal de luminiscencia.
8. Se registró la luminiscencia y se informó en gráficas como RLU = unidades de luminiscencia relativa.

Se graficaron los datos como media de luminiscencia para cada conjunto de réplicas, con barras de error de desvío

estándar, como se observa en las Figuras 1A-E.

Medio: crecimiento SK-BR-3 en 50/50/10 % de FBS/glutamina/250 µg/mL de G-418 crecimiento OVCAR-3 en RPMI/FBS al 20 %/glutamina

Ejemplo 7 Inhibición del crecimiento tumoral, eficacia *in vivo* en ratones con xenoinjerto

Se establecieron tumores y se dejaron crecer hasta un volumen de 150-200 mm³ (según la medición con pinzas) antes del único tratamiento en el día 0. El volumen tumoral se midió utilizando pinzas según la fórmula: $V \text{ (mm}^3\text{)} = 0,5A \times B^2$, en la que A y B son los diámetros largos y cortos, respectivamente. Los ratones se sometieron a eutanasia antes de que el volumen tumoral alcanzó 3000 mm³ o cuando los tumores mostraron signos de úlcera inminente. Los datos recopilados de cada grupo experimental (10 ratones por grupo) se expresaron como media $\pm$ SE.

Se inocularon n=150 ratones con células HER2 KPL-4 a 3 millones de células/ratón suspendidas en HBSS/matrigel, en el pániculo adiposo mamario torácico a un volumen de 0,2 ml. Cuando los tumores alcanzan un volumen medio tumoral de 100-250 mm³, estos se agrupan en 10 grupos de 8-10 ratones cada uno. Se administra un único tratamiento intravenoso mediante la vena de la cola el día 0. El volumen no debe superar 0,3 ml y un tamaño de aguja de calibre 28 o 29.

La línea celular HCC1569 expresa Ly6E y se obtuvo de la ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo; Manassas, VA) y la sublínea HCC1569X2 se generó en Genentech para crecimiento óptimo en ratones. Cada uno de los ratones SCID beige C.B-17 hembra (Charles River Laboratory) se inoculó en el área del pániculo adiposo mamario torácico con 5 millones de

células HCC1569X2 suspendidas en HBSS/matrigel (relación 1:1). Cuando los tumores de xenoinjerto alcanzaron un volumen tumoral promedio de 100-300 mm³ (indicado como Día 0), se asignaron los animales en forma aleatoria a grupos de 5 ratones cada uno y recibieron una única inyección intravenosa del conjugado de anticuerpo-fármaco a través de la vena de la cola. Se midieron el peso tumoral y el peso corporal de los ratones 1-2 veces por semana durante el estudio. Cuando la reducción del peso corporal fue de >20 % de su peso inicial, los ratones fueron sometidos a eutanasia. Se sometió a eutanasia a todos los animales antes de que los tumores alcanzaran 3000 mm³ o de que mostraran señales de ulceración inminente. Se midió el volumen tumoral en dos dimensiones (longitud y ancho) utilizando pinzas y se calculó el volumen tumoral utilizando la siguiente fórmula: Tamaño tumoral (mm³) = (medición más extensa x medición más corta²) x 0,5 (WO 2013/177055).

Se utilizó el modelo de tumor de mama en ratón Fo5 para evaluar la eficacia *in vivo* de los conjugados de anticuerpo-fármaco de la invención tras inyecciones intravenosas de una sola dosis, como se describió previamente (Phillips GDL, Li GM, Dugger DL, et ál. Targeting HER2-Positive Breast Cancer with Trastuzumab-DM1, an Antibody-Cytotoxic Drug Conjugate. (2008) Cancer Res. 68:9280-90), que se incorpora a la presente mediante esta referencia. Se analizaron los ADC anti-Her2 con el modelo Fo5, un modelo de ratón transgénico en el que el gen HER2 humano se sobreexpresa en el epitelio mamario con regulación transcripcional del promotor del virus tumoral mamario en murino (MMTV-HER2), como se muestra en las Figuras 3 y 5. La sobreexpresión de HER2 provoca desarrollo espontáneo de un tumor mamario. El tumor mamario de uno de estos animales fundadores (fundador n.º 5 [Fo5]) se propagó a generaciones posteriores de ratones FVB mediante

trasplante en serie de fragmentos tumorales (tamaño de ~ 2 × 2 mm). Todos los estudios se realizaron de acuerdo con la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Cada conjugado de anticuerpo-fármaco (dosis única) se administró a nueve animales por vía intravenosa al inicio del estudio y 14 días tras el trasplante. El tamaño tumoral inicial fue de alrededor de 200 mm³ en volumen. Las mediciones de inhibición del crecimiento tumoral en el tiempo por parte de los conjugados de anticuerpo-fármaco de la invención y los controles se muestran en las Figuras 2-8.

Se puede utilizar otro modelo de eficacia de trasplante en pániculo adiposo mamario como se ha descrito (Chen et ál. (2007) *Cancer Res* 67:4924-4932), que evalúa el volumen tumoral tras una única dosis intravenosa y utiliza tumores extraídos de un ratón con tumor intraperitoneal y luego los pasa en serie a pániculos adiposos mamarios de los ratones receptores.

Se determinaron las actividades de destrucción celular de ADC anti-CD22 y anti-Napi en líneas celulares con expresión de CD22 o Napi tras incubaciones de 5 días y en ratones con xenoinjerto.

Ejemplo 8 Ensayo de alquilación/unión de oligonucleótidos

Se estudió la interacción de compuestos de pirrolobenzodiazepina con oligonucleótidos formadores de estructuras dobles de diversa longitud y secuencia con secuencias de Pu-GAATG-Py > Pu-GATC-Py >> Pu-GATG-Py o Pu-GAATC-Py, en las que Pu es un nucleótido de purina A o G y Py es un nucleótido de pirimidina C o T, para determinar la reticulación intracatenaria e intercatenaria previamente identificada (Rahman KM, et ál (2009) *J Am Chem Soc* 131:13756-13766). Se estudiaron la estructura doble

intercatenaria G, 5'- TATAGAAATCTATA -3' y 3'- ATATCTTTAGATAT -5', y la estructura doble intracatenaria G, 5'- TATAGAAATGTATA -3' y 3'- ATATCTTTACATAT -5' con el siguiente procedimiento:

Los compuestos se incubaron a 100 μ M con 50 μ M de desoxioligonucleótidos (ADN) de cadena doble durante 1 hora en 10 mM de Bis-Tris, pH 7,1 a 37 °C. Las muestras se analizaron mediante LC/MS/UV en Sciex TripleTOF 5600 en una columna Hypersil Gold C18 (100x2,1, 1,9 μ M, Thermo Scientific). La columna se eluyó a 0,4 mL/min con un gradiente de amortiguador A (50 mM de hexafluoro-isopropanol y 15 mM de dietilamina) a amortiguador B (A al 50 % y 50 % de 1:1 metanol:acetonitrilo), 5 % hasta 25 % de B en 8 min, hasta 75 % de B en 5 min y hasta 95 % de B en 1 min.

Ejemplo 9 Estudio de seguridad/toxicidad en monos cinomolgos
Se evaluaron conjugados de anticuerpo-fármaco de la invención para determinar la toxicidad en monos cinomolgos, incluidos los efectos pulmonares de toxicidad dependiente del antígeno debido a la expresión en el pulmón.

Diseño del estudio:

Régimen: Dosificación IV dos veces en los días 1 y 22 para evaluar la toxicidad en 2 ciclos enteros. 10 días de dosificación inicial (1M por grupo), con dosis 10 días antes del 1M/2F restante para mitigar el riesgo de morbilidad/mortalidad aguda.

Las posibles observaciones clínicas pueden incluir enrojecimiento cutáneo, descoloración de color negro de la piel, desprendimiento de células epiteliales/descamación, úlceras, hinchazón facial/edema, afección de masa corporal magra, falta de apetito y estado moribundo general.

Los posibles cambios en la patología clínica asociados con la dosificación de conjugado de anticuerpo-fármaco en monos cinomolgos pueden incluir aumento en la creatinina y el nitrógeno en urea en combinación con una orina con concentración inadecuada, alteraciones en sodio, cloruro y potasio posiblemente vinculadas con una alteración de la función tubular renal, degeneración alveolar pulmonar y cambios de respuesta a la dosis en los parámetros hematológicas, así como inflamación.

Las principales toxicidades de los órganos pueden incluir riñones, ojos, piel/SQ/músculos, médula ósea, pulmones, órganos linfoides (agotamiento linfoide esplénico y tímico).

Los hallazgos de aumento dependiente de la dosis en la gravedad de la patología pueden permitir la comparación de propiedades de seguridad/toxicidad de conjugados de anticuerpo-fármaco y compuestos de control.

Ejemplo 10 Eficacia en ratones

Se investigó la eficacia de conjugados de anticuerpo anti-Her2-fármaco en un modelo de aloinjerto en ratón del fundador MMTV-HER2 n.º 5 (tumor de mama murino) o un modelo de xenoinjerto en ratón de KPL4, HCC1569X2 (cáncer de mama humano).

El modelo de fundador MMTV-HER2 n.º 5 (Fo5) (desarrollado en Genentech) es un modelo de ratón transgénico en el que se sobreexpresa el gen HER2 humano en el epitelio mamario, con regulación de transcripción del promotor de virus tumoral mamario murino (MMTV-HER2). La sobreexpresión provoca el desarrollo espontáneo de tumores mamarios que sobreexpresan el receptor HER2 humano. El tumor mamario de uno de los animales fundadores (fundador n.º 5, Fo5) se implantó de

forma quirúrgica en el pániculo adiposo mamario torácico de ratones FVB o nu/nu hembra (Charles River Laboratories) como fragmentos tumorales de aproximadamente 15-30 mm³ de tamaño.

La línea celular de cáncer de mama KPL4 se obtuvo del laboratorio del Dr. J. Kurebayashi (Japón). La línea celular de cáncer de mama HCC1569 se obtuvo de la ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo; Manassas, VA) y la sublínea HCC1569X2 se generó en Genentech para crecimiento óptimo en ratones. Ambas líneas celulares expresan HER2, como se determina mediante FACS e IHC. Para establecer el modelo, cada uno de los ratones SCID beige C.B-17 hembra (Charles River Laboratories) se inoculó en el área del pániculo adiposo mamario torácico con 3 millones de células KPL4 o 5 millones de células HCC1569X2 suspendidas en HBSS/matrigel (relación 1:1).

Cuando los tumores alcanzaron un volumen tumoral promedio de 100-300 mm³, se asignaron los animales en forma aleatoria a grupos de 5-10 ratones cada uno y recibieron una única inyección intravenosa de los ADC (indicado como Día 0). Se midieron el peso tumoral y el peso corporal de los ratones 1-2 veces por semana durante el estudio. Cuando la reducción del peso corporal fue de >20 % de su peso inicial, los ratones fueron sometidos a eutanasia. Se sometió a eutanasia a todos los animales antes de que los tumores alcanzaran 3000 mm³ o de que mostraran señales de ulceración inminente. Se midió el volumen tumoral en dos dimensiones (longitud y ancho) utilizando pinzas y se calculó el volumen tumoral utilizando la siguiente fórmula: Tamaño tumoral (mm³) = 0,5 x (longitud x ancho x ancho). Los datos de esta prueba se muestran en las Figuras 12 y 13.

Estudio de toxicología de hu7C2 anti-HER2 LC:K149C-LD-51 en monos cinomolgos

Se realizó un estudio de toxicología exploratorio con aumento de dosis en monos cinomolgos. Los animales recibieron dos o cuatro dosis de bolo IV lento q3w de hu7C2 anti-HER2 LC:K149C-LD-51, comenzando con un nivel de dosis de 1 mg/kg. Los aumentos de dosis se escalonaron en 2-3 semanas. El diseño del estudio se resume en la Tabla 7 a continuación.

Tabla 7: Diseño del estudio de toxicología de anti-HER2-LD51 LC:K149C en monos cinomolgos

Artículo de prueba	N/sexo	Dosis (mg/kg)	Régimen de dosis
Vehículo	2M/2F	0	2X q3w
anti-HER2-LD51	1M	1	2X q3w
anti-HER2-LD51	1M	2	2X q3w
anti-HER2-LD51	1M	4	2X q3w
anti-HER2-LD51	1M	8	2X q3w
anti-HER2-LD51	2M/2F	16	2X q3w
anti-HER2-LD51	2M/2F	16	4X q3w
anti-HER2-LD51	2M/2F	24	2X q3w
anti-HER2-LD51	1M	36	2X q3w

La toxicidad se evaluó mediante exámenes clínicos y oftálmicos, así como la patología clínica (hematología, química en suero, coagulación y análisis de orina; aproximadamente de forma semanal durante todo el estudio). Se realizó histopatología macro y microscópica en los tejidos extraídos en la necropsia tres semanas tras la última dosis.

En animales que recibieron cuatro dosis q3w de 16 mg/kg de hu7C2 anti-HER2 LC:K149C-LD-51, los hallazgos histológicos fueron en general más graves que los observados tras dos dosis de 16 mg/kg. Se observaron degeneración tubular renal (leve-moderada), agotamiento linfoide (timo, bazo, nódulos linfáticos; leve-moderado), pigmentación epitelial/hiperqueratosis (leve), mucosa en intestino delgado (leve) y degeneración alveolar pulmonar leve/fibroplasia (leve).

Los principales órganos objetivo del hu7C2 anti-HER2 LC:K149C-LD-51 en el mono cinomolgo son riñón, médula ósea, piel, pulmones, órganos linfoides (bazo, timo, nódulos linfáticos), intestino delgado y ojos (córnea). La dosis máxima tolerada (MTD) como régimen 2X q3w es de 16 mg/kg, mientras que la MTD como régimen 4X q3w es de 8 mg/kg.

No se realizaron estudios de anti-HER2-CLD-1 en monos. No obstante, se determinó la dosis MTD 2X q3w de CLD-1 al conjugarse con otros anticuerpos modificados con cisteína en el mono cinomolgo. La MTD de dosis 2 q3w de anti-NaPi2b-CLD-1 fue de 0,5 mg/kg, mientras que la del conjugado sin direccionamiento gD-CLD-1 fue de 0,5 mg/kg. Los efectos similares observados en órganos objetivo sugieren que las toxicidades son mayormente independientes del antígeno y se atribuyen a CLD-1 o LD-51. Las mayores MTD de los conjugados LD-51 en comparación con los conjugados CLD-1 indican la mejor tolerabilidad de LD-51 en comparación con CLD-1. Los datos de estas pruebas se muestran en las Figuras 12 y 13.

Ejemplo 12 Estudio de toxicología de C-1 y DM-2 en rata

Se realizó un estudio exploratorio de toxicología de dosis única en ratas comparando los fármacos libres C-1 (PBD bis

alquilador) y DM-2 (PDB monoalquilador). Los animales recibieron una única dosis IV de C-1, DM-2 o vehículo y se controlaron durante un período de recuperación de 7 días. El diseño del estudio se resume en la Tabla 8 a continuación.

Tabla 8: Diseño de estudio de toxicología de fármacos libres C-1 y DM-2 en ratas

Artículo de prueba	N/sexo	Dosis (mg/kg)
Vehículo	5F	0
C-1	5F	0,05
C-1	5F	0,1
C-1	5F	0,2
DM-2	5F	0,5
DM-2	5F	1
DM-2	5F	2

Se evaluó la toxicidad mediante observaciones clínicas y la patología clínica (hematología y química clínica a las 72 y 168 horas tras la dosis). En general, los resultados fueron similares para DM-2 a diez veces el nivel de dosis de C-1. Para C-1, se observó una disminución dependiente de la dosis en los reticulocitos con todas las dosis a las 72 horas, con recuperación en los grupos de 0,05 y 0,1 mg/kg a las 168 h tras la dosis. Con la dosis de 0,2 mg/kg, se observaron cambios en la patología clínica que indican toxicidad hepática y renal. Dosis de 0,05 y 0,1 mg/kg se toleraron bien sin signos clínicos.

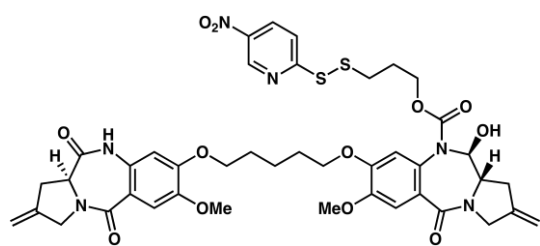
Los niveles de dosis de 0,5 y 1 mg/kg de DM-2 se toleraron

bien y no produjeron signos clínicos o eutanasias tempranas. Los animales que recibieron 2 mg/kg perdieron aproximadamente el 14 % de su peso corporal del día 2 a 4 y se sometieron a eutanasia en estado moribundo al día 4. Se observó una disminución dependiente de la dosis en los reticulocitos con todas las dosis de DM-2 72 horas tras la dosis, con recuperación en los grupos de 0,5 y 1 mg/kg a las 168 horas tras la dosis. Con la dosis de 2 mg/kg, se observaron cambios en la patología clínica que indican toxicidad hepática y renal.

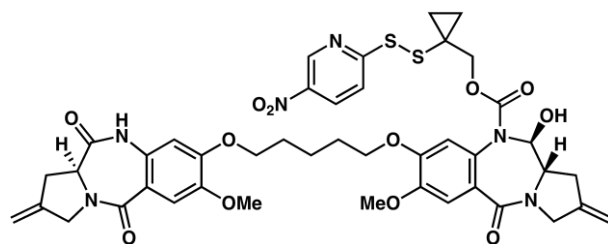
En resumen, el perfil de toxicidad que resulta de una única dosis de C-1 o DM-2 fue similar, con C-1 aproximadamente diez veces más potente que DM-2. Los principales órganos objetivo de ambos artículos de prueba fueron médula ósea, riñón e hígado. Las MTD de C-1 y DM-2 fueron de 0,1 y 1 mg/kg, respectivamente, como una única dosis IV en ratas. Los resultados de este estudio indican la mayor tolerabilidad de DM-2 en comparación con C-1.

Ejemplo 13 Actividad in vitro en líneas celulares de cáncer de mama positivo para HER2 SK-BR-3 y KPL-4

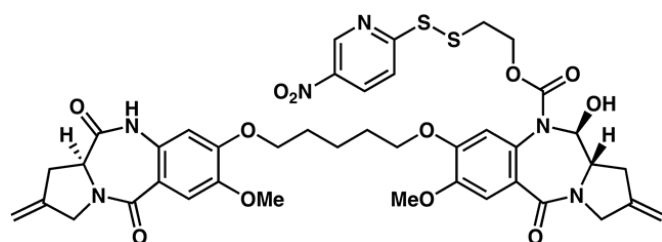
Las células se colocaron en placas de 96 pocillos y se dejaron adherir durante la noche a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 %. Luego se extrajo el medio y se reemplazó con medio de cultivo fresco con diversas concentraciones de cada fármaco. Se agregó Cell Titer Glo (Promega Corp.) a los pocillos a los 5 días tras la administración del fármaco y se midió la señal luminiscente utilizando el lector de placas de etiquetas múltiples EnVision (PerkinElmer). Los compuestos analizados fueron anti-HER2 hu7C2 LC:K149C CLD-7; anti-HER2 hu7C2 LC:K149C CLD-8; anti-HER2 hu7C2 LC:K149C CLD-9, y anti-HER2 hu7C2 LC:K149C LD-51



CLD-7



CLD-8



CLD-9

Los datos de esta prueba se muestran en la Figura 14 y en la Tabla 9 a continuación.

Tabla 9

Enlazador- fármaco	Objetivo	DAR	SK-BR-3		KPL-4	
			IC ₅₀		IC ₅₀	
			ng/mL	nM	ng/mL	nM
CLD-7	HER2 (7C2)	1,9	>10.000	>67	>100.000	>67
CLD-8	HER2 (7C2)	1,94	>10.000	>67	63.000	422
CLD-9	HER2 (7C2)	2,0	180	1,2	1480	9,9
LD-51	HER2 (7C2)	1,9	27,7	0,19	1240	8,3

Ejemplo 14 Eficacia in vivo de aloinjerto en ratón

Se investigó la eficacia de los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) anti-Her2 en un modelo de aloinjerto en ratón del fundador MMTV-HER2 n.º 5 (tumor mamario murino). El modelo de fundador MMTV-HER2 n.º 5 (Fo5) (desarrollado en Genentech) es un modelo de ratón transgénico en el que se sobreexpresa el gen HER2 humano en el epitelio mamario, con regulación de transcripción del promotor de virus tumoral mamario murino (MMTV-HER2). La sobreexpresión provoca el desarrollo espontáneo de tumores mamarios que sobreexpresan el receptor de HER2 humano. El tumor mamario de uno de los animales fundadores (fundador n.º 5 Fo5) se propagó en ratones FVB (Charles River Laboratories) mediante trasplante en serie de fragmentos tumorales.

Para los estudios de eficacia, se trasplantó de forma quirúrgica el tumor mamario transgénico Fo5 en el panículo adiposo mamario torácico de ratones nu/nu hembra (Charles River Laboratories; Hollister, CA) como fragmentos tumorales de aproximadamente 15-30 mm³ de tamaño. Cuando los tumores de aloinjerto alcanzaron un volumen tumoral promedio de 100-

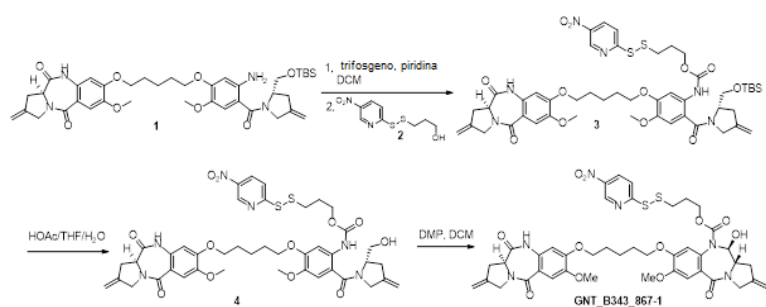
300 mm³ (indicado como Día 0), se asignaron los animales en forma aleatoria a grupos de 7 ratones cada uno y recibieron una única inyección intravenosa del conjugado de los ADC. Se midieron el peso tumoral y el peso corporal de los ratones 1-2 veces por semana durante el estudio. Cuando la reducción del peso corporal fue de >20 % de su peso inicial, los ratones fueron sometidos a eutanasia. Se sometió a eutanasia a todos los animales antes de que los tumores alcanzaran 3000 mm³ o de que mostraran señales de ulceración inminente. Se midió el volumen tumoral en dos dimensiones (longitud y ancho) utilizando pinzas y se calculó el volumen tumoral utilizando la siguiente fórmula: Tamaño tumoral (mm³) = 0,5 x (longitud x ancho x ancho). Los datos de este estudio se muestran en la figura 15. Entre los 4 ADC anti-Her2, solamente anti-Her2-LD-51 demostró una clara actividad antitumoral cuando se comparó con el grupo con vehículo. La eficacia de anti-Her2_LD-51 fue dependiente del objetivo, dado que el control correspondiente anti-CD22-LD-51 que no tenía este objetivo no tuvo efecto sobre el crecimiento tumoral.

Ejemplo 15 Síntesis de DM-4, C-1, C-2, C-3, CLD-2, CLD, 3, CLD-5 y CLD-6

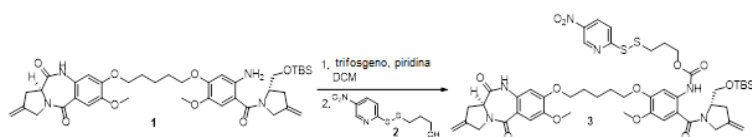
El procedimiento sintético para realizar C-1, C-2, C-3 y CLD-2 se puede encontrar en los siguientes documentos: C-1: Journal of Medicinal Chemistry (2004), 47(5), 1161-1174; C-2: Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (2000), 10(16), 1845-1847 o la solicitud int. PCT WO 2000012508; C-3: Solicitud int. PCT WO 2015155753 y CLD-2 US 20160074527.

Síntesis de CLD-7

Esquema



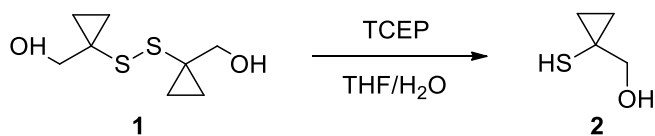
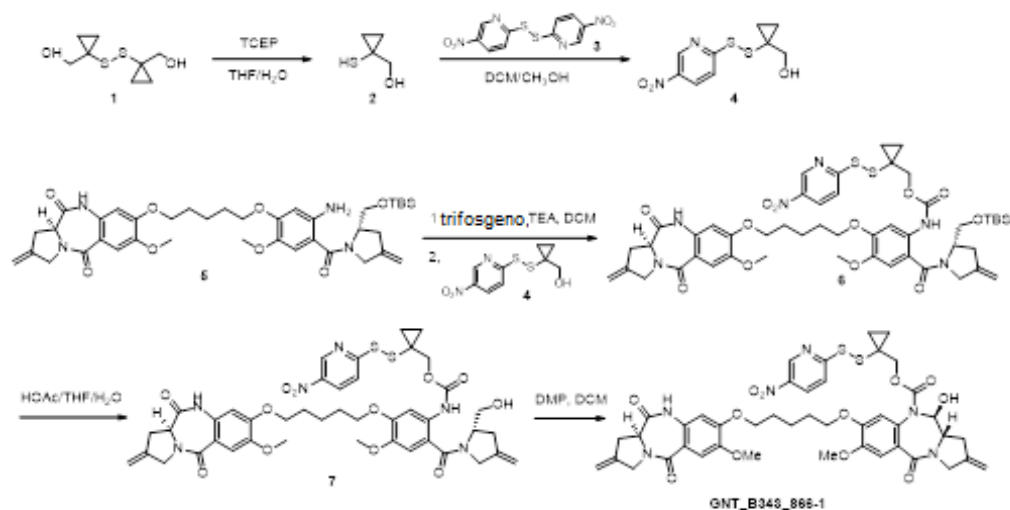
Práctica experimental



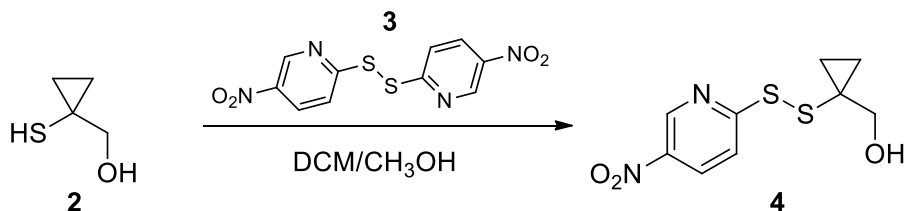
A una solución de trifosgeno (60,6 mg, 0,200 mmol) en DCM (15 mL) se le agregó una solución de piridina (129 mg, 1,63 mmol) y **2** (55,3 mg, 0,220 mmol) en DCM (15 mL). La mezcla se agitó a 0 °C durante 10 min, la TLC (EtOAc al 25 % en éter de petróleo, R_f = 0,5) mostró consumo del material de partida. La mezcla se concentró hasta sequedad y se disolvió en DCM (10 mL) y se agregó a una solución del compuesto **1** (150,0 mg, 0,200 mmol) y Et₃N (103,3 mg, 1,02 mmol) en DCM (15 mL). La mezcla se agitó a 0 °C durante 1 h. La TLC (EtOAc al 50 % en éter de petróleo) mostró consumo del material de partida. La mezcla se concentró y el producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida en sílice (EtOAc al 0-33 % en éter de petróleo). Se concentró para proporcionar **3** (180,0 mg, 81 %) como un sólido amarillo. LCMS (5-95AB/1,5 min): RT = 1,014 min, [M+H]⁺1007,1.

Síntesis de CLD-8

Esquema

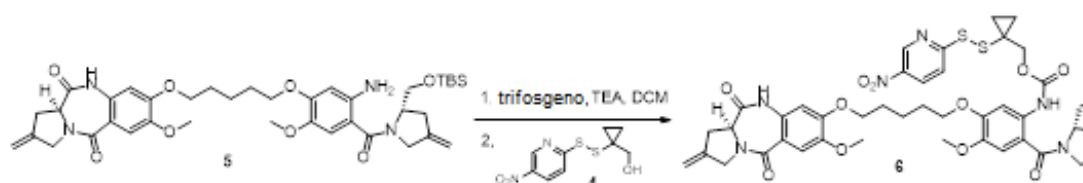


A una solución del compuesto **1** (40,0 mg, 0,190 mmol) en THF (5,0 mL)/ agua (5,0 mL) se le agregó TCEP (277,9 mg, 0,970 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 16 °C durante 48 h. La solución se diluyó con H₂O (10 mL) y se extrajo con DCM (20 mL × 3). Las capas orgánicas combinadas se secaron en Na₂SO₄, se filtraron y se utilizaron directamente en la siguiente etapa.

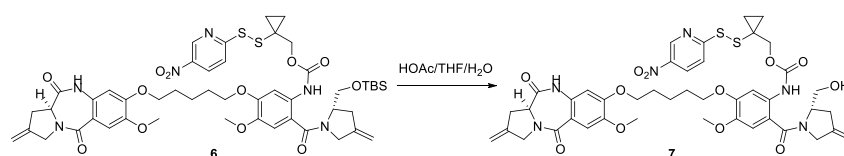


A una solución del compuesto **2** (40,0 mg, 0,380 mmol) en una mezcla de DCM (25 mL) y MeOH (25 mL) se le agregó el compuesto **3** (238,3 mg, 0,770 mmol). La solución de reacción se agitó

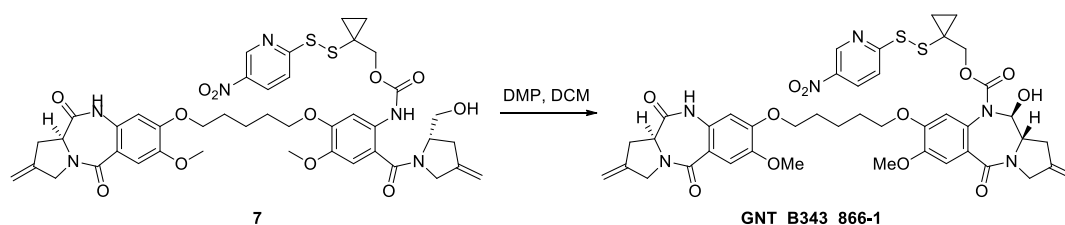
a 16 °C durante 16 h y se agregó MnO₂ (500 mg) y la mezcla se agitó durante 0,5 h. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró al vacío. El residuo se diluyó con MeOH (5 mL), se filtró nuevamente para retirar la mayor parte del compuesto **3** restante, el filtrado se concentró y purificó mediante prep-TLC (EtOAc al 33 % en éter de petróleo, R_f=0,5) para brindar el compuesto **4** (50 mg, 0,157 mmol, 40,8 % de rendimiento) como un aceite incoloro. LCMS (5-95AB/1,5 min): R_T = 0,805 min, [M+H]⁺ 258,9 mostró 81 % de DP.



A una mezcla agitada de trifosgeno (64,6 mg, 0,220 mmol) y 4 Å MS (30 mg) en DCM (8 mL) se le agregó lentamente una solución del compuesto **5** (160,0 mg, 0,220 mmol) y trietilamina (110,1 mg, 1,09 mmol) en DCM anhidro (8 mL). La mezcla de reacción se agitó a 16 °C durante 1 h y la mezcla se concentró al vacío para retirar el solvente. Se disolvió en DCM anhidro (10,0 mL) y se agregó trietilamina (65,8 mg, 0,650 mmol), seguido por una solución del compuesto **4** (50,0 mg, 0,190 mmol) en DCM anhidro (5,0 mL). La mezcla de reacción se agitó a 16 °C durante 16 h. La mezcla se filtró, el filtrado se concentró y purificó mediante prep-TLC (MeOH al 10 % en DCM, R_f = 0,8) para brindar el compuesto **6** (100 mg, 0,0814 mmol, 37,6 % de rendimiento) como un sólido amarillo. LCMS (5-95AB/1,5 min): R_T = 1,119 min, [M+H]⁺ 1019,4 mostró 83 % de producto deseado.



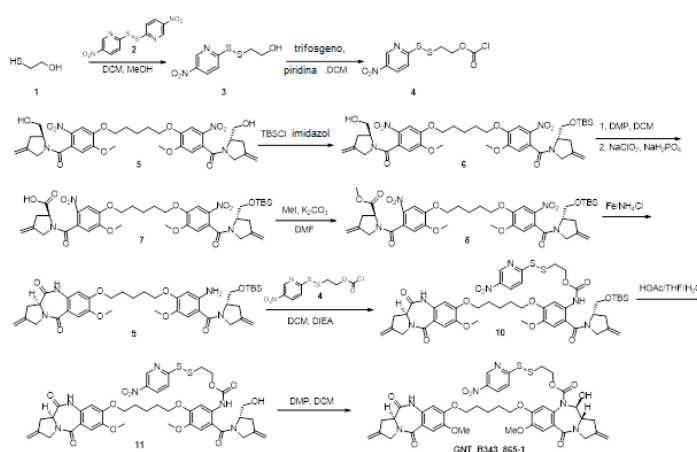
Se agitó una solución del compuesto **6** (100,0 mg, 0,1000 mmol) en una mezcla de ácido acético (3,0 mL), THF (2,0 mL) y agua (1,0 mL) a 16 °C durante 48 h. La solución se concentró al vacío y el residuo se diluyó con DCM (30 mL), se lavó con H₂O (20 mL × 3), se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó mediante prep-TLC (MeOH al 10% en DCM, R_f = 0,5) para brindar el compuesto **7** (55 mg, 0,0602 mmol, 61,3 % de rendimiento) como un sólido amarillo. LCMS (5-95AB/1,5 min): RT = 0,892 min, [M+H]⁺ 905,2 mostró 99 % del producto deseado.



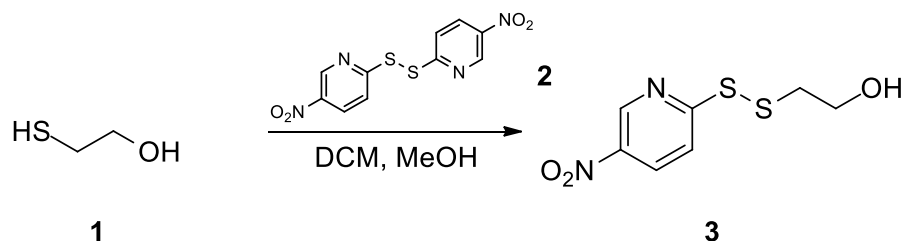
A una mezcla del compuesto **7** (55 mg, 0,060 mmol) y 4 Å MS (30 mg) en DCM anhidro (6,0 mL) se le agregó DMP (44,0 mg, 0,104 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 16 °C durante 1 h. La mezcla se diluyó con EtOAc (30 mL), se inactivó con solución de Na₂SO₃ saturada (30 mL) y se extrajo con EtOAc (30 mL × 3). Las fases orgánicas combinadas se secaron en Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó mediante prep-TLC (MeOH al 10 % en DCM, R_f = 0,5) para brindar CLD-8 (GNT_B343_866-1) (42 mg, 77 % de rendimiento) como un sólido amarillo pálido. LCMS (5-95AB/1,5 min): R_T = 0,868 min, [M+H]⁺ 903,2 mostró 98 % del producto deseado.

Síntesis de CLD-9

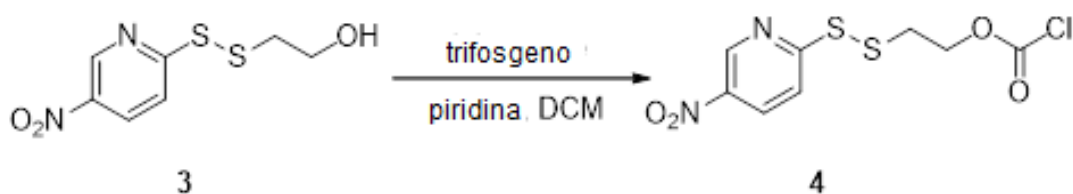
Esquema



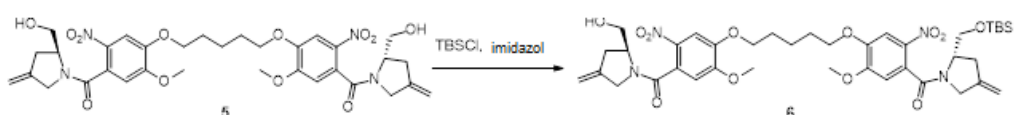
Práctica experimental



A una solución del compuesto **2** (2383 mg, 7,68 mmol) en DCM (10 mL)/ MeOH (10 mL) se le agregó el compuesto **1** (300 mg, 3,84 mmol). La solución se agitó a 16 °C durante 2 h. Se agregó MnO₂ (5,0 g) a la solución, la mezcla se agitó a 16 °C durante 30 min. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró al vacío y el residuo se lavó con MeOH (15 mL), se filtró y concentró. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida en sílice (DCM) para brindar el compuesto **3** (800 mg, 3,25 mmol, 84,8 % de rendimiento) como un aceite. LCMS (5-95AB/1,5 min): RT = 0,608 min, [M+H]⁺ 232,8

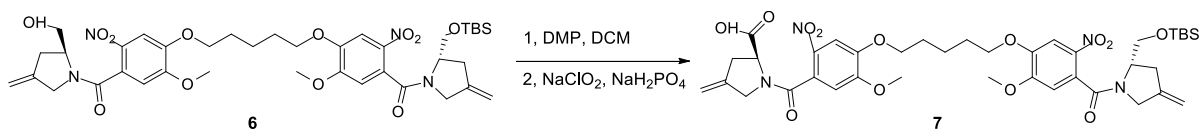


Se agregaron el compuesto **3** (65,0 mg, 0,280 mmol) y piridina (88,5 mg, 1,12 mmol) en DCM anhidro (5,0 mL) por goteo a una solución de trifosgeno (41,5 mg, 0,140 mmol) en DCM anhidro (5,0 mL) a 0 °C. La solución se agitó a 0 °C durante 10 min y la mezcla se concentró para brindar el compuesto bruto **4** como un sólido blanco que se utilizó para la siguiente etapa.



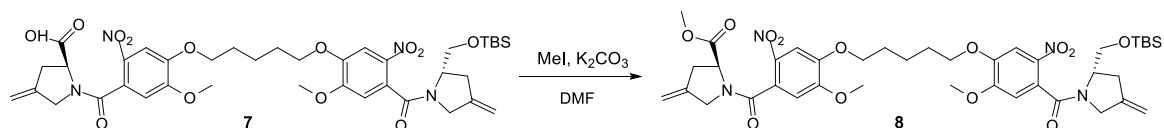
A una solución del compuesto **5** (4000 mg, 5,84 mmol) en DCM anhidro (80 mL) se le agregó imidazol (2,38 g, 35,1 mmol), seguido por TBSCl (1,761 g, 11,7 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 40 °C durante 3 h. La mezcla se diluyó con DCM (100 mL), se lavó con H₂O (50 mL x 3), se secó en Na₂SO₄, se filtró y concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida en sílice (0 - 3,3 % de MeOH en DCM), para proporcionar el compuesto **6** (2,50 g, 3,13 mmol, 53,6 % de rendimiento) como un sólido amarillo pálido.

LCMS (5-95AB/1,5 min): RT = 0,945 min, [M+H]⁺ 799,2.

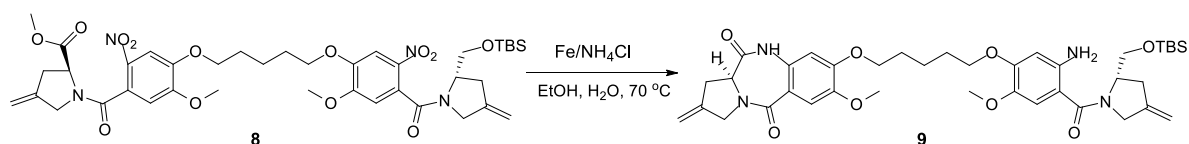


A una solución del compuesto **6** (2,30 g, 2,88 mmol) en DCM anhidro (100 mL) se le agregó DMP (4,88 g, 11,52 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 10 °C durante 2 h. Esta se filtró y el filtrado se diluyó con EtOAc (600 mL), se inactivó con solución de Na₂SO₃ sat. (200 mL), solución de Na₂SO₃ sat./ NaHCO₃ (v/v= 1:1, 200 mL) y salmuera. La capa orgánica se secó en Na₂SO₄, se filtró y concentró para brindar aceite bruto, que se disolvió en ^tBuOH (40 mL, 2,88 mmol) /

agua (20 mL) y luego se trató con 2-metil-2-buteno (30 mL, 2,88 mmol) y dihidrogenfosfato de sodio (1,382 mg, 11,5 mmol) de forma sucesiva a 10 °C. Posteriormente se agitó a 10 °C durante 0,5 h, la mezcla de reacción se agitó con clorito de sodio (1,56 g, 17,3 mmol) a 10 °C durante 1 h. La mezcla se diluyó con EtOAc (300 mL) y se lavó con agua (100 mL) y salmuera (100 mL). La capa orgánica se secó en Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío para proporcionar el compuesto **7** (2,0 g, 2,46 mmol, 85,5 % de rendimiento) como producto bruto. LCMS (5-95AB/1,5 min): RT = 0,929 min, [M+H]⁺ 813,2.

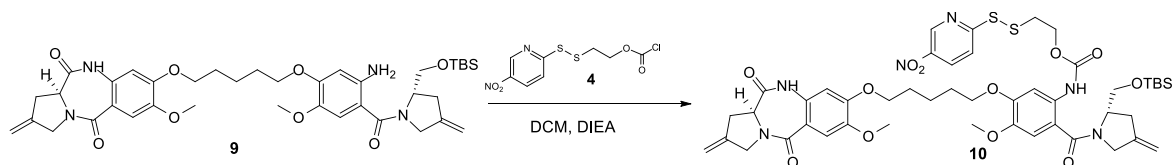


A una solución del compuesto **7** (2,0 g, 2,46 mmol) en DMF (20 mL) se le agregó K₂CO₃ (680 mg, 4,92 mmol), seguido por MeI (3,95 g, 27,8 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 10 °C durante 1 h. La mezcla se diluyó con EtOAc (200 mL), se lavó con salmuera (40 mL x 5), luego se secó en Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío para brindar el compuesto **8** (2,0 g, 2,42 mmol, 98,3 % de rendimiento) como un aceite amarillo. LCMS (5-95AB/1,5 min): RT = 0,975 min, [M+H]⁺ 827,2.

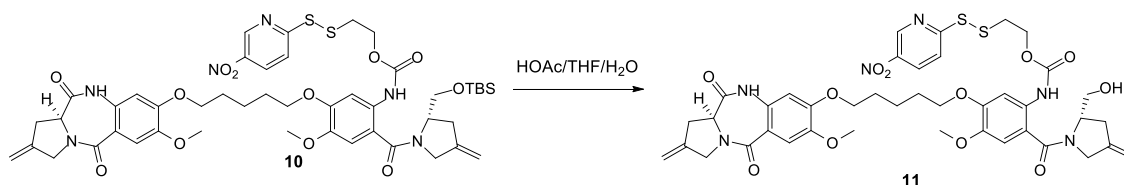


A una mezcla del compuesto **8** (2,0 g, 2,42 mmol) y hierro (1,35 g, 24,2 mmol) en EtOH (20 mL)/ agua (10 mL) se le agregó NH₄Cl (2,59 g, 48,7 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 70 °C durante 2 h. La mezcla se filtró, el filtrado se concentró al vacío para retirar EtOH y la suspensión acuosa se extrajo con EtOAc (50 mL x 3). Las capas de EtOAc combinadas se secaron en Na₂SO₄, se filtraron, concentraron y purificaron mediante cromatografía en columna ultrarrápida

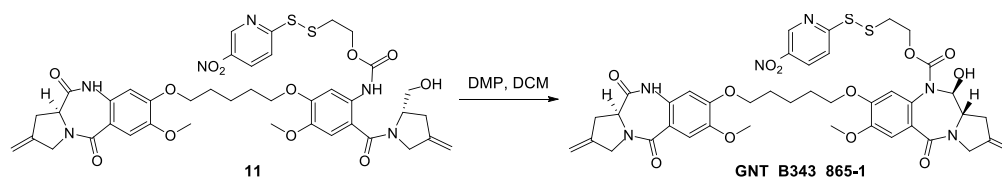
en sílice (3-5 % de MeOH en DCM, $R_f = 0,5$) para brindar el compuesto **9** (1,5 g, 1,89 mmol, 78,1 % de rendimiento) como un sólido amarillo. LCMS (5-95AB/1,5 min): RT = 0,845 min, $[M+H]^+$ 735,3.



A una solución del compuesto **9** (100 mg, 0,140 mmol) y DIEA (68,8 mg, 0,680 mmol) en DCM (15 mL) se le agregó el compuesto **4** (80,2 mg, 0,270 mmol) y la reacción se agitó a 0 °C durante 1 h. La mezcla se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida en sílice (0-5 % de MeOH en DCM, $R_f = 0,5$) para brindar el compuesto **10** (130 mg, 0,117 mmol, 85,8 % de rendimiento) como un aceite amarillo. LCMS (5-95AB/1,5 min): RT = 0,985 min, $[M+H]^+$ 993,4.



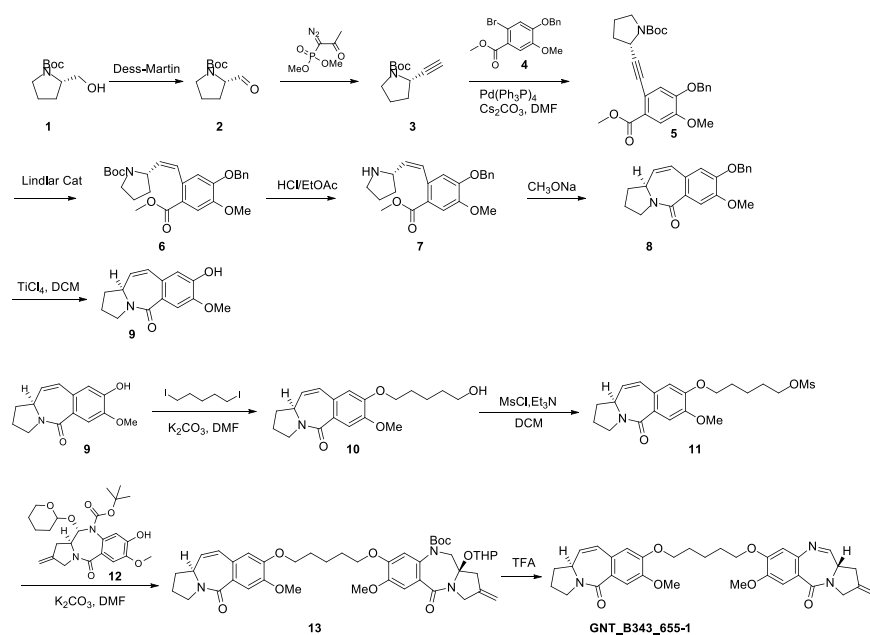
A una solución de ácido acético (6,0 mL, 105 mmol) en THF (6,0 mL)/ agua (3,0 mL) se le agregó el compuesto **10** (130 mg, 0,130 mmol). La solución de reacción se agitó a 40 °C durante 24 h. La solución se concentró al vacío para retirar el solvente, el residuo se diluyó con EtOAc (30 mL), se lavó con H₂O (10 mL × 4), se secó en Na₂SO₄, se filtró y concentró al vacío. El residuo se purificó mediante prep-TLC (MeOH al 8 % en DCM, $R_f = 0,5$) para brindar el compuesto **11** (60 mg, 0,0683 mmol, 52,2% de rendimiento) como un aceite amarillo. LCMS (5-95AB/1,5 min): RT = 0,763 min, $[M+H]^+$ 879,0.



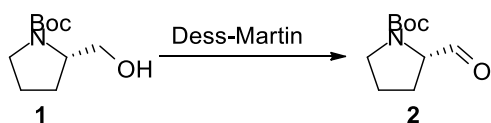
A una solución del compuesto **11** en DCM anhidro (5 mL) se le agregó DMP (17,4 mg, 0,0400 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 18 °C durante 1 h. La mezcla se diluyó con DCM (50 mL) y se filtró. El filtrado se lavó con Na₂SO₃ (30 mL x 3), se secó en Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío. El producto bruto se purificó mediante prep-TLC (MeOH al 5% en DCM, R_f = 0,5) para brindar CLD-9 (GNT_B343_865-1) (12,2 mg, 0,0136 mmol, 39,9% de rendimiento) como un sólido amarillo pálido. LCMS (5-95AB/1,5 min): RT = 0,739 min, [M+H]⁺ 877,2

Síntesis de DM-4

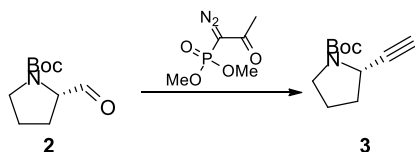
Esquema



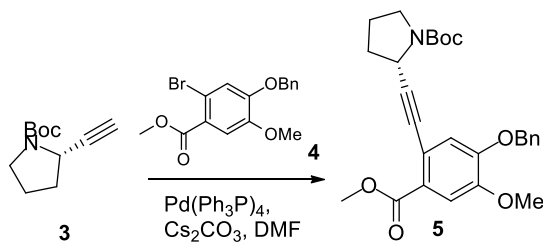
Práctica experimental



A una solución del Compuesto **1** (3,0 g, 14,9 mmol) en DCM (80 mL) se le agregó DMP (9,48 g, 22,4 mmol). Luego de haber agitado la mezcla a 0 °C durante 1 h, se diluyó con Na₂S₂O₃ (50 mL)/ NaHCO₃ (50 mL) y MTBE (130 mL). La fase orgánica se lavó con agua (60 mL x 3) y se concentró para brindar el Compuesto **2** (2,9 g, 14,6 mmol, 97,6 % rendimiento) como un aceite incoloro.



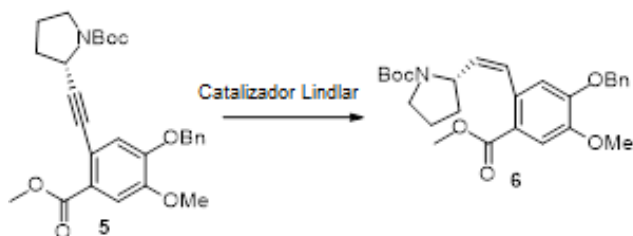
A una solución del compuesto **2** (2,9 g, 14,6 mmol) y (1-diazo-2-oxo-propil) fosfonato de dimetilo en MeOH (20 mL) se le agregó K₂CO₃ (6,03 g, 43,7 mmol). Luego de haber agitado la mezcla de reacción a 20 °C durante 1 h, se concentró al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida en sílice (EtOAc al 10 % en PE) para brindar el producto del Compuesto **3** (2,0 g, 10,24 mmol, 70,4 % de rendimiento) como un aceite incoloro.



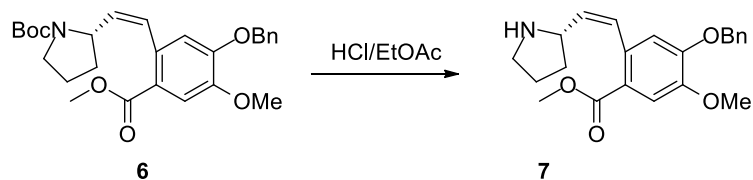
A una solución del compuesto **3** (2,0 g, 10,2 mmol) y el Compuesto **4** (5,4 g, 15,4 mmol) en DMF (50 mL) se le agregó Cs₂CO₃ (3,97 g, 20,5 mmol) y Pd(PPh₃)₄ (785 mg, 1,54 mmol). La mezcla se agitó a 95 °C con N₂ durante 1 h. La mezcla se concentró y purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida en sílice (EtOAc al 20 % en PE) para brindar el producto del Compuesto **5** (1,60 g, 2,44 mmol, 23,8% de

rendimiento) como un aceite incoloro.

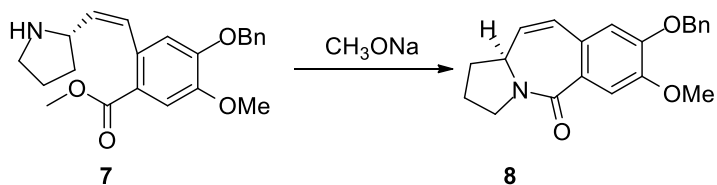
LCMS (5-95AB/1,5 min): RT = 0,994 min, $[M+H-56]^+$ 410,0



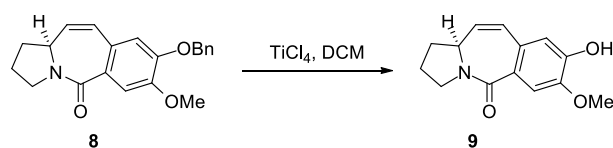
A una solución del Compuesto **5** (2,0 g, 4,3 mmol) en MeOH (10 mL) se le agregó Pd/CaCO₃ (200,0 mg, 21,5 mmol). La mezcla se agitó a 30 °C durante 1 h con H₂ (1 atm.). La mezcla se filtró y el filtrado se concentró para brindar el producto bruto, que se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida en sílice (EtOAc al 10 % en PE) para dar el producto del Compuesto **6** (1,0 g, 2,14 mmol, 49,8% de rendimiento) como un sólido blanco. LCMS (5-95AB/1,5 min): RT = 0,983 min, $[M+Na]^+$ 490,1.



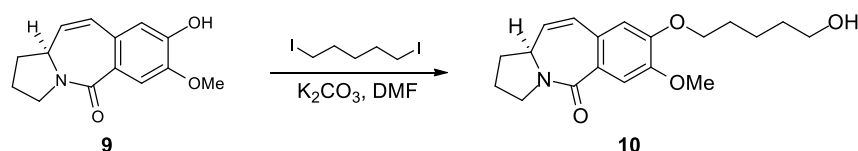
A una solución del Compuesto **6** (0,90 g, 1,92 mmol) en EtOAc (10 mL) se le agregó HCl/EtOAc (6,0 mL). Luego de haber agitado la mezcla a 25 °C durante 1 h, se concentró para brindar el producto bruto Compuesto **7** (0,77 g, 1,90 mmol, 99 % de rendimiento) como un sólido blanco.



A una solución del **Compuesto 7** (0,77 g, 1,91 mmol) en MeOH (30 mL) se le agregó NaOMe (1,03 g, 19,06 mmol). La mezcla se agitó a 30 °C durante 2 h. La mezcla se concentró y purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida en sílice (25-75 % de EtOAc en PE) para brindar el producto del **Compuesto 8** (0,60 g, 1,79 mmol, 93,8% de rendimiento) como un aceite amarillo. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 1,89 - 2,11 (m, 3 H) 2,18 - 2,33 (m, 1 H) 3,59 (dt, $J = 12,0, 7,6$ Hz, 1 H) 3,80 (dt, $J = 11,5, 5,8$ Hz, 1 H) 3,90 - 3,96 (m, 1 H) 3,97 (s, 3 H) 5,19 (s, 2 H) 5,86 (dd, $J = 10,0, 4,8$ Hz, 1 H) 6,53 (dd, $J = 10,0, 2,0$ Hz, 1 H) 6,69 (s, 1 H) 7,29 - 7,35 (m, 1 H) 7,36 - 7,41 (m, 2 H) 7,42 - 7,48 (m, 2 H) 7,62 (s, 1 H)

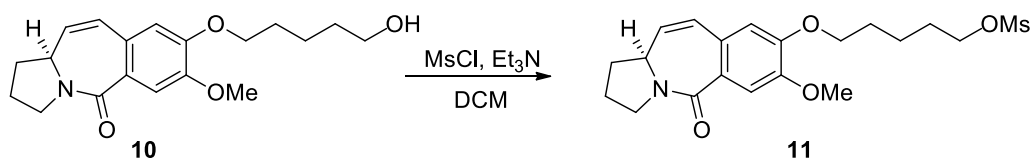


A una solución del **Compuesto 8** (580 mg, 1,73 mmol) en DCM (50 mL) se le agregó TiCl_4 (656 mg, 3,46 mmol). La mezcla se agitó a 30 °C durante 12 h. A la mezcla se le agregó HCl (1,0 M, 20 mL) y EtOAc (100 mL). La capa orgánica se lavó con agua (50 mL x 3) y se concentró para brindar el producto bruto del **Compuesto 9** (250 mg, 0,44 mmol, 25,3 % rendimiento) como un aceite amarillo.

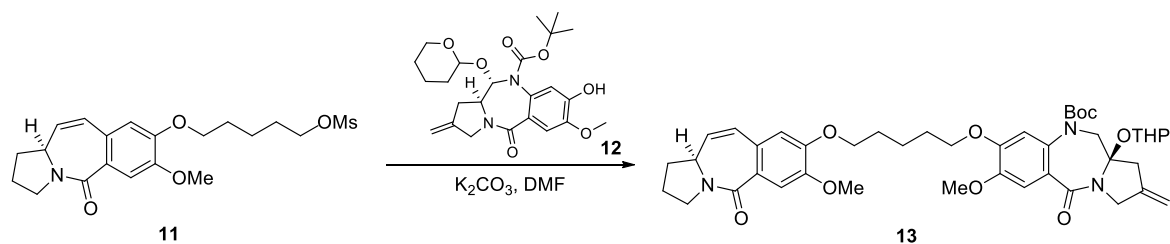


A una solución del **Compuesto 9** (50,0 mg, 0,20 mmol) en DMF (5,0 mL) se le agregó K_2CO_3 (42,26 mg, 0,31 mmol) y 1,5-diiodopentano (333 mg, 1,0 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 90 °C durante 3 h. La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía en columna de sílice (0-50 % de EtOAc

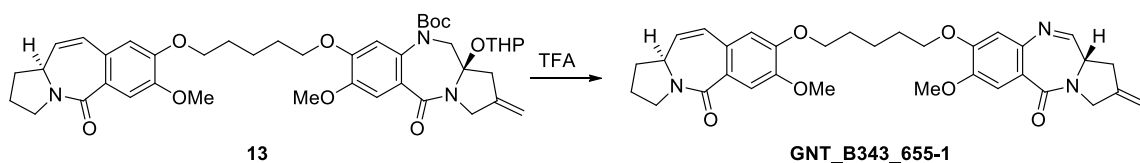
en éter de petróleo) para brindar el Compuesto **10** (60 mg, 0,178 mmol, 87,6 % de rendimiento) como un aceite. LCMS (5-95AB/1,5 min): RT = 0,765 min, [M+H]⁺ 332,0.



A una solución del Compuesto **10** (60,0 mg, 0,18 mmol) en DCM (6,0 mL) se le agregó trietilamina (55 mg, 0,54 mmol) y MsCl (41 mg, 0,36 mmol). Luego de haber agitado la mezcla a 35 °C durante 1 h, se diluyó con EtOAc (80 mL) y se lavó con agua (50 mL x 3). La capa orgánica se concentró para proporcionar el producto bruto (70 mg) como un aceite incoloro. LCMS (5-95AB/1,5 min): RT = 0,679 min, [M+H]⁺ 410,0.



A una solución del compuesto **11** (70 mg, 0,17 mmol) y el Compuesto **12** (87 mg, 0,19 mmol) en DMF (5,0 mL) se le agregó K₂CO₃ (47 mg, 0,34 mmol) y KI (5,68 mg, 0,030 mmol). La mezcla se agitó a 90 °C durante 3 h y se purificó mediante prep-HPLC (HCOOH) para brindar el producto bruto Compuesto **13** (70 mg, 0,084 mmol, 49,2 % de rendimiento) como un sólido blanco. LCMS (5-95AB/1,5 min): RT = 0,845 min, [M+H]⁺ 774,4.

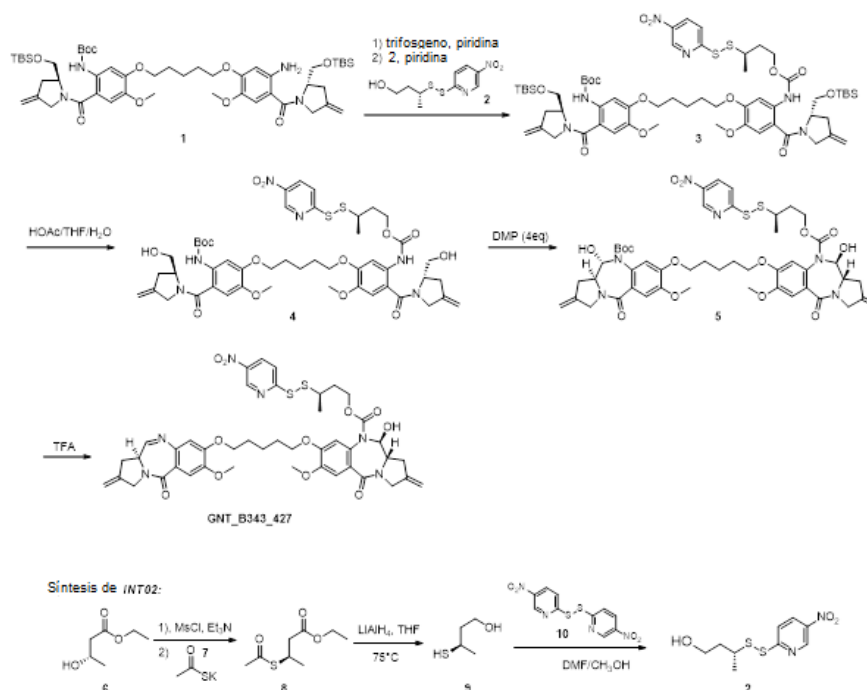


Se agitó una solución del Compuesto **13** (50 mg, 0,060 mmol)

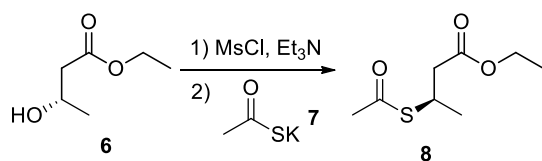
en una mezcla de TFA (1,9 mL) y agua (0,10 mL) a 35 °C durante 1 h. La mezcla se separó entre sat.NaHCO₃ (30 mL) y EtOAc (50 mL). Se lavó la capa orgánica con agua (30 mL x 2), salmuera (30 mL) y se secó en Na₂SO₄. Se concentró y purificó mediante prep-TLC (MeOH al 5 % en DCM, R_f = 0,5) para brindar el producto DM-4 (GNT_B343_655-1) (20 mg, 0,034 mmol, 53,1 % de rendimiento) como un sólido blanco. LCMS (5-95AB/1,5 min): RT = 0,825 min, [M+H]⁺ 572,1 ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δppm 1,65 - 1,75 (m, 3H) 1,88 - 2,10 (m, 8H) 2,19 - 2,31 (m, 1H) 2,82 - 3,29 (m, 2H) 3,60 (dt, *J* = 11,9, 7,5 Hz, 1H) 3,81 (dt, *J* = 11,6, 5,9 Hz, 1H) 3,86 - 3,91 (m, 1H) 3,94 (s, 6H) 3,97 (br, s, 1H) 4,01 - 4,18 (m, 4H) 4,30 (s, 2H) 5,19 (d, *J* = 10,6 Hz, 2H) 5,89 (dd, *J* = 9,9, 5,1 Hz, 1H) 6,53 - 6,63 (m, 1H) 6,66 (s, 1H) 6,81 (s, 1H) 7,51 (s, 1H) 7,59 (s, 1H) 7,68 (d, *J* = 4,4 Hz, 1H)

Síntesis de CLD-3

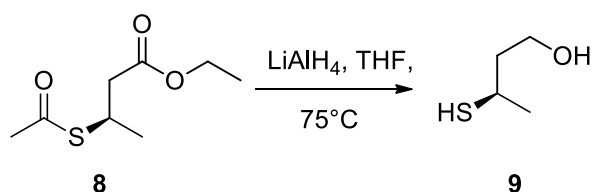
Esquema



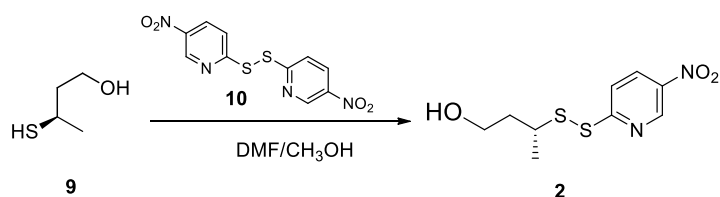
Práctica experimental



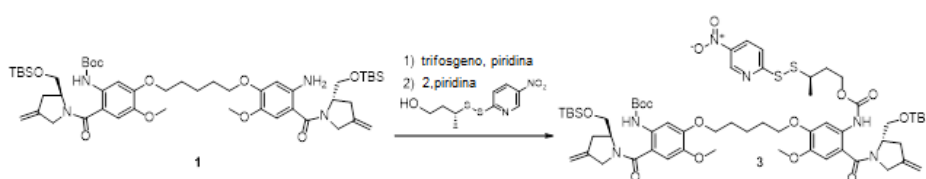
A una solución del compuesto **6** (5,00 g, 37,83 mmol) y Et₃N (11,49 g, 113,50 mmol) en DCM (100 mL) se le agregó MsCl (8,97 g, 78,32 mmol) por goteo a 0 °C. Luego se agitó a 25 °C durante 2 h con N₂, la mezcla de reacción se vertió en agua helada (200 mL) y se extrajo con DCM (100 mL x 2). La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó en Na₂SO₄ y se concentró al vacío para proporcionar el producto bruto (7.0 g, 95 %) como un aceite amarillo. Se mezcló con KSAc (6,59 g, 57,66 mmol) en acetona/agua (50 mL/50 mL) y se agitó a 25 °C durante 10 h. La mezcla de reacción se concentró y purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida en sílice (PE/EtOAc = 100/1~40/1) para brindar el compuesto puro **8** (1,0 g, 14,6 %) como un aceite amarillo.



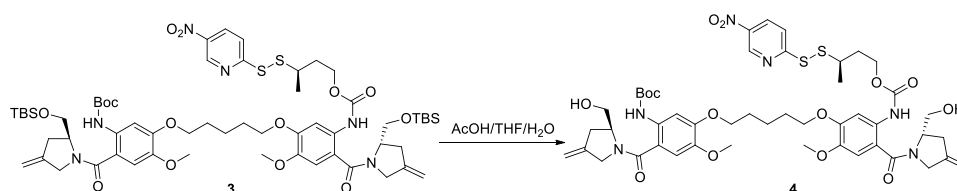
A una suspensión de LiAlH₄ (692 mg, 18,23 mmol) en THF (20 mL) se le agregó una solución del compuesto **8** (867 mg, 4,56 mmol) en THF (5 mL) a 0 °C con N₂. La mezcla de reacción se agitó a 75 °C con reflujo durante 2 h. La mezcla de reacción se inactivó con EtOAc (3,0 mL) y solución de HCl (2,0 M, 5 mL) a 0 °C. La mezcla de reacción se utilizó directamente en la siguiente e



A una solución del compuesto **10** (2,84 g, 9,12 mmol) en DCM/MeOH (25 mL/25 mL) se le agregó una solución del compuesto **9** (de la etapa anterior) a 25 °C. La mezcla se agitó a 25 °C durante 10 h. A la mezcla de reacción se agregó MnO₂ (3,4 g, 39,6 mmol) y se filtró. El filtrado se concentró al vacío y se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida en sílice (DCM) y SFC para brindar el compuesto **2** (0,80 g, 67,4 %) como un aceite amarillo. LCMS (5-95 AB, 1,5 min): RT = 1,020 min, M+H⁺ = 260,9.

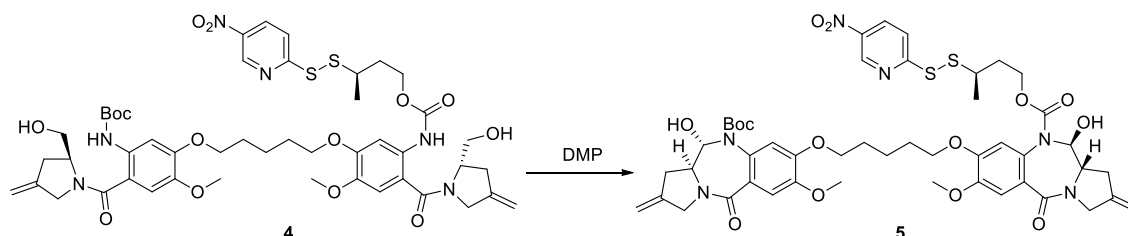


A una solución de trifosgeno (46 mg, 0,16 mmol) en DCM (3,0 mL) se le agregó una solución del compuesto **2** (100 mg, 0,38 mmol) y piridina (30 mg, 0,38 mmol) en DCM (3 mL) por goteo a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 15 min y se agregó a una solución del compuesto **1** (280 mg, 0,29 mmol) y piridina (30 mg, 0,38 mmol) en DCM (4,0 mL) por goteo a 26 °C. La mezcla de reacción se agitó a 26 °C durante 2 h. El solvente se retiró y el residuo se purificó mediante prep-TLC (solvente: EtOAc al 30 % en éter de petróleo) para brindar el compuesto **3** (300 mg, 82,4 %) como una espuma amarilla. LCMS (5-95AB/1,5 min): RT = 1,248 min, [M+H]⁺ 1239,5.

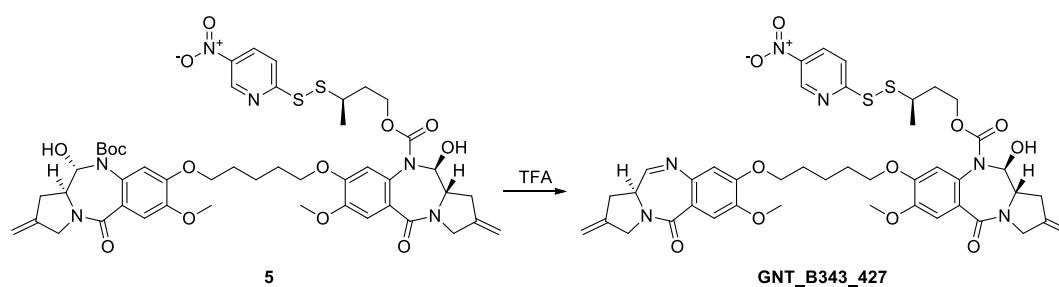


A una solución del compuesto **3** (312 mg, 0,24 mmol) en THF/H₂O (4 mL/4 mL) se le agregó HOAc (6,0 mL) a 26 °C. Luego la mezcla de reacción se agitó a 26 °C durante 24 h, se diluyó con EtOAc (20 mL) y se lavó con agua (2 x 10 mL), NaHCO₃ ac.

saturado (15 mL) y salmuera (15 mL). Se secó, concentró y purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida en sílice (0 - 5% de MeOH en DCM), para brindar el compuesto **4** (240 mg, 97,1 %) como una espuma amarilla. LCMS (5-95AB/1,5 min): RT = 0,876min, [M+H]⁺ 1011,3.



A una solución del compuesto **4** (101 mg, 0,10 mmol) en DCM (5,0 mL) se le agregó DMP (125 mg, 0,29 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a 26 °C durante 2 h. La reacción se inactivó con una solución sat. de NaHCO₃/Na₂SO₃ (2,0 mL/2,0 mL) y se extrajo con DCM (3 x 5 mL). La capa orgánica combinada se lavó con NaHCO₃/Na₂SO₃ (2 mL/2 mL), salmuera (5 mL), se secó y concentró. El residuo se purificó mediante prep-TLC (DCM/MeOH = 15:1) para proporcionar el compuesto **5** (66 mg, 66,2 %) como una espuma amarilla. LCMS (5-95AB/1,5 min): RT = 0,815 min, [(M-100)/2+Na]⁺ 476,1.

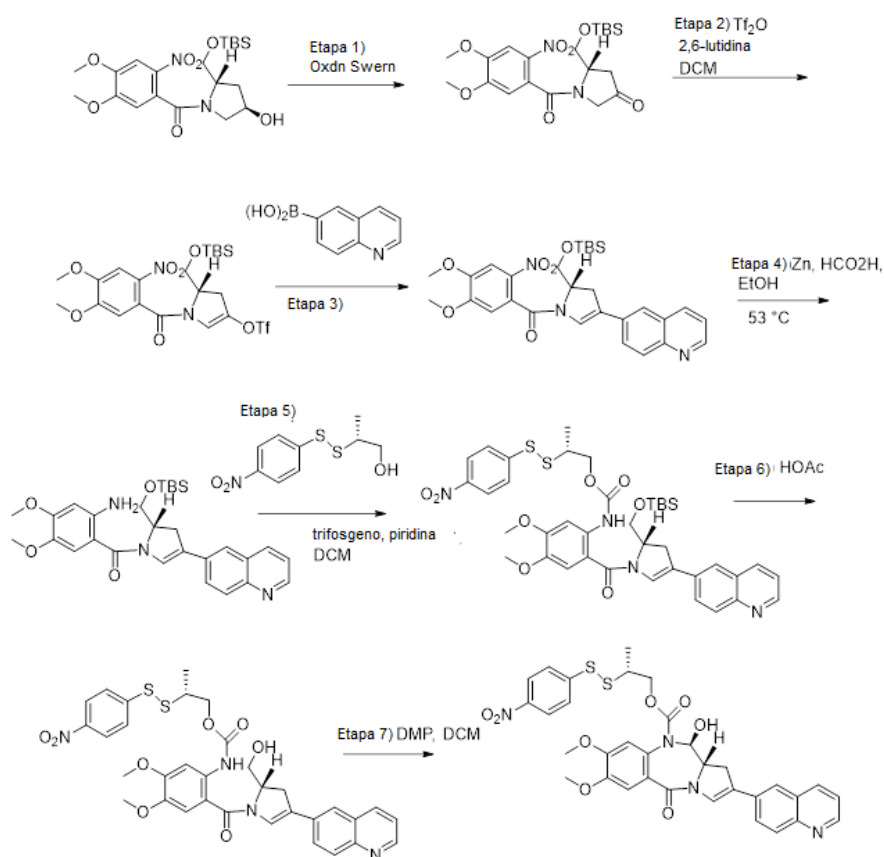


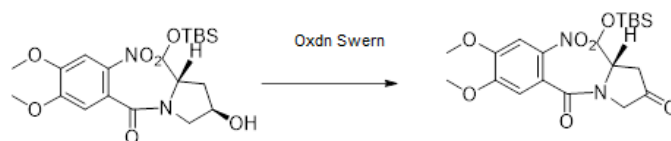
Se agregó TFA frío (95 % en agua, 2,0 mL) al compuesto **5** (66 mg, 0,06 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 30 min. La mezcla de reacción se agregó por goteo a NaHCO₃ ac. sat. (4,0 mL) a 0 °C y se extrajo con DCM (4 x 8,0 mL). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (20 mL), se secó y concentró para brindar el producto bruto que se

purificó mediante prep-TLC (MeOH al 6,25 % en DCM, $R_f = 0,5$) para brindar CLD-3 (GNT_B343_427-1) (27,4 mg, 47,4 %) como una espuma amarilla. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9,21 (s, 1H), 8,38-8,35 (m, 1H), 7,79 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 7,69 (d, $J = 4,4$ Hz, 1H), 7,47 (s, 1H), 7,17 (s, 1H), 6,80 (s, 1H), 6,50 (s, 1H), 5,57 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H), 5,20-5,13 (m, 4H), 4,29-4,25 (m, 5H), 4,14-4,09 (m, 4H), 3,96-3,87 (m, 8H), 3,38 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 3,58 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 3,44 (s, 1H), 3,16-3,09 (m, 1H), 2,97-2,89 (m, 3H), 2,71-2,67 (m, 1H), 1,95-1,91 (m, 6H), 1,45-1,22 (m, 3H). LCMS (5-95AB/1,5 min): RT = 0,750 min, $[\text{M}+\text{H}]^+ 889,8$

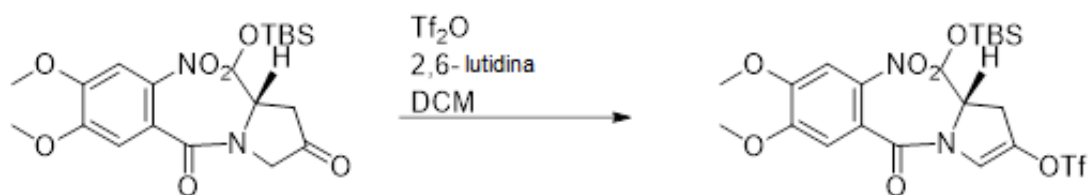
Síntesis de CLD-5

(11S,11aS)-11-hidroxi-7,8-dimetoxi-5-oxo-2-(quinolin-6-il)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepina-10(5H)-carboxilato de (R)-2-((4-nitrofenil)disulfanil)propilo



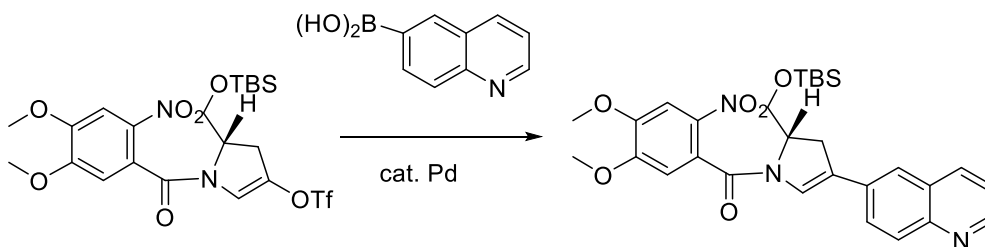


Se mezclaron una solución 2 M de cloruro de oxalilo (39 mL, 77,14 mmol) y 60 mL de diclorometano en un matraz de 500 mL y se enfriaron hasta $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se agregó DMSO (5,77 mL, 77,14 mmol) mediante una jeringa durante ~2-3 min. La mezcla se agitó durante 20 min a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, luego el material de partida (5S)-5-[[terc-butil(dimetil)silil] oximetil] -1-(4,5-dimetoxi-2-nitro-benzoil)pirrolidin-3-ona (11,33 g, disuelto en 30 mL de diclorometano más 10 mL de enjuague, sintetizado de acuerdo con el Journal of Medicinal Chemistry, 2010, 53, 2927-2941 y Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2000, 10, 1845-1847) con una jeringa. Tras 30 min a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, se agregó Et₃N (22,6 mL, 154,3 mmol) mediante una jeringa durante 2 min. Luego de ~ 4 min, la mezcla se calentó hasta $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se agitó durante 1 h. La mezcla se vertió en 100 mL de agua. Se separó el diclorometano. La capa acuosa se extrajo con EtOAc (2x75 mL). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con HCl 1N, luego bicarbonato de sodio sat., se secaron en Na₂SO₄ y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (70 %-90 % de EtOAc/Heptano) para brindar el producto deseado como una espuma levemente amarilla (10,12 g).



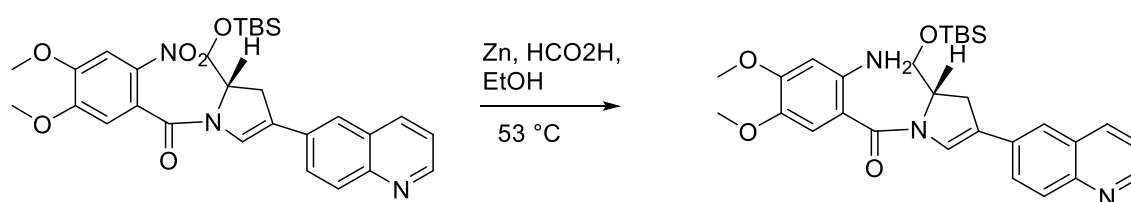
Se mezclaron (5S)-5-[[terc-butil(dimetil)silil]oximetil]-1-

(4,5-dimetoxi-2-nitro-benzoil)pirrolidin-3-ona (1,20 g, 2,74 mmol), 2,6-lutidina (1,27 mL, 10,9 mmol) en diclorometano (45 mL) y luego se enfriaron hasta -35 °C. Luego se agregó anhídrido triflico (0,87 mL disueltos en ~5,2 mL de DCM) lentamente mediante una jeringa ---la mezcla se tornó de color amarillo intenso y la temperatura del baño aumentó a -33 °C. La temp. de la reacción se mantuvo sin superar los -20 °C en todo momento. Tras un total de ~ 1hr, la mezcla de reacción se colocó con pipetas en una mezcla de solución de NaHCO₃ ac. saturada, hielo y EtOAc, luego se extrajo dos veces con acetato de etilo (total ~ 400mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con HCl ac. 1N, luego salmuera y luego se secaron en sulfato de sodio y concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (40 %-100 % de EtOAc/Heptano) para brindar el producto deseado como un sólido amarillo (957 mg).

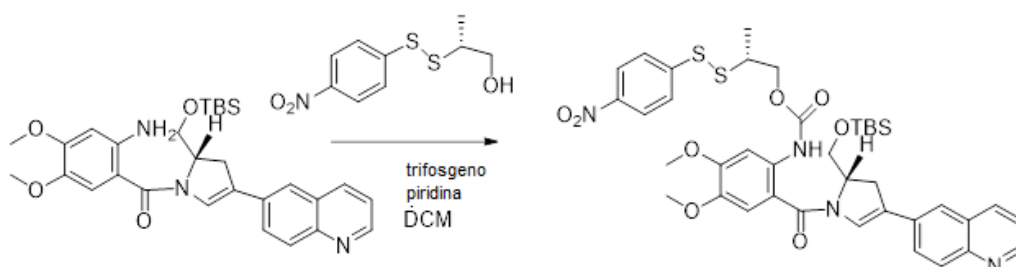


Al triflato de vinilo (957 mg, 1,68 mmol) en un matraz de 250 mL, se agregaron etanol (8,75 mL) y agua (2,5 mL), ácido 6-quinolilborónico (348 mg, 2,01 mmol), fosfato de potasio (1,10 g, 5,03 mmol) y luego [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio(ii) (982 mg, 0,134 mmol). La mezcla se enjuagó con nitrógeno y luego se agitó a temperatura ambiente con nitrógeno. Luego de haber realizado la reacción (~10 min), se agregó EtOAc (50 mL) a la mezcla de reacción. La mezcla se filtró para retirar todos

los sólidos. Se agregó agua (~ 5 mL) al filtrado. El filtrado se extrajo con EtOAc (2x). Los orgánicos combinados se secaron con sulfato de sodio y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (40 %-100 % de EtOAc/Heptano) para brindar el producto deseado como un sólido amarillo (928 mg).

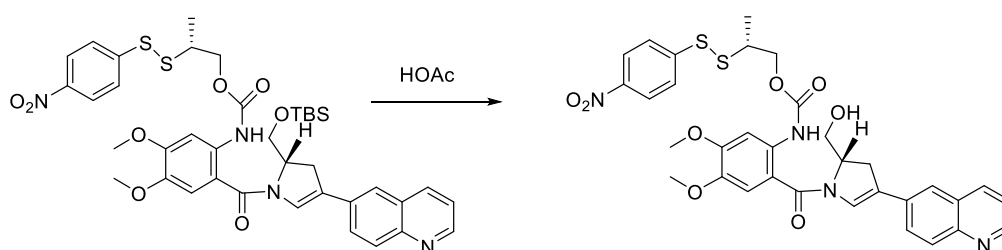


El material nitro inicial (322 mg, 0,586 mmol) se disolvió en 6 mL de etanol y luego se agregó polvo de cinc (383 mg, 5,86 mmol), seguido por 1,5 ml de ácido fórmico al 5 % en agua (75 uL de ácido fórmico en 1,5 mL de agua). La mezcla luego se calentó hasta 53 °C y se agitó hasta completar la reacción (~ 3,5 h). La mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente y se filtró. El filtrado se diluyó con EtOAc (~ 10 mL) y luego se agregó amoníaco 3 M (~ 3 mL) La mezcla se extrajo con EtOAc (3x). Los productos orgánicos combinados se secaron con sulfato de sodio y se concentraron para proporcionar la anilina bruta, que se utilizó en la siguiente etapa sin purificación.

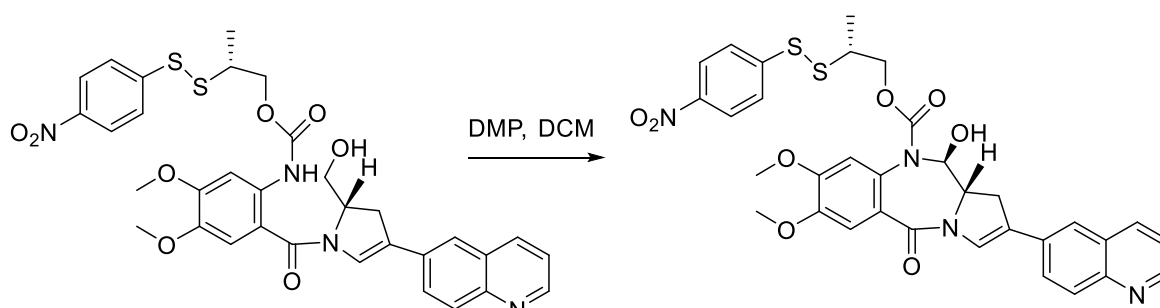


Se disolvió trifosgeno (79,4 mg, 0,268 mmol) en 1,5 mL de diclorometano, luego se agregaron una solución de (2R)-2-

[(5-nitro-2-piridil)disulfanil]propan-1-ol (196 mg, 0,797 mmol) y piridina (0,092 mL) en 2 mL de diclorometano. Tras 30 min, se agregó la solución anterior a una solución del material inicial de anilina y piridina (0,092 mL) en 4,5 mL de diclorometano. Luego de haber completado la reacción (~ 1 h), la mezcla se diluyó con EtOAc, luego se lavó con solución de HCL 1 M y luego solución de carbonato de sodio saturada. Los productos orgánicos se secaron con sulfato de sodio y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (30 %-70 % de EtOAc/Heptano) para brindar el carbamato deseado (182 mg).



El alcohol protegido con TBS (182 mg, 0,230 mmol) se disolvió en 4 mL: 1 mL de THF:agua y luego se agregaron 4 mL de ácido acético. La mezcla se calentó hasta 55 °C. Luego de haber realizado la reacción (~ dos noches), la mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente y luego se diluyó con 50 mL de acetato de etilo. Se agregó carbonato de potasio para neutralizar el ácido acético hasta alcanzar un pH ~ 10. La mezcla se extrajo con acetato de etilo dos veces. Los orgánicos combinados se secaron con sulfato de sodio y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (0 %-10 % de MeOH/EtOAc) para brindar el alcohol deseado (125 mg).

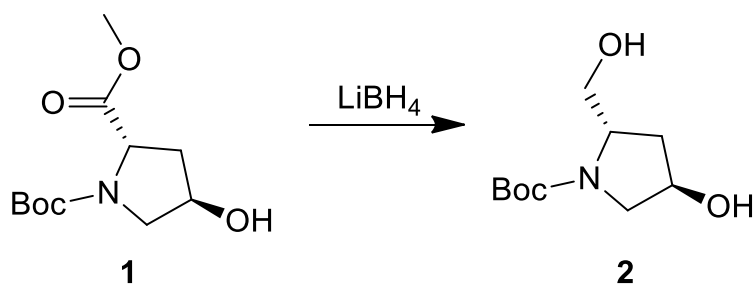
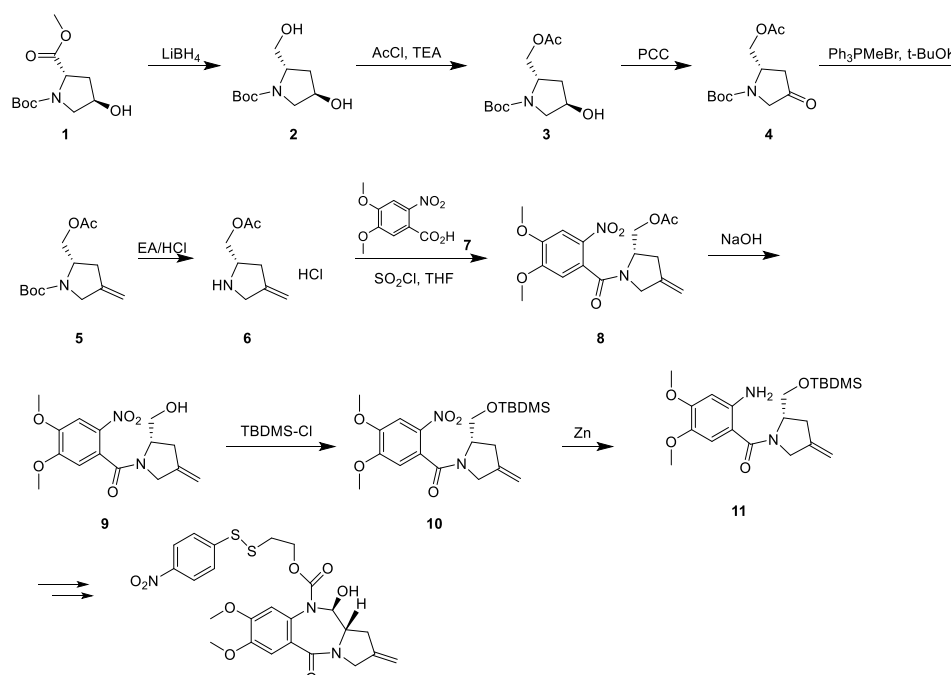


El material inicial de alcohol (116 mg, 0,171 mmol) se disolvió en 6 mL de diclorometano y luego se agregó periodinano de Dess-Martin (89,8 mg, 0,205 mmol) a temperatura ambiente. Luego de ~ 2,5 h, se agregaron una solución saturada de bicarbonato de sodio (~ 6 mL) y solución de tiosulfato de sodio 1 M (~ 4 mL). La mezcla se extrajo con diclorometano una vez y dos veces con cloroformo. Los orgánicos combinados (~ 75 mL) se secaron en sulfato de sodio, se concentraron para brindar ~ 103 mg de producto bruto, que se purificó mediante HPLC de fase inversa para brindar el producto deseado (29,5 mg).

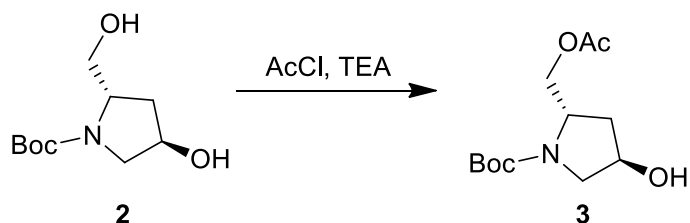
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9,24 (s, 1H), 8,83 (dd, J = 1,6, 4,2 Hz, 1H), 8,47 (dd, J = 2,6, 8,9 Hz, 1H), 8,32 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 8,12 (dd, J = 1,9, 8,9 Hz, 1H), 7,92 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 7,87 (d, J = 1,8 Hz, 1H), 7,80 (s, 1H), 7,75 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 7,51 (dd, J = 4,2, 8,3 Hz, 1H), 7,20 (s, 1H), 7,07 (s, 1H), 6,95 (d, J = 6,3 Hz, 1H), 5,78 – 5,62 (m, 1H), 4,30 (d, J = 6,8 Hz, 1H), 4,00 (td, J = 3,2, 10,0 Hz, 1H), 3,85 (s, 6H), 3,56 – 3,44 (m, 1H), 3,08 (d, J = 14,6 Hz, 1H), 1,14 (d, J = 6,3 Hz, 3H), 0,07 (s, 12H). MS m/z = 676 $[\text{M}+1]^+$.

Síntesis de CLD-6

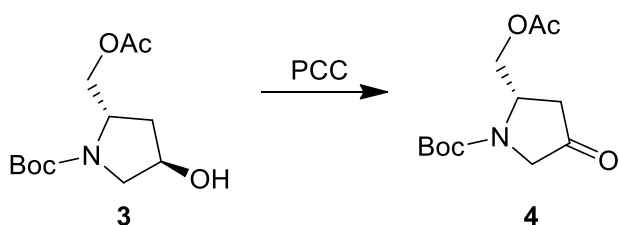
(11S,11aS)-11-hidroxi-7,8-dimetoxi-5-oxo-2-(quinolin-6-il)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepina-10(5H)-carboxilato de 2-((4-nitrofenil)disulfanil)etilo



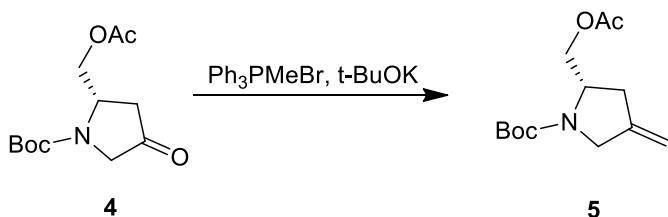
A una solución del compuesto **1** (1,13 kg, 4,59 mol, 1,00 eq.) en THF (10 L) a 0 °C se le agregó LiBH_4 (99,90 g, 4,59 mol, 1,00 eq.) en dos partes (casi sin cambio de temperatura durante la adición de LiBH_4). La suspensión se agitó a 0 °C durante 1 h y luego a 10-20 °C durante 18 h. La mezcla se enfrió hasta 0 °C y se agregó NH_4Cl ac. (5 L). Las capas se separaron y se extrajo la capa acuosa con EA (5 L x 3). Los orgánicos combinados se lavaron con salmuera. Las capas orgánicas se secaron en Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron para proporcionar el compuesto **2** como un aceite transparente (1600 g, 7,36 mol, 80,2 % de rendimiento).



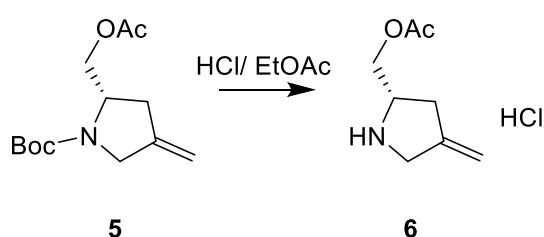
Se cargó un matraz de 50 L con el compuesto **2** (1,60 kg, 7,36 mol, 1,00 eq.), DCM (20 L), seguido por adición de TEA (1,12 kg, 11,05 mol, 1,50 eq.) y cloruro de acetilo (635,54 g, 8,10 mol, 1,10 eq.) por goteo en sucesión con agitación a 0 °C. Tras la adición, la solución resultante se agitó a 15-25 °C durante 18 h, se inactivó con adición de 5 L de agua y se extrajo con 3 x 2 L de DCM. Las capas orgánicas combinadas se secaron en sulfato de sodio anhidro y se concentraron al vacío para proporcionar el compuesto **3** como un aceite incoloro (2,46 kg, 9,49 mol, 128,90 % de rendimiento).



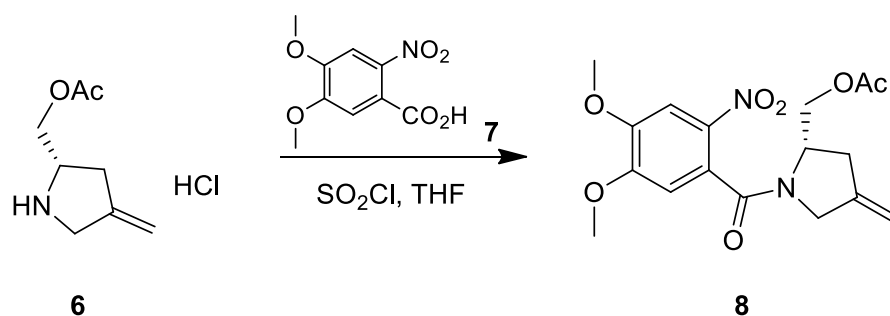
Un matraz de 3 cuellos y fondo redondo de 20L se cargó con el compuesto **3** (1,23 kg, 4,75 mol, 1,00 eq.) en DCM (12 L), seguido por adición de PCC (1,54 kg, 7,13 mol) en diversos lotes a 15 °C. La solución resultante se agitó a 15-25 °C durante 18 h. Los sólidos se retiraron mediante filtración y el filtrado se concentró al vacío. El residuo se purificó en una columna de gel de sílice con elución con acetato de etilo:éter de petróleo (1:5) para proporcionar el compuesto **4** como un líquido amarillo claro (1,13 kg, 4,38 mol, 46,15 % de rendimiento).



Se cargó un matraz de fondo redondo con 3 cuellos de 10 L con bromuro de metil(trifenil)fosfonio (958,03 g, 2,68 mol), THF (2,5 L), seguido por adición de t-BuOK (300,94 g, 2,68 mol) en partes a 0 °C durante 2 h. A esto se agregó una solución del compuesto **4** (460,00 g, 1,79 mol) en THF (2,5 L) por goteo con agitación a 0 °C. La solución resultante se agitó a -5~0 °C durante 20 min, se inactivó mediante adición de 500 L de agua y se extrajo con 3 x 500 mL de acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se secaron en sulfato de sodio anhidro y se concentraron al vacío. El residuo se purificó en una columna de gel de sílice con elución con acetato de etilo:éter de petróleo (1:20) para proporcionar el compuesto **5** como un líquido amarillo claro (275,00 g, 1,08 mol, 30,09 %).

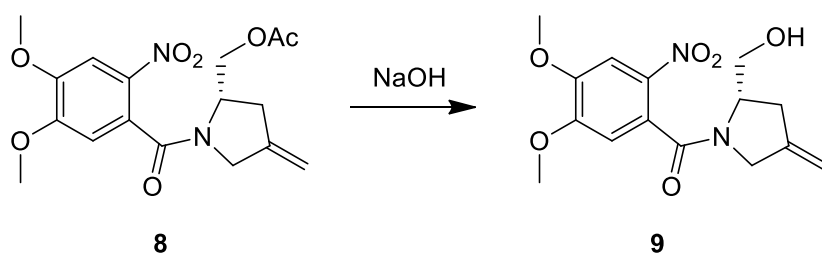


Se agitó una mezcla del compuesto **5** (330,00 g, 1,29 mol) en HCl (gas)/EtOAc (3L, 4M/L) a 0 °C 20 min. La mezcla luego se agitó a 10-30 °C durante 1 h. La mezcla se concentró al vacío para proporcionar el compuesto **6** como un sólido amarillo (250,00 g, 1,30 mol, 101 %), que se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.



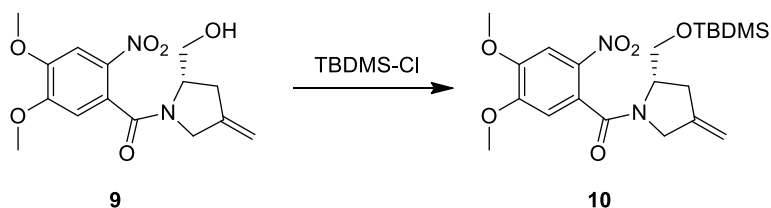
Se cargó un matraz de fondo redondo con 3 cuellos de 3000 mL

purgado y mantenido con atmósfera inerte de nitrógeno con una solución del compuesto **7** (354,42 g, 1,56 mol, 1,30 eq.) en THF (1,5 L), seguido por adición de SOCl₂ (1,71 kg, 14,33 mol, 11,94 eq.) por goteo con agitación. La solución resultante se agitó a 20-30 °C durante 4 horas y luego se concentró al vacío. En otro matraz de fondo redondo con 3 cuellos de 3000 mL purgado y mantenido con una atmósfera inerte de nitrógeno, se colocó una solución del compuesto **6** (230,00 g, 1,20 mol, 1,00 eq.) en DCM (2,5 L). A esto se agregó Et₃N (485,75 g, 4,80 mol, 4,00 eq.) por goteo con agitación a -40 °C, seguido por la solución en el primer matraz a -40 °C. La temperatura se dejó calentar hasta 0 °C de forma natural, se inactivó mediante adición de 3000 mL de agua/hielo y se extrajo con 3x1000 mL de diclorometano. Las capas orgánicas combinadas se secaron en sulfato de sodio anhidro y se concentraron al vacío. El residuo se purificó en una columna de gel de sílice con elución con EtOAc:PE (1:3) para proporcionar el compuesto **8** como un aceite café claro (210,00 g), que se utilizó en la siguiente etapa sin purificación.

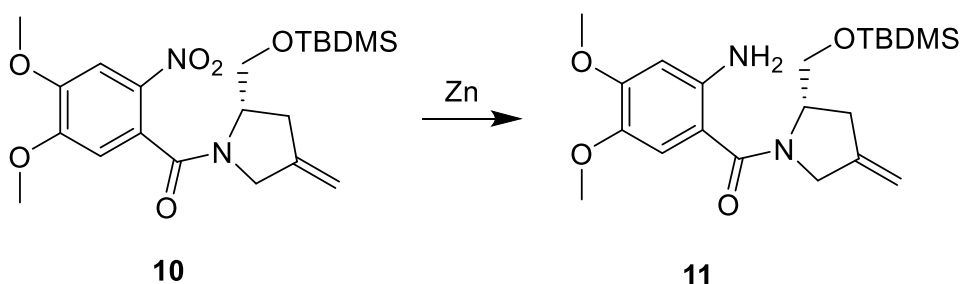


A una mezcla del compuesto **8** (90,00 g, 247,02 mmol, 1,00 eq.) en THF (400 mL), MeOH (100 mL), H₂O (400 mL), se le agregó NaOH (29,64 g, 741,05 mmol, 3,00 eq.) en una parte a 0 °C. La mezcla se agitó a 20-30 °C durante 18 h. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (300 mL x 3). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera saturada (100 mL), se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró al vacío para proporcionar el compuesto **9** como un sólido amarillo (90,26

g, bruto), que se utilizó para la siguiente etapa sin purificación adicional.



Se cargó un matraz de fondo redondo con tres cuellos de 2000 mL equipado con una sonda de temperatura, agitadores magnéticos y entrada de nitrógeno con TBDMSCl (126,62 g, 840,12 mmol), imidazol (57,20 g, 840,12 mmol, 3,00 eq.) en DMF (1 L). Luego se agregó una solución del compuesto **9** (90,26 g, 280,04 mmol, 1,00 eq.) en DMF (1 L) a la mezcla a 0 °C. La mezcla de reacción resultante se agitó durante 2 h a 25-30 °C. La mezcla de reacción se vertió en agua helada (1 mL) y luego se extrajo con DCM (200 mL x 3). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (100 mL) se secaron en Na₂SO₄ y se concentraron al vacío para proporcionar el residuo, para proporcionar el compuesto **10** como un aceite amarillo (126,00 g), que se utilizó para la siguiente etapa sin purificación adicional.

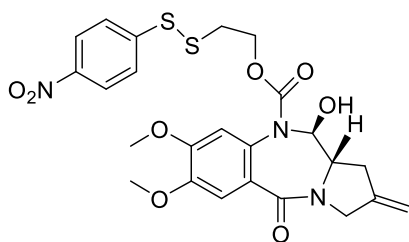


A una mezcla del compuesto **10** (126,00 g, 288,61 mmol, 1,00 eq.) en AcOH (1 L), se le agregó Zn (188,72 g, 2,89 mol) en partes manteniendo la temperatura por debajo de 30 °C. La mezcla se agitó a 20-30 °C durante 30 min. El residuo se vertió en EtOAc (500 mL) y se filtró. El filtrado se

concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (PE/EtOAc=10/1, 1/1) para proporcionar **11** como un aceite amarillo (58,00 g, 142,64 mmol, 49 % de rendimiento).

¹H NMR (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 6,71 (s, 1 H) 6,22 (s, 1 H) 4,85 - 4,97 (m, 2 H) 4,52 (br, s, 1 H) 4,14 - 4,23 (m, 1 H) 3,99 - 4,13 (m, 1 H) 3,82 (s, 3 H) 3,77 (s, 3 H) 3,59 (d, J=5,73 Hz, 1 H) 2,63 - 2,72 (m, 2 H) 2,01 - 2,04 (m, 1 H) 1,23 (t, J=7,06 Hz, 1 H) 0,85 (s, 9 H) -0,06 - 0,06 (m, 5 H).

(11S,11aS)-11-hidroxi-7,8-dimetoxi-5-oxo-2-(quinolin-6-il)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepina-10(5H)-carboxilato de 2-((4-nitrofenil)disulfanil)etilo



El compuesto del título se sintetizó siguiendo las etapas 5-7 como se describió anteriormente. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,24 (d, J = 2,3 Hz, 1H), 8,66 - 8,34 (m, 1H), 8,15 - 7,62 (m, 1H), 7,11 (s, 1H), 6,98 (s, 1H), 6,67 (d, J = 5,8 Hz, 1H), 5,37 (dd, J = 9,5, 6,3 Hz, 1H), 5,13 (d, J = 6,2 Hz, 2H), 4,54 - 4,31 (m, 1H), 4,12 (d, J = 15,6 Hz, 1H), 4,03 - 3,91 (m, 2H), 3,86 - 3,78 (m, 6H), 3,76 (d, J = 3,4 Hz, 1H), 3,48 (t, J = 8,8 Hz, 1H), 3,24 - 3,00 (m, 2H), 2,96 - 2,80 (m, 1H). MS m/z = 549 [M+1]⁺

Si bien la invención que antecede se describió de forma detallada a modo ilustrativo y de ejemplo con fines de

claridad de comprensión, las descripciones y los ejemplos no deberían interpretarse como taxativos del alcance de la invención. Todas las patentes, solicitudes de patente y referencias mencionadas en todo el texto de la memoria descriptiva se incorporan expresamente mediante esta referencia.