

CONJUGADOS ANTICUERPO-DROGA PARA ABLACIÓN DE CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS

REMISIÓN A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 62/437.622 presentada el 21 de diciembre de 2016, y Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 62/520.854 presentada el 16 de junio de 2017, cuyos contenidos se incorporan a la presente a modo de referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

[0002] La presente revelación se dirige a conjugados anticuerpo droga anti-cKIT, y sus usos para ablación de células madre hematopoyéticas en un paciente que lo necesita, por ej., un receptor de trasplante de células madre hematopoyéticas.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0003] La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que ha sido presentado electrónicamente en formato ASCII y se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 14 de diciembre de 2017, se denomina PAT057400-WO-PCT_SL.txt y tiene 209.938 bytes de tamaño.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0004] cKIT (CD117) es un receptor de transmembrana simple de tirosina quinasa que se une al ligando Factor de Célula Madre (SCF). SCF induce homodimerización del cKIT que activa su actividad tirosina quinasa y señala a través de ambas vías PI3-AKT y MAPK (Kindblom et al., Am J. Path. 1998 152(5):1259). cKIT fue inicialmente descubierto como un oncogén como una forma truncada expresada por un retrovirus felino (Besmer et al., Nature 1986 320:415-421). La clonación del gen humano correspondiente demostró que cKIT es un miembro de la clase tipo III de receptores tirosina quinasas, que se enumeran entre los miembros de la familia, FLT3, receptor CSF-1 y receptor PDGF. cKIT se requiere para el desarrollo de células hematopoyéticas, células germinales, mastocitos y melanocitos. Células progenitoras hematopoyéticas, por ej., células madre hematopoyéticas (HSC), en la médula ósea, expresan nivel alto de cKIT sobre superficie celular. Además, mastocitos, melanocitos en la piel, y células intersticiales de Cajal en el tracto digestivo expresan cKIT.

[0005] Las células madre hematopoyéticas (HSCs) son capaces de regenerar toda la sangre y células inmune en un receptor de trasplante y por lo tanto tener gran potencial terapéutico. El trasplante de células madre hematopoyéticas es ampliamente usado como terapias para leucemia, linfoma, y otras enfermedades con riesgo de vida. Muchos riesgos, sin embargo, se asocian con dicho trasplante, incluyendo injerto pobre, rechazo inmunológico, enfermedad de injerto–contra–huésped (GVHD), o infección. Trasplante de células madre hematopoyéticas alogénicas generalmente requiere acondicionamiento del receptor mediante tratamiento cito–reductivos para prevenir rechazo inmunológico del injerto. Los regímenes de acondicionamiento actuales son con frecuencia tan tóxicos para el huésped que son contraindicados por grandes grupos de pacientes de trasplante y/o no puede ser provisto en cantidades suficientes para prevenir enfermedad de injerto contra huésped. Por lo tanto, existe la necesidad de mejorar los métodos de acondicionamiento y trasplante y disminuir los riesgos asociados con trasplante de células madre hematopoyéticas y aumentar su efectividad para diversos trastornos.

SÍNTESIS DE LA INVENCIÓN

[0006] La presente revelación proporciona conjugados anticuerpo droga donde un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano se conecta a un resto droga (por ej., un agente citotóxico), opcionalmente a través de un ligador. Esos conjugados anticuerpo droga pueden selectivamente liberar un agente citotóxico a las células que expresan cKIT, por ej., células madre hematopoyéticas, así selectivamente produciendo ablación de aquellas células en un paciente, por ej., un receptor de trasplante de células madre hematopoyéticas. Preferentemente, los conjugados anticuerpo droga cKIT tienen propiedades farmacocinéticas tal que no estará presente y/o activo en la circulación de un paciente durante un tiempo prolongado, entonces pueden ser usados para acondicionar receptores de trasplante de células madre hematopoyéticas previo a trasplante de células madre hematopoyéticas. En algunas realizaciones, se proporcionan en la presente conjugados que comprenden un fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT, conectado a un resto droga (por ej., un agente citotóxico), opcionalmente a través de un ligador. Sorpresivamente, los inventores de la presente hallaron que los anticuerpos anti–cKIT de longitud completa (por ej., IgGs de longitud completa), fragmentos F(ab')₂, y sus conjugados toxina producen desgranulación de mastocitos, pero los conjugados anti–cKIT Fab' o Fab–toxina no producen desgranulación de mastocitos, aun

cuando se entrecruzan y/o multimerizan dentro de complejos más grandes como se puede observar si un paciente desarrolla o tiene anticuerpos anti-droga pre-existentes que reconocen fragmentos Fab. La presente revelación además proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los conjugados de anticuerpo droga, y métodos para elaborar y usar dichas composiciones farmacéuticas para ablación de células madre hematopoyéticas en un paciente que lo necesita, por ej., un receptor de trasplante de células madre hematopoyéticas.

[0007] En un aspecto, la presente revelación se dirige a un conjugado de Fórmula (I):



donde:

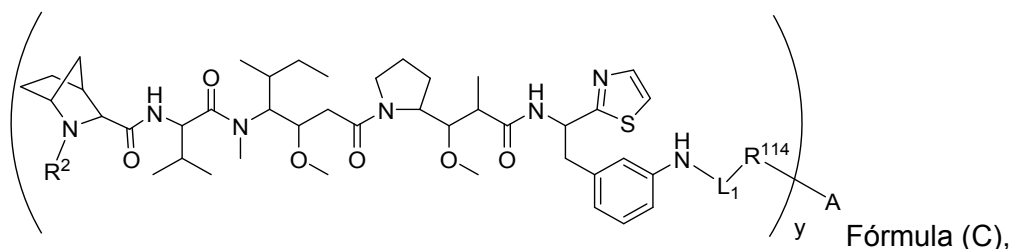
A es un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a cKIT humano;

L_B es un ligador;

D es un agente citotóxico;

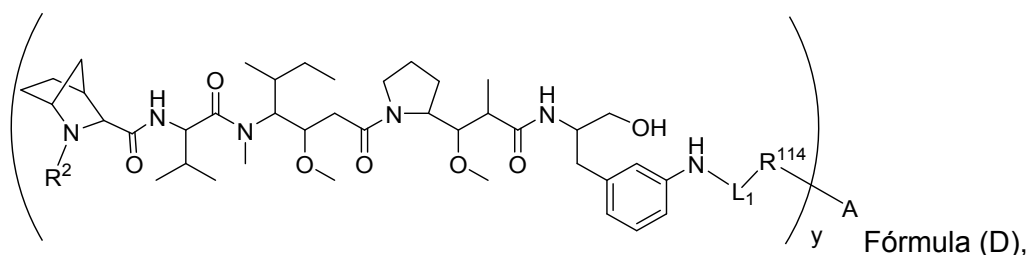
n es un número entero que va desde 1 hasta 10, y y es un número entero que va desde 1 hasta 10.

[0008] En un aspecto, la presente revelación se dirige a un conjugado que tiene la estructura de Fórmula (C):



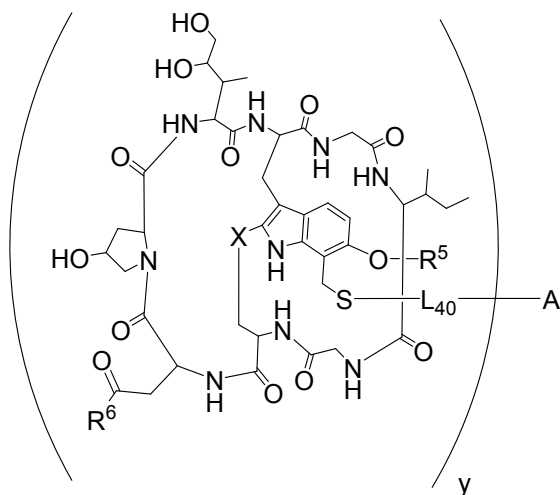
donde A, L_{20} , y y R^2 , son como se define en la presente.

[0009] En un aspecto, la presente revelación se dirige a un conjugado que tiene la estructura de Fórmula (D):



donde A, L_{30} , y, R^1 y R^2 , son como se define en la presente.

[0010] En un aspecto, la presente revelación se dirige a un conjugado que tiene la estructura de Fórmula (E):



Fórmula (E),

donde A, L₄₀, y, X, R⁵ y R⁶, son como se define en la presente.

[0011] En otro aspecto, se proporcionan en la presente anticuerpos y fragmentos de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se unen a cKIT humano. Dichos anticuerpos anti-cKIT y fragmentos de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') se puede usar en cualquiera de los conjugados que se describen en la presente.

[0012] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une al dominio extracelular de cKIT humano (SEQ ID NO: 112).

[0013] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a un epítipo en dominios 1-3 de cKIT humano (SEQ ID NO: 113).

[0014] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que se describe en la Tabla 1.

[0015] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una HCDR1 de SEQ ID NO:

1, una HCDR2 de SEQ ID NO: 2; una HCDR3 de SEQ ID NO: 3; una LCDR1 de SEQ ID NO: 16; una LCDR2 de SEQ ID NO: 17; y una LCDR3 de SEQ ID NO: 18.

[0016] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 4, una HCDR2 de SEQ ID NO: 5; una HCDR3 de SEQ ID NO: 3; una LCDR1 de SEQ ID NO: 19; una LCDR2 de SEQ ID NO: 20; y una LCDR3 de SEQ ID NO: 21.

[0017] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 6, una HCDR2 de SEQ ID NO: 2; una HCDR3 de SEQ ID NO: 3; una LCDR1 de SEQ ID NO: 16; una LCDR2 de SEQ ID NO: 17; y una LCDR3 de SEQ ID NO: 18.

[0018] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 7, una HCDR2 de SEQ ID NO: 8; una HCDR3 de SEQ ID NO: 9; una LCDR1 de SEQ ID NO: 22; una LCDR2 de SEQ ID NO: 20; y una LCDR3 de SEQ ID NO: 18.

[0019] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 27, una HCDR2 de SEQ ID NO: 28; una HCDR3 de SEQ ID NO: 29; una LCDR1 de SEQ ID NO: 42; una LCDR2 de SEQ ID NO: 17; y una LCDR3 de SEQ ID NO: 43.

[0020] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 30, una HCDR2 de SEQ ID NO: 31; una HCDR3 de SEQ ID NO: 29; una LCDR1 de SEQ ID NO: 44; una LCDR2 de SEQ ID NO: 20; y una LCDR3 de SEQ ID NO: 45.

[0021] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 32, una HCDR2 de SEQ ID NO: 28; una HCDR3 de SEQ ID NO: 29; una LCDR1 de SEQ ID NO: 42; una LCDR2 de SEQ ID NO: 17; y una LCDR3 de SEQ ID NO: 43.

[0022] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 33, una HCDR2 de SEQ ID NO: 34; una HCDR3 de SEQ ID NO: 35; una LCDR1 de SEQ ID NO: 46; una LCDR2 de SEQ ID NO: 20; y una LCDR3 de SEQ ID NO: 43.

[0023] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una HCDR1 de SEQ ID NO:

1, una HCDR2 de SEQ ID NO: 51; una HCDR3 de SEQ ID NO: 3; una LCDR1 de SEQ ID NO:16; una LCDR2 de SEQ ID NO: 17; y una LCDR3 de SEQ ID NO: 18.

[0024] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 4, una HCDR2 de SEQ ID NO: 52; una HCDR3 de SEQ ID NO: 3; una LCDR1 de SEQ ID NO:19; una LCDR2 de SEQ ID NO: 20; y una LCDR3 de SEQ ID NO: 21.

[0025] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 6, una HCDR2 de SEQ ID NO: 51; una HCDR3 de SEQ ID NO: 3; una LCDR1 de SEQ ID NO:16; una LCDR2 de SEQ ID NO: 17; y una LCDR3 de SEQ ID NO: 18.

[0026] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 7, una HCDR2 de SEQ ID NO: 53; una HCDR3 de SEQ ID NO: 9; una LCDR1 de SEQ ID NO: 22; una LCDR2 de SEQ ID NO: 20; y una LCDR3 de SEQ ID NO: 18.

[0027] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 60, una HCDR2 de SEQ ID NO: 61; una HCDR3 de SEQ ID NO: 62; una LCDR1 de SEQ ID NO: 75; una LCDR2 de SEQ ID NO: 76; y una LCDR3 de SEQ ID NO: 77.

[0028] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 63, una HCDR2 de SEQ ID NO: 64; una HCDR3 de SEQ ID NO: 62; una LCDR1 de SEQ ID NO: 78; una LCDR2 de SEQ ID NO: 79; y una LCDR3 de SEQ ID NO: 80.

[0029] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 65, una HCDR2 de SEQ ID NO: 61; una HCDR3 de SEQ ID NO: 62; una LCDR1 de SEQ ID NO:75; una LCDR2 de SEQ ID NO: 76; y una LCDR3 de SEQ ID NO: 77.

[0030] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 66, una HCDR2 de SEQ ID NO: 67; una HCDR3 de SEQ ID NO: 68; una LCDR1 de SEQ ID NO: 81; una LCDR2 de SEQ ID NO: 79; y una LCDR3 de SEQ ID NO: 77.

[0031] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una HCDR1 de SEQ ID NO:

86, una HCDR2 de SEQ ID NO: 87; una HCDR3 de SEQ ID NO: 88; una LCDR1 de SEQ ID NO: 101; una LCDR2 de SEQ ID NO: 102; y una LCDR3 de SEQ ID NO: 103.

[0032] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 89, una HCDR2 de SEQ ID NO: 90; una HCDR3 de SEQ ID NO: 88; una LCDR1 de SEQ ID NO: 104; una LCDR2 de SEQ ID NO: 105; y una LCDR3 de SEQ ID NO: 106.

[0033] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 91, una HCDR2 de SEQ ID NO: 87; una HCDR3 de SEQ ID NO: 88; una LCDR1 de SEQ ID NO: 101; una LCDR2 de SEQ ID NO: 102; y una LCDR3 de SEQ ID NO: 103.

[0034] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 92, una HCDR2 de SEQ ID NO: 93; una HCDR3 de SEQ ID NO: 94; una LCDR1 de SEQ ID NO: 107; una LCDR2 de SEQ ID NO: 105; y una LCDR3 de SEQ ID NO: 103.

[0035] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, y una región variable de cadena liviana (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23.

[0036] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47.

[0037] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23.

[0038] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82.

[0039] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una VH que comprende la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 95, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 108.

[0040] En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo (por ej., Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

[0041] En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo (por ej., Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49.

[0042] En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo (por ej., Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

[0043] En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo (por ej., Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84.

[0044] En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo (por ej., Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 99, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 110.

[0045] En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo (por ej., Fab) que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 118, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 122.

[0046] En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo (por ej., Fab) que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 118, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 123.

[0047] En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo (por ej., Fab) que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 124, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 128.

[0048] En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo (por ej., Fab) que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 124, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 129.

[0049] En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo (por ej., Fab) que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 134.

[0050] En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo (por ej., Fab) que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 135.

[0051] En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo (por ej., Fab) que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 136, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 140.

[0052] En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo (por ej., Fab) que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 141, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145.

[0053] En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo (por ej., Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 119, 120 o 121, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

[0054] En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo (por ej., Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 125, 126, o 127, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49.

[0055] En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo (por ej., Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende una

secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 131, 132, o 133, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

[0056] En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo (por ej., Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 137, 138, o 139, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84.

[0057] En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo (por ej., Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 142, 143, o 144, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 110.

[0058] En algunas realizaciones, el anticuerpo que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

[0059] En algunas realizaciones, el anticuerpo que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49.

[0060] En algunas realizaciones, el anticuerpo que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

[0061] En algunas realizaciones, el anticuerpo que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84.

[0062] En algunas realizaciones, el anticuerpo que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 110.

[0063] En algunas realizaciones, se proporcionan en la presente conjugados que comprenden un fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT (anti-cKIT Fab o Fab'), conectado a un resto droga (por ej., un agente citotóxico),

opcionalmente a través de un ligador. El Fab o Fab' anti-cKIT puede ser cualquiera de los Fab o Fab' que se describen en la presente, por ej., cualquiera de los Fab o Fab' en la Tabla 1. Tal como se describe en la presente, dichos conjugados anti-cKIT Fab' o Fab-toxina son capaces de producir ablación de células HSC humanas *in vitro* e *in vivo*, pero no producen desgranulación de mastocitos incluso cuando están entrecruzados y/o multimerizados dentro de complejos más grandes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0064] **FIG. 1** es un gráfico de líneas que muestra todos los conjugados anti-cKIT Fab'-(1) DAR4 ensayados (ver Tabla 2 para detalles de conjugado) células madre destruida y progenitora (cKIT⁺ / CD90⁺ células) *in vitro* con potencia aproximadamente igual: J3 (cuadrados); J2 (triángulos hacia arriba); J1 (triángulos hacia abajo). A ADC control, J6 (diamantes), no destruyeron HSCs humanas en comparación con PBS control (círculos).

[0065] **FIG. 2** es un gráfico de líneas que muestra tanto J4 (cuadrados) como J5 (triángulos) conjugados anti-cKIT destruyeron HSCs de ratón a largo plazo (cKIT⁺ células). J5 (triángulos) fue más potente que J4 (cuadrados) en este ensayo de destrucción de HSC de ratón. Un ADC control, J6 (diamantes) no destruyeron HSCs de ratón en comparación con control PBS (círculos).

[0066] **FIGs. 3A–3L** son gráficos de líneas que muestran resultados representativos de ensayos *in vitro* de desgranulación de mastocitos humanos, que usaron sangre periférica humana mastocitos derivados de HSC y liberación beta-hexosaminidasa como la lectura (evaluada por absorbancia a 405 nm con sustracción de valor de referencia en base a absorbancia de referencia a 620 nm). Los datos que se muestran aquí fueron recogidos en la ausencia de SCF. **FIG. 3A** es un gráfico de líneas que muestra titulación de ya sea conjugados anti-cKIT Fab'-(1) DAR4 (símbolos cerrados, líneas continuas) o anticuerpos anti-cKIT de longitud completa (símbolos abiertos, líneas entrecortadas) para varios clones anti-cKIT: anti-cKIT Ab4/Fab'4 (círculos), anti-cKIT Ab3/Fab'3 (cuadrados), anti-cKIT Ab2/Fab'2 (triángulos hacia arriba), anti-cKIT Ab1/Fab'1 (triángulos hacia abajo), y anti-Her2 Ab/Fab' control (diamantes). **FIG. 3B** es un gráfico de líneas que muestra titulación de anti-IgE como un control positivo para desgranulación de mastocitos. Se observe desgranulación de mastocitos para todas las concentraciones de anti-IgE ensayadas. **FIGs. 3C–3J** son gráficos de líneas que muestran nivel de desgranulación de mastocitos activado por

conjugados anti-cKIT Fab'-(1) DAR4 (descritos en Tabla 2) o controles IgG anti-cKIT Ab de longitud completa (descritos en Tabla 8) en varias concentraciones: ausente (diamantes abiertos y líneas entrecortadas); 0,006 nM (triángulos); 0,098 nM (diamantes); 1,56 nM (círculos); y 25 nM (cuadrados), cuando los agentes de ensayo fueron entrecruzados usando un anticuerpo específico para la porción Fab en los agentes de ensayo de anticuerpo (titulados sobre eje x). **FIGs. 3C y 3D** muestra que no hay desgranulación de mastocitos activada por conjugado J4 en todas las concentraciones ensayadas (FIG. 3C), mientras anti-cKIT Ab4 de longitud completa, al entrecruzarse, produjo desgranulación de mastocitos (FIG. 3D). **FIGs. 3E y 3F** muestra que no hay desgranulación de mastocitos activada por conjugado J1 en todas las concentraciones ensayadas (FIG. 3E), mientras anti-cKIT Ab1 de longitud completa, al entrecruzarse, produjo desgranulación de mastocitos (FIG. 3F). **FIGs. 3G y 3H** muestra que no hay desgranulación de mastocitos activada por J2 conjugado en todas las concentraciones ensayadas (FIG. 3G), mientras anti-cKIT Ab2 de longitud completa, al entrecruzarse, produjo desgranulación de mastocitos (FIG. 3H). **FIGs. 3I y 3J** muestra que no hay desgranulación de mastocitos activada por J3 conjugado en todas las concentraciones ensayadas (FIG. 3I), mientras anti-cKIT Ab3 de longitud completa, al entrecruzarse, produjo desgranulación de mastocitos (FIG. 3J). **FIGs. 3K y 3L** son gráficos de líneas que muestran que no hay desgranulación de mastocitos producida por conjugado control J6 (FIG. 3K) o anticuerpo anti-Her2 de longitud completa (FIG. 3L) al entrecruzarse.

[0067] **FIG. 4** es un gráfico de puntos que muestra números relativos de HSCs humanas presentes en médula ósea de ratones NSG humanizados después del tratamiento con varios agentes. J7 conjugado redujo HSCs humanas (cuadrados) en relación a PBS control (círculos), mientras el conjugado J8 control (diamantes) no redujo HSCs humana en la médula ósea.

[0068] **FIG. 5** es un gráfico de puntos que muestra números relativos de HSCs humanas presentes en médula ósea de ratones NSG humanizados después del tratamiento con varios agentes. Conjugados anti-cKIT Fab'-(1) DAR4 redujeron HSCs humana en relación a control PBS (círculos). Los conjugados anti-cKIT ensayados (descritos en Tabla 2) fueron: J3 (cuadrados); J2 (triángulos hacia arriba); J1 (triángulos hacia abajo). Los ratones control tratados con J6 (diamantes) no redujeron HSCs humana en la médula ósea.

[0069] **FIG. 6** es un gráfico de barras que muestra números relativos de HSCs presentes en médula ósea de C57Bl/6 ratones después del tratamiento con varios agentes.

Bar A = ratones tratados con conjugado J4, Bar B = ratones tratados con conjugado J5, Bar C = ratones tratados con PBS.

[0070] **FIGs. 7A–7I** son gráficos de líneas que muestran resultados representativos de *in vitro* ensayos de desgranulación de mastocitos humanos, que usaron sangre periférica humana mastocitos derivados de HSC y liberación beta-hexosaminidasa como la lectura (evaluada por absorbancia a 405 nm con sustracción de valor de referencia en base a absorbancia de referencia a 620 nm). Los datos que se muestran aquí fueron recogidos en la ausencia de SCF. Los gráficos de líneas muestran nivel de desgranulación de mastocitos activado por anticuerpos o fragmentos de anticuerpo en varias concentraciones: 0,006 nM (triángulos); 0,098 nM (diamantes); 1,6 nM (círculos); y 25 nM (cuadrados), cuando los agentes de ensayo eran entrecruzados usando un anticuerpo específico para la porción Fab en los agentes de ensayo de anticuerpo (titulado en eje x). **FIGs. 7A–7C** muestran que anti-cKIT Ab4 de longitud completa (HC–E152C–S375C) (FIG. 7A) y fragmento anti-cKIT F(ab')₂ (HC–E152C) conjugado a compuesto (4) (FIG. 7B) produjo desgranulación de mastocitos al entrecruzarse, mientras que no se activó desgranulación de mastocitos por fragmento Fab4 (HC–E152C) en todas las concentraciones ensayadas (FIG. 7C). **FIGs. 7D–7F** muestran que anti-cKIT Ab3 (HC–E152C–S375C) de longitud completa (FIG. 7D) y fragmento F(ab')₂ (HC–E152C) conjugado a compuesto (5) (FIG. 7E) produjo desgranulación de mastocitos al entrecruzarse, mientras que no se activó desgranulación de mastocitos por fragmento Fab3 (E152C) conjugado a compuesto (4) en todas las concentraciones ensayadas (FIG. 7F). **FIGs. 7G–7I** son gráficos de líneas que muestran que no hay desgranulación de mastocitos producida por anticuerpo anti-Her2 (HC–E152C–S375C) (FIG. 7G), fragmento anti-Her2–F(ab')₂ (HC–E152C) conjugado a compuesto (4) (FIG. 7H), o fragmento anti-Her2–Fab (HC–E152C) conjugado a compuesto (7) (FIG. 7I) al entrecruzarse.

[0071] **FIGs. 8A–8O** son gráficos de líneas que muestran resultados representativos de ensayos de desgranulación de mastocitos humanos *in vitro*, que utilizaron mastocitos provenientes de sangre periférica humana HSC y liberación beta-hexosaminidasa como la lectura (ensayado mediante absorbancia a 405 nm con sustracción de valor referencia en base a la absorbancia de referencia a 620 nm). Los datos que se muestran aquí fueron recogidos en la ausencia de SCF. Los gráficos de líneas muestran nivel de desgranulación de mastocitos activado por anticuerpos o fragmentos de anticuerpo en varias concentraciones: 0,006 nM (triángulos); 0,098 nM (diamantes); 1,6 nM (círculos); y 25 nM (cuadrados), cuando

los agentes de prueba fueron entrecruzados usando un anticuerpo específico para la porción Fab en los agentes de prueba de anticuerpo (titulados sobre eje x). A modo de referencia, el anticuerpo de entrecruzamiento solo es graficado en cada gráfico (diamantes abiertos, línea entrecortada). **FIGs. 8A–8C** muestran que anti-cKIT Ab4 de longitud completa (FIG. 8A) y anti-cKIT F fragmento (ab'4)₂ (FIG. 8B) produjo desgranulación de mastocitos al entrecruzarse, mientras que no se activó desgranulación de mastocitos mediante anti-cKIT fragmento Fab4 (HC–E152C) en todas las concentraciones ensayadas (FIG. 8C). **FIGs. 8D–8F** muestran que anti-cKIT Ab1 de longitud completa (FIG. 8D) y anti-cKIT fragmento F(ab'1)₂ (FIG. 8E) produjo desgranulación de mastocitos al entrecruzarse, mientras que no se activó desgranulación de mastocitos mediante anti-cKIT fragmento Fab1 (HC–E152C) en todas las concentraciones ensayadas (FIG. 8F). **FIGs. 8G–8I** muestran que anti-cKIT Ab2 de longitud completa (FIG. 8G) y anti-cKIT fragmento F(ab'2)₂ (FIG. 8H) produjo desgranulación de mastocitos al entrecruzarse, mientras que no se activó desgranulación de mastocitos mediante anti-cKIT fragmento Fab2 (HC–E152C) en todas las concentraciones ensayadas (FIG. 8I). **FIGs. 8J–8L** muestran que anti-cKIT Ab3 de longitud completa (FIG. 8J) y anti-cKIT fragmento F(ab'3)₂ (FIG. 8K) produjo desgranulación de mastocitos al entrecruzarse, mientras que no se activó desgranulación de mastocitos mediante anti-cKIT fragmento Fab3 (HC–E152C) en todas las concentraciones ensayadas (FIG. 8L). **FIGs. 8M–8O** son gráficos de línea que muestran que no hay desgranulación de mastocitos producida por anticuerpo anti-Her2 (FIG. 8M), fragmento anti-Her2–F(ab')₂ (FIG. 8N), o fragmento anti-Her2–Fab (HC–E152C) (FIG. 8O) al entrecruzarse.

[0072] **FIGs. 9A–9C** representan resultados de ensayos de destrucción *in vitro* usando células humanas. HSCs de sangre periférica movilizada fueron cultivadas con factores de crecimiento y se midió el agente de ensayo indicado durante 7 días y viabilidad mediante citometría de flujo y recuento de células. Agentes de ensayo anti-cKit Fab' DAR4 fueron preparados con diferentes Fabs: anti-cKIT Fab'1 (FIG. 9A), Fab'2 (FIG. 9B), o Fab'3 (FIG. 9C). Las cargas efectivas ensayadas fueron C1 (cuadrado abierto), mc–MMAF (círculo abierto), C5 (diamante) o C2 (triángulo). Los datos representan media con desviación estándar y ajustes de curva de respuesta de 3 parámetros por triplicados medidos en el mismo experimento.

[0073] **FIGs. 10A–10D** son gráficos de líneas que muestran evolución temporal de establecimiento de quimerismo de célula donante en muestras de sangre tomadas de ratones trasplantados. C57BL/6J ratones (n=5 para grupo anti-cKit– tratado o n=2 para grupo PBS–

tratado) fueron dosificados con 10 mg/kg anti-cKit-Fab'5-DAR4-C1 (triángulos), 20 mg/kg anti-cKit-Fab'5-DAR4-C1 (círculos), o PBS (cuadrados) inyectados por siete días y luego trasplantados dos días más tarde con CD45.1+ células donantes. Dos animales control fueron irradiados con 1100 RADS (diamantes) un día previo a trasplante. Los gráficos de líneas muestran el porcentaje de células donantes (CD45.1+) medido en la población de todas las células (FIG. 10A), células mieloide (FIG. 10B), células B (FIG. 10C) o células T (FIG. 10D) mediante análisis FACS de muestras de sangre tomadas en cada punto de tiempo. Los datos representan media con error estándar.

[0074] **FIGs. 11A–11B** son gráficos de barra que muestran quimerismo de célula donante en muestras de sangre tomadas de ratones trasplantados. C57BL/6J ratones (n=5 para grupo anti-cKit-tratado o n=2 para grupo PBS-tratado) fueron dosificados con 10 mg/kg anti-cKit-Fab'5-DAR4-C1 (rayas horizontales), 20 mg/kg anti-cKit Fab'5-DAR4-C1 (rayas verticales), 40 mg/kg anti-cKit-Fab'5-DAR4-C1 (entero), 40 mg/kg anti-cKit-Fab'5-DAR4-mc-MMAF (a cuadros), o PBS (borde negro abierto) inyectados durante cinco días y luego trasplantados un día más tarde con CD45.1+ células donantes. Dos animales control fueron irradiados con 1100 RADS (incubados) un día previo a trasplante. Los gráficos muestran el porcentaje de células donantes (CD45.1+) medido en la población de todas las células (FIG. 11A) o células mieloide (FIG. 11B) mediante análisis FACS de muestras de sangre tomadas en el día 28 (barra izquierda para cada grupo) o día 56 (barra derecha para cada grupo) post-trasplante. Los datos representan media con error estándar.

[0075] **FIGs. 12A–12B** son gráficos de líneas que muestran evolución temporal de establecimiento de quimerismo de célula donante en muestras de sangre tomadas de ratones trasplantados. C57BL/6J ratones (n=5 para grupo anti-cKit-tratado o n=2 para grupo PBS-tratado) fueron irradiados con 300 RADS y tres días más tarde fueron ya sea no dosificados (cuadrados) o fueron dosificados con 10 mg/kg anti-cKit-Fab'5-DAR4-C1 (triángulos) o 20 mg/kg anti-cKit-Fab'5-DAR4-C1 (círculos) inyectados durante tres días y luego trasplantados dos días más tarde con CD45.1+ células donantes. Un grupo adicional de 5 animales fueron solamente dosificados con 10 mg/kg anti-cKit-Fab'5-DAR4-C1 (cuadrados abiertos) inyectados durante tres días y luego trasplantados dos días más tarde. Dos animales control fueron irradiados con 1100 RADS (diamantes) un día previo a trasplante y dos animales control no fueron tratados (diamantes abiertos) previo a trasplante. Los gráficos de líneas muestran el porcentaje de células donantes (CD45.1+) medido en la población de todas

las células (FIG. 12A) o células mieloide (FIG. 12B) mediante análisis FACS de muestras de sangre tomadas en cada punto de tiempo. Los datos representan media con error estándar.

[0076] **FIG. 13** es un gráfico de puntos que muestra números relativos de HSCs humanas presentes en médula ósea de ratones NSG humanizados después del tratamiento con varios agentes. Conjugados anti-cKIT Fab'-DAR4 redujeron HSCs humana en relación con control PBS (diamantes). Los conjugados anti-cKIT ensayados (descritos en Tabla 2) fueron: JW (círculos); JX (cuadrados); JY (triángulos hacia arriba); JZ (triángulos hacia abajo).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0077] La presente revelación proporciona conjugados anticuerpo droga donde un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano se conecta a un resto droga (por ej., un agente citotóxico), opcionalmente a través de un ligador. Esos conjugados anticuerpo droga pueden selectivamente liberar un agente citotóxico a las células que expresan cKIT, por ej., células madre hematopoyéticas, así selectivamente eliminando aquellas células en un paciente, por ej., un receptor de trasplante de células madre hematopoyéticas. Preferentemente, los conjugados anticuerpo droga cKIT tienen propiedades farmacocinéticas tal que no estará presente y/o activo en la circulación de un paciente durante un tiempo prolongado (por ej., vida media es menos de 24-48 horas), de modo que pueden usarse para acondicionamiento de receptores de trasplante de células madre hematopoyéticas previo al trasplante de células madre hematopoyéticas. En algunas realizaciones, se proporcionan en la presente conjugados que comprenden un fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT, conectado a un resto droga (por ej., un agente citotóxico), opcionalmente a través de un ligador. Sorpresivamente, los inventores de la presente hallaron que los anticuerpos anti-cKIT de longitud completa (por ej., de IgGs longitud completa), fragmentos F(ab')₂, y sus conjugados toxina producen desgranulación de mastocitos, pero los conjugados anti-cKIT Fab' o Fab-toxina no producen desgranulación de mastocitos, incluso cuando están entrecruzados y/o multimerizados dentro de complejos más grandes como se puede observar si un paciente desarrolló o tenía anticuerpos anti-droga preexistentes que reconocen fragmentos Fab. La presente revelación además proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los conjugados anticuerpo droga, y métodos para elaborar y usar dichas composiciones farmacéuticas para ablación de células madre hematopoyéticas en un paciente que lo necesita, por ej., un receptor de trasplante de células madre hematopoyéticas.

Definiciones

[0078] A menos que se indique de otra manera, los términos y frases que siguen como se utilizan en la presente pretenden tener los siguientes significados:

[0079] El término “alquilo” se refiere a una cadena de hidrocarburos saturada monovalente que tiene el número especificado de átomos de carbono. Por ejemplo, C₁₋₆ alquilo se refiere a un grupo alquilo que tiene desde 1 hasta 6 átomos de carbono. Grupos alquilo pueden ser rectos o ramificados. Los grupos alquilo ramificados representativos tiene una, dos, o tres ramificaciones. Ejemplos de grupos alquilo incluyen, aunque sin limitación a, metilo, etilo, propilo (n-propilo e isopropilo), butilo (n-butilo, isobutilo, sec-butilo, y t-butilo), pentilo (n-pentilo, isopentilo, y neopentilo), y hexilo.

[0080] El término “anticuerpo,” tal como se usa en la presente, se refiere a una proteína, o secuencia de polipéptidos derivada de una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente a un antígeno. Anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales, de cadena múltiple o simple, o inmunoglobulinas intactas, y pueden provenir de fuentes naturales o de fuentes recombinantes. Un “anticuerpo” que se da naturalmente es una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas livianas (L) interconectadas mediante enlaces bisulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente como VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta por dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena liviana está compuesta por una región variable de cadena liviana (abreviada en la presente como VL) y una región constante de cadena liviana. La región constante de cadena liviana está compuesta por un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden ser adicionalmente subdivididas en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), combinadas con regiones que son más conservadas, llamadas regiones marco (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDRs y cuatro FRs dispuestas desde amino-terminal a carboxil-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variable de las cadenas pesada y liviana contienen un dominio de enlace que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden intermediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos huésped o factores, incluyendo varias células del sistema inmune (por ej., células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico. Un anticuerpo puede ser

un anticuerpo monoclonal, anticuerpo humano, anticuerpo humanizado, anticuerpo camélido, o anticuerpo quimérico. Los anticuerpos pueden ser de cualquier isotipo (por ej., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2) o subclase.

[0081] “Dominios determinantes de complementariedad” o “regiones determinantes de complementariedad” (“CDRs”) se refieren de forma intercambiable a las regiones hipervariables de VL y VH. Las CDRs son el sitio de unión a proteína objetivo de las cadenas de anticuerpo que hospeda especificidad para dicha proteína objetivo. Existen tres CDRs (CDR1–3, numeradas secuencialmente desde la N-terminal) en cada VL o VH humana, que constituye aproximadamente 15–20% de los dominios variables. CDRs puede denominarse por su región y orden. Por ejemplo, “VHCDR1” o “HCDR1” ambos se refieren a la primera CDR de la región variable de cadena pesada. Las CDRs son estructuralmente complementarias al epítipo de la proteína objetivo y por lo tanto son directamente responsables por la especificidad de unión. Los tramos restantes de la VL o VH, las denominadas regiones marco, presentan menos variación en secuencia de aminoácidos (Kuby, Immunology, 4th ed., Capítulo 4. W.H. Freeman & Co., New York, 2000).

[0082] Los límites de secuencia de aminoácidos precisos de una CDR determinada pueden ser determinados usando cualquiera de un número de esquemas bien conocidos, incluyendo aquellos descritos por Kabat *et al.* (1991), “Sequences of Proteins of Immunological Interest,” 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (esquema de numeración “Kabat”), Al-Lazikani *et al.*, (1997) JMB 273, 927–948 (esquema de numeración “Chothia”) y numeración ImMunoGenTics (IMGT) (Lefranc, M.–P., The Immunologist, 7, 132–136 (1999); Lefranc, M.–P. *et al.*, Dev. Comp. Immunol., 27, 55–77 (2003) (esquema de numeración “IMGT”). Por ejemplo, para formatos clásicos, bajo Kabat, los residuos de aminoácidos CDR en el dominio variable de cadena pesada (VH) son numerados 31–35 (HCDR1), 50–65 (HCDR2), y 95–102 (HCDR3); y los residuos de aminoácidos CDR en el dominio variable de cadena liviana (VL) son numerados 24–34 (LCDR1), 50–56 (LCDR2), y 89–97 (LCDR3). Bajo Chothia los aminoácidos CDR en la VH son numerados 26–32 (HCDR1), 52–56 (HCDR2), y 95–102 (HCDR3); y los residuos de aminoácidos en VL son numerados 26–32 (LCDR1), 50–52 (LCDR2), y 91–96 (LCDR3). Combinando las definiciones CDR de Kabat y Chothia, las CDRs se componen de residuos de aminoácidos 26–35 (HCDR1), 50–65 (HCDR2), y 95–102 (HCDR3) en VH humana y residuos de aminoácidos 24–34 (LCDR1), 50–56 (LCDR2), y 89–97 (LCDR3) en VL humana. Bajo IMGT los residuos de aminoácidos CDR en la VH son numerados aproximadamente 26–

35 (CDR1), 51–57 (CDR2) y 93–102 (CDR3), y los residuos de aminoácidos CDR en la VL son numerados aproximadamente 27–32 (CDR1), 50–52 (CDR2), y 89–97 (CDR3) (numeración de acuerdo a “Kabat”). Bajo IMGT, las regiones CDR de un anticuerpo pueden ser determinadas usando el programa IMGT/DomainGap Align.

[0083] Ambas cadenas liviana y pesada se dividen en regiones de homología estructural y funcional. Los términos “constante” y “variable” se usan funcionalmente. En este sentido, se apreciará que los dominios variables de porciones de cadena tanto liviana (VL) como pesada (VH) determinan reconocimiento de antígeno y especificidad. Por el contrario, los dominios constantes de la cadena liviana (CL) y la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3, y en algunos casos, CH4) otorgan importantes propiedades biológicas tal como secreción, movilidad transplacentaria, unión receptor Fc, unión complemento, unión receptor FcRn, vida media, farmacocinéticas y similares. Por lo general, la numeración de los dominios de región constante aumenta a medida que se tornan más alejados del sitio de unión a antígeno o amino-terminal del anticuerpo. La N-terminal es una región variable y en la C-terminal es una región constante; los dominios CH3 y CL actualmente comprenden los dominios carboxi-terminal de la cadena pesada y liviana, respectivamente.

[0084] El término “fragmento de anticuerpo” o “fragmento de unión a antígeno”, tal como se usa en la presente, se refiere a una o más porciones de un anticuerpo que retiene la capacidad de interactuar específicamente con (por ej., unión, obstrucción estérica, estabilización/desestabilización, distribución espacial) un epítipo de un antígeno (por ej., cKIT). Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, aunque sin limitación, un fragmento Fab, que es un fragmento monovalente que se compone de los dominios VL, VH, CL y CH1; un fragmento Fab', que es un fragmento monovalente que se compone de los dominios VL, VH, CL, CH1, y la región bisagra; un fragmento F(ab')₂, que es un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente bisulfuro en la región bisagra; un semi anticuerpo, que incluye una cadena pesada simple y una cadena liviana simple unida por un puente bisulfuro; un anticuerpo de un brazo, que incluye un fragmento Fab unido a una región Fc; un anticuerpo de dominio CH2 suprimido, que incluye dos fragmentos Fab unidos a los dímeros de dominio CH3 (ver Glaser, J Biol Chem. 2005; 280(50):41494–503); un Fv de cadena simple (scFv); un Fv unido a bisulfuro (sdFv); un fragmento Fd que se compone de los dominios VH y CH1; un fragmento Fv que se compone de los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; un fragmento dAb (Ward *et al.*, Nature 341:544–546, 1989), que se compone de un dominio VH; y una región determinante de complementariedad aislada (CDR),

u otros fragmentos de unión a epítipo de un anticuerpo. Por ejemplo, un fragmento Fab puede incluir residuos aminoácidos 1–222 (numeración EU) de la cadena pesada de un anticuerpo; mientras un fragmento Fab' puede incluir residuos aminoácidos 1–236 (numeración EU) de la cadena pesada de un anticuerpo. El fragmento Fab o Fab' de una anticuerpo puede ser generado recombinantemente o mediante digestión enzimática de un anticuerpo progenitor. Fab o Fab' generados recombinantemente pueden ser manipulados para introducir aminoácidos para conjugación de sitio específico tal como cisteínas (Junutula, J. R.; et al., *Nature biotechnology* 2008, 26, 925), pirrolina–carboxi–lisinas (Ou, W. et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(26):10437–42) o aminoácidos no naturales (por ejemplo Tian, F. et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 2014, 111, 1766, Axup, J. Y. et al., *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012, 109, 16101. De modo similar, mutaciones o etiquetas péptidos se pueden agregar para facilitar conjugación a través de fosfopanteteína transferasas (Grunewald, J. et al., *Bioconjugate chemistry* 2015, 26, 2554), enzima formadora de formil glicina (Drake, P. M. et al., *Bioconjugate chemistry* 2014, 25, 1331), transglutaminasa (Strop, P. et al., *Chemistry & biology* 2013, 20, 161), sortasa (Beerli, R. R.; Hell, T.; Merkel, A. S.; Grawunder, U. *PLoS one* 2015, 10, e0131177) u otras estrategias de conjugación enzimática. Además, a pesar de que los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, son codificados mediante genes separados, pueden ser unidos, usando métodos recombinantes, mediante un ligador sintético que los posibilita a que sean hechos como una cadena de proteína simple en donde las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv cadena simple ("scFv"); ver, por ej., Bird *et al.*, *Science* 242:423–426, 1988; y Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:5879–5883, 1988). Dichos anticuerpos de cadena simple también pretenden estar abarcados dentro del término "fragmento de unión a antígeno." Estos fragmentos de unión a antígeno se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por aquellos con experiencia en el arte, y los fragmentos son seleccionados por utilidad del mismo modo que lo son los anticuerpos intactos.

[0085] Fragmentos de anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno también se pueden incorporar dentro de anticuerpos de dominio simple, maxicuerpos, minicuerpos, nanocuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v–NAR y bis–scFv (ver, por ej., Hollinger and Hudson, *Nature Biotechnology* 23:1126–1136, 2005). Fragmentos de unión a antígeno pueden ser injertados en andamios en base a polipéptidos tal como fibronectina tipo III (Fn3) (ver Patente de los Estados Unidos No. 6.703.199, que describe monocuerpos de polipéptido fibronectina).

[0086] Fragmentos de anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno también se pueden incorporar dentro de moléculas de cadena simple que comprende un par de segmentos Fv tándem (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con polipéptidos de cadena liviana complementaria, forman un par de regiones de unión a antígeno (Zapata *et al.*, Protein Eng. 8:1057-1062, 1995; y Patente de los Estados Unidos No. 5.641.870).

[0087] El término “anticuerpo monoclonal” o “composición anticuerpo monoclonal” como se usa en la presente se refiere a polipéptidos, incluyendo anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que tienen secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica o provienen de la misma fuente genética. Este término también incluye preparaciones de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal exhibe una única especificidad de unión y afinidad para un epítipo particular.

[0088] El término “anticuerpo humano”, tal como se usa en la presente, incluye anticuerpos que tienen regiones variables en donde ambas regiones la marco y CDR provienen de secuencias de origen humano. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también proviene de dichas secuencias humanas, por ej., secuencias de línea germinal humana, o versiones mutadas de secuencias de línea germinal humana o anticuerpo que contienen secuencias marco de consenso provenientes de análisis de secuencias marco humanas, por ejemplo, tal como se describe en Knappik *et al.*, J. Mol. Biol. 296:57-86, 2000.

[0089] Los anticuerpos humanos de la presente revelación pueden incluir residuos aminoácidos no codificados por secuencias humanas (por ej., mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o de sitio específico in vitro o mediante mutación somática in vivo, o una sustitución conservadora para promover estabilidad o elaboración).

[0090] El término “reconocer” tal como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno que encuentra e interactúa (por ej., se une) con su epítipo, ya sea que ese epítipo sea lineal o conformacional. El término “epítipo” se refiere a un sitio sobre un antígeno al cual un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la revelación se une específicamente. Epítopos pueden estar formados tanto por aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína. Epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos son típicamente retenidos con exposición a solventes de desnaturalización, mientras que epítopos formados por plegamiento terciario son típicamente perdidos en tratamiento con solventes de desnaturalización. Un epítipo típicamente incluye al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos en una

conformación especial única. Los métodos para determinar conformación espacial de epítopos incluyen técnicas en el arte, por ejemplo, cristalografía de rayos c y resonancia magnética nuclear de 2 dimensiones (ver, por ej., Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)). Un “parátopo” es la parte del anticuerpo que reconoce el epítipo del antígeno.

[0091] La frase “se une específicamente” o “se une selectivamente,” cuando se usa en el contexto para describir la interacción entre un antígeno (por ej., una proteína) y un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o agente de unión derivado de anticuerpo, se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia del antígeno en una población heterogénea de proteína y otros productos biológicos, por ej., en una muestra biológica, por ej., una muestra de sangre, suero, plasma o tejido. Por lo tanto, bajo ciertas condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos o agentes de unión con una especificidad de unión particular se unen a un antígeno particular al menos dos veces el antecedente y no se unen sustancialmente en una cantidad significativa a otros antígenos presentes en la muestra. En un aspecto, bajo condiciones de inmunoensayo designadas, el anticuerpo o agente de unión con una especificidad de unión particular se une a un antígeno particular al menos diez (10) veces el antecedente y no se une sustancialmente en una cantidad significativa a otros antígenos presentes en la muestra. Unión específica a un anticuerpo o agente de unión bajo dichas condiciones puede requerir que el anticuerpo o agente haya sido seleccionado por su especificidad para una proteína particular. Según se desee o resulte apropiado, esta selección puede lograrse sustrayendo anticuerpos que hacen reacción cruzada con moléculas de otras especies (por ej., ratón o rata) u otros subtipos. Alternativamente, en algunos aspectos, se seleccionan anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que hacen reacción cruzada con ciertas moléculas deseadas.

[0092] El término “afinidad” tal como se usa en la presente se refiere a la fuerza de interacción entre anticuerpo y antígeno en sitios antigénicos simples. Dentro de cada sitio antigénico, la región variable del “brazo” del anticuerpo interactúa mediante fuerzas no covalentes débiles con antígeno en numerosos sitios; cuanto más interacciones, mayor la afinidad.

[0093] El término “anticuerpo aislado” se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un antígeno puede, sin embargo, tener

reactividad cruzada con otros antígenos. Adicionalmente, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o químicos.

[0094] El término “secuencia de línea germinal humana correspondiente” se refiere a la secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de región variable humana o subsecuencias que comparte la máxima identidad de secuencia de aminoácidos determinada con una secuencia de aminoácidos de región variable de referencia o subsecuencia en comparación a todas otras conocidas secuencias de aminoácidos de región variable codificadas por secuencias de región variable de inmunoglobulina de línea germinal humana. La secuencia de línea germinal humana correspondiente también puede referirse a la secuencia de aminoácidos de región variable humana o subsecuencia con la máxima identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de región variable de referencia o subsecuencia en comparación con toda otra secuencias de aminoácidos de región variable evaluadas. La secuencia de línea germinal humana correspondiente puede ser regiones marco solamente, regiones determinantes de complementariedad solamente, regiones marco y determinantes de complementariedad, un segmento variable (tal como se definió con anterioridad), u otras combinaciones de secuencias o subsecuencias que comprenden una región variable. Identidad de secuencia puede determinarse usando los métodos descritos en la presente, por ejemplo, alineando dos secuencias usando BLAST, ALIGN, u otro algoritmo de alineación conocido en el arte. La secuencia de ácido nucleico o de aminoácido de línea germinal humana correspondiente puede tener al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico o aminoácido de región variable de referencia.

[0095] Una variedad de formatos de inmunoensayo se pueden usar para seleccionar anticuerpos específicamente inmunoreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, inmunoensayos ELISA de fase sólida son rutinariamente usados para seleccionar anticuerpos específicamente inmunoreactivos con una proteína (ver, por ej., Harlow & Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual (1998), para una descripción de formatos de inmunoensayos y condiciones que se pueden usar para determinar inmunoreactividad específica). Típicamente una reacción de unión específica o selectiva va a producir una señal al menos dos veces sobre la señal antecedente y más típicamente al menos 10 a 100 veces sobre la antecedente.

[0096] El término “equilibrio de constante de disociación (KD [M])” se refiere a la relación de constante de disociación (k_d [s^{-1}]) dividida por la relación de constante de asociación (k_a [s^{-1} , M^{-1}]). Equilibrio de constantes de disociación pueden ser medidas usando cualquier método conocido en el arte. Los anticuerpos de la presente revelación generalmente van a tener un equilibrio de constante de disociación de menos de aproximadamente 10^{-7} o 10^{-8} M, por ejemplo, menos de aproximadamente 10^{-9} M o 10^{-10} M, en algunos aspectos, menos de aproximadamente 10^{-11} M, 10^{-12} M o 10^{-13} M.

[0097] El término "biodisponibilidad" se refiera a la disponibilidad sistémica (es decir, niveles sangre/plasma) de una cantidad determinada de droga administrada a un paciente. Biodisponibilidad es un término absoluto que indica medición de tanto el tiempo (relación) y cantidad total (alcance) de droga que alcanza la circulación general a partir de una forma de dosificación administrada.

[0098] Tal como se usa en la presente, la frase “se compone esencialmente de” se refiere al género o especie de agentes farmacéuticos activos incluidos en un método o composición, así como también cualesquiera excipientes inactivos para el fin pretendido de los métodos o composiciones. En algunos aspectos, la frase “se compone esencialmente de” expresamente excluye la inclusión de uno o más agentes activos adicionales diferentes de un conjugado anticuerpo droga de la presente revelación. En algunos aspectos, la frase “se compone esencialmente de” expresamente excluye la inclusión de uno o más agentes activos adicionales diferentes de un conjugado anticuerpo droga de la presente revelación y un segundo agente co-administrado.

[0099] El término “aminoácido” se refiere a aminoácidos que se dan naturalmente, sintéticos, y no naturales, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de un modo similar a los aminoácidos que se dan naturalmente. Aminoácidos que se dan naturalmente son aquellos codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que son modificados después, por ej., hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, y O-fosfoserina. Análogos de aminoácidos se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido que se da naturalmente, es decir, un α -carbono que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, por ej., homoserina, norleucina, metionina sulfóxido, metionina metil sulfonio. Dichos análogos tienen grupos R modificados (por ej., norleucina) o cadenas principales de péptidos modificadas, pero retienen la misma estructura química básica que un aminoácido que se da naturalmente. Miméticos de aminoácido se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente

de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de un manera similar a un aminoácido que se da naturalmente.

[00100] El término “variante modificada conservadoramente” aplica tanto a secuencia de aminoácido como de ácido nucleico. Con respecto a secuencias de ácido nucleico particulares, variantes modificadas conservadoramente se refiere a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o donde el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácido, a secuencias esencialmente idénticas. Debido a su degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína determinada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU todos codifican el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición donde una alanina es especificada por un codón, el codón puede ser alterado a cualquiera de los codones correspondientes descriptos sin alterar el polipéptido codificado. Dichas variaciones de ácido nucleico son “variaciones silenciosas,” que son una especie de variaciones modificadas conservadoramente. Cada secuencia de ácido nucleico de la presente que codifica un polipéptido también describe cada variación silenciosa posible del ácido nucleico. La persona con experiencia va a reconocer que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es normalmente el único codón para metionina, y TGG, que es normalmente el único codón para triptófano) puede ser modificado para proporcionar una molécula funcionalmente idéntica. En consecuencia, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descripta.

[00101] Para secuencias de polipéptidos, “variantes modificadas conservadoramente” incluyen sustituciones individuales, deleciones o adiciones a una secuencia de polipéptido que da como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Tablas de sustitución conservadora que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidos en el arte. Dichas variantes modificadas conservadoramente son en adición a y no excluyen variantes polimórficas, homólogos interespecies, y alelos. Los siguientes ocho grupos contienen aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8) Cisteína (C), Metionina (M) (ver, por ej., Creighton, Proteins (1984)). En algunos aspectos, el término “modificaciones de secuencia conservadora” se usan para referirse a modificaciones de

aminoácidos que no afectan significativamente o alteran las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácido.

[00102] El término “optimizado” tal como se usa en la presente se refiere a una secuencia de nucleótidos que ha sido alterada para codificar una secuencia de aminoácidos usando codones que son preferidos en la producción de célula u organismo, generalmente una célula eucariótica, por ejemplo, una célula de levadura, una célula de *Pichia*, una célula fúngica, una célula de *Trichoderma*, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula humana. La secuencia de nucleótidos optimizada es diseñada para retener completamente o tanto como sea posible la secuencia de aminoácidos originalmente codificada por la secuencia de nucleótidos de partida, que también es conocida como la secuencia “parental”.

[00103] Los términos “idéntico por ciento” o “identidad por ciento,” en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o polipéptido, se refiere al alcance en que dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales. Dos secuencias son “idénticas” si tienen la misma secuencia de aminoácidos o nucleótidos sobre la región que está siendo comparada. Dos secuencias son “sustancialmente idénticas” si dos secuencias tienen un porcentaje especificado de residuos aminoácidos o nucleótidos que son iguales (es decir, 60% de identidad, opcionalmente 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 99% de identidad sobre una región especificada, o, cuando no está especificada, sobre la secuencia completa), al comparar y alinear para correspondencia máxima sobre una ventana de comparación, o región designada según se mida usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante alineación manual e inspección visual. Opcionalmente, la identidad existe sobre una región que es al menos aproximadamente 30 nucleótidos (o 10 aminoácidos) de longitud, o más preferentemente sobre una región que es 100 a 500 o 1000 o más nucleótidos (o 20, 50, 200 o más aminoácidos) de longitud.

[00104] Para comparación de secuencia, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, al que secuencias de prueba son comparadas. Al usar un algoritmo de comparación de secuencia, secuencias de prueba y referencia son ingresadas en una computadora, se designan coordenadas subsecuencia, de ser necesario, y parámetros de programa de algoritmo de secuencia se designan. Parámetros de programa predeterminados se pueden usar, o parámetros alternativos pueden ser diseñados. El algoritmo de comparación de secuencia luego calcula las identidades de secuencia por ciento para las secuencias de prueba en relación con la secuencia de referencia, en base a los parámetros del programa.

[00105] Una “ventana de comparación”, tal como se usa en la presente, incluye referencia a un segmento de cualquiera del número de posiciones contiguas seleccionadas entre el grupo compuesto por desde 20 hasta 600, generalmente aproximadamente 50 hasta aproximadamente 200, más generalmente aproximadamente 100 hasta aproximadamente 150 en donde una secuencia puede ser comparada con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias están óptimamente alineadas. Métodos de alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en el arte. Alineación óptima de secuencias para comparación pueden ser realizados, por ej., mediante el algoritmo de homología local de Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482c (1970), mediante el algoritmo de alineación por homología de Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), mediante la búsqueda de por el método de similitud de Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineación manual e inspección visual (ver, por ej., Brent *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, 2003).

[00106] Dos ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar identidad de secuencia por ciento y similitud de secuencia con los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 25:3389–3402, 1977; y Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403–410, 1990, respectivamente. Software para realizar análisis BLAST se encuentra disponible públicamente a través de la National Center for Biotechnology Information. Este algoritmo implica primero identificar pares de secuencia de alto puntaje (HSPs) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, ya sea con coincidencia o que cumpla algunos puntajes T umbral de valor positivo al alinearse con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se refiere a como el umbral de puntaje de palabra vecina (Altschul *et al.*, *supra*). Estos aciertos de palabra vecina inicial actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSPs más largos que las contengan. Los aciertos de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta donde el puntaje de alineación acumulativo puede ser aumentado. Puntajes acumulativos se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntaje de recompensa para un par de residuos concordantes; siempre > 0) y N (puntaje de penalidad para residuos que no emparejan; siempre < 0). Para secuencias de aminoácidos, una matriz de puntuación se usa para calcular el puntaje acumulativo. Extensión de las coincidencias de

palabras en cada dirección se detienen cuando: el puntaje de alineación acumulativa desciende por la cantidad X de su valor máximo logrado; el puntaje acumulativo va a cero o debajo, debido a la acumulación de una o más alineaciones residuo de puntaje negativo; o el extremo de cualquier secuencia es alcanzado. Los parámetros W, T, y X de algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa como predeterminados una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas hebras. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa como predeterminados una longitud de palabra de 3, y expectativa (E) de 10, y la matriz de puntaje BLOSUM62 (ver Henikoff and Henikoff, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4, y una comparación de ambas hebras.

[00107] El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (ver, por ej., Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787, 1993). Una medida de similitud provista por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual una concordancia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos podrían darse por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico es considerado similar a una secuencia de referencia si la suma de probabilidad más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es menor de aproximadamente 0,2, más preferentemente menos de aproximadamente 0,01, y con máxima preferencia menos de aproximadamente 0,001.

[00108] La identidad por ciento entre dos secuencias de aminoácidos también puede ser determinada usando el algoritmo de E. Meyers and W. Miller, Comput. Appl. Biosci. 4:11-17, (1988) que ha sido incorporada dentro del programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de residuo de peso PAM120, un error de longitud de brecha de 12 y un error de brecha de 4. Además, la identidad por ciento entre dos secuencias de aminoácidos puede ser determinada usando el algoritmo de Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:444-453, (1970) que ha sido incorporado dentro del programa GAP en el paquete software GCG (disponible en www.gcg.com), usando ya sea una matriz Blossom 62 o una matriz PAM250, y un peso de brecha de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6.

[00109] Además del porcentaje de identidad de secuencia observado anteriormente, otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico o polipéptidos son sustancialmente idénticas es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico es inmunológicamente

de reacción cruzada con los anticuerpos contruidos contra el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, tal como se describe debajo. Por lo tanto, un polipéptido es típicamente sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren solamente por sustituciones conservadoras. Otra indicación que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas o sus complementos hibridan entre sí bajo condiciones de rigurosidad, tal como se describe debajo. Incluso otra indicación que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que los mismos cebadores pueden ser usados para amplificar la secuencia.

[00110] El término “ácido nucleico” se usa en la presente de forma intercambiable con el término “polinucleótido” y se refiere a desoxiribonucleótidos o ribonucleótidos y sus polímeros ya sea en forma de hebra simple o doble. El término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos nucleótidos conocidos o residuos de cadena principal modificados o enlaces, que son sintéticos, que se dan naturalmente, y que no se dan naturalmente, que tienen similares propiedades de unión que el ácido nucleico de referencia, y que son metabolizados de un modo similar a los nucleótidos de referencia. Ejemplos de dichos análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, metil fosfonatos, quiral–metil fosfonatos, 2–O–metil ribonucleótidos, péptido–ácidos nucleicos (PNAs).

[00111] A menos que se indique de otro modo, una secuencia de ácido nucleico particular también implícitamente abarca sus variantes modificadas conservadoramente (por ej., sustituciones de codón degenerado) y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. Específicamente, como se detalla debajo, sustituciones de codón degenerado pueden lograrse generando secuencias en donde la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye con residuos de base mezclada y/o desoxiinosina (Batzer *et al.*, (1991) *Nucleic Acid Res.* 19:5081; Ohtsuka *et al.*, (1985) *J. Biol. Chem.* 260:2605–2608; and Rossolini *et al.*, (1994) *Mol. Cell. Probes* 8:91–98).

[00112] El término “unido operativamente” en el contexto de ácidos de ácidos nucleicos se refiere a una relación funcional entre dos o más segmentos de polinucleótidos (por ej., DNA). Normalmente, se refiere a la relación funcional de una secuencia reguladora transcripcional a una secuencia transcripta. Por ejemplo, una secuencia promotora o intensificadora está operativamente unida a una secuencia de codificación si estimula o modula la transcripción de la secuencia de codificación en una célula huésped apropiada u otro sistema de expresión. Generalmente, secuencias reguladoras transcripcionales promotoras que están operativamente unidas a una secuencia transcripta son físicamente

contiguas a la secuencia transcrita, es decir, son de actuación cis. Sin embargo, algunas secuencias reguladoras transcripcionales, tal como intensificadores, precisan no ser físicamente contiguos o ubicados en proximidad cercana a las secuencias de codificación cuya transcripción mejoran.

[00113] Los términos “polipéptido” y “proteína” se usan de forma intercambiable en la presente para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos aplican a polímeros de aminoácidos en donde uno o más residuos aminoácidos es un mimético químico artificial de un aminoácido que se da naturalmente correspondiente, así como también a polímeros de aminoácidos que se dan naturalmente y polímeros de aminoácidos que no se dan naturalmente. A menos que se indique de otro modo, una secuencia de polipéptidos particular también implícitamente abarca sus variantes modificadas conservadoramente.

[00114] El término “conjugado” o “conjugado anticuerpo droga” tal como se usa en la presente se refiere a la unión de un anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno con otro agente, tal como un agente quimioterapéutico, una toxina, un agente inmunoterapéutico, una sonda de imagen, y similares. La unión puede ser uniones covalentes, o interacciones no covalentes tal como a través de fuerzas electrostáticas. Varios ligadores, conocidos en el arte, pueden ser utilizados a fin de formar el conjugado. Adicionalmente, el conjugado puede ser provisto en la forma de una proteína de fusión que puede ser expresada a partir de un polinucleótido que codifica el conjugado. Tal como se usa en la presente, “proteína de fusión” se refiere a proteínas creadas a través de la unificación de dos o más genes o fragmentos de gen que originalmente codificaban proteínas separadas (incluyendo péptidos y polipéptidos). La traducción del gen de fusión da como resultado una única proteína con propiedades funcionales que provienen de cada una de las proteínas originales.

[00115] El término “sujeto” incluye humanos y animales no humanos. Animales no humanos incluye todos los vertebrados, por ej., mamíferos y no mamíferos, tal como primates no humanos, ovejas, perro, vaca, gallinas, anfibios, y reptiles. Excepto cuando se observe, los términos “paciente” o “sujeto” se usan en la presente de forma intercambiable.

[00116] El término “toxina”, “citotoxina” o “agente citotóxico” tal como se usa en la presente, se refiere a cualquier agente que es perjudicial para el crecimiento y proliferación de células y puede actuar para reducir, inhibir, o destruir una célula o afección.

[00117] El término “agente anticancerígeno” tal como se usa en la presente se refiere a cualquier agente que se puede usar para tratar un trastorno proliferativo celular tal como cáncer, incluyendo aunque sin limitación a, agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos,

agentes de radioterapia y radioterapéuticos, agentes anticancerígenos objetivo, y agentes inmunoterapéuticos.

[00118] El término “resto droga” o “carga efectiva” tal como se usa en la presente se refiere a un resto químico que es conjugado con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, y puede incluir cualquier agente terapéutico o diagnóstico, por ejemplo, un agente anticancerígeno, anti-inflamatorio, anti-infeccioso (por ej., anti-fúngico, antibacteriano, anti-parasítico, anti-viral), o un agente anestésico. En ciertos aspectos, un resto droga se selecciona entre un inhibidor Eg5, un inhibidor V-ATPase, un inhibidor HSP90, un inhibidor IAP, un inhibidor mTor, un estabilizador de microtúbulo, un desestabilizador de microtúbulo, una auristatina, una dolastatina, un maitansinoide, una MetAP (metionina aminopeptidasa), un inhibidor de exportación nuclear de proteínas CRM1, un inhibidor DPPIV, un inhibidor de reacciones de transferencia fosforilo en mitocondria, un inhibidor de síntesis de proteína, un inhibidor quinasa, un inhibidor CDK2, un inhibidor CDK9, un inhibidor proteasoma, un inhibidor quinesina, un inhibidor HDAC, un agente que produce daño al ADN, un agente alquilante de ADN, un intercalador de ADN, un ligando de unión al surco menor de ADN, un inhibidor de ARN polimerasa, una amanitina, un inhibidor espliceosoma, un inhibidor de topoisomerasa y un inhibidor DHFR. Métodos para adherir cada uno de estos a un ligador compatible con los anticuerpos y método de la presente revelación son conocidos en el arte. Ver, por ej., Singh et al., (2009) *Therapeutic Antibodies: Methods and Protocols*, vol. 525, 445–457. Además, una carga efectiva puede ser una sonda biofísica, un fluoróforo, un marcador de espín, una sonda infrarroja, una sonda de afinidad, un quelante, una sonda espectroscópica, una sonda radioactiva, una molécula de lípidos, un polietilenglicol, un polímero, un marcador de espín, ADN, ARN, una proteína, un péptido, una superficie, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una nanopartícula, un punto cuántico, un liposoma, una partícula PLGA, un sacárido o un polisacárido.

[00119] El término “cáncer” incluye tumores malignos primarios (por ej., aquellos cuyas células no han migrado a sitios en el cuerpo del sujeto además del sitio del tumor original) y tumores malignos secundarios (por ej., aquellos que surgen de metástasis, la migración de células de tumor a sitios secundarios que son diferentes del sitio del tumor original).

[00120] El término “cKIT” (también conocido como KIT, PBT, SCFR, C-Kit, CD117) se refiere a un receptor tirosina quinasa que es un miembro del receptor de familia tirosina quinasa III. El ácido nucleico y secuencias de aminoácidos de isoformas cKIT humano son conocidos, y han sido publicados en GenBank con los siguientes Nros. de Acceso:

NM_000222.2 → NP_000213.1 factor crecimiento mastocitos receptor Kit isoforma 1 precursor;
 NM_001093772.1 → NP_001087241.1 factor crecimiento mastocitos receptor Kit isoforma 2 precursor.

Estructuralmente, receptor cKIT es una proteína de transmembrana tipo I y contiene un péptido señal, 5 dominios C2 tipo Ig en el dominio extracelular y tiene un dominio de proteína quinasa en su dominio intracelular. Tal como se usa en la presente, el término “cKIT” se usa para referirse colectivamente a todas las isoformas que se dan naturalmente de proteína cKIT, o una de su variante.

[00121] El término “variante” se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica con un polipéptido de referencia, o está codificada por una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica, y es capaz de tener una o más actividades del polipéptido de referencia. Por ejemplo, una variante puede tener aproximadamente 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o mayor identidad de secuencia con un polipéptido de referencia., mientras que retiene una o más actividades del polipéptido de referencia.

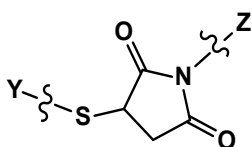
[00122] Tal como se usa en la presente, los términos “tratar”, “tratando”, o “tratamiento” de cualquier enfermedad o trastorno se refiere en un aspecto, a mejorar la enfermedad o trastorno (es decir, desacelerando o deteniendo o reduciendo el desarrollo de la enfermedad o al menos uno de sus síntomas clínicos). En otro aspecto, “tratar”, “tratando”, o “tratamiento” se refiere a aliviar o mejorar al menos un parámetro físico incluyendo aquellos que pueden no ser perceptible por el paciente. Incluso en otro aspecto, “tratar”, “tratando”, o “tratamiento” se refiere a modular la enfermedad o trastorno, ya sea físicamente, (por ej., estabilización de un síntoma perceptible), fisiológicamente, (por ej., estabilización de un parámetro físico), o ambas. Incluso en otro aspecto, “tratar”, “tratando”, o “tratamiento” se refiere a prevenir o atrasar el inicio o desarrollo o progresión de la enfermedad o trastorno.

[00123] El término “cantidad terapéuticamente aceptable” o “dosis terapéuticamente efectiva” de forma intercambiable se refiere a una cantidad suficiente para lograr el resultado deseado (es decir, una reducción en tamaño del tumor, inhibición de crecimiento del tumor, prevención de metástasis, inhibición o prevención de infección viral, bacteriana, fúngica o parasítica). En algunos aspectos, una cantidad terapéuticamente aceptable no induce o provoca efectos secundarios no deseados. Una cantidad terapéuticamente aceptable puede ser determinada primero administrando una dosis baja, y luego aumentando de modo gradual

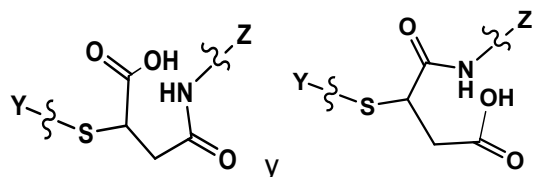
esa dosis hasta que el efecto deseado es logrado. Una “dosificación terapéuticamente efectiva,” de las moléculas de la presente revelación puede prevenir el inicio de, o dar como resultado una disminución en la gravedad de, respectivamente, síntomas de enfermedad, incluyendo síntomas asociados con cáncer.

[00124] El término “co-administrar” se refiere a la presencia simultánea de dos agentes activos en la sangre de un individuo. Agentes activos que son co-administrados pueden ser administrados en forma conjunta o secuencialmente.

[00125] El término ‘tiol–maleimida’ tal como se usa en la presente se refiere a un grupo formado por reacción de un tiol con maleimida, que tiene esta fórmula general:



donde Y y Z son grupos a ser conectados mediante la unión tiol–maleimida y pueden comprender componentes de unión, anticuerpos o cargas efectivas. El tiol–maleimida puede



formar las siguiente estructuras de anillo abierto

[00126] “Escindible” tal como se usa en la presente se refiere a un grupo de enlace o componente de unión que conecta dos restos mediante conexiones covalentes, pero se rompe al para dividir la conexión covalente entre los restos bajo condiciones fisiológicamente relevantes, normalmente un grupo de unión escindible es dividido in vivo más rápidamente en un entorno intracelular que cuando está fuera de una célula, produciendo liberación de la carga efectiva para darse preferencialmente dentro de una célula designada como objetivo. Escisión puede ser puede ser enzimática o no enzimática, pero generalmente libera una carga efectiva de un anticuerpo sin degradar el anticuerpo. Escisión puede dejar algunas porciones de un grupo de enlace o componente de unión adherido a la carga efectiva, o puede liberar la carga efectiva sin ningún residuo del grupo de enlace.

[00127] “No escindible” tal como se usa en la presente se refiere a un grupo de enlace o componente de unión que no es especialmente susceptible a romperse bajo condiciones fisiológicas, por ej., es al menos tan estable como el anticuerpo o porción de fragmento de

unión a antígeno del conjugado. Dichos grupos de enlace son algunas veces denominados como 'estables', lo que significa que son suficientemente resistentes a degradación para mantener la carga efectiva conectada a anticuerpo o fragmento de unión a antígeno hasta que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno sea por sí al menos parcialmente degradado, es decir, la degradación del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno procede a escisión del grupo de enlace in vivo. Degradación de la porción anticuerpo de un ADC que tiene in grupo de enlace estable o no escindible puede dejar parte o todo el grupo de enlace, por ej., uno o más grupos aminoácidos de un anticuerpo, adheridos a la carga efectiva o resto droga que se administra in vivo.

Ligador–Resto Droga ($L_B-(D)_n$)

[00128] En un aspecto, el Ligador–resto Droga de la invención comprende una o más citotoxinas adheridas covalentemente a un ligador (L_B), donde la o las citotoxinas son independientemente seleccionadas entre una auristatina, una amanitina, un maitansinoide y una saporina.

[00129] En otro aspecto, el Ligador–resto Droga de la invención comprende una o más citotoxinas adheridas covalentemente a un ligador (L_B), donde la o las citotoxinas son independientemente seleccionadas entre una auristatina y una amanitina.

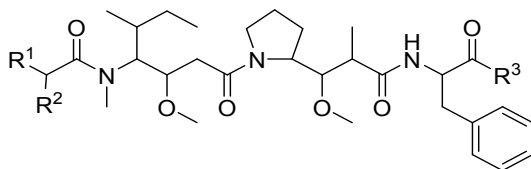
[00130] En un aspecto, el Ligador–resto Droga de la invención comprende una o más citotoxinas adheridas covalentemente a un ligador (L_B), donde el ligador (L_B) es un ligador escindible y la o las citotoxinas son independientemente seleccionadas entre una auristatina, una amanitina, un maitansinoide y una saporina.

[00131] En otro aspecto, el Ligador–resto Droga de la invención comprende una o más citotoxinas adheridas covalentemente a un ligador (L_B), donde el ligador (L_B) es un ligador escindible y la o las citotoxinas son independientemente seleccionadas entre una auristatina y una amanitina.

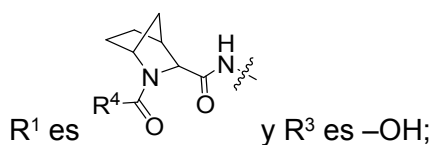
[00132] En un aspecto, el Ligador–resto Droga de la invención comprende una o más citotoxinas adheridas covalentemente a un ligador (L_B), donde el ligador (L_B) es un ligador no–escindible y la o las citotoxinas son independientemente seleccionadas entre una auristatina, una amanitina, un maitansinoide y una saporina.

[00133] En otro aspecto, el resto Droga (D) es una toxina proteína seleccionada entre saporina, proteína antiviral de la hierba carmín [pokeweed] (PAP), briodina 1, bouganina,

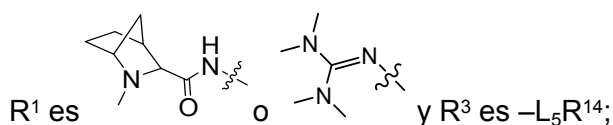
[00135] En un aspecto el Ligador-resto Droga de la invención es un compuesto que tiene la estructura de Fórmula (A), o estereoisómeros o sales farmacéuticamente aceptables del mismo.



donde:



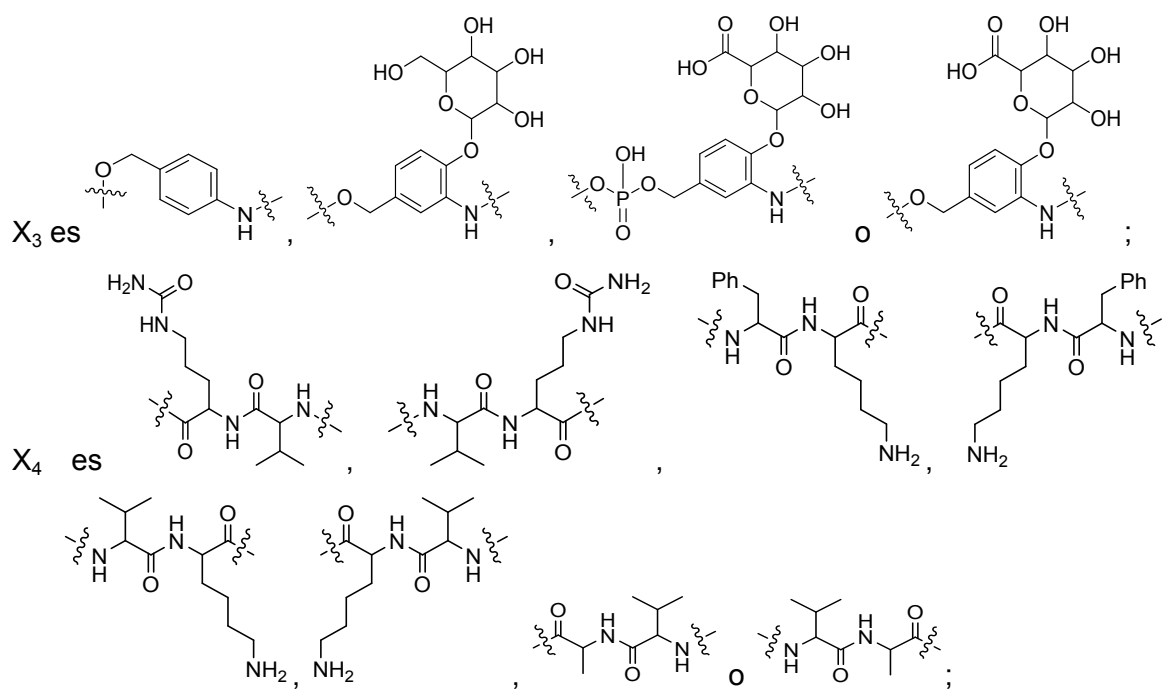
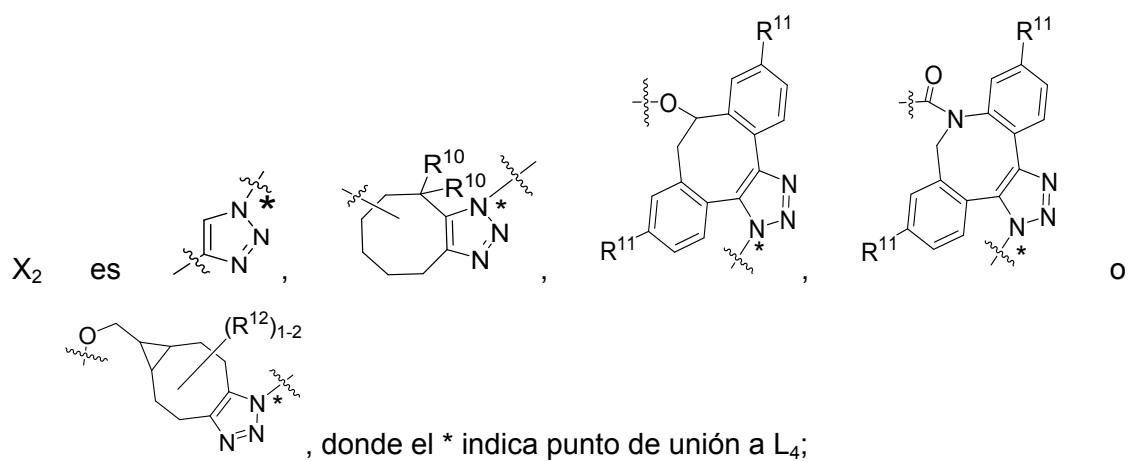
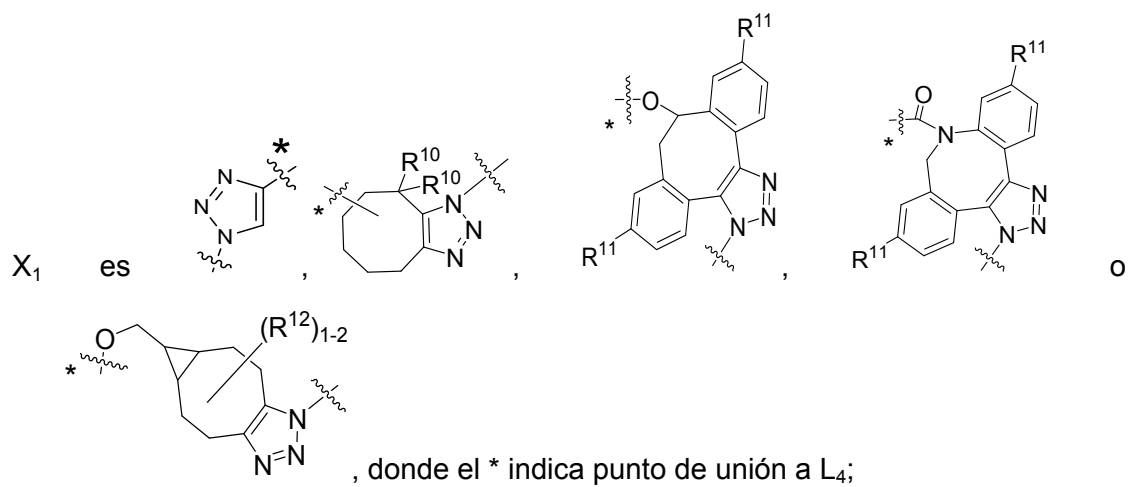
O

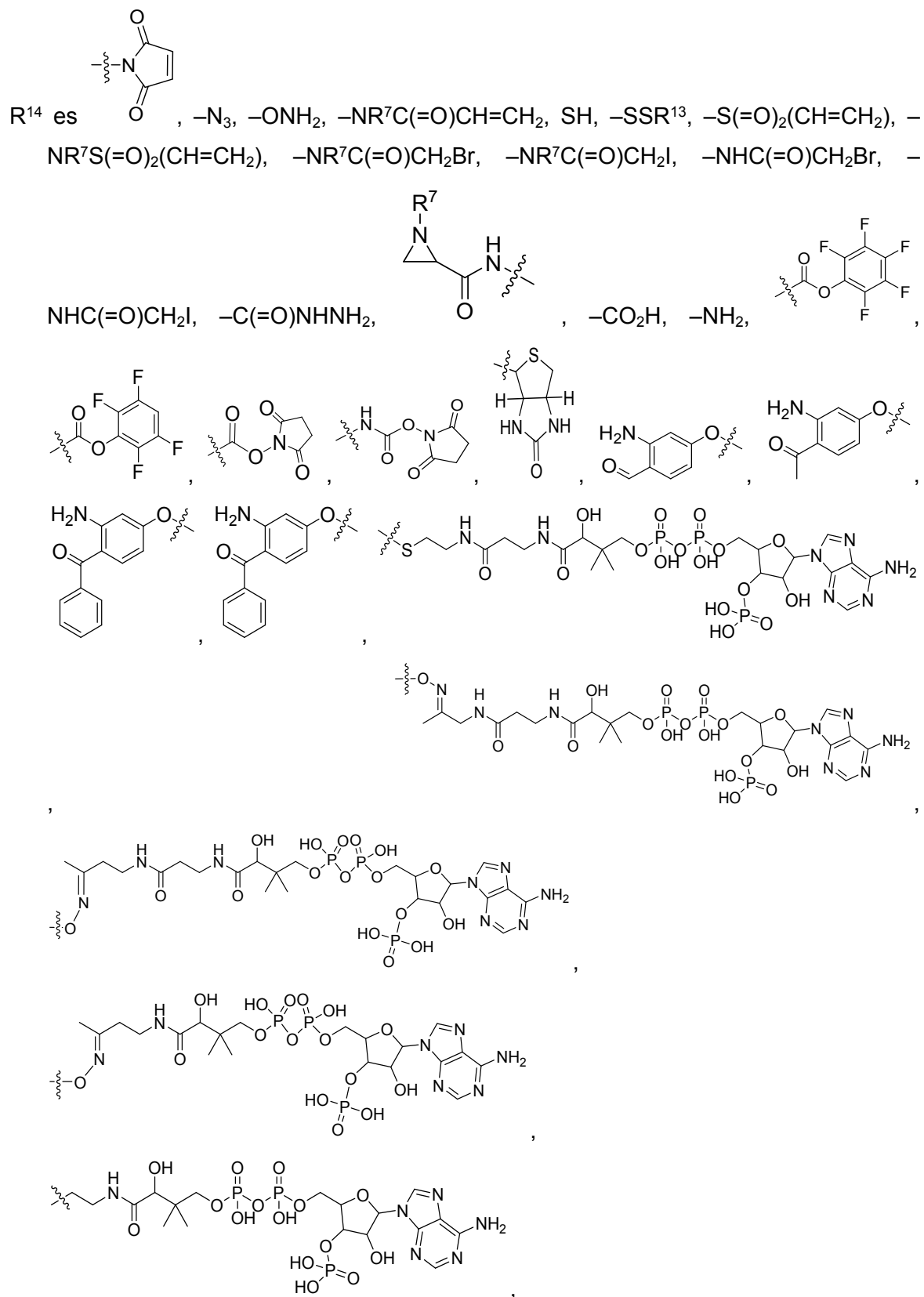


R² es alquilo C₁–C₆:

$$R^4 \text{ es } -L_1 R^{14}, -L_2 R^{24}, -L_2 R^{34} \text{ o } -L_3 R^{44}.$$
$$\begin{array}{llll} \text{L}_1 & \text{es} & -((\text{CH}_2)_m\text{O})_p(\text{CH}_2)_m\text{X}_1\text{L}_4-, & -((\text{CH}_2)_m\text{O})_p(\text{CH}_2)_m\text{X}_2\text{L}_4-, & -((\text{CH}_2)_m\text{O})_p(\text{CH}_2)_m-, & - \\ & & (\text{CH}_2)_m-, & -(\text{CH}_2)_m\text{X}_1(\text{CH}_2)_m-, & -(\text{CH}_2)_m\text{NHC(=O)}(\text{CH}_2)_m-, & - \\ & & (\text{CH}_2)_m\text{NHC(=O)}(\text{CH}_2)_m\text{C(=O)NH}(\text{CH}_2)_m-, & -((\text{CH}_2)_m\text{O})_p(\text{CH}_2)_m\text{NHC(=O)}(\text{CH}_2)_m-, & - \end{array}$$








$$\text{R}^{34} \text{ es, } -\text{N}_3, -\text{ONH}_2, -\text{NR}^7\text{C(=O)CH=CH}_2, -\text{C(=O)NHNH}_2, -\text{CO}_2\text{H}, -\text{NH}_2,$$


cada R⁷ se selecciona independientemente entre H y alquilo C₁-C₆;

$$R^8 \text{ es } -S(CH_2)_nCHR^9NH_2;$$
$$R^9 \text{ es } -C(=O)OR^7;$$

cada R¹⁰ se selecciona independientemente entre H, alquilo C₁–C₆, F, Cl, y–OH;

cada R¹¹ se selecciona independientemente entre H, alquilo C₁–C₆, F, Cl, –NH₂, –

OCH₃, -OCH₂CH₃, -N(CH₃)₂, -CN, -NO₂ y -OH;

donde:

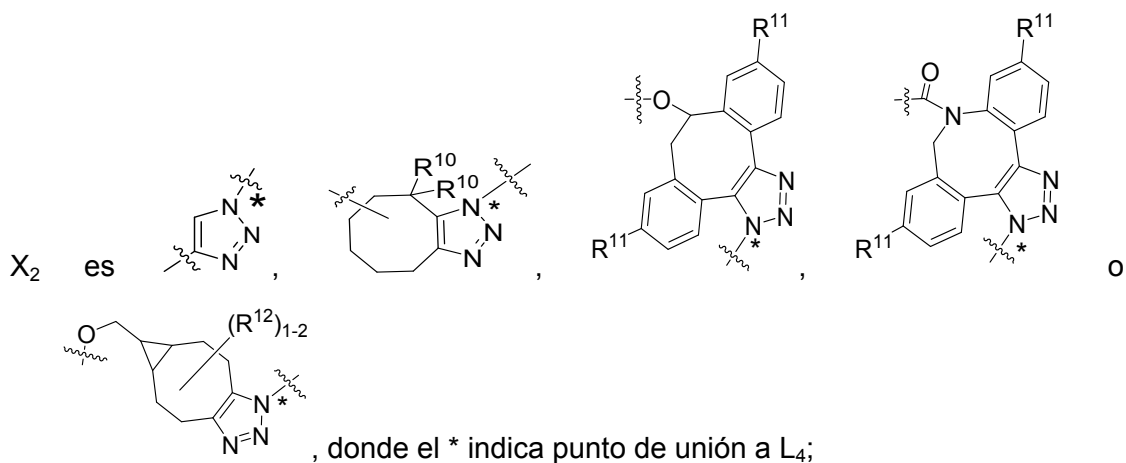
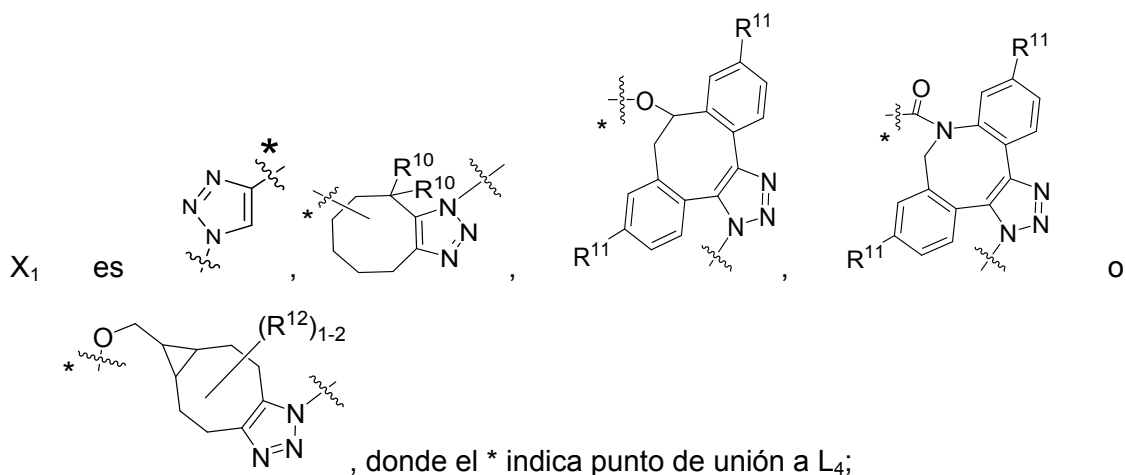
R⁶ es -NH₂ o -OH;

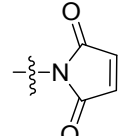
$$\begin{aligned} \text{L}_7 \text{ es } & -((\text{CH}_2)_m\text{O})_p(\text{CH}_2)_{m-}, -(\text{CH}_2)_m\text{X}_1(\text{CH}_2)_{m-}, -\text{L}_4\text{NHC(=O)NH}((\text{CH}_2)_m\text{O})_p(\text{CH}_2)_{m-}, - \\ & \text{L}_4\text{NHC(=O)NH}((\text{CH}_2)_m\text{O})_p(\text{CH}_2)_{m-}, -(\text{CH}_2)_m\text{NHC(=O)(CH}_2)_{m-}, - \end{aligned}$$

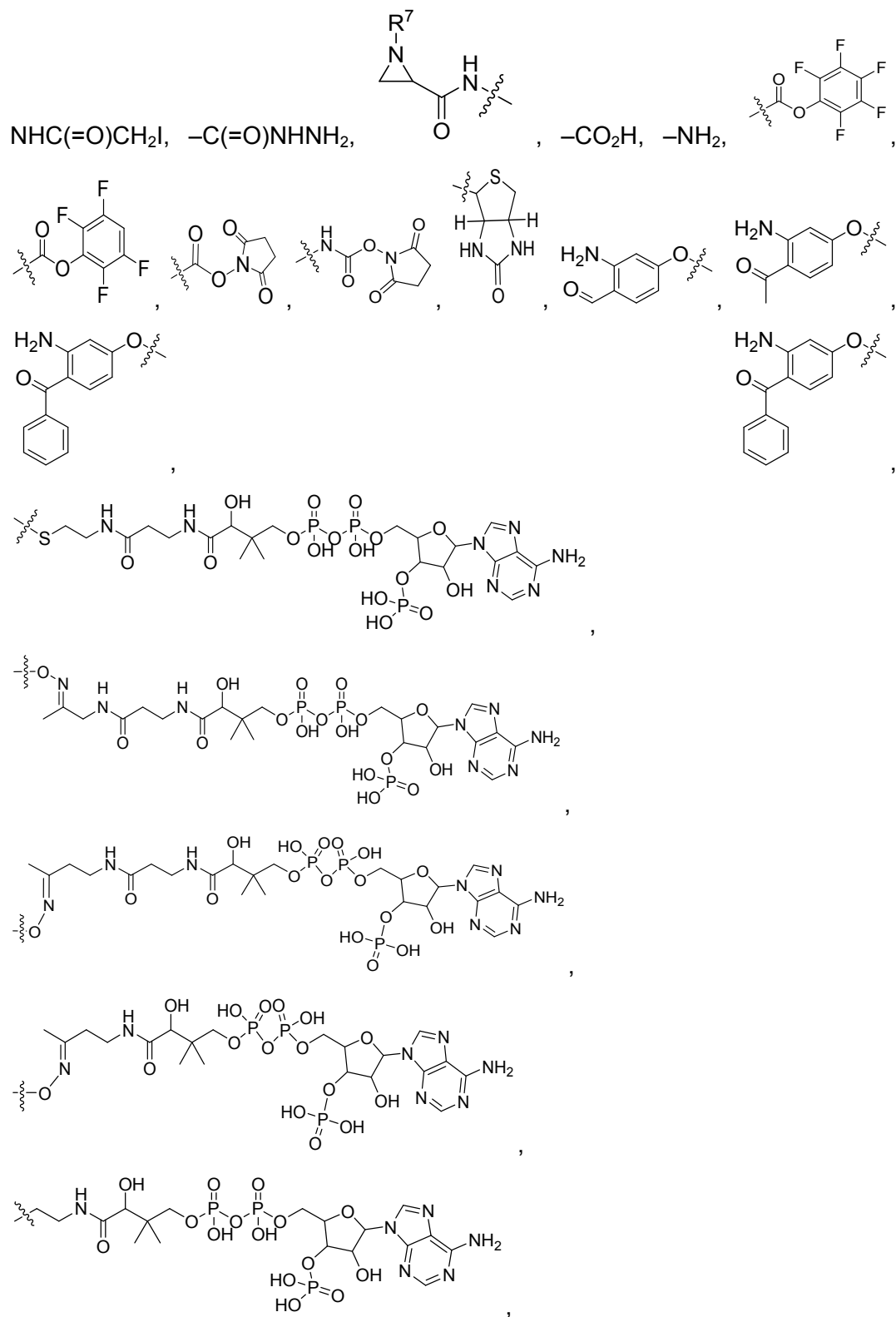
$(\text{CH}_2)_m\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_m-$, $-(\text{CH}_2)_m\text{O})_p(\text{CH}_2)_m\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m-$, $-$
 $((\text{CH}_2)_m\text{O})_p(\text{CH}_2)_m\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_m-$, $-(\text{CH}_2)_m\text{C}(\text{R}_7)_2-$, o $-$
 $(\text{CH}_2)_m\text{C}(\text{R}_7)_2\text{SS}(\text{CH}_2)_m\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m-$;

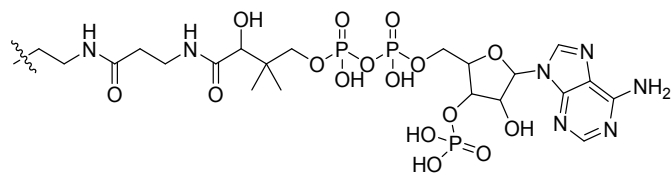
L_8 es $-(\text{CH}_2)_m\text{O})_p(\text{CH}_2)_m\text{X}_1\text{L}_4-$, $-(\text{CH}_2)_m\text{O})_p(\text{CH}_2)_m\text{X}_2\text{L}_4-$, $-$
 $\text{L}_4\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}((\text{CH}_2)_m\text{O})_p(\text{CH}_2)_m\text{X}_1\text{L}_4-$, $-\text{L}_4\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}((\text{CH}_2)_m\text{O})_p(\text{CH}_2)_m\text{X}_2\text{L}_4-$, $-$
 $((\text{CH}_2)_m\text{O})_p(\text{CH}_2)_m-$, $-(\text{CH}_2)_m-$, $-(\text{CH}_2)_m\text{X}_1(\text{CH}_2)_m-$, $-(\text{CH}_2)_m\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m-$, $-$
 $(\text{CH}_2)_m\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_m-$, $-(\text{CH}_2)_m\text{O})_p(\text{CH}_2)_m\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m-$, $-$
 $((\text{CH}_2)_m\text{O})_p(\text{CH}_2)_m\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_m-$, $-(\text{CH}_2)_m\text{C}(\text{R}_7)_2-$ o $-$
 $(\text{CH}_2)_m\text{C}(\text{R}_7)_2\text{SS}(\text{CH}_2)_m\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m-$;

L_4 es $-(\text{CH}_2)_m-$;

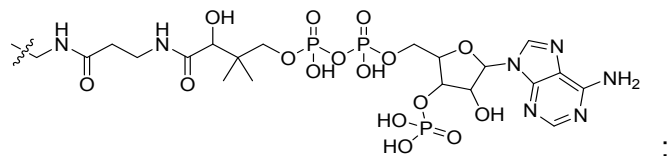


R^{14} es , $-\text{N}_3$, $-\text{ONH}_2$, $-\text{NR}^7\text{C}(=\text{O})\text{CH}=\text{CH}_2$, SH , $-\text{SSR}^{13}$, $-\text{S}(=\text{O})_2(\text{CH}=\text{CH}_2)$, $-$
 $\text{NR}^7\text{S}(=\text{O})_2(\text{CH}=\text{CH}_2)$, $-\text{NR}^7\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$, $-\text{NR}^7\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{I}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$, $-$

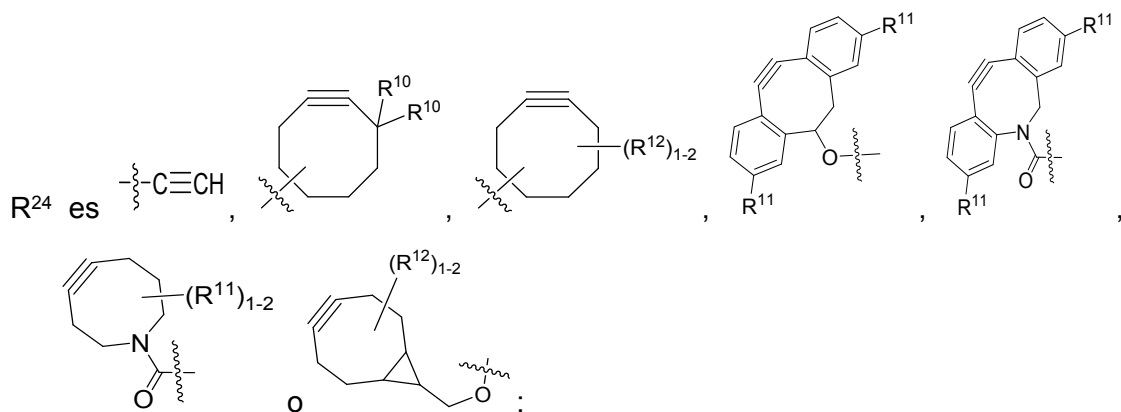




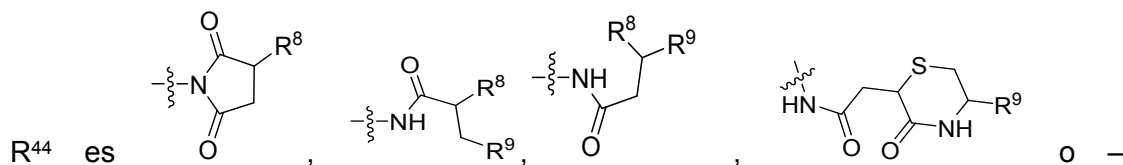
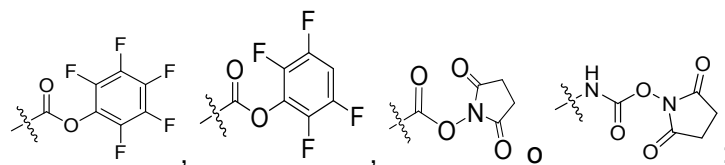
O



;



R^{34} es, $-\text{N}_3$, $-\text{ONH}_2$, $-\text{NR}^7\text{C}(=\text{O})\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NHNH}_2$, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{NH}_2$,



$\text{NR}^7\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{R}^8$;

cada R^7 se selecciona independientemente entre H y alquilo $\text{C}_1\text{--C}_6$;

R^8 es $-\text{S}(\text{CH}_2)_n\text{CHR}^9\text{NH}_2$;

R^9 es $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}^7$;

cada R^{10} se selecciona independientemente entre H, alquilo $\text{C}_1\text{--C}_6$, F, Cl, y $-\text{OH}$;

cada R^{11} se selecciona independientemente entre H, alquilo $\text{C}_1\text{--C}_6$, F, Cl, $-\text{NH}_2$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CN}$, $-\text{NO}_2$ y $-\text{OH}$;

cada R^{12} se selecciona independientemente entre H, alquilo C_{1-6} , flúor, benciloxi sustituido con $-C(=O)OH$, bencilo sustituido con $-C(=O)OH$, alcoxi C_{1-4} sustituido con $-C(=O)OH$ y alquilo C_{1-4} sustituido con $-C(=O)OH$;

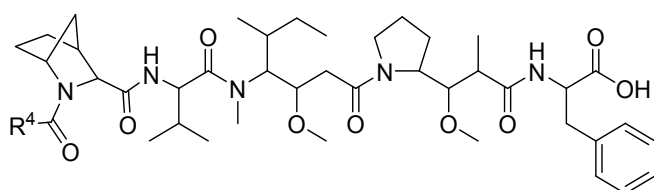
R^{13} es 2-piridilo o 4-piridilo;

cada m se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, y

cada p se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14.

[00137] Ciertos aspectos y ejemplos del Ligador-resto Droga de la invención se proporcionan en el siguiente listado de realizaciones enumeradas adicionales. Se reconocerá que características especificadas en cada realización puede ser combinada con otras características especificadas para proporcionar realizaciones adicionales de la presente invención.

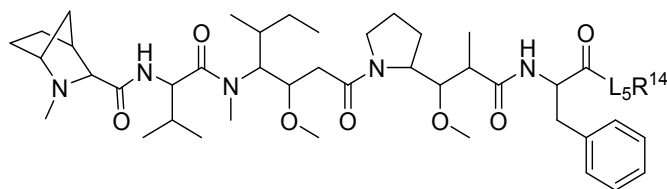
[00138] Realización 1. El compuesto de Fórmula (A), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que tiene la estructura de Fórmula (A-1), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



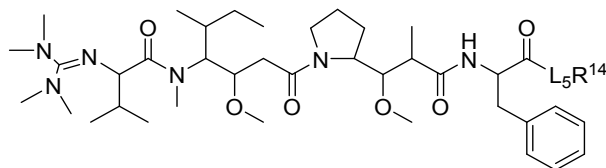
Fórmula (A-1)

donde: R^4 es como se definió con anterioridad.

[00139] Realización 2. El compuesto de Fórmula (A), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que tiene la estructura de Fórmula (A-2) o Fórmula (A-3), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



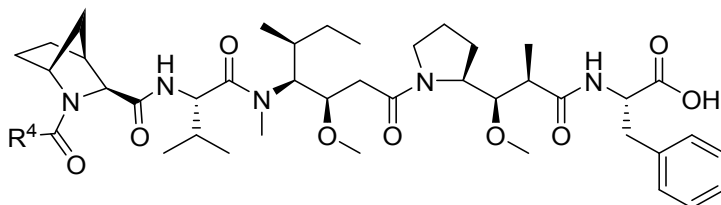
Fórmula (A-2)



Fórmula (A-3)

donde: L_5 y R^{14} con como se definió con anterioridad.

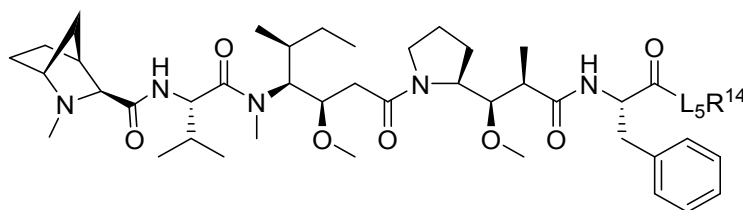
[00140] Realización 3. El compuesto de Fórmula (A), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que tiene la estructura de Fórmula (A-1a), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



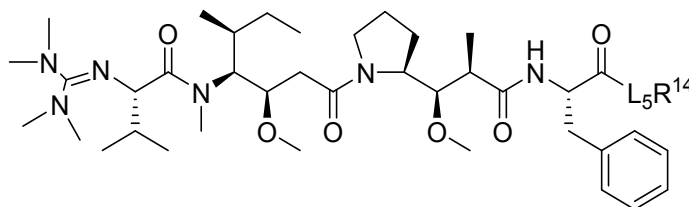
Fórmula (A-1a)

donde: R^4 es como se definió con anterioridad.

[00141] Realización 4. El compuesto de Fórmula (A), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que tiene la estructura de Fórmula (A-2a) o Fórmula (A-3a), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



Fórmula (A-2a)



Fórmula (A-3a)

donde: L_5 y R^{14} con como se definió con anterioridad.

[00142] Realización 5. El compuesto de Fórmula (A), Fórmula (A-1) o Fórmula (A-1a), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

donde:

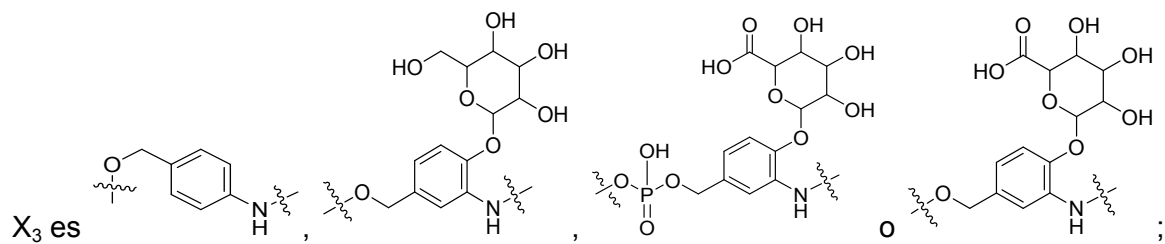
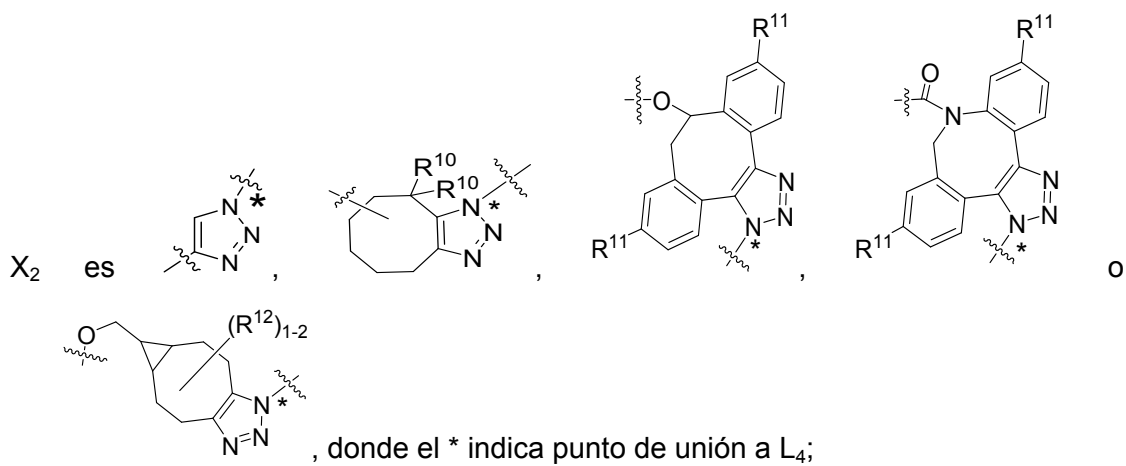
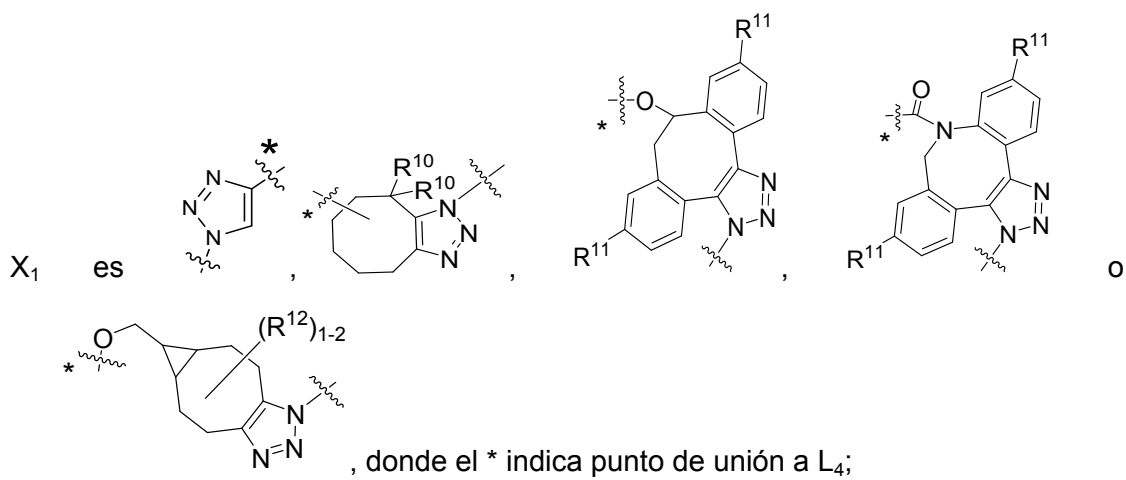
R^4 es $-L_1R^{14}$, $-L_2R^{24}$, $-L_2R^{34}$ o $-L_3R^{44}$;

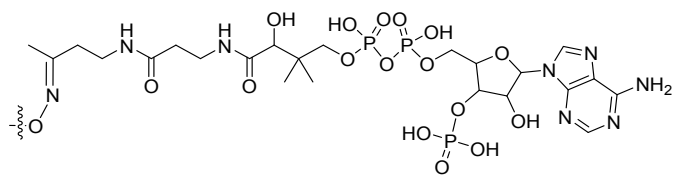
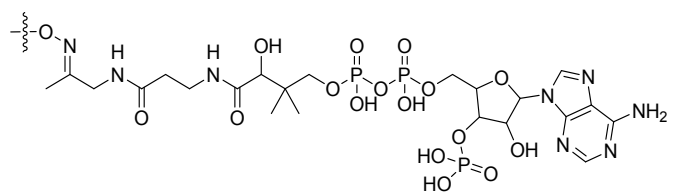
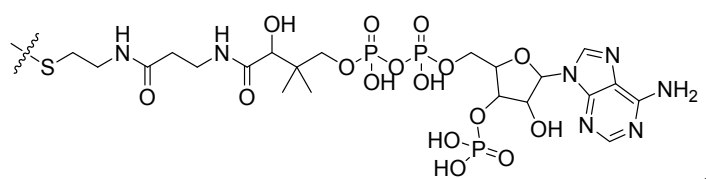
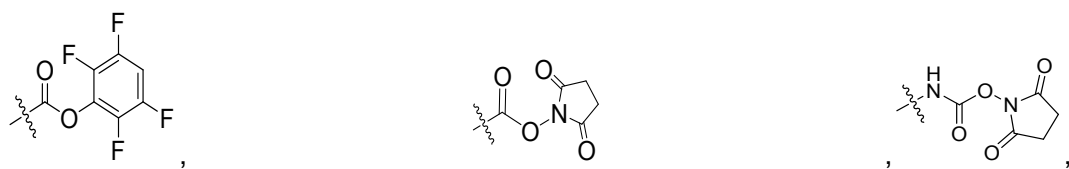
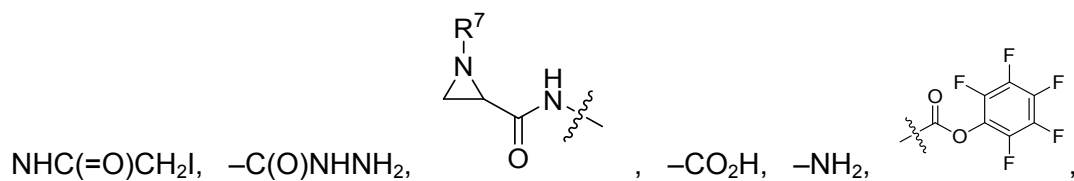
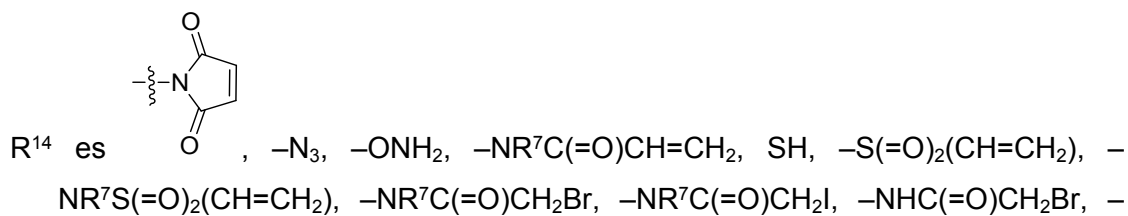
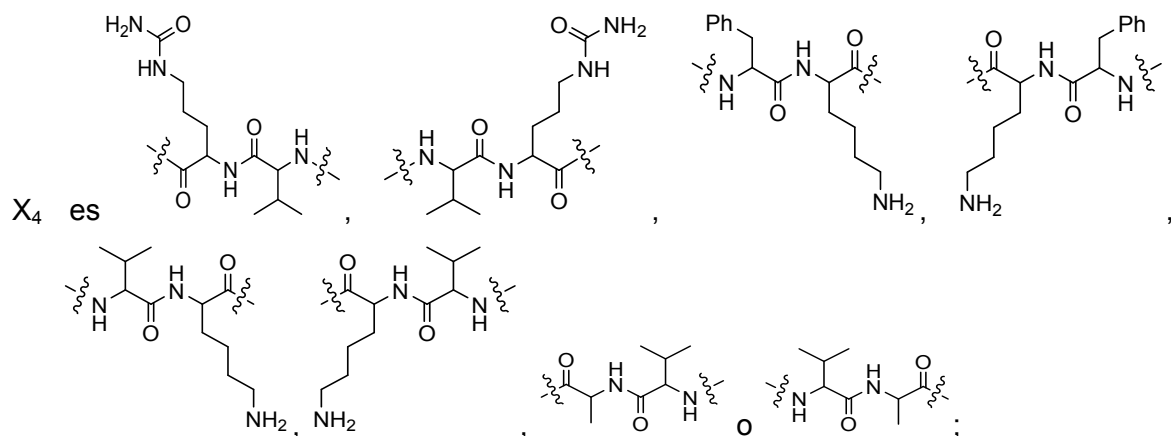
L_1 es $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_1L_4-$, $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_2L_4-$, $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m-$, $-(CH_2)_m-$, $-X_3X_4C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m-$, $-X_3X_4C(=O)(CH_2)_m-$, $-X_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m-$, $-X_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m-$;

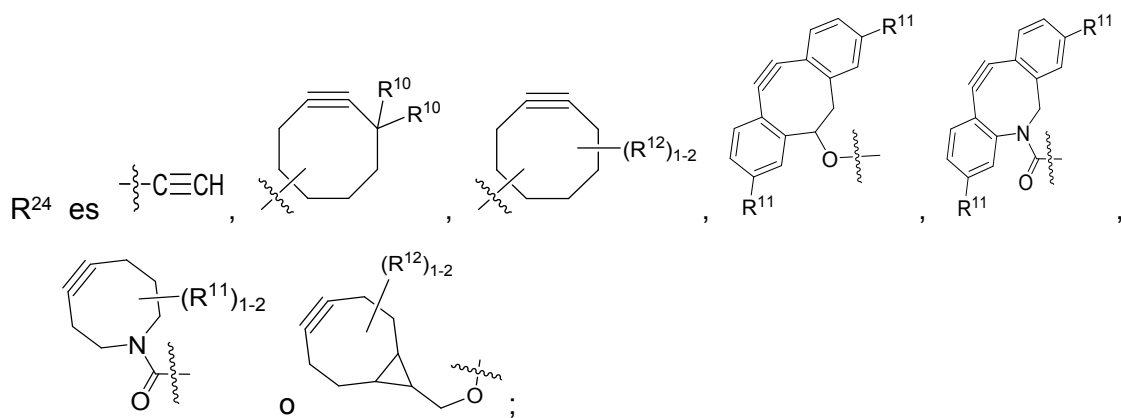
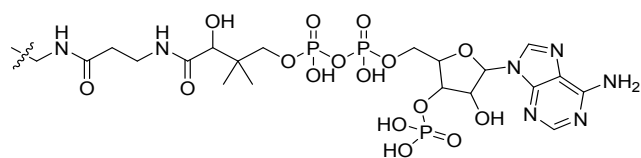
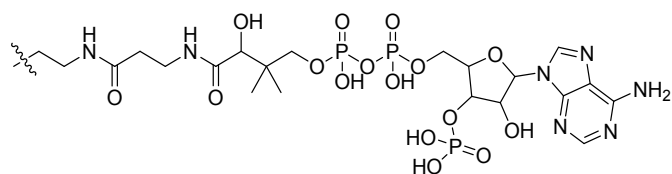
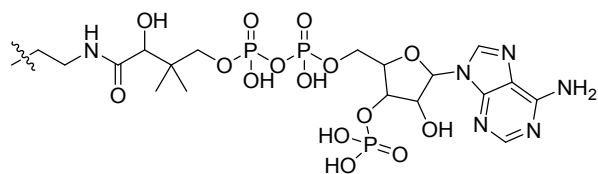
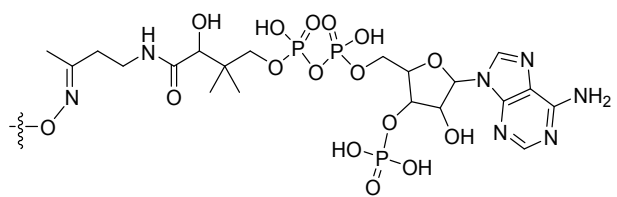
L_2 es $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m-$;

L_3 es $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_1L_4-$, $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_2L_4-$, $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m-$, $-(CH_2)_m-$, $X_3X_4C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m-$, $-X_3X_4C(=O)(CH_2)_m-$, $-X_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m-$, $-X_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m-$;

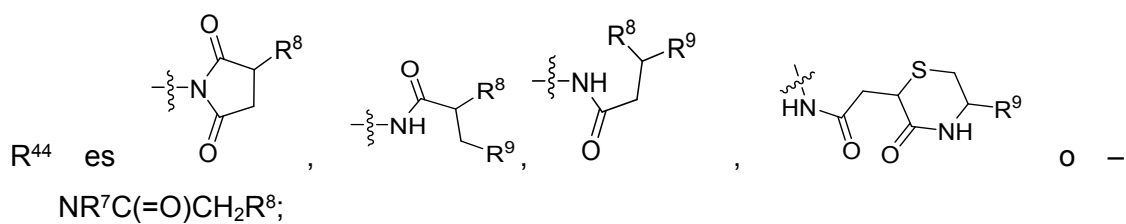
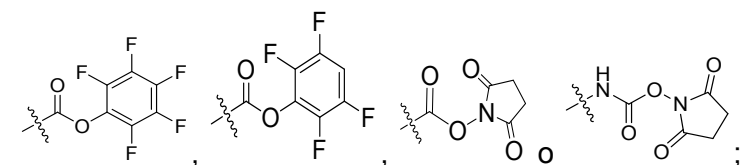
L_4 es $-(CH_2)_m-$;

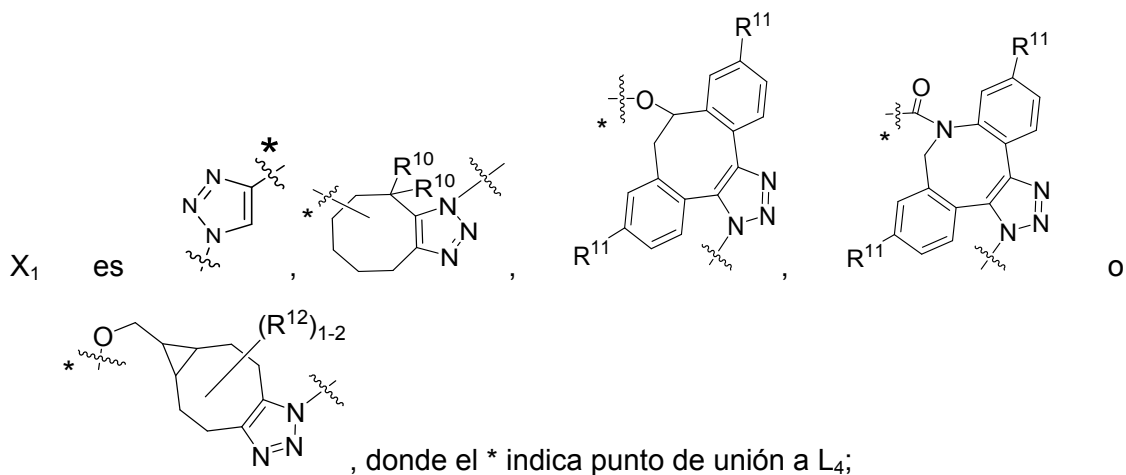


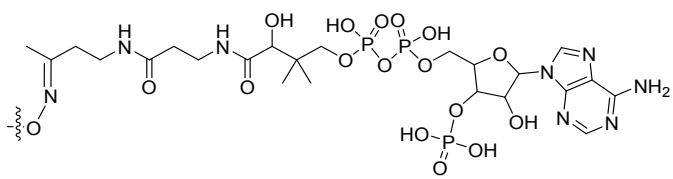
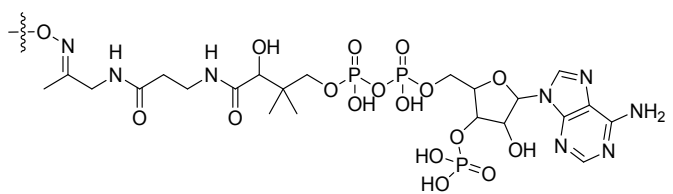
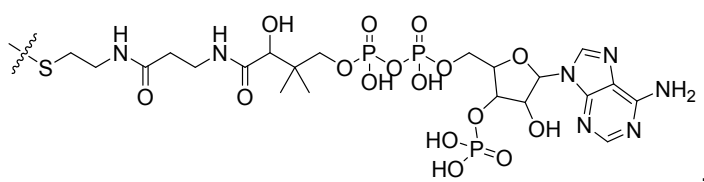
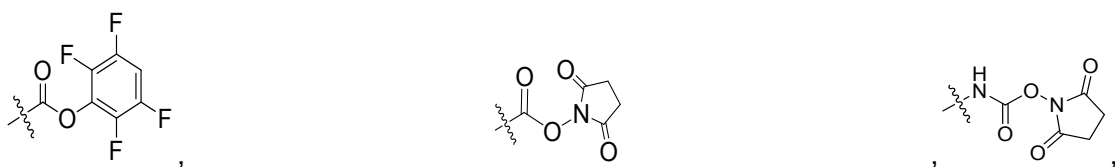
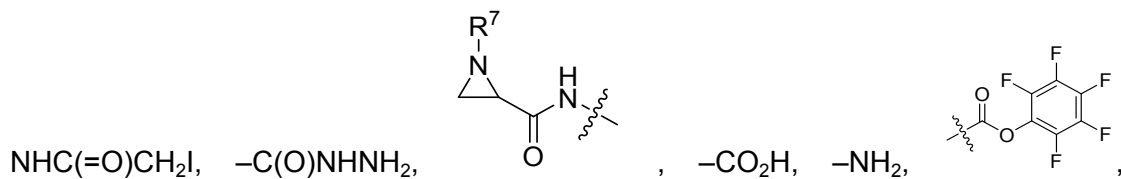
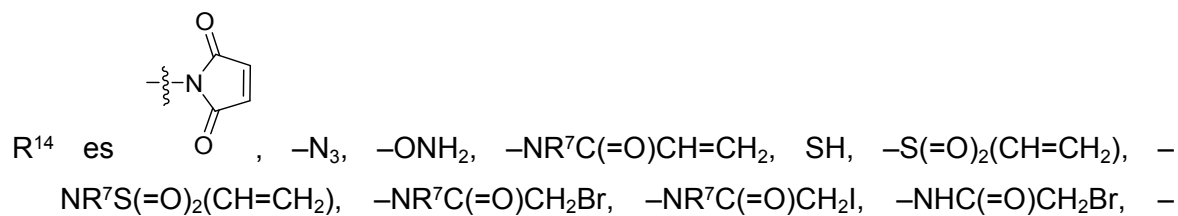
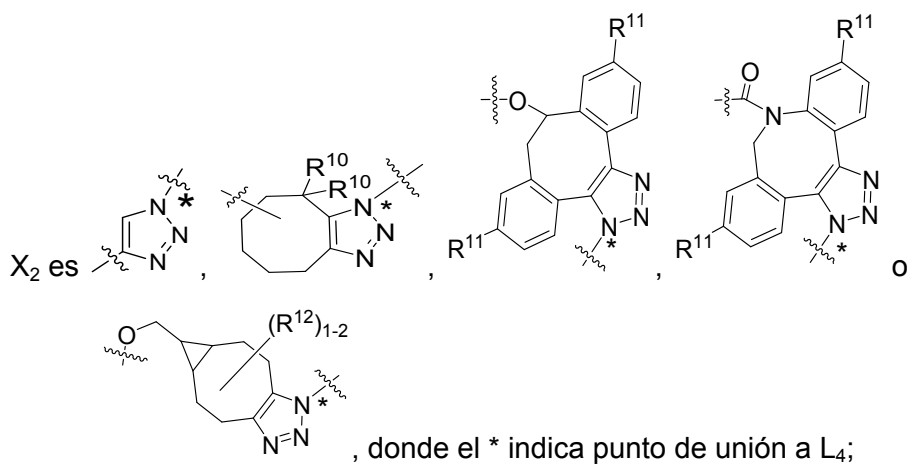


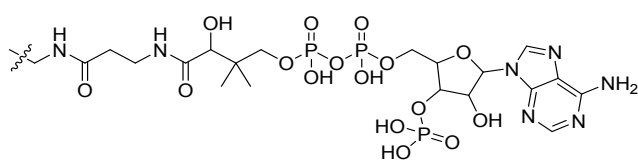
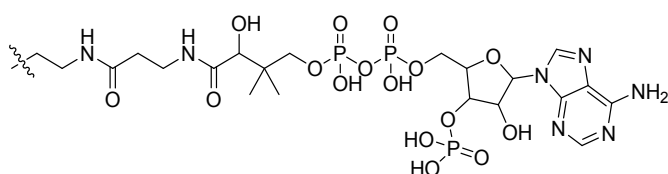
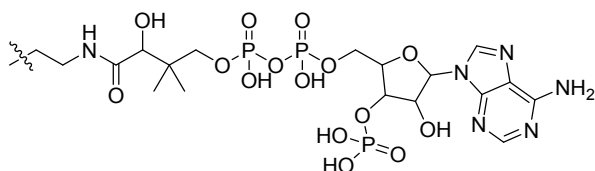
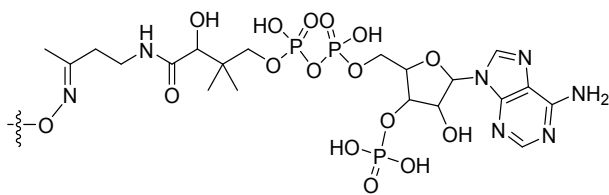


R^{34} es, $-\text{N}_3$, $-\text{ONH}_2$, $-\text{NR}^7\text{C}(=\text{O})\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHNH}_2$, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{NH}_2$,



$$\begin{aligned} \text{L}_4 \text{ es } &-(\text{CH}_2)_m-; \\ \text{L}_5 \text{ es } &-\text{NHS}(=\text{O})_2(\text{CH}_2)_m\text{X}_1\text{L}_4, -\text{NH}((\text{CH}_2)_m\text{O})_p(\text{CH}_2)_m\text{X}_1\text{L}_4-, -\text{NH}((\text{CH}_2)_m\text{O})_p(\text{CH}_2)_m\text{X}_2\text{L}_4- \\ &, -\text{NH}((\text{CH}_2)_m\text{O})_p(\text{CH}_2)_m- \text{ o } -\text{NH}(\text{CH}_2)_m-; \end{aligned}$$






o

cada R^7 se selecciona independientemente entre H y alquilo C_1-C_6 ;

cada R^{10} se selecciona independientemente entre H, alquilo C_1-C_6 , F, Cl, y $-OH$;

cada R^{11} se selecciona independientemente entre H, alquilo C_1-C_6 , F, Cl, $-NH_2$, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-N(CH_3)_2$, $-CN$, $-NO_2$ y $-OH$;

cada R^{12} se selecciona independientemente entre H, alquilo C_{1-6} , flúor, benciloxi sustituido con $-C(=O)OH$, bencilo sustituido con $-C(=O)OH$, alcoxi C_{1-4} sustituido con $-C(=O)OH$ y alquilo C_{1-4} sustituido con $-C(=O)OH$;

cada m se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, y

cada p se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14.

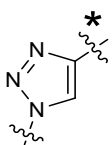
[00144] Realización 7. El compuesto de Fórmula (A), Fórmula (A-1) o Fórmula (A-1a), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde:

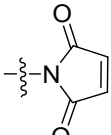
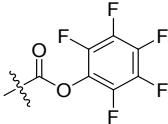
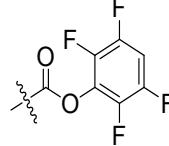
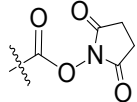
R^4 es $-L_1R^{14}$;

L_1 es $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_1L_4-$, $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m-$ o $-(CH_2)_m-$;

L_4 es $-(CH_2)_m-$;

L_5 es $-NHS(=O)_2(CH_2)_mX_1L_4$;

X_1 es , donde el * indica punto de unión a L_4 ;

R^{14} es , $-\text{ONH}_2$, , , o .

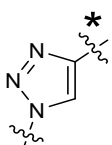
cada m se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, y

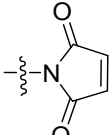
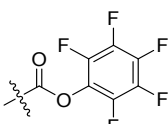
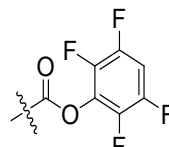
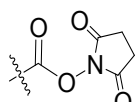
cada p se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14.

[00145] Realización 8. El compuesto de Fórmula (A), Fórmula (A-2), Fórmula (A-3), Fórmula (A-2a) o Fórmula (A-3a), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde:

L_4 es $-(\text{CH}_2)_m-$;

L_5 es $-\text{NHS}(=\text{O})_2(\text{CH}_2)_mX_1L_4$;

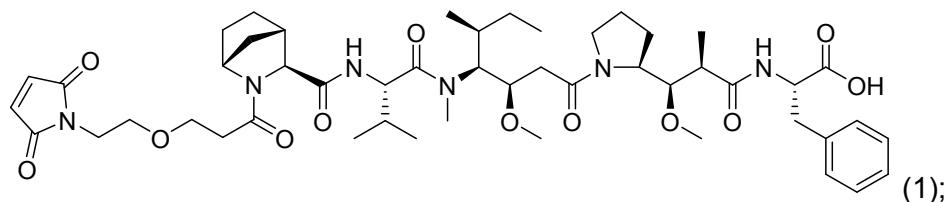
X_1 es , donde el * indica punto de unión a L_4 ;

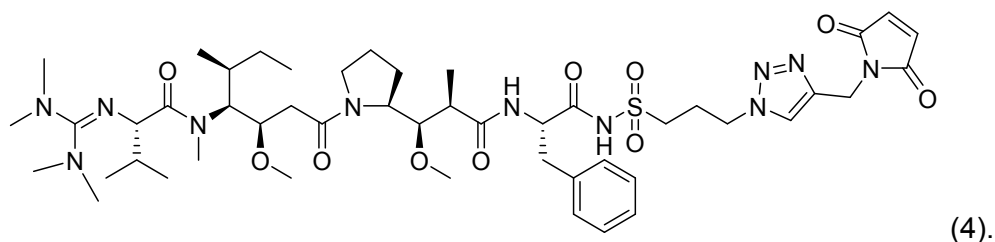
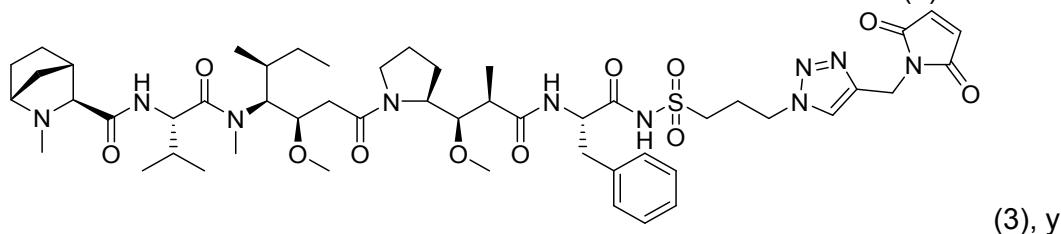
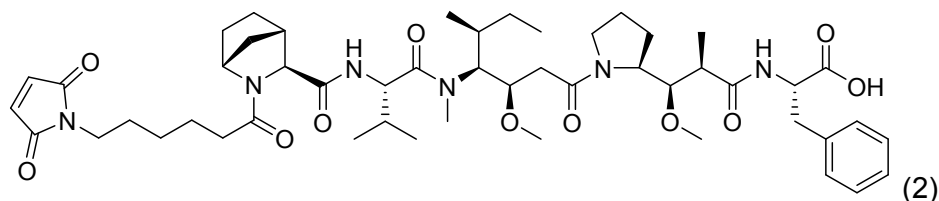
R^{14} es , $-\text{ONH}_2$, , , o .

cada m se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, y

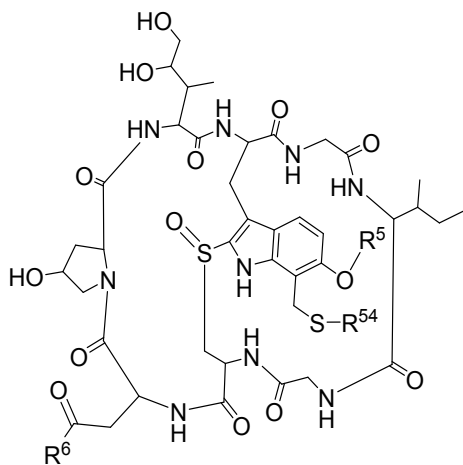
cada p se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14.

[00146] Realización 9. El compuesto de Fórmula (A) seleccionado entre:





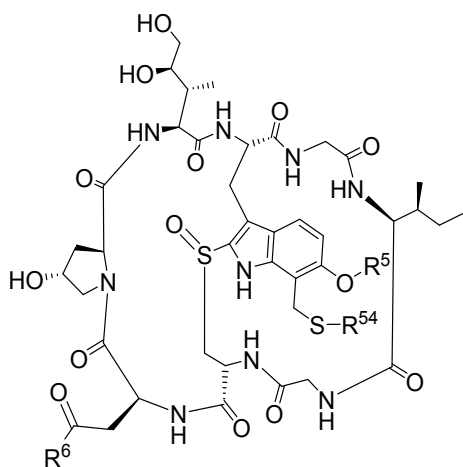
[00147] Realización 10. El compuesto de Fórmula (B), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que tiene la estructura de Fórmula (B-1), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



Fórmula (B-1),

donde: R^{54} , R^5 y R^6 , con como se definió con anterioridad.

[00148] Realización 11. El compuesto de Fórmula (B), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que tiene la estructura de Fórmula (B-1a), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



Fórmula (B-1a)

donde: R^{54} , R^5 y R^6 , con como se definió con anterioridad.

[00149] Realización 12. El compuesto de Fórmula (B), Fórmula (B-1) o Fórmula (B-1a), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

donde:

R^{54} es $-L_6R^{14}$, $-L_7R^{24}$, $-L_7R^{34}$ o $-L_8R^{44}$;

R^5 es H, $-\text{CH}_3$ o $-\text{CD}_3$;

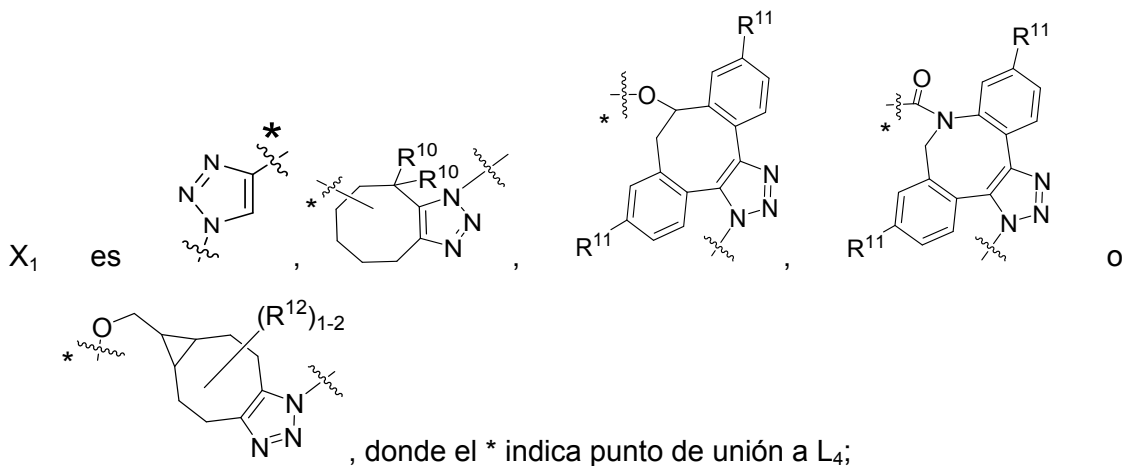
R^6 es $-\text{NH}_2$ o $-\text{OH}$;

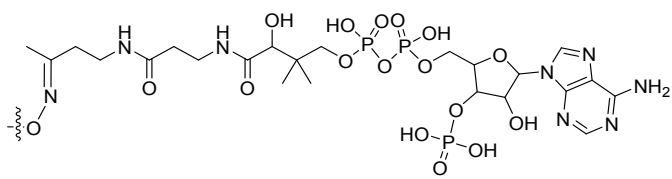
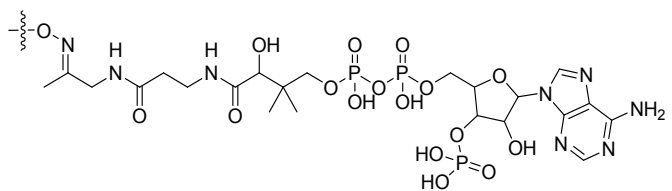
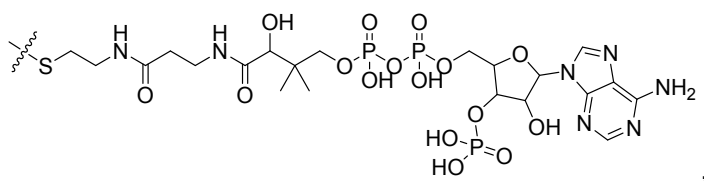
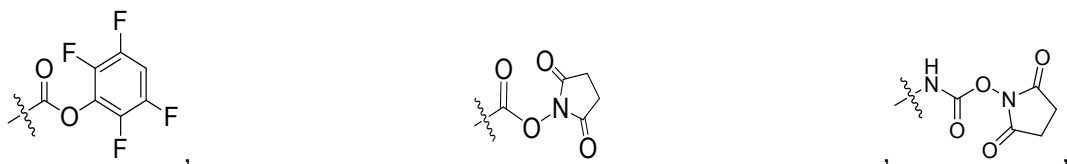
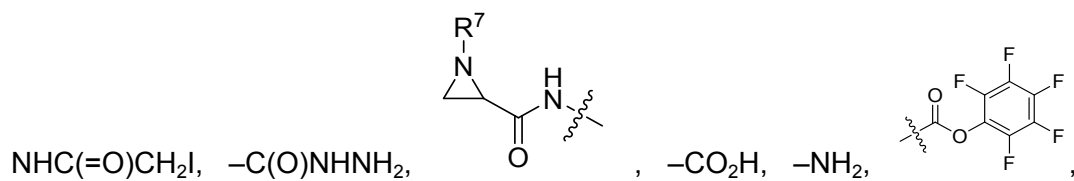
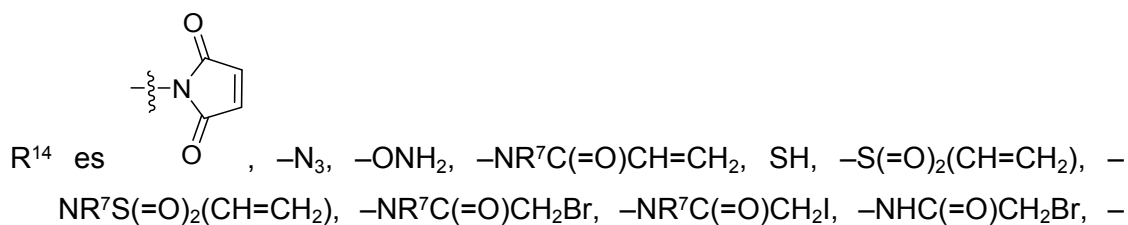
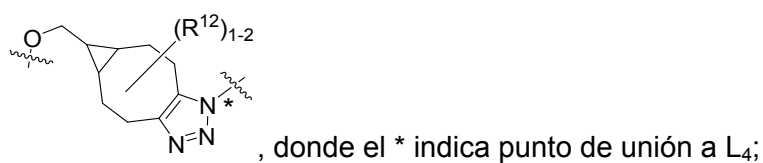
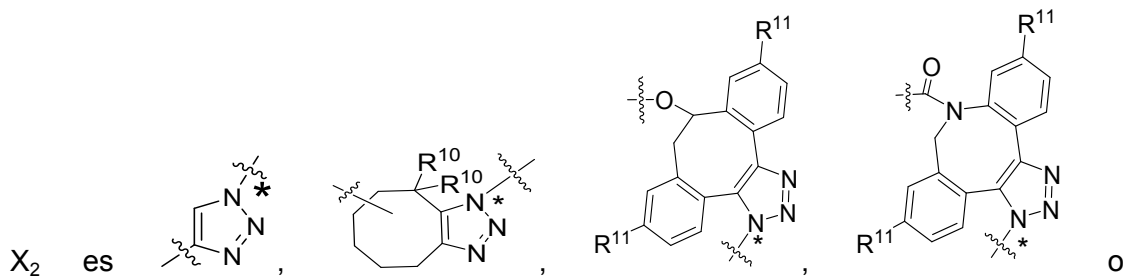
L_6 es $-\text{((CH}_2\text{)}_m\text{O)}_p\text{(CH}_2\text{)}_m\text{X}_1\text{L}_4-$, $-\text{((CH}_2\text{)}_m\text{O)}_p\text{(CH}_2\text{)}_m\text{X}_2\text{L}_4-$, $-L_4\text{NHC(=O)NH((CH}_2\text{)}_m\text{O)}_p\text{(CH}_2\text{)}_m\text{X}_1\text{L}_4-$, $-L_4\text{NHC(=O)NH((CH}_2\text{)}_m\text{O)}_p\text{(CH}_2\text{)}_m\text{X}_2\text{L}_4-$, $-\text{((CH}_2\text{)}_m\text{O)}_p\text{(CH}_2\text{)}_m-$ o $-(\text{CH}_2)_m-$;

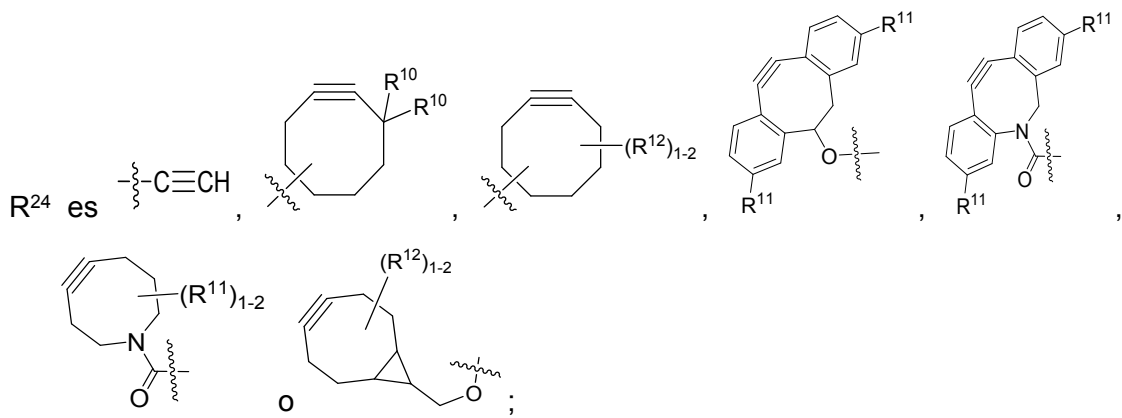
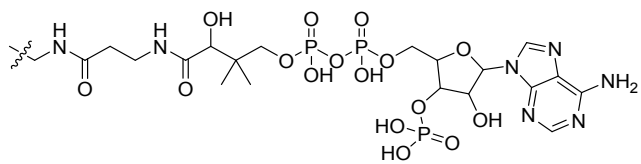
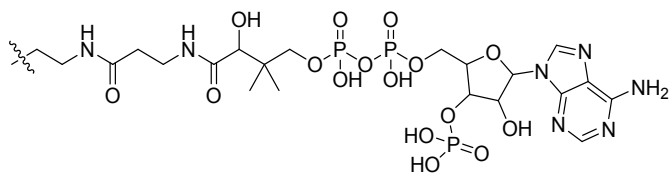
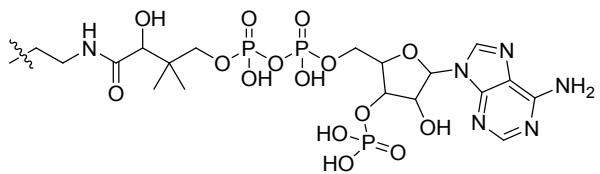
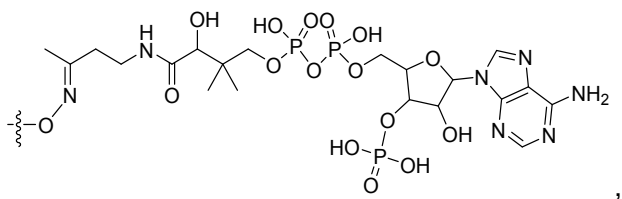
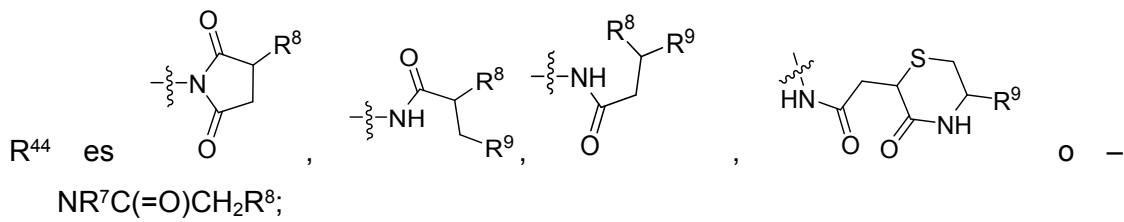
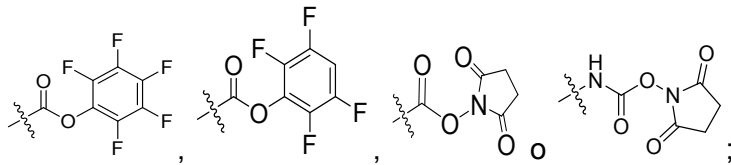
L_7 es $-\text{((CH}_2\text{)}_m\text{O)}_p\text{(CH}_2\text{)}_m-$;

L_8 es $-\text{((CH}_2\text{)}_m\text{O)}_p\text{(CH}_2\text{)}_m\text{X}_1\text{L}_4-$, $-\text{((CH}_2\text{)}_m\text{O)}_p\text{(CH}_2\text{)}_m\text{X}_2\text{L}_4-$, $-\text{((CH}_2\text{)}_m\text{O)}_p\text{(CH}_2\text{)}_m-$, $-(\text{CH}_2)_m-$;

L_4 es $-(\text{CH}_2)_m-$;






$$R^{34} \text{ es, } -N_3, -ONH_2, -NR^7C(=O)CH=CH_2, -C(O)NHNH_2, -CO_2H, -NH_2,$$


cada R^7 se selecciona independientemente entre H y alquilo C_1-C_6 ;

R^8 es $-S(CH_2)_nCHR^9NH_2$;

R^9 es $-C(=O)OR^7$;

cada R^{10} se selecciona independientemente entre H, alquilo C_1-C_6 , F, Cl, y $-OH$;

cada R^{11} se selecciona independientemente entre H, alquilo C_1-C_6 , F, Cl, $-NH_2$, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-N(CH_3)_2$, $-CN$, $-NO_2$ y $-OH$;

cada R^{12} se selecciona independientemente entre H, alquilo C_{1-6} , flúor, benciloxi sustituido con $-C(=O)OH$, bencilo sustituido con $-C(=O)OH$, alcoxi C_{1-4} sustituido con $-C(=O)OH$ y alquilo C_{1-4} sustituido con $-C(=O)OH$;

cada m se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, y

cada p se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14.

[00150] Realización 13. El compuesto de Fórmula (B), Fórmula (B-1) o Fórmula (B-1a), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde:

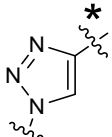
R^{54} es $-L_6R^{14}$;

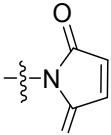
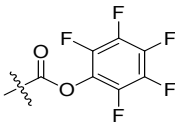
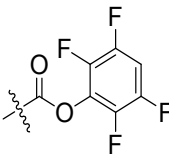
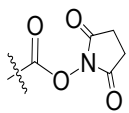
R^5 es $-CH_3$;

R^6 es $-NH_2$;

L_6 es $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_1L_4-$, $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m-$, $-L_4NHC(=O)NH((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_1L_4-$, $-L_4NHC(=O)NH((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_2L_4-$, o $-(CH_2)_m-$;

L_4 es $-(CH_2)_m-$;

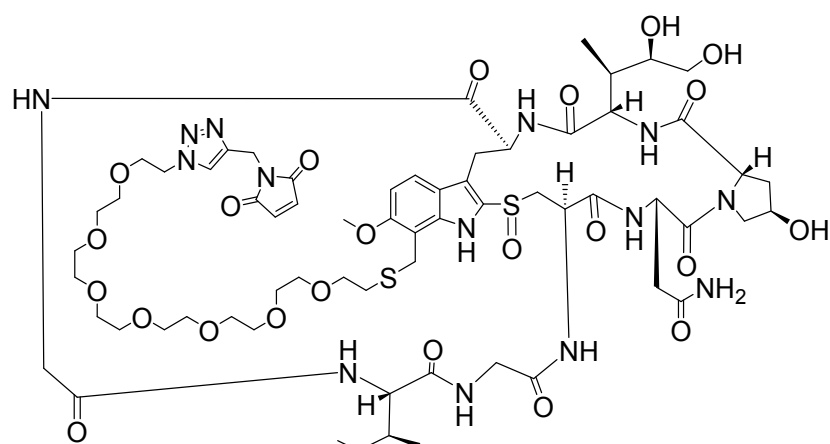
X_1 es , donde el * indica punto de adhesión a L_4 ;

R^{14} es , $-ONH_2$, , , o .

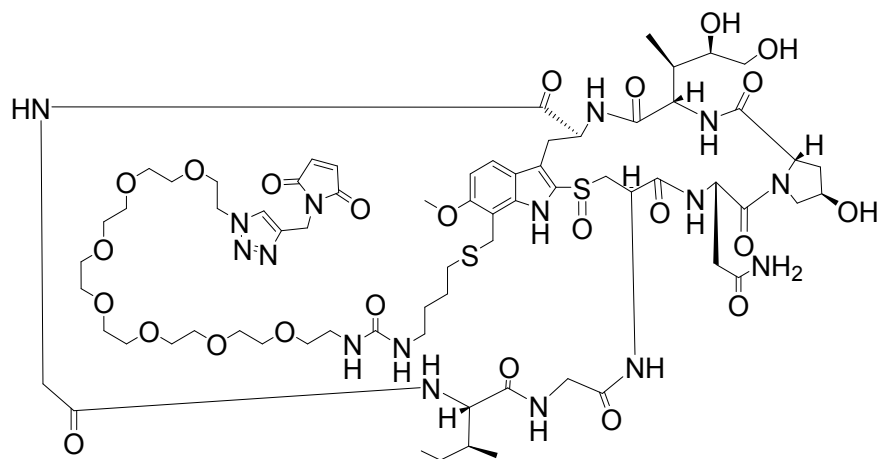
cada m se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, y

cada p se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14.

[00151] Realización 14. El compuesto de Fórmula (B) que se selecciona entre:

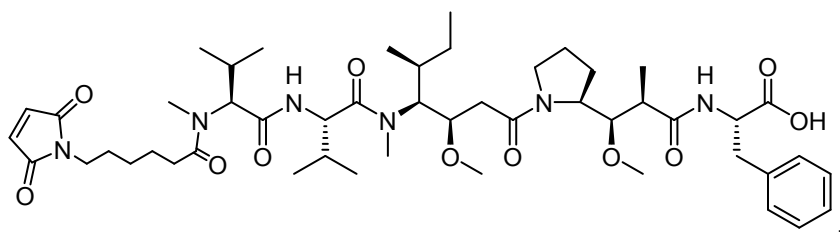
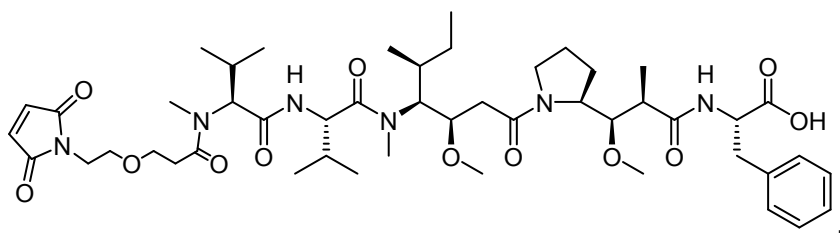


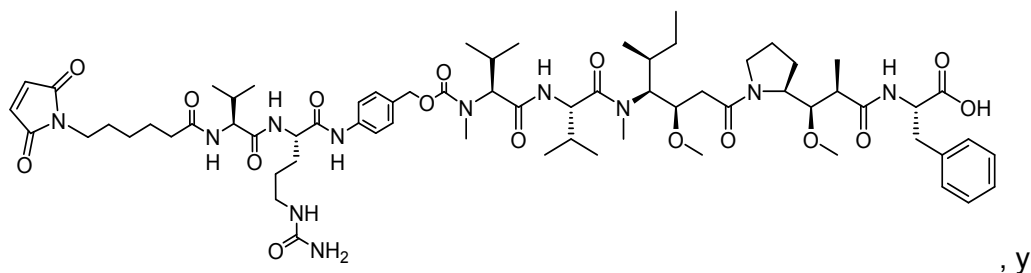
(5), y



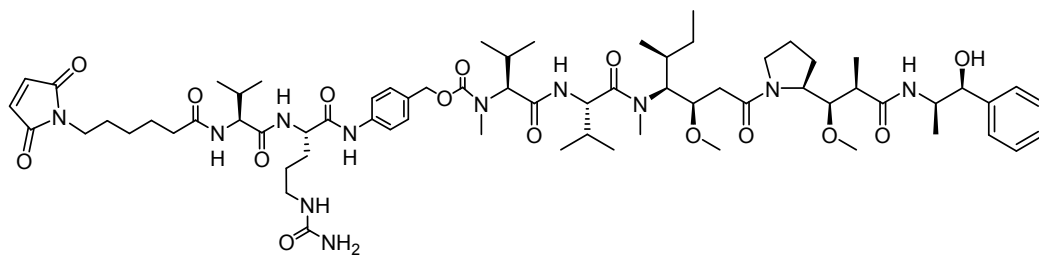
(6).

[00152] En otro aspecto el Ligador-resto Droga de la invención se selecciona entre:

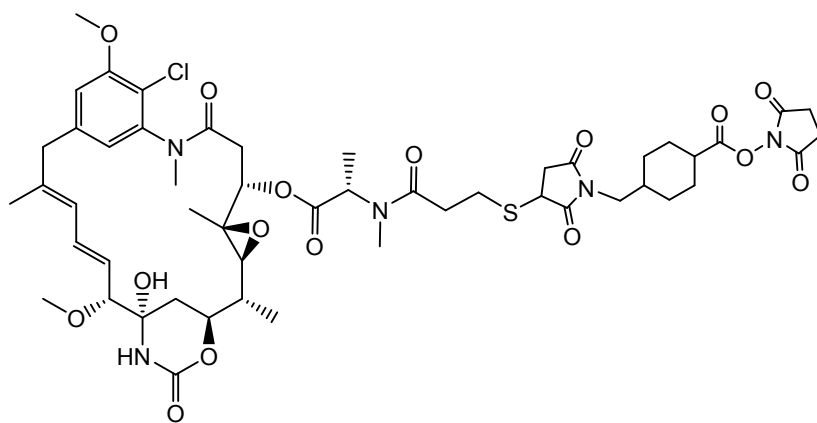




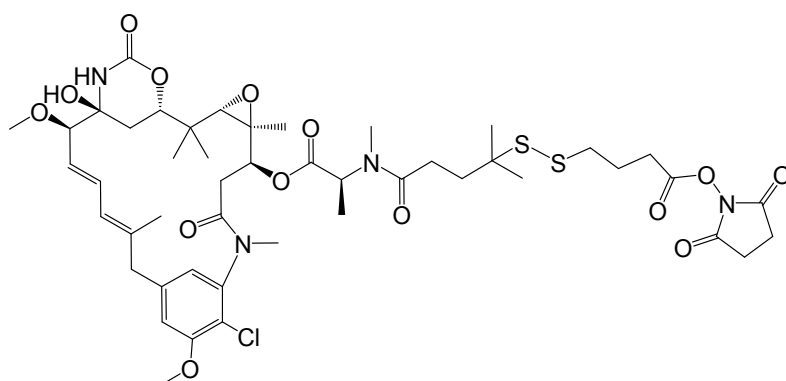
, y



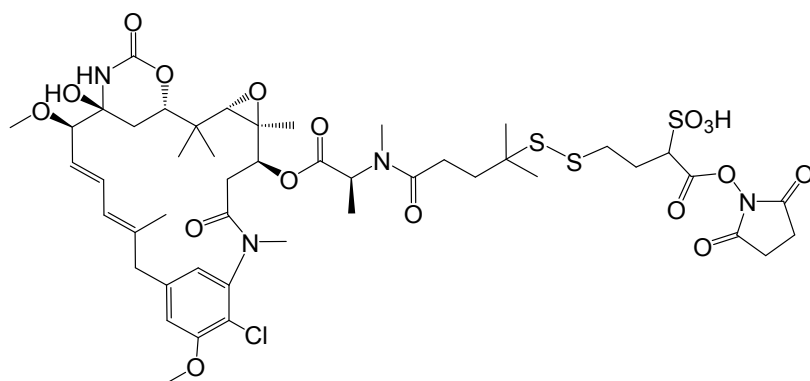
[00153] En otro aspecto el Ligador-resto Droga de la invención se selecciona entre:



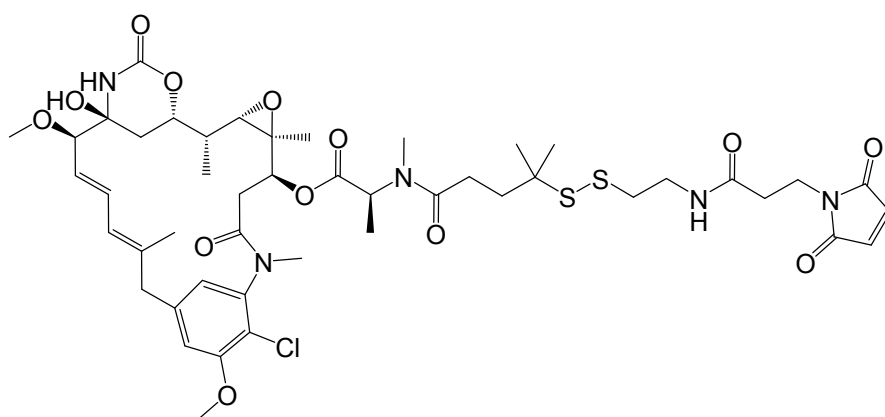
(SMCC-DM1),



(SPDB-DM4),



(sulfo-SPDB-DM4), y



(MPET-DM4).

Conjugados Anticuerpo Droga

[00154] La presente revelación proporciona conjugados anticuerpo droga donde un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT es conectado a un resto droga (por ej., un agente citotóxico), opcionalmente a través de un ligador. En un aspecto, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') es unido, mediante adhesión covalente a través de un ligador, a un resto droga que es un agente citotóxico.

[00155] Los conjugados anticuerpo droga pueden selectivamente liberar un agente citotóxico a las células que expresan cKIT, por ej., células madre hematopoyéticas, así selectivamente produciendo ablación de aquellas células en un paciente, por ej., un receptor de trasplante de células madre hematopoyéticas. Preferentemente, los conjugados anticuerpo droga cKIT tienen corta vida media y van a ser despejados de la circulación de un paciente de modo que pueden ser usados para acondicionar receptores de trasplante de células madre hematopoyéticas previo a trasplante de células madre hematopoyéticas.

[00156] En algunas realizaciones, los conjugados anticuerpo droga cKIT que se revelan en la presente son modificados para tener capacidad reducida para inducir desgranulación de

células madre, incluso cuando están entrecruzados y/o multimerizados en complejos más grandes. Por ejemplo, los conjugados anticuerpo droga cKIT que se revelan en la presente son modificados para tener una capacidad reducida para inducir desgranulación de mastocitos es decir, es aproximadamente, o es al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% reducida en comparación con un anticuerpo cKIT de longitud completa, un $F(ab')_2$ o un fragmento $F(ab)_2$, o su conjugado, incluso cuando fueron entrecruzados y/o multimerizados en complejos más grandes. En algunas realizaciones, los conjugados anticuerpo droga cKIT que se revelan en la presente pueden comprender un anti-cKIT Fab o fragmento Fab'. En algunas realizaciones, los conjugados anticuerpo droga anti-cKIT que se revelan en la presente pueden tener actividad mínima para inducir desgranulación de mastocitos, por ej., una lectura O.D. corregida de valor de referencia de menos de 0,25, por ej., menos de 0,2, menos de 0,15, o menos de 0,1, en un ensayo de liberación beta-hexosaminidasa, incluso cuando son entrecruzados y/o multimerizados en complejos más grandes.

[00157] En algunas realizaciones, se proporcionan en la presente conjugados que comprenden un fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT (anti-cKIT Fab o Fab'), conectado a un resto droga (por ej., un agente citotóxico), opcionalmente a través de un ligador. Tal como se describe en la presente, dichos conjugados anti-cKIT Fab' o Fab-toxina son capaces de ablación de células HSC humana *in vitro* e *in vivo*, pero no provocan desgranulación de mastocitos incluso cuando son entrecruzados y/o multimerizados en complejos más grandes.

[00158] En un aspecto, la revelación proporciona un conjugado de Fórmula (I):



donde:

A es un fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano;

L_B es un ligador;

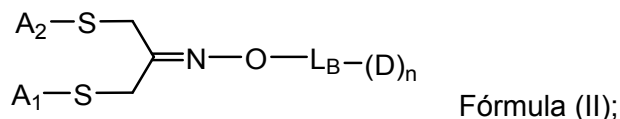
D es un agente citotóxico;

n es un número entero que va desde 1 hasta 10, y

y es un número entero que va desde 1 hasta 10,

donde el ligador-resto droga ($L_B-(D)_n$) se adhiere covalentemente al fragmento de anticuerpo (A).

[00159] En un aspecto, la presente revelación se dirige a un conjugado de Fórmula (II):



A_1 es un fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') o cadena (por ej. HC o LC) que específicamente se une a cKIT humano;

A_2 es un fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') o cadena (por ej. HC o LC) que específicamente se une a cKIT humano;

L_B es un ligador;

D es un agente citotóxico, y

n es un número entero que va desde 1 hasta 10,

donde el ligador-resto droga ($L_B-(D)_n$) acopla covalentemente los fragmentos de anticuerpo A_1 y A_2 .

[00160] En un aspecto, el de más de los restos droga, D, en el conjugado de Fórmula (I) y Fórmula (II) se seleccionan independientemente entre una auristatina, una amanitina, un maitansinoide y una saporina.

[00161] En otro aspecto, el de más de los restos droga, D, en el conjugado de Fórmula (I) se seleccionan independientemente entre una auristatina y una amanitina.

[00162] En los conjugados de Fórmula (I), uno o más Ligador-Resto Droga ($L_B-(D)_n$) puede ser adherido covalentemente al fragmento de anticuerpo, A (por ej. Fab o Fab'), así adhiriendo covalentemente uno o más restos droga, D, al fragmento de anticuerpo, A (por ej. Fab o Fab'), mediante ligador, L_B . L_B es cualquier resto químico que es capaz de unir el fragmento de anticuerpo, A (por ej. Fab o Fab') a uno o más restos droga, D. Los conjugados de Fórmula (I), donde uno o más restos droga, D, son unidos covalentemente a un fragmento de anticuerpo, A (por ej. Fab o Fab'), pueden ser formados usando un reactivo ligador bifuncional o multifuncional que tiene uno o más grupos reactivos funcionales que son iguales o diferentes. Uno de los grupos reactivos funcionales del reactivo ligador bifuncional o multifuncional se usa para reaccionar con un grupo en el fragmento de anticuerpo, A, a modo de ejemplo, un tiol o una amina (por ej. una cisteína, una cadena lateral de terminal N o de aminoácidos tal como lisina) para formar un enlace covalente con un extremo del ligador L_B . Dichos grupos reactivos funcionales del reactivo ligador bifuncional o multifuncional incluyen, aunque no se limitan a, un maleimida, un tiol y un éster NHS. El otro grupo reactivo funcional

o grupos del reactivo ligador bifuncional o multifuncional se usan para adherir covalentemente uno o más restos droga, D, al ligador L_B .

[00163] En los conjugados de Fórmula (II), un puente cetona se forma por reacción de tioles pendientes sobre fragmentos de anticuerpo A_1 y A_2 y una 1,3-dihaloacetona, tal como 1,3-dicloroacetona, 1,3-dibromoacetona, 1,3-diiodoacetona, y bisulfonato éster de 1, 3-dihidroxiacetona, que por consiguiente acopla covalentemente los fragmentos de anticuerpo A_1 y A_2 . Este resto puente cetona se usa para adherir covalentemente uno o más restos droga, D, a los fragmentos de anticuerpo A_1 y A_2 mediante un ligador L_B . L_B es cualquier resto químico que es capaz de unir el fragmento de anticuerpo, A_1 y A_2 a uno o más restos droga, D. Los conjugados de Fórmula (II), donde uno o más restos droga, D, son covalentemente unidos a fragmentos de anticuerpo A_1 y A_2 , pueden formarse usando un reactivo ligador bifuncional o multifuncional que tiene uno o más grupos funcionales reactivos que son iguales o diferentes. En una realización, uno de los grupos reactivos funcionales del reactivo ligador bifuncional o multifuncional es una alcoxiamina que se usa para reaccionar con el puente cetona para formar un enlace oxima con un extremo del ligador L_B , y el otro grupo reactivo funcional o grupos del reactivo ligador bifuncional o multifuncional se usan para unir covalentemente uno o más restos droga, D, al ligador L_B . En otra realización, uno de los grupos reactivos funcionales del reactivo ligador bifuncional o multifuncional es una hidracina que se usa para reaccionar con el puente cetona para formar un enlace hidrazona con un extremo del ligador L_B , y el otro grupo reactivo funcional o grupos del reactivo ligador bifuncional o multifuncional se usan para unir covalentemente uno o más restos droga, D, al ligador L_B .

[00164] En un aspecto, L_B es un ligador escindible. En otro aspecto, L_B es un ligador no-escindible. En algunos aspectos, L_B es un ligador ácido-lábil, ligador foto-lábil, ligador escindible peptidasa, ligador escindible esterasa, ligador escindible glucosidasa, ligador escindible fosfodiesterasa, un ligador reducible de enlace disulfuro, un ligador hidrofílico, o un ligador a base ácido dicarboxílico.

[00165] En otro aspecto, el resto droga (D) es una toxina proteína seleccionada entre saporina, proteína antiviral de la hierba carmín [pokeweed] (PAP), briodina 1, bouganina, gelonina, ricina, abrina, lectina mistletoe, modeccina, volkensina, asparina, momordina, ebulina, viscumina, toxina Shiga, toxina diftérica (DT), o exotoxina Pseudomonas (PE). Dichas proteínas son capaces de destruir células inactivando ribosoma o inhibiendo síntesis de proteína interfiriendo con función de factor 2 de elongación (EF2) (ver Kreitman et al., Immunotoxins for targeted cancer therapy, The AAPS Journal 2006; 8 (3) Article 63; Gadadhar

and Karande, Targeted Cancer Therapy: History and Development of Immunotoxins, Chapter 1 of Resistance to Immunotoxins in Cancer Therapy, pp 1–31). En algunas realizaciones, la toxina proteína es saporina. La toxina proteína se puede adherir al fragmento anticuerpo anti-cKIT (A) covalentemente mediante un ligador escindible o no escindible (L_B). En algunas realizaciones, la toxina proteína se une al fragmento anticuerpo anti-cKIT mediante un enlace disulfuro o tioéter.

[00166] Mientras que la relación droga a anticuerpo tiene un valor de número entero exacto para una molécula conjugado específica (por ej., el producto de n y y en Fórmula (I) y “ n ” en Fórmula (II)), se entiende que el valor con frecuencia va a ser un valor promedio cuando se use para describir una muestra que contiene muchas moléculas, debido a algún grado de inhomogeneidad, normalmente asociada con el paso de conjugación. La carga promedio para una muestra de un conjugado se refiere en la presente como la relación de la droga al anticuerpo (o Fab’), o “DAR.” En algunos aspectos, la DAR se encuentra entre aproximadamente 1 y aproximadamente 5, y normalmente es aproximadamente 1, 2, 3, o 4. En algunos aspectos, al menos 50% de una muestra en peso es compuesto que tiene el promedio DAR más o menos 2, y preferentemente al menos 50% de la muestra es un conjugado que contiene el promedio DAR más o menos 1. Otros aspectos incluyen conjugados donde la DAR es aproximadamente 2. En algunos aspectos, una DAR de ‘aproximadamente y ’ significa el valor medido para DAR se encuentra dentro del 20% del producto de n y y en Fórmula (I). En algunos aspectos, una DAR de ‘aproximadamente n ’ significa el valor medido para DAR se encuentra dentro de 20% de n en Fórmula (II).

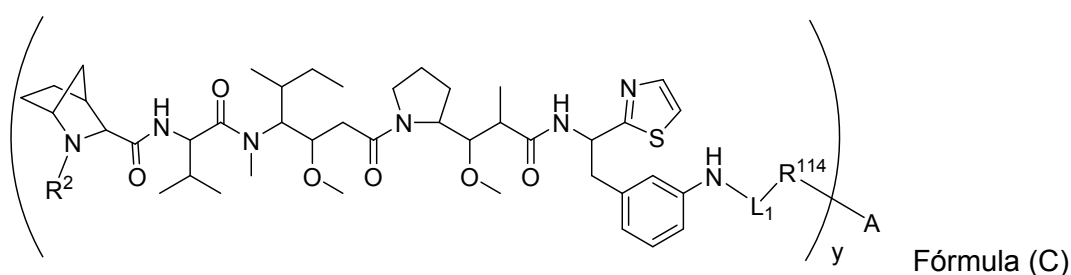
[00167] En un aspecto, la relación molar promedio de la droga con el fragmento de anticuerpo (Fab o Fab’) en los conjugados de Fórmula (I) (es decir, valor promedio del producto de n e y , también conocido como relación droga a anticuerpo (DAR)) es aproximadamente 1 a aproximadamente 10, aproximadamente 1 hasta aproximadamente 6 (por ej., 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0), aproximadamente 1 hasta aproximadamente 5, aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 4,5, o aproximadamente 2 hasta aproximadamente 4.

[00168] En un aspecto, la relación molar promedio de la droga con los fragmentos de anticuerpo A_1 y A_2 en los conjugados de Fórmula (II) (es decir, valor promedio de n , también conocido como relación droga a anticuerpo (DAR)) es aproximadamente 1 hasta

aproximadamente 10, aproximadamente 1 hasta aproximadamente 6 (por ej., 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0), aproximadamente 1 hasta aproximadamente 5, aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 4,5, o aproximadamente 2 hasta aproximadamente 4.

[00169] En un aspecto proporcionado por la revelación, el conjugado tiene sustancialmente pureza alta y tiene una o más de las siguientes características: (a) mayor de aproximadamente 90% (por ej., mayor de o igual a aproximadamente 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100%), preferentemente mayor de aproximadamente 95%, de especies de conjugado son monoméricas, (b) nivel de ligador no conjugado en la preparación de conjugado es menos de aproximadamente 10% (por ej., menos de o igual a aproximadamente 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, o 0%) (en relación al ligador total), (c) menos de 10% de especie conjugado son entrecruzadas (por ej., menos de o igual a aproximadamente nivel de 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, o 0%), (d) droga libre (por ej., auristatina, amanitina, maitansinoide o saporina) en la preparación de conjugado es menos de aproximadamente 2% (por ej., menos de o igual a aproximadamente 1,5%, 1,4%, 1,3%, 1,2%, 1,1%, 1,0%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%, o 0%) (mol/mol en relación a agente citotóxico total).

[00170] En un aspecto los conjugados de la invención tienen la estructura de Fórmula (C):



donde:

A representa un fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano;

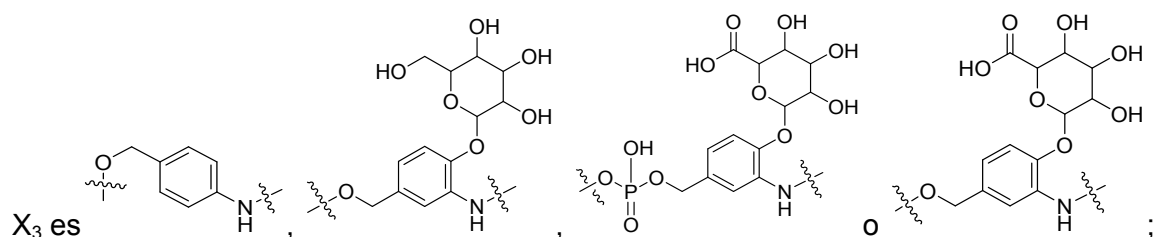
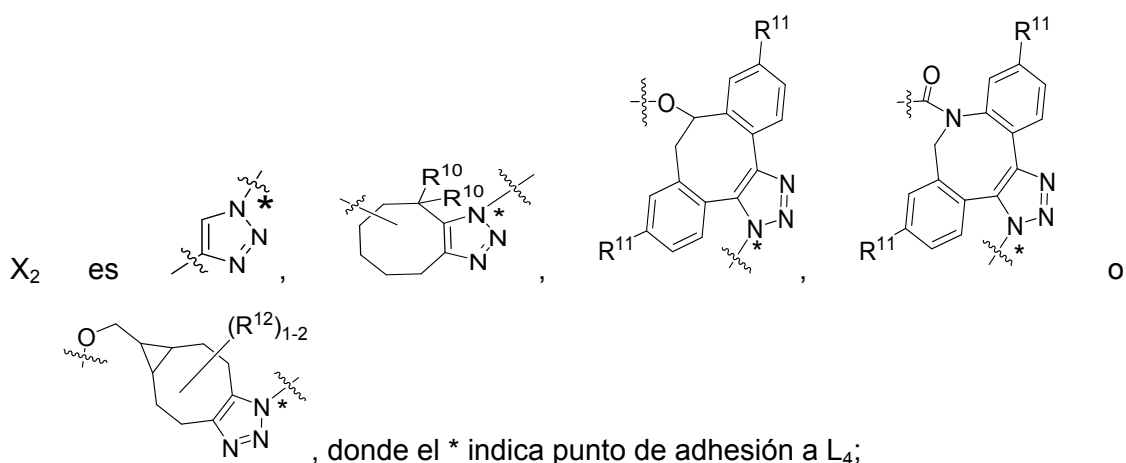
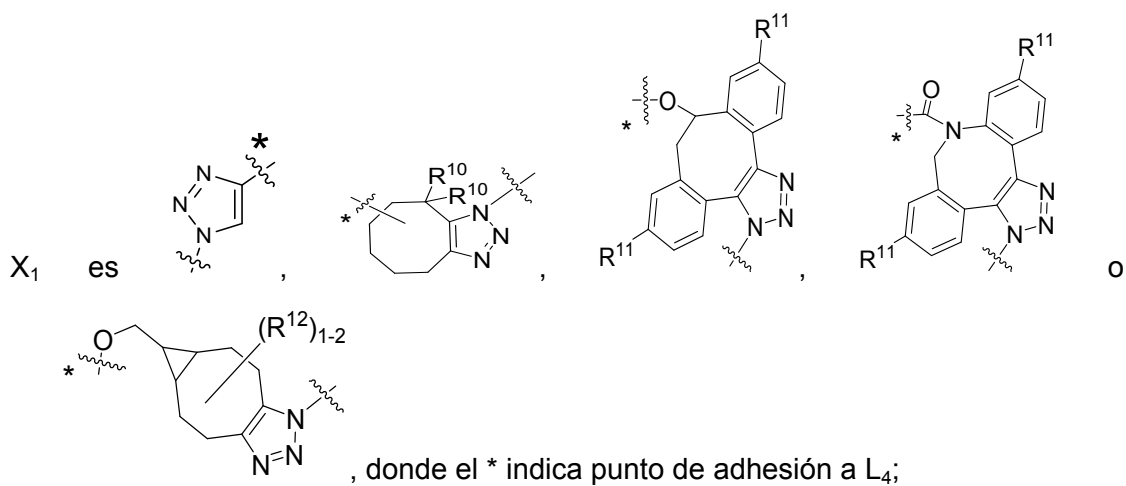
y es un número entero que va desde 1 hasta 10;

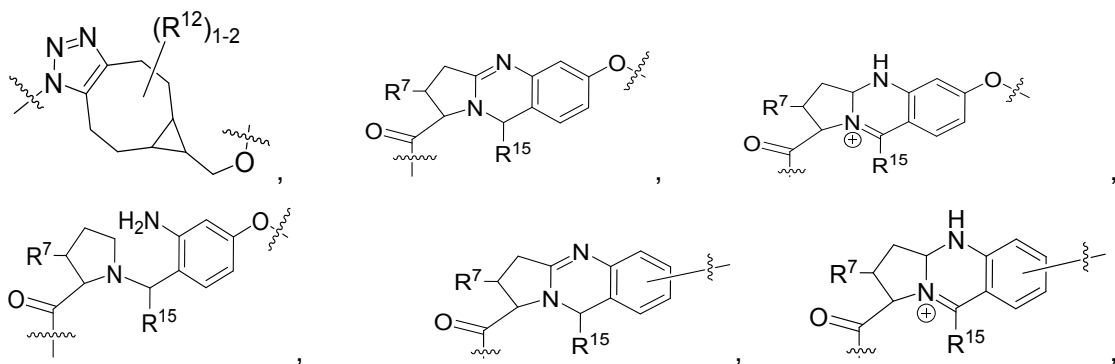
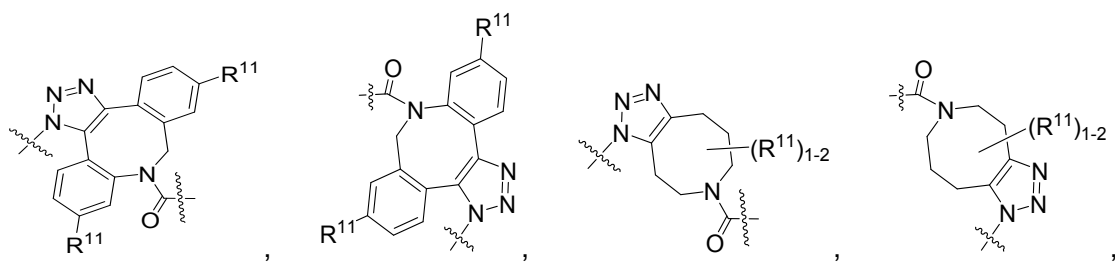
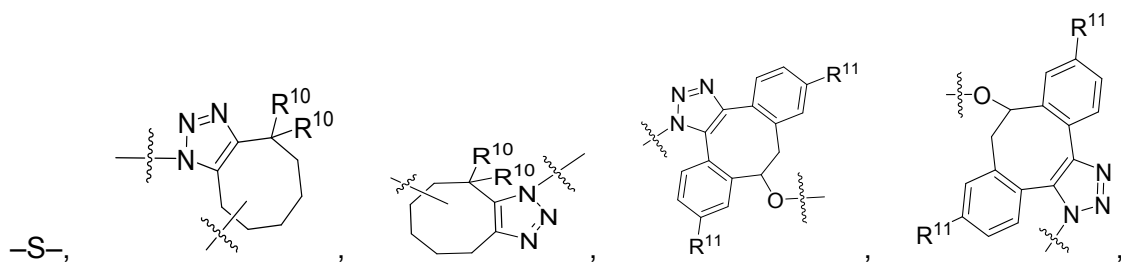
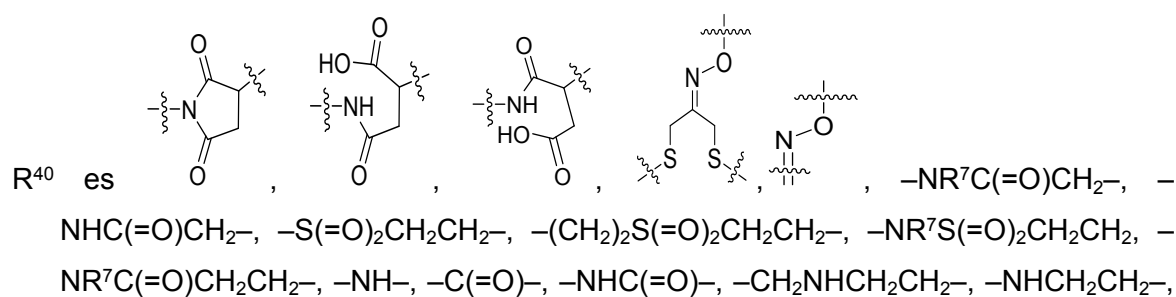
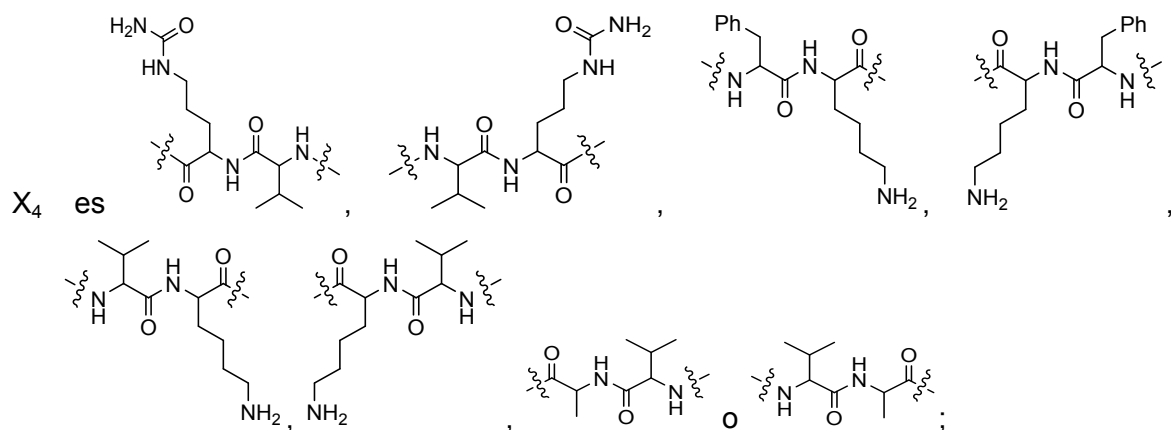
R² es alquilo C₁–C₆;

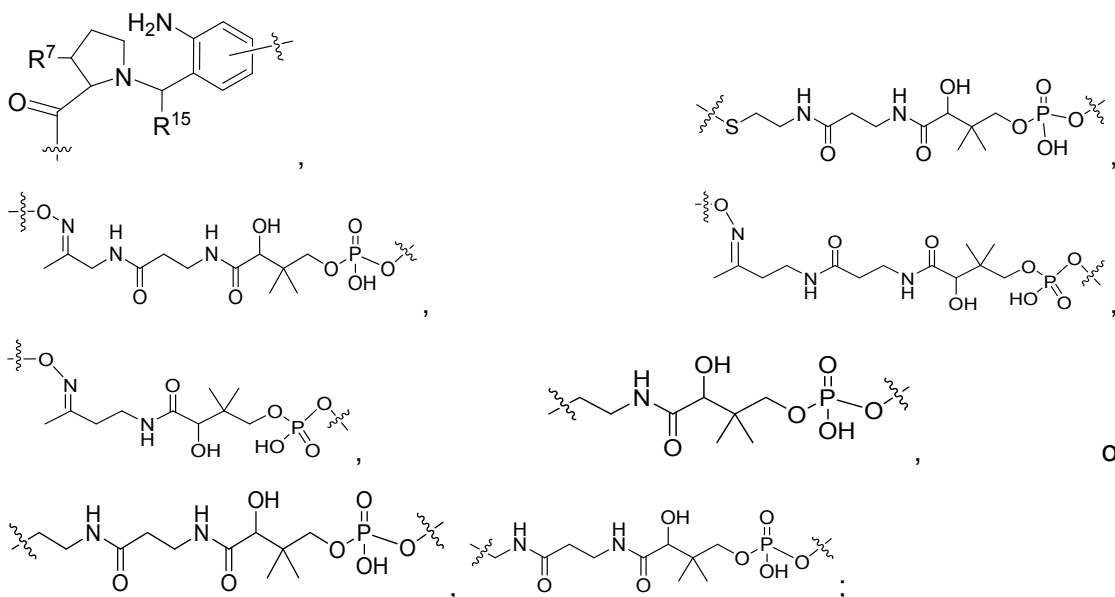
L₂₀ es –L₁R⁴⁰;

L_1 es $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_1L_4-$, $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_2L_4-$, $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m-$, $-(CH_2)_m-$, $-(CH_2)_mX_1(CH_2)_m-$, $-(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m-$, $-(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_mC(=O)NH(CH_2)_m-$, $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m-$, $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mC(=O)NH(CH_2)_m-$, $X_3X_4C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m-$, $X_3X_4C(=O)(CH_2)_m-$, $-X_3C(=O)(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_m-$, $X_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m-$, $-(CH_2)_mC(R_7)_2-$, $(CH_2)_mC(R_7)_2SS(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m-$ o $(CH_2)_mX_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m-$;

L_4 es $-((CH_2)_m-$







cada R^7 se selecciona independientemente entre H y alquilo $\text{C}_1\text{--C}_6$;

cada R^{10} se selecciona independientemente entre H, alquilo $\text{C}_1\text{--C}_6$, F, Cl, y --OH ;

cada R^{11} se selecciona independientemente entre H, alquilo $\text{C}_1\text{--C}_6$, F, Cl, --NH_2 , --OCH_3 , $\text{--OCH}_2\text{CH}_3$, $\text{--N}(\text{CH}_3)_2$, --CN , --NO_2 y --OH ;

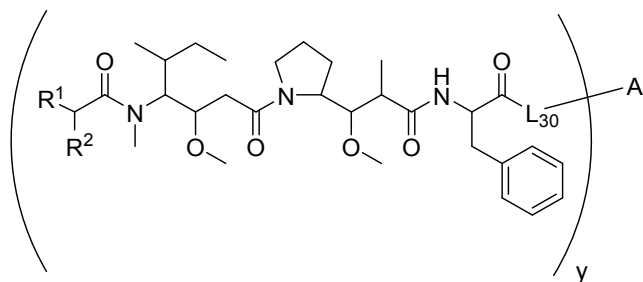
cada R^{12} se selecciona independientemente entre H, alquilo C_{1-6} , flúor, benciloxi sustituido con --C(=O)OH , bencilo sustituido con --C(=O)OH , alcoxi C_{1-4} sustituido con --C(=O)OH y alquilo C_{1-4} sustituido con --C(=O)OH ;

cada R^{15} se selecciona independientemente entre H, --CH_3 y fenilo;

cada m se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, y

cada p se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14.

[00171] En otro aspecto los conjugados de la invención tienen la estructura de Fórmula (D):

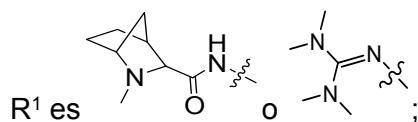


Fórmula (D)

donde:

A representa un fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que se une específicamente a cKIT humano;

y es un número entero que va desde 1 hasta 10;

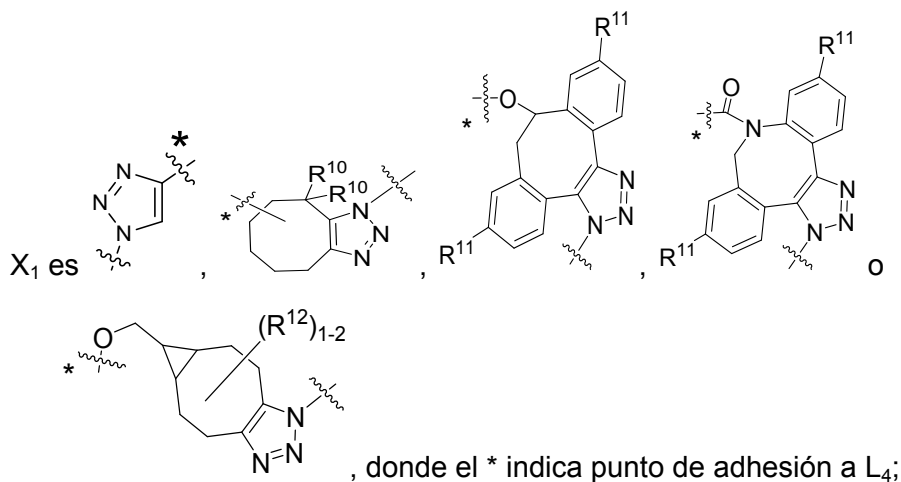


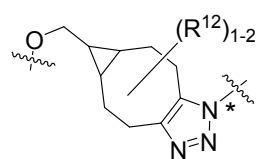
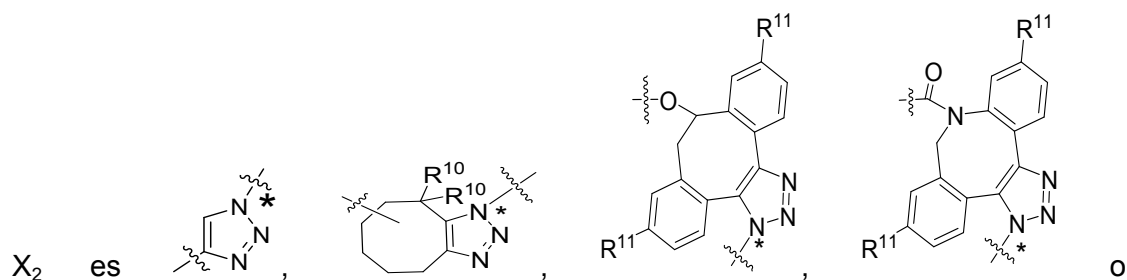
R^2 es alquilo C_1-C_6 ;

L_{30} es $-L_5R^{40}$;

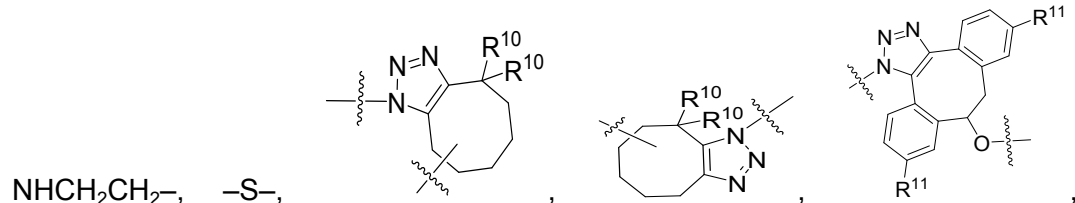
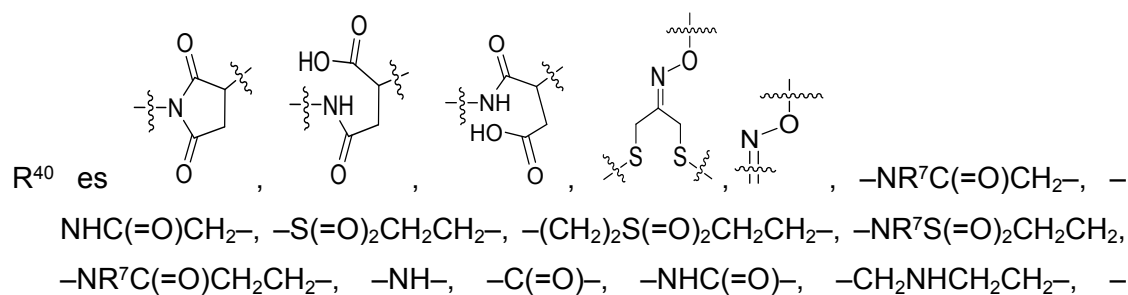
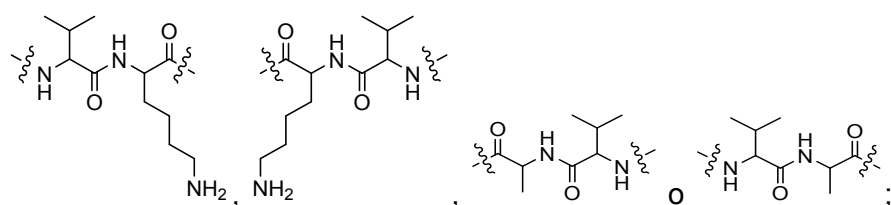
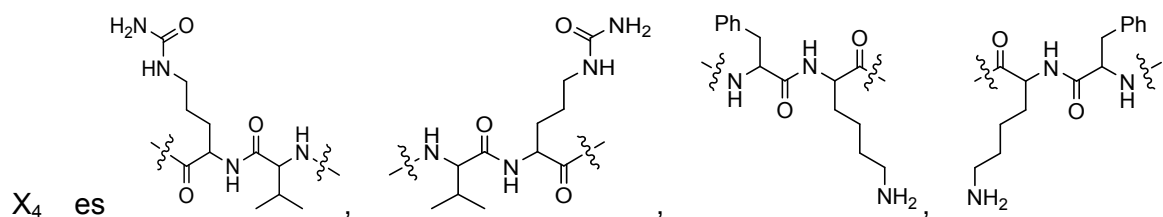
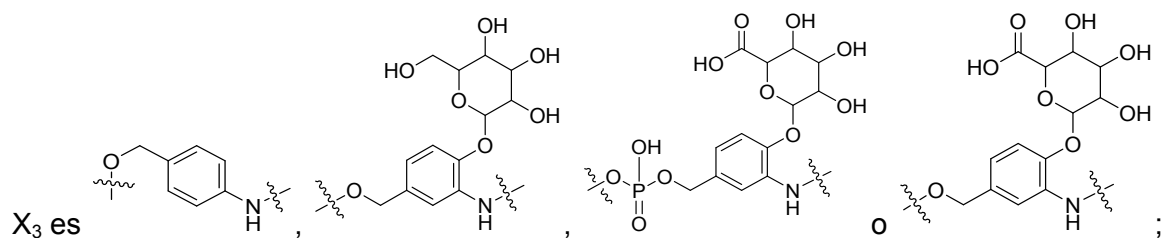
L_4 es $-((CH_2)_m)$;

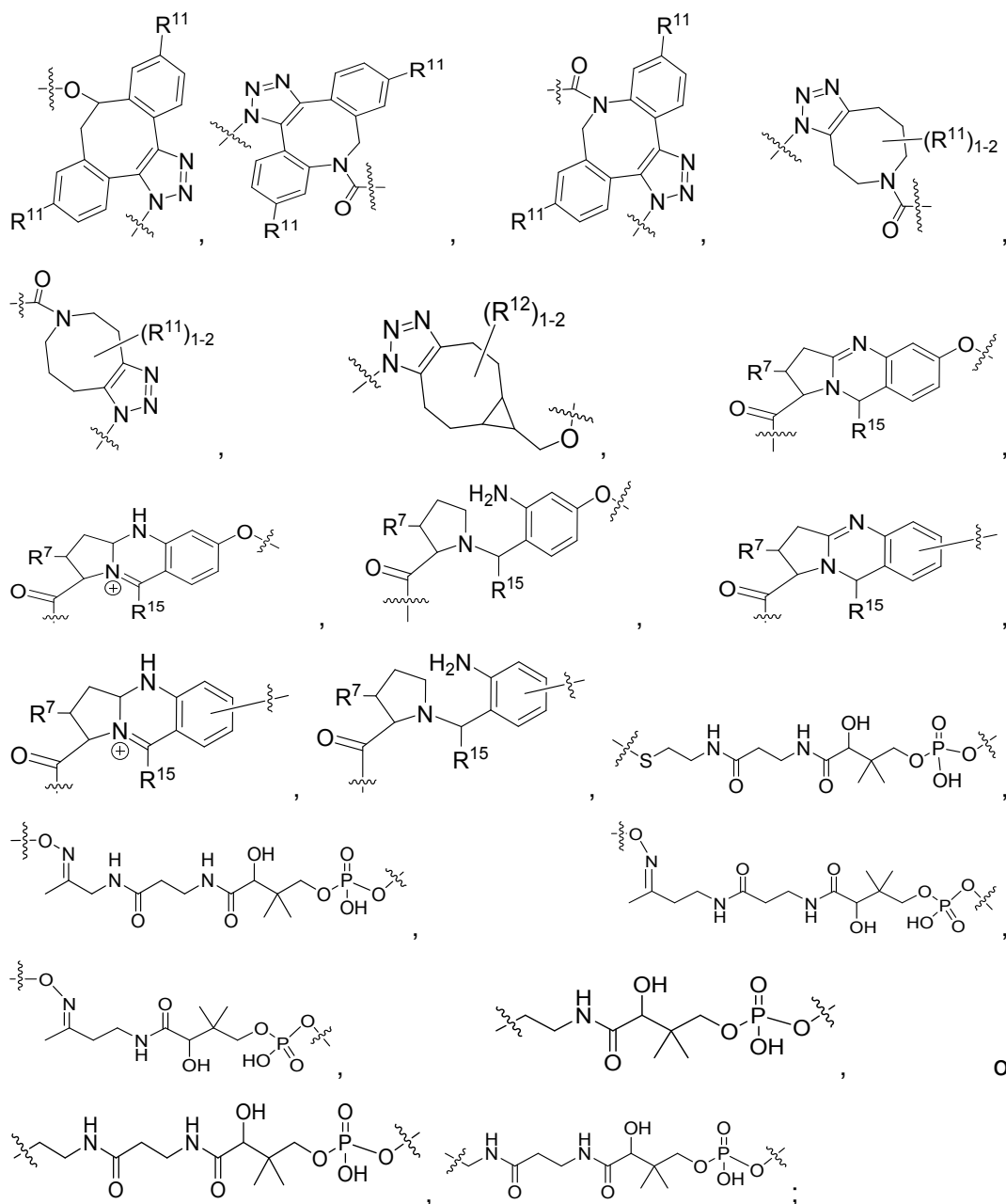
L_5 es $-NHS(=O)_2(CH_2)_mX_1L_4$, $-NH((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_1L_4$, $-NH((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_2L_4$,
 $-NH((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m$, $-NH(CH_2)_m$, $-NH(CH_2)_mX_1(CH_2)_m$,
 $-NH(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m$, $-NH(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_mC(=O)NH(CH_2)_m$,
 $-NH((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m$, $-NH((CH_2)_mO)_pCH_2)_mC(=O)NH(CH_2)_m$,
 $-NH(CH_2)_nC(R_7)_2$, $-NH(CH_2)_mC(R_7)_2SS(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m$ o
 $-NH(CH_2)_mX_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m$;





, donde el * indica punto de adhesión a L_4 ;





cada R^7 se selecciona independientemente entre H y alquilo C_1-C_6 ;

cada R^{10} se selecciona independientemente entre H, alquilo C_1-C_6 , F, Cl, y $-OH$;

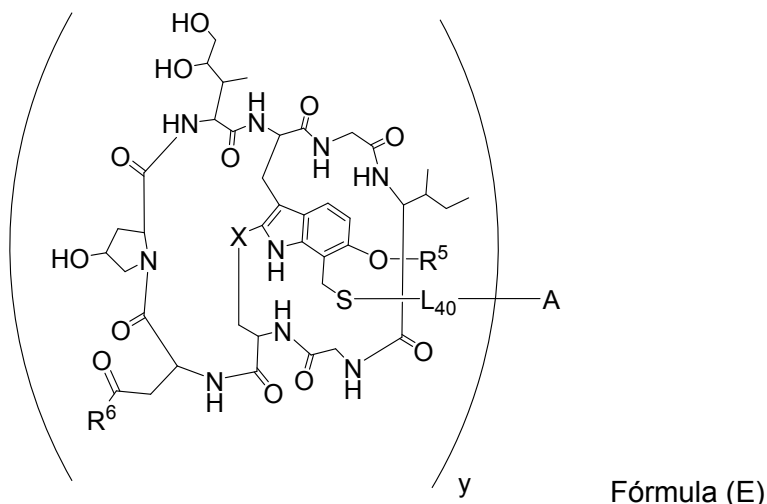
cada R^{11} se selecciona independientemente entre H, alquilo C_1-C_6 , F, Cl, $-NH_2$, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-N(CH_3)_2$, $-CN$, $-NO_2$ y $-OH$;

cada R^{12} se selecciona independientemente entre H, alquilo C_1-C_6 , flúor, benciloxi sustituido con $-C(=O)OH$, bencilo sustituido con $-C(=O)OH$, alcoxi C_{1-4} sustituido con $-C(=O)OH$ y alquilo C_{1-4} sustituido con $-C(=O)OH$;

cada R^{15} se selecciona independientemente entre H, $-CH_3$ y fenilo;

cada m se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, y
cada p se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13
y 14.

[00172] En otro aspecto los conjugados de la invención tienen la estructura de Fórmula
(E):



donde:

A representa un fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que se une específicamente a cKIT humano;

y es un número entero que va desde 1 hasta 10;

X es S(=O), S(=O)₂ o S;

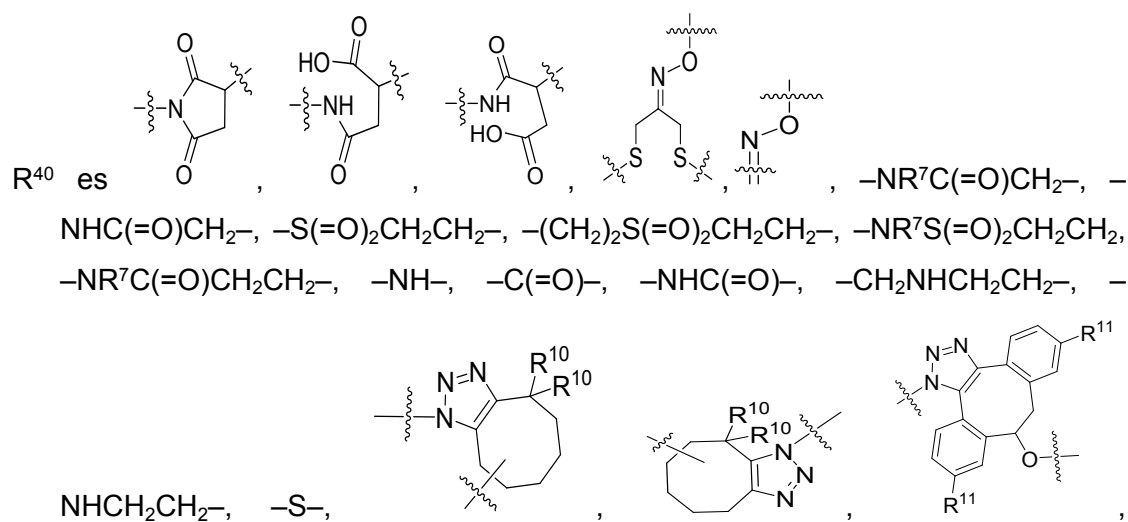
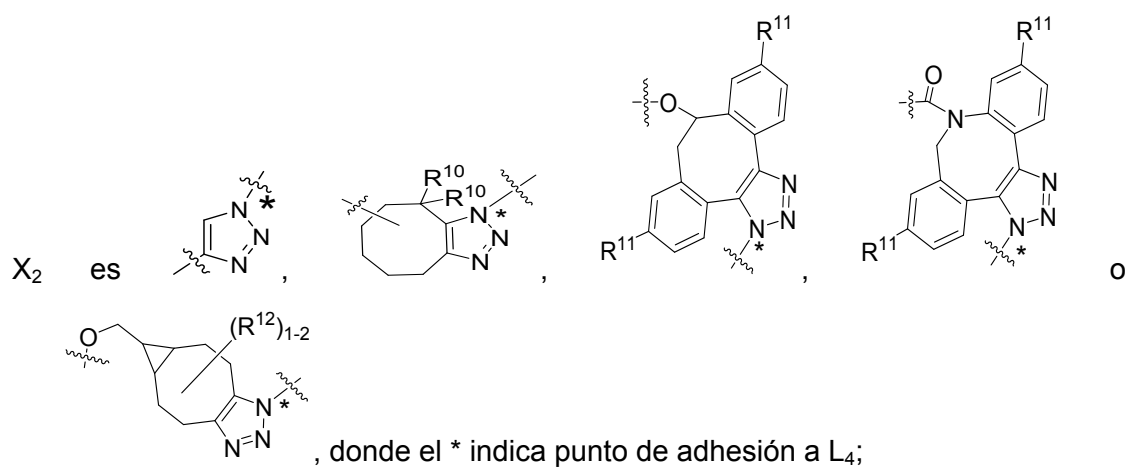
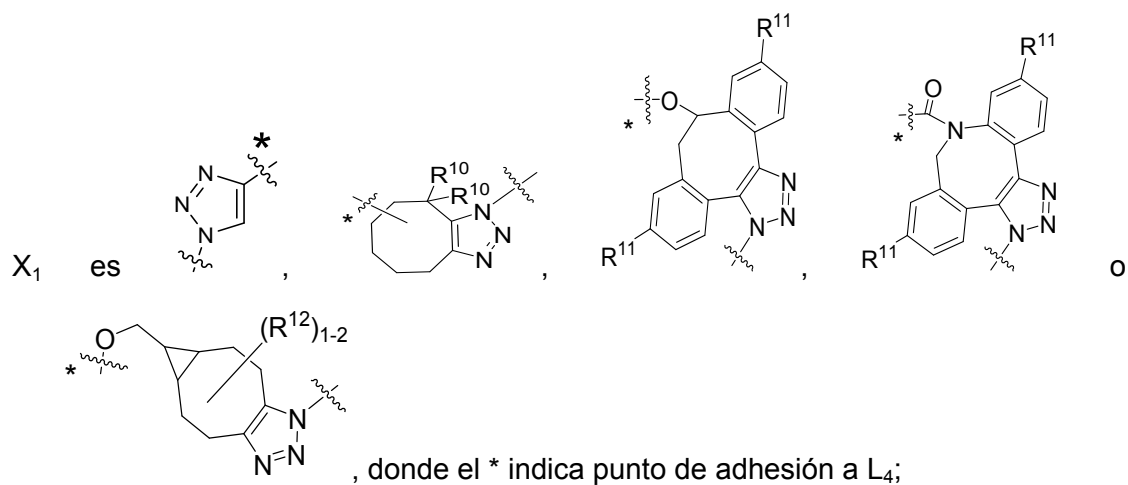
R⁵ es H, -CH₃ o -CD₃;

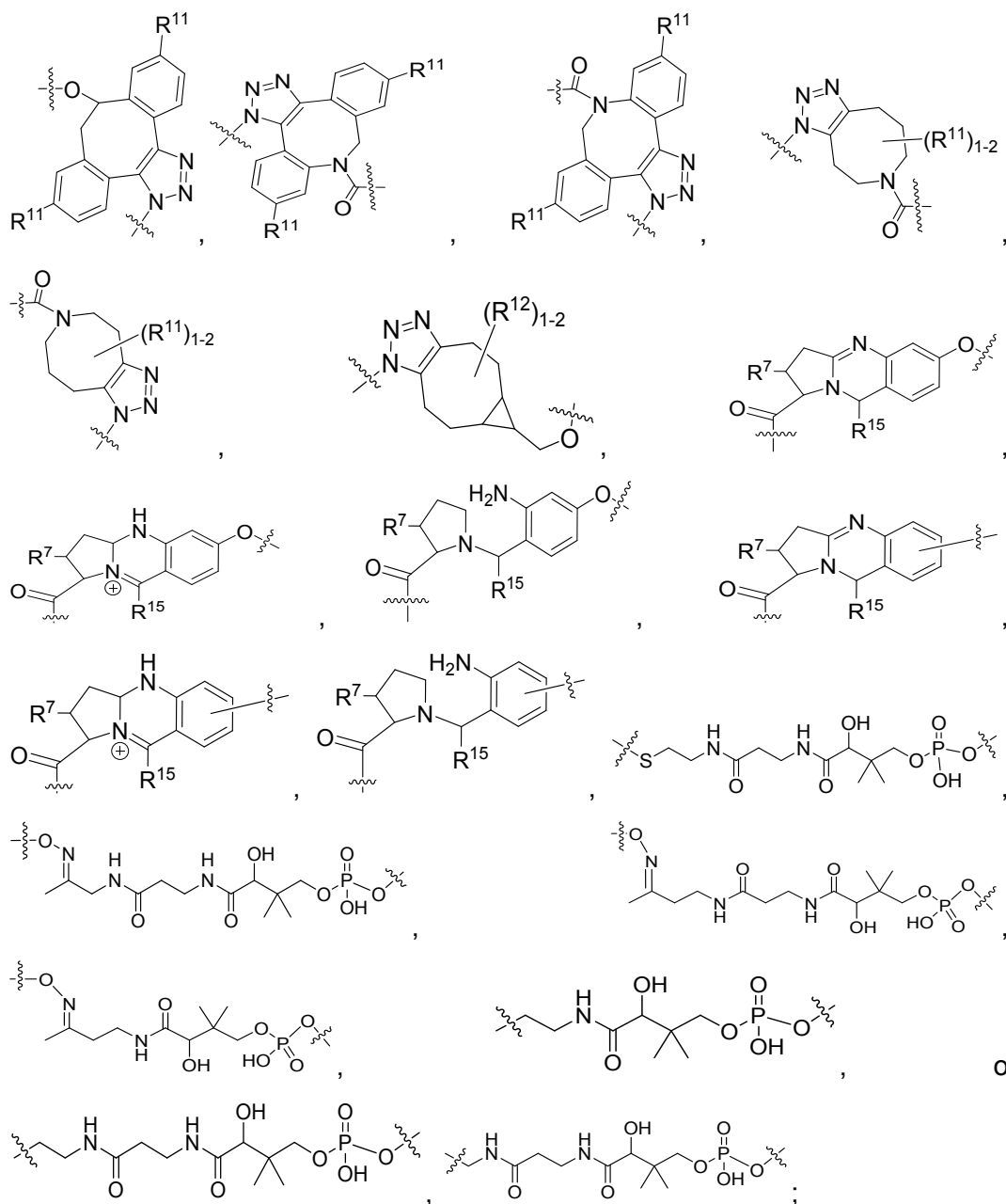
R⁶ es -NH₂ o -OH;

L₄₀ es -L₆R⁴⁰;

L₆ es $-\text{((CH}_2\text{)}_m\text{O)}_p\text{(CH}_2\text{)}_m\text{X}_1\text{L}_4-$, $-\text{((CH}_2\text{)}_m\text{O)}_p\text{(CH}_2\text{)}_m\text{X}_2\text{L}_4-$, $-\text{L}_4\text{NHC(=O)NH((CH}_2\text{)}_m\text{O)}_p\text{(CH}_2\text{)}_m\text{X}_1\text{L}_4-$, $-\text{L}_4\text{NHC(=O)NH((CH}_2\text{)}_m\text{O)}_p\text{(CH}_2\text{)}_m\text{X}_2\text{L}_4-$, $-\text{((CH}_2\text{)}_m\text{O)}_p\text{(CH}_2\text{)}_m-$, $-(\text{CH}_2\text{)}_m-$, $-(\text{CH}_2\text{)}_m\text{X}_1(\text{CH}_2\text{)}_m-$, $-(\text{CH}_2\text{)}_m\text{NHC(=O)(CH}_2\text{)}_m-$, $-(\text{CH}_2\text{)}_m\text{NHC(=O)(CH}_2\text{)}_m\text{C(=O)NH(CH}_2\text{)}_m-$, $-\text{((CH}_2\text{)}_m\text{O)}_p\text{(CH}_2\text{)}_m\text{NHC(=O)(CH}_2\text{)}_m-$, $-\text{((CH}_2\text{)}_m\text{O)}_p\text{(CH}_2\text{)}_m\text{C(=O)NH(CH}_2\text{)}_m-$, $-(\text{CH}_2\text{)}_m\text{C(R}_7\text{)}_2-$ o $-(\text{CH}_2\text{)}_m\text{C(R}_7\text{)}_2\text{SS(CH}_2\text{)}_m\text{NHC(=O)(CH}_2\text{)}_m-$;

L₄ es $-\text{((CH}_2\text{)}_m)-$;





cada R⁷ se selecciona independientemente entre H y alquilo C₁–C₆;

cada R¹⁰ se selecciona independientemente entre H, alquilo C₁–C₆, F, Cl, y –OH;

cada R¹¹ se selecciona independientemente entre H, alquilo C₁–C₆, F, Cl, –NH₂, –OCH₃, –OCH₂CH₃, –N(CH₃)₂, –CN, –NO₂ y –OH;

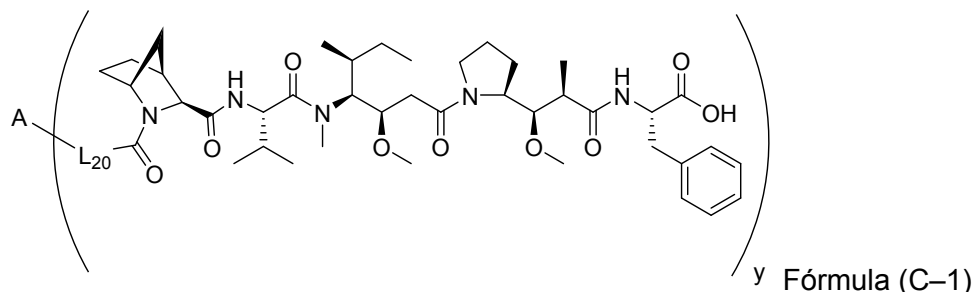
cada R¹² se selecciona independientemente entre H, alquilo C₁–C₆, flúor, benciloxi sustituido con –C(=O)OH, bencilo sustituido con –C(=O)OH, alcoxi C₁–C₄ sustituido con –C(=O)OH y alquilo C₁–C₄ sustituido con –C(=O)OH;

cada R¹⁵ se selecciona independientemente entre H, –CH₃ y fenilo;

cada m se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, y cada p se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14.

[00173] Ciertos aspectos y ejemplos de los conjugados de la invención se proporcionan en el siguiente listado de realizaciones enumeradas, adicionales. Se reconocerá que características especificadas en cada realización pueden combinarse con otras características especificadas para proporcionar realizaciones adicionales de la presente invención.

[00174] Realización 15. El conjugado que tiene la estructura de Fórmula (C) es un conjugado que tiene la estructura de Fórmula (C-1):



donde: A, y, y L_{20} con como se definió con anterioridad.

[00175] Realización 16. El conjugado que tiene la estructura de Fórmula (C) o Fórmula (C-1) donde:

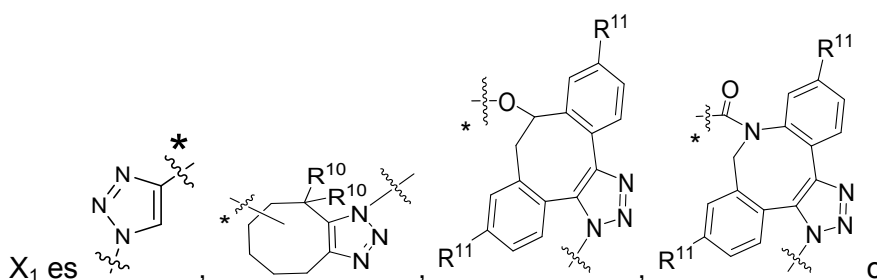
A representa un fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que se une específicamente a cKIT humano;

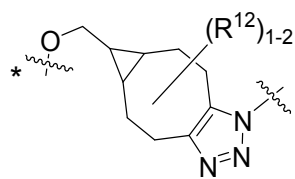
y es un número entero que va desde 1 hasta 10;

L_{20} es $-L_1R^{40}$;

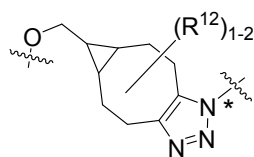
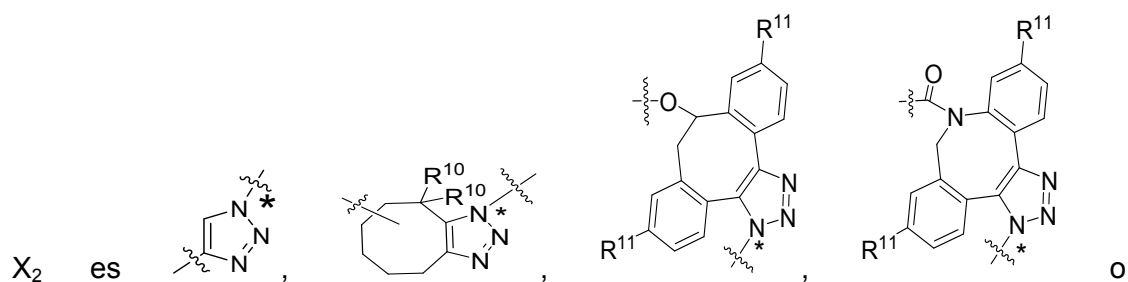
L_1 es $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_1L_4-$, $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_2L_4-$, $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m-$, $-(CH_2)_m-$, $-X_3X_4C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m-$, $-X_3X_4C(=O)(CH_2)_m-$, $-X_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m-$, $-X_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m-$;

L_4 es $-((CH_2)_m-$;

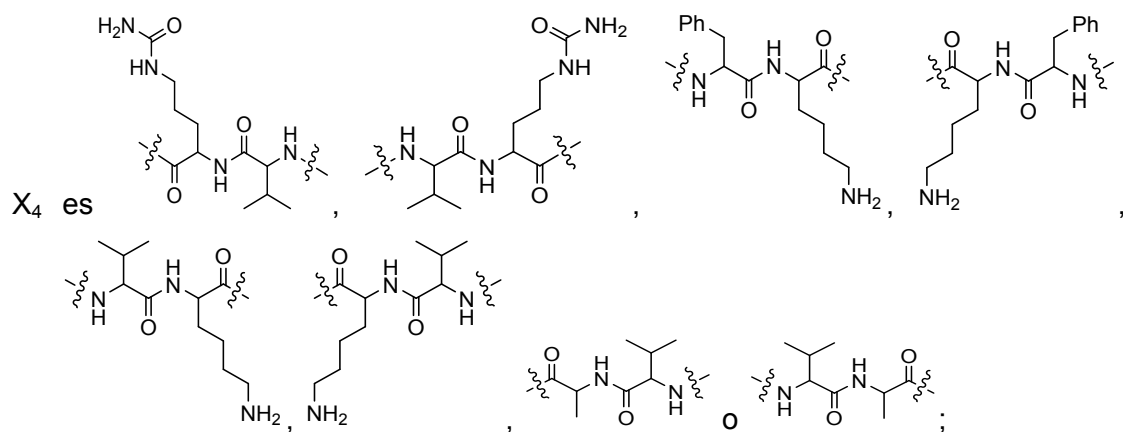
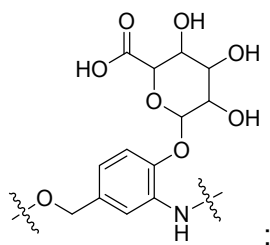
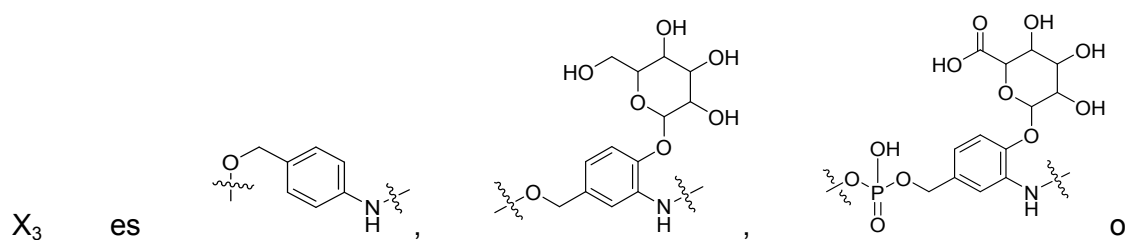


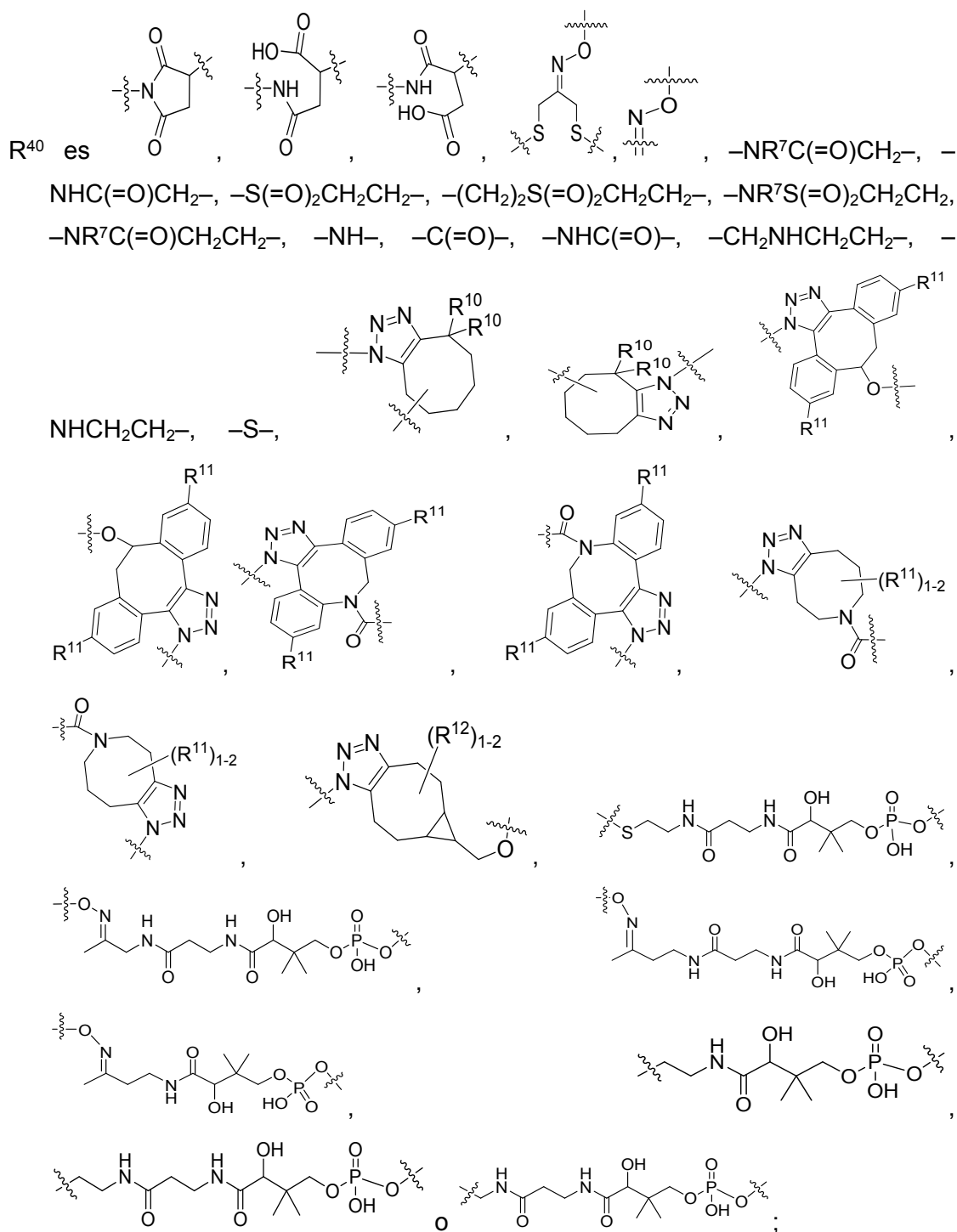


, donde el * indica punto de adhesión a L₄;



, donde el * indica punto de adhesión a L₄;





cada R^7 se selecciona independientemente entre H y alquilo $\text{C}_1\text{--C}_6$;

cada R^{10} se selecciona independientemente entre H, alquilo $\text{C}_1\text{--C}_6$, F, Cl, y $-\text{OH}$;

cada R^{11} se selecciona independientemente entre H, alquilo $\text{C}_1\text{--C}_6$, F, Cl, $-\text{NH}_2$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CN}$, $-\text{NO}_2$ y $-\text{OH}$;

cada R^{12} se selecciona independientemente entre H, alquilo C_{1-6} , flúor, benciloxi sustituido con $-C(=O)OH$, bencilo sustituido con $-C(=O)OH$, alcoxi C_{1-4} sustituido con $-C(=O)OH$ y alquilo C_{1-4} sustituido con $-C(=O)OH$;

cada m se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, y

cada p se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14.

[00176] Realización 17. El conjugado que tiene la estructura de Fórmula (C) o Fórmula (C-1), donde:

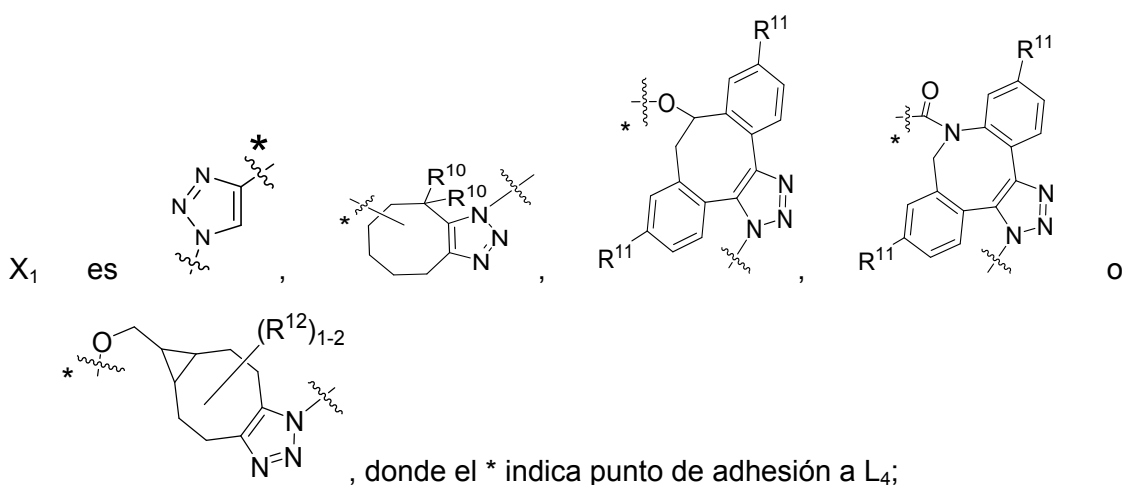
A representa un fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que se une específicamente a cKIT humano;

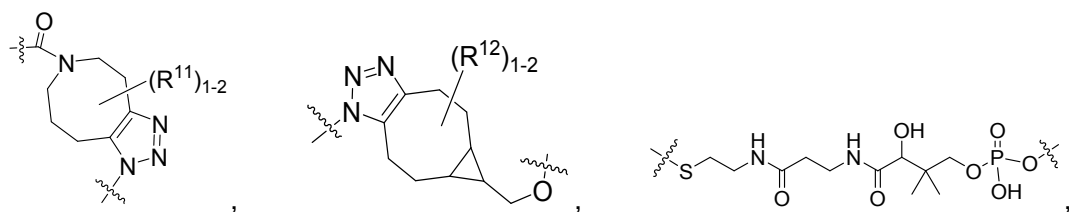
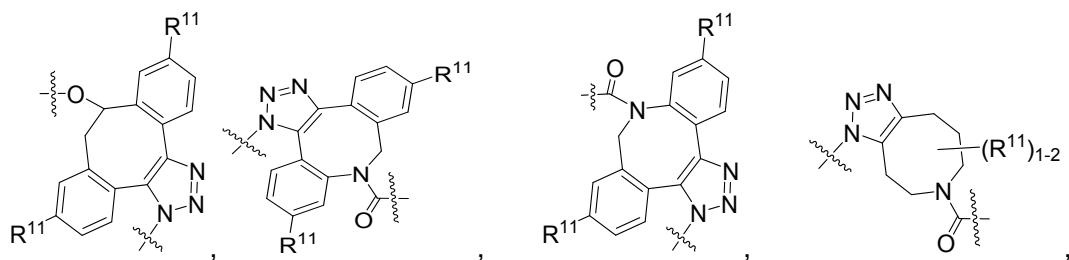
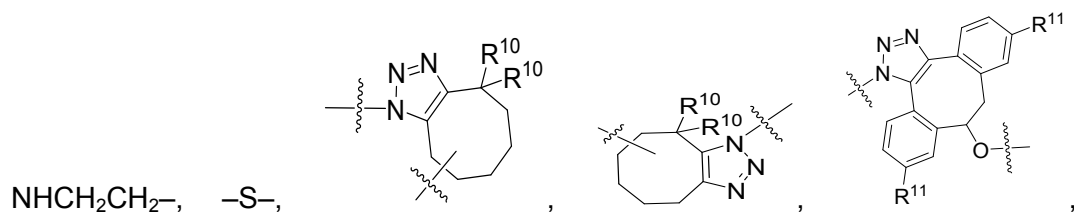
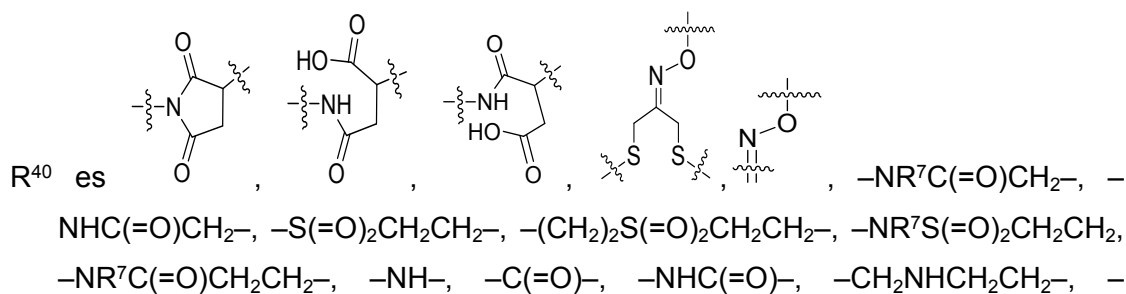
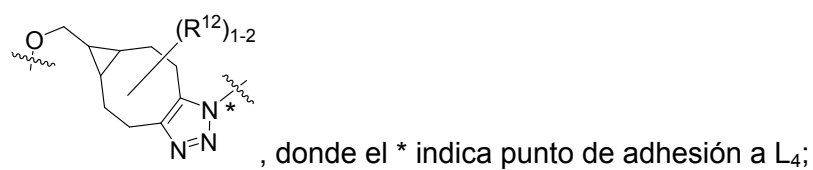
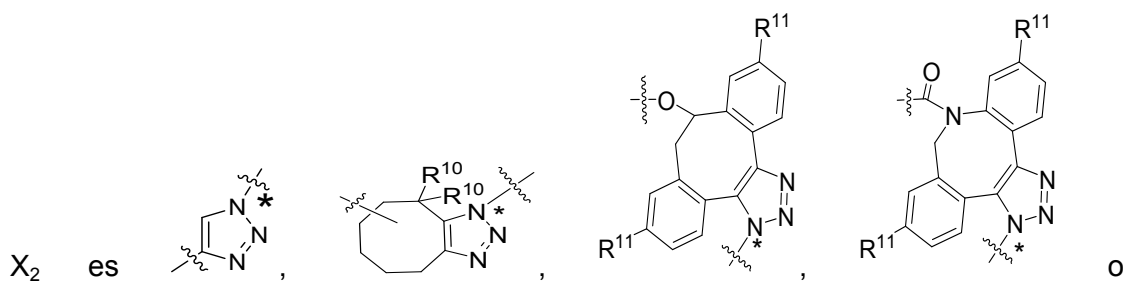
y es un número entero que va desde 1 hasta 10;

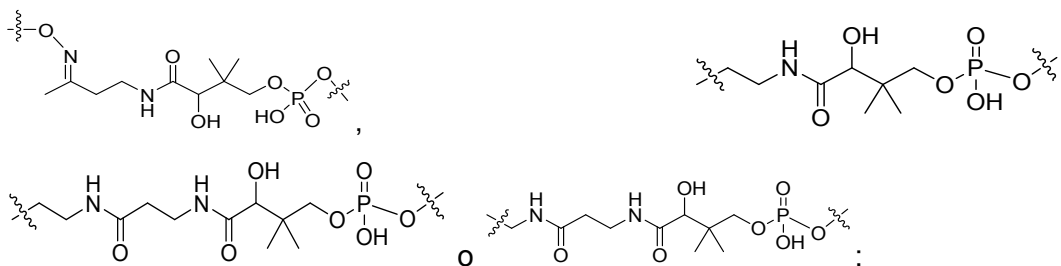
L_{20} es $-L_1R^{40}$;

L_1 es $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_1L_4-$, $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_2L_4-$, $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m-$ o $-(CH_2)_m-$;

L_4 es $-((CH_2)_m-$







cada R^7 se selecciona independientemente entre H y alquilo C_1-C_6 ;

cada R^{10} se selecciona independientemente entre H, alquilo C_1-C_6 , F, Cl, y $-OH$;

cada R^{11} se selecciona independientemente entre H, alquilo C_1-C_6 , F, Cl, $-NH_2$, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-N(CH_3)_2$, $-CN$, $-NO_2$ y $-OH$;

cada R^{12} se selecciona independientemente entre H, alquilo C_{1-6} , flúor, benciloxi sustituido con $-C(=O)OH$, bencilo sustituido con $-C(=O)OH$, alcoxi C_{1-4} sustituido con $-C(=O)OH$ y alquilo C_{1-4} sustituido con $-C(=O)OH$;

cada m se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, y

cada p se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14.

[00177] Realización 18. El conjugado que tiene la estructura de Fórmula (C) o Fórmula (C-1), donde:

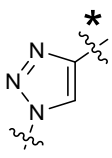
A representa un fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que se une específicamente a cKIT humano;

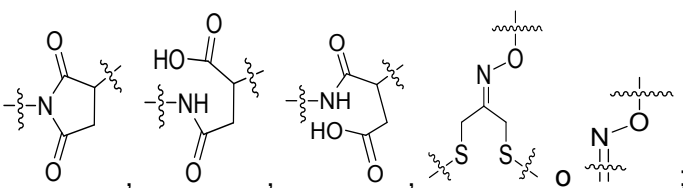
y es un número entero que va desde 1 hasta 10;

L_{20} es $-L_1R^{40}$;

L_1 es $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_1L_4-$, $-((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m-$ o $-(CH_2)_m-$;

L_4 es $-((CH_2)_m)$;

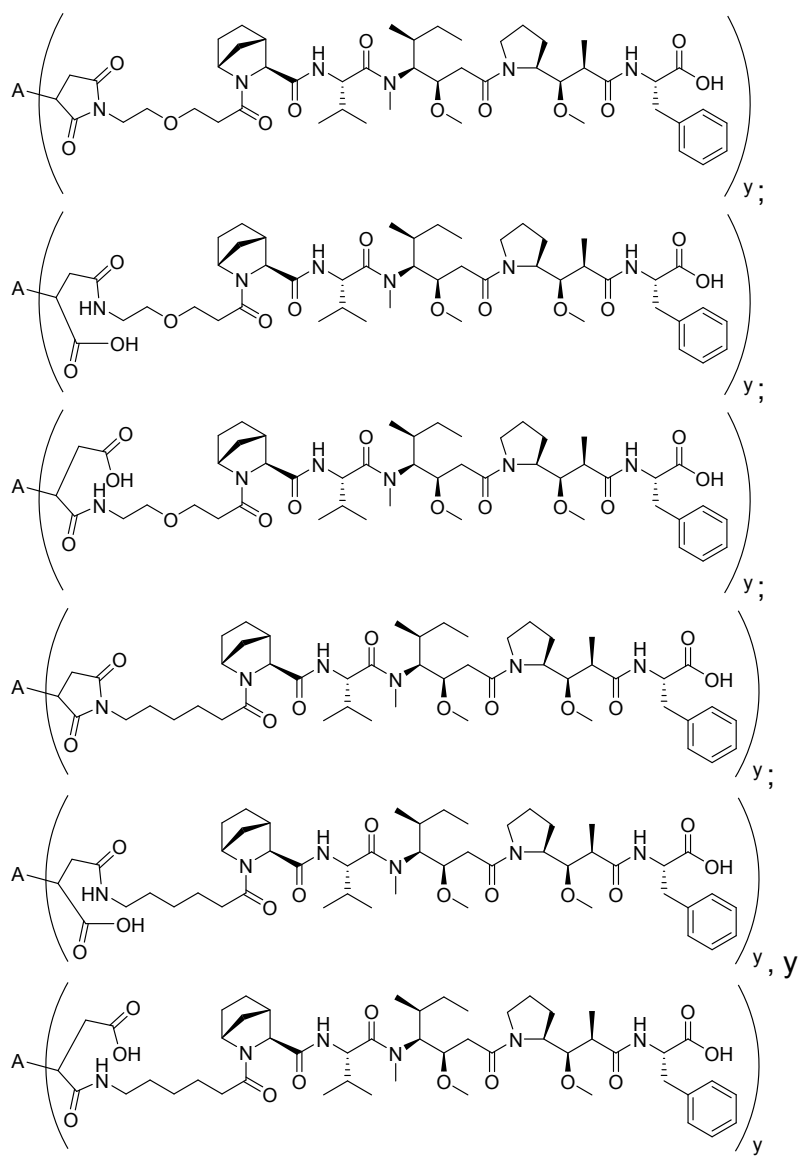
X_1 es , donde el * indica punto de adhesión a L_4 ;

R^{40} es ;

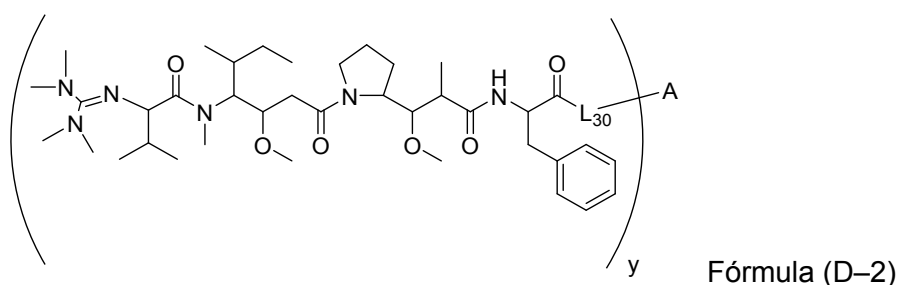
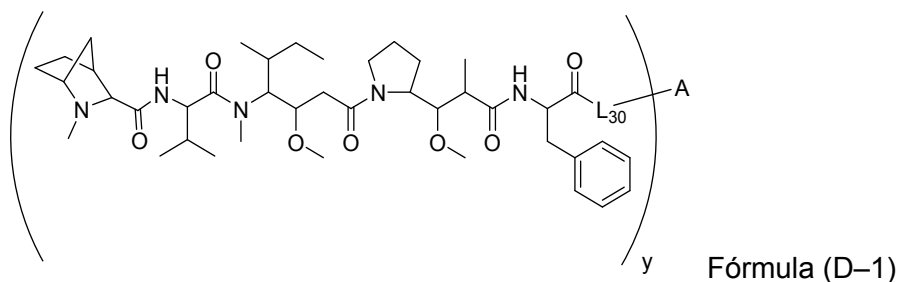
cada m se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, y

cada p se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14.

[00178] Realización 19. El conjugado que tiene la estructura de Fórmula (C) o Fórmula (C-1) que se selecciona entre:

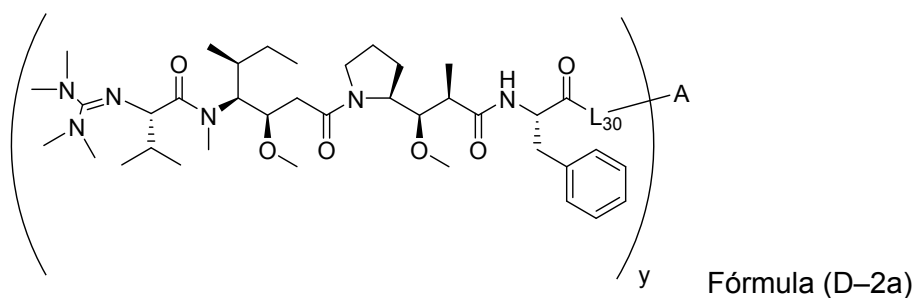
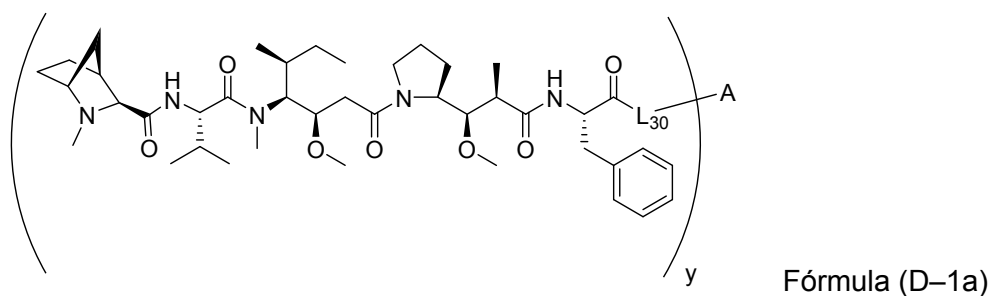


[00179] Realización 20. El conjugado que tiene la estructura de Fórmula (D) es un conjugado que tiene la estructura de Fórmula (D-1) o Fórmula (D-2):



donde: A, y y L_{30} con como se definió con anterioridad.

[00180] Realización 21. El conjugado que tiene la estructura de Fórmula (D) es un conjugado que tiene la estructura de Fórmula (D-1a) o Fórmula (D-2a):



donde: A, y y L_{30} con como se definió con anterioridad.

[00181] Realización 22. El conjugado que tiene la estructura de Fórmula (D), Fórmula (D-1), Fórmula (D-2), Fórmula (D-1a) o Fórmula (D-2a), donde:

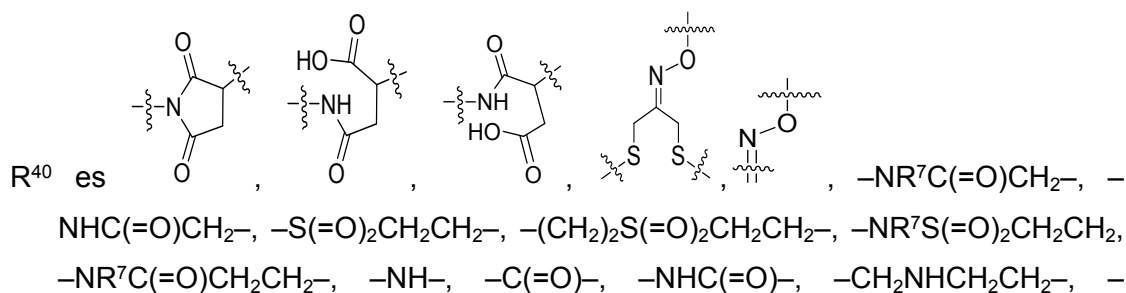
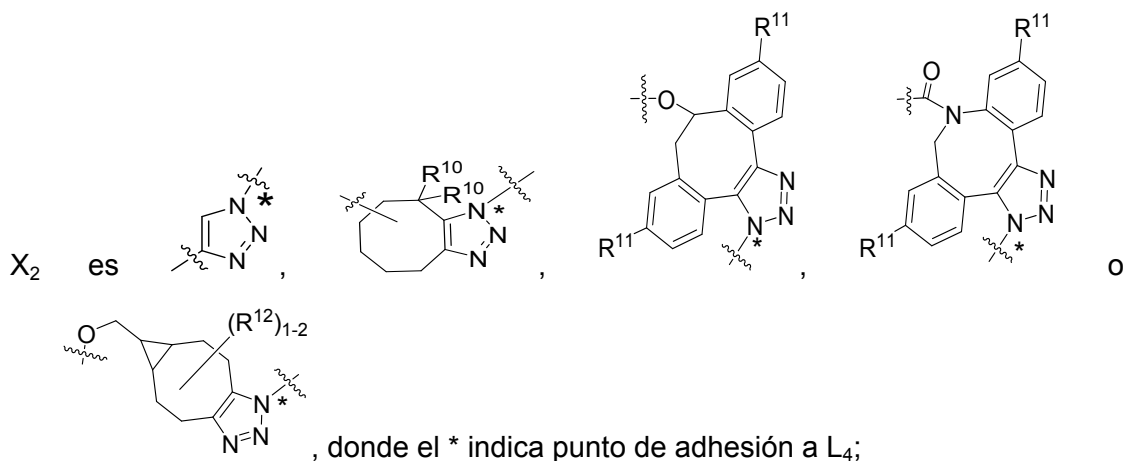
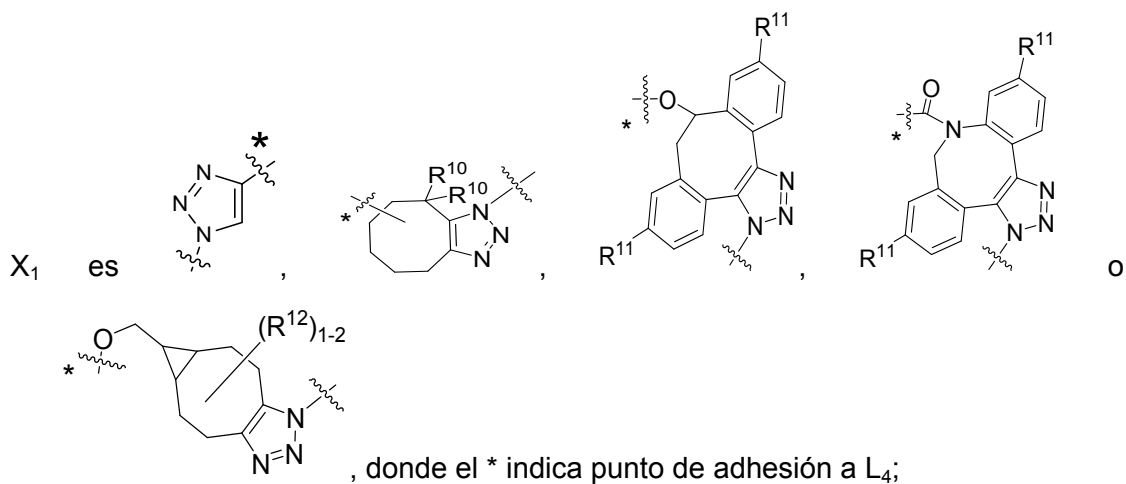
A representa un fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que se une específicamente a cKIT humano;

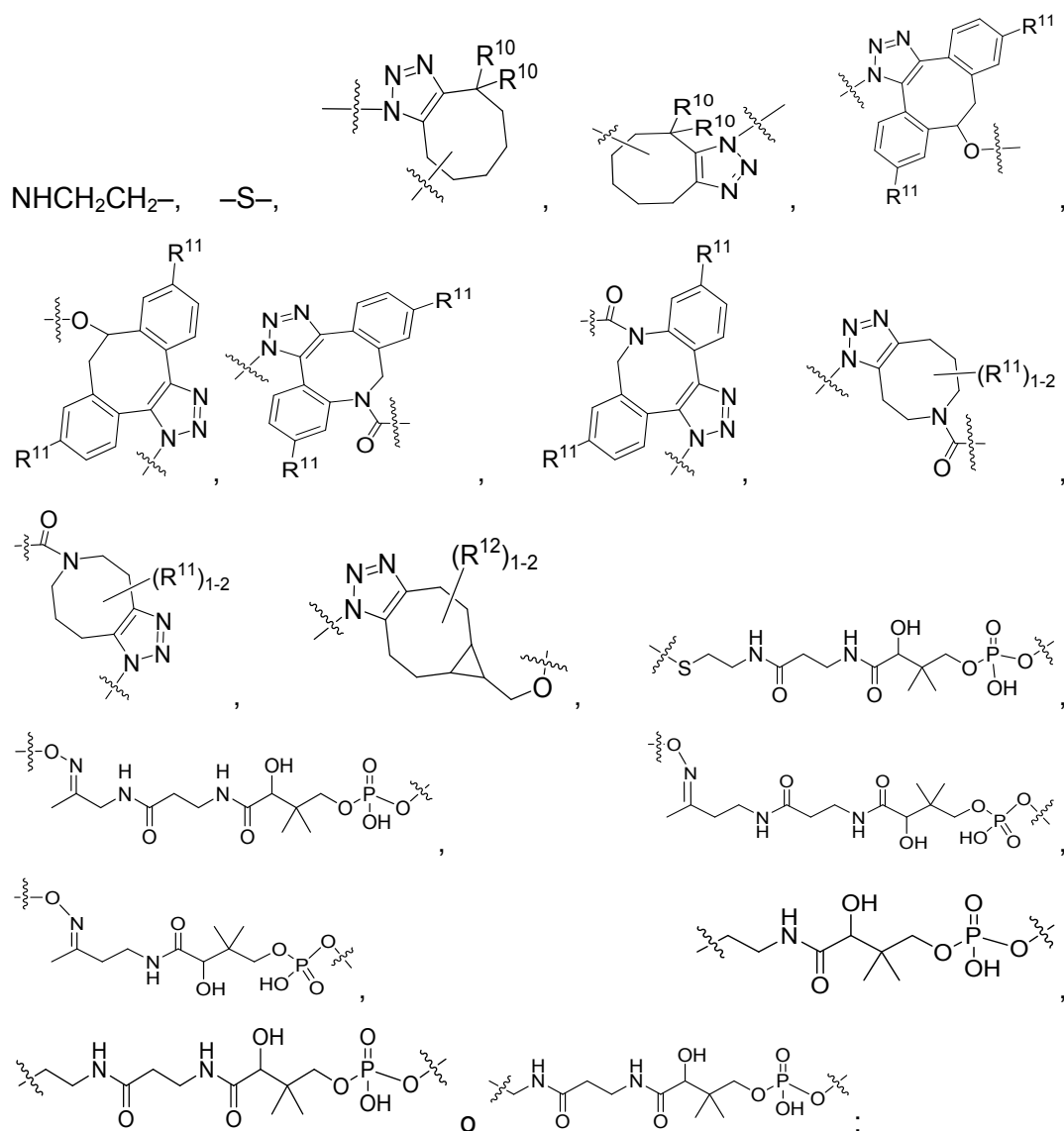
y es un número entero que va desde 1 hasta 10;

L_{30} es $-L_5R^{40}$;

L_4 es $-((CH_2)_m$;

L_5 es $-NHS(=O)_2(CH_2)_mX_1L_4$, $-NH((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_1L_4-$, $-NH((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_2L_4-$,
 $-NH((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m-$ o $-NH(CH_2)_m-$;





cada R^7 se selecciona independientemente entre H y alquilo $\text{C}_1\text{--C}_6$;

cada R^{10} se selecciona independientemente entre H, alquilo $\text{C}_1\text{--C}_6$, F, Cl, y $-\text{OH}$;

cada R^{11} se selecciona independientemente entre H, alquilo $\text{C}_1\text{--C}_6$, F, Cl, $-\text{NH}_2$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CN}$, $-\text{NO}_2$ y $-\text{OH}$;

cada R^{12} se selecciona independientemente entre H, alquilo C_{1-6} , flúor, benciloxi sustituido con $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$, bencilo sustituido con $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$, alcoxi C_{1-4} sustituido con $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$ y alquilo C_{1-4} sustituido con $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$;

cada m se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, y

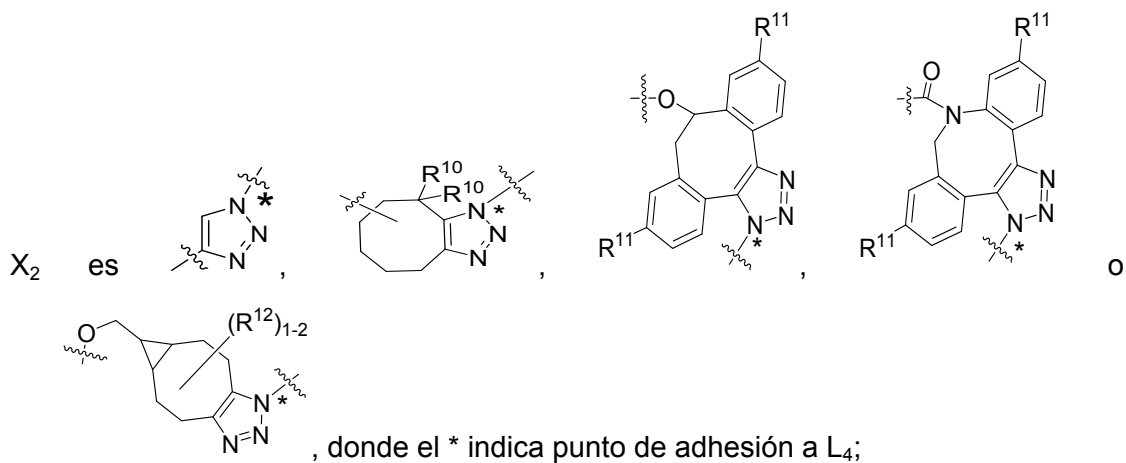
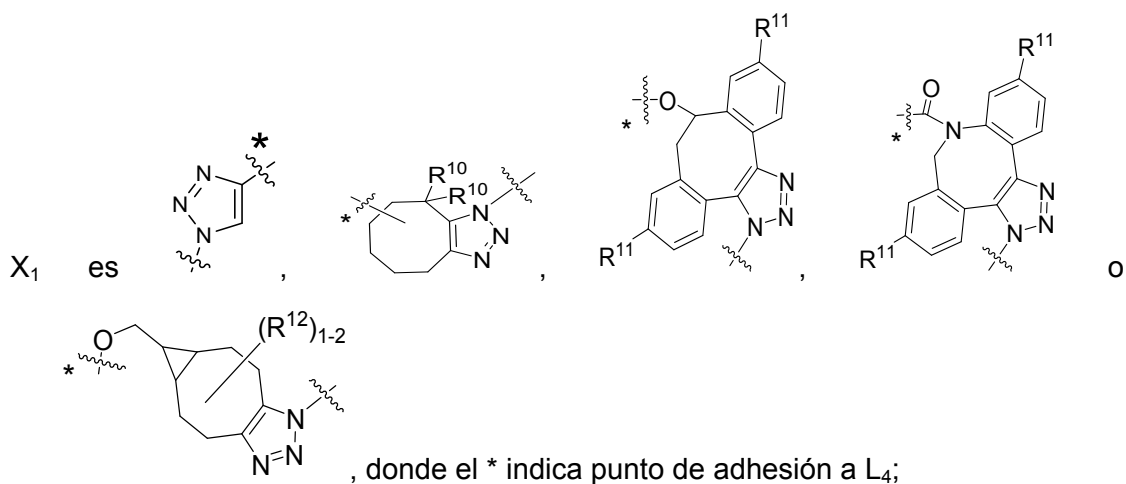
cada p se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14.

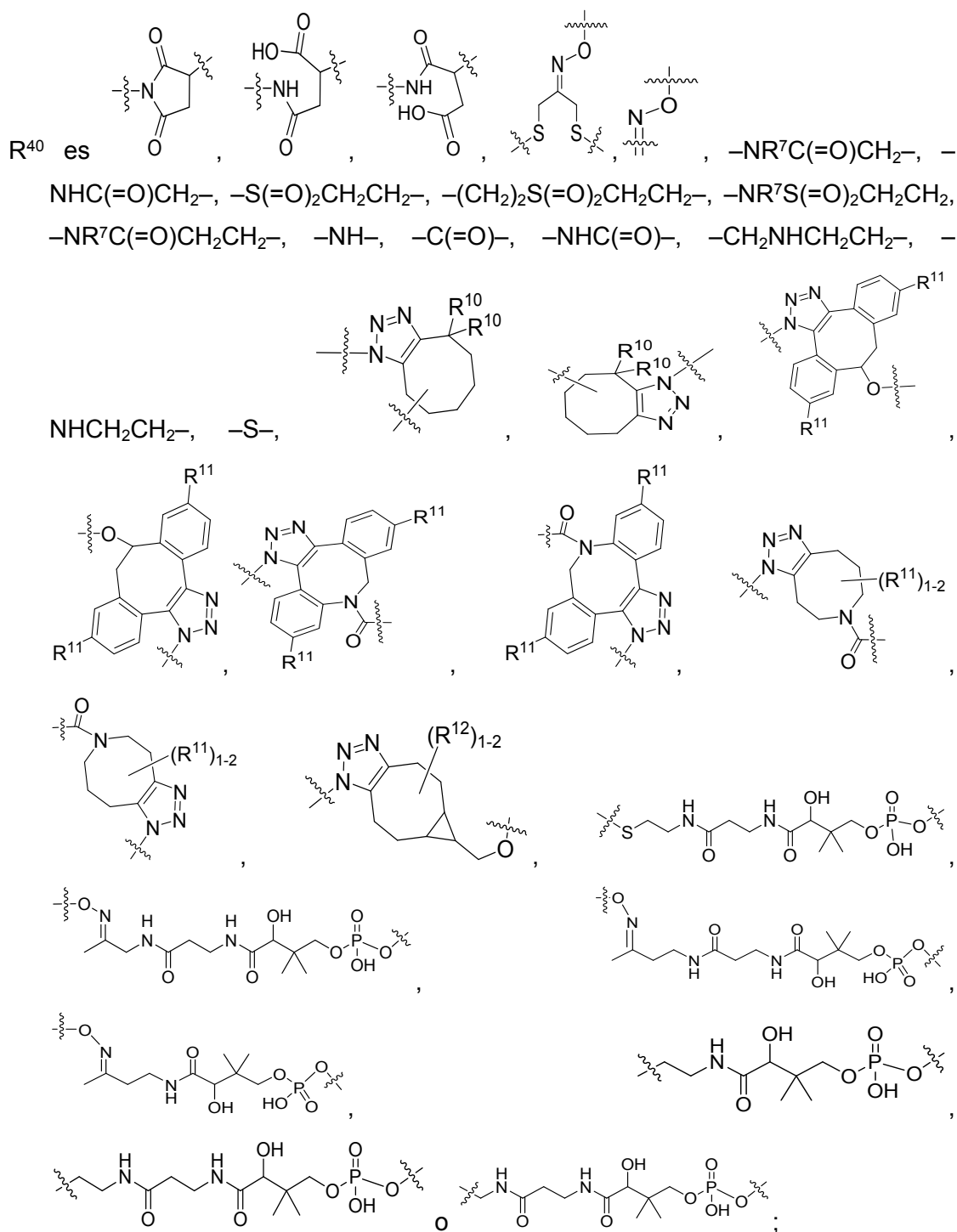
[00182] Realización 23. El conjugado que tiene la estructura de Fórmula (D), Fórmula (D-1), Fórmula (D-2), Fórmula (D-1a) o Fórmula (D-2a):

donde:

A representa un fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que se une específicamente a cKIT humano;

y es un número entero que va desde 1 hasta 10;

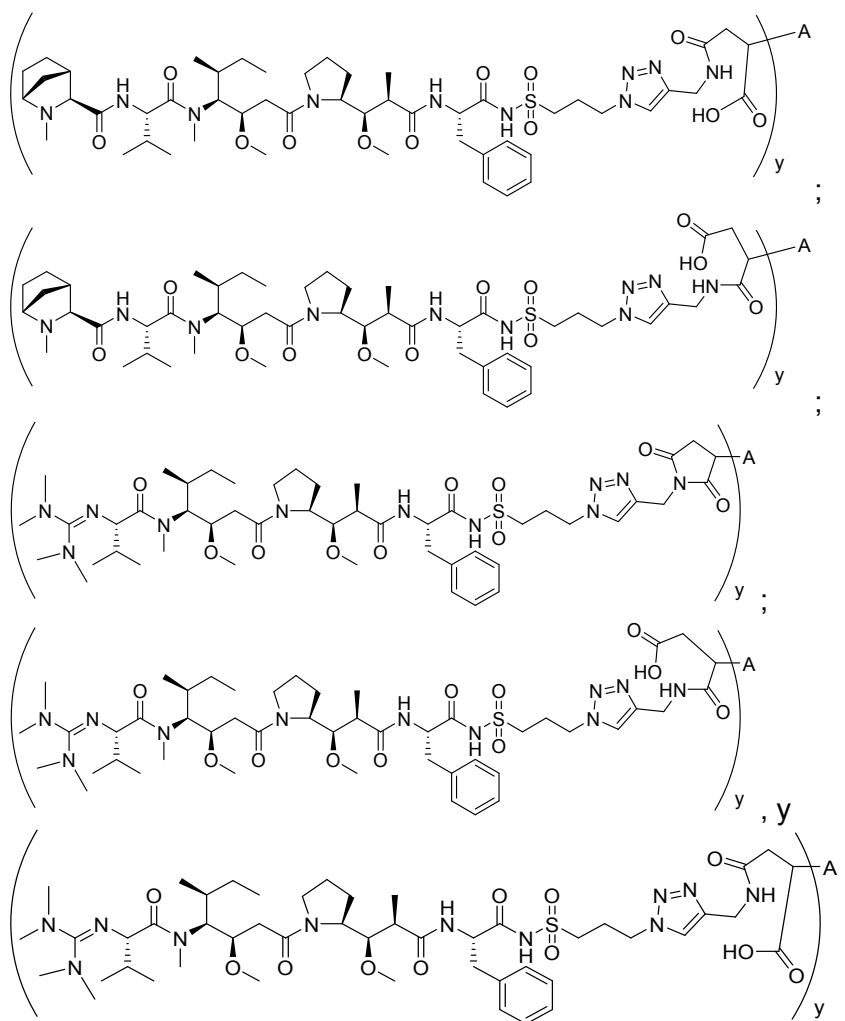
$$L_{30} \text{ es } -L_5 R^{40};$$
$$L_4 \text{ es } -((CH_2)_m;$$
$$\text{L}_5 \text{ es } -\text{NHS}(=\text{O})_2(\text{CH}_2)_m\text{X}_1\text{L}_4, -\text{NH}((\text{CH}_2)_m\text{O})_p(\text{CH}_2)_m\text{X}_1\text{L}_4-, -\text{NH}((\text{CH}_2)_m\text{O})_p(\text{CH}_2)_m\text{X}_2\text{L}_4-, \\ , -\text{NH}((\text{CH}_2)_m\text{O})_p(\text{CH}_2)_m- \text{ o } -\text{NH}(\text{CH}_2)_m-;$$




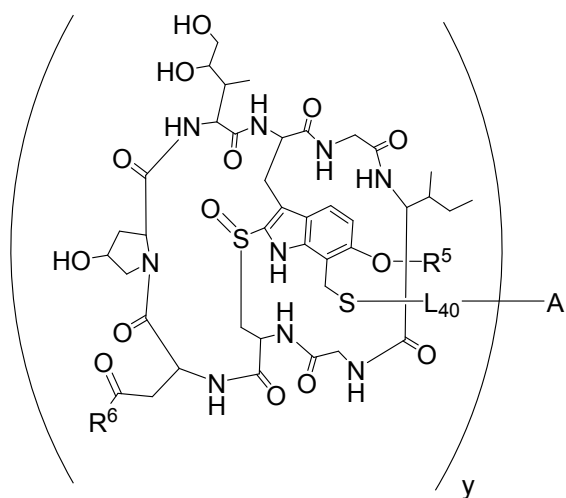
cada R^7 se selecciona independientemente entre H y alquilo C_1-C_6 ;

cada R^{10} se selecciona independientemente entre H, alquilo C_1-C_6 , F, Cl, y $-OH$;

cada R^{11} se selecciona independientemente entre H, alquilo C_1-C_6 , F, Cl, $-NH_2$, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-N(CH_3)_2$, $-CN$, $-NO_2$ y $-OH$;



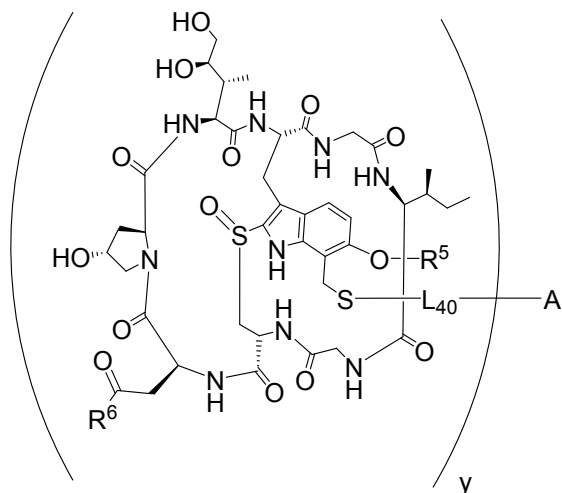
[00185] Realización 26. El conjugado que tiene la estructura de Fórmula (E) es un conjugado que tiene la estructura de Fórmula (E-1):



Fórmula (E-1)

donde: A, y, R⁵, R⁶ y L₄₀ son como se define con anterioridad.

[00186] Realización 27. El conjugado que tiene la estructura de Fórmula (E) es un conjugado que tiene la estructura de Fórmula (E-1a):



Fórmula (E-1a)

donde: A, y, R⁵, R⁶ y L₄₀ son como se define con anterioridad.

[00187] Realización 28. El conjugado que tiene la estructura de Fórmula (E), Fórmula (E-1) o Fórmula (E-1a), donde:

A representa un fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que se une específicamente a cKIT humano;

y es un número entero que va desde 1 hasta 10;

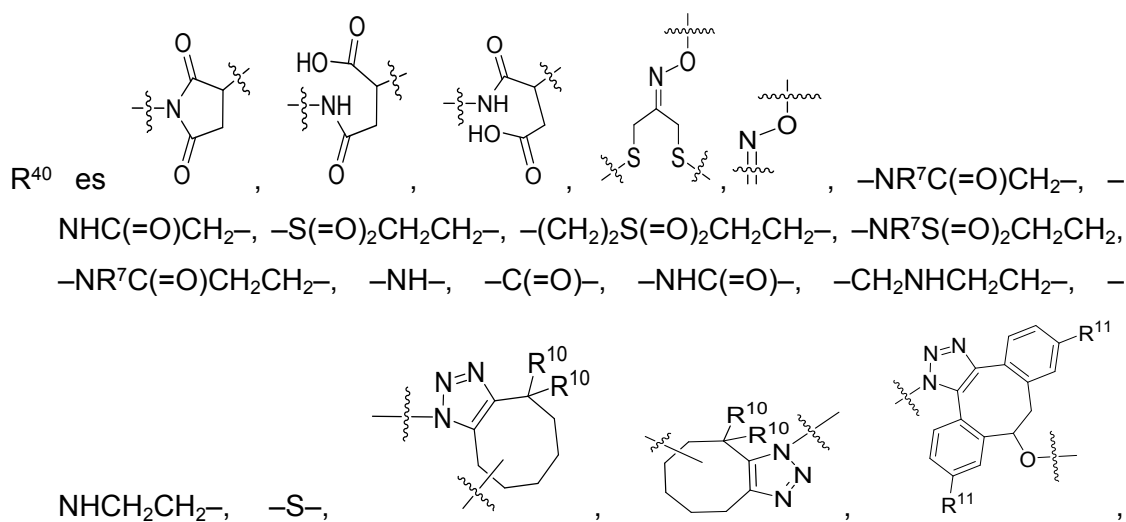
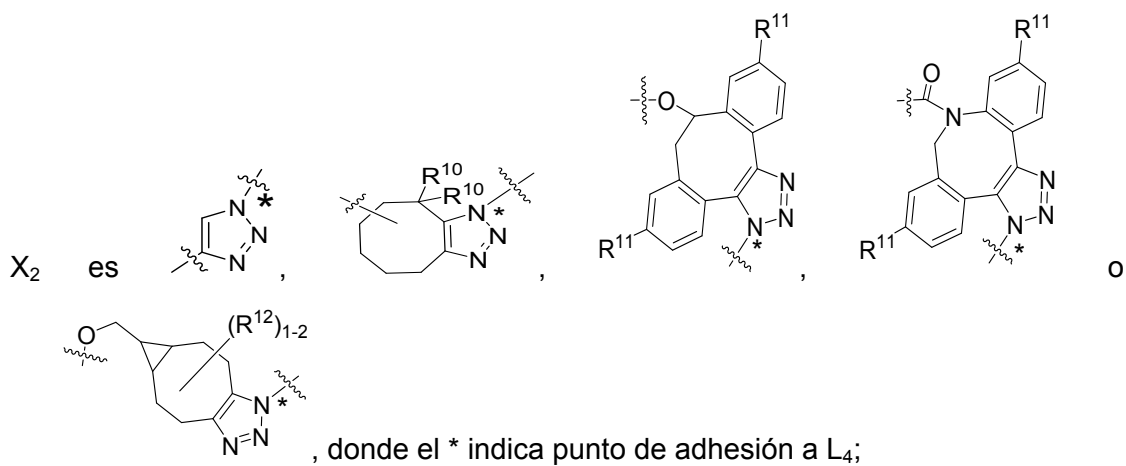
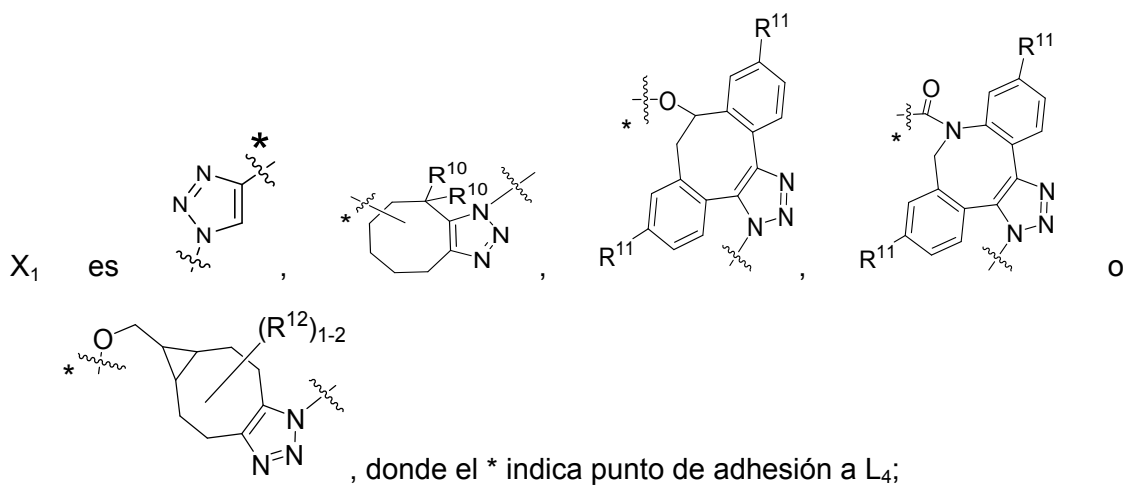
R⁵ es H, -CH₃ o -CD₃;

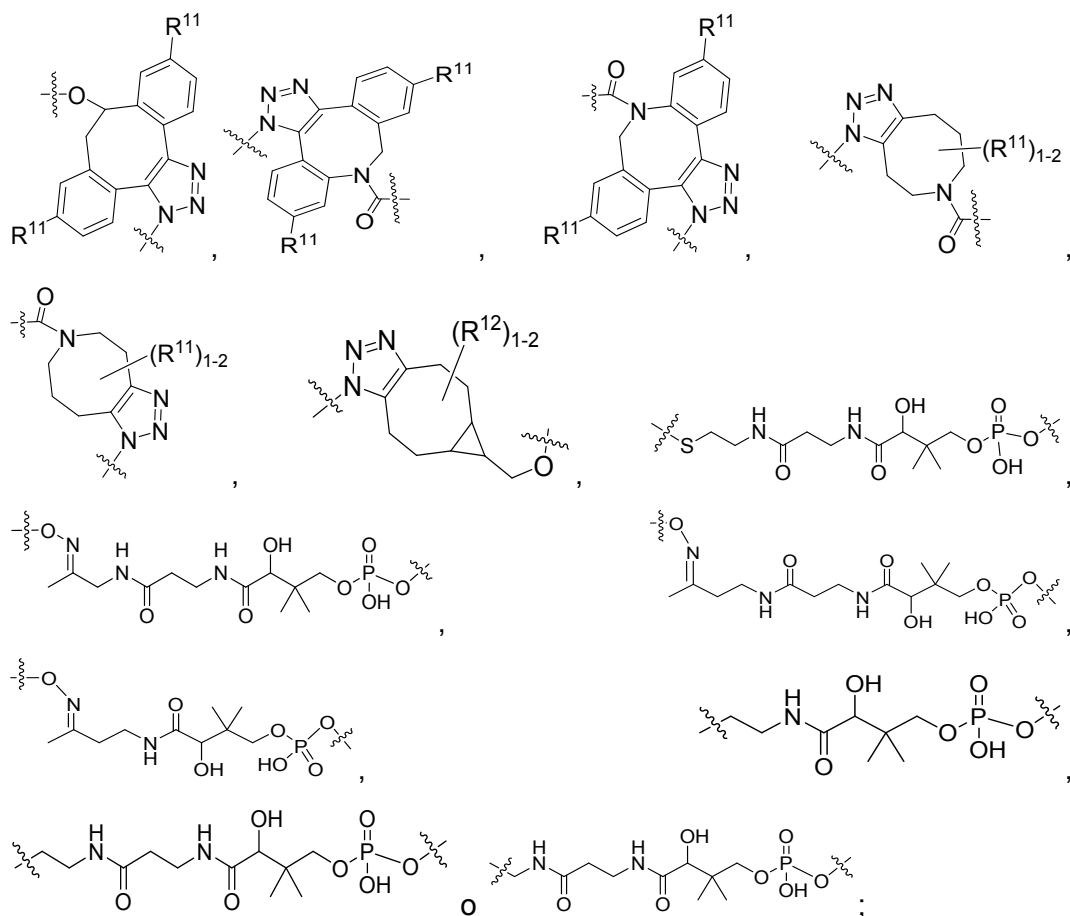
R⁶ es -NH₂ o -OH;

L₄₀ es -L₆R⁴⁰;

L₆ es -((CH₂)_mO)_p(CH₂)_mX₁L₄-, -((CH₂)_mO)_p(CH₂)_mX₂L₄-, -L₄NHC(=O)NH((CH₂)_mO)_p(CH₂)_mX₁L₄-, -L₄NHC(=O)NH((CH₂)_mO)_p(CH₂)_mX₂L₄-, -((CH₂)_mO)_p(CH₂)_m- o -(CH₂)_m-;

L₄ es -((CH₂)_m);





cada R⁷ se selecciona independientemente entre H y alquilo C₁–C₆;

cada R¹⁰ se selecciona independientemente entre H, alquilo C₁–C₆, F, Cl, y –OH;

cada R¹¹ se selecciona independientemente entre H, alquilo C₁–C₆, F, Cl, –NH₂, –OCH₃, –OCH₂CH₃, –N(CH₃)₂, –CN, –NO₂ y –OH;

cada R¹² se selecciona independientemente entre H, alquilo C_{1–6}, flúor, benciloxi sustituido con –C(=O)OH, bencilo sustituido con –C(=O)OH, alcoxi C_{1–4} sustituido con –C(=O)OH y alquilo C_{1–4} sustituido con –C(=O)OH;

cada m se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, y

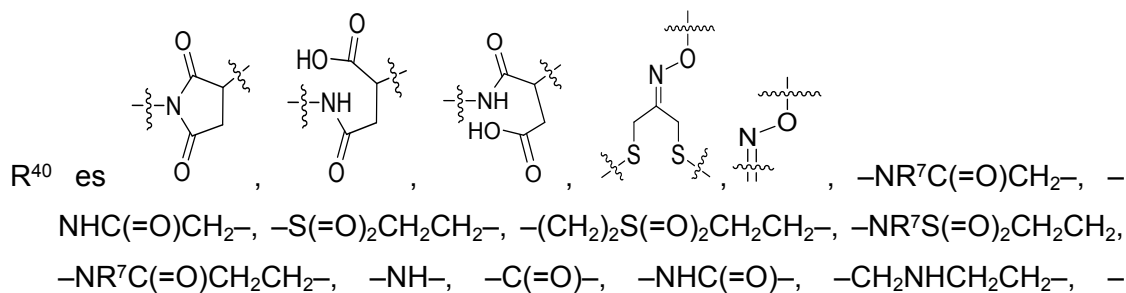
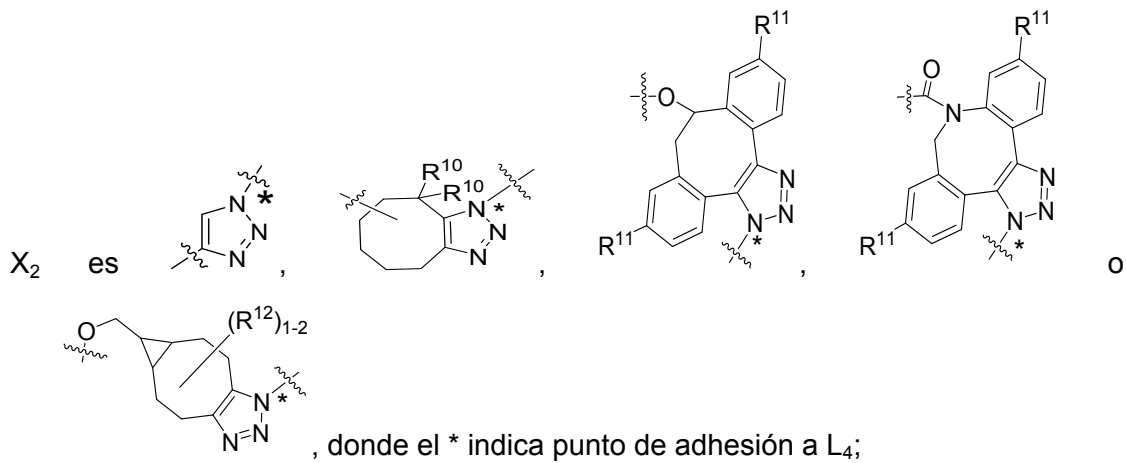
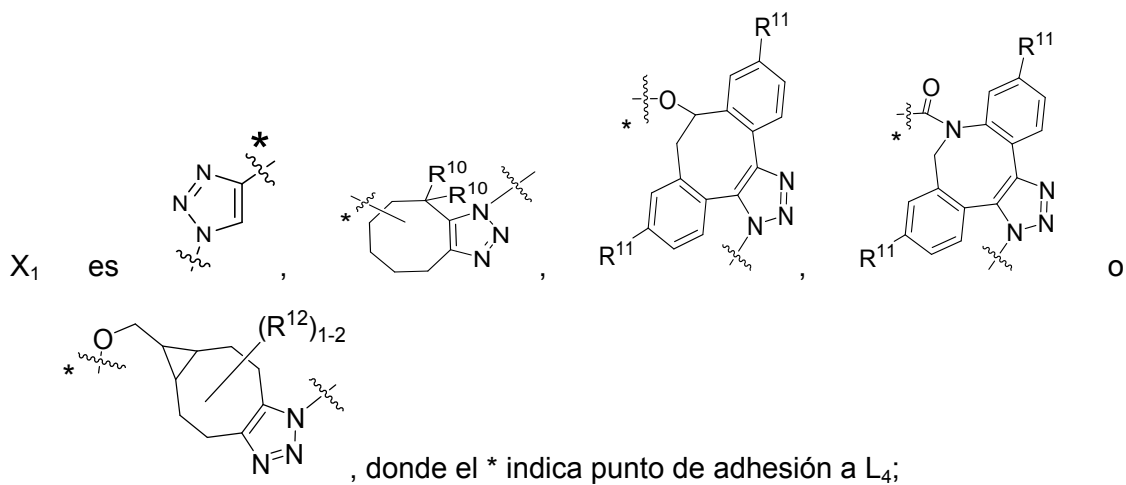
cada p se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14.

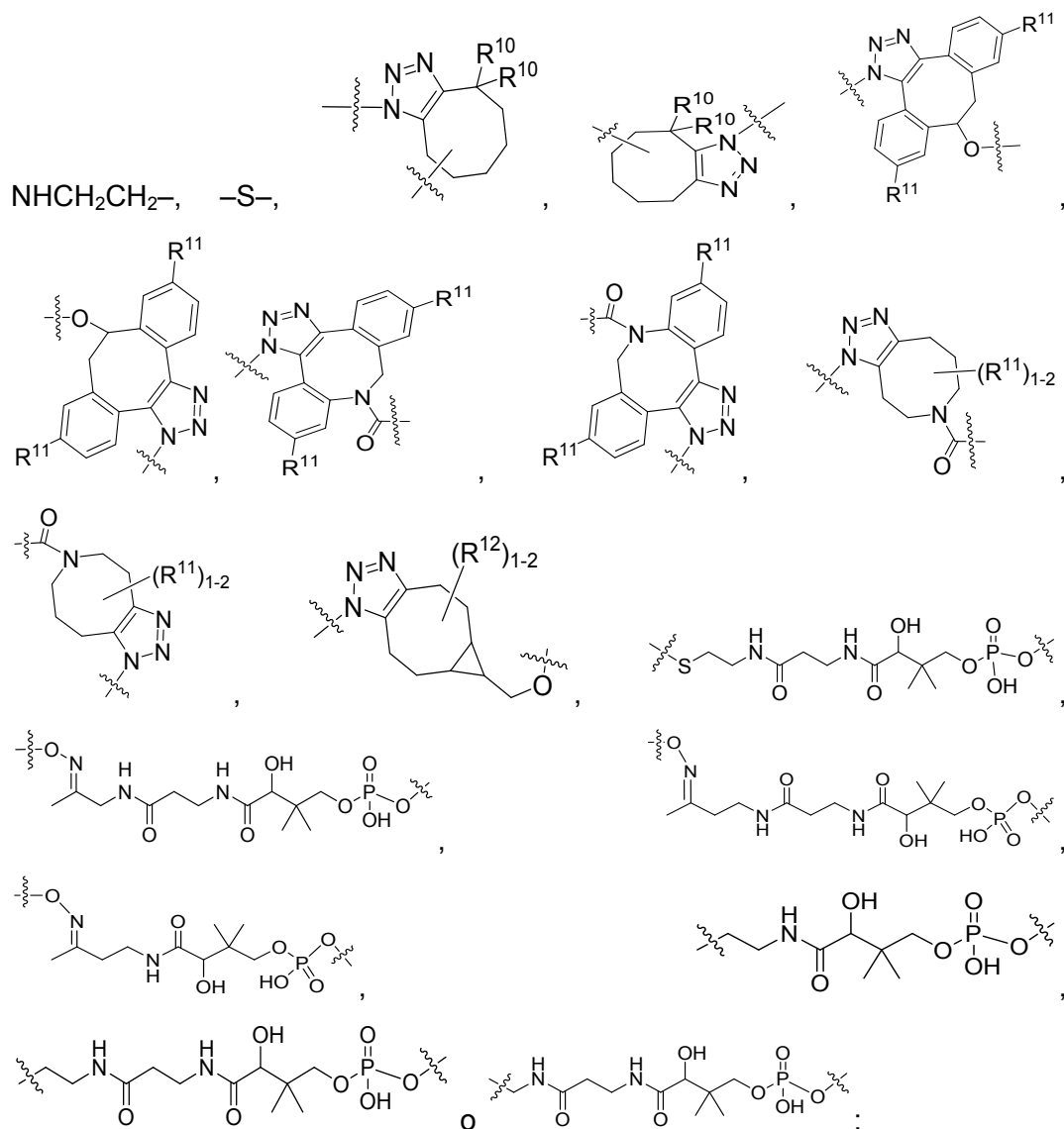
[00188] Realización 29. El conjugado que tiene la estructura de Fórmula (E), Fórmula (E–1) o Fórmula (E–1a), donde:

A representa un fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que se une específicamente a cKIT humano;

y es un número entero que va desde 1 hasta 10;

R⁵ es H, -CH₃ o -CD₃;

$$R^6 \text{ es } -NH_2 \text{ o } -OH;$$
$$L_{40} \text{ es } -L_6 R^{40};$$
$$\begin{aligned} & \text{L}_6 \quad \text{es} \quad -((\text{CH}_2)_m\text{O})_p(\text{CH}_2)_m\text{X}_1\text{L}_4-, \quad -((\text{CH}_2)_m\text{O})_p(\text{CH}_2)_m\text{X}_2\text{L}_4-, \quad - \\ & \text{L}_4\text{NHC(=O)NH}((\text{CH}_2)_m\text{O})_p(\text{CH}_2)_m\text{X}_1\text{L}_4-, \quad -\text{L}_4\text{NHC(=O)NH}((\text{CH}_2)_m\text{O})_p(\text{CH}_2)_m\text{X}_2\text{L}_4-, \quad - \\ & ((\text{CH}_2)_m\text{O})_p(\text{CH}_2)_m\text{- o }-(\text{CH}_2)_m-; \end{aligned}$$
$$L_4 \text{ es } -((CH_2)_m;$$




cada R^7 se selecciona independientemente entre H y alquilo $\text{C}_1\text{--C}_6$;

cada R^{10} se selecciona independientemente entre H, alquilo $\text{C}_1\text{--C}_6$, F, Cl, y $-\text{OH}$;

cada R^{11} se selecciona independientemente entre H, alquilo $\text{C}_1\text{--C}_6$, F, Cl, $-\text{NH}_2$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CN}$, $-\text{NO}_2$ y $-\text{OH}$;

cada R^{12} se selecciona independientemente entre H, alquilo C_{1-6} , flúor, benciloxi sustituido con $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$, bencilo sustituido con $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$, C_{1-4} alcoxi sustituido con $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$ y alquilo C_{1-4} sustituido con $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$;

cada m se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, y

cada p se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14.

[00189] Realización 30. El conjugado que tiene la estructura de Fórmula (E), Fórmula (E-1) o Fórmula (E-1a), donde:

A representa un fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que se une específicamente a cKIT humano;

y es un número entero que va desde 1 hasta 10;

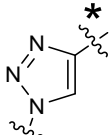
R⁵ es -CH₃;

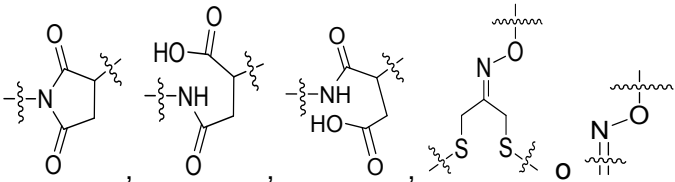
R⁶ es -NH₂;

L₄₀ es -L₆R⁴⁰;

L₆ es $-\text{((CH}_2\text{)}_m\text{O)}_p\text{(CH}_2\text{)}_m\text{X}_1\text{L}_4-$, $-\text{((CH}_2\text{)}_m\text{O)}_p\text{(CH}_2\text{)}_m-$, $-\text{L}_4\text{NHC(=O)NH((CH}_2\text{)}_m\text{O)}_p\text{(CH}_2\text{)}_m\text{X}_1\text{L}_4-$, $-\text{L}_4\text{NHC(=O)NH((CH}_2\text{)}_m\text{O)}_p\text{(CH}_2\text{)}_m\text{X}_2\text{L}_4-$, o $-\text{(CH}_2\text{)}_m-$;

L₄ es $-\text{((CH}_2\text{)}_m)-$;

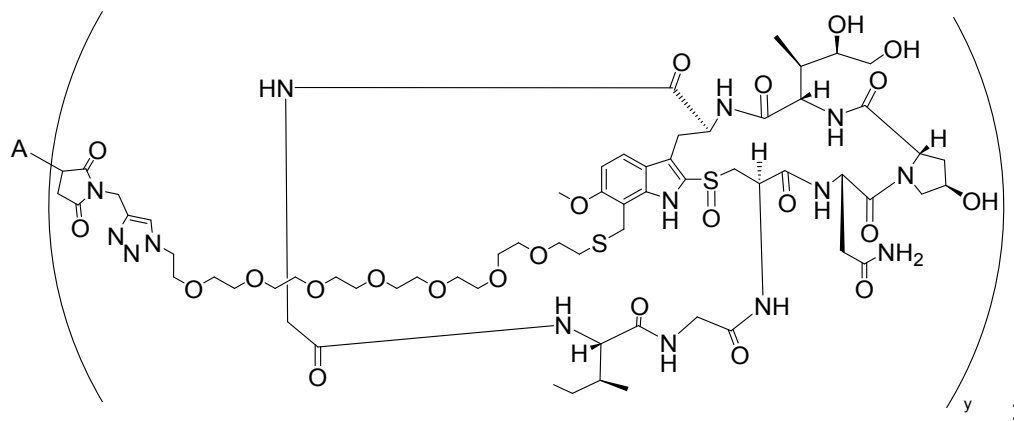
X₁ es , donde el * indica punto de adhesión a L₄;

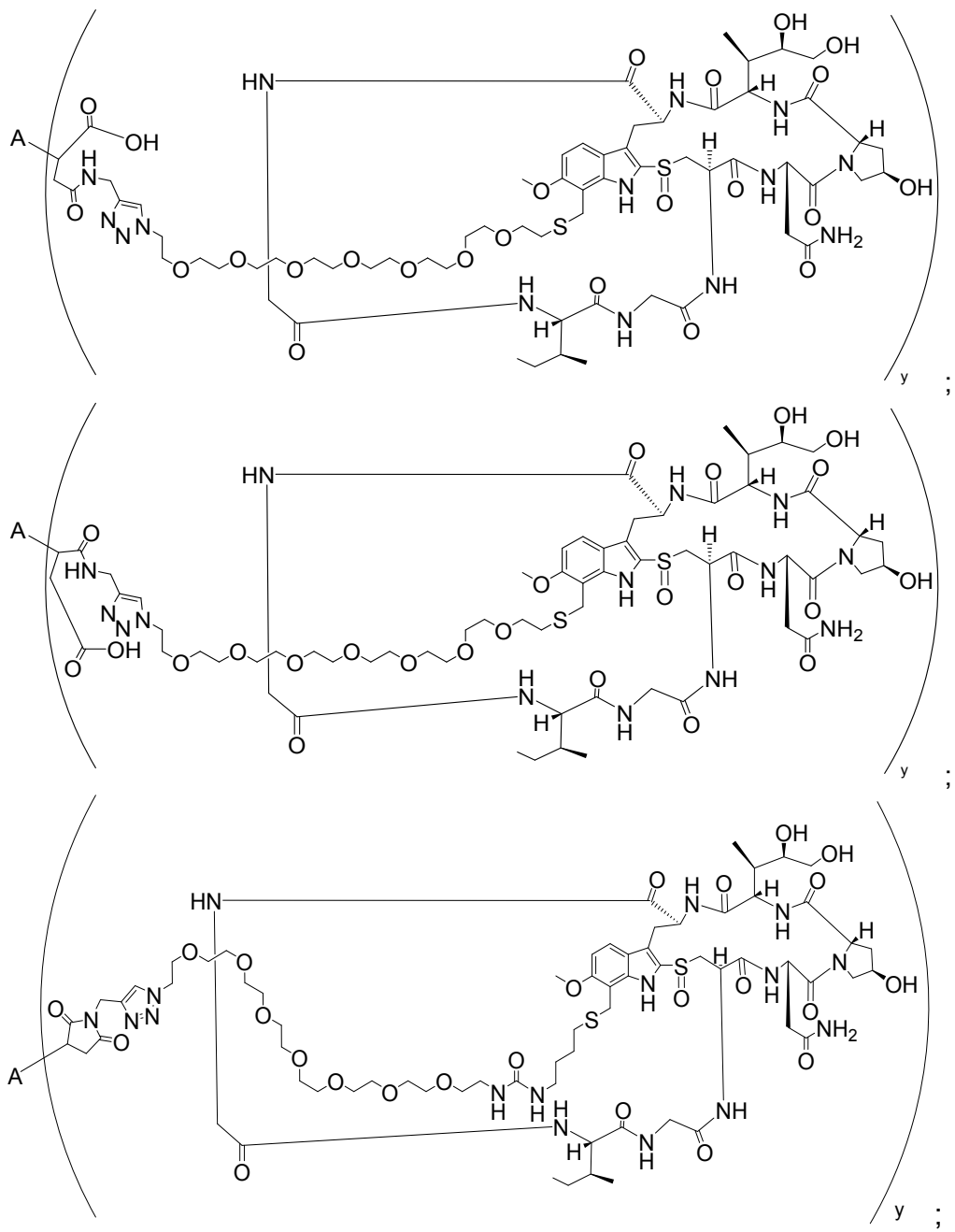
R⁴⁰ es ;

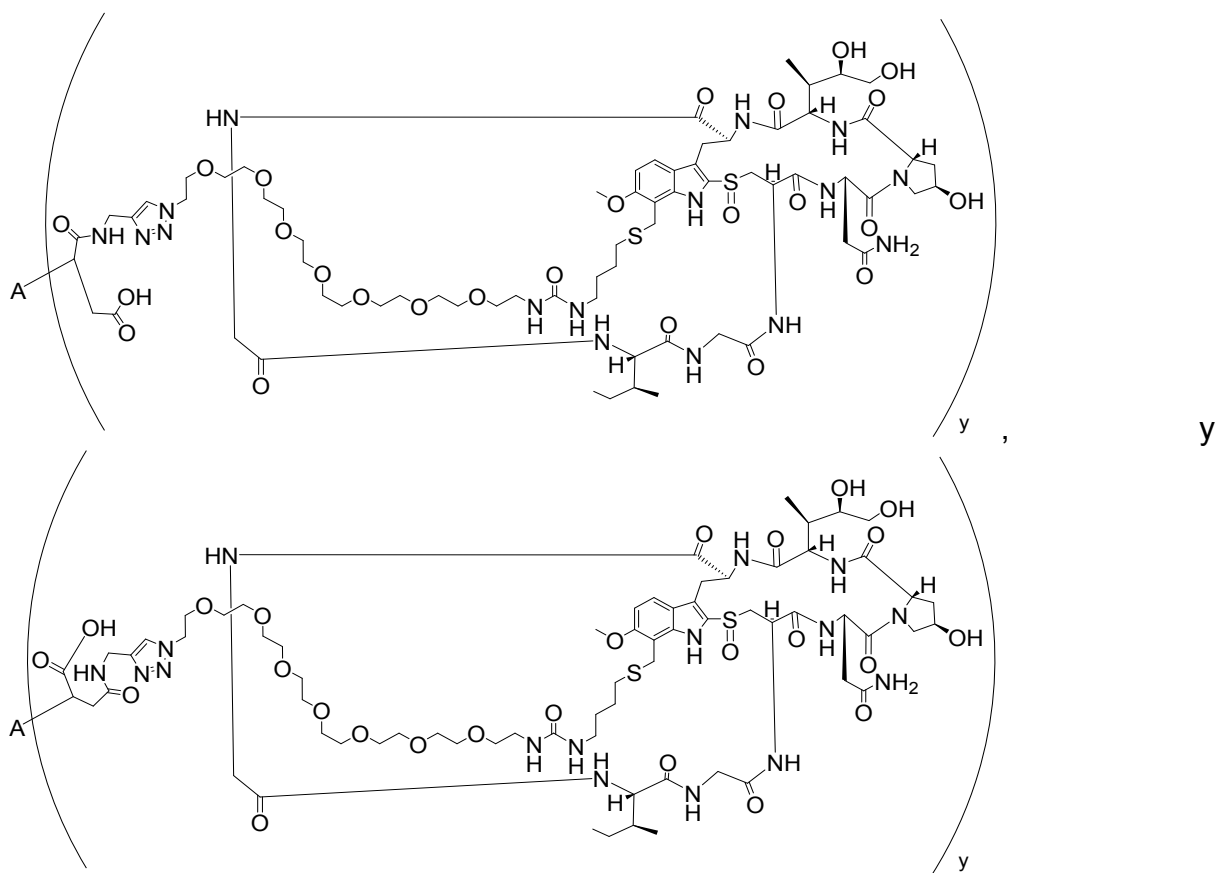
cada m se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, y

cada p se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14.

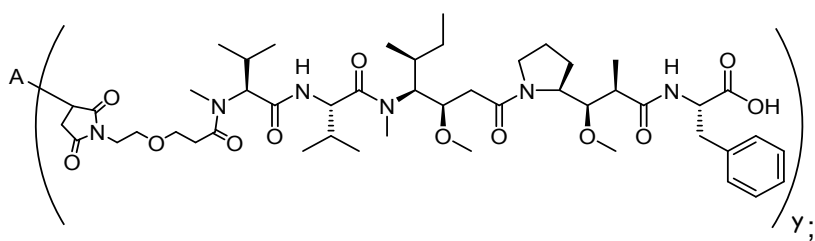
[00190] Realización 31. El conjugado que tiene la estructura de Fórmula (E), Fórmula (E-1) o Fórmula (E-1a) que se selecciona entre:

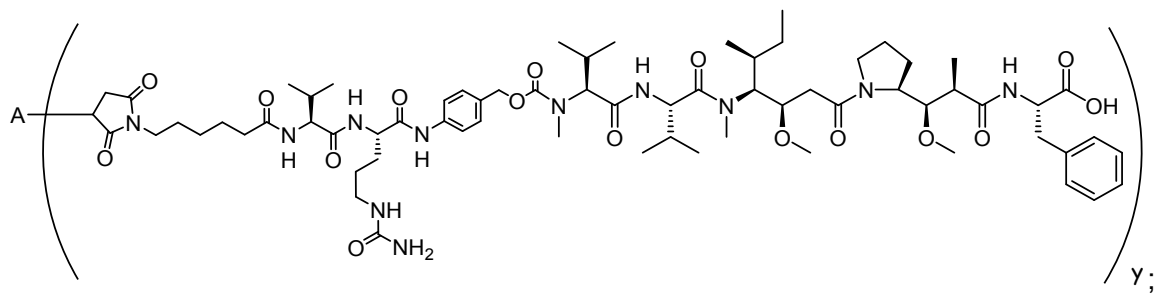
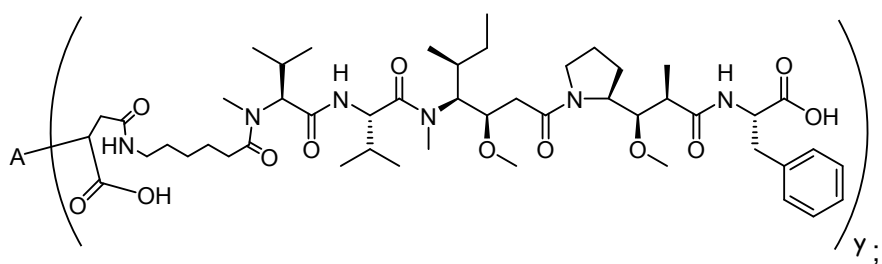
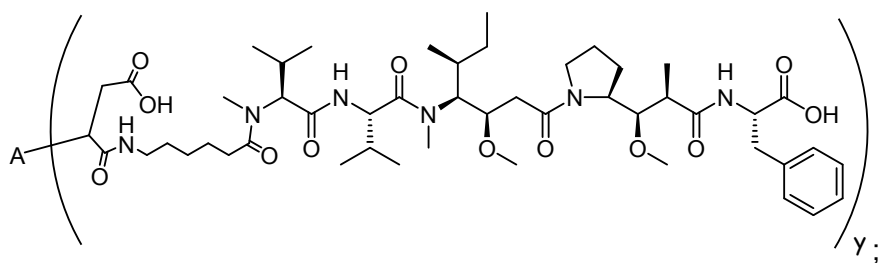
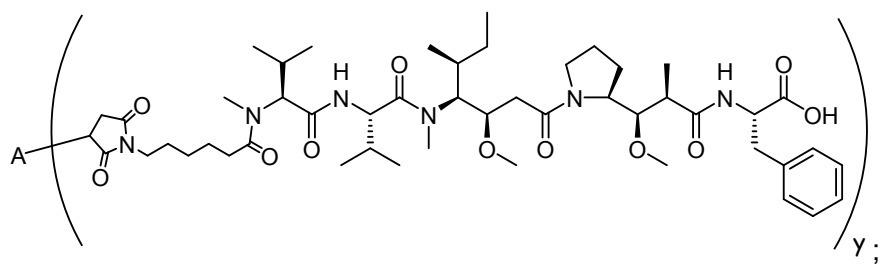
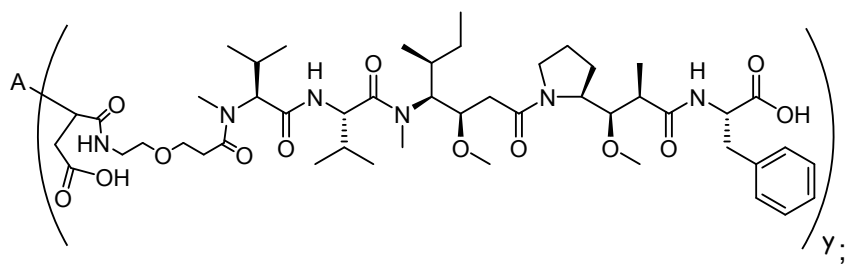
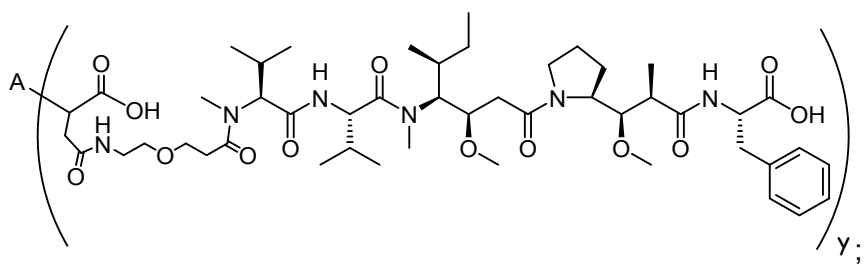


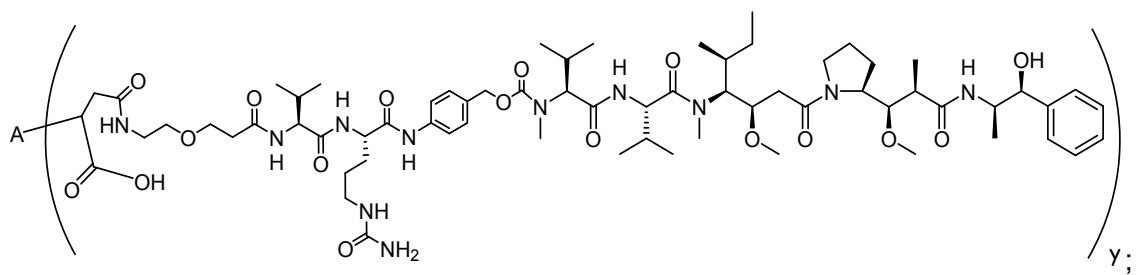
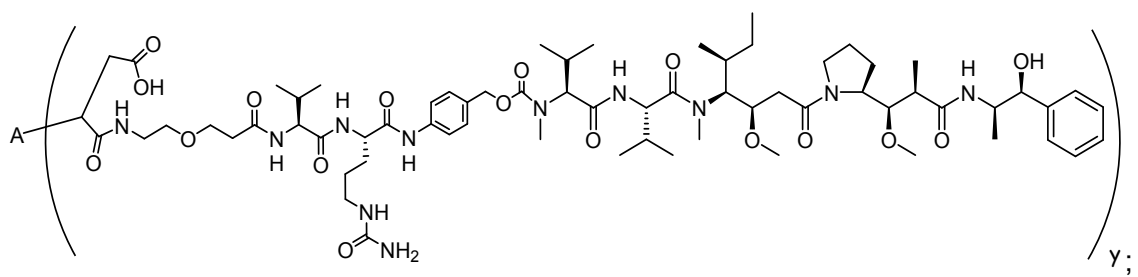
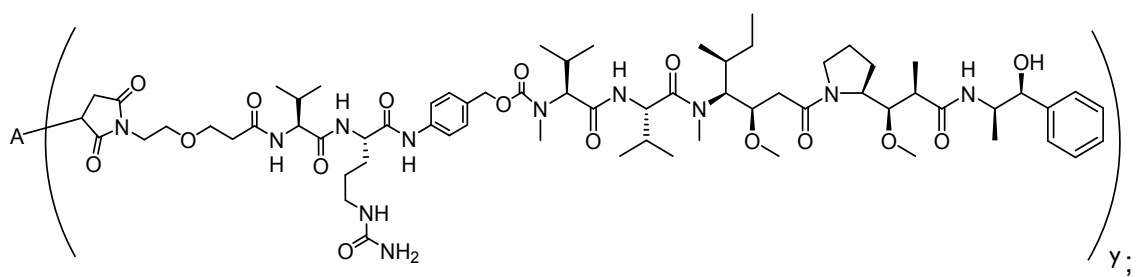
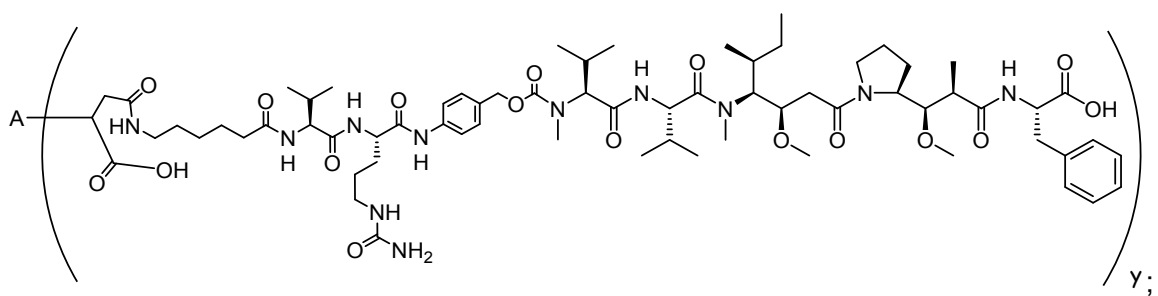
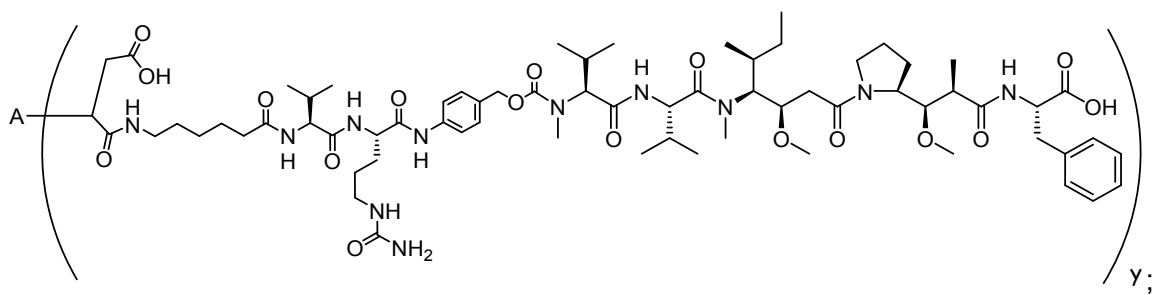


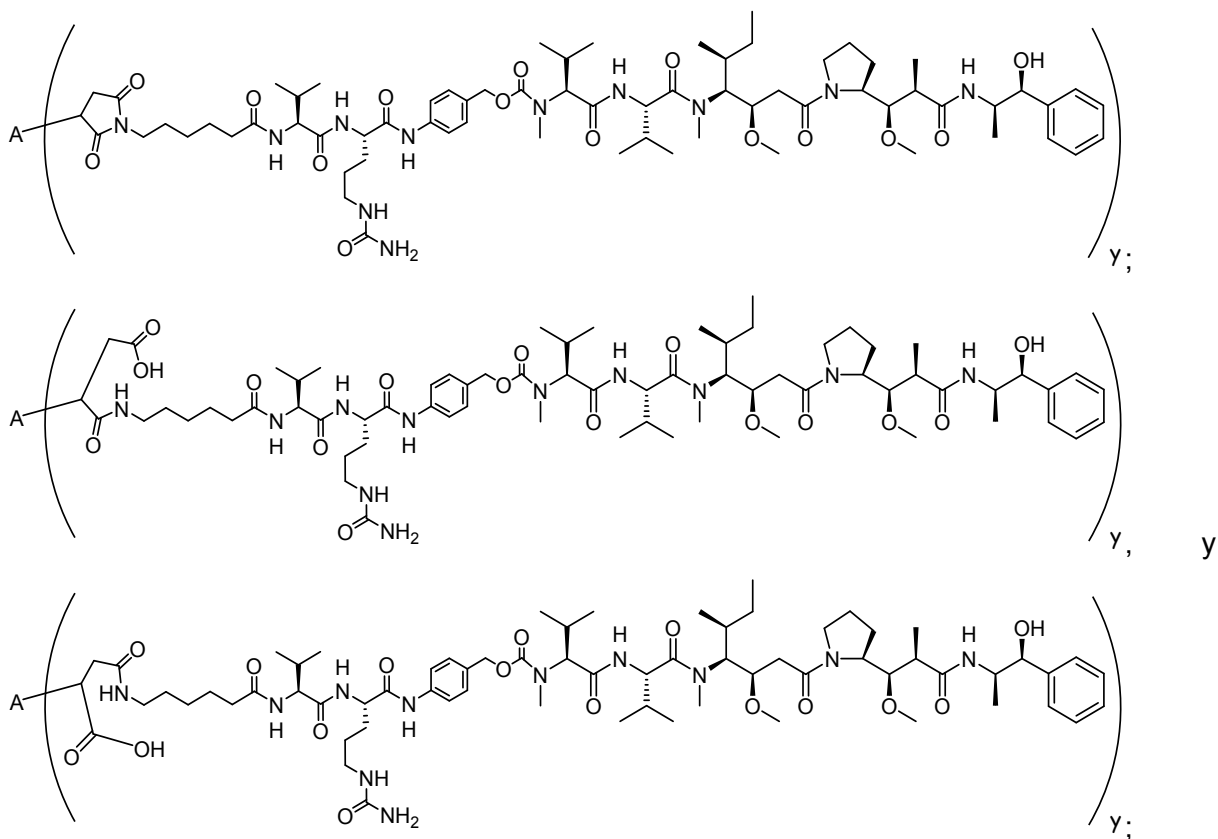


[00191] En otro aspecto del conjugado anticuerpo droga de la invención se selecciona entre:



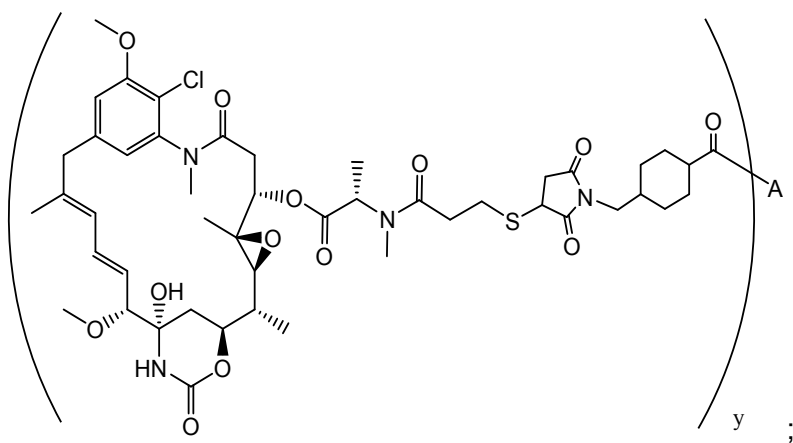


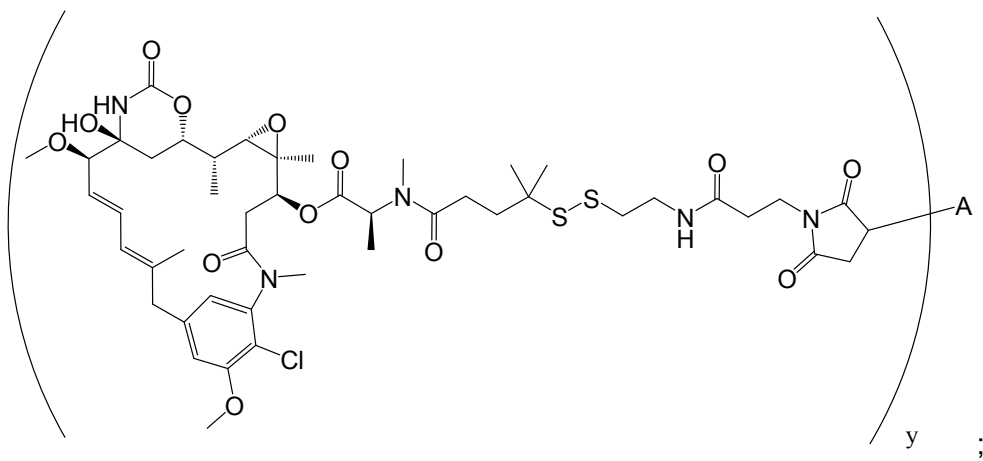
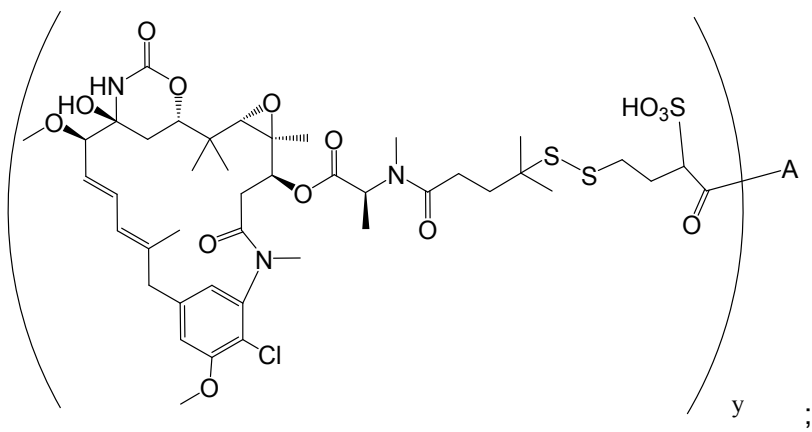
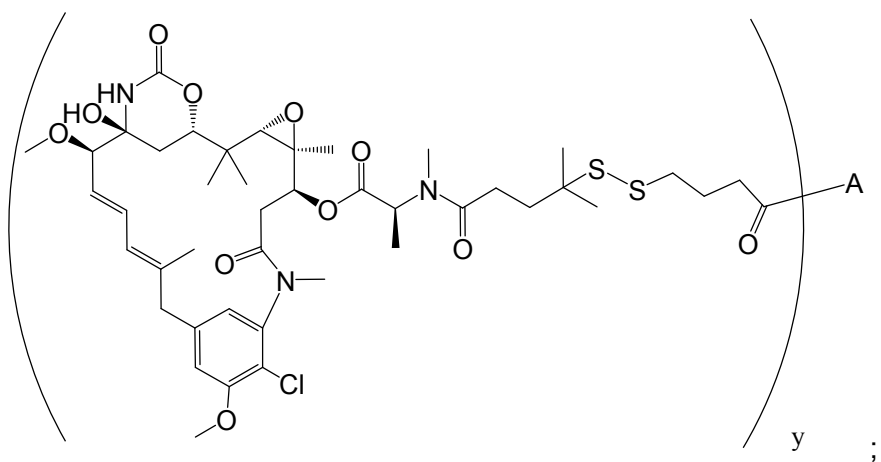


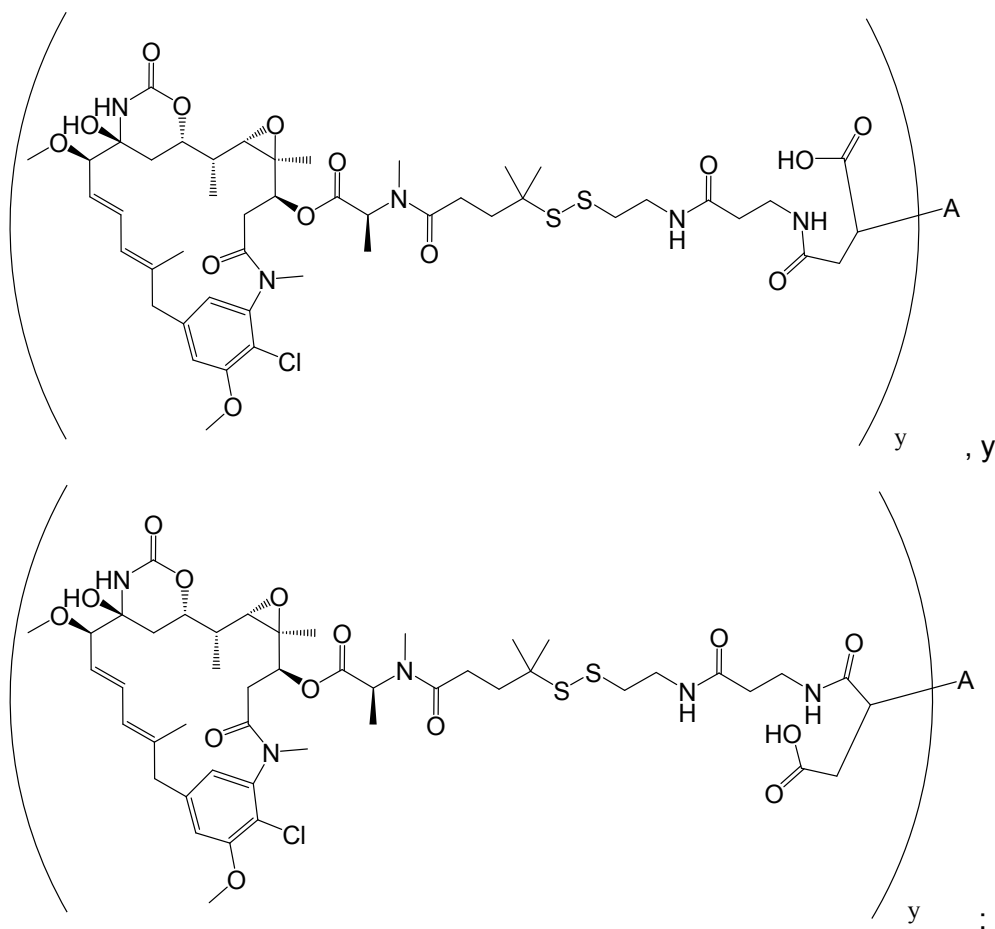


donde A representa un fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que se une específicamente a cKIT humano,
 y y es un número entero que va desde 1 hasta 10.

[00192] En otro aspecto del conjugado anticuerpo droga de la invención se selecciona entre:



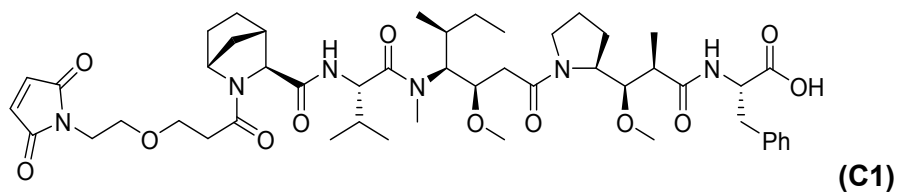




donde A representa un fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que se une específicamente a cKIT humano,
y y es un número entero que va desde 1 hasta 10.

Síntesis de Compuestos Ligador-Droga Ejemplares

Ejemplo 1: Síntesis de ácido (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((1R,3S,4S)-2-(3-(2-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-N,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**C1**)



Paso 1: A una solución de BocVal-Dil-Dap-OH (1,00 g, 1,75 mmol) en N,N-dimetilformamida (DMF, 20,0 mL) a 0°C se agregaron N,N-diisopropil etilamina (DIEA, 0,677 g, 5,25 mmol) y 1-[bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio 3-oxid hexafluorofosfato (HATU)(0,731 g, 1,93 mmol). La solución resultante luego se agitó durante 5 minutos y se agregó a una solución de L-fenilalanina metil éster sal HCl (0,377 g, 1,75 mmol) y DIEA (0,226 g, 1,75 mmol) en DMF (5,0 mL) a 0°C. La mezcla de reacción se entibió a temperatura ambiente, se agitó durante 30 minutos adicionales y luego se concentró. El residuo se purificó por HPLC de fase inversa usando el sistema ISCO, columna C18, eluido con 20–90% acetonitrilo-agua para obtener BocVal-Dil-Dap-PheOMe: MS m/z 733,4 (M+1); tiempo de retención 1,47 minutos.

Paso 2: A una solución de BocVal-Dil-Dap-PheOMe (0,683 g, 0,932 mmol) que se obtuvo en paso 1 en metanol (20 mL) se agregó HCl (4N es 1, 4-dioxano, 16 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 7 horas y se concentró. El residuo se disolvió en dioxano y liofilizado para obtener Val-Dil-Dap-PheOMe sal HCl: MS m/z 633,4 (M+1); tiempo de retención 0,96 minutos.

Paso 3: ácido (1R,3S,4S)-N-Boc-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxílico (12,6 mg, 0,052 mmol) se disolvió en DMF (1 mL) en un matraz de fondo redondo de 15 mL. DIEA (12,3 mg, 0,095 mmol) y HATU (19 mg, 0,050 mmol) se agregaron. La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos y Val-Dil-Dap-PheOMe sal HCl (30 mg, 0,090 mmol) en DMF (1,0 mL) se agregó. La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora. Análisis LCMS indicó la reacción estaba completada y la mezcla resultante se purificó por HPLC de fase inversa usando columna C18, eluida con 20–90% acetonitrilo-H₂O que contiene 0,05% ácido trifluoroacético (TFA). Las fracciones que contienen el producto deseado fueron agrupadas y concentradas para obtener (1R,3S,4S)-terc-butil 3-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-3-metoxi-1-((S)-2-((1R,2R)-1-metoxi-3-(((S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxylato: MS m/z 856,6 (M+1); tiempo de retención 1,67 minutos.

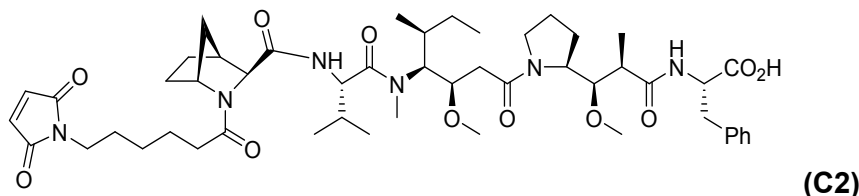
Paso 4: El producto que se obtuvo en paso 3 se disolvió en diclorometano (DCM) (2,0 mL) y trató con TFA (0,5 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Análisis LCMS mostró que la reacción estaba completa. La mezcla de reacción se concentró por evaporador giratorio para dar (S)-metil 2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((1R,3S,4S)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-N,3-dimetilbutanamido)-

3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoato como una sal TFA: MS m/z 756,6 (M+1); tiempo de retención 1,22 minutos.

Paso 5: En un matraz de fondo redondo de 25 mL se agregaron (S)-metil 2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((1R,3S,4S)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-N,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoato sal TFA (38,4 mg, 0,044 mmol), LiOH monohidrato (50,0 mg, 1,19 mmol) y una mezcla solvente de MeOH-H₂O (2:1, 4,0 mL). La mezcla de agitó a temperatura ambiente durante 60 horas. El análisis LC-MS indicó que la reacción estaba completa. La mezcla de reacción se concentró y purificó por HPLC de fase inversa, columna C18, se eluyó con acetonitrilo-H₂O (10-70%) que contiene 0,05% TFA. Las fracciones que contienen el producto deseado fueron combinadas y concentradas para dar ácido (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((1R,3S,4S)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-N,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico como una sal TFA, MS m/z 742,5 (M+1). Tiempo de retención 1,15 minutos.

Paso 6: A una solución de ácido 3-(2-(maleimido)etoxi)propanoico (2,2 mg, 0,010 mmol) en DMF (1 ml) se agregaron HATU (3,7 mg, 0,0098 mmol) y DIEA (3,6 mg, 0,028 mmol). La reacción se agitó durante 5 min, y luego ácido (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((1R,3S,4S)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-N,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (8 mg, 0,0093 mmol) en DMF (0,5 ml) se agregó. La mezcla de reacción se agitó a ta durante 1 h y luego se concentró y purificó por HPLC preparativa (10-60% acetonitrilo-H₂O que contiene 0,05% TFA) para obtener ácido (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((1R,3S,4S)-2-(3-(2-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanoyl)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-N,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**C1**). MS m/z 937,5 (M+H). Tiempo de retención 1,138 min.

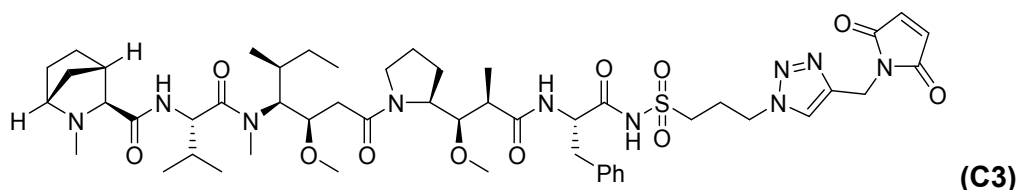
Ejemplo 2: ácido (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((1R,3S,4S)-2-(6-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-N,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**C2**)



ácido (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((1R,3S,4S)-2-(6-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-N,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**2**) se realizó de acuerdo al método en Ejemplo 1, excepto en paso 6

ácido 6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoico (EMCA) (1,2 mg, 0,0058 mmol) en DMF (1,0 mL) se usó en lugar de ácido 3-(2-(maleimido)etoxi)propanoico. Ácido (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((1R,3S,4S)-2-(6-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-N,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**2**) MS m/z 935,6 (M+1). Tiempo de retención 1,17 minutos.

Ejemplo 3: (1R,3S,4S)-N-((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-N-1-(3-(4-((2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)propilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**C3**)



Paso 1: A una solución agitada de azida de sodio (3,50 g, 53,8 mmol) en agua (25 mL) se agregó una solución de 1,3-propano sulfona (6,10 g, 50,0 mmol) en acetona (25 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas y se concentró hasta su sequedad. El sólido resultante se suspendió en dietil éter (100 mL) y se agitó a reflujo durante 1 hora. La suspensión se enfrió a temperatura ambiente y el sólido se recogió por filtración, se lavó con acetona y dietil éter, y se secó al vacío, proporcionando ácido 3-azido-1-propanosulfónico. MS m/z 188,1(M+1). ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 3,47 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 2,87 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 2,07–2,00 (m, 2H).

Paso 2: Ácido 3-Azido-1-propanosulfónico (2,07 g, 13,0 mmol) se suspendió en tolueno. PCl_5 (2,61 g, 13,0 mmol) se agregó. La mezcla se calentó a reflujo durante 3 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, y se filtró para eliminar insolubles. La torta de filtrado se lavó con DCM. Los filtrados combinados se concentraron para dar 3-azidopropano-1-sulfonyl cloruro como un aceite color amarillo oscuro, que se usó en el paso siguiente sin purificación adicional.

Paso 3: A NH_4OH (5 mL) enfriado a 0°C se agregó 3-azidopropano-1-sulfonyl cloruro (1,75 g, 9,53 mmol). Después de 10 minutos, la mezcla de reacción se entibió a temperatura ambiente y se agitó a la misma temperatura durante 3 horas. La mezcla aceitosa se tornó clara. La mezcla de reacción se extrajo con EtOAc tres veces. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO_4 anhidro, y concentró. El solvente residual se eliminó adicionalmente con alto vacío durante 18 horas para dar 3-azidopropano-1-sulfonamida. MS m/z 187,1 ($M+1$). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 4,83 (s, 2H), 3,51 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H), 3,23 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,17–2,10 (m, 2H).

Paso 4: ácido (S)-2-((terc-Butoxicarbonil)amino)-3-fenilpropanoico (100 mg, 0,38 mmol) se disolvió en DMF (4 mL), seguido por adición de DIEA (0,395 mL, 2,26 mmol) y HATU (358 mg, 0,940 mmol). Después de 15 minutos, 3-azidopropano-1-sulfonamida (186 mg, 1,13 mmol) se agregó. La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas en cuyo tiempo análisis LCMS indicó la finalización de la reacción. La mezcla resultante luego se purificó por HPLC de fase inversa usando columna C18, se eluyó con 10–90% acetonitrilo- H_2O que contiene 0,05% TFA. Las fracciones que contienen el producto deseado fueron agrupadas y liofilizadas para obtener (S)-terc-butil (1-(3-azidopropilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)carbamato. MS m/z 312,1 ($M+1$ -Boc). Tiempo de retención 1,15 minutos. El producto así obtenido (72,4 mg, 0,176 mmol) se disolvió en 3M metanólico HCl (5 mL). El solvente se extrajo bajo presión reducida. El residuo se tomó en acetonitrilo y H_2O y se liofilizó para dar (S)-2-amino-N-((3-azidopropil)sulfonyl)-3-fenilpropanamide como un sólido amarillento rosado. MS m/z 312,1 ($M+1$). ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 7,42–7,31 (m, 5H), 4,16–4,13 (m, 1H), 3,51–3,47 (m, 4H), 3,32–3,26 (m, 1H), 3,13–3,08 (m, 1H), 2,00–1,94 (m, 2H).

Paso 5: A Boc-Val-Dil-Dap-OH (195mg, 0,34mmol) disuelto en DMF (4mL) se agregaron DIEA (132 mg, 1,02 mmol) y HATU(108 mg, 0,28 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente antes de que se agregue (S)-2-amino-N-((3-azidopropil)sulfonyl)-3-fenilpropanamida (59,2 mg, 0,17 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas adicionales a temperatura ambiente. Y luego se purificó mediante HPLC

de fase inversa para brindar el producto deseado (95 mg, 65% rendimiento, MS m/z 865,4 (M+1), Tiempo de retención 1,43 minutos). El producto se disolvió en 3M HCl en MeOH (3 mL). Solventes fueron extraídos al vacío. El acetonitrilo y H₂O se agregaron al residuo y la solución se liofilizó para obtener el producto deseado, (S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-N-1-(3-azidopropilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-2-amino-3-metil-1-oxobutano. MS m/z 765,4 (M+1). Tiempo de retención 1,04 minutos.

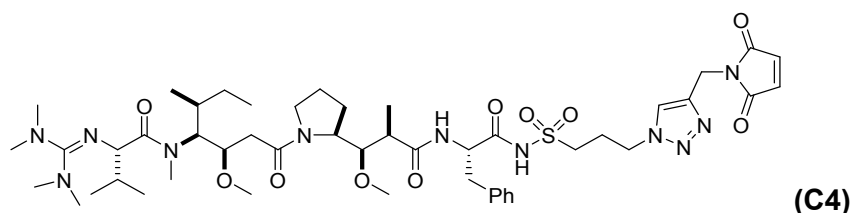
Paso 6: A ácido (1R,3S,4S)-2-(terc-butoxicarbonil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxílico (16,5 mg, 0,068mmol) en DMF (2,0 mL) se agregaron DIEA (17,6 mg, 0,137mmol) y HATU (21,6 mg, 0,057mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos antes de que se agregue (S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-N-1-(3-azidopropilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-2-amino-3-metil-1-oxobutano (20mg, sal TFA, 0,023mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente en cuyo tiempo análisis LCMS indicó la finalización de la reacción. La mezcla resultante luego se purificó por HPLC de fase inversa usando columna C18, se eluyó con 10–90% ACN–H₂O que contiene 0,05% TFA. Las fracciones que contienen el producto deseado fueron agrupadas y liofilizadas para obtener (1R,3S,4S)-N-((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-N-1-(3-azidopropilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-(terc-butoxicarbonil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida. MS m/z 988,5 (M+1). Tiempo de retención 1,51 minutos. El producto así obtenido (9,4mg, 0,0095 mmol) se disolvió en metanólico HCl (3M, 2,0 mL). El solvente se extrajo lentamente bajo presión reducida. El residuo se disolvió en acetonitrilo y H₂O y se liofilizó para dar (1R,3S,4S)-N-((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-N-1-(3-Azidopropilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida como una sal HCl. MS m/z 888,5 (M+1). Tiempo de retención 1,10 minutos.

Paso 7: (1R,3S,4S)-N-((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-N-1-(3-Azidopropilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-

oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (8,8mg, 0,0099 mmol) se disolvió en MeOH (2,0mL). Paraformaldehído (10,1 mg, 0,337mmol) y ácido acético (0,0102 mL) se agregaron, seguido por cianoborohidruro de sodio (21,2mg, 0,337mmol). La mezcla de reacción se calentó hasta 50°C con agitación durante 1 hora. Paraformaldehído adicional (10,1mg, 0,337mmol), ácido acético (0,0102 mL) y cianoborohidruro de sodio (21,2mg, 0,337mmol) se agregaron. Después de 1 hora a 50°C, análisis LCMS indicó la finalización de la reacción. La mezcla resultante luego se purificó por HPLC de fase inversa usando columna C18, se eluyó con 10–90% ACN–H₂O que contiene 0,05% TFA. Las fracciones que contienen el producto deseado fueron agrupadas y liofilizadas para obtener (1R,3S,4S)-N-((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-N-1-(3-Azidopropilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida. MS m/z 902,5 (M+1). Tiempo de retención 1,12 minutos.

Paso 8: Una solución de (1R,3S,4S)-N-((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-N-1-(3-azidopropilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (5,2mg, 0,0058 mmol), 1-(prop-2-in-1-il)-1H-pirrol-2,5-diona (1,56mg, 0,012mmol) y CuSO₄ (0,7 mg, 0,004 mmol) en DMF (2,0mL) y H₂O (0,5mL) se trató con ácido L-ascórbico y sal de sodio (2,5 mg, 0,014mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. CuSO₄ adicional (0,7 mg, 0,004 mmol) y ácido L-ascórbico y sal de sodio (2,5 mg, 0,014mmol) se agregaron. Después de 2 horas adicionales a temperatura ambiente, análisis LCMS indicó la finalización de la reacción. La mezcla resultante luego se purificó por HPLC de fase inversa usando columna C18, se eluyó con 10–90% acetonitrilo–H₂O que contiene 0,05% TFA. Las fracciones que contienen el producto deseado fueron agrupadas y liofilizadas para obtener (1R,3S,4S)-N-((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-N-1-(3-(4-((2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)propilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**C3**). MS m/z 1037,4 (M+1). Tiempo de retención 1,00 minutos.

Ejemplo 4: Síntesis de (S)-2-((bis(dimetilamino)metileno)amino)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-N-1-(3-(4-((2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)propilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutano (**C4**)



Paso 1: A una solución agitada de azida de sodio (3,5 g, 54 mmol) en agua (25 ml) se agregó una solución de 1,3-propano sulfona (6,1 g, 50 mmol) en acetona (25 ml). La mezcla de reacción se agitó a ta durante 24 h, y se concentró. El sólido resultante se suspendió en dietil éter (100 ml) y se agitó a reflujo durante 1 h. La suspensión se enfrió a ta. El sólido se recogió mediante filtración, se lavó con acetona y dietil éter, y secó al vacío, proporcionando ácido 3-azido-1-propanosulfónico. MS m/z 188,1 (M+23). ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 3,47 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 2,87 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 2,07–2,00 (m, 2H).

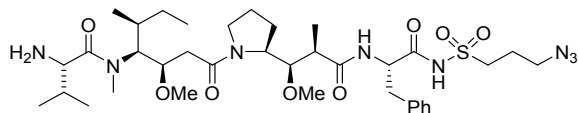
Paso 2: Ácido 3-Azido-1-propanosulfónico (2,07 g, 13 mmol) se suspendió en tolueno. PCl_5 (2,61 g, 13 mmol) se agregó. La mezcla se calentó hasta reflujo durante 3 h. La reacción se enfrió a ta. Materiales insolubles fueron extraídos mediante filtración, y lavados con DCM. El filtrado combinado se concentró para dar 3-azidopropano-1-sulfonil cloruro como un aceite amarillo-marrón, que se usó en el siguiente paso sin purificación adicional.

Paso 3: NH_4OH (28%, 5 mL) se enfrió a 0 °C. 3-azidopropano-1-sulfonil cloruro (1,75 g, 9,53 mmol) se agregó. Después de 10 min, la reacción se entibió a ta, y luego se agitó durante 3 horas a ta. Las dos fases se tornaron homogéneas. La mezcla de reacción se extrajo con EtOAc tres veces. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, secaron sobre MgSO_4 , y concentró en un evaporador giratorio seguido por alto vacío durante 18 h para dar 3-azidopropano-1-sulfonamida. MS m/z 187,1 (M+23), ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 4,83 (s, 2H), 3,51 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 3,23 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 2,17–2,10 (m, 2H).

Paso 4: Ácido (S)-2-((terc-Butoxicarbonil)amino)-3-fenilpropanoico (100 mg, 0,38 mmol) se disolvió en DMF (4 mL). DIEA (0,395 mL, 2,26 mmol) y HATU (358 mg, 0,94 mmol) se agregaron. Después de 15 min, 3-azidopropano-1-sulfonamida (186 mg, 1,13 mmol) se agregó. La reacción se agitó durante 2 h. LCMS indicó finalización de la reacción. La mezcla

de reacción se purificó por HPLC preparativa usando un gradiente 10–90% para obtener (S)-terc-butil (1-(3-azidopropilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)carbamato. MS m/z 312,1 ($M+1$ -Boc). Tiempo de retención 1,15 min. El producto así obtenido (72,4 mg, 0,176 mmol) se disolvió en metanólico HCl (3 M, 5 mL). El solvente se extrajo por evaporación. El residuo se liofilizó a partir de acetonitrilo y H₂O para dar (S)-2-amino-N-((3-azidopropil)sulfonyl)-3-fenilpropanamida como un sólido rosado amarillento. MS m/z 312,1 ($M+1$) ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7,42–7,31 (m, 5H), 4,16–4,13 (m, 1H), 3,51–3,47 (m, 4H), 3,32–3,26 (m, 1H), 3,13–3,08 (m, 1H), 2,00–1,94 (m, 2H).

Paso 5: A Boc-Val-Dil-Dap-OH (195 mg, 0,34 mmol) en DMF (4 mL) se agregaron DIEA (132 mg, 1,02 mmol) y HATU (108 mg, 0,28 mmol). Se agitó 15 min a ta. (S)-2-amino-N-((3-azidopropil)sulfonyl)-3-fenilpropanamida (59,2 mg, 0,17 mmol) se agregó. La reacción se agitó durante 2 h a ta. El material crudo se purificó por HPLC preparativa para brindar el producto deseado (95 mg, 65% rendimiento, MS m/z 865,4 ($M+1$), Tiempo de retención 1,43 minutos). El producto se disolvió en 3M HCl en MeOH (3 mL). Solventes fueron extraídos por evaporación. El residuo se liofilizó a partir de acetonitrilo-agua para obtener (S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-N-1-(3-azidopropilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-2-amino-3-metil-1-oxobutano,



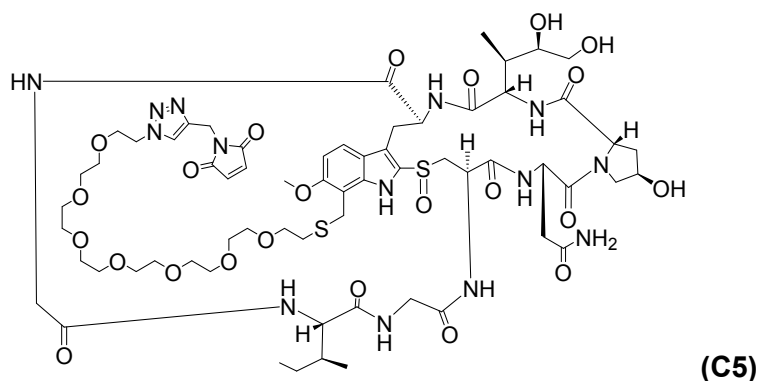
, como una sal HCl, MS m/z 765,4 ($M+1$), tiempo de retención 1,04 min.

Paso 6: A (S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-N-1-(3-azidopropilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-2-amino-3-metil-1-oxobutano sal HCl (20 mg, 0,025 mmol) en DMF (2 mL) se agregaron DIEA (0,024 mL, 0,14 mmol) y HATU (21,6 mg, 0,057 mmol). La reacción se agitó a ta durante 2 h. LCMS indicó finalización de la reacción. La mezcla resultante luego se purificó por HPLC preparativa usando un gradiente 10–90% para obtener (S)-2-((bis(dimetilamino)metileno)amino)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-N-1-(3-azidopropilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutano como una sal TFA. MS m/z 863,5 ($M+1$). Tiempo de retención 1,169 min.

Paso 7: (S)-2-((Bis(dimetilamino)metileno)amino)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-

((S)-N-1-(3-azidopropilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutano sal TFA (87,4 mg, 0,089 mmol) y 1-(prop-2-in-1-il)-1H-pirrol-2,5-diona (24,2 mg, 0,0179 mmol) fueron suspendidos en 3,0 mL cada uno de t-BuOH y agua. El recipiente de reacción se llenó con N₂ por ciclo de llenado al vacío con N₂ cinco veces. Soluciones desgasificadas de L-ascorbato de sodio (17,7mg, 0,089mmol) en H₂O (2,4 ml) y CuSO₄ (2,86 mg, 0,018 mmol) en H₂O (0,6 ml) se agregaron sucesivamente y la reacción se agitó a ta durante 5 h. LCMS indicó finalización de la reacción. El material crudo se purificó por HPLC preparativa usando un gradiente 20-45% para obtener (S)-2-((bis(dimetilamino)metileno)amino)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-N-1-(3-(4-((2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)propilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutano (**C4**) como una sal TFA. MS m/z 998,5 (M+1). Tiempo de retención 1,014 min.

Ejemplo 5: Síntesis de 6'O-metil-7'C-((23-(4-((2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosanthio)metil)-α-Amanitina (**C5**), 7'C-((23-azido-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosantio)metil)-α-Amanitina (**A-3**) y 6'O-metil-7'C-((23-azido-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosantio)metil)-α-Amanitina (**A4**)



Paso 1: Formaldehído (0,035 mL, 0,44 mmol) y 23-azido-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosano-1-tiol (35 mg, 0,11 mmol) se agregaron a una solución de α-Amanitina (20 mg, 0,022 mmol) en MeOH (2 mL). Trietilamina (1,2 mL, 8,7 mmol) y ácido acético (0,25 mL, 4,4 mmol) se agregaron a la mezcla de reacción y se lavaron con gas N₂ tres veces. La mezcla de reacción se agitó a 40 °C durante 2 días. Después de concentración in vacuo, el residuo luego se purificó por HPLC y liofilizó para dar 7'C-((23-azido-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosanthio)metil)-α-Amanitina. MS (m+1) = 1342,4, HPLC Pico TA = 0,834 min,

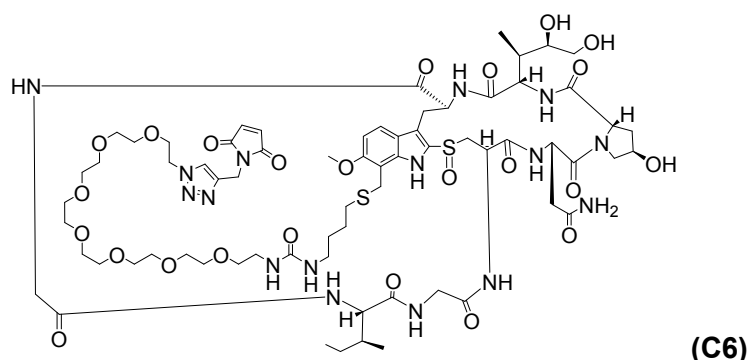
¹H-NMR (MeOD, 500 MHz) δ 10,65 (s, 1H), 8,81 (m, 1H), 8,59 (d, 1H, J = 2,0 Hz), 8,45 (m, 2H), 8,33 (s, 1H), 8,14 (d, 1H, J = 10,5 Hz), 8,00 (d, 1H, J = 12,0 Hz), 7,90 (d, 1H, J = 11,0 Hz), 7,67 (s, 1H), 7,48 (d, 1H, J = 11,0 Hz), 6,69 (d, 1H, J = 10,5 Hz), 5,25 (m, 1H), 5,12 (m, 1H), 4,74 (bs, 1H), 4,61 (dd, 1H, J = 6,5 y 12,0 Hz), 4,51 (m, 2H), 4,29 (dd, 1H, J = 10,5 and 23,0 Hz), 4,09 (m, 3H), 3,92 (m, 1H), 3,38~3,73 (m, 43H), 3,29 (m, 2H), 3,21 (m, 1H), 3,06 (m, 1H), 3,12 (m, 1H), 2,91 (m, 1H), 2,56 (m, 2H), 2,39 (m, 2H), 2,00 (m, 1H), 1,60 (m, 2H), 1,15 (m, 1H), 0,94 (d, 3H, J = 9,0 Hz), 0,85 (m, 6H).

Paso 2: 7'C-((23-azido-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosanthio)metil)- α -Amanitina (14,0 mg, 0,011 mmol) y DMSO (1 mL) fueron tratados con metilioduro (0,0007 mL) y K₂CO₃ (1,5 mg) a ta y se agitó a ta durante 1 h. Metilioduro adicional (0,0007 mL) y K₂CO₃ (1,5 mg) se agregaron a ta y se agitó a ta durante 2 h. Metilioduro adicional (0,0007 mL) y K₂CO₃ (1,5 mg) a ta y se agitó a ta durante 2 h, nuevamente. La mezcla de reacción luego se purificó por RP-C18 ISCO y se liofilizó para dar 6'O-metil-7'C-((23-azido-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosanthio)metil)- α -Amanitina. MS (m+2/2) = 679,0, HPLC Pico TA = 0,887 min, ¹H-NMR (MeOD, 500 MHz) δ 10,75 (s, 1H), 8,83 (m, 1H), 8,64 (d, 1H, J = 2,0 Hz), 8,52 (d, 1H, J = 10,0 Hz), 8,47 (d, 1H, J = 3,5 Hz), 8,36 (s, 1H), 8,18 (d, 1H, J = 8,5 Hz), 8,05 (d, 1H, J = 9,5 Hz), 7,96 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,70 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,69 (s, 1H), 6,98 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 5,33 (m, 1H), 5,18 (m, 1H), 4,80 (bs, 1H), 4,68 (dd, 1H, J = 5,5 y 9,5 Hz), 4,56 (m, 2H), 4,35 (dd, 1H, J = 9,0 y 18,5 Hz), 4,10~4,21 (m, 3H), 3,97 (m, 1H), 3,92 (s, 3H), 3,45~3,79 (m, 42H), 3,35~3,44 (m, 3H), 3,11 (m, 1H), 2,96 (m, 1H), 2,61 (m, 2H), 2,44 (m, 2H), 2,06 (m, 1H), 1,65 (m, 2H), 1,21 (m, 1H), 0,99 (d, 3H, J = 7,0 Hz), 0,90 (m, 6H).

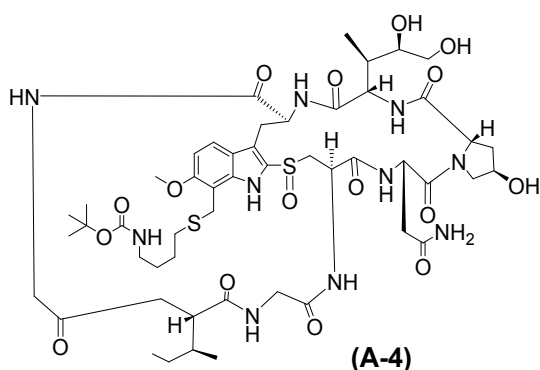
Paso 3: 6'O-metil-7'C-((23-azido-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosanthio)metil)- α -Amanitina (8 mg, 0,006 mmol) y 1-(prop-2-in-1-il)-1H-pirrol-2,5-diona (2 mg, 0,012 mmol) se agregaron a t-butanol (0,5 mL) y la mezcla de reacción se lavó con gas N₂ cinco veces. Ácido L-ascórbico y sal de sodio (1 mg, 0,006 mmol), CuSO₄ (0,2 mg, 0,0012 mmol) y 0,5 mL de H₂O luego fueron agregados. La mezcla de reacción se lavó con gas N₂ cinco veces y se agitó a ta durante 4 h, y luego purificó por RP-C18 ISCO para dar 6'O-metil-7'C-((23-(4-((2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosanthio)metil)- α -Amanitina (**C5**). MS (m+2/2) = 746,5, HPLC Pico TA = 0,850 min, ¹H-NMR (MeOD, 500 MHz) δ 10,74 (s, 1H), 8,83 (m, 1H), 8,63 (d, 1H, J = 2,0 Hz), 8,51 (d, 1H, J = 10,0 Hz), 8,47 (d, 1H, J = 3,5 Hz), 8,36 (s, 1H), 8,17 (d, 1H, J = 8,5 Hz), 8,04 (d, 1H, J = 10,0 Hz), 7,96 (d, 1H, J = 9,5 Hz), 7,94 (s, 1H), 7,69 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 6,97 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 6,83 (s, 2H), 5,34 (m, 1H), 5,17 (m, 1H), 4,79 (bs, 1H), 4,75 (s, 2H), 4,68 (dd, 1H, J

= 5,0 y 9,5 Hz), 4,56 (m, 2H), 4,52 (t, 1H, J = 5,0 Hz), 4,34 (dd, 1H, J = 9,0 y 18,5 Hz), 4,08~4,20 (m, 3H), 3,97 (m, 1H), 3,91 (s, 3H), 3,39~3,78 (m, 38H), 3,10 (m, 1H), 2,94 (dd, 1H, J = 14,0 y 15,0 Hz), 2,61 (m, 2H), 2,41 (m, 2H), 2,05 (m, 1H), 1,57~1,68 (m, 2H), 1,20 (m, 1H), 0,99 (d, 3H, J = 7,0 Hz), 0,91 (m, 6H).

Ejemplo 6: Síntesis de 6'O-metil-7'C-((4-(3-(23-((4-maleimido)metil-1H-1,2,3-triazol-1-il)-3,6,9,12,15,18,21-heptaioxatricosil)ureido)butiltio)metil)- α -Amanitina (**C6**)



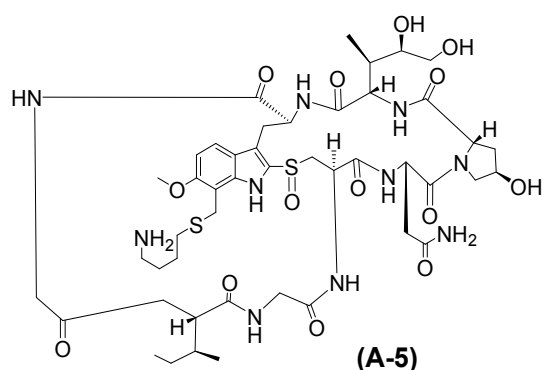
Paso 1: Formaldehído (0,027 mL, 0,33 mmol) y terc-butil (4-mercaptopbutil)carbamato (**i-7**) (34 mg, 0,16 mmol) se agregaron a una solución de α -Amanitina (**A**) (15 mg, 0,016 mmol) en MeOH (5 mL) y trietilamina (0,46 mL, 3,26mmol) en un vial de 40 mL, y la mezcla de reacción se agitó a 40 °C durante 3 días. Después de concentración in vacuo, el residuo se disolvió en 2 mL de MeOH y 408 μ L de 2M de trimetilsilil diazometano en dietil éter se agregó y la mezcla se agitó durante 2h a ta. Luego otros 408 μ L de 2M de trimetilsilil diazometano en dietil éter se agregaron y se agitó a ta durante 2 h. La mezcla de reacción se purificó por HPLC y liofilizó para dar 6'O-metil-7'C-((4-t-butoxycarbonilaminobutiltio)metil)- α -Amanitina (**A-4**),



. MS ($m+2-boc/2$) = 525,8, HPLC Pico TA = 0,936 min, ^1H -NMR (MeOD- d_4 , 400 MHz) δ 10,78 (s, 1H), 8,84 (m, 1H), 8,59 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 8,48 (s, 1H), 8,46 (d, 1H, J = 14,4 Hz), 8,35 (s, 1H), 8,15 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 8,01 (d, 1H, J = 10,0 Hz), 7,92 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 7,69 (s, 1H), 7,63 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 6,92 (d, 1H, J = 8,8

Hz), 5,28 (m, 1H), 5,13 (m, 1H), 4,73 (bs, 1H), 4,61 (dd, 1H, J = 5,6 y 8,4 Hz), 4,51 (m, 2H), 4,30 (dd, 1H, J = 8,8 y 18,4 Hz), 4,12 (m, 1H), 4,04 (d, 1H, J = 13,2 Hz), 3,94 (d, 1H, J = 13,2 Hz), 3,92 (m, 1H), 3,86 (s, 3H), 3,35~3,75 (m, 14H), 3,05 (m, 1H), 2,92 (m, 3H), 2,49 (m, 4H), 2,00 (m, 1H), 1,39~1,65 (m, 8H), 1,37 (s, 9H), 1,15 (m, 1H), 0,93 (d, 3H, J = 7,2 Hz), 0,84 (m, 6H).

Paso 2: TFA (1 mL) se agregó a 8 mg de compuesto **(A-4)** en un vial de 40 mL y la solución resultante se permitió reposar a ta durante 2 min y luego se concentró al vacío para dar 6'O-metil-7'C-((4-aminobutiltio)metil)- α -Amanitina **(A-5)**,

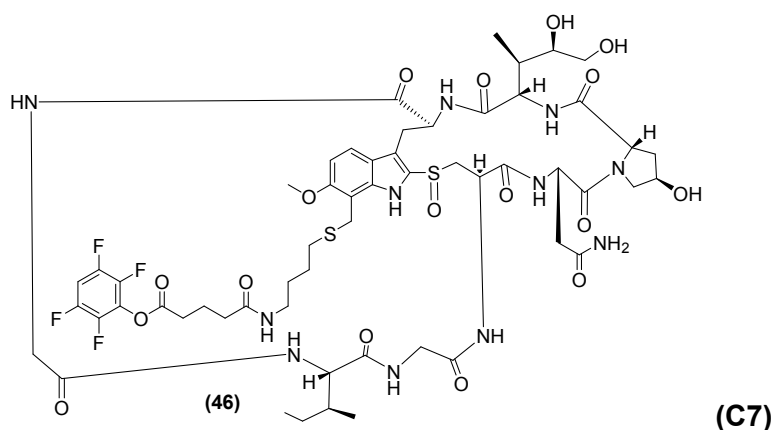


, que se usó sin purificación adicional. MS (m+1) = 1050,4, HPLC Pico TA = 0,635 min, 1H-NMR (MeOD-d₄, 400 MHz) δ 8,87 (m, 1H), 8,58 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 8,48 (d, 1H, J = 10,4 Hz), 8,44 (d, 1H, J = 1,6 Hz), 8,16 (d, 1H, J = 8,4 Hz), 7,97 (d, 1H, J = 9,6 Hz), 7,94 (d, 1H, J = 9,2 Hz), 7,62 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 6,92 (d, 1H, J = 9,2 Hz), 5,25 (m, 1H), 5,13 (m, 1H), 4,73 (m, 1H), 4,60 (dd, 1H, J = 5,6 y 9,2 Hz), 4,49 (m, 2H), 4,28 (dd, 1H, J = 8,8 y 18,4 Hz), 4,12 (m, 1H), 4,04 (d, 1H, J = 13,2 Hz), 3,99 (s, 2H), 3,92 (m, 1H), 3,86 (s, 3H), 3,83 (s, 1H), 3,60~3,72 (m, 4H), 3,30~3,60 (m, 10H), 3,00~3,20 (m, 2H), 2,90 (m, 1H), 2,76 (m, 2H), 2,00 (m, 1H), 1,50~1,75 (m, 7H), 1,16 (d, 1H, J = 5,6 Hz), 1,24 (d, 2H, J = 7,6 Hz), 1,15 (m, 1H), 0,94 (d, 3H, J = 6,8 Hz), 0,85 (m, 6H).

Paso 3: Trietilamina (3 μ L, 18 μ mol) se agregó a una solución de compuesto **(A-5)** (7,5 mg, 7 μ mol) y 4-nitrofenil (23-(4-((2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosil)carbamato (5,0 mg, 7 μ mol) en DMF (1 mL) y la mezcla de reacción se agito a ta durante 2 h, purificó por HPLC y liofilizó para dar 6'O-metil-7'C-((4-(3-(23-(4-maleimido)metil-1H-1,2,3-triazol-1-il)-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosil)ureido)butiltio)metil)- α -Amanitina **(C6)**. MS (m+2/2) = 803,5, HPLC Pico TA = 0,834 min, 1H-NMR (MeOD-d₄, 400 MHz) δ 10,76 (s, 1H), 8,84 (m, 1H), 8,59 (d, 1H, J = 2,0 Hz), 8,49 (s, 1H), 8,47 (d, 1H, J = 8,0 Hz), 8,15 (d, 1H, J = 8,4 Hz), 8,01 (d, 1H, J = 9,6 Hz), 7,92 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 7,90 (s, 1H), 7,63 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 6,92 (d, 1H, J = 9,2 Hz),

6,79 (s, 2H), 5,28 (m, 1H), 5,13 (m, 1H), 4,74 (m, 1H), 4,71 (s, 2H), 4,62 (dd, 1H, J = 5,2 y 9,6 Hz), 4,49 (m, 4H), 4,30 (dd, 1H, J = 8,8 y 18,4 Hz), 4,14 (m, 1H), 4,04 (d, 1H, J = 13,2 Hz), 3,94 (d, 1H, J = 13,2 Hz), 3,92 (m, 1H), 3,85 (s, 3H), 3,80 (t, 2H, J = 4,8 Hz), 3,35~3,75 (m, 38H), 2,90~3,10 (m, 4H), 2,92 (m, 1H), 2,40 (m, 4H), 2,01 (m, 1H), 1,38~1,65 (m, 6H), 1,15 (m, 1H), 0,94 (d, 3H, J = 6,8 Hz), 0,85 (m, 6H).

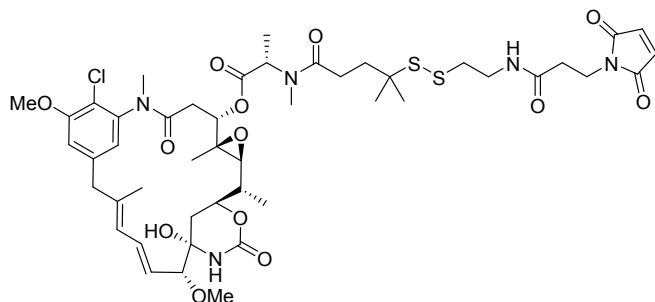
Ejemplo 7: Síntesis de Tetrafluorofenil éster de 6'O-metil-7'C-((4-(3-(carboxi)propanocarboxamido)butiltio)metil)- α -Amanitina (**C7**)



(**A-5**) (5 mg, 5 μ mol) y DMF (1 mL) se combinaron en un vial de 40 mL para dar una solución clara. bis(2,3,5,6-tetrafluorofenil) glutarato (2 mg, 5 μ mol) y DIEA (4 μ L, 20 μ mol) se agregaron. Después la mezcla de reacción se agito a ta durante 2 h, la mezcla de reacción se purificó por HPLC para dar Tetrafluorofenil éster de 6'O-metil-7'C-((4-(3-(carboxi)propanocarboxamido)butiltio)metil)- α -Amanitina (**C-7**). MS ($m+1$) = 1313,3, HPLC Pico TA = 0,996 min, 1H-NMR (MeOD, 400 MHz) δ 10,78 (s, 1H), 8,85 (m, 1H), 8,59 (s, 1H), 8,49 (s, 1H), 8,47 (d, 1H, J = 10,0 Hz), 8,35 (bs, 1H), 8,15 (d, 1H, J = 8,0 Hz), 8,01 (d, 1H, J = 9,6 Hz), 7,93 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 7,69 (bs, 1H), 7,63 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 7,36 (m, 1H), 6,92 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 5,27 (m, 1H), 5,14 (m, 1H), 4,75 (bs, 1H), 4,61 (dd, 1H, J = 5,2 y 9,6 Hz), 4,51 (m, 2H), 4,30 (dd, 1H, J = 8,4 y 18,0 Hz), 4,12 (m, 1H), 4,00 (d, 1H, J = 13,2 Hz), 3,95 (d, 1H, J = 13,2 Hz), 3,91 (m, 1H), 3,85 (s, 3H), 3,34~3,70 (m, 9H), 3,08 (m, 4H), 2,91 (m, 1H), 2,73 (t, 2H, J = 14,4 Hz), 1,98 (t, 2H, J = 7,6 Hz), 1,92~2,04 (m, 1H), 1,40~1,60 (m, 6H), 1,16 (m, 1H), 0,94 (d, 3H, J = 6,8 Hz), 0,87 (m, 6H)..

Otros compuestos de Fórmula (A), Fórmula (B), Fórmula (A-1), Fórmula (A-2), Fórmula (A-3), Fórmula (B-1), Fórmula (A-1a), Fórmula (A-2a), Fórmula (A-3a) o Fórmula (B-1a) se pueden realizar usando los métodos de Ejemplos 1-7 y materiales de partida apropiados.

[00193] Ejemplo 8: Preparación de la carga efectiva de ligador MPET.DM4:



[00194] Métodos Analíticos

A menos que se indique de otra forma, los siguientes métodos HPLC y HPLC/MS fueron usados en la preparación de Intermediarios y Ejemplos.

Análisis LC/MS se realizó en un sistema Agilent 1200sl/6140.

Columna: Waters Acquity HSS T3 C18, 50x2,0, 1,8um

Fase móvil: A) H₂O + 0,05% TFA; B: acetonitrilo + 0,035% TFA

Método Bomba:

Tiempo	A%	B%	Flujo (mL/min)
0	90	10	0,9
1,35	0	100	0,9
1,36	0	100	0,9
1,95	0	100	0,9
1,96	90	10	0,9
2,0	90	10	0,9

Detección: Matriz de Diodos UV a 190 nm – 400 nm

Barrido MS: 200 – 1350amu

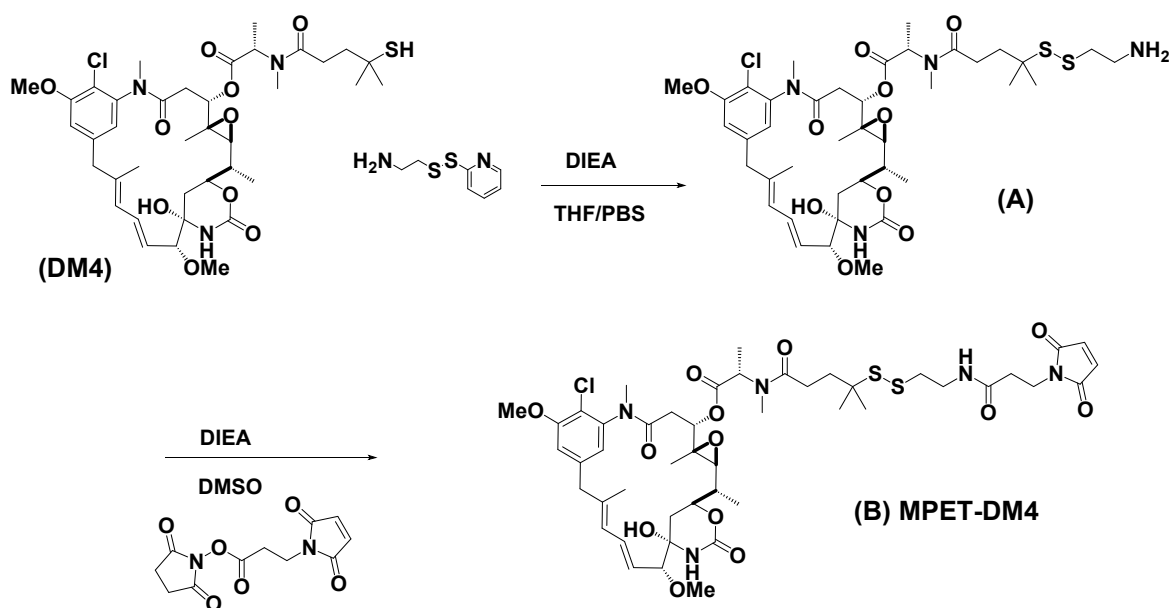
ELSD: 60°C

Parámetros MS:

Polaridad	Positivo
Gas Secado	12
Presión Nebulizador	50
Temperatura Gas Secado	350

Voltaje Capilar	3000
-----------------	------

[00195] (14S,16S,32S,33S,2R,4S,10E,12E,14R)-86-cloro-14-hidroxi-85,14-dimetoxi-33,2,7,10-tetrametil-12,6-dioxo-7-aza-1(6,4)-oxazinana-3(2,3)-oxirana-8(1,3)-bencenacicotetradecafane-10,12-dien-4-il N-(4-((2-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)etil)disulfanil)-4-metilpentanoyl)-N-metil-L-alaninato



[00196] Paso 1: Preparación de (14S,16S,32S,33S,2R,4S,10E,12E,14R)-86-cloro-14-hidroxi-85,14-dimetoxi-33,2,7,10-tetrametil-12,6-dioxo-7-aza-1(6,4)-oxazinana-3(2,3)-oxirana-8(1,3)-bencenacicotetradecafane-10,12-dien-4-il N-(4-((2-aminoetil)disulfanil)-4-metilpentanoil)-N-metil-L-alaninato

[00197] A DM4 (480 mg, 0,62 mmol) disuelto en regulador PBS (10,5 mL) y THF anhidro (21 mL) se agregaron 2-(piridin-2-ildisulfanil)etan-1-amina (151 mg, 0,68 mmol) y DIEA (0,27 mL, 1,54 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min y concentró in vacuo. El residuo acuoso se diluyó con CH₃CN (1 mL) y H₂O (2 mL) y purificó por ISCO de fase inversa, se eluyó con 10–60% acetonitrilo–H₂O que contiene 0,05% TFA. Fracciones que contienen el producto deseado fueron liofilizadas para obtener producto deseado (555 mg, 93 % rendimiento). ¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ ppm 0,83 (s, 3 H) 1,21 (d, *J*=5,0 Hz, 3 H) 1,25 (s, 3 H) 1,28 (s, 3 H) 1,30 (d, *J*=5,0 Hz, 3 H) 1,45–1,55 (m, 3 H) 1,67 (s, 3 H) 1,84–1,88 (m, 1 H) 1,95 – 2,01 (m, 1 H) 2,14 (dd, *J*=5,0 y 15,0 Hz, 1 H) 2,37–2,43 (m, 1 H) 2,53–2,59 (m, 1 H) 2,64 (dd, *J*=10,0 y 15,0 Hz,

1 H) 2,82–2,89 (m, 5 H) 2,91 (d, $J=10,0$ Hz, 1 H) 3,16 (dd, $J=5,0$ y $10,0$ Hz, 2 H) 3,20 (s, 3 H) 3,23 (d, $J=10,0$ Hz, 1 H) 3,35 (s, 3 H) 3,55 (d, $J=5,0$ Hz, 1 H) 3,58 (d, $J=10,0$ Hz, 1 H) 4,15–4,20 (m, 1 H) 4,64 (dd, $J=5,0$ y $10,0$ Hz, 1 H) 5,43 (q, $J=5,0$ Hz, 2 H) 5,66 (dd, $J=10,0$ y $15,0$ Hz, 1 H)) 6,58 (dd, $J=10,0$ y $15,0$ Hz, 1 H) 6,65 (d, $J=10,0$ Hz, 1 H) 6,66 (s, 1 H) 7,11 (bs, 1H) 7,28 (bs, 1H); MS m/z 855,3 (M+H), Tiempo de retención 0,988 minutos.

[00198] Paso 2: Preparación de (14S,16S,32S,33S,2R,4S,10E,12E,14R)–86–cloro–14–hidroxi–85,14–dimetoxi–33,2,7,10–tetrametil–12,6–dioxo–7–aza–1(6,4)–oxazinana–3(2,3)–oxirana–8(1,3)–bencenacicotetradecafane–10,12–dien–4–il N–(4–((2–(3–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)propanamido)etil)disulfanil)–4–metilpentanoil)–N–metil–L–alaninato.

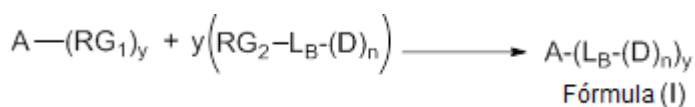
A (14S,16S,32S,33S,2R,4S,10E,12E,14R)–86–cloro–14–hidroxi–85,14–dimetoxi–33,2,7,10–tetrametil–12,6–dioxo–7–aza–1(6,4)–oxazinana–3(2,3)–oxirana–8(1,3)–bencenacicotetradecafane –10,12–dien–4–il N–(4–((2–aminoetil)disulfanil)–4–metilpentanoil)–N–metil–L–alaninato (555 mg, 0,57 mmol) disuelto en DMSO anhidro (7 mL) se agregaron 2,5–dioxopirrolidin–1–il 3–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)propanoato (171 mg, 0,63 mmol) y DIEA (249 mL, 1,43 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 min y neutralizó usando TFA. La mezcla se enfrió hasta 0 °C con baño de hielo, seguido por adición de CH₃CN (2 mL) y H₂O (7 mL), y luego purificó por ISCO de fase inversa, eluyendo con 10–70% acetonitrilo–H₂O que contiene 0,05% TFA. Fracciones que contienen el producto deseado fueron liofilizadas para obtener producto deseado (430 mg, 66 % rendimiento).). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0,81 (s, 3 H) 1,23 (s, 3 H) 1,24 (s, 3 H) 1,25 (s, 1 H) 1,28 (d, $J=5,0$ Hz, 3 H) 1,31 (d, $J=5,0$ Hz, 3 H) 1,43–1,49 (m, 1 H) 1,61 (d, $J=15,0$ Hz, 1 H) 1,64 (s, 3 H) 1,81–1,87 (m, 1 H) 1,94 – 2,01 (m, 1 H) 2,19 (dd, $J=5,0$ y $15,0$ Hz, 1 H) 2,30–2,36 (m, 1 H) 2,54 (t, $J=5,0$ Hz, 2 H) 2,61 (dd, $J=10,0$ y $15,0$ Hz, 1 H) 2,70 (t, $J=5,0$ Hz, 2 H) 2,88 (s, 3 H) 3,00 (d, $J=10,0$ Hz, 1 H) 3,13 (d, $J=10,0$ Hz, 1 H) 3,21 (s, 3 H) 3,55 (s, 3 H) 3,45 (q, $J=5,0$ Hz, 2 H) 3,49 (d, $J=5,0$ Hz, 1 H) 3,62 (d, $J=10,0$ Hz, 1 H) 3,83 (t, $J=5,0$ Hz, 1 H) 3,98 (s, 3 H) 4,32 (m, 1 H) 4,80 (dd, $J=5,0$ y $10,0$ Hz, 1 H) 5,28 (d, $J=5,0$ Hz, 1 H) 5,66 (dd, $J=10,0$ y $15,0$ Hz, 1 H)) 6,22 (bs, 1 H) 6,42 (dd, $J=10,0$ y $15,0$ Hz, 1 H) 6,50 (s, 1 H) 6,63 (s, 1 H) 6,66 (d, $J=10,0$ Hz, 1 H) 6,70 (s, 2H) 6,83(s, 1H); MS m/z 988,3 (M+H–H₂O), Tiempo de retención 1,145 minutos.

Conjugación y Preparación de ADCs

Procesos para Realizar Conjugado Anticuerpo de Fórmula (I)

[00199] Un esquema de reacción general para la formación de conjugados de Fórmula (I) se muestra en Esquema 1 debajo:

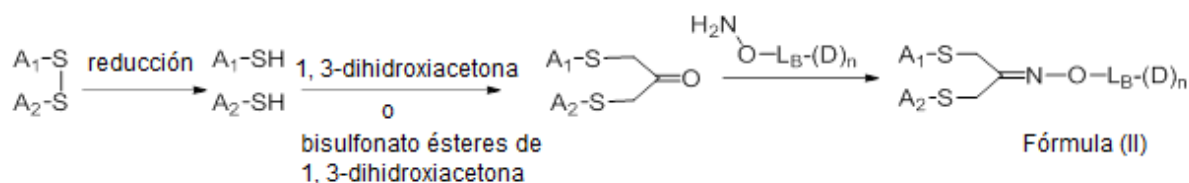
Esquema 1



donde: RG_1 es un grupo reactivo, a modo de ejemplo sólo un tiol o amina o cetona, que reacciona con un grupo reactivo compatible, RG_2 , adherido al ligador-resto droga así uniendo covalentemente fragmento anticuerpo, A, a uno o más ligador-restos droga. Ejemplos no limitativos de dichas reacciones de grupos RG_1 y RG_2 es una maleimida (RG_2) reaccionando con un tiol (RG_1) para dar un anillo succinimida, o una hidroxilamina (RG_2) reaccionando con una cetona (RG_1) para dar una oxima.

[00200] Un esquema de reacción general para la formación de conjugados de Fórmula (II) se muestra en Esquema 2 debajo:

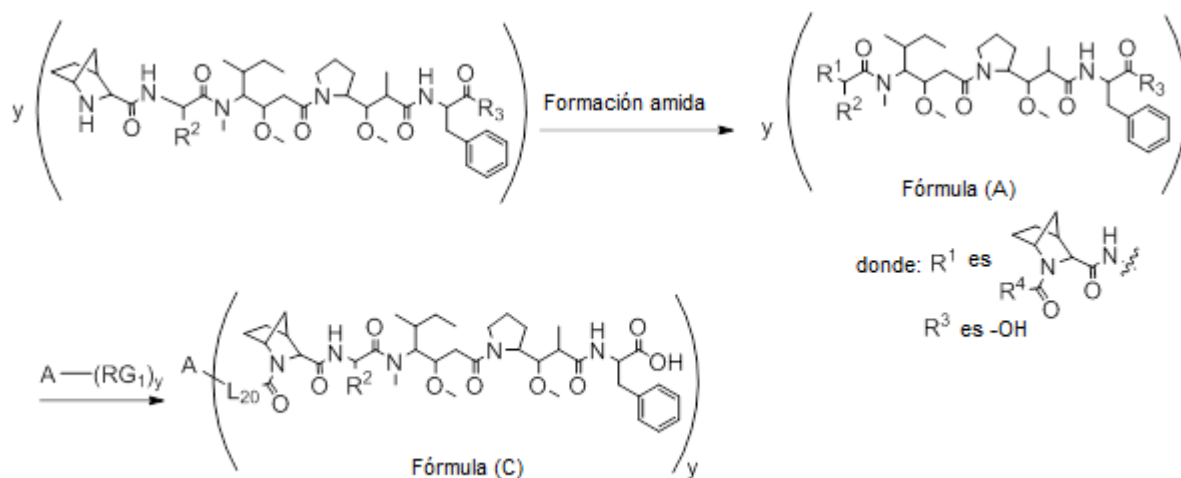
Esquema 2



donde: A_1 , A_2 , L_B , D y n son como se define en la presente, la 1,3-dihaloacetona se selecciona entre 1,3-dicloroacetona, 1,3-dibromoacetona, y 1,3-diiodoacetona, y el paso de reducción se lleva a cabo usando un agente de reducción seleccionado entre ditioneol (DTT) y Tris(2-carboxietil)fosfina clorhidrato (TCEP-HCl).

[00201] Un esquema de reacción general para la formación de conjugados de Fórmula (C) se muestra en Esquema 3 debajo:

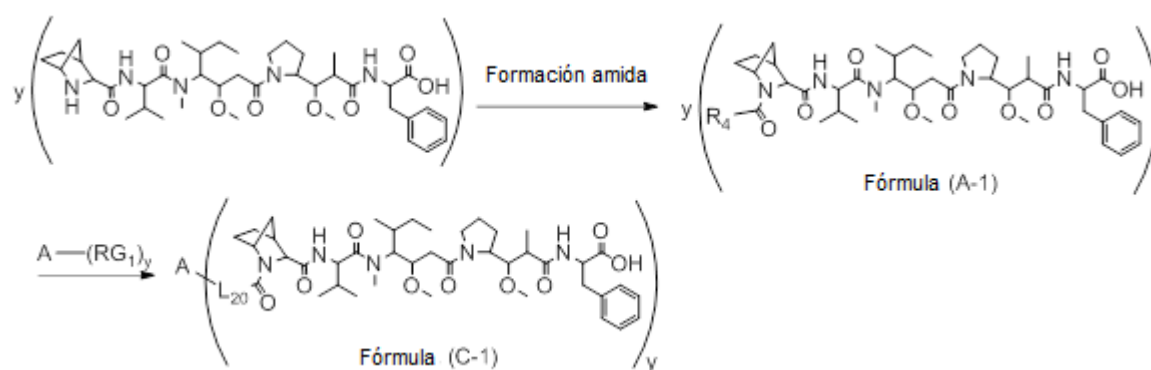
Esquema 3



donde L_{20} es $-L_1R^{40}$; R^4 es $-L_1R^{14}$, $-L_2R^{24}$ o $-L_2R^{34}$ y RG_1 es un grupo reactivo, a modo de ejemplo solamente un tiol o amina o cetona, que reacciona con un grupo R^{14} , R^{24} o R^{34} compatible de un compuesto de Fórmula (A) para formar un grupo R^{40} correspondiente. A modo de ejemplo, una maleimida que reacciona con un tiol para dar un anillo succinimida, o una hidroxilamina que reacciona con una cetona para dar una oxima. A, R^2 , L_1 , L_2 , R^{14} , R^{24} , R^{34} y R^{40} son como se define en la presente.

[00202] Un esquema de reacción general para la formación de conjugados de Fórmula (C-1) se muestra en Esquema 4 debajo:

Esquema 4

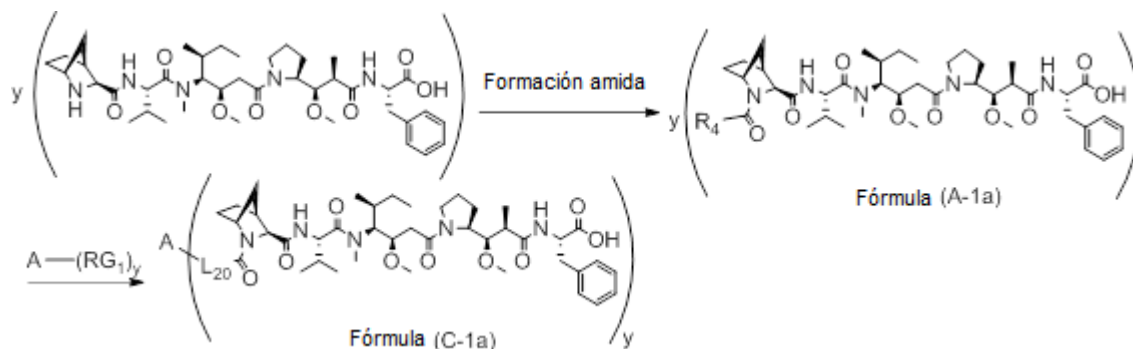


donde: L_{20} es $-L_1R^{40}$; R^4 es $-L_1R^{14}$, $-L_2R^{24}$ o $-L_2R^{34}$ y RG_1 es un grupo reactivo que reacciona con un grupo R^{14} , R^{24} o R^{34} compatible de un compuesto de Fórmula (A-1) para formar un grupo R^{40} correspondiente. A modo de ejemplo, una maleimida que reacciona con un tiol para

dar un anillo succinimida, o una hidroxilamina que reacciona con una cetona para dar una oxima. A, L₁, L₂, R¹⁴, R²⁴, R³⁴ y R⁴⁰ son como se define en la presente.

[00203] Un esquema de reacción general para la formación de conjugados de Fórmula (C-1a) se muestra en Esquema 5 debajo:

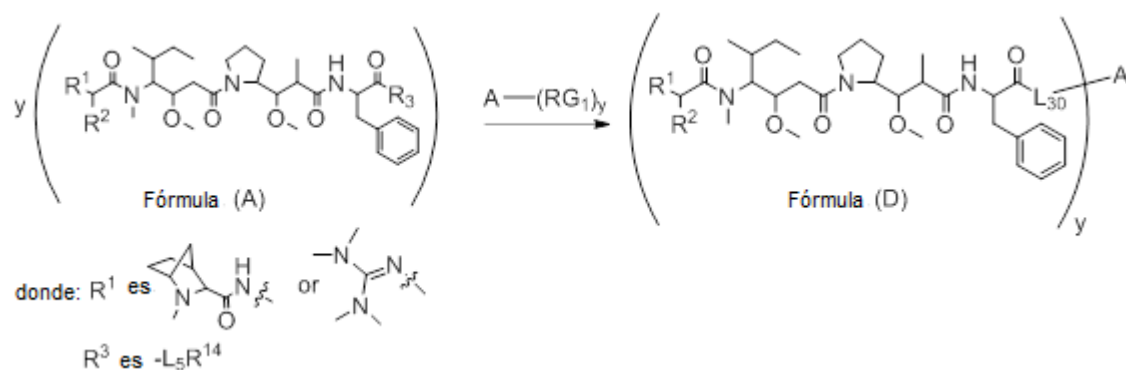
Esquema 5



donde: L₂₀ es -L₁R⁴⁰; R⁴ es -L₁R¹⁴, -L₂R²⁴ o -L₂R³⁴ y RG₁ es un grupo reactivo, a modo de ejemplo solamente un tiol o amina o cetona, que reacciona con un grupo R¹⁴, R²⁴ o R³⁴ compatible de un compuesto de Fórmula (A-1a) para formar un grupo R⁴⁰ correspondiente. A modo de ejemplo, una maleimida que reacciona con un tiol para dar un anillo succinimida, o una hidroxilamina que reacciona con una cetona para dar una oxima. A, L₁, L₂, R¹⁴, R²⁴, R³⁴ y R⁴⁰ son como se define en la presente.

[00204] Un esquema de reacción general para la formación de conjugados de Fórmula (D) se muestra en Esquema 6 debajo:

Esquema 6



donde: L₃₀ es -L₅R⁴⁰; R³ es -L₅R¹⁴ y RG₁ es un grupo reactivo que, a modo de ejemplo solamente un tiol o amina o cetona, reacciona con un grupo R¹⁴ compatible de un compuesto de Fórmula (A) para formar un grupo R⁴⁰ correspondiente. A modo de ejemplo, una maleimida

que reacciona con un tiol para dar un anillo succinimida, o una hidroxilamina que reacciona con una cetona para dar una oxima. A, R², L₅, R¹⁴ y R⁴⁰ son como se define en la presente.

[00205] Un esquema de reacción general para la formación de conjugados de Fórmula (D-1) se muestra en Esquema 7 debajo:

Esquema 7



donde: L₃₀ es -L₅R⁴⁰ y RG₁ es un grupo reactivo, a modo de ejemplo solamente un tiol o amina o cetona, que reacciona con un grupo R¹⁴ compatible de un compuesto de Fórmula (A-2) para formar un grupo R⁴⁰ correspondiente. A modo de ejemplo, una maleimida que reacciona con un tiol para dar un anillo succinimida, o una hidroxilamina que reacciona con una cetona para dar una oxima. A, L₅, R¹⁴ y R⁴⁰ son como se define en la presente.

[00206] Un esquema de reacción general para la formación de conjugados de Fórmula (D-1a) se muestra en Esquema 8 debajo:

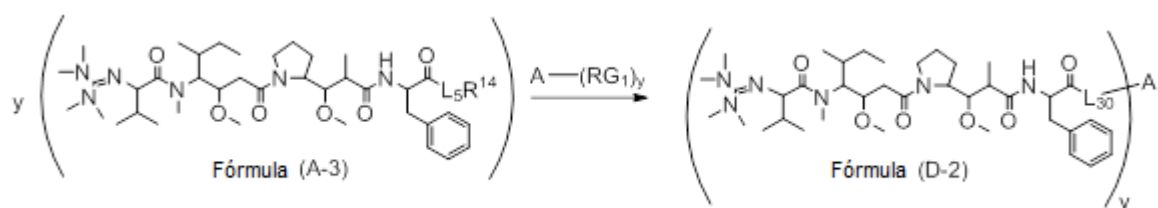
Esquema 8



donde: L₃₀ es -L₅R⁴⁰ y RG₁ es un grupo reactivo, a modo de ejemplo solamente un tiol o amina o cetona, que reacciona con un grupo R¹⁴ compatible de un compuesto de Fórmula (A-2) para formar un grupo R⁴⁰ correspondiente. A modo de ejemplo, una maleimida que reacciona con un tiol para dar un anillo succinimida, o una hidroxilamina que reacciona con una cetona para dar una oxima. A, L₅, R¹⁴ y R⁴⁰ son como se define en la presente.

[00207] Un esquema de reacción general para la formación de conjugados de Fórmula (D-2) se muestra en Esquema 9 debajo:

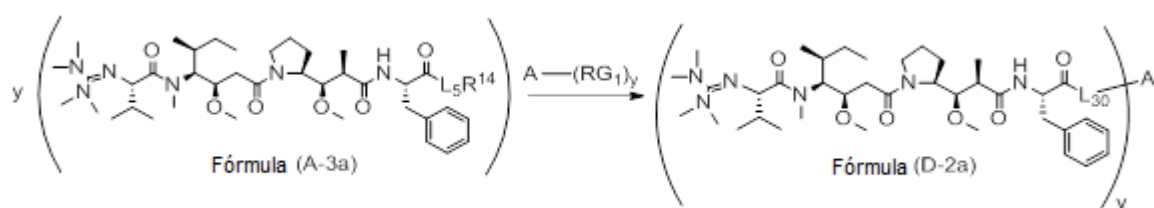
Esquema 9



donde: L_{30} es $-L_5R^{40}$ y RG_1 es un grupo reactivo, a modo de ejemplo solamente un tiol o amina o cetona, que reacciona con un grupo R^{14} compatible de un compuesto de Fórmula (A-3) para formar un grupo R^{40} correspondiente. A modo de ejemplo, una maleimida que reacciona con un tiol para dar un anillo succinimida, o una hidroxilamina que reacciona con una cetona para dar una oxima. A, L_5 , R^{14} y R^{40} son como se define en la presente.

[00208] Un esquema de reacción general para la formación de conjugados de Fórmula (D-2a) se muestra en Esquema 10 debajo:

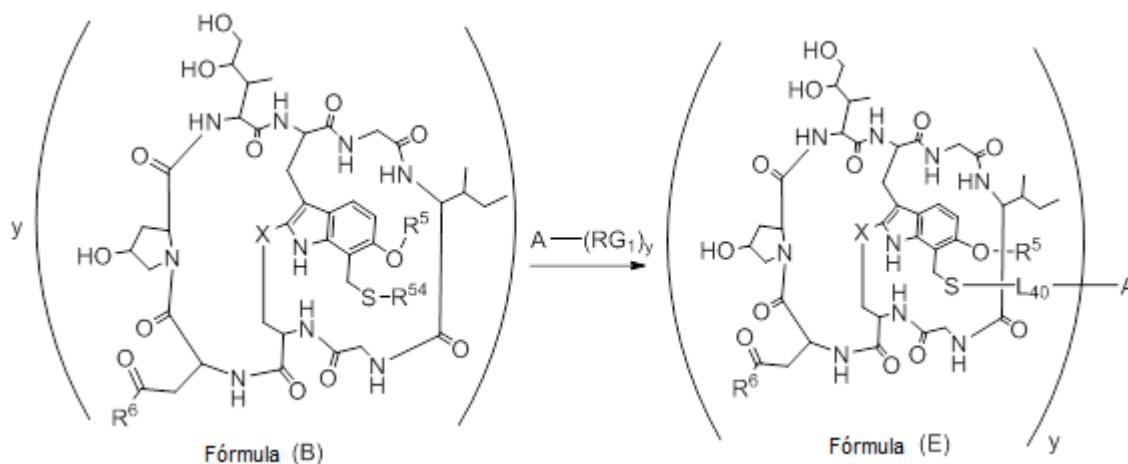
Esquema 10



donde: L_{30} es $-L_5R^{40}$ y RG_1 es un grupo reactivo, a modo de ejemplo solamente un tiol o amina o cetona, que reacciona con un grupo R^{14} compatible de un compuesto de Fórmula (A-3a) para formar un grupo R^{40} compatible. A modo de ejemplo, una maleimida que reacciona con un tiol para dar un anillo succinimida, o una hidroxilamina que reacciona con una cetona para dar una oxima. A, L_5 , R^{14} y R^{40} son como se define en la presente.

[00209] Un esquema de reacción general para la formación de conjugados de Fórmula (E) se muestra en Esquema 11 debajo:

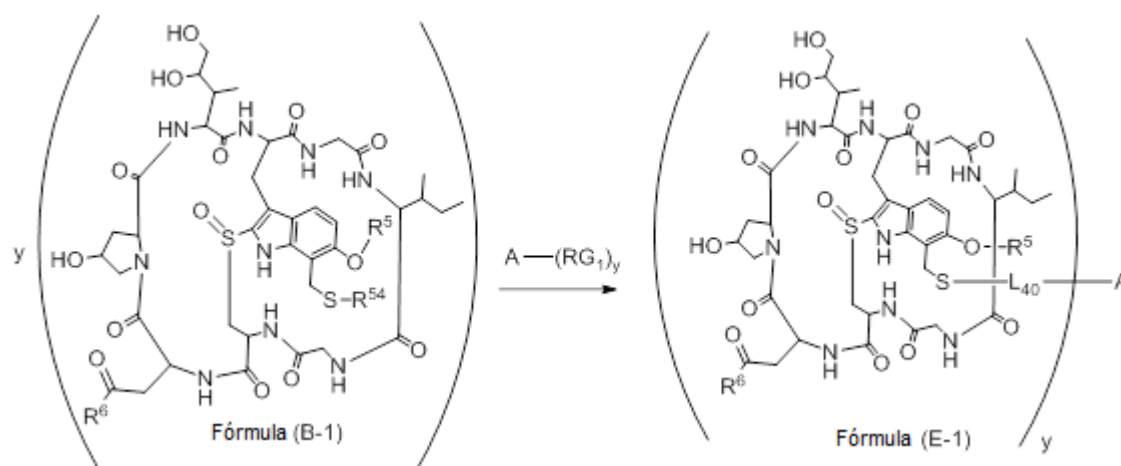
Esquema 11



donde: L_{40} es $-L_6R^{40}$; R^{54} es $-L_6R^{14}$, $-L_7R^{24}$ o $-L_7R^{34}$ y RG_1 es un grupo reactivo, a modo de ejemplo solamente un tiol o amina o cetona, que reacciona con un grupo R^{14} , R^{24} o R^{34} compatible de un compuesto de Fórmula (B) para formar un grupo R^{40} compatible. A modo de ejemplo, una maleimida que reacciona con un tiol para dar un anillo succinimida, o una hidroxilamina que reacciona con una cetona para dar una oxima. A, X, R^5 , R^6 , L_6 , L_7 , R^{14} , R^{24} , R^{34} y R^{40} son como se define en la presente.

[00210] Un esquema de reacción general para la formación de conjugados de Fórmula (E-1) se muestra en Esquema 12 debajo:

Esquema 12

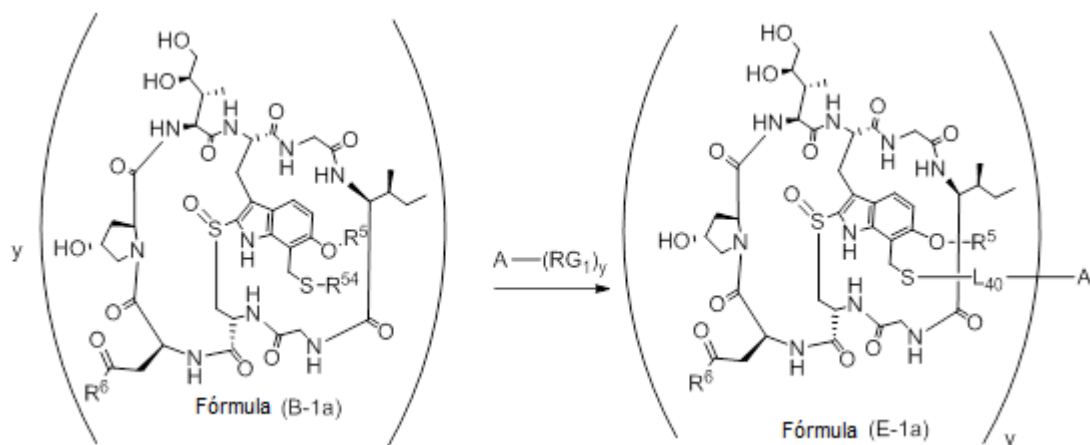


donde: L_{40} es $-L_6R^{40}$; R^{54} es $-L_6R^{14}$, $-L_7R^{24}$ o $-L_7R^{34}$ y RG_1 es un grupo reactivo, a modo de ejemplo solamente un tiol o amina o cetona, que reacciona con un grupo R^{14} , R^{24} o R^{34} compatible de un compuesto de Fórmula (B-1) para formar un grupo R^{40} compatible. A modo de ejemplo, una maleimida que reacciona con un tiol para dar un anillo succinimida, o una

hidroxilamina que reacciona con una cetona para dar una oxima. A, y, R⁵, R⁶, L₆, L₇, R¹⁴, R²⁴, R³⁴ y R⁴⁰ son como se define en la presente.

[00211] Un esquema de reacción general para la formación de conjugados de Fórmula (E-1a) se muestra en Esquema 13 debajo:

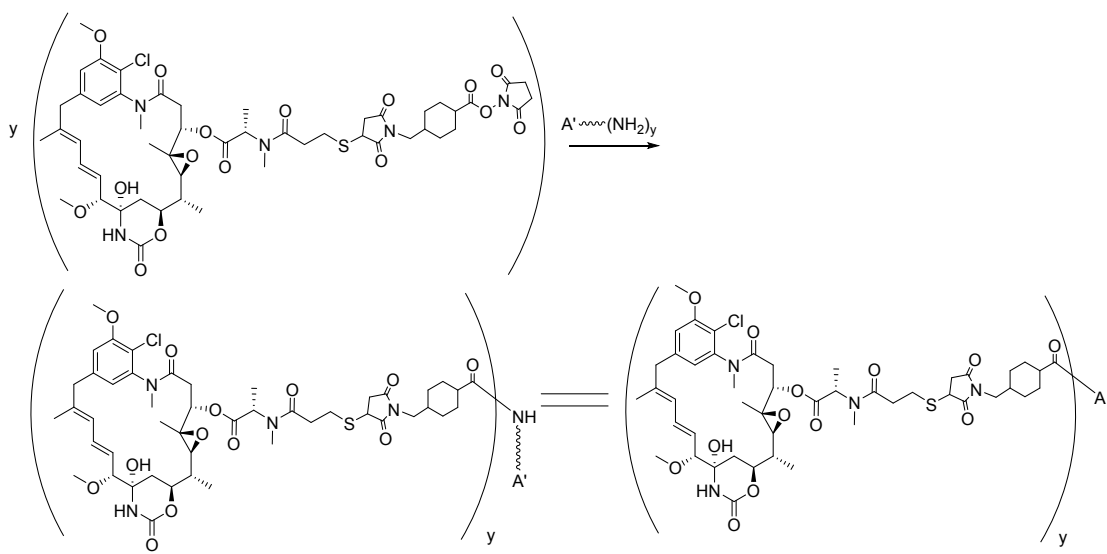
Esquema 13



donde: L₄₀ es -L₆R⁴⁰; R⁵⁴ es -L₆R¹⁴, -L₇R²⁴ o -L₇R³⁴ y RG₁ es un grupo reactivo, a modo de ejemplo solamente un tiol o amina o cetona, que reacciona con un grupo R¹⁴, R²⁴ o R³⁴ compatible de un compuesto de Fórmula (B-1a) para formar un grupo R⁴⁰ compatible. A modo de ejemplo, una maleimida que reacciona con un tiol para dar un anillo succinimida, o una hidroxilamina que reacciona con una cetona para dar una oxima. A, y, R⁵, R⁶, L₆, L₇, R¹⁴, R²⁴, R³⁴ y R⁴⁰ son como se define en la presente.

[00212] Un esquema de reacción general para la formación de conjugados que comprende un resto maitansinoide se muestra en Esquema 14 debajo:

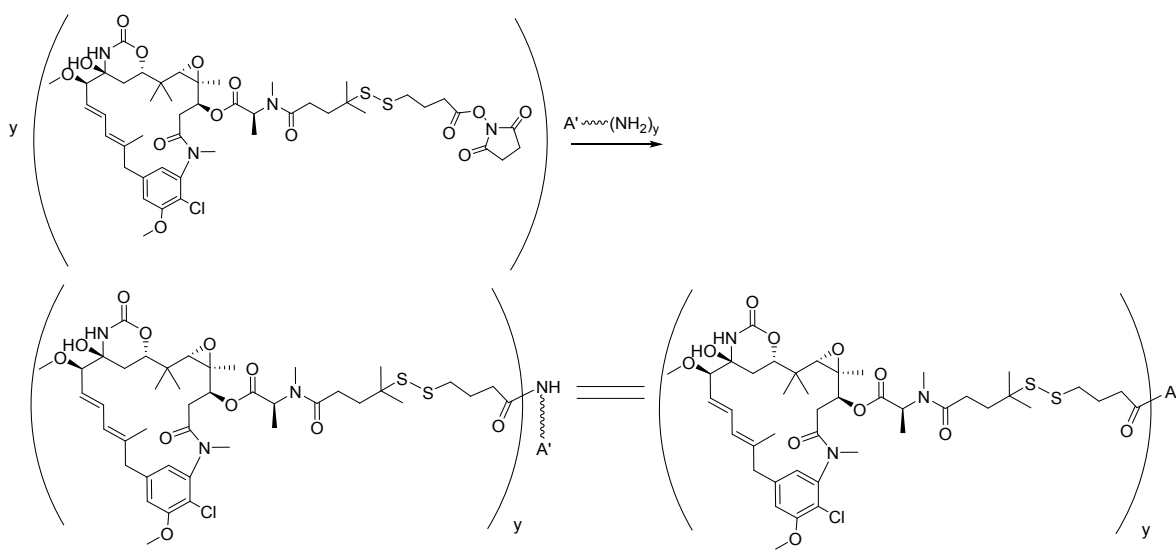
Esquema 14



donde uno o más NHS ésteres de una o más ligador–carga efectiva reacciona con una o más aminas libres en A (es decir $A'-(NH_2)_y$), formando así un conjugado. A es como se define en la presente y A' es la porción de A que no incluye el resto amina libre.

[00213] Un esquema de reacción general para la formación de conjugados que comprende un resto maitansinoide se muestra en Esquema 15 debajo:

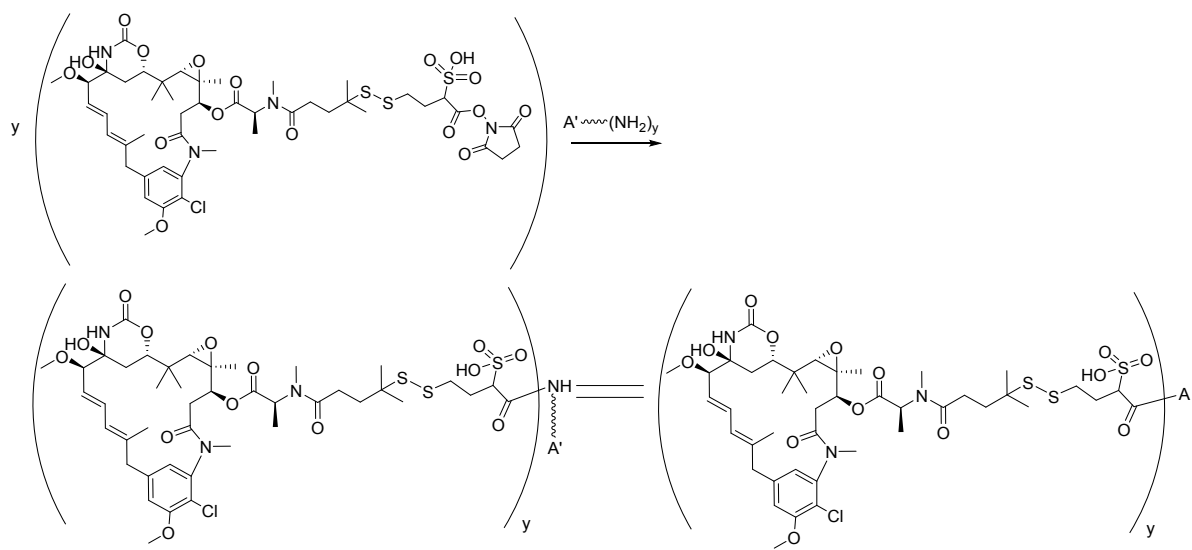
Esquema 15



donde uno o más NHS ésteres de una o más ligador–carga efectiva reacciona con una o más aminas libres en A (es decir $A'-(NH_2)_y$), formando así un conjugado. A es como se define en la presente y A' es la porción de A que no incluye el resto amina libre.

[00214] Un esquema de reacción general para la formación de conjugados que comprende un resto maitansinoide se muestra en Esquema 16 debajo:

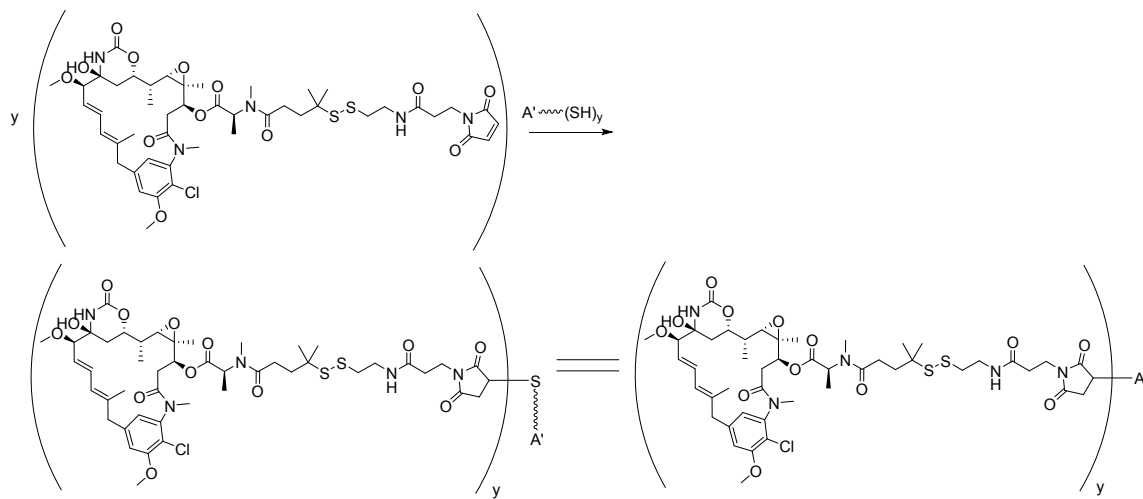
Esquema 16



donde uno o más NHS ésteres de una o más ligador–carga efectiva reacciona con una o más aminas libres en A (es decir $A'-(NH_2)_y$), formando así un conjugado. A es como se define en la presente y A' es la porción de A que no incluye el resto amina libre.

[00215] Un esquema de reacción general para la formación de conjugados que comprende un resto maitansinoide se muestra en Esquema 17 debajo:

Esquema 17



donde una o más maleimides de una o más ligador–carga efectiva reacciona con uno o más tioles libres en A (es decir $A'-(SH)_y$), formando así un conjugado. A es como se define en la presente y A' es la porción de A que no incluye el resto tiol libre.

4. Caracterización y Selección de ADCs anti-cKIT Deseables

Determinación de DAR y agregación del ADCs

[00216] Valor DAR del ADC cKIT se evaluó mediante cromatografía líquida-espectrometría de masa (LC-MS). Una relación compuesto –a–anticuerpo fue extrapolada a partir de datos LC-MS para muestras reducidas y desglicosiladas (cuando resulte apropiado, es decir cuando Fc se incluye). LC-MS permite cuantificación del número promedio de moléculas de ligador –carga efectiva (compuesto) adherido a un anticuerpo en una muestra de conjugado.

[00217] Los conjugados anticuerpo droga de la invención fueron evaluados usando métodos analíticos. Dicha metodología analítica y resultados pueden demostrar que los conjugados tienen propiedades favorables, por ejemplo propiedades que los harían más fáciles de ser elaborados, más fáciles para administrar a pacientes, más eficaces, y/o potencialmente más seguros para pacientes. Un ejemplo es la determinación de cromatografía por exclusión de tamaño molecular (SEC) donde la cantidad de especies de anticuerpo deseadas en una muestra se determina en relación a la cantidad de contaminantes alto peso molecular (por ej., dímero, multímero, o anticuerpo agregado) o contaminantes de bajo peso molecular (por ej., fragmentos de anticuerpo, productos de degradación, o cadenas de anticuerpo individual) presentes en la muestra. En general, se desea tener mayores cantidades de monómero y menor cantidades de, por ejemplo, anticuerpo agregado debido al impacto de, por ejemplo, agregados en otras propiedades de la muestra de anticuerpo tal como aunque sin limitación índice de depuración, inmunogenicidad, y toxicidad. Un ejemplo adicional es la determinación de la hidrofobicidad por cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) donde la hidrofobicidad de una muestra es evaluada en relación a un conjunto de anticuerpos estándar de propiedades conocidas. En general, se desea tener baja hidrofobicidad debido al impacto de hidrofobicidad sobre otras propiedades de la muestra anticuerpo tal como aunque sin limitación a agregación, agregación con el transcurso del tiempo, adherencia a superficies, hepatotoxicidad, índices de depuración, y exposición farmacocinética. Ver Damle, N.K., Nat Biotechnol. 2008; 26(8):884–885; Singh, S.K., Pharm Res. 2015; 32(11):3541–71.

Selección de ADCs anti–cKIT

[00218] Para seleccionar ADCs anti–cKIT adecuados para usar en los métodos que se describen en la presente, un ensayo de destrucción de células madre hematopoyéticas humanas *in vitro* se puede usar para rastrear los ADCs anti–cKIT por su eficacia y potencia.

Por ejemplo, los métodos descritos en Ejemplo 5 se pueden usar para rastrear ADCs anti-cKIT. ADCs anti-cKIT adecuados se pueden seleccionar en base a EC₅₀, por ej., ADC anti-cKIT con un EC₅₀ menos de 500 µg/ml, por ej., menos de 100 µg/ml, menos de 50 µg/ml, menos de 10 µg/ml, o menos de 5 µg/ml.

[00219] Adicionalmente, se ha informado que cKIT se expresa en células madres, y factor de célula madre (SCF), el ligando de cKIT, induce desgranulación directa de mastocitos peritoneal de rata *in vitro* e *in vivo* (Taylor et al., Immunology. 1995 Nov;86(3):427–33). SCF también induce desgranulación de mastocitos humanos *in vivo* (Costa et al., J Exp Med. 1996; 183(6): 2681–6). Para evitar efectos perjudiciales potenciales provocados por desgranulación de mastocitos en receptores de trasplante, ADCs cKIT seleccionados pueden ser evaluados por su capacidad para inducir desgranulación de mastocitos *in vitro*. Por ejemplo, experimentos descritos en Ejemplo 6 se pueden usar para rastrear ADCs cKIT, y ADCs anti-cKIT adecuados pueden ser seleccionados en base a desgranulación de mastocitos mínima, por ej., una lectura O.D. corregida de valor de referencia de menos de 0,25, por ej., menos de 0,2, menos de 0,15, o menos de 0,1, en un ensayo de liberación beta-hexosaminidasa.

Anticuerpo cKIT y Fragmentos de Anticuerpo

[00220] La presente revelación proporciona anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (por ej., fragmentos de unión a antígeno) que específicamente se unen a cKIT humano. Anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (por ej., fragmentos de unión a antígeno) de la presente revelación incluyen, aunque no se limitan a, los anticuerpos monoclonales humanos o sus fragmentos descritos debajo.

[00221] En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-cKIT revelados en la presente o fragmentos de anticuerpo (por ej., fragmentos de unión a antígeno) tienen una capacidad reducida para producir desgranulación de mastocitos, incluso cuando fueron entrecruzados y/o multimerizados en complejos más grandes, en comparación con un anticuerpo anti-cKIT de longitud completa. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-cKIT o fragmentos de anticuerpo (por ej., fragmentos de unión a antígeno) que se revelan en la presente son modificados para tener capacidad reducida para inducir desgranulación de células madre, incluso cuando fueron entrecruzados y/o multimerizados en complejos más grandes. Por ejemplo, los anticuerpos anti-cKIT o fragmentos de anticuerpo (por ej., fragmentos de unión a antígeno) que se revelan en la presente son modificados para tener una capacidad reducida para inducir desgranulación de mastocitos que es, es aproximadamente, o es al menos 10%,

20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% reducida en comparación con un anticuerpo anti-cKIT de longitud completa, o un $F(ab')_2$ o su fragmento $F(ab)_2$, incluso cuando fueron entrecruzados y/o multimerizados en complejos más grandes. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-cKIT o fragmentos de anticuerpo (por ej., fragmentos de unión a antígeno) que se revelan en la presente pueden comprender un Fab o fragmento Fab' anti-cKIT. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-cKIT o fragmentos de anticuerpo (por ej., fragmentos de unión a antígeno) que se revelan en la presente pueden tener capacidad mínima para inducir desgranulación de mastocitos, por ej., una lectura O.D. corregida de valor de referencia de menos de 0,25, por ej., menos de 0,2, menos de 0,15, o menos de 0,1, en un ensayo de liberación beta-hexosaminidasa, incluso cuando fueron entrecruzados y/o multimerizados en complejos más grandes.

[00222] Los conjugados anticuerpo droga que se proporcionan en la presente incluyen un fragmento de anticuerpo de unión cKIT humano (por ej., Fab o Fab'). En algunas realizaciones, conjugados anticuerpo droga proporcionados en la presente incluyen un fragmento de anticuerpo humano o humanizado (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano. En algunas realizaciones, conjugados anticuerpo droga proporcionados en la presente incluyen un Fab' humano o humanizado que específicamente se une a cKIT humano. En algunas realizaciones, conjugados anticuerpo droga proporcionados en la presente incluyen un Fab humano o humanizado que específicamente se une a cKIT humano.

[00223] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de cualquier dominio VH que se describe en la Tabla 1 (por ej., SEQ ID NO: 10, 36, 54, 69, 95). Otro anticuerpo o fragmento de anticuerpo adecuado (por ej., Fab o Fab') puede incluir un dominio VH que tiene al menos 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, o 99 identidad de secuencia por ciento con cualquiera de los dominios VH que se describen en la Tabla 1.

[00224] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una VH CDR (o HCDR) que tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las VH CDRs (o HCDR) enumeradas en Tabla 1. En aspectos particulares, la presente revelación proporciona el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que comprende (o alternativamente, se compone de) uno, dos, tres, cuatro, cinco o más VH CDRs (o HCDR) que tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las VH CDRs (o HCDR) enumeradas en Tabla 1.

[00225] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de dominio VL que se describe en la Tabla 1 (por ej., SEQ ID NO: 23, 47, 82, 108). Otro anticuerpo o fragmento de anticuerpo adecuado (por ej., Fab o Fab') puede incluir un dominio VL que tiene al menos 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, o 99 identidad de secuencia por ciento con cualquiera de los dominios VL que se describen en la Tabla 1.

[00226] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una VL CDR (o LCDR) que tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las VL CDRs (o LCDR) enumeradas en Tabla 1. En aspectos particulares, la presente revelación proporciona el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que comprende (o alternativamente, se compone de) uno, dos, tres, cuatro, cinco o más VL CDRs (o LCDR) que tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las VL CDRs (o LCDR) enumeradas en Tabla 1.

[00227] Otros anticuerpos anti-cKIT o fragmentos de anticuerpos (por ej., Fab o Fab') que se revelan en la presente incluyen aminoácidos que han sido mutados, no obstante tienen al menos 60, 70, 80, 90 o 95 identidad de secuencia por ciento en las regiones CDR con las regiones CDR representadas en las secuencias que se describen en la Tabla 1. En algunos aspectos, incluye secuencias de aminoácidos mutadas donde no más de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos han sido mutados en las regiones CDR al comparar con las regiones CDR representadas en la secuencia que se describe en la Tabla 1.

[00228] La presente revelación también proporciona secuencias de ácido nucleico que codifican VH, VL, la cadena pesada, y la cadena liviana del anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano. Dichas secuencias de ácido nucleico pueden ser optimizadas para expresión en células mamíferas.

Tabla 1. Secuencias de anticuerpos anti-CKIT y fragmentos de anticuerpo ejemplares

Ab1/Fab1/Fab'1Anti-cKIT		
SEQ ID NO: 1	HCDR1 (Kabat)	SYAIS
SEQ ID NO: 2	HCDR2 (Kabat)	VIFPAEGAPGYAQKFQG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Kabat)	GGYISDFDV
SEQ ID NO: 4	HCDR1 (Chothia)	GGTFSSY
SEQ ID NO: 5	HCDR2 (Chothia)	FPAEGA
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Chothia)	GGYISDFDV

SEQ ID NO: 6	HCDR1 (Combinada)	GGTFSSYAI
SEQ ID NO: 2	HCDR2 (Combinada)	VIFPAEGAPGYAQKFQG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Combinada)	GGYISDFDV
SEQ ID NO: 7	HCDR1 (IMGT)	GGTFSSYA
SEQ ID NO: 8	HCDR2 (IMGT)	IFPAEGAP
SEQ ID NO: 9	HCDR3 (IMGT)	ARGGYISDFDV
SEQ ID NO: 10	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGVIFPAEGAPGYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARGG YISDFDVWGQGT LTVSS
SEQ ID NO: 11	VH DNA	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGCGGTGCCGAAGT GAAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTTAGCT GCAAAGCATCCGGAGGGACGTTTAGCAGCTAT GCGATTAGCTGGGTGCGCCAGGCCCGGGCC AGGGCCTCGAGTGGATGGGCGTTATCTTCCCG GCTGAAGGCGCTCCGGGTTACGCCCAGAAATT TCAGGGCCGGGTGACCATTACCGCCGATGAAA GCACCAGCACCGCCTATATGGAAGT GAGCAGC CTGCGCAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTG CGCGCGTGGTGGTTACATCTCTGACTTCGATG TTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGC TCA
SEQ ID NO: 12	Ab HC	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGVIFPAEGAPGYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARGG YISDFDVWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 13	Ab HC DNA	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGCGGTGCCGAAGT GAAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTTAGCT GCAAAGCATCCGGAGGGACGTTTAGCAGCTAT GCGATTAGCTGGGTGCGCCAGGCCCGGGCC AGGGCCTCGAGTGGATGGGCGTTATCTTCCCG GCTGAAGGCGCTCCGGGTTACGCCCAGAAATT

		TCAGGGCCGGGTGACCATTACCGCCGATGAAA GCACCAGCACCGCCTATATGGAAGTGAAGCAGC CTGCGCAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTG CGCGCGTGGTGGTTACATCTCTGACTTCGATG TTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGC TCAGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCC CCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCG GAACTGCTGCCCTGGGTTGCCTGGTGAAGGAC TACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTGGA CTCTGGGGCTCTGACTTCCGGCGTGACACCT TCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTAC AGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCTCCAG CTCTCTGGGAACCCAGACCTATATCTGCAACGT GAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA AGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACC CACACCTGCCCCCCCCTGCCAGCTCCAGAACT GCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCTGTTCCCCC CCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGG ACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACG TGTCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAAC TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACG CCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAAC AGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGT GCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAAT ACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCA GCCCCAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAA GGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACC CTGCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAGA ACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGC TTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACACTACAAGA CCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAG CTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAA GTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAAGCT GCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCAC TACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGG CAAG
SEQ ID NO: 14	Fab' HC(EU236)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGVIFPAEGAPGYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGG YISDFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICN

		VNHKPSNTKVDRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL G
SEQ ID NO: 15	Fab' HC DNA	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGCGGTGCCGAAGT GAAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTTAGCT GCAAAGCATCCGGAGGGACGTTTTCAGCAGCTAT GCGATTAGCTGGGTGCGCCAGGCCCGGGCC AGGGCCTCGAGTGGATGGGCGTTATCTTCCCG GCTGAAGGCGCTCCGGGTACGCCCAGAAATT TCAGGGCCGGGTGACCATTACGCCGATGAAA GCACCAGCACCGCCTATATGGAAGTGAAGCAGC CTGCGCAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTG CGCGCGTGGTGGTTACATCTCTGACTTCGATG TTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGC TCAGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCC CCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCG GAACTGCTGCCCTGGGTGCCTGGTGAAGGAC TACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTCTGGAA CTCTGGGGCTCTGACTTCCGGCGTGACACCT TCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTAC AGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCTCCAG CTCTCTGGGAACCCAGACCTATATCTGCAACGT GAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA AGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACC CACACCTGCCCCCCCCTGCCAGCTCCAGAACT GCTGGGA
SEQ ID NO: 118	Cys Fab– HC(EU221)–HC– E152C (EU)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGVIFPAEGAPGYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDATVYYCARGG YISDFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPCPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDRVEPKSCD
SEQ ID NO: 119	Fab' HC(EU230)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGVIFPAEGAPGYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDATVYYCARGG YISDFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDRVEPKSCDKTHTCPPCP
SEQ ID NO: 120	Fab' HC(EU232)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGVIFPAEGAPGYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDATVYYCARGG YISDFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDRVEPKSCDKTHTCPPCP
SEQ ID NO: 121	Fab' Pro HC(EU236)–	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGVIFPAEGAPGYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDATVYYCARGG

		YISDFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GP
SEQ ID NO: 16	LCDR1 (Kabat)	RASQISISNYLA
SEQ ID NO: 17	LCDR2 (Kabat)	DASSLQS
SEQ ID NO: 18	LCDR3 (Kabat)	QQYYYESIT
SEQ ID NO: 19	LCDR1 (Chothia)	SQISISNY
SEQ ID NO: 20	LCDR2 (Chothia)	DAS
SEQ ID NO: 21	LCDR3 (Chothia)	YYYESI
SEQ ID NO: 16	LCDR1 (Combinada)	RASQISISNYLA
SEQ ID NO: 17	LCDR2 (Combinada)	DASSLQS
SEQ ID NO: 18	LCDR3 (Combinada)	QQYYYESIT
SEQ ID NO: 22	LCDR1 (IMGT)	QSISNY
SEQ ID NO: 20	LCDR2 (IMGT)	DAS
SEQ ID NO: 18	LCDR3 (IMGT)	QQYYYESIT
SEQ ID NO: 23	VL (kappa)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQISISNYLA WYQQKPGKAPKLLIYDASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYYESITFGQGT KVEIK
SEQ ID NO: 24	VL DNA	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCT GAGCGCCAGCGTGGGCGATCGCGTGACCATT CCTGCAGAGCCAGCCAGTCTATTTCTAACTACC TGGCTTGGTACCAGCAGAAACCGGGCAAAGCG CCGAAACTATTAATCTACGACGCTTCTTCTCTG CAAAGCGGCGTGCCGAGCCGCTTTAGCGGCA GCGGATCCGGCACCGATTTCACCCTGACCATT AGCTCTCTGCAACCGGAAGACTTTGCGACCTAT TATTGCCAGCAGTACTACTACGAATCTATCACC TTTGCCAGGGCACGAAAGTTGAAATTAAA
SEQ ID NO: 25	Ab/Fab' LC (kappa)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQISISNYLA WYQQKPGKAPKLLIYDASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYYESITFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNREGC
SEQ ID NO: 26	Ab/Fab' LC DNA	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCT GAGCGCCAGCGTGGGCGATCGCGTGACCATT CCTGCAGAGCCAGCCAGTCTATTTCTAACTACC TGGCTTGGTACCAGCAGAAACCGGGCAAAGCG CCGAAACTATTAATCTACGACGCTTCTTCTCTG CAAAGCGGCGTGCCGAGCCGCTTTAGCGGCA GCGGATCCGGCACCGATTTCACCCTGACCATT

		AGCTCTCTGCAACCGGAAGACTTTGCGACCTAT TATTGCCAGCAGTACTACTACGAATCTATCACC TTTGGCCAGGGCACGAAAGTTGAAATTAAACGT ACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCC CCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGTGGCACC GCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTA CCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG GACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGG AGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCC ACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAG CAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACG CCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAG CCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGT GC
SEQ ID NO: 122	Cys Fab-LC-E165C (EU)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSSISNYLA WYQQKPGKAPKLLIYDASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYYESITFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTCQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNREGC
SEQ ID NO: 123	Cys Fab-LC-S114C (EU)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSSISNYLA WYQQKPGKAPKLLIYDASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYYESITFGQGT KVEIKRTVAAPCVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNREGC
Ab2/Fab2/Fab'2Anti-cKIT		
SEQ ID NO: 27	HCDR1 (Kabat)	SHALS
SEQ ID NO: 28	HCDR2 (Kabat)	GIIPSGTADYAQKFQG
SEQ ID NO: 29	HCDR3 (Kabat)	GLYDFDY
SEQ ID NO: 30	HCDR1 (Chothia)	GGTFSSH
SEQ ID NO: 31	HCDR2 (Chothia)	IPSGT
SEQ ID NO: 29	HCDR3 (Chothia)	GLYDFDY
SEQ ID NO: 32	HCDR1 (Combinada)	GGTFSSHALS
SEQ ID NO: 28	HCDR2 (Combinada)	GIIPSGTADYAQKFQG
SEQ ID NO: 29	HCDR3 (Combinada)	GLYDFDY
SEQ ID NO: 33	HCDR1 (IMGT)	GGTFSSHA
SEQ ID NO: 34	HCDR2 (IMGT)	IIPSGTA
SEQ ID NO: 35	HCDR3 (IMGT)	ARGLYDFDY
SEQ ID NO: 36	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSHA LSWVRQAPGQGLEWMGGIIPSGTADYAQKFQG

		RVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARGL YDFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 37	VH DNA	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGCGGTGCCGAAGT GAAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTTAGCT GCAAAGCATCCGGAGGGACGTTTTCTTCTCAT GCTCTGTCTTGGGTGCGCCAGGCCCGGGCC AGGGCCTCGAGTGGATGGGCGGTATCATCCCG TCTTTCGGCACTGCGGACTACGCCCAGAAATTT CAGGGCCGGGTGACCATTACCGCCGATGAAAG CACCAGCACCGCCTATATGGAAGT GAGCAGCC TGCGCAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTGC GCGCGTGGTCTGTACGACTTCGACTACTGGGG CCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGCTCA
SEQ ID NO: 38	Ab HC	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSHA LSWVRQAPGQGLEWMGGIIPSGTADYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARGL YDFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 39	Ab HC DNA	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGCGGTGCCGAAGT GAAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTTAGCT GCAAAGCATCCGGAGGGACGTTTTCTTCTCAT GCTCTGTCTTGGGTGCGCCAGGCCCGGGCC AGGGCCTCGAGTGGATGGGCGGTATCATCCCG TCTTTCGGCACTGCGGACTACGCCCAGAAATTT CAGGGCCGGGTGACCATTACCGCCGATGAAAG CACCAGCACCGCCTATATGGAAGT GAGCAGCC TGCGCAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTGC GCGCGTGGTCTGTACGACTTCGACTACTGGGG CCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGCTCAGCTA GCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGC CCCCAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCGGAACTG CTGCCCTGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTC CCCGAGCCCGTGACAGTGTCTGGAAGTCTGG GGCTCTGACTTCCGGCGTGCACACCTTCCCCG CCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTG AGCAGCGTGGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCT GGGAACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGA

		GTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACAC CTGCCCCCCTGCCAGCTCCAGAACTGCTGG GAGGGCCTTCCGTGTTCTGTTCCCCCACAAG CCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCC CGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCC CACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTA CGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAG ACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCAC CTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGC ACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAG TGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCC AATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGGCC AGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCC CCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAG GTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTA CCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC AACGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCAC CCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCT TCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCC AGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCACTGTCAG CGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA CCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 40	Fab' HC(EU236)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSHA LSWVRQAPGQGLEWMGGIIPSGTADYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCARGL YDFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL G
SEQ ID NO: 41	Fab' HC DNA	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGCGGTGCCGAAGT GAAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTTAGCT GCAAAGCATCCGGAGGGACGTTTTCTTCTCAT GCTCTGTCTTGGGTGCGCCAGGCCCGGGCC AGGGCCTCGAGTGGATGGGCGGTATCATCCCG TCTTTCGGCACTGCGGACTACGCCCAGAAATTT CAGGGCCCGGTGACCATTACCGCCGATGAAAG CACCAGCACCGCCTATATGGAAGTGAAGCAGCC TGCGCAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTGC GCGCGTGGTCTGTACGACTTCGACTACTGGGG CCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGCTCAGCTA GCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGC CCCCAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCGGAACTG CTGCCCTGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTC CCCGAGCCCGTGACAGTGTCCTGGAAGTCTGG GGCTCTGACTTCCGGCGTGCACACCTTCCCCG CCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTG AGCAGCGTGGTGAAGTGCCTCCAGCTCTCT

		GGGAACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGA GTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACAC CTGCCCCCCTGCCAGCTCCAGAACTGCTGG GA
SEQ ID NO: 124	Cys Fab– HC(EU221)–HC– E152C (EU)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSHA LSWVRQAPGQGLEWMGGIIPSGTADYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGL YDFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPCPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEPKSCD
SEQ ID NO: 125	Fab' HC(EU230)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSHA LSWVRQAPGQGLEWMGGIIPSGTADYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGL YDFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP
SEQ ID NO: 126	Fab' HC(EU232)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSHA LSWVRQAPGQGLEWMGGIIPSGTADYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGL YDFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAP
SEQ ID NO: 127	Fab' HC(EU236)– Pro	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSHA LSWVRQAPGQGLEWMGGIIPSGTADYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGL YDFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAP GP
SEQ ID NO: 42	LCDR1 (Kabat)	RASQDISQDLA
SEQ ID NO: 17	LCDR2 (Kabat)	DASSLQS
SEQ ID NO: 43	LCDR3 (Kabat)	QYYYLPST
SEQ ID NO: 44	LCDR1 (Chothia)	SQDISQD
SEQ ID NO: 20	LCDR2 (Chothia)	DAS
SEQ ID NO: 45	LCDR3 (Chothia)	YYLPS
SEQ ID NO: 42	LCDR1 (Combinada)	RASQDISQDLA
SEQ ID NO: 17	LCDR2 (Combinada)	DASSLQS
SEQ ID NO: 43	LCDR3 (Combinada)	QYYYLPST
SEQ ID NO: 46	LCDR1 (IMGT)	QDISQD
SEQ ID NO: 20	LCDR2 (IMGT)	DAS
SEQ ID NO: 43	LCDR3 (IMGT)	QYYYLPST

SEQ ID NO: 47	VL (kappa)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDISQDLA WYQQKPGKAPKLLIYDASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQYYLPSTFGQG TKVEIK
SEQ ID NO: 48	VL DNA	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCT GAGCGCCAGCGTGGGCGATCGCGTGACCATTA CCTGCAGAGCCAGCCAGGACATTTCTCAGGAC CTGGCTTGGTACCAGCAGAAACCGGGCAAAGC GCCGAACTATTAATCTACGACGCTTCTTCTCT GCAAAGCGGCGTGCCGAGCCGCTTTAGCGGC AGCGGATCCGGCACCGATTTACCCCTGACCAT TAGCTCTCTGCAACCGGAAGACTTTGCGGTGT ATTATTGCCAGCAGTACTACTACCTGCCGTCTA CCTTTGGCCAGGGCACGAAAGTTGAAATTAAA
SEQ ID NO: 49	Ab/Fab' LC (kappa)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDISQDLA WYQQKPGKAPKLLIYDASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQYYLPSTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 50	Ab/Fab' LC DNA	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCT GAGCGCCAGCGTGGGCGATCGCGTGACCATTA CCTGCAGAGCCAGCCAGGACATTTCTCAGGAC CTGGCTTGGTACCAGCAGAAACCGGGCAAAGC GCCGAACTATTAATCTACGACGCTTCTTCTCT GCAAAGCGGCGTGCCGAGCCGCTTTAGCGGC AGCGGATCCGGCACCGATTTACCCCTGACCAT TAGCTCTCTGCAACCGGAAGACTTTGCGGTGT ATTATTGCCAGCAGTACTACTACCTGCCGTCTA CCTTTGGCCAGGGCACGAAAGTTGAAATTAAAC GTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTTC CCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGTGGA CCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTC TACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGG TGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCA GGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGAC TCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCT GAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGT ACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTC CAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCG AGTGC
SEQ ID NO: 128	Cys Fab-LC-E165C (EU)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDISQDLA WYQQKPGKAPKLLIYDASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQYYLPSTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS

		KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 129	Cys Fab-LC-S114C (EU)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISQDLA WYQQKPGKAPKLLIYDASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQYYLPSTFGQG TKVEIKRTVAAPCVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
Ab3/Fab3/Fab'3Anti-cKIT		
SEQ ID NO: 1	HCDR1 (Kabat)	SYAIS
SEQ ID NO: 51	HCDR2 (Kabat)	TIGPFEGQPRYAQKFQG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Kabat)	GGYISDFDV
SEQ ID NO: 4	HCDR1 (Chothia)	GGTFSSY
SEQ ID NO: 52	HCDR2 (Chothia)	GPFEQG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Chothia)	GGYISDFDV
SEQ ID NO: 6	HCDR1 (Combinada)	GGTFSSY AIS
SEQ ID NO: 51	HCDR2 (Combinada)	TIGPFEGQPRYAQKFQG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Combinada)	GGYISDFDV
SEQ ID NO: 7	HCDR1 (IMGT)	GGTFSSYA
SEQ ID NO: 53	HCDR2 (IMGT)	IGPFEGQP
SEQ ID NO: 9	HCDR3 (IMGT)	ARGGYISDFDV
SEQ ID NO: 54	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGTIGPFEGQPRYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARGG YISDFDVWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 55	VH DNA	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGCGGTGCCGAAGT GAAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTTAGCT GCAAAGCATCCGGAGGGACGTTTAGCAGCTAT GCGATTAGCTGGGTGCGCCAGGCCCGGGCC AGGGCCTCGAGTGGATGGGCACTATCGGTCCG TTCGAAGGCCAGCCGCGTTACGCCAGAAATT TCAGGGCCGGGTGACCATTACCGCCGATGAAA GCACCAGCACCGCCTATATGGAAGT GAGCAGC CTGCGCAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTG CGCGCGTGGTGGTTACATCTCTGACTTCGATG TTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGC TCA
SEQ ID NO: 56	Ab HC	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGTIGPFEGQPRYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARGG

		YISDFDVWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 57	Ab HC DNA	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGCGGTGCCGAAGT GAAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTTAGCT GCAAAGCATCCGGAGGGACGTTTAGCAGCTAT GCGATTAGCTGGGTGCGCCAGGCCCGGGCC AGGGCCTCGAGTGGATGGGCACTATCGGTCCG TTCGAAGGCCAGCCGCGTTACGCCCAGAAATT TCAGGGCCGGGTGACCATTACCGCCGATGAAA GCACCAGCACCGCCTATATGGAAGT GAGCAGC CTGCGCAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTG CGCGCGTGGTGGTTACATCTCTGACTTCGATG TTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGC TCAGCTAGCACCAAGGGCCCAAGTGTGTTTCC CCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCG GAACTGCTGCCCTGGGTTGCCTGGTGAAGGAC TACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTTGAA CTCTGGGGCTCTGACTTCCGGCGTGACACCT TCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTAC AGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCTCCAG CTCTCTGGGAACCCAGACCTATATCTGCAACGT GAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA AGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACC CACACCTGCCCCCCTGCCAGCTCCAGAACT GCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCTGTTCCCCC CCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGG ACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACG TGTCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAAC TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACG CCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAAC AGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGT GCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAAT ACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCA GCCCCAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAA GGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACC

		CTGCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAGA ACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGC TTCTACCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGA CCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAG CTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAA GTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCT GCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCAC TACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGG CAAG
SEQ ID NO: 58	Fab' HC(EU236)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGTIGPFEGQPRYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGG YISDFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL G
SEQ ID NO: 59	Fab' HC DNA	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGCGGTGCCGAAGT GAAAAAACC GGCGAGCAGCGTGAAAGTTAGCT GCAAAGCATCCGGAGGGACGTTTAGCAGCTAT GCGATTAGCTGGGTGCGCCAGGCCCCGGGCC AGGGCCTCGAGTGGATGGGCACTATCGGTCCG TTCGAAGGCCAGCCGCGTTACGCCCAGAAATT TCAGGGCCGGGTGACCATTACCGCCGATGAAA GCACCAGCACCGCCTATATGGAAGTGAAGCAGC CTGCGCAGCGAAGATACGGCCGTGTATTATTG CGCGCGTGGTGGTTACATCTCTGACTTCGATG TTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGTTAGC TCAGCTAGCACCAAGGGCCCAAGTGTGTTTCC CCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCG GAACTGCTGCCCTGGGTTGCCTGGTGAAGGAC TACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTGGA CTCTGGGGCTCTGACTTCCGGCGTGACACCT TCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTAC AGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCTCCAG CTCTCTGGGAACCCAGACCTATATCTGCAACGT GAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA AGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACC CACACCTGCCCCCCCCTGCCAGCTCCAGAACT GCTGGGA
SEQ ID NO: 130	Cys Fab HC(EU221)–HC– E152C (EU)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGTIGPFEGQPRYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGG

		YISDFDVWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPCPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDDKKVEPKSCD
SEQ ID NO: 131	Fab' HC(EU230)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGTIGPFEGQPRYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARGG YISDFDVWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP
SEQ ID NO: 132	Fab' HC(EU232)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGTIGPFEGQPRYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARGG YISDFDVWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAP
SEQ ID NO: 133	Fab' HC(EU236)– Pro	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGTIGPFEGQPRYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARGG YISDFDVWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GP
SEQ ID NO: 16	LCDR1 (Kabat)	RASQSI SNYLA
SEQ ID NO: 17	LCDR2 (Kabat)	DASSLQS
SEQ ID NO: 18	LCDR3 (Kabat)	QQYYYYESIT
SEQ ID NO: 19	LCDR1 (Chothia)	SQSI SNY
SEQ ID NO: 20	LCDR2 (Chothia)	DAS
SEQ ID NO: 21	LCDR3 (Chothia)	YYYYESI
SEQ ID NO: 16	LCDR1 (Combinada)	RASQSI SNYLA
SEQ ID NO: 17	LCDR2 (Combinada)	DASSLQS
SEQ ID NO: 18	LCDR3 (Combinada)	QQYYYYESIT
SEQ ID NO: 22	LCDR1 (IMGT)	QSI SNY
SEQ ID NO: 20	LCDR2 (IMGT)	DAS
SEQ ID NO: 18	LCDR3 (IMGT)	QQYYYYESIT
SEQ ID NO: 23	VL (kappa)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI SNYLA WYQQKPGKAPKLLIYDASSLQSGVPSRFGSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYYYESITFGQGT KVEIK

SEQ ID NO: 24	VL DNA	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCT GAGCGCCAGCGTGGGCGATCGCGTGACCATTA CCTGCAGAGCCAGCCAGTCTATTTCTAACTACC TGGCTTGGTACCAGCAGAAACCGGGCAAAGCG CCGAAACTATTAATCTACGACGCTTCTTCTCTG CAAAGCGGCGTGCCGAGCCGCTTTAGCGGCA GCGGATCCGGCACCATTTCACCCTGACCATT AGCTCTCTGCAACCGGAAGACTTTGCGACCTAT TATTGCCAGCAGTACTACTACGAATCTATCACC TTTGGCCAGGGCACGAAAGTTGAAATTAAA
SEQ ID NO: 25	Ab/Fab' LC (kappa)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSSISNYLA WYQQKPGKAPKLLIYDASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYYESITFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNREGC
SEQ ID NO: 26	Ab/Fab' LC DNA	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCT GAGCGCCAGCGTGGGCGATCGCGTGACCATTA CCTGCAGAGCCAGCCAGTCTATTTCTAACTACC TGGCTTGGTACCAGCAGAAACCGGGCAAAGCG CCGAAACTATTAATCTACGACGCTTCTTCTCTG CAAAGCGGCGTGCCGAGCCGCTTTAGCGGCA GCGGATCCGGCACCATTTCACCCTGACCATT AGCTCTCTGCAACCGGAAGACTTTGCGACCTAT TATTGCCAGCAGTACTACTACGAATCTATCACC TTTGGCCAGGGCACGAAAGTTGAAATTAAACGT ACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCC CCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGTGGCACC GCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTA CCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG GACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGG AGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCC ACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAG CAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACG CCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAG CCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGT GC
SEQ ID NO: 134	Cys Fab-LC-E165C (EU)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSSISNYLA WYQQKPGKAPKLLIYDASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYYESITFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTCQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNREGC
SEQ ID NO: 135	Cys Fab-LC-S114C (EU)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSSISNYLA WYQQKPGKAPKLLIYDASSLQSGVPSRFSGSGS

		GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYYESITFGQGT KVEIKRTVAAPCVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNREGC
Ab4/Fab4/Fab'4Anti-cKIT		
SEQ ID NO: 60	HCDR1 (Kabat)	TNSAAWN
SEQ ID NO: 61	HCDR2 (Kabat)	RIYYRSQWLNDYAVSVKS
SEQ ID NO: 62	HCDR3 (Kabat)	QLTYPYTVYHKALDV
SEQ ID NO: 63	HCDR1 (Chothia)	GDSVSTNSA
SEQ ID NO: 64	HCDR2 (Chothia)	YYRSQWL
SEQ ID NO: 62	HCDR3 (Chothia)	QLTYPYTVYHKALDV
SEQ ID NO: 65	HCDR1 (Combinada)	GDSVSTNSAAWN
SEQ ID NO: 61	HCDR2 (Combinada)	RIYYRSQWLNDYAVSVKS
SEQ ID NO: 62	HCDR3 (Combinada)	QLTYPYTVYHKALDV
SEQ ID NO: 66	HCDR1 (IMGT)	GDSVSTNSAA
SEQ ID NO: 67	HCDR2 (IMGT)	IYYRSQWLN
SEQ ID NO: 68	HCDR3 (IMGT)	ARQLTYPYTVYHKALDV
SEQ ID NO: 69	VH	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSTNSA AWNWIRQSPSRGLEWLGRIYYRSQWLNDYAVSV KSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARQ LTPYTVYHKALDVWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 70	VH DNA	CAGGTGCAATTGCAGCAGAGCGGTCCGGGCCT GGTGAAACCGAGCCAGACCCTGAGCCTGACCT GCGCGATTTCCGGAGATAGCGTGAGCACTAAC TCTGCTGCTTGGAAGTGGATTCGTCAGAGCCC GAGCCGTGGCCTCGAGTGGCTGGGCCGTATCT ACTACCGTAGCCAGTGGCTGAACGACTATGCC GTGAGCGTGAAAAGCCGCATTACCATTAACCC GGATACTTCGAAAACCAAGTTTAGCCTGCAACT GAACAGCGTGACCCCGGAAGATACGGCCGTGT ATTATTGCGCGCGTCAGCTGACTTACCCGTACA CTGTTTACCATAAAGCTCTGGATGTTTGGGGTC AAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCG
SEQ ID NO: 71	Ab HC	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSTNSA AWNWIRQSPSRGLEWLGRIYYRSQWLNDYAVSV KSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARQ LTPYTVYHKALDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP

		APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVME ALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 72	Ab HC DNA	CAGGTGCAATTGCAGCAGAGCGGTCCGGGCCT GGTGAAACCGAGCCAGACCCTGAGCCTGACCT GCGCGATTTCCGGAGATAGCGTGAGCACTAAC TCTGCTGCTTGGAAGTGGATTCGTGAGAGCCC GAGCCGTGGCCTCGAGTGGCTGGGCCGTATCT ACTACCGTAGCCAGTGGCTGAACGACTATGCC GTGAGCGTGAAAAGCCGCATTACCATTAACCC GGATACTTCGAAAAACCAAGTTTAGCCTGCAACT GAACAGCGTGACCCCGGAAGATACGGCCGTGT ATTATTGCGCGCGTCAGCTGACTTACCCGTACA CTGTTTACCATAAAGCTCTGGATGTTTGGGGTC AAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCGGCTAGC ACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCC CAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCGGAAGTCTG CCCTGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCC GAGCCCGTGACAGTGTCTTGAAGTCTGGGGC TCTGACTTCCGGCGTGACACCTTCCCCGCCG TGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGC AGCGTGGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGG AACCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAA GCCAGCAACACCAAGGTGACAAGAGAGTGG AGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGC CCCCCTGCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGG GCCTTCCGTGTTCTGTTCCCCCCCCAAGCCCA AGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCGAG GTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGA GGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGG ACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAA GCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACA GGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAG GACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAA AGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCAATCG AAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCA CGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCA GCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTC CCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCA GCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGG CCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCC CAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTG TACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTG GCAGCAGGGCAACGTGTTTCACTGACGCGTGA TGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAG AAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 73	Fab' HC (EU236)	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSTNSA AWNWIWQSPSRGLEWLGRIYYRSQWLNDYAVSV

		KSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARQ LTPYPTVYHKALDVWGQGLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLG
SEQ ID NO: 74	Fab' HC DNA	CAGGTGCAATTGCAGCAGAGCGGTCCGGGCCT GGTGAAACCGAGCCAGACCCTGAGCCTGACCT GCGCGATTTCCGGAGATAGCGTGAGCACTAAC TCTGCTGCTTGGAAGTGGATTTCGTGAGAGCCC GAGCCGTGGCCTCGAGTGGCTGGGCCGTATCT ACTACCGTAGCCAGTGGCTGAACGACTATGCC GTGAGCGTGAAAAGCCGCATTACCATTAACCC GGATACTTCGAAAAACCAAGTTTAGCCTGCAACT GAACAGCGTGACCCCGGAAGATACGGCCGTGT ATTATTGCGCGCGTCAGCTGACTTACCCGTACA CTGTTTACCATAAAGCTCTGGATGTTTGGGGTC AAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCGGCTAGC ACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCC CAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCGGAACTGCTG CCCTGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCC GAGCCCGTGACAGTGTCTGGAAGTCTGGGGC TCTGACTTCCGGCGTGACACCTTCCCCGCCG TGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGC AGCGTGGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGG AACCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAA GCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGG AGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGC CCCCCCTGCCAGCTCCAGAACTGCTGGGA
SEQ ID NO: 136	Cys Fab HC(EU221)–HC– E152C (EU)	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSTNSA AWNWIRQSPSRGLEWLGRIYYRSQWLNDYAVSV KSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARQ LTPYPTVYHKALDVWGQGLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPCPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD
SEQ ID NO: 137	Fab' HC(EU230)	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSTNSA AWNWIRQSPSRGLEWLGRIYYRSQWLNDYAVSV KSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARQ LTPYPTVYHKALDVWGQGLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CP
SEQ ID NO: 138	Fab' HC(EU232)	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSTNSA AWNWIRQSPSRGLEWLGRIYYRSQWLNDYAVSV KSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARQ LTPYPTVYHKALDVWGQGLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS

		GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAP
SEQ ID NO: 139	Fab' HC(EU236)– Pro	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSTNSA AWNWIWQSPSRGLEWLGRIYYRSQWLNDYAVSV KSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARQ LTPYPTVYHKALDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGP
SEQ ID NO: 75	LCDR1 (Kabat)	SGDNLGDQYVS
SEQ ID NO: 76	LCDR2 (Kabat)	DDTDRPS
SEQ ID NO: 77	LCDR3 (Kabat)	QSTD SKSVV
SEQ ID NO: 78	LCDR1 (Chothia)	DNLGDQY
SEQ ID NO: 79	LCDR2 (Chothia)	DDT
SEQ ID NO: 80	LCDR3 (Chothia)	TDSKSV
SEQ ID NO: 75	LCDR1 (Combinada)	SGDNLGDQYVS
SEQ ID NO: 76	LCDR2 (Combinada)	DDTDRPS
SEQ ID NO: 77	LCDR3 (Combinada)	QSTD SKSVV
SEQ ID NO: 81	LCDR1 (IMGT)	NLGDQY
SEQ ID NO: 79	LCDR2 (IMGT)	DDT
SEQ ID NO: 77	LCDR3 (IMGT)	QSTD SKSVV
SEQ ID NO: 82	VL (lambda)	DIELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNLGDQYVSW YQQKPGQAPVLVIYDDTDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISGTQAEDEADYYCQSTD SKSVVFGGGTK LTVL
SEQ ID NO: 83	VL DNA	GATATCGAACTGACCCAGCCGCCGAGCGTGAG CGTGAGCCCGGGCCAGACCGCGAGCATTACCT GTAGCGGCGATAACCTGGGTGACCAATACGTT TCTTGGTACCAGCAGAAACCGGGCCAGGCGCC GGTGCTGGTGATCTACGACGACACTGACCGTC CGAGCGGCATCCCGGAACGTTTTAGCGGATCC AACAGCGGCAACACCGCGACCCTGACCATTAG CGGCACCCAGGCGGAAGACGAAGCGGATTATT ACTGCCAGTCTACTGACTCTAAATCTGTTGTGT TTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCCTA
SEQ ID NO: 84	Ab/Fab' LC (lambda)	DIELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNLGDQYVSW YQQKPGQAPVLVIYDDTDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISGTQAEDEADYYCQSTD SKSVVFGGGTK LTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSN KYAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS
SEQ ID NO: 85	Ab/Fab' LC DNA	GATATCGAACTGACCCAGCCGCCGAGCGTGAG CGTGAGCCCGGGCCAGACCGCGAGCATTACCT GTAGCGGCGATAACCTGGGTGACCAATACGTT

		TCTTGGTACCAGCAGAAACCGGGCCAGGCGCC GGTGCTGGTGATCTACGACGACACTGACCGTC CGAGCGGCATCCCGGAACGTTTTAGCGGATCC AACAGCGGCAACACCGCGACCCTGACCATTAG CGGCACCCAGGCGGAAGACGAAGCGGATTATT ACTGCCAGTCTACTGACTCTAAATCTGTTGTGT TTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCCTAGGC CAGCCTAAGGCCGCTCCCTCCGTGACCCTGTT CCCCCCCAGCTCCGAGGAACTGCAGGCCAACA AGGCCACCCTGGTGTGCCTGATCAGCGACTTC TACCCTGGCGCCGTGACCGTGGCCTGGAAGG CCGACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGGCGTGGA GACAACCACCCCCAGCAAGCAGAGCAACAACA AGTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACC CCCGAGCAGTGGAAGAGCCACAGAAGCTACAG CTGCCAGGTCACCCACGAGGGCAGCACCGTG GAGAAAACCGTGGCCCCCACCAGTGCAGC
SEQ ID NO: 140	Cys Fab-LC (lambda)-A143C (EU)	DIELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNLDQYVSW YQQKPGQAPVLIYDDTDPRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISGTQAEDEADYYCQSTDSKSVVFGGGTK LTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGCVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSN KYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS
Ab5/Fab5/Fab'5 Anti-cKIT		
SEQ ID NO: 86	HCDR1 (Kabat)	NYWIA
SEQ ID NO: 87	HCDR2 (Kabat)	IIYPSNSYTLYSPSFQG
SEQ ID NO: 88	HCDR3 (Kabat)	VPPGGGISYPAFDH
SEQ ID NO: 89	HCDR1 (Chothia)	GYSFTNY
SEQ ID NO: 90	HCDR2 (Chothia)	YPSNSY
SEQ ID NO: 88	HCDR3 (Chothia)	VPPGGGISYPAFDH
SEQ ID NO: 91	HCDR1 (Combinada)	GYSFTNYWIA
SEQ ID NO: 87	HCDR2 (Combinada)	IIYPSNSYTLYSPSFQG
SEQ ID NO: 88	HCDR3 (Combinada)	VPPGGGISYPAFDH
SEQ ID NO: 92	HCDR1 (IMGT)	GYSFTNYW
SEQ ID NO: 93	HCDR2 (IMGT)	IYPSNSYT
SEQ ID NO: 94	HCDR3 (IMGT)	ARVPPGGGISYPAFDH
SEQ ID NO: 95	VH	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYWI AWVRQMPGKGLEWMGIIYPSNSYTLYSPSFQGG VTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCARVPP GGGISYPAFDHWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 96	VH DNA	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGCGGTGCGGAAGT GAAAAAACCGGGCGAAAGCCTGAAAATTAGCT GCAAAGGCTCCGGATATAGCTTCACTAACTACT

		GGATCGCTTGGGTGCGCCAGATGCCGGGCAA AGGTCTCGAGTGGATGGGCATCATCTACCCGT CTAACAGCTACACCCTGTATAGCCCGAGCTTTC AGGGCCAGGTGACCATTAGCGCGGATAAAAGC ATCAGCACCGCGTATCTGCAATGGAGCAGCCT GAAAGCGAGCGATAACCGCGATGTATTATTGCG CGCGTGTTCCGCCGGGTGGTTCTATCTCTTAC CCGGCTTTCGATCATTGGGGCCAAGGCACCCT GGTGA CTGTTAGCTCA
SEQ ID NO: 97	Ab HC	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYWI AWVRQMPGKGLEWMGIYPSNSYTLSPSFQGG VTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCARVPP GGSISYPAFDHWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 98	Ab HC DNA	CAGGTGCAATTGGTGCAAGCGGTGCGGAAGT GAAAAAACCGGGCGAAAGCCTGAAAATTAGCT GCAAAGGCTCCGGATATAGCTTCACTAACTACT GGATCGCTTGGGTGCGCCAGATGCCGGGCAA AGGTCTCGAGTGGATGGGCATCATCTACCCGT CTAACAGCTACACCCTGTATAGCCCGAGCTTTC AGGGCCAGGTGACCATTAGCGCGGATAAAAGC ATCAGCACCGCGTATCTGCAATGGAGCAGCCT GAAAGCGAGCGATAACCGCGATGTATTATTGCG CGCGTGTTCCGCCGGGTGGTTCTATCTCTTAC CCGGCTTTCGATCATTGGGGCCAAGGCACCCT GGTGA CTGTTAGCTCAGCTAGCACCAAGGGCC CCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAG TCTACTTCCGGCGGAACTGCTGCCCTGGGTTG CCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGA CAGTGTCCTGGA ACTCTGGGGCTCTGACTTCC GGCGTGACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAG CAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGA CAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACC TATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAAC ACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAG CTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCC CAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCCTTCCGTG TTCCTGTTCCCCC CCAAGCCCAAGGACACCCT GATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCG TGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCAGA

		GGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG AGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAG GAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTG CGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGA ACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACA AGGCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATC AGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCC AGGTGTACACCCTGCCCCCAGCCGGGAGGA GATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTC TGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGA ACAACTACAAGACCACCCCCCAGTGCTGGAC AGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCT GACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGC AACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGC CCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGA GCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 99	Fab' HC (EU236)	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYWI AWVRQMPGKGLEWMGIIYPSNSYTLSPSFQGG VTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCARVPP GGISYPAFDHWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTCPPCP APELLG
SEQ ID NO: 100	Fab' HC DNA	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGCGGTGCGGAAGT GAAAAAACCGGGCGAAAGCCTGAAAATTAGCT GCAAAGGCTCCGGATATAGCTTCACTAACTACT GGATCGCTTGGGTGCGCCAGATGCCGGGCAA AGGTCTCGAGTGGATGGGCATCATCTACCCGT CTAACAGCTACACCCTGTATAGCCCGAGCTTTC AGGGCCAGGTGACCATTAGCGCGGATAAAAGC ATCAGCACCGCGTATCTGCAATGGAGCAGCCT GAAAGCGAGCGATACCGCGATGTATTATTGCG CGCGTGTTCCGCCGGGTGGTTCTATCTCTTAC CCGGCTTTCGATCATTGGGGCCAAGGCACCCT GGTGACTGTTAGCTCAGCTAGCACCAAGGGCC CCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAG TCTACTTCCGGCGGAACTGCTGCCCTGGGTTG CCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGA CAGTGTCCTGGAACCTCTGGGGCTCTGACTTCC GGCGTGACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAG CAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGA CAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACC TATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAAC ACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAG CTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCC CAGCTCCAGAACTGCTGGGA

SEQ ID NO: 141	Cys Fab HC(EU221)–HC– E152C (EU)	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYWI AWVRQMPGKGLEWMGIIYPSNSYTLSPSFQGG VTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYICARVPP GGISYPAFDHWGQGT ¹ LVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPC ² PVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV ³ TVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD
SEQ ID NO: 142	Fab' HC(EU230)	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYWI AWVRQMPGKGLEWMGIIYPSNSYTLSPSFQGG VTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYICARVPP GGISYPAFDHWGQGT ¹ LVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP ² VTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV ³ TVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP
SEQ ID NO: 143	Fab' HC(EU232)	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYWI AWVRQMPGKGLEWMGIIYPSNSYTLSPSFQGG VTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYICARVPP GGISYPAFDHWGQGT ¹ LVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP ² VTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV ³ TVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP AP
SEQ ID NO: 144	Fab' HC(EU236)– Pro	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYWI AWVRQMPGKGLEWMGIIYPSNSYTLSPSFQGG VTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYICARVPP GGISYPAFDHWGQGT ¹ LVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP ² VTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV ³ TVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGP
SEQ ID NO: 101	LCDR1 (Kabat)	SGDNIGSIYAS
SEQ ID NO: 102	LCDR2 (Kabat)	RDNKRPS
SEQ ID NO: 103	LCDR3 (Kabat)	SVTDMEQHSV
SEQ ID NO: 104	LCDR1 (Chothia)	DNIGSIY
SEQ ID NO: 105	LCDR2 (Chothia)	RDN
SEQ ID NO: 106	LCDR3 (Chothia)	TDMEQHS
SEQ ID NO: 101	LCDR1 (Combinada)	SGDNIGSIYAS
SEQ ID NO: 102	LCDR2 (Combinada)	RDNKRPS
SEQ ID NO: 103	LCDR3 (Combinada)	SVTDMEQHSV
SEQ ID NO: 107	LCDR1 (IMGT)	NIGSIY
SEQ ID NO: 105	LCDR2 (IMGT)	RDN
SEQ ID NO: 103	LCDR3 (IMGT)	SVTDMEQHSV
SEQ ID NO: 108	VL (lambda)	DIELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGSIYASWY QQKPGQAPVLIYRDNKRPSGIPERFSGSNSGNT ATLTISGTQAEDEADYYCSVTDMEQHSVFGGGT KLTVL

SEQ ID NO: 109	VL DNA	GATATCGAACTGACCCAGCCGCCGAGCGTGAG CGTGAGCCCGGGCCAGACCGCGAGCATTACCT GTAGCGGCGATAACATCGGTTCTATCTACGCTT CTTGGTACCAGCAGAAACCGGGCCAGGCGCC GGTGCTGGTGATCTACCGTGACAACAAACGTC CGAGCGGCATCCCGGAACGTTTTAGCGGATCC AACAGCGGCAACACCGCGACCCTGACCATTAG CGGCACCCAGGCGGAAGACGAAGCGGATTATT ACTGCTCCGTTACTGACATGGAACAGCATTCTG TGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCCTA
SEQ ID NO: 110	Ab/Fab' LC (lambda)	DIELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGSIYASWY QQKPGQAPV ^L VIYRDNKRPSGIPERFSGSNSGNT ATLTISGTQAEDEADYYCSVTDMEQHSVF ^G GGT KLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTT ^P SKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTV EKTVA ^P TECS
SEQ ID NO: 111	Ab/Fab' LC DNA	GATATCGAACTGACCCAGCCGCCGAGCGTGAG CGTGAGCCCGGGCCAGACCGCGAGCATTACCT GTAGCGGCGATAACATCGGTTCTATCTACGCTT CTTGGTACCAGCAGAAACCGGGCCAGGCGCC GGTGCTGGTGATCTACCGTGACAACAAACGTC CGAGCGGCATCCCGGAACGTTTTAGCGGATCC AACAGCGGCAACACCGCGACCCTGACCATTAG CGGCACCCAGGCGGAAGACGAAGCGGATTATT ACTGCTCCGTTACTGACATGGAACAGCATTCTG TGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCCTA GGCCAGCCTAAGGCCGCTCCCTCCGTGACCCT GTTCCCCCCCAGCTCCGAGGAACTGCAGGCCA ACAAGGCCACCCTGGTGTGCCTGATCAGCGAC TTCTACCCTGGCGCCGTGACCGTGGCCTGGAA GGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGGCGTG GAGACAACCACCCCCAGCAAGCAGAGCAACAA CAAGTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGA CCCCCGAGCAGTGGAAGAGCCACAGAAGCTAC AGCTGCCAGGTCACCCACGAGGGCAGCACCG TGGAGAAAACCGTGGCCCCCACCAGTGCAGC
SEQ ID NO: 145	Cys Fab-LC (lambda)-A144C (EU)	DIELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGSIYASWY QQKPGQAPV ^L VIYRDNKRPSGIPERFSGSNSGNT ATLTISGTQAEDEADYYCSVTDMEQHSVF ^G GGT KLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGCVTVAWKADSSPVKAGVETTT ^P SKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTV EKTVA ^P TECS

[00229] Otro anticuerpo anti-cKIT o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que se revela en la presente incluye a aquellos donde los aminoácidos o ácidos nucleicos que codifican los aminoácidos han sido mutados, no obstante tienen al menos 60, 70, 80, 90 o 95

identidad por ciento con las secuencias que se describen en la Tabla 1. En algunos aspectos, incluye secuencias de aminoácidos mutantes donde no más de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos han sido mutados en las regiones variables al comparar con las regiones variables representadas en la secuencia que se describe en la Tabla 1, mientras que retiene sustancialmente la misma actividad terapéutica.

[00230] Dado que cada uno de estos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') se pueden unir a cKIT, las secuencias VH, VL, cadena pesada, y cadena liviana (secuencias de aminoácidos y las secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos) se pueden "mezclar y concordar" para crear otro anticuerpo de unión a cKIT o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab'). Dicho anticuerpo de unión a cKIT o fragmento de anticuerpo "mezclado y concordado" (por ej., Fab o Fab') se puede evaluar usando los ensayos de unión conocidos en el arte (por ej., ELISAs, y otros ensayos que se describen en la sección Ejemplo). Cuando estas cadenas son mezcladas y concordadas, una secuencia VH de un par VH/VL particular se debe reemplazar con una secuencia VH estructuralmente similar. Asimismo una secuencia de cadena pesada de un par cadena pesada / cadena liviana particular debe ser reemplazada con una secuencia de cadena pesada estructuralmente similar. Asimismo, una secuencia VL de un par VH/VL particular debe ser reemplazada con una secuencia VL estructuralmente similar. Asimismo, una secuencia de cadena liviana de un par cadena pesada / cadena liviana particular debe ser reemplazada con una secuencia de cadena liviana estructuralmente similar.

[00231] En consecuencia, en un aspecto, la revelación proporciona un fragmento aislado o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que tiene: una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo compuesto por SEQ ID NOs: 10, 36, 54, 69, y 95 (Tabla 1); y una región variable de cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo compuesto por SEQ ID NOs: 23, 47, 82, y 108 (Tabla 1); donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') se une específicamente a cKIT humano.

[00232] En otro aspecto, la revelación proporciona un anticuerpo aislado que tiene: una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo compuesto por SEQ ID NOs: 12, 38, 56, 71, y 97; y una cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo compuesto por SEQ ID NOs: 25, 49, 84, y 110.

[00233] En otro aspecto, la revelación proporciona un fragmento de anticuerpo aislado (por ej., Fab') que tiene: una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo compuesto por SEQ ID NOs: 14, 40, 58, 73, y 99; y una cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo compuesto por SEQ ID NOs: 25, 49, 84, y 110.

[00234] En otro aspecto, la presente revelación proporciona anticuerpo de unión a cKIT o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que comprende las CDR1s, CDR2s y CDR3s de cadena pesada y cadena liviana que se describen en la Tabla 1, o sus combinaciones. Las secuencias de aminoácidos de las VH CDR1s (o HCDR1) de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (por ej., Fab o Fab') se muestran en SEQ ID NOs: 1, 4, 6, 7, 27, 30, 32, 33, 60, 63, 65, 66, 86, 89, 91, y 92. Las secuencias de aminoácidos de las VH CDR2s (o HCDR2) de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (por ej., Fab o Fab') se muestran en SEQ ID NOs: 2, 5, 8, 28, 31, 34, 51, 52, 53, 61, 64, 67, 87, 90, y 93. Las secuencias de aminoácidos de las VH CDR3s (o HCDR3) de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (por ej., Fab o Fab') se muestran en SEQ ID NOs: 3, 9, 29, 35, 62, 68, 88, y 94. Las secuencias de aminoácidos de las VL CDR1s (o LCDR1) de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (por ej., Fab o Fab') se muestran en SEQ ID NOs: 16, 19, 22, 42, 44, 46, 75, 78, 81, 101, 104, y 107. Las secuencias de aminoácidos de las VL CDR2s (o LCDR2) de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (por ej., Fab o Fab') se muestran en SEQ ID NOs: 17, 20, 76, 79, 102, y 105. Las secuencias de aminoácidos de las VL CDR3s (o LCDR3) de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (por ej., Fab o Fab') se muestran en SEQ ID NOs: 18, 21, 43, 45, 77, 80, 103, y 106.

[00235] Dado que cada uno de estos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (por ej., Fab o Fab') se pueden unir a cKIT humano y que especificidad de unión a antígeno se proporciona principalmente por las regiones CDR1, 2 y 3, las secuencias VH CDR1, 2 y 3 (o HCDR1, 2, 3) y secuencias VL CDR1, 2 y 3 (o LCDR1, 2, 3) pueden ser "mezcladas y concordadas" (es decir, CDRs de anticuerpos diferentes pueden ser mezcladas y concordar, aunque cada anticuerpo debe contener una VH CDR1, 2 y 3 y una VL CDR1, 2 y 3 para crear un anticuerpo de unión a cKIT o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') . Dicho anticuerpo "mezclado y concordado" de unión a cKIT o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') puede ser evaluado usando los ensayos de unión conocidos en el arte. Cuando secuencias VH CDR son mezcladas y concordadas, las secuencias CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia VH particular debe ser reemplazada con una secuencia(s) CDR

estructuralmente similar. Asimismo, cuando secuencias VL CDR son mezcladas y concordadas, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia VL particular debe ser reemplazada con una secuencia(s) CDR estructuralmente similar. Se tornará fácilmente aparente para la persona con experiencia común en el arte que secuencias VH y VL novedosas pueden ser creadas sustituyendo una o más secuencias región VH y/o VL CDR con secuencias estructuralmente similares de las secuencias CDR que se muestran en la presente.

[00236] En consecuencia, la presente revelación proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que comprende una CDR1 de cadena pesada (HCDR1) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo compuesto por SEQ ID NOs: 1, 4, 6, 7, 27, 30, 32, 33, 60, 63, 65, 66, 86, 89, 91, y 92; una CDR2 de cadena pesada (HCDR2) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo compuesto por SEQ ID NOs: 2, 5, 8, 28, 31, 34, 51, 52, 53, 61, 64, 67, 87, 90, y 93; una CDR3 de cadena pesada (HCDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo compuesto por SEQ ID NOs: 3, 9, 29, 35, 62, 68, 88, y 94; una CDR1 de cadena liviana (LCDR1) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo compuesto por SEQ ID NOs: 16, 19, 22, 42, 44, 46, 75, 78, 81, 101, 104, y 107; una CDR2 de cadena liviana (LCDR2) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo compuesto por SEQ ID NOs: 17, 20, 76, 79, 102, y 105; y una CDR3 de cadena liviana (LCDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo compuesto por SEQ ID NOs: 18, 21, 43, 45, 77, 80, 103, y 106; donde el anticuerpo se une específicamente a cKIT.

[00237] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 1, una HCDR2 de SEQ ID NO: 2; una HCDR3 de SEQ ID NO: 3; una LCDR1 de SEQ ID NO:16; una LCDR2 de SEQ ID NO: 17; y una LCDR3 de SEQ ID NO: 18.

[00238] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 4, una HCDR2 de SEQ ID NO: 5; una HCDR3 de SEQ ID NO: 3; una LCDR1 de SEQ ID NO:19; una LCDR2 de SEQ ID NO: 20; y una LCDR3 de SEQ ID NO: 21.

[00239] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una HCDR1 de SEQ ID NO:

6, una HCDR2 de SEQ ID NO: 2; una HCDR3 de SEQ ID NO: 3; una LCDR1 de SEQ ID NO:16; una LCDR2 de SEQ ID NO: 17; y una LCDR3 de SEQ ID NO: 18.

[00240] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 7, una HCDR2 de SEQ ID NO: 8; una HCDR3 de SEQ ID NO: 9; una LCDR1 de SEQ ID NO: 22; una LCDR2 de SEQ ID NO: 20; y una LCDR3 de SEQ ID NO: 18.

[00241] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 27, una HCDR2 de SEQ ID NO: 28; una HCDR3 de SEQ ID NO: 29; una LCDR1 de SEQ ID NO: 42; una LCDR2 de SEQ ID NO: 17; y una LCDR3 de SEQ ID NO: 43.

[00242] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 30, una HCDR2 de SEQ ID NO: 31; una HCDR3 de SEQ ID NO: 29; una LCDR1 de SEQ ID NO: 44; una LCDR2 de SEQ ID NO: 20; y una LCDR3 de SEQ ID NO: 45.

[00243] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 32, una HCDR2 de SEQ ID NO: 28; una HCDR3 de SEQ ID NO: 29; una LCDR1 de SEQ ID NO: 42; una LCDR2 de SEQ ID NO: 17; y una LCDR3 de SEQ ID NO: 43.

[00244] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 33, una HCDR2 de SEQ ID NO: 34; una HCDR3 de SEQ ID NO: 35; una LCDR1 de SEQ ID NO: 46; una LCDR2 de SEQ ID NO: 20; y una LCDR3 de SEQ ID NO: 43.

[00245] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 1, una HCDR2 de SEQ ID NO: 51; una HCDR3 de SEQ ID NO: 3; una LCDR1 de SEQ ID NO:16; una LCDR2 de SEQ ID NO: 17; y una LCDR3 de SEQ ID NO: 18.

[00246] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 4, una HCDR2 de SEQ ID NO: 52; una HCDR3 de SEQ ID NO: 3; una LCDR1 de SEQ ID NO:19; una LCDR2 de SEQ ID NO: 20; y una LCDR3 de SEQ ID NO: 21.

[00247] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una HCDR1 de SEQ ID NO:

6, una HCDR2 de SEQ ID NO: 51; una HCDR3 de SEQ ID NO: 3; una LCDR1 de SEQ ID NO:16; una LCDR2 de SEQ ID NO: 17; y una LCDR3 de SEQ ID NO: 18.

[00248] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 7, una HCDR2 de SEQ ID NO: 53; una HCDR3 de SEQ ID NO: 9; una LCDR1 de SEQ ID NO: 22; una LCDR2 de SEQ ID NO: 20; y una LCDR3 de SEQ ID NO: 18.

[00249] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 60, una HCDR2 de SEQ ID NO: 61; una HCDR3 de SEQ ID NO: 62; una LCDR1 de SEQ ID NO: 75; una LCDR2 de SEQ ID NO: 76; y una LCDR3 de SEQ ID NO: 77.

[00250] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 63, una HCDR2 de SEQ ID NO: 64; una HCDR3 de SEQ ID NO: 62; una LCDR1 de SEQ ID NO: 78; una LCDR2 de SEQ ID NO: 79; y una LCDR3 de SEQ ID NO: 80.

[00251] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 65, una HCDR2 de SEQ ID NO: 61; una HCDR3 de SEQ ID NO: 62; una LCDR1 de SEQ ID NO:75; una LCDR2 de SEQ ID NO: 76; y una LCDR3 de SEQ ID NO: 77.

[00252] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 66, una HCDR2 de SEQ ID NO: 67; una HCDR3 de SEQ ID NO: 68; una LCDR1 de SEQ ID NO: 81; una LCDR2 de SEQ ID NO: 79; y una LCDR3 de SEQ ID NO: 77.

[00253] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 86, una HCDR2 de SEQ ID NO: 87; una HCDR3 de SEQ ID NO: 88; una LCDR1 de SEQ ID NO: 101; una LCDR2 de SEQ ID NO: 102; y una LCDR3 de SEQ ID NO: 103.

[00254] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 89, una HCDR2 de SEQ ID NO: 90; una HCDR3 de SEQ ID NO: 88; una LCDR1 de SEQ ID NO: 104; una LCDR2 de SEQ ID NO: 105; y una LCDR3 de SEQ ID NO: 106.

[00255] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una HCDR1 de SEQ ID NO:

91, una HCDR2 de SEQ ID NO: 87; una HCDR3 de SEQ ID NO: 88; una LCDR1 de SEQ ID NO: 101; una LCDR2 de SEQ ID NO: 102; y una LCDR3 de SEQ ID NO: 103.

[00256] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una HCDR1 de SEQ ID NO: 92, una HCDR2 de SEQ ID NO: 93; una HCDR3 de SEQ ID NO: 94; una LCDR1 de SEQ ID NO: 107; una LCDR2 de SEQ ID NO: 105; y una LCDR3 de SEQ ID NO: 103.

[00257] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, y una región variable de cadena liviana (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23.

[00258] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47.

[00259] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23.

[00260] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82.

[00261] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 95, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 108.

[00262] En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo (por ej., Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

[00263] En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo (por ej., Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49.

[00264] En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo (por ej., Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

[00265] En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo (por ej., Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84.

[00266] En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo (por ej., Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 99, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 110.

[00267] En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo (por ej., Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 119, 120 o 121, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

[00268] En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo (por ej., Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 125, 126, o 127, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49.

[00269] En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo (por ej., Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 131, 132, o 133, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

[00270] En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo (por ej., Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 137, 138, o 139, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84.

[00271] En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo (por ej., Fab') que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende una

secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 142, 143, o 144, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 110.

[00272] En algunas realizaciones, el anticuerpo que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

[00273] En algunas realizaciones, el anticuerpo que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49.

[00274] En algunas realizaciones, el anticuerpo que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

[00275] En algunas realizaciones, el anticuerpo que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84.

[00276] En algunas realizaciones, el anticuerpo que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 110.

[00277] En ciertos aspectos, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a cKIT humano es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que se describe en la Tabla 1.

1. Anticuerpos que se Unen al Mismo Epítipo

[00278] La presente revelación proporciona el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que específicamente se une a un epítipo dentro del dominio extracelular del receptor cKIT humano. En ciertos aspectos el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') se pueden unir a un epítipo dentro de dominios 1–3 del dominio extracelular cKIT humano.

[00279] La presente revelación también proporciona anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que se une al mismo epítipo que el anticuerpo anti-cKIT o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que se describe en la Tabla 1. Anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') adicional puede por lo tanto ser identificado por su capacidad para competencia cruzada (por ej., para inhibir competitivamente la unión de, en un modo estadísticamente significativo) con otro anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') en ensayos de unión cKIT. Un proceso de alto rendimiento para "unir" anticuerpos en base a su competencia cruzada se describe en la Solicitud de Patente Internacional No. WO 2003/48731. La capacidad de un anticuerpo de ensayo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') para inhibir la unión de anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que se revela en la presente a una proteína cKIT (por ej., cKIT humano) demuestra que el anticuerpo de ensayo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') puede competir con ese anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') para unión a cKIT; dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') puede, de acuerdo a teoría no limitativa, unirse al mismo epítipo o a uno relacionado (por ej., uno estructuralmente similar o espacialmente próximo) sobre la proteína cKIT que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') con el que compite. En un cierto aspecto, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que se une al mismo epítipo sobre cKIT que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') revelado en la presente es un anticuerpo humano o humanizado o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab'). Dicho anticuerpo humano o humanizado o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') puede ser preparado y aislado según se describe en la presente.

2. Modificación de la Matriz

[00280] Conjugados anticuerpo droga que se revelan en la presente pueden comprender anticuerpo de unión a cKIT modificado o fragmento de unión a anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que comprende modificaciones a residuos matriz dentro de VH y/o VL, por ej. para mejorar las propiedades del conjugado anticuerpo droga.

[00281] En algunas realizaciones, modificaciones de matriz se realizan para disminuir inmunogenicidad de un anticuerpo o conjugado anticuerpo droga. Por ejemplo, una metodología es "retro-mutar" uno o más residuos matriz a una secuencia de línea germinal correspondiente. Dichos residuos pueden ser identificados comparando secuencias matriz de anticuerpo con secuencias de línea germinal de las cuales proviene el anticuerpo. Para

“concordar” secuencias de región matriz a configuración de línea germinal deseada, residuos puede ser “reto–mutados” a una secuencia de línea germinal correspondiente mediante, por ejemplo, mutagénesis de sitio dirigido. Dichos anticuerpos “reto–mutados” o conjugados anticuerpo droga también pretenden ser abarcados por la invención.

[00282] Otro tipo de modificación matriz implica mutar uno o más residuos dentro de la región matriz, o incluso dentro de una o más regiones CDR, para eliminar epítomos de célula T para así reducir la inmunogenicidad potencial del anticuerpo o conjugado anticuerpo droga. Esta metodología también se denomina como “desinmunización” y se describe con mayor detalle en la Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 2003/0153043 por Carr *et al.*

[00283] Aparte de o como alternativa a modificaciones realizadas dentro regiones matriz o CDR, anticuerpos pueden ser diseñados para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tal como suero semivida, fijación de complemento. Además, un anticuerpo puede ser químicamente modificado (por ej., uno o más restos químicos pueden adherirse al anticuerpo) o ser modificado para alterar su glucosilación, nuevamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada uno de estos aspectos se describe en mayor detalle debajo.

[00284] En un aspecto, la región bisagra de CH1 se modifica tal que el número de residuos cisteína en la región bisagra se altera, por ej., se aumenta o disminuye. Esta metodología se describe adicionalmente en la Patente de los Estados Unidos No. 5.677.425 por Bodmer *et al.* El número de residuos cisteína en la región bisagra de CH1 se altera para, por ejemplo, facilitar montaje de las cadenas pesada y liviana, para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo, o para permitir conjugación a otra molécula.

[00285] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que se revela en la presente incluye residuos aminoácidos modificados o diseñados, por ej., uno o más residuos cisteína, como sitios para conjugación a un resto droga (Junutula JR, et al.: Nat Biotechnol 2008, 26:925–932). En una realización, la invención proporciona un anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que comprende una sustitución de uno o más aminoácidos con cisteína en las posiciones que se describen en la presente. Los sitios para sustitución de cisteína están en las regiones constantes del anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') y son por lo tanto aplicables a una variedad de anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab'), y los sitios se seleccionan para proporcionar conjugados estables y homogéneos. Un anticuerpo o fragmento modificado puede tener uno, dos o más sustituciones cisteína, y estas sustituciones

se pueden usar en combinación con otros métodos de modificación y conjugación según se describe en la presente. Los métodos para insertar cisteína en ubicaciones específicas de un anticuerpo son conocidos en el arte, ver, por ej., Lyons et al, (1990) Protein Eng., 3:703–708, WO 2011/005481, WO2014/124316, WO 2015/138615. En ciertas realizaciones, un anticuerpo modificado comprende una sustitución de uno o más aminoácidos con cisteína sobre su región constante seleccionada entre posiciones 117, 119, 121, 124, 139, 152, 153, 155, 157, 164, 169, 171, 174, 189, 191, 195, 197, 205, 207, 246, 258, 269, 274, 286, 288, 290, 292, 293, 320, 322, 326, 333, 334, 335, 337, 344, 355, 360, 375, 382, 390, 392, 398, 400 y 422 de una cadena pesada del anticuerpo, y donde las posiciones son numeradas de acuerdo con el sistema EU. En ciertas realizaciones, un fragmento de anticuerpo modificado (por ej., Fab o Fab') comprende una sustitución de uno o más aminoácidos con cisteína en su región constante seleccionada entre posiciones 121, 124, 152, 153, 155, 157, 164, 169, 171, 174, 189, y 207 de una cadena pesada del fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab'), y donde las posiciones son enumeradas de acuerdo con el sistema EU. En ciertas realizaciones, un fragmento de anticuerpo modificado (por ej., Fab o Fab') comprende una sustitución de uno o más aminoácidos con cisteína en su región constante seleccionada entre posiciones 124, 152, 153, 155, 157, 164, 174, 189, y 207 de una cadena pesada del fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab'), y donde las posiciones son enumeradas de acuerdo con el sistema EU.

[00286] En algunas realizaciones, un anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') comprende una sustitución de uno o más aminoácidos con cisteína en su región constante seleccionada entre posiciones 107, 108, 109, 114, 126, 127, 129, 142, 143, 145, 152, 154, 156, 157, 159, 161, 165, 168, 169, 170, 182, 183, 188, 197, 199, y 203 de una cadena liviana del anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab'), donde las posiciones son enumeradas de acuerdo con el sistema EU, y donde la cadena liviana es una cadena liviana kappa humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') comprende una sustitución de uno o más aminoácidos con cisteína en su región constante seleccionada entre posiciones 107, 108, 114, 126, 127, 129, 142, 159, 161, 165, 183, y 203 de una cadena liviana del anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab'), donde las posiciones son enumeradas de acuerdo con el sistema EU, y donde la cadena liviana es una cadena liviana kappa humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') comprende una sustitución de uno o más aminoácidos con cisteína en su región constante seleccionada entre posiciones 114, 129, 142, 145, 152, 159, 161, 165, y 197 de una

cadena liviana del anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab'), donde las posiciones son enumeradas de acuerdo con el sistema EU, y donde la cadena liviana es una cadena liviana kappa humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') comprende una sustitución de uno o más aminoácidos con cisteína en su región constante seleccionada entre posiciones 107, 108, 109, 126, 143, 145, 152, 154, 156, 157, 159, 182, 183, 188, 197, 199, y 203 de una cadena liviana del anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab'), donde las posiciones son enumeradas de acuerdo con el sistema EU, y donde la cadena liviana es una cadena liviana kappa humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') comprende una sustitución de uno o más aminoácidos con cisteína en su región constante seleccionada entre posiciones 145, 152, y 197 de una cadena liviana del anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab'), donde las posiciones son enumeradas de acuerdo con el sistema EU, y donde la cadena liviana es una cadena liviana kappa humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') comprende una sustitución de uno o más aminoácidos con cisteína en su región constante seleccionada entre posiciones 114 y 165 de una cadena liviana del anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab'), donde las posiciones son enumeradas de acuerdo con el sistema EU, y donde la cadena liviana es una cadena liviana kappa humana.

[00287] En algunas realizaciones, un anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') comprende una sustitución de uno o más aminoácidos con cisteína en su región constante seleccionada entre posiciones 143, 145, 147, 156, 159, 163, 168 de una cadena liviana del anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab'), donde las posiciones son enumeradas de acuerdo con el sistema EU, y donde la cadena liviana es una cadena liviana lambda humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') comprende cisteína en posición 143 (por numeración EU) de una cadena liviana del anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab'), donde la cadena liviana es una cadena liviana lambda humana.

[00288] En ciertas realizaciones, un anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') comprende una combinación de sustitución de dos o más aminoácidos con cisteína en sus regiones constantes y la combinación de posiciones se puede seleccionar de cualquiera de las posiciones enumeradas.

[00289] En algunas realizaciones, un anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') comprende cisteína en una o más de las siguientes posiciones: posición 124 de la cadena pesada, posición 152 de la cadena pesada, posición 153 de la cadena pesada, posición 155 de la cadena pesada, posición 157 de la cadena pesada, posición 164 de la cadena pesada, posición 174 de la cadena pesada, posición 114 de la cadena liviana, posición 129 de la cadena liviana, posición 142 de la cadena liviana, posición 159 de la cadena liviana, posición 161 de la cadena liviana, o posición 165 de la cadena liviana, y donde las posiciones son enumeradas de acuerdo con el sistema EU, y donde la cadena liviana es una cadena kappa. En algunas realizaciones, un anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') comprende cisteína en cuatro de las siguientes posiciones: posición 124 de la cadena pesada, posición 152 de la cadena pesada, posición 153 de la cadena pesada, posición 155 de la cadena pesada, posición 157 de la cadena pesada, posición 164 de la cadena pesada, posición 174 de la cadena pesada, posición 114 de la cadena liviana, posición 129 de la cadena liviana, posición 142 de la cadena liviana, posición 159 de la cadena liviana, posición 161 de la cadena liviana, o posición 165 de la cadena liviana, y donde las posiciones son enumeradas de acuerdo con el sistema EU, y donde la cadena liviana es una cadena kappa.

[00290] En algunas realizaciones, un anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') comprende cisteína en posición 152 de la cadena pesada, donde la posición es numerada de acuerdo con el sistema EU. En algunas realizaciones, un anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') comprende cisteína en posición 124 de la cadena pesada, donde la posición es numerada de acuerdo con el sistema EU. En algunas realizaciones, un anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') comprende cisteína en posición 165 de la cadena liviana, donde la posición es numerada de acuerdo con el sistema EU y donde la cadena liviana es una cadena kappa. En algunas realizaciones, un anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') comprende cisteína en posición 114 de la cadena liviana, donde la posición es numerada de acuerdo con el sistema EU y donde la cadena liviana es una cadena kappa. En algunas realizaciones, un anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') comprende cisteína en posición 143 de la cadena liviana, donde la posición es numerada de acuerdo con el sistema EU y donde la cadena liviana es una cadena lambda.

[00291] En algunas realizaciones, un anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') comprende cisteínas en posición 152 de la cadena pesada y posición

165 de la cadena liviana y donde las posiciones son enumeradas de acuerdo con el sistema EU, y donde la cadena liviana es una cadena kappa. En algunas realizaciones, un anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') comprende cisteínas en posición 152 de la cadena pesada y posición 114 de la cadena liviana y donde las posiciones son enumeradas de acuerdo con el sistema EU, y donde la cadena liviana es una cadena kappa. En algunas realizaciones, un anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') comprende cisteínas en posición 152 de la cadena pesada y posición 143 de la cadena liviana y donde las posiciones son enumeradas de acuerdo con el sistema EU, y donde la cadena liviana es una cadena lambda. En algunas realizaciones, un anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') comprende cisteínas en posición 124 y posición 152 de la cadena pesada y donde las posiciones son enumeradas de acuerdo con el sistema EU.

[00292] En algunas realizaciones, un anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') comprende cisteína en una o más de las siguientes posiciones: posición 155 de la cadena pesada, posición 189 de la cadena pesada, posición 207 de la cadena pesada, posición 145 de la cadena liviana, posición 152 de la cadena liviana, o posición 197 de la cadena liviana, y donde las posiciones son enumeradas de acuerdo con el sistema EU, y donde la cadena liviana es una cadena kappa. En algunas realizaciones, un anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') comprende cisteína en dos o más (por ej., 2, 3, 4) de las siguientes posiciones: posición 155 de la cadena pesada, posición 189 de la cadena pesada, posición 207 de la cadena pesada, posición 145 de la cadena liviana, posición 152 de la cadena liviana, o posición 197 de la cadena liviana, y donde las posiciones son enumeradas de acuerdo con el sistema EU, y donde la cadena liviana es una cadena kappa.

[00293] En algunas realizaciones, un anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') comprende cisteína en una o más de las siguientes posiciones: posición 124 de la cadena pesada, posición 152 de la cadena pesada, posición 153 de la cadena pesada, posición 155 de la cadena pesada, posición 157 de la cadena pesada, posición 164 de la cadena pesada, posición 174 de la cadena pesada, posición 114 de la cadena liviana, posición 129 de la cadena liviana, posición 142 de la cadena liviana, posición 159 de la cadena liviana, posición 161 de la cadena liviana, o posición 165 de la cadena liviana, y donde las posiciones son enumeradas de acuerdo con el sistema EU, y donde la cadena liviana es una cadena kappa. En algunas realizaciones, un anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo

(por ej., Fab o Fab') comprende cisteína en dos o más (por ej., 2, 3, 4) de las siguientes posiciones: posición 124 de la cadena pesada, posición 152 de la cadena pesada, posición 153 de la cadena pesada, posición 155 de la cadena pesada, posición 157 de la cadena pesada, posición 164 de la cadena pesada, posición 174 de la cadena pesada, posición 114 de la cadena liviana, posición 129 de la cadena liviana, posición 142 de la cadena liviana, posición 159 de la cadena liviana, posición 161 de la cadena liviana, o posición 165 de la cadena liviana, y donde las posiciones son enumeradas de acuerdo con el sistema EU, y donde la cadena liviana es una cadena kappa.

[00294] En algunas realizaciones, un fragmento de anticuerpo modificado (por ej., Fab) que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 118, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 122.

[00295] En algunas realizaciones, un fragmento de anticuerpo modificado (por ej., Fab) que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 118, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 123.

[00296] En algunas realizaciones, un fragmento de anticuerpo modificado (por ej., Fab) que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 124, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 128.

[00297] En algunas realizaciones, un fragmento de anticuerpo modificado (por ej., Fab) que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 124, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 129.

[00298] En algunas realizaciones, un fragmento de anticuerpo modificado (por ej., Fab) que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 134.

[00299] En algunas realizaciones, un fragmento de anticuerpo modificado (por ej., Fab) que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 135.

[00300] En algunas realizaciones, un fragmento de anticuerpo modificado (por ej., Fab) que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 136, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 140.

[00301] En algunas realizaciones, un fragmento de anticuerpo modificado (por ej., Fab) que específicamente se une a cKIT humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 141, y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145.

3. Producción de los Anticuerpos cKIT o Fragmentos de Anticuerpo

[00302] Anticuerpo anti-cKIT o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') se pueden producir a través de cualquier medio conocidos en el arte, incluyendo aunque sin limitación a, expresión recombinante, síntesis química, o digestión enzimática de anticuerpos monoclonales de longitud completa, que se pueden obtener por, por ej., hibridoma o producción recombinante. Expresión recombinante puede ser a partir de cualesquiera células huésped apropiadas conocidas en el arte, por ejemplo, células huésped de mamíferos, células huésped bacterianas, células huésped de levadura, células huésped de insectos, o realizadas por un sistema libre de células (por ej., Plataforma Sutro's Xpress CF™, <http://www.sutro.bio.com/technology/>).

[00303] La revelación además proporciona polinucleótidos que codifican el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que se describe en la presente, por ej., polinucleótidos que codifican regiones variables de cadena pesada o liviana o segmentos que comprenden las regiones determinantes de complementariedad según se describe en la presente. En algunos aspectos, el polinucleótido que codifica las regiones variables de cadena pesada (VH) tiene al menos 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% identidad de secuencia de ácido nucleico con un polinucleótido seleccionado entre el grupo compuesto por SEQ ID NOs: 11, 37, 55, 70, y 96. En algunos aspectos, el polinucleótido que codifica las regiones variables de cadena liviana (VL) tiene al menos 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% identidad de secuencia de ácido nucleico con un polinucleótido seleccionado entre el grupo compuesto por SEQ ID NOs: 24, 48, 83, y 109.

[00304] En algunos aspectos, el polinucleótido que codifica la cadena pesada de anticuerpo tiene al menos 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%,

99%, o 100% identidad de secuencia de ácido nucleico con un polinucleótido de SEQ ID NOs: 13, 39, 57, 72, y 98. En algunos aspectos, el polinucleótido que codifica la cadena liviana de anticuerpo tiene al menos 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% identidad de secuencia de ácido nucleico con un polinucleótido de SEQ ID NOs: 26, 50, 85, y 111.

[00305] En algunos aspectos, el polinucleótido que codifica la cadena pesada de Fab' tiene al menos 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% identidad de secuencia de ácido nucleico con un polinucleótido de SEQ ID NOs: 15, 41, 59, 74, y 100. En algunos aspectos, el polinucleótido que codifica la cadena liviana de Fab' tiene al menos 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% identidad de secuencia de ácido nucleico con un polinucleótido de SEQ ID NOs: 26, 50, 85, y 111.

[00306] El polinucleótido de la presente revelación puede codificar solamente la secuencia de región variable de un anticuerpo anti-cKIT o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab'). También pueden codificar tanto una región variable como una región constante del anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab'). Algunas de las secuencias de polinucleótidos codifican un polipéptido que comprende regiones variables tanto de la cadena pesada como la cadena liviana de uno de un anticuerpo anti-cKIT ejemplificado o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab').

[00307] Las secuencias de polinucleótido se pueden producir por la síntesis de ADN de fase sólida de novo o mediante mutagénesis PCR de una secuencia existente (por ej., secuencias tal como se describen en los Ejemplos debajo) que codifican un anticuerpo anti-cKIT o su fragmento de unión. Síntesis química directa de ácidos nucleicos pueden llevarse a cabo mediante métodos conocidos en el arte, tal como el método fosfotriéster de Narang *et al.*, Meth. Enzymol. 68:90, 1979; el método fosfodiéster de Brown *et al.*, Meth. Enzymol. 68:109, 1979; el método dietilfosforamidita de Beaucage *et al.*, Tetra. Lett., 22:1859, 1981; y el método de soporte sólido de la Patente de los Estados Unidos No. 4.458.066. Introduciendo mutaciones a una secuencia de polinucleótidos por PCR se puede realizar tal como se describe en, por ej., PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H.A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, NY, 1992; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis *et al.* (Ed.), Academic Press, San Diego, CA, 1990; Mattila *et al.*, Nucleic Acids Res. 19:967, 1991; and Eckert *et al.*, PCR Methods and Applications 1:17, 1991.

[00308] También se proporciona en la presente revelación vectores de expresión y células huésped para producir el anticuerpo anti-cKIT o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') que se describe con anterioridad. Varios vectores de expresión se pueden utilizar para expresar los polinucleótidos que codifican el anticuerpo anti-cKIT o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab'). Ambos vectores de expresión de base viral y no viral se pueden usar para producir los anticuerpos en una célula huésped mamífera. Los vectores no virales y sistemas incluyen plásmidos, vectores episomales, típicamente con un casete de expresión para expresar una proteína o ARN, y cromosomas artificiales humanos (ver, por ej., Harrington *et al.*, Nat Genet. 15:345, 1997). Por ejemplo, vectores no virales de utilidad para expresión de los polinucleótidos anti-cKIT y polipéptidos en células de mamíferos (por ej., humanos) incluyen pThioHis A, B & C, pcADN3.1/His, pEBVHis A, B & C (Invitrogen, San Diego, CA), vectores MPSV, y numerosos otros vectores conocidos en el arte para expresar otras proteínas. Los vectores virales de utilidad incluyen vectores en base a retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, herpes virus, vectores basados en SV40, papiloma virus, virus de HBP Epstein Barr, vectores vaccinia virus y virus de Semliki Forest (SFV). Ver, Brent *et al.*, supra; Smith, Annu. Rev. Microbiol. 49:807, 1995; y Rosenfeld *et al.*, Cell 68:143, 1992.

[00309] La elección del vector de expresión depende de la célula huésped pretendida en donde el vector va a ser expresado. Normalmente, los vectores de expresión contienen un promotor y otras secuencias reguladoras (por ej., intensificadores) que están operativamente ligados a los polinucleótidos que codifican un anticuerpo anti-cKIT o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab'). En algunos aspectos, un promotor inducible se utiliza para prevenir expresión de secuencias insertadas excepto bajo condiciones de inducción. Promotores inducibles incluyen, por ej., arabinosa, lacZ, promotor metalotioneína o un promotor de choque térmico. Cultivos de organismos transformados se pueden expandir bajo condiciones de no inducción sin afectar la población para secuencias de codificación cuyos productos de expresión son mejor tolerados por las células huésped. Además de los promotores, otros elementos reguladores también pueden ser requeridos o deseados para expresión eficiente de un anticuerpo anti-cKIT o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab'). Estos elementos típicamente incluyen un codón de inicio ATG y sitio de unión a ribosoma adyacente u otras secuencias. Además, la eficiencia de expresión puede ser mejorada mediante la inclusión de intensificadores apropiados al sistema celular en uso (ver, por ej., Scharf *et al.*, Results Probl. Cell Differ. 20:125, 1994; y Bittner *et al.*, Meth. Enzymol., 153:516,

1987). Por ejemplo, el intensificador SV40 o intensificador CMV se pueden usar para aumentar expresión en células huésped de mamíferos.

[00310] Los vectores de expresión también pueden proporcionar una posición de secuencia señal de secreción para formar una proteína de fusión con polipéptidos codificados mediante secuencias anticuerpo anti-cKIT anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') insertadas. Con mayor frecuencia, las secuencias de anticuerpo anti-cKIT o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') insertadas son enlazadas a las secuencias señal antes de inclusión en el vector. Vectores a ser usados para recibir secuencias que codifican dominios variables de cadena liviana y pesada de anticuerpo anti-cKIT o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') algunas veces también codifican regiones o partes de las mismas. Dichos vectores permiten expresión de las regiones variables como proteínas de fusión con las regiones constantes conllevando así a producción de anticuerpos o sus fragmentos intactos.

[00311] Las células huésped para albergar y expresar cadenas del anticuerpo anti-cKIT o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') pueden ser tanto procariotas o eucariotas. *E. coli* es un huésped procariota de utilidad para clonar y expresar el polinucleótido de la presente revelación. Otros huéspedes microbianos adecuados para usar incluyen bacilli, tal como *Bacillus subtilis*, y otras enterobacterias, tal como *Salmonella*, *Serratia*, y varias especies *Pseudomonas*. En estos huéspedes procariotas, uno también puede realizar vectores de expresión, que típicamente contienen secuencias control de expresión compatibles con la célula huésped (por ej., un origen de replicación). Además, cualquier número de una variedad de promotores bien conocidos estarán presentes, tal como el sistema promotor de lactosa, un sistema promotor de triptófano (*trp*), un sistema promotor beta-lactamasa, o un sistema promotor a partir de fago lambda. Los promotores típicamente controlan expresión, opcionalmente con una secuencia operadora, y tienen secuencias de sitio de unión ribosoma y similares, para iniciar y completar transcripción y traducción. Otros microbios, tal como levadura, también se pueden utilizar para expresar polipéptidos de anticuerpo anti-cKIT o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab'). Células de insectos en combinación con vectores baculovirus también se pueden usar.

[00312] En otros aspectos, células huésped de mamíferos se usan para expresar y producir los polipéptidos de anticuerpo anti-cKIT o fragmento de anticuerpo (por ej., Fab o Fab') de la presente revelación. Por ejemplo, pueden ser tanto una línea celular hibridoma que expresa genes inmunoglobulina endógenos (por ej., los clones hibridoma mieloma tal

como se describen en los Ejemplos) o una línea celular de mamíferos que alberga un vector de expresión exógeno (por ej., las células mieloma SP2/0 ejemplificadas debajo). Estas incluyen cualquier célula animal mortal normal o normal o anormal inmortal o humana. Por ejemplo, un número de líneas celulares huésped adecuadas capaces de secretar inmunoglobulinas intactas han sido desarrolladas, incluyendo las líneas celulares CHO, carias líneas celulares COS, células HeLa, líneas celulares mieloma, células B transformadas e hibridomas. El uso de cultivo de células de tejido de mamífero para expresar polipéptidos se analizó generalmente en, por ej., Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987. Vectores de expresión para células huésped de mamíferos pueden incluir secuencias control de expresión, tal como un origen de replicación, un promotor, y un intensificador (ver, por ej., Queen *et al.*, *Immunol. Rev.* 89:49–68, 1986), y sitios de información de procesamiento necesarios, tal como sitios de unión ribosoma, sitios de empalme ARN, sitios de poliadenilación, y secuencias de terminación transcripcional. Estos vectores de expresión generalmente contienen promotores provenientes de genes mamíferos o de virus de mamíferos. Promotores adecuados pueden ser constitutivos, específicos de tipo de célula, específico de etapa, y/o modulable o regulable. Promotores adecuados incluyen, aunque no se limitan a, el promotor metalohioneina, el promotor mayor tardío constitutivo de adenovirus, el promotor dexametasona–inducible MMTV, el promotor SV40, el promotor MRP polIII, el promotor constitutivo MPSV, el promotor tetraciclina –inducible de CMV (tal como el promotor inmediato–temprano de CMV humano), el promotor constitutivo CMV, y combinaciones promotor–intensificador conocidas en el arte.

[00313] Métodos para introducir vectores de expresión que contienen las secuencias de polinucleótido de interés varían dependiendo del tipo de huésped celular. Por ejemplo, transfección de cloruro de calcio se utiliza comúnmente para células procariotas, mientras tratamiento fosfato de calcio o electroporación se puede usar para otros huéspedes celulares (ver generalmente Sambrook *et al.*, *supra*). Otros métodos incluyen, por ej., electroporación, tratamiento fosfato de calcio, transformación intermediada por liposoma, inyección y microinyección, métodos balísticos, virosomas, inmunoliposomas, conjugados policación:ácido nucleico, ADN desnudo, viriones artificiales, fusión a la proteína estructural de herpes virus VP22 (Elliot and O'Hare, *Cell* 88:223, 1997), captación ADN intensificada por agente, y transducción ex vivo. Para producción a largo plazo, de alto rendimiento de proteínas recombinantes, expresión estable será deseada con frecuencia. Por ejemplo, líneas celulares que expresan establemente cadenas de anticuerpo anti–cKIT o fragmento de

anticuerpo (por ej., Fab o Fab') se pueden preparar usando vectores de expresión que contienen orígenes viral de replicación o elementos de expresión endógena y un gen marcador seleccionable. Seguido de la introducción del vector, se puede permitir a las células crecer durante 1–2 días en un medio enriquecido antes de que sean cambiadas a medio selectivo. El fin del marcador seleccionable es el de otorgar resistencia a selección, y su presencia permite crecimiento de células que exitosamente expresan las secuencias introducidas en medio selectivo. Células transfectadas establemente, resistentes se puede hacer proliferar usando técnicas de cultivo de tejido apropiadas al tipo de célula.

[00314] Fragmentos de anticuerpo, tal como Fab o Fab' se pueden producir por escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tal como papaína (para producir fragmentos Fab), o pepsina (para producir fragmentos Fab'), etc. Comparado con fragmentos Fab, fragmentos Fab' también contienen la región bisagra que incluye las dos cisteínas naturales que forman enlaces disulfuro entre dos cadenas pesadas de una molécula inmunoglobulina.

Usos Terapéuticos

[00315] Los conjugados de la presente revelación son útiles en una variedad de aplicaciones incluyendo, aunque sin limitación a, ablación de células madre hematopoyéticas en un paciente que lo necesita, por ej., un receptor de trasplante de células madre hematopoyéticas. En consecuencia, en la presente se proporcionan métodos para ablación de células madres hematopoyéticas en un paciente que lo necesita mediante la administración al paciente de una cantidad efectiva de cualquiera de los conjugados que se describen en la presente. Se proporcionan en la presente también métodos para acondicionar un paciente de trasplante de células madre hematopoyéticas (por ej., un receptor de trasplante) administrando al paciente una cantidad efectiva de cualquiera de los conjugados que se describen en la presente, y permitiendo un período de tiempo suficiente para que los conjugados para que se despejen de la circulación del paciente antes de realizar el trasplante de células madre hematopoyéticas al paciente. Los conjugados pueden ser administrados al paciente intravenosamente. También se proporciona el uso de cualquiera de los conjugados o composiciones farmacéuticas que se describen en la presente para ablación de células madre hematopoyéticas en un paciente que lo necesita. Además se proporciona el uso de cualquiera de los conjugados o composiciones farmacéuticas que se describen en la presente

en la elaboración de un medicamento para ablación de células madre hematopoyéticas en un paciente que lo necesita.

[00316] Células madre hematopoyéticas endógenas generalmente residen dentro de la de los sinusoides de la médula ósea. Este entorno físico en donde residen células madre es denominado como el microambientes de las células madre, o el nicho de las células madre. Las células estromales y otras involucradas en este nicho proporcionan factores solubles y límite, que tienen una gran cantidad de efectos. Varios modelos han sido propuestos para la interacción entre células madre hematopoyéticas y su nicho. Por ejemplo, se ha sugerido un modelo donde, cuando una célula madre se divide, solamente permanece una hija en el nicho y la otra célula hija deja el nicho para diferenciarse. Se ha propuesto que a eficiencia de injerto puede intensificarse por depleción selectiva de células madre hematopoyéticas endógenas, abriendo así los nichos de células madre para el injerto de células madre donantes (ver por ej., WO 2008/067115).

[00317] Trasplante de células madre hematopoyéticas (HSC), o trasplante de médula ósea (como se denominó anteriormente), es un tratamiento establecido para una amplia gama de enfermedades que afectan las células madre de la sangre del cuerpo tal como leucemia, anemia severa, anomalías inmunes, y algunas enfermedades con déficit de enzimas. Estas enfermedades con frecuencia conllevan al que el paciente precisa tener su médula ósea reemplazada por nuevas células sanguíneas saludables.

[00318] El trasplante de HSC con frecuencia es alogénico, lo que significa que el paciente recibe células madre de otro individuo de la misma especie, ya sea un hermano/a, pariente relacionado, haploidéntico relacionado o no relacionado, donante voluntario. Se estima que alrededor de 30% de pacientes que necesitan trasplante de células madre hematopoyéticas tienen acceso a un hermano/a cuyo tipo de tejido es adecuado. El otro 70% de pacientes debe depender en la concordancia de un donante voluntario, no relacionado o la disponibilidad de un donante relacionado haploidéntico. Es importante que las características de las células de donante y paciente sean comparables. El trasplante de células madre hematopoyéticas también podría ser autólogo, en donde las células trasplantadas se originan del sujeto en sí, es decir, el donante y el receptor son el mismo individuo. Además, los trasplantes podrían ser singénicos, es decir, a partir de un individuo genéticamente idéntico tal como un mellizo. En un aspecto adicional los trasplantes podrían ser xenogénicos, es decir, se originan a partir de una especie diferente, que es de interés cuando no hay donantes suficientes de la misma especie, tal como para trasplante de órganos.

[00319] Antes del trasplante de HSC, los pacientes generalmente experimentan un método de pre-tratamiento o acondicionamiento. El fin de este pre-tratamiento o acondicionamiento es el de eliminar tantas células no deseadas (por ej., células malignas/cancerígenas) en el cuerpo como sea posible, para minimizar rechazo, y/o para abrir los nichos de células madre mediante reducción de HSCs endógenas para injerto eficiente de células madre donante dentro de esos nichos. Las HSCs saludables del donante son entonces dadas al paciente intravenosamente, o en algunos casos de forma intraósea. Muchos riesgos, sin embargo, se asocian con trasplante HSC, incluyendo injerto deficiente, rechazo inmunológico, enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), o infección. Aunque el donante y las células del paciente parecen ser iguales en términos de tipo de tejido, por ej., las moléculas MHC concuerdan (o haploidéntico); existen aún diferencias menores entre estos individuos que las células inmunes pueden percibir como peligrosas. Esto significa que el nuevo sistema inmune (glóbulos blancos de las nuevas células madre) perciben el nuevo cuerpo como "extraño ", que provoca un ataque inmune. Esta reacción, denominada enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), puede convertirse una amenaza para la vida del paciente. Los pacientes después del trasplante de HSC también tienen un riesgo aumentado de infecciones debido a la ausencia de glóbulos blancos antes de que la nueva médula ósea comience a funcionar. Este período puede en algunos casos durar muchos meses hasta que el sistema inmune haya madurado. Algunas de estas infecciones oportunistas pueden poner en riesgo la vida.

[00320] Por lo tanto, existe la necesidad de mejorar el método de acondicionamiento y trasplante y disminuir el riesgo asociado con el trasplante de HSC y aumentar su efectividad por varias enfermedades. Se proporcionan en la presente nuevos conjugados anticuerpo droga que, destruyendo específicamente las HSCs endógenas del receptor previo al trasplante pero no todas las otras células inmunes, mantienen una defensa inmune parcialmente activa para combatir infecciones inmediatamente después del trasplante, pero al mismo tiempo proporcionan un efecto inmunosupresor indirecto debido a la incapacidad del sujeto de formar nuevas células inmunes de sus propias HSCs. Dado que el pre-tratamiento puede ser más moderado que quimioterapia o radiación, y con menos efectos secundarios graves, podría inducir menos GVHD en pacientes con trasplante.

[00321] Los conjugados anticuerpo droga que se describen en la presente podrían ser usados para ablación de células madre hematopoyéticas endógenas, por ej., en un método pre-tratamiento /acondicionamiento antes del trasplante de células madre hematopoyéticas.

Por ejemplo, los conjugados de la invención podrían usarse para tratar cualquier afección/trastorno no maligno donde el trasplante de células madre podría ser beneficioso, tal como anemia aplásica severa (SAA), Síndrome de Wiskott Aldrich, Síndrome de Hurlers, linfocitosis haemofagocítica familiar (FHL), enfermedad granulomatosa crónica (CGD), síndrome de Kostmanns, síndrome de inmunodeficiencia severo (SCID), otros trastornos autoinmunes tal como SLE, esclerosis múltiple, IBD, Enfermedad de Crohns, colitis ulcerativa, síndrome de Sjogrens, vasculitis, Lupus, Miastenia Gravis, enfermedad de Wegeners, errores innatos de metabolismo y/o otras inmunodeficiencias.

[00322] Además, los conjugados de la invención podrían usarse para tratar cualquier afección/trastorno maligno donde trasplante de células madre podría ser beneficioso, tal como enfermedades hematológicas, neoplasias hematológicas o tumores sólidos (por ej., cáncer renal, cáncer hepático, cáncer pancreático). Tipos comunes de enfermedades/afecciones hematológicas que podrían ser tratadas con los métodos reivindicados y anticuerpos son leucemias, linfomas y síndromes mielodisplásicos. La leucemia es un tipo de cáncer de la sangre o médula ósea caracterizado por un incremento anormal de células blancas inmaduras llamadas blastocitos, y el término leucemia incluye: leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mielogenosa aguda (AML), leucemia monocítica aguda (AMoL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mielogenosa crónica (CML) y otras leucemias tal como leucemia de células pilosas (HCL), Leucemia prolinfocítica de células T (T-PLL), leucemia linfocítica granular grande y leucemia de células T del adulto. En un aspecto de la invención, la leucemia tratada es leucemia aguda. En un aspecto adicional, la leucemia es ALL, AML o AMoL. Linfomas incluyen leucemia /linfoma de células T precursoras, linfoma de Burkitt, linfoma folicular, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de células del manto, leucemia/linfoma linfocítico crónico de células B, linfoma de MALT, Micosis fungoide, Linfoma periférico de células T no especificado de otro modo, Forma de esclerosis nodular de subtipo de linfoma de Hodgkin de celularidad mixta de linfoma de Hodgkin. Síndrome mielodisplásico (MDS) es el nombre de un grupo de afecciones que se dan cuando las células que forman la sangre en la médula ósea son dañadas. Este daño conlleva a números bajos de uno o más tipos de células sanguíneas. MDS se subdivide en 7 categorías; Citopenia refractaria con displasia unilínea (RCUD), Anemia refractaria con sideroblastos en anillo (RARS), Citopenia refractaria con displasia multilineal (RCMD), Anemia refractaria con exceso de blastos-1 (RAEB-1), Anemia refractaria con exceso de blastos-2 (RAEB-2), Síndrome mielodisplásico, no clasificado (MDS-U), y Síndrome mielodisplásico asociado con aislamiento del (5q).

[00323] En algunas realizaciones, un paciente que necesita ablación de células madre hematopoyéticas (por ej., un receptor de trasplante de células madre hematopoyéticas) puede tener una enfermedad inmunodeficiente hereditaria, un trastorno autoinmune, un trastorno hematopoyético, o errores innatos de metabolismo.

[00324] En algunas realizaciones, el trastorno hematopoyético se puede seleccionar entre cualquiera de los siguientes: Leucemia mieloide aguda (AML), Leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia monocítica aguda (AMoL), Leucemia mieloide crónica (CML), Leucemia linfocítica crónica (CLL), Trastornos mieloproliferativos, Síndrome mielodisplásicos, Mieloma múltiple, Linfoma no Hodgkin, Enfermedad de Hodgkin, Anemia aplásica, Aplasia pura de células rojas, Hemoglobinuria paroxística nocturna, Anemia de Fanconi, Talasemia mayor, Anemia de células falciformes, Inmunodeficiencia combinada severa, síndrome de Wiskott–Aldrich, Linfohistiocitosis hemofagocítica.

[00325] Errores innatos del metabolismo se conocen también como enfermedades metabólicas hereditaria (IMB) o enfermedades metabólicas congénitas, que son una clase de enfermedades genéticas que incluyen trastornos congénitos de metabolismo de carbohidrato, metabolismo de aminoácidos, metabolismo de ácido orgánico, o enfermedades de depósito lisosomal. En algunas realizaciones, errores innatos del metabolismo se seleccionan entre mucopolisacaridosis, enfermedad de Gaucher, leucodistrofias metacromáticas, o adrenoleucodistrofias.

[00326] Además, los conjugados de la invención podrían usarse para tratar un tumor estromal gastrointestinal (GIST), tal como GIST que es cKIT positivo. En algunas realizaciones, los conjugados de la invención podrían usarse para tratar GIST que expresa cKIT de tipo salvaje. En algunas realizaciones, los conjugados de la invención podrían usarse para tratar GIST que es resistente a un tratamiento, por ej., imatinib (Glivec®/Gleevec®).

Terapia de Combinación

[00327] En ciertos casos, un conjugado anticuerpo droga de la presente revelación se puede usar en combinación con otro régimen de acondicionamiento tal como terapia de radiación o quimioterapia.

[00328] En ciertos casos, un conjugado anticuerpo droga de la presente revelación se puede usar en combinación con otro agente terapéutico, tal como un agente anti–cancerígeno, agente anti–náuseas (o anti–eméticos), analgésico, agente de movilización, o combinaciones de los mismos.

[00329] Agentes quimioterapéuticos generales considerados para usar en terapias de combinación incluyen anastrozol (Arimidex®), bicalutamida (Casodex®), sulfato de bleomicina (Blenoxane®), busulfan (Myleran®), busulfan inyección (Busulfex®), capecitabine (Xeloda®), N4–pentoxicarbonil–5–desoxy–5–fluorocytidine, carboplatino (Paraplatin®), carmustine (BiCNU®), clorambucil (Leukeran®), cisplatino (Platinol®), cladribine (Leustatin®), ciclosporina (Sandimmune®, Neoral® o Restasis®), ciclofosfamida (Cytoxan® o Neosar®), citarabina, citocina arabinósido (Cytosar–U®), citarabina liposoma inyección (DepoCyt®), dacarbazine (DTIC–Dome®), dactinomicina (Actinomicina D, Cosmegan), daunorubicina clorhidrato (Cerubidine®), daunorubicina citrato liposoma inyección (DaunoXome®), dexametasona, docetaxel (Taxotere®), doxorubicina clorhidrato (Adriamycin®, Rubex®), etopósido (Vepesid®), fludarabina fosfato (Fludara®), 5–fluorouracil (Acrucil®, Efudex®), flutamida (Eulexin®), tezacitibina, Gemcitabina (difluorodesoxicidina), hidroxiurea (Hydrea®), Idarubicina (Idamycin®), ifosfamida (IFEX®), irinotecano (Camptosar®), L–asparaginasa (ELSPAR®), leucovorin calcio, melfalan (Alkeran®), 6–mercaptopurina (Purinethol®), metotrexato (Folex®), mitoxantrona (Novantrone®), milotarg, paclitaxel (Taxol®), phoenix (Yttrium90/MX–DTPA), pentostatina, polifeprosan 20 con implante de carmustina (Gliadel®), tamoxifeno citrato (Nolvadex®), tenipósido (Vumon®), 6–tioguanina, tiotepa, tirapazamina (Tirazone®), topotecan clorhidrato para inyección (Hycamptin®), vinblastina (Velban®), vincristina (Oncovin®), y vinorelbina (Navelbine®).

[00330] En algunas realizaciones, el conjugado anticuerpo droga de la presente revelación se puede usar en combinación con un bloqueador CD47, por ej., un anticuerpo anti–CD47 o su fragmento. Se ha informado que un microcuerpo anti–CD47 que bloquea la interacción entre CD47 y proteína reguladora de señales alfa (SIRP α) puede intensificar la reducción de HSCs endógenas mediante un anticuerpo anti–c–Kit desnudo (Chhabra et al., *Science Translational Medicine* **8** (351), 351ra105).

[00331] En algunas realizaciones, el conjugado anticuerpo droga de la presente revelación se puede usar en combinación con otro anticuerpo o su fragmento que se une específicamente a células madre hematopoyéticas o células hematopoyéticas progenitoras, por ej., anticuerpo anti–CD45 o su fragmento, anticuerpo anti–CD34 o su fragmento, anticuerpo anti–CD133 o su fragmento, anticuerpo anti–CD59 o su fragmento, o anticuerpo

anti-CD90 o su fragmento. En algunas realizaciones, los conjugados anticuerpo droga de la presente revelación se puede usar en combinación con un inhibidor Dyrk1a, tal como Harmine, INDY, ML 315 clorhidrato, ProINDY, Tocris™ TC-S 7044, Tocris™ TG 003, FINDY, TBB, DMAT, CaNDY, etc.

[00332] En algunas realizaciones, el conjugado anticuerpo droga de la presente revelación se puede usar en combinación con uno o más inmuno supresores, tal como glucocorticoides, por ej., prednisona, dexametasona, e hidrocortisona; citostáticos, por ej., agentes de alquilación, antimetabolitos, metotrexato, azatioprina, mercaptopurina, dactinomicina, etc.; drogas que actúan sobre inmunofilinas, por ej., tacrolimus (Prograf®, Astograf XL® o Envarsus XR®), sirolimus (rapamicina o Rapamune®) y everolimus; interferonas; opiodes; proteínas de unión a TNF; micofenolato; fingolimod; miriocin; etc. En algunas realizaciones, el conjugado anticuerpo droga de la presente revelación se puede usar en combinación con uno o más agentes que específicamente reducen células T, tal como Fludarabine, Ciclosporina, anticuerpo anti-CD52, por ej., Alemtuzumab, Antitimocita globulina (ATG), anticuerpo anti-CD3 o su fragmento, anticuerpo anti-CD4 o su fragmento, anticuerpo anti-CD8 o su fragmento, o anticuerpo TCR α/β anti-humana o su fragmento. Terapias de reducción de células T pueden reducir reacción huésped contra injerto, que podría conllevar a rechazo de un trasplante.

[00333] En algunas realizaciones, el conjugado anticuerpo droga de la presente revelación se puede usar en combinación con uno o más agentes seleccionados entre plerixafor (también conocido como AMD3100, Mozobil®), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), por ej., sargramostim (Leukine®), o factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), por ej., filgrastim o pegfilgrastim (Zarzio®, Zarzio®, Neupogen®, Neulasta®, Nufil®, Religrast®, Emgrast®, Neukine®, Grafeel®, Imumax®, Filcad®).

[00334] En un aspecto, un conjugado anticuerpo droga de la presente revelación se combina en una formulación de combinación farmacéutica, o régimen de dosificación como terapia de combinación, con un segundo compuesto que tiene propiedades anticancerígenas. El segundo compuesto de la formulación de combinación farmacéutica o régimen de dosificación puede tener actividades complementarias para el conjugado de la combinación de modo tal que no se afecten adversamente entre sí.

[00335] El término “combinación farmacéutica” tal como se usa en la presente se refiere tanto a una combinación fija en una forma de dosificación unitaria, o combinación no fija o un kit de partes para la administración combinada donde dos o más agentes terapéuticos pueden ser administrados independientemente al mismo tiempo o separadamente dentro de intervalos de tiempo, especialmente donde estos intervalos de tiempo permiten que los socios de combinación muestren un efecto cooperativo, *por ej.* sinergista.

[00336] El término “terapia de combinación” se refiere a la administración de dos o más agentes terapéuticos para tratar una afección terapéutica o trastorno descrito en la presente revelación. Dicha administración abarca co-administración de estos agentes terapéuticos en un modo sustancialmente simultáneo, tal como en una única cápsula que tiene una tasa fija de ingredientes activos. Alternativamente, dicha administración abarca co-administración en múltiples recipientes, o en recipientes separados (por ej., cápsulas, polvos, y líquidos) para cada ingrediente activo. Polvos y/o líquidos pueden ser reconstituidos o diluidos en una dosis deseado previo a administración. Además, dicha administración también abarca uso de cada tipo de agente terapéutico en un modo secuencial, ya sea aproximadamente al mismo tiempo o en tiempos diferentes. En cualquiera de los casos, el régimen de tratamiento va a proporcionar efectos beneficiosos de la combinación de drogas para tratar las afecciones o trastornos que se describen en la presente.

[00337] La terapia de combinación puede proporcionar “sinergia” y demostrar “sinergista”, es decir, el efecto logrado cuando los ingredientes activos usados juntos es mayor que la suma de los efectos que son resultado del uso de los compuestos separadamente. Un efecto sinergista puede ser logrado cuando los ingredientes activos son: (1) co-formulados y administrados o suministrados simultáneamente en una formulación de dosificación unitaria combinada; (2) suministrados mediante alternancia o en paralelo como formulaciones separadas; o (3) mediante algún otro régimen. Cuando se administran en terapia de alternación, un efecto sinergista se puede lograr cuando los compuestos son administrados o suministrados secuencialmente, por ej., mediante diferentes inyecciones en jeringas separadas. En general, durante terapia de alternación, una dosis efectiva de cada ingrediente activo se administra secuencialmente, es decir, serialmente, mientras en terapia de combinación, las dosificaciones efectivas de dos o más ingredientes activos se administran juntas.

Composiciones Farmacéuticas

[00338] Para preparar composiciones farmacéuticas o estériles que incluyan uno o más conjugados anticuerpo droga que se describen en la presente, el conjugado (s) proporcionado puede mezclarse con un portador farmacéuticamente aceptable o excipiente.

[00339] Formulaciones de agentes terapéuticos y diagnósticos se pueden preparar mezclando con portadores aceptables fisiológicamente, excipientes, o estabilizadores e la forma de, por ej., polvos liofilizados, lechadas, soluciones acuosas, lociones, o suspensiones (ver, por ej., Hardman et al., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y., 2001; Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N.Y., 2000; Avis, et al. (eds.), Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY, 1993; Lieberman, et al. (eds.), Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY, 1990; Lieberman, et al. (eds.) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY, 1990; Weiner and Kotkoskie, Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 2000).

[00340] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica que comprende conjugado anticuerpo de la presente invención es una preparación liofilizada. En ciertas realizaciones una composición farmacéutica que comprende el conjugado anticuerpo es un liofilizado en un que contiene un conjugado anticuerpo, histidina, sacarosa, y polisorbato 20. En ciertas realizaciones la composición farmacéutica que comprende el conjugado anticuerpo es un liofilizado en un vial que contiene un conjugado anticuerpo, succinato de sodio, y polisorbato 20. En ciertas realizaciones la composición farmacéutica que comprende el conjugado anticuerpo es un liofilizado en un vial que contiene un conjugado anticuerpo, trehalosa, citrato, y polisorbato 8. El liofilizado puede ser reconstituido, por ej., con agua, solución salina, para inyección. En una realización específica, la solución comprende el conjugado anticuerpo, histidina, sacarosa, y polisorbato 20 a un pH de aproximadamente 5,0. En otra realización específica la solución comprende el conjugado anticuerpo, succinato de sodio, y polisorbato 20. En otra realización específica, la solución comprende el conjugado anticuerpo, trehalosa dihidrato, citrato dihidrato, ácido cítrico, y polisorbato 8 a un pH de

aproximadamente 6,6. Para administración intravenosa, la solución obtenida generalmente va a ser adicionalmente diluida dentro de una solución portadora.

[00341] Elegir un régimen de administración para un agente terapéutico depende de varios factores, incluyendo la tasa de recambio de suero o tejido de la entidad, el nivel de síntomas, la inmunogenicidad de la entidad, y la accesibilidad de las células objetivo en la matriz biológica. En ciertas realizaciones, un régimen de administración maximiza la cantidad de agente terapéutico administrado al paciente en consistencia con un nivel aceptable de efectos secundarios. En consecuencia, la cantidad de producto biológico administrado depende en parte de la entidad particular y la gravedad de la afección que está siendo tratada. La orientación en la elección apropiada de dosis de anticuerpos, citocinas, y moléculas pequeñas se encuentra disponible (ver, por ej., Wawrzynczak, *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK, 1996; Kresina (ed.), *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, New York, N.Y., 1991; Bach (ed.), *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, New York, N.Y., 1993; Baert et al., *New Engl. J. Med.* 348:601–608, 2003; Milgrom et al., *New Engl. J. Med.* 341:1966–1973, 1999; Slamon et al., *New Engl. J. Med.* 344:783–792, 2001; Beniaminovitz et al., *New Engl. J. Med.* 342:613–619, 2000; Ghosh et al., *New Engl. J. Med.* 348:24–32, 2003; Lipsky et al., *New Engl. J. Med.* 343:1594–1602, 2000).

[00342] La determinación de la dosis apropiada se realiza por el médico clínico, por ej., usando parámetros de factores conocidos o sospechados en el arte que afecten el tratamiento o previstos que afecten el tratamiento. Generalmente, la dosis comienza con una cantidad un poco menos de la dosis óptima y se aumenta mediante incrementos pequeños de allí en más hasta que el efecto deseado u óptimo se logra en relación a cualquier efecto secundario negativo. Medidas de diagnóstico importantes incluyen aquellas de síntomas de, por ej., la inflamación o nivel de citocinas inflamatorias producido.

[00343] Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser variados de forma de obtener una cantidad del ingrediente activo que es efectiva para lograr la respuesta

terapéutica deseada para un paciente particular, composición, y modo de administración, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación elegido va a depender de una variedad de factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención utilizadas, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que está siendo utilizado, la duración del tratamiento, otras drogas, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares utilizadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general y antecedentes médicos previos del paciente que está siendo tratado, y factores similares conocidos en el arte medicinal.

[00344] Las composiciones que comprenden el conjugado anticuerpo de la invención pueden ser provistas mediante infusión continua, o mediante dosis en intervalos de, por ej., un día, una semana, o 1–7 veces por semana, una vez semana por medio, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada cinco semanas, una vez cada seis semanas, una vez cada siete semanas, o una vez cada ocho semanas. Dosis pueden ser provistas de forma intravenosa, subcutánea, o intraósea. Un protocolo de dosis específico es aquel que involucra la dosis máxima o frecuencia de dosis que evita efectos secundarios significativos no deseados.

[00345] Para los conjugados anticuerpo de la invención, la dosificación administrada a un paciente puede ser 0,0001 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente. La dosificación puede ser entre 0,001 mg/kg y 50 mg/kg, 0,005 mg/kg y 20 mg/kg, 0,01 mg/kg y 20 mg/kg, 0,02 mg/kg y 10 mg/kg, 0,05 y 5 mg/kg, 0,1 mg/kg y 10 mg/kg, 0,1 mg/kg y 8 mg/kg, 0,1 mg/kg y 5 mg/kg, 0,1 mg/kg y 2 mg/kg, 0,1 mg/kg y 1 mg/kg del peso corporal del paciente. La dosificación del conjugado anticuerpo puede ser calculada usando el peso del paciente en kilogramos (kg) multiplicado por la dosis a ser administrada en mg/kg.

[00346] Las dosis de los conjugados anticuerpo de la invención pueden repetirse y las administraciones pueden separarse por menos de 1 día, al menos 1 día, 2 días, 3 días, 5 días, 10 días, 15 días, 30 días, 45 días, 2 meses, 75 días, 3 meses, 4 meses, 5 meses, o al menos 6 meses. En algunas realizaciones, un conjugado anticuerpo de la invención se administra

dos veces a la semana, una vez a la semana, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, una vez cada cuatro meses, o menos frecuentemente.

[00347] Una cantidad efectiva para un paciente particular puede variar dependiendo de factores tal como la afección que está siendo tratada, la salud general del paciente, el método, vía y dosis de administración y la gravedad de los efectos secundarios (ver, por ej., Maynard et al., *A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice*, Interpharm Press, Boca Raton, Fla., 1996; Dent, *Good Laboratory and Good Clinical Practice*, Urch Publ., London, UK, 2001).

[00348] La vía de administración puede ser por, por ej., aplicación tópica o cutánea, inyección o infusión por administración subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial, intracerebroespinal, intralesional, o por sistemas de liberación sostenida o un implante (ver, por ej., Sidman et al., *Biopolymers* 22:547–556, 1983; Langer et al., *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167–277, 1981; Langer, *Chem. Tech.* 12:98–105, 1982; Epstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688–3692, 1985; Hwang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4030–4034, 1980; Patente de los Estados Unidos Nos. 6.350.466 y 6.316.024). Cuando resulte necesario, la composición también puede incluir un agente de solubilización o un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección, o ambas. Además, administración pulmonar también puede utilizarse, por ej., mediante uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente en aerosol. Ver, por ej., Patente de los Estados Unidos Nos. 6.019.968, 5.985.320, 5.985.309, 5.934.272, 5.874.064, 5.855.913, 5.290.540, y 4.880.078; y Publicación PCT Nos. WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346, y WO 99/66903, cada una de las cuales se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad.

[00349] Métodos para co-administración o tratamiento con un segundo agente terapéutico, por ej., una citocina, esteroide, agente quimioterapéutico, antibiótico, o radiación (tal como irradiación total del cuerpo (TBI)), son conocidos en el arte (ver, por ej., Hardman et al., (eds.) (2001) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10.sup.th ed., McGraw–Hill, New York, N.Y.; Poole and Peterson (eds.) (2001) *Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach*, Lippincott, Williams &

Wilkins, Phila., Pa.; Chabner and Longo (eds.) (2001) Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.). Una cantidad efectiva de terapéutico puede disminuir los síntomas por al menos 10%; por al menos 20%; al menos aproximadamente 30%; al menos 40%, o al menos 50%.

[00350] Terapias adicionales, que se pueden administrar en combinación con los conjugados anticuerpo de la invención pueden administrarse con menos de 5 minutos de separación, menos de 30 minutos de separación, 1 hora de separación, a aproximadamente 1 hora de separación, a aproximadamente 1 hasta aproximadamente 2 horas de separación, a aproximadamente 2 horas hasta aproximadamente 3 horas de separación, a aproximadamente 3 horas hasta aproximadamente 4 horas de separación, a aproximadamente 4 horas hasta aproximadamente 5 horas de separación, a aproximadamente 5 horas hasta aproximadamente 6 horas de separación, a aproximadamente 6 horas hasta aproximadamente 7 horas de separación, a aproximadamente 7 horas hasta aproximadamente 8 horas de separación, a aproximadamente 8 horas hasta aproximadamente 9 horas de separación, a aproximadamente 9 horas hasta aproximadamente 10 horas de separación, a aproximadamente 10 horas hasta aproximadamente 11 horas de separación, a aproximadamente 11 horas hasta aproximadamente 12 horas de separación, a aproximadamente 12 horas hasta 18 horas de separación, 18 horas hasta 24 horas de separación, 24 horas hasta 36 horas de separación, 36 horas hasta 48 horas de separación, 48 horas hasta 52 horas de separación, 52 horas hasta 60 horas de separación, 60 horas hasta 72 horas de separación, 72 horas hasta 84 horas de separación, 84 horas hasta 96 horas de separación, o 96 horas hasta 120 horas de separación de los conjugados anticuerpo de la invención. Las dos o más terapias pueden ser administradas dentro de una misma visita del paciente.

[00351] La invención proporciona protocolos para la administración de composición farmacéutica que comprende conjugados anticuerpo de la invención solo o en combinación con otras terapias a un sujeto que lo necesita. Las terapias de las terapias de combinación de

la presente invención pueden ser administradas de modo concomitante o secuencial a un sujeto. La terapia de las terapias de combinación de la presente invención también pueden ser administradas de forma cíclica. Terapia cíclica involucra la administración de una primera terapia durante un período de tiempo, seguido por la administración de una segunda terapia durante un período de tiempo y repitiendo esta administración secuencial, es decir, el ciclo, a fin de reducir el desarrollo de resistencia a una de las terapias (por ej., agentes) para evitar o reducir los efectos secundarios de una de las terapias (por ej., agentes), y/o para mejorar, la eficacia de las terapias.

[00352] Las terapias de las terapias de combinación de la invención pueden ser administradas a un sujeto de forma concurrente.

[00353] El término "concurrente" no está limitado a la administración de terapias a exactamente el mismo tiempo, sino más bien significa que una composición farmacéutica que comprende anticuerpos o sus fragmentos de la invención se administran a un sujeto en una secuencia y dentro un intervalo de tiempo tal que los anticuerpos o conjugados anticuerpos de la invención pueden actuar juntos con la otra terapia(s) para proporcionar un beneficio aumentado que si fueran administrados de otra forma. Por ejemplo, cada terapia puede ser administrada a un sujeto al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden en diferentes puntos en el tiempo; sin embargo, si no se administra al mismo tiempo, deben ser administrados lo suficientemente cerca en el tiempo de forma de proporcionar el efecto terapéutico deseado. Cada terapia puede ser administrada a un sujeto separadamente, en cualquier forma apropiada y mediante cualquier vía adecuada. En varias realizaciones, las terapias son administradas a un sujeto con menos de 5 minutos de separación, menos de 15 minutos de separación, menos de 30 minutos de separación, menos de 1 hora de separación, a aproximadamente 1 hora de separación, a aproximadamente 1 hora hasta aproximadamente 2 horas de separación, a aproximadamente 2 horas hasta aproximadamente 3 horas de separación, a aproximadamente 3 horas hasta aproximadamente 4 horas de separación, a aproximadamente 4 horas hasta aproximadamente 5 horas de separación, a aproximadamente 5 horas hasta

aproximadamente 6 horas de separación, a aproximadamente 6 horas hasta aproximadamente 7 horas de separación, a aproximadamente 7 horas hasta aproximadamente 8 horas de separación, a aproximadamente 8 horas hasta aproximadamente 9 horas de separación, a aproximadamente 9 horas hasta aproximadamente 10 horas de separación, a aproximadamente 10 horas hasta aproximadamente 11 horas de separación, a aproximadamente 11 horas hasta aproximadamente 12 horas de separación, 24 horas de separación, 48 horas de separación, 72 horas de separación, o 1 semana de separación. En otras realizaciones, dos o más terapias son administradas dentro de la misma visita del paciente.

[00354] Las terapias de combinación pueden ser administradas a un sujeto en la misma composiciones farmacéutica. Alternativamente, los agentes terapéuticos de las terapias de combinación pueden ser administrados de forma concurrente a un sujeto en composiciones farmacéuticas separadas. Los agentes terapéuticos pueden ser administrados a un sujeto por la misma o diferentes vías de administración.

[00355] Se entiende que los ejemplos y realizaciones que se describen en la presente son con fines ilustrativos solamente y que varias modificaciones o cambios en visa de la misma se sugerirán a las personas con experiencia en el arte y deben ser incluidas dentro del espíritu y ámbito de esta solicitud y alcance de las reivindicaciones anexas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Generación de ADC anti-cKIT

Preparación de anticuerpos anti-cKit y fragmentos de anticuerpo con o sin mutaciones cisteína de sitio específico

[00356] Anticuerpos anti-cKIT humanos y fragmentos de anticuerpo fueron generados como se describió previamente en WO2014150937 y WO2016020791.

[00357] Regiones variables que codifican ADN de las cadenas pesada y liviana de un anticuerpo anti-cKit se amplificaron a partir de un vector aislado en un cribado a base de expresión de fagos y se clonaron dentro de vectores de expresión mamíferos que contienen las regiones constantes de cadena pesada IgG1 humana y cadena liviana kappa humana p cadena liviana lambda. Vectores contienen un promotor CMV y un péptido señal

(MPLLLLLPLWAGALA (SEQ ID NO: 151) para cadena pesada y MSVLTQVLALLLWLTGTRC (SEQ ID NO: 152) para cadena liviana, y señal apropiada y secuencias de selección para amplificación de ADN en un huésped bacteriano, por ej. células *E. coli* DH5alpha, expresión transitoria en células mamíferas, por ej. células HEK293, o transfección estable dentro de células mamíferas, por ej. células CHO. Para introducir mutaciones Cys, PCR mutagénesis de sitio dirigido se llevó a cabo con oligos diseñados para sustituir residuos Cys únicos en ciertos sitios en las regiones constantes de las secuencias de codificación de la cadena pesada o cadena liviana. Los ejemplos de mutaciones sustitución Cys son E152C o S375C de cadena pesada; E165C o S114C de cadena liviana kappa; o A143C de la cadena liviana lambda (todas numeración EU). En algunos casos, dos o más mutaciones Cys se combinaron para realizar un anticuerpo con múltiples sustituciones Cys, por ejemplo HC–E152C–S375C, lambda LC–A143C–HC–E152C, kappa LC–E165C–HC–E152C, o kappa LC–S114C–HC–E152C (todas numeración EU). Para generar plásmidos que codifican fragmentos de anticuerpo, mutagénesis por PCR se llevó a cabo con oligos diseñados para eliminar o modificar una porción de la región constante de cadena pesada. Por ejemplo, una PCR se realizó para eliminar residuos 222–447 (numeración EU) de la región constante de cadena pesada tal que un codón de terminación se codificó directamente después de residuo 221 (número EU) a fin de realizar un constructo de expresión para un fragmento Fab. Por ejemplo, una PCR se llevó a cabo para eliminar residuos 233–447 (numeración EU) de la región constante de cadena pesada tal que un codón de terminación se codificó directamente después de residuo 232 (número EU) a fin de realizar un constructo de expresión para un fragmento Fab' que incluye los dos residuos Cys de la bisagra IgG1.

[00358] Anticuerpo anti–cKit, fragmentos de anticuerpo, y anticuerpos mutantes Cys o fragmentos de anticuerpo se expresaron en 293 células Freestyle™ mediante co–transfectando plásmidos de cadena pesada y cadena liviana usando métodos de transfección transitoria como se describió previamente (Meissner, *et al.*, *Biotechnol Bioeng.* 75:197–203 (2001)). Los anticuerpos expresados se purificaron a partir de los sobrenadantes de células a través de métodos de cromatografía por afinidad estándar usando una resina apropiada tal como resinas Proteína A, Proteína G, Capto–L o LambdaFabSelect. Alternativamente, anticuerpos anti–cKit, fragmentos de anticuerpo, y anticuerpos mutantes Cys o fragmentos de anticuerpos se expresaron en una CHO mediante co–transfección de un vector de cadena pesada y un vector de cadena liviana en células CHO. Las células se sometieron a selección, y células transfectadas establemente se cultivaron luego bajo condiciones optimizadas para

producción de anticuerpo. Anticuerpos fueron purificados a partir de los sobrenadantes de células como anteriormente.

Reducción, re-oxidación y conjugación de anticuerpos anti-cKit y fragmentos de anticuerpos en toxinas

[00359] Compuestos que constan de un resto reactivo, por ej. un grupo maleimida, para reacción en un grupo tiol (cadena lateral Cys) en el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un ligador como se describió, y un resto funcional, tal como una auristatina u otra toxina, se conjugaron en residuos Cys, nativos o diseñados dentro del anticuerpo usando métodos descriptos previamente (por ej., en WO2014124316, WO2015138615, Junutula JR, et al., Nature Biotechnology 26:925–932 (2008)).

[00360] Debido a que residuos Cys diseñados en anticuerpos expresados en células mamíferas son modificados por aductos (disulfuros) tal como glutatión (GSH) y/o cisteína durante biosíntesis (Chen *et al.* 2009), el Cys modificado como inicialmente se expresa no es reactivo a reactivos tiol tal como maleimido o grupos bromo– acetamida o yodo–acetamida. Para conjugar residuos Cys diseñados, aductos glutatión o cisteína necesitan ser removidos mediante disulfuros de reducción, que generalmente conllevan reducir todos los disulfuros en el anticuerpo expresado. Debido a que residuos Cys nativos en anticuerpos y fragmentos de anticuerpo generalmente forman enlaces disulfuro en otros residuos Cys en el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, estos también son no reactivos a reactivos tiol hasta que los disulfuros se reducen. La reducción de disulfuros puede llevarse a cabo exponiendo primero el anticuerpo a un agente de reducción tal como ditioneitol (DTT), cisteína, o Tris(2–carboxietil)fosfina clorhidrato (TCEP–HCl). Opcionalmente, el agente de reducción puede ser removido para permitir re-oxidación de todos los enlaces disulfuro nativos del anticuerpo o fragmento de anticuerpo para recuperar y/o estabilizar la estructura de anticuerpo funcional.

[00361] En casos en donde un anticuerpo o fragmento de anticuerpo se conjugó solamente en residuos Cys diseñados, a fin de reducir enlaces disulfuro nativos y enlaces disulfuro entre los aductos cisteína o GSH de residuo(s) Cys diseñados, DTT recientemente preparado se agregó a anticuerpos mutantes Cys purificados, a una concentración final de 10 mM o 20 mM. Después de incubación de anticuerpo con DTT a 37°C durante 1 hora, mezclas se dializaron contra PBS durante tres días con intercambio de tampón diariamente para remover DTT y re-oxidar enlaces disulfuro nativos. El proceso de re-oxidación fue supervisado mediante HPLC de fase inversa, que es capaz de separar tetrámero de

anticuerpo de moléculas individuales de cadena pesada y liviana. Las reacciones se analizaron sobre una columna PRLP–S 4000A (50 mm x 2,1 mm, Agilent) calentada a 80°C y elución de columna se realizó mediante un gradiente lineal de 30–60% acetonitrilo en agua que contiene 0,1% TFA a un índice de flujo de 1,5 ml/min. La elución de proteínas de la columna se supervisó a 280 nm. Se permitió que continúe diálisis hasta reoxidación estaba completa. Reoxidación recupera disulfuros intra–cadena e intercadena, mientras diálisis permite cisteínas y glutationes conectados al residuo(s) Cys recientemente introducido que dialicen. Después de re–oxidación, compuestos que contienen maleimida se agregaron a anticuerpos re–oxidados o fragmentos de anticuerpos en tampón PBS (pH 7,2) en relaciones de normalmente 1,5:1, 2:1, o 5:1 a Cys diseñado, y se llevaron a cabo incubaciones durante 1 hora. Normalmente, exceso de compuesto libre se removió mediante purificación sobre Proteína A u otra resina apropiada mediante métodos estándares seguido por intercambio de tampón en PBS.

[00362] Alternativamente, anticuerpos o fragmentos de anticuerpo con sitios Cys diseñados se redujeron y re–oxidados usando un método sobre resina. Proteína A Sefarosa perlas (1 ml por 10 mg anticuerpo) se equilibraron en PBS (sin sales de calcio o magnesio) y luego se agregaron a una muestra de anticuerpo en modo de lote. Una solución patrón de 0,5 M cisteína se preparó disolviendo 850 mg de cisteína HCl en 10 ml de una solución preparada agregando 3,4 g de NaOH a 250 ml de 0,5 M fosfato de sodio pH 8,0 y luego 20 mM cisteína se agregó a la suspensión anticuerpo/perla, y se mezcló suavemente a temperatura ambiente durante 30–60 minutos. Las perlas se cargaron en una columna de gravedad y se lavaron con 50 volúmenes de lecho de PBS en menos de 30 minutos. Luego se puso una tapa a la columna con perlas resuspendidas en un volumen de lecho de PBS. Par modular el índice de re–oxidación, 50 nM a 1 μ M cloruro de cobre se agregó opcionalmente. El progreso de re–oxidación se supervisó removiendo una pequeña muestra de prueba de la resina, eluyendo en tampón de Elución IgG (Thermo), y analizando mediante RP–HPLC como se describió anteriormente. Una vez que la re–oxidación progresó al grado de finalización deseado, conjugación podría ser iniciada inmediatamente mediante agregado de 2–3 exceso molar de compuesto sobre cisteínas diseñadas, y permitiendo que la mezcla reaccione durante 5–10 minutos a temperatura ambiente antes que se lave la columna con al menos 20 volúmenes de columna de PBS. Conjugados de anticuerpo se eluyeron con tampón de elución IgG y se neutralizó con 0,1 volúmenes 0,5 M fosfato de sodio pH 8,0 y tampón intercambiado a PBS. En algunos casos, en lugar de iniciar conjugación con anticuerpo sobre

la resina, la columna se lavó con al menos 20 volúmenes columna de PBS, y anticuerpo se eluyó con tampón elución IgG y se neutralizó con tampón pH 8,0. Los anticuerpos se usaron luego tanto para reacciones de conjugación como liofilización para futuro uso.

[00363] En algunos casos, se desea conjugar a residuos Cys nativos, tal como aquellos que generalmente forman enlace disulfuro de cadena pesada a cadena liviana intercadena y los residuos Cys en la región bisagra del anticuerpo que generalmente forman enlaces disulfuro de cadena pesada a cadena pesada intercadena, en la ausencia de residuos Cys diseñados o al mismo tiempo que conjugación se dirigió también a residuos Cys diseñados. En estos casos, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se redujo agregando 5-veces exceso de TCEP a enlaces disulfuro y se incubó la muestra a 37°C durante 1 hora. Las muestras luego se conjugaron inmediatamente o congelaron a $< -60^{\circ}\text{C}$ para conjugación futura. Compuestos que contienen maleimida se agregaron a anticuerpos o fragmentos de anticuerpo en tampón PBS (pH 7,2) en relaciones de generalmente 2:1 a residuos Cys usados para conjugación, e incubaciones se llevaron a cabo durante 1 hora. Normalmente, exceso compuesto libre se extrajo desalinizando columna seguido por intercambio de tampón más extenso a PBS.

[00364] Conjugación a residuos lisina se puede preparar haciendo reaccionar anticuerpos o fragmentos de anticuerpo con un ligador-compuesto droga que comprende un grupo reactivo amina, tal como un NHS éster o un tetrafluorofenil éster, (por ej., compuesto (7), SMCC-DM1, Sulfo-SPDB-DM4 o SPDB-DM4). A modo de ejemplo, Compuesto (7) se conjugó con residuos lisina en anti-HER2 Fab-HC-E152C. Específicamente, anti-HER2 Fab-HC-E152C se expresó mediante transfección transitoria en células HEK293. Fab se capturó a partir del medio por capto-L (GE Healthcare) purificación de afinidad, se eluyó con Tampón de Elución IgG (Pierce) y el tampón se intercambió a PBS por ultraconcentrador (Amicon). A la solución Fab (5,8 mg/ml) se agregó un exceso molar de 2 veces de Compuesto (7). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego la mezcla se desactivó con 50 mM Tris pH 8. El conjugado resultante luego se purificó por SEC preparativa en PBS.

Generación de fragmentos de anticuerpo de anticuerpos de longitud completa

[00365] En algunos casos, se generaron fragmentos de anticuerpo mediante manipulación genética de la secuencia de codificación de cadena pesada del anticuerpo,

como se describió con anterioridad, tal que el producto de expresión fue un fragmento de un anticuerpo. En otros casos, se generaron anticuerpos mediante digestión enzimática de anticuerpos de longitud completa.

[00366] Para generar fragmentos Fab que comprenden residuos 1–222 (numeración EU) de un anticuerpo de partida, el anticuerpo completo se trató con resina papaína inmovilizada (ThermoFisher Scientific) de acuerdo con el protocolo del fabricante. En resumen, la resina papaína inmovilizada se prepara equilibrando en un tampón de digestión de 20 mM cisteína–HCl recientemente disuelta ajustada a pH 7,0. El anticuerpo se ajusta a aproximadamente 10 mg/ml y se intercambia tampón en el tampón de digestión y se agrega a resina a un índice de 4 mg IgG por ml resina y se incubó a 37°C durante 5–7 horas. La resina luego se extrae, y el fragmento de anticuerpo es purificado ya sea por una resina de afinidad apropiada, por ejemplo la IgG intacta y fragmento Fc se separa del fragmento Fab uniendo a resina Proteína A, o la separación se lleva a cabo por cromatografía por exclusión de tamaño.

[00367] Para generar fragmentos F(ab')₂ que comprenden residuos 1–236 (numeración EU) del anticuerpo de partida, el anticuerpo completo se trató con una enzima proteolítica. En resumen, el anticuerpo se prepara en PBS a aproximadamente 10 mg/ml. La enzima se agrega a una relación 1:100 peso/peso y se incubó durante 2 horas a 37°C. El fragmento de anticuerpo es purificado ya sea por una resina de afinidad apropiada, por ejemplo la IgG intacta y fragmento Fc se separan del fragmento Fab' uniendo a resina Proteína A, la separación se lleva a cabo por cromatografía por exclusión de tamaño.

Propiedades de conjugados anticuerpo anti–cKit–toxina y fragmento de anticuerpo

[00368] Conjugados anticuerpo y fragmento de anticuerpo se analizaron para determinar alcance de conjugación. Una relación compuesto a anticuerpo se extrapola a partir de datos LC–MS para muestras reducidas y desglicosiladas (cuando resulte apropiado). LC/MS permite cuantificación del número promedio de moléculas de ligador –carga efectiva (compuesto) adherida a un anticuerpo en una muestra de conjugado. Cromatografía líquida de presión alta (HPLC) separa anticuerpo en cadenas liviana y pesada, y bajo condiciones de reducción, separa cadena pesada (HC) y cadena liviana (LC) de acuerdo al número de grupos ligador–carga efectiva por cadena. Los datos espectrales de masa posibilitan identificación de las especies de componente en la mezcla, por ej., LC, LC+1, LC+2, HC, HC+1, HC+2, etc. A partir de la carga promedio en las cadenas LC y HC, el compuesto promedio a relación

anticuerpo puede ser calculado para un conjugado anticuerpo. Una relación compuesto a anticuerpo para una muestra conjugado determinada representa el número promedio de moléculas de compuesto (ligador–carga efectiva) adheridas a un anticuerpo tetramérico que contiene dos cadenas livianas y dos cadenas pesadas.

[00369] Los conjugados fueron perfilados usando cromatografía por exclusión de tamaño analítica (AnSEC) en Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) y/o Proteína KW–803 5 µm 300 x 8 mm columnas (Shodex); agregación se analizó en base a cromatografía por exclusión de tamaño analítica.

Preparación de conjugados anti–cKIT Fab–toxina ejemplares

[00370] Para generar conjugados anti–cKIT Fab’–toxina DAR4 o conjugado control anti–Her2 Fab–toxina DAR4, 50 mg full IgG (WT, sin cisteínas introducidas) se digirió con una enzima proteolítica. El fragmento F(ab’)₂ se purificó mediante SEC en una columna Superdex–S200 (GE Healthcare). Alternativamente, para generar conjugados control anti–HER2 o conjugado anti–cKit Fab’–toxina DAR4, un vector que codifica el Fab’ HC se co–transfectó con un vector que codifica el Fab’ LC en CHO. El Fab’ expresado se purificó por captura en resina Proteína G. El F(ab’)₂ o Fab’ se redujo por adición de TCEP (5x exceso a disulfuros intercadena) e inmediatamente reaccionó con un compuesto de la invención (2,5x exceso a residuos Cys libres). Reacción se supervisó mediante RP–HPLC, y se agregaron 1x equivalentes adicionales de compuesto hasta que la reacción estaba completa. Compuesto libre se removió por columna de desalinización PD10 (GE Healthcare). DAR se determinaron experimentalmente que son ≥3,9. Conjugados específicos estudiados adicionalmente en los ejemplos proporcionados se enumeran en Tabla 2.

[00371] Para generar conjugados anti–cKIT Fab–toxina DAR2, un vector que codifica el Fab HC con un residuo Cys introducido (HC 1–221 con E152C por numeración EU) se co–transfectó con un vector que codifica el Fab LC con un residuo Cys introducido (kappa LC K107C, kappa LC S114C, o kappa LC E165C por numeración EU) en HEK293. Para generar conjugados control anti–Her2 Fab–toxina DAR2, un vector que codifica el Fab HC con un residuo Cys introducido (HC 1–222 con E152C por numeración EU, y una etiqueta His₆ C–terminal (SEQ ID NO: 162)) se co–transfectó con un vector que codifica el Fab LC con un residuo Cys introducido (kappa LC K107C, kappa LC S114C, o kappa LC E165C por numeración EU) en HEK293. Los Fabs expresados se purificaron por captura en resina Capto–L (GE Healthcare) y elución con Tampón de Elución IgG estándar (Thermo). Se

intercambió tampón a los Fabs a PBS usando ultra dispositivos Amicon. Los Fabs se redujeron con DTT y dejaron reoxidar a temperatura ambiente. Después de reformación del enlace disulfuro intercadena, los Fabs se conjugaron en Compuesto 6 (3x exceso a residuos Cys libres). Se dejó que la reacción proceda durante 30 min a temperatura ambiente y se supervisó por RP-HPLC con detección a 310 nm. Los Fabs conjugados se purificaron sobre proteína A (anti-her2) o resinas capto-L (anti-cKit) y se lavaron con PBS + 1 % Triton X-100 y lavaron con PBS extenso antes de elución en Tampón de Elución IgG. Luego se les intercambió tampón a los Fabs a PBS usando ultra dispositivos Amicon. Conjugados específicos estudiados adicionalmente en los ejemplos proporcionados se enumeran en Tabla 2 debajo con valores DAR determinados experimentalmente.

[00372] Para generar conjugados anti-cKIT F(ab')₂-toxina DAR2, un vector que codifica el HC con residuos Cys introducidos (E152C y S375C por numeración EU) se co-transfectó con un vector que codifica el Fab LC en CHO. Para generar conjugados control anti-Her2 F(ab')₂-toxina DAR2, un vector que codifica el HC con residuos Cys introducidos (E152C y S375C por numeración EU) se co-transfectó con un vector que codifica el Fab LC en HEK293. Los IgGs expresados se purificaron por captura en proteína A o resina mabselectsure (GE Healthcare) y elución con Tampón de Elución IgG estándar (Thermo). IgGs completas se redujeron con DTT a temperatura ambiente y reoxidaron seguido de la extracción de DTT según se supervisó por RP-HPLC. Las IgGs reoxidadas luego se digirieron con una enzima proteolítica para generar fragmentos F(ab')₂. Para fragmentos anti-cKIT, se les cambió tampón a F(ab')₂'s a PBS usando ultra dispositivos Amicon. Para fragmento anti-HER2, fracción F(ab')₂ se enriqueció por HIC preparativa y luego se intercambió tampón a PBS usando ultra dispositivos Amicon. Los F(ab')₂'s se conjugaron en Compuesto 4 o Compuesto 5 (4x exceso a residuos Cys libres). Se permitió que proceda la reacción durante 30 min a temperatura ambiente y se supervisó por RP-HPLC con detección a 310 nm. F(ab')₂'s conjugados se purificaron sobre resinas capto-L (anti-cKit Ab3) y se lavaron con PBS + 1 % Triton X-100 y lavaron con PBS extenso antes de elución en Tampón de Elución IgG o por SEC preparativa (anti-her2 y anti-cKIT Ab4). F(ab')₂'s luego se concentraron y se les intercambió tampón a PBS usando ultra dispositivos Amicon. Conjugados específicos estudiados adicionalmente en los ejemplos proporcionado en se enumeran en Tabla 2 debajo con valores DAR determinados experimentalmente.

[00373] Para generar conjugados anti-cKIT Fab-toxina DAR1, un vector que codifica el HC con residuos Cys introducidos (E152C por numeración EU) se co-transfectó con un

vector que codifica el Fab LC en HEK293. La IgG expresada se purificó por captura en resina proteína A (GE Healthcare) y se eluyó con Tampón de Elución IgG estándar (Thermo). IgGs completas se redujeron con DTT a temperatura ambiente y reoxidaron seguido de eliminación de DTT según se supervisó mediante RP-HPLC. IgG se digirió con papaína inmovilizada (Thermo) para generar fragmento Fab. Se les cambió el tampón de Fabs a PBS usando dispositivos Amicon ultra. Fabs fueron conjugados con Compuestos 4 (exceso 4x de residuos Cys libres). Reacción se permitió que proceda durante 30 min a temperatura ambiente y se supervisó mediante RP-HPLC con detección a 310 nm. Fab conjugado se purificó por SEC preparativa en PBS.

[00374] Para generar conjugados anti-Her2 Fab-toxina DAR1 control, un vector que codifica el Fab HC con residuos Cys introducidos (E152C por numeración EU) se co-transfectó con un vector que codifica el Fab LC en HEK293. Los Fabs expresados se purificaron por captura en resina Capto-L (GE Healthcare) y se eluyó con Tampón de Elución IgG estándar (Thermo). Se les cambió el tampón de Fabs a PBS usando dispositivo Amicon ultra. El Fab se conjugó con Compuesto 7 (2x exceso molar de Fab). Reacción se permitió que proceda durante 30 min a temperatura ambiente y se supervisó mediante RP-HPLC con detección a 310 nm. Conjugación se desactivó con 50 mM Tris pH 8,0. Fab conjugado se purificó por SEC preparativa en PBS.

[00375] **Tabla 2.** Conjugados anti-cKIT o control ejemplares

Conjug. No.	Fragmento anticuerpo	Método Conjugación	Secuencia HC fragmento anticuerpo	Secuencia LC fragmento anticuerpo	Carga Efectiva	DAR
J1	Anti-cKIT Fab'1	Conjugación Cisteína Nativa *	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 25	Compuesto (1)	4
J2	Anti-cKIT Fab'2	Conjugación Cisteína Nativa	SEQ ID NO: 40	SEQ ID NO: 49	Compuesto (1)	4
J3	Anti-cKIT Fab'3	Conjugación Cisteína Nativa	SEQ ID NO: 58	SEQ ID NO: 25	Compuesto (1)	4
J4	Anti-cKIT Fab'4	Conjugación Cisteína Nativa	SEQ ID NO: 73	SEQ ID NO: 84	Compuesto (1)	4
J5	Anti-cKIT Fab'5	Conjugación Cisteína Nativa	SEQ ID NO: 99	SEQ ID NO: 110	Compuesto (1)	4

J6	Anti–Her2 Fab'	Conjugación Cisteína Nativa	EVQLVESG GGLVQPG GSLRLSCA ASGFNIKDT YIHWVRQA PGKGLEWV ARIYPTNG YTRYADSV KGRFTISAD TSKNTAYL QMNSLRAE DTAVYYCS RWGGDGF YAMDYWG QGTLLTVS SASTKGPS VFPLAPSS KSTSGGTA ALGCLVKD YFPEPVT SWNSGALT SGVHTFPA VLQSSGLY SLSSVTV PSSSLGTQ TYICNVNH KPSNTKVD KKVEPKSC DKTHTCPP CPAPPELLG (SEQ ID NO: 146)	DIQMTQS PSSLSASV GDRVITC RASQDVN TAVAWYQ QKPGKAP KLLIYSAS FLYSGVPS RFSGSRS GTDFTLTI SSLQPED FATYYCQ QHYTTPP TFGQGTK VEIKRTVA APSVFIFP PSDEQLK SGTASVV CLLNNFYP REAKVQW KVDNALQ SGNSQES VTEQDSK DSTYSLSS TLTSLKAD YEKHKVY ACEVTHQ GLSSPVTK SFNRGEC (SEQ ID NO: 147)	Compuesto (1)	4
J7	Anti–cKIT Fab3	Cisteínas diseñadas en HC–E152C y LC–E165C (EU)	SEQ ID NO: 130	SEQ ID NO: 134	Compuesto (6)	1,7
J8	Anti–Her2 Fab	Cisteínas diseñadas en HC–E152C y LC–K107C (EU)	EVQLVESG GGLVQPG GSLRLSCA ASGFNIKDT YIHWVRQA PGKGLEWV ARIYPTNG YTRYADSV KGRFTISAD TSKNTAYL QMNSLRAE DTAVYYCS RWGGDGF YAMDYWG QGTLLTVS SASTKGPS VFPLAPSS	DIQMTQS PSSLSASV GDRVITC RASQDVN TAVAWYQ QKPGKAP KLLIYSAS FLYSGVPS RFSGSRS GTDFTLTI SSLQPED FATYYCQ QHYTTPP TFGQGTK VEICRTVA APSVFIFP PSDEQLK	Compuesto (6)	1,8

			KSTSGGTA ALGCLVKD YFPCPVT SWNSGALT SGVHTFPA VLQSSGLY SLSSVTV PSSSLGTQ TYICNVNH KPSNTKVD KKVEPKSC DKHHHHHH (SEQ ID NO: 148)	SGTASVV CLLNNFYP REAKVQW KVDNALQ SGNSQES VTEQDSK DSTYSLSS TLTSLKAD YEKHKVY ACEVTHQ GLSSPVTK SFNRGEC (SEQ ID NO: 149)		
J9	Anti-cKIT F(ab'4) ₂	Cisteínas diseñadas en HC-E152C (EU)	QVQLQQS GPGLVKPS QTLSTCAI SGDSVSTN SAAWNWIR QSPSRGLE WLGRIYYR SQWLNDYA VSVKSRITI NPDTSKNQ FSLQLNSV TPEDTAVY YCARQLTY PYTVYHKA LDVWGQG TLVTVSSas tkgpsvfplaps skstsggtaalg clvkdyfpCpvt vswngaltsg vhtfpavlqssg lyslssvvtvps sslgqtqyicvn hkpsntkvdkr vepkscdktht cppcpapellg (SEQ ID NO: 153)	SEQ ID NO: 84	Compuesto (4)	1,9
J10	Anti-cKIT F(ab'3) ₂	Cisteínas diseñadas en HC-E152C (EU)	QVQLVQSG AEVKKPGS SVKVSCKA SGGTFSSY AISWVRQA PGQGLEW MGTIGPFE GQPRYAQK FQGRVTITA DESTSTAY MELSSLRS EDTAVYYC	SEQ ID NO: 25	Compuesto (5)	2

			ARGGYISD FDVWGQG TLVTVSSas tkgpsvfplaps skstsggtaalg clvkdyfpCpvt vswngaltsg vhtfpavlqssg lyslssvvtvps sslgtqtyicnv hkpsntkvdkr vepkscdktht cppcpapellg (SEQ ID NO: 154)			
J11	Anti-cKIT Fab3	Cisteínas diseñadas en HC-E152C (EU)	QVQLVQSG AEVKKPGS SVKVSCKA SGGTFSSY AISWVRQA PGQGLEW MGTIGPFE GQPRYAQK FQGRVTITA DESTSTAY MELSSLRS EDTAVYYC ARGGYISD FDVWGQG TLVTVSSA STKGPSVF PLAPSSKS TSGGTAAL GCLVKDYF PcPVTVSW NSGALTSG VHTFPAVL QSSGLYSL SSVVTVPS SSLGTQTYI CNVNHKPS NTKVDKKV EPKSCDKT H (SEQ ID NO: 155)	SEQ ID NO: 25	Compuesto (4)	0,9
J12	Anti-Her2 F(ab') ₂	Cisteínas diseñadas en HC-E152C (EU)	EVQLVESG GGLVQPG GSLRLSCA ASGFNIKDT YIHWVRQA PGKGLEWV ARIYPTNG YTRYADSV	SEQ ID NO: 147	Compuesto (4)	1,7

			KGRFTISAD TSKNTAYL QMNSLRAE DTAVYYCS RWGGDGF YAMDYWG QGTLVTVS SASTKGPS VFPLAPSS KSTSGGTA ALGCLVKD YFPCPVTV SWNSGALT SGVHTFPA VLQSSGLY SLSSVVTV PSSSLGTQ TYICNVNH KPSNTKVD KKVEPKSC DKTHTCPP CPAPELLG (SEQ ID NO: 156)			
J13	Anti-Her2 Fab	Cisteínas diseñadas en HC-E152C (EU)	EVQLVESG GGLVQPG GSLRLSCA ASGFNIKDT YIHWVRQA PGKGLEWV ARIYPTNG YTRYADSV KGRFTISAD TSKNTAYL QMNSLRAE DTAVYYCS RWGGDGF YAMDYWG QGTLVTVS SASTKGPS VFPLAPSS KSTSGGTA ALGCLVKD YFPCPVTV SWNSGALT SGVHTFPA VLQSSGLY SLSSVVTV PSSSLGTQ TYICNVNH KPSNTKVD KKVEPKSC DK	SEQ ID NO: 147	Compuesto (7)	0,9

			(SEQ ID NO: 157)			
J14	Anti-cKIT Fab'1	Conjugación Cisteína Nativa	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 25	mc-MMAF	4
J15	Anti-cKIT Fab'1	Conjugación Cisteína Nativa	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 25	Compuesto (5)	4
J16	Anti-cKIT Fab'1	Conjugación Cisteína Nativa	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 25	Compuesto (2)	4
J17	Anti-cKIT Fab'2	Conjugación Cisteína Nativa	SEQ ID NO: 40	SEQ ID NO: 49	mc-MMAF	4
J18	Anti-cKIT Fab'2	Conjugación Cisteína Nativa	SEQ ID NO: 40	SEQ ID NO: 49	Compuesto (5)	4
J19	Anti-cKIT Fab'2	Conjugación Cisteína Nativa	SEQ ID NO: 40	SEQ ID NO: 49	Compuesto (2)	4
J20	Anti-cKIT Fab'3	Conjugación Cisteína Nativa	SEQ ID NO: 132	SEQ ID NO: 25	mc-MMAF	4
J21	Anti-cKIT Fab'3	Conjugación Cisteína Nativa	SEQ ID NO: 58	SEQ ID NO: 25	Compuesto (5)	4
J22	Anti-cKIT Fab'3	Conjugación Cisteína Nativa	SEQ ID NO: 132	SEQ ID NO: 25	Compuesto (2)	4
	Anti-cKIT Fab4	HC-E152C (EU)	QVQLQQS GPGLVKPS QTLSTCAI SGDSVSTN SAAWNWIR QSPSRGLE WLGRIYYR SQWLNDYA VSVKSRITI NPDTSKNQ FSLQLNSV TPEDTAVY YCARQLTY PYTVYHKA LDVWGQG TLVTVSSas tkgpsvfplaps skstsggtaalg clvkdyfpCpvt vwnsgaltsg vhftpavlqssg lyslssvvtvps ssltgtqtyicnvn hkpsntkvdkr vepkscdk	SEQ ID NO: 84	ninguno	

			(SEQ ID NO: 158)			
	Anti-cKIT Fab1	HC-E152C (EU)	QVQLVQS GAEVKKP GSSVKVS CKASGGT FSSYAISW VRQAPGQ GLEWMG VIFPAEGA PGYAQKF QGRVTITA DESTSTA YMESSL RSEDNAV YYCARGG YISDFDV WGQGTLV TVSSastkg psvfplapss kstsggtaalg clvkdyfpCp vtvswngalt sgvhtfpavlg ssglyslssv tpssslgtqt yicnvnhkps ntkvdkrvep kscdk (SEQ ID NO: 159)	SEQ ID NO: 25	ninguno	
	Anti-cKIT Fab2	HC-E152C (EU)	QVQLVQS GAEVKKP GSSVKVS CKASGGT FSSHALS WVRQAP GQGLEW MGGIIPSF GTADYAQ KFQGRVTI TADESTS TAYMELS SLRSEDV AVYYCAR GLYDFDY WGQGTLV TVSSastkg psvfplapss kstsggtaalg clvkdyfpCp	SEQ ID NO: 49	ninguno	

			vtvswmsgalt sgvhtfpavliq ssglyslssvv tvpssslgtqt yicnvnhkps ntkvdkrvep kscdk (SEQ ID NO: 160)			
	Anti-cKIT Fab3	HC-E152C (EU)	QVQLVQS GAEVKKP GSSVKVS CKASGGT FSSYAISW VRQAPGQ GLEWMGT IGPFEGQ PRYAQKF QGRVTITA DESTSTA YMELSSL RSEDNAV YYCARGG YISDFDV WGQGTLV TVSSAST KGPSVFP LAPSSKST SGGTAAL GCLVKDY FPCPVTV SWNSGAL TSGVHTF PAVLQSS GLYSLSS VVTVPSS SLGTQTYI CNVNHKP SNTKVDK KVEPKSC DK (SEQ ID NO: 161)	SEQ ID NO: 25	ninguno	
	Anti-Her2 Fab	HC-E152C (EU)	SEQ ID NO: 157	SEQ ID NO: 147	ninguno	
	Anti-cKIT Fab'5	Conjugación Cisteína Nativa	SEQ ID NO: 143	SEQ ID NO: 110	Compuesto (1)	3,9
	Anti-cKIT Fab'5	Conjugación Cisteína Nativa	SEQ ID NO: 143	SEQ ID NO: 110	Compuesto (1)	3,7

	Anti-cKIT Fab'5	Conjugación Cisteína Nativa	SEQ ID NO: 143	SEQ ID NO: 110	mc-MMAF	4
JW	Anti-cKIT Fab'2	Conjugación Cisteína Nativa	SEQ ID NO: 126	SEQ ID NO: 49	Compuesto (1)	3,9
JX	Anti-cKIT Fab'2	Conjugación Cisteína Nativa	SEQ ID NO: 126	SEQ ID NO: 49	mc-MMAF	3,9
JY	Anti-cKIT Fab'3	Conjugación Cisteína Nativa	SEQ ID NO: 132	SEQ ID NO: 25	Compuesto (1)	3,9
JZ	Anti-cKIT Fab'3	Conjugación Cisteína Nativa	SEQ ID NO: 132	SEQ ID NO: 25	mc-MMAF	3,9

* conjugación Cys nativa significa que la droga está adherida al fragmento de anticuerpo en uno o más de los residuos cisteína nativos seleccionados entre LC-214C y HC-220C-226C-229C (todas las posiciones por numeración EU).

Ejemplo 2: Generación de proteínas de dominio extracelular cKIT humano, cyno, de ratón y rata cKIT, y de subdominios cKIT 1-3, y 4-5 para ensayos de unión

[00376] Dominios extracelulares humanos, de ratón y rata cKIT (ECD) se sintetizaron los genes en base a secuencias de aminoácidos de las bases de datos GenBank o Uniprot (ver Tabla 3 debajo). Cynomolgus cKIT y plantilla 1 ECD cADN se sintetizaron los genes en base a formación de secuencias de aminoácidos generada usando mRNA de varios tejidos cyno (por ej. Zyagen Laboratories; Tabla 4 debajo). Todos los fragmentos ADN sintetizados se clonaron en vectores de expresión apropiados *por ej.* vector de base hEF1-HTLV (pFUSE-mIgG2A-Fc2) con etiquetas C-terminal para permitir purificación.

Tabla 3 Secuencias de constructos cKIT humanos, de ratón, rata

Nombre	Descripción	Número de Acceso	SEQ ID NO:
cKIT Humano D1-5 (dominio extracelular)	cKIT Humano tr. variante 2 , residuos 26-520-ETIQUETA QPSVSPGEPSPPSIHPGKSDLIVRVGDEI RLLCTDPGFVKWTFEILDETNNENKQNEW ITEKAEATNTGKYTCTNKHGLSNSIYVFV RDPKFLVDRSLYGKEDNDTLVRCPLT DPEVTNYSKGCQGKPLPKDLRFIPDPK AGIMIKSVKRAYHRLCLHCSVDQEGKSV LSEKFIKVRPAFKAVPVVSVSKASYLLR EGEFTVTCTIKDVSSSVYSTWKRENSQ	NM_001093772	112

	TKLQEKYNSWHHGDFNYERQATLTISSA RVNDSGVFMCIYANNTFGSANVTTTLEVV DKGFINIFPMINTTVFVNDGENVDLIVEYE AFPKPEHQQWIYMNRTFTDKWEDYPKS ENESNIRYVSELHLTRLKGTEGGTYTFLV SNSDVNAAIAFNYYVNTKPEILTYDRLVN GMLQCVAAGFPEPTIDWYFCPGTEQRC SASVLPVDVQTLNSSGPPFGKLVVQSSI DSSAFKHNGTVECKAYNDVGKTSAYFNF AFKEQIHPHTLFTPRSHHHHHH		
cKIT Humano D1-3	cKIT Humano tr. Variante 1, residuos 26- 311- ETIQUETA QPSVSPGEPSPPSIHPGKSDLIVRVGDEI RLLCTDPGFVKWTFEILDETENKQNEW ITEKAEATNTGKYTCTNKHGLSNSIYVFV RDPAKL FLVDRSLYGKEDNDTLVRCPLT DPEVTNYSKGCQGKPLPKDLRFIPDPK AGIMIKSVKRAYHRLCLHCSVD QEGKSV LSEK FILKVRPAFAKAVPVSVSKASYLLR EGEFTVTCTIKDVSSSVYSTWKRENSQ TKLQEKYNSWHHGDFNYERQATLTISSA RVNDSGVFMCIYANNTFGSANVTTTLEVV DKGRSHHHHHH	NM_000222	113
cKIT Humano D4-5	cKIT Humano tr. variante 1, residuos 311- 524- ETIQUETA GFINIFPMINTTVFVNDGENVDLIVEYEAF PKPEHQQWIYMNRTFTDKWEDYPKSEN ESNIRYVSELHLTRLKGTEGGTYTFLVSN SDVNAAIAFNYYVNTKPEILTYDRLVNGM LQCVAAGFPEPTIDWYFCPGTEQRCAS VLPVDVQTLNSSGPPFGKLVVQSSIDSS AFKHNGTVECKAYNDVGKTSAYFNFAFK GNNKEQIHPHTLFTPRSHHHHHH	NM_000222	114
cKIT de ratón D1-5	cKIT de ratón tr. variante 1, residuos 26- 527- ETIQUETA SQPSASPGEPSPPSIHPAQSELIVEAGDT LSLTCIDPDFVRWTFKTYFNEMVENKKN EWIQEKAETRGTGTYTCSNSNGLTSSIYV FVRDPAKLFLVGLPLFGKEDSDALVRCPL TDPQVSNSYLIECDGKSLPTDLTFVPNPK AGITIKNVKRAYHRLCVRCAAQRDGTWL HSDKFTLVRAAIAIPVVSVPETSHLLKK GDTFTVVCTIKDVSTSVNSMWLKMNPQP QHIAQVKHNSWHRGDFNYERQETLTISS ARVDDSGVFMCIYANNTFGSANVTTTLKV VEKGFINISPVKNNTTVFVTDGENVDLVE YEAYPKPEHQQWIYMNRTSANKGKDYV KSDNKSNIYVYNQLRLTRLKGTEGGTYT FLVSNSDASASVTFNYYVNTKPEILTYDR	NM_001122733	115

	LINGMLQCVAEGFPEPTIDWYFCTGAEQ RCTTPVSPVDVQVQNVSVSPFGKLVVQS SIDSSVFRHNGTVECKASNDVGKSSAFF NFAFKEQIQAHFTLFTPLEVLFQGPRSPRG PTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIK DVLMLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISW FVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVSA LPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIE RTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKK QVTLTTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTEL NYKNTEPVLDSGYSYFMYSKLRVEKKN WVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSR TPGK		
cKIT de rata D1-5	cKIT de rata, residuos 25-526- ETIQUETA SQPSASPGEPSPPSIQPAQSELIVEAGDT IRLTCTDPAFVKWTFEILDVRIENKQSEWI REKAEATHTGKYTCVSGSGLRSSIYVFV RDPAVLFLVGLPLFGKEDNDALVRCPLT DPQVSNYSLIECDGKSLPTDLKFVPNPKA GITIKNVKRAYHRLCIRCAAQREGKWMMR SDKFTLVRAAIKAIPVVSVPETSHLLKEG DTFTVICTIKDVSTSVDSMWIKLNPQPQS KAQVKRNSWHQGDFNYERQETLTISSA RVNDSGVFMCYANNTFGSANVTTLKVV EKGFINIFPVKNNTTVFVTDGENVDLVVEF EAYPKPEHQQWIYMNRTPTNRGEDYVK SDNQSNIRYVNELRLTRLKGTEGGTYTFL VSNSDVSAVTFDVYVNTKPEILTYDRLM NGRLQCVAAGFPEPTIDWYFCTGAEQR CTVPVPPVDVQIQNASVSPFGKLVVQSSI DSSVFRHNGTVECKASNAVGKSSAFFNF AFKGSKEQIQPHTLFTPRSLEVLFGQP GSPPLKECPPCAAPDLLGGPSVFIFPPKI KDVLMLSPMVTCTVVVDVSEDDPDVQIS WVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVV SALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNRALPS PIEKTISKPRGPVRAPQVYVLPPPAEEMT KKEFSLTCMITGFLPAEIAVDWTSNGRTE QNYKNTATVLDSGYSYFMYSKLRVQKST WERGSLFACSVVHEGLHNHLTTKTISRS LGK	NM_022264	116

Tabla 4 Secuencias de proteína cKIT cynomolgus

Constructo	Secuencia aminoácidos en un código de letra, péptido señal subrayado cKIT mono Cynomolgus, residuos 25–520–ETIQUETA	SEQ ID NO
Mono Cynomolgus cKIT D1–5	MYRMQLLSICIALSLALVTNSQPSVSPGEPSPPSIHPAKSELI VRVGNEIRLLCIDPGFVKWTFEILDETNNENKQNEWITEKAEA TNTGKYTCTNKHGLSSSIYVFVRDPAKLFLVDRSLYGKEDN DTLVRCPLTDPEVTSYSLKGCQGKPLPKDLRFVPDPKAGITI KSVKRAYHRLCLHCSADQEGKSVLSDKFILKVRPAFKAVPV VSVSKASYLLREGEEFTVTCTIKDVSSSVYSTWKRENSQTK LQEKYNSWHHGDFNYERQATLTISSARVNDSGVFMCYANN TFGSANVTTLLEVVDKGFNIFPMINTTVFVNDGENVDLIVEY EAFPKPEHQQWIYMNRTFTDKWEDYPKSENESENIRYVSEL HLTRLKGTEGGTYTFLVSNSDVNASIAFNYYVNTKPEILTYD RLVNGMLQCVAAGFPEPTIDWYFCPGTEQRCSASVLPVDV QTLNASGPPFGKLVVQSSIDSSAFKHNGTVECKAYNDVGKT SAYFNFAFKGNNKEQIHPHTLFTPRSHHHHHH	117

Expresión de Proteínas Recombinantes cKIT ECD

[00377] Las proteínas recombinantes cKIT deseadas se expresaron en líneas celulares provenientes de HEK293 (293FS) previamente adaptadas a cultivo en suspensión y crecieron en medio libre de suero FreeStyle–293 (Gibco, catálogo # 12338018). Ambas producciones de proteína a escala pequeña y a larga escala fueron a través de transfección transitoria y se llevó a cabo en múltiples matraces de agitación (Nalgene), hasta 1 L cada uno, con 293Fectin® (Life Technologies, catálogo #12347019) como un portador plásmido. ADN total y 293Fectina se usó a una relación de 1:1,5 (p:v). ADN para relación cultivo fue 1 mg/L. Los sobrenadantes de cultivo celular fueron cosechados 3–4 días post transfección, se centrifugaron y se filtraron de forma estéril previo a purificación.

Purificación de Proteína con Etiqueta ECD

[00378] Proteínas recombinantes de dominio extracelular cKIT con etiqueta Fc (por ej., cKIT ECD–Fc humana, cKIT humano (ECD subdominios 1–3, 4–5)–Fc, cyno cKIT–mFc, cKIT–mFc de rata, cKIT–mFc de ratón) fueron purificadas a partir del sobrenadante de cultivo celular. El sobrenadante clarificado se hizo pasar sobre una columna de Proteína A Sepharose® que había sido equilibrada con PBS. Después de lavar al valor de base, el material unido se eluyó con Tampón de Elución con pH bajo Pierce Immunopure®, o 100 mM

glicina (pH 2,7) y se neutralizó inmediatamente con 1/8° el volumen de elución de 1 M Tris pH 9,0. La proteína agrupada fue concentrada de ser necesario usando concentradores centrífugos Amicon® Ultra 15 mL con interrupciones de peso molecular nominal de 10 kD o 30 kD. Las mezclas luego se purificaron por SEC usando una columna Superdex® 200 26/60 para eliminar agregados. La proteína purificada luego se caracterizó por SDS–PAGE y SEC–MALLS (dispersión de luz láser de ángulo múltiple). La concentración se determinó por absorbancia a 280 nm, usando los coeficientes de absorción teóricos calculados a partir de la secuencia por Vector NTI.

Ejemplo 3: Unión de cKIT Fabs a subdominios cKIT ECD

[00379] Para ayudar a definir los sitios de unión de los cKIT Abs, la cKIT ECD humana se dividió en subdominios 1–3 (dominio de unión a ligando) y subdominios 4–5 (dominio de dimerización). Para determinar que subdominios fueron unidos, se utilizó un ensayo ELISA sándwich. 1 µg/ml de ECD diluido en 1X solución salina tamponada con fosfato que corresponde a cKIT subdominios 1–3, subdominios 4–5 o cKIT ECD de longitud completa fueron cubiertos sobre placas de 96 receptáculos Immulon® 4–HBX (Thermo Scientific Cat# 3855, Rockford, IL) y se incubaron durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado (1X solución salina tamponada con fosfato (PBS) con 0,01% Tween–20 (Bio–Rad 101–0781)). Las placas se bloquearon con 280 µl/receptáculo 3% Albúmina de Suero Bovino diluida en 1XPBS durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado. Se prepararon anticuerpos en 2 µg/ml en tampón de lavado con diluciones de 5–veces para 8 puntos y se agregaron a placas ELISA a 100 µl/receptáculo en triplicado. Las placas se incubaron sobre un agitador a 200 rpm durante 1 hr a temperatura ambiente. Las placas de ensayo se lavaron tres veces con tampón de lavado. Se preparó F(ab')₂ fragmento IgG anticuerpo secundario de cabra anti–humano (H+L) (Jackson ImmunoResearch Cat# 109–036–088, West Grove, PA) 1:10.000 en tampón de lavado y se agregó a placas ELISA a 100 µl/receptáculo. Las placas se incubaron con anticuerpo secundario durante 1 hr a temperatura ambiente agitando a 200 rpm en un agitador orbital. Las placas de ensayo se lavaron tres veces con tampón de lavado. Para desarrollar la señal ELISA, 100 µl/receptáculo de Sure blue ® TMB sustrato (KPL Cat# 52–00–03, Gaithersburg, MD) se agregó a placas y se dejó incubar durante 10 mins a temperatura ambiente. Para detener la reacción 50 µl de 1N Ácido clorhídrico se agregó a cada placa. La absorbancia se midió a 450 nm usando un lector de placa Molecular Devices SpectraMax®

M5. Para determinar la respuesta de unión de cada anticuerpo las mediciones de densidad óptica se promediaron, valores de desviación estándar se generaron y se graficó usando Excel. Las características de unión de anticuerpo anti-cKIT individual a cKIT se puede encontrar en Tabla 5.

Ejemplo 4: Medidas de afinidad de anticuerpos cKIT

[00380] La afinidad de los anticuerpos a especies ortólogas cKIT y también a cKIT humano se determinó usando tecnología SPR usando un instrumento Biacore® 2000 (GE Healthcare, Pittsburgh, PA) y con chips sensores CM5.

[00381] En resumen, HBS-P (0,01 M HEPES, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,005% Tensioactivo P20) suplementado con 2% tampón de bloqueo Odyssey® (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE) se usó como el tampón de utilización para todos los experimentos. El nivel de inmovilización e interacciones analito se midieron por unidad de respuesta (RU). Experimentos piloto se realizaron para evaluar y confirmar la viabilidad de la inmovilización del anticuerpo Fc anti-humano (Catálogo número BR100839, GE Healthcare, Pittsburgh, PA) y la captura de los anticuerpos de ensayo.

[00382] Para mediciones cinéticas, se llevaron a cabo experimentos en donde los anticuerpos fueron capturados a la superficie con chip sensor mediante el anticuerpo Fc anti-humano inmovilizado y la capacidad de las proteínas cKIT de unirse en solución libre fue determinada. En resumen, 25 µg/ml de anticuerpo Fc anti-humano con pH 5 se inmovilizó en un chip sensor CM5 a través de acoplamiento amina con índice de flujo de 5 µl/min sobre ambas células de flujo para alcanzar 10.500 RUs. 0,1–1 µg/ml de anticuerpos de ensayo fueron entonces inyectados a 10 µl/min durante 1 minuto. Niveles capturados de los anticuerpos fueron generalmente mantenidos debajo de 200 RUs. Posteriormente, 3,125–50 nM de dominios extracelular receptor cKIT (ECD) se diluyeron en una serie de 2–veces y se inyectó con un índice de flujo de 40 µl/min durante 3 min sobre ambas células de flujo de referencia y de ensayo. Una tabla de ECDs evaluadas se enumera debajo (Tabla 5). Disociación de unión ECD se siguió durante 10 min. Después de cada ciclo de inyección, la superficie con chip fue regenerada con 3 M MgCl₂ a 10 µl/min durante 30 segundos. Todos los experimentos fueron realizados a 25 °C y los datos de respuesta fueron globalmente adecuados con un simple modelo de interacción 1:1 (usando un software Scrubber 2 ® versión 2.0b (BioLogic Software) para obtener estimados de asociación [on rate] (k_a), disociación [off–

rate] (k_d) y afinidad (K_D). Tabla 6 enumera la unión de dominio y afinidad de anticuerpos anti-cKIT seleccionados.

Tabla 5 cKIT ECD isotipo y fuente

ECD Isotipo	Etiqueta	Fuente
Humano	C-terminal 6x His (SEQ ID NO: 162)	Constructo Novartis
Cyno	C-terminal 6x His (SEQ ID NO: 162)	Constructo Novartis
Ratón	C-terminal 6x His (SEQ ID NO: 162)	Sino Biological Inc (Catálogo número: 50530-M08H)
Rata	C-terminal mFc	Constructo Novartis

Tabla 6– Afinidad de anticuerpo y reactividad cruzada

Ab	unión dominio cKIT	KD (pM) a cKIT humano ECD en SET	KD (pM) a cKIT cyno ECD en SET	Reactividad a cKIT de ratón	Reactividad a cKIT de rata
Anti-cKIT Ab1	D1–3	94	170	No reactivo	No reactivo
Anti-cKIT Ab2	D1–3	7	10	No reactivo	No reactivo
Anti-cKIT Ab3	D1–3	160	52	No reactivo	No reactivo
Anti-cKIT Ab4	D4–5	2400	140	Yes	Yes
Anti-cKIT Ab5	D1–3	110	180	Yes	Yes

Ejemplo 5 Ensayos in vitro de destrucción de célula HSC humana y de ratón por cKIT ADCs

Ensayos de viabilidad HSC in vitro

[00383] Células madre hematopoyéticas de sangre periférica movilizada humana (HSCs) se obtuvieron a partir de HemaCare (catálogo número M001F–GCSF–3). Cada vial

de ~1 millón de células se descongeló y diluyó en 10 ml de 1X HBSS y centrifugó durante 7 minutos a 1200 rpm. El microgránulo de células se resuspendió en 18 ml de medio de crecimiento que contenía tres factores de crecimiento (StemSpan SFEM (StemCell Technologies, catálogo número 09650) con 50 ng/ml cada uno de TPO (R&D Systems, catálogo número 288-TP) ligando Flt3 (Life Technologies, catálogo número PHC9413), y IL-6 (Life Technologies, catálogo número PHC0063), suplementado con aminoácidos (Gibco, catálogo número 10378-016)).

[00384] Las células de médula ósea de ratones C57BL/6J fueron recolectadas de los fémures y tibias, resuspendidos en IMDM (HyClone, número de catálogo SH30228.01) y se agruparon. Las células fueron centrifugadas durante 10 minutos a 300 g. El microgránulo se resuspendió en tampón AutoMACS (1X PBS + 0,5% BSA + 2 mM EDTA) a una concentración de 100 millones de células en 40 µl. El cóctel anticuerpo de linaje (Miltenyi, número de catálogo 130-090-858) se agregó a una concentración de 10 µl por 100 millones de células. Células fueron incubadas durante 10 minutos en el compartimento frío antes del agregado de 30 µl de tampón AutoMACS y 20 µl de perlas magnéticas biotiniladas por 100 millones de células. Esta nueva suspensión se incubó en el compartimento frío durante 15 minutos. Las células fueron centrifugadas durante 10 minutos a 300 g. Los microgránulos fueron resuspendidos en 2 ml de tampón AutoMACS y pasaron a través de un filtro celular. Las células fueron seleccionadas en el AutoMACS usando protocolo de "reducción". La fracción negativa de la clase se centrifugó durante 10 minutos a 300 g y resuspendió en 1 ml de HBSS. Las células resuspendidas fueron teñidas con anti-CD45-PerCP-Cy5.5 (Becton Dickinson, número de catálogo 550994), anti-CD48-FITC (eBioscience, número de catálogo 11-0481-82), anti-CD150-PE (BioLegend, número de catálogo 115904), y anti-Sca-1 (Becton Dickinson, número de catálogo 560653). Las células fueron incubadas a temperatura ambiente durante 30 minutos, centrifugadas durante 5 minutos a 300 g, y resuspendidas en 700 µl de tampón FACS para clasificación. Sca-1+ células fueron positivamente clasificadas en un FACS Aria. Después de la clasificación, las células se colocaron dentro de medio de crecimiento que contiene tres factores de crecimiento (StemSpan SFEM con 50 ng/ml TPO (R&D Systems, número de catálogo 288-TP), ligando Flt3 (Life Technologies, número de catálogo PHC9413), y IL-6 (Life Technologies, número de catálogo PHC0063) suplementado con aminoácidos (Gibco, número de catálogo 10378-016)).

[00385] Agentes de ensayo fueron diluidos en duplicado dentro de una placa de ensayo negra de 384-receptáculos con un volumen final de 5 µl, comenzando con 10 µg/ml y con

diluciones seriales 1:3. Las células anteriores se agregaron a cada receptáculo con un volumen final de 45 µl. Las células fueron incubadas a 37 °C y 5% oxígeno durante 7 días. Al final del cultivo, las células fueron recolectadas para tinción mediante centrifugación de la placa de ensayo durante 4 minutos a 1200 rpm. Los sobrenadantes luego se aspiraron y las células se lavaron y se transfirieron a una placa diferente de 384–receptáculos (Greiner Bio–One tratada con TC, plana color negro claro, catálogo número 781092).

[00386] Para ensayo células humanas, cada receptáculo se tiño con anti–CD34–PerCP (Becton Dickinson, catálogo número 340666) y anti–CD90–APC (Becton Dickinson, catálogo número 559869), se lavó, y resuspendió en tampón FACS a un volumen final de 50 µl. Para ensayos de ratón, cada receptáculo se tiñó con anti–CD45–PerCP–Cy5.5 (Becton Dickinson, número de catálogo 550994), anti–CD48–FITC (eBioscience, número de catálogo 11–0481–82), anti–CD150–PE (BioLegend, número de catálogo 115904), anti–cKIT–APC (Becton Dickinson, número de catálogo 553356), y anti–Sca–1 (Becton Dickinson, número de catálogo 560653), se lavó, y resuspendió en tampón FACS para un volumen final de 50 µl. Las células fueron luego analizadas en un aparato de citometría de flujo Becton Dickinson Fortessa y se cuantificó para análisis.

[00387] Conjugados toxina de anticuerpo y fragmentos de anticuerpo que reconocen cKIT destruyeron HSCs según se determinó en este ensayo. Cuantificación de células mediante FACS mostró menos células viables en receptáculos con anti–cKIT–conjugados toxina que en receptáculos control tratados con PBS o co conjugados toxina isotipo control de anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Los datos se muestran en FIG.1, FIG. 2 y FIG. 9 y se sintetizan en Tabla 7. La convención de nomenclatura que se usa en la presente es J#, corresponde al No. de Conjugado específico que se describe en la Tabla 2.

Tabla 7. Viabilidad de células después de tratamiento de conjugados Fab–toxina anti–cKIT

Conjugado ensayado	Población celular	EC50 (ng/ml)
J3	Células nucleadas total humanas	45
	CD34+ células humanas	8
	CD90+ células humanas	12
J2	Células nucleadas total humanas	58
	CD34+ células humanas	11

	CD90+ células humanas	16
J1	Células nucleadas total humanas	48
	CD34+ células humanas	11
	CD90+ células humanas	13
J4	Células nucleadas total de ratón	3800
	CD45+ células de ratón	3800
	CKIT+ células de ratón	8
J5	Células nucleadas total de ratón	210
	CD45+ células de ratón	210
	CKIT+ células de ratón	120
J14	Células nucleadas total humanas	7
	CD34+ células humanas	10
	CD90+ células humanas	11
J15	Células nucleadas total humanas	6
	CD34+ células humanas	5
	CD90+ células humanas	1
J16	Células nucleadas total humanas	6
	CD34+ células humanas	7
	CD90+ células humanas	9
J17	Células nucleadas total humanas	12
	CD34+ células humanas	16
	CD90+ células humanas	37
J18	Células nucleadas total humanas	15
	CD34+ células humanas	11
	CD90+ células humanas	3

J19	Células nucleadas total humanas	14
	CD34+ células humanas	16
	CD90+ células humanas	23
J20	Células nucleadas total humanas	20
	CD34+ células humanas	25
	CD90+ células humanas	72
J21	Células nucleadas total humanas	154
	CD34+ células humanas	88
	CD90+ células humanas	22
J22	Células nucleadas total humanas	8
	CD34+ células humanas	10
	CD90+ células humanas	17

Ejemplo 6 Ensayo in vitro de desgranulación de mastocitos humanos

[00388] Mastocitos se generaron usando CD34+ progenitoras a partir de sangre periférica movilizada. Células CD34+ fueron cultivadas en StemSpan SFEM (StemCell Technologies) suplementadas con factor de células madre recombinante humano (rhSCF, 50 ng/ml, Gibco), interleucina 6 recombinante humana (rhIL-6, 50 ng/ml, Gibco), IL-3 recombinante humana (30 ng/ml, Peprotech), GlutaMAX (2 nM, Gibco), penicilina (100 U/ml, Hyclone) y estreptomycin (100 µg/ml, Hyclone). hIL-3 recombinante se agregó solamente durante la primera semana del cultivo. Después de la tercer semana, la mitad del medio se reemplazó semanalmente con medio fresco que contiene rhIL-6 (50 ng/ml) y rhSCF (50 ng/ml). Pureza de mastocitos maduros se evaluó por tinción de superficie de receptor IgE de alta afinidad (FCεRI, eBioscience) y CD117 (BD). Células se usaron entre semana 8 y 12 del cultivo.

[00389] Los mastocitos derivados se lavaron una vez para extraer SCF, y la cantidad requerida de células se incubó durante la noche en medio de mastocitos que contiene rhIL-6 (50 ng/ml) con o sin rhSCF (50 ng/ml). Como control positivo para desgranulación de mastocitos, una porción de las células fueron sintetizadas con IgE mieloma humano (100 ng/ml, EMD Millipore). Al día siguiente, diluciones de anticuerpo anti-cKIT o sus fragmentos

de anticuerpo o conjugados toxina, IgG1 monoclonal de ratón anti-humana (Fab específico, Sigma), IgE anti-humana de cabra (Abcam) y compuesto 48/80 (Sigma) fueron preparadas en tampón de desgranulación HEPES (10 mM HEPES, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,4 mM fosfato de sodio dibásico, 5,6 mM glucosa, pH ajustado a 7,4 y mezclado con 1,8 mM cloruro de calcio y 1,3 mM sulfato de magnesio) suplementado con 0,04% albúmina de suero bovino (BSA, Sigma). Agentes de ensayo y anti-IgG1 se mezclaron juntos en una palca de ensayo con fondo en forma de V de 384 receptáculos mientras anti-IgE y compuesto 48/80 fueron ensayados solos. La palca de ensayo se incubó 30 min a 37 °C. Durante la incubación, las células se lavaron 3 veces con tampón de desgranulación HEPES + 0,04% BSA para extraer medio e IgE no ligada. Las células fueron resuspendidas en tampón de desgranulación HEPES + 0,04% BSA y sembraron a 3000 células por receptáculo en la palca de ensayo para un volumen de reacción final de 50 µl. Las células que fueron sensibilizadas con IgE fueron usadas solas con anti-IgE como un control positivo para desgranulación. La placa de ensayo se incubó 30 min a 37°C para que se dé la desgranulación. Durante esta incubación, tampón *p*-nitro-*N*-acetil-β-D-glucosamina (pNAG, Sigma) se preparó mediante sonicación de 3,5 mg/ml de pNAG en tampón de citrato (40 mM ácido cítrico, 20 mM fosfato de sodio dibásico, pH 4,5). Se midió liberación de β-hexosaminidasa mezclando 20 µl de sobrenadante celular con 40 µl de solución pNAG en una placa de fondo plano de 384 receptáculos. Esta placa se incubó durante 1,5 hora a 37°C, y la reacción se detuvo con la adición de 40 µl de solución de terminación (400 mM glicina, pH 10,7). Absorbancia se leyó usando un lector de placa a λ = 405 nm con filtro de referencia a λ = 620 nm.

[00390] Controles IgG de longitud completa usados en los ensayos de desgranulación de mastocitos se describen en la Tabla 8.

Tabla 8. Controles IgG de longitud completa usados en los ensayos de desgranulación de mastocitos

	Nombre	Secuencia HC	Secuencia LC
IgG control para J1	Anti-cKIT Ab1	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 25
IgG control para J2	Anti-cKIT Ab2	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 49
IgG control para J3	Anti-cKIT Ab3	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 25

IgG control para J4	Anti-cKIT Ab4	SEQ ID NO: 71	SEQ ID NO: 84
IgG control para J6	Anti-Her2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARI YPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDG FYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTP EVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 150)	SEQ ID NO: 147

[00391] Como se muestra en FIG. 3A, ciertos clones de clase anticuerpo antagonista anti-cKIT son menos probable que produzcan desgranulación de mastocitos. Si sugiere adicionalmente que el fragmento Fab o Fab' no es capaz de producir desgranulación de mastocitos. Luego del entrecruzamiento con anticuerpo específico para Fab (FIG. 3C–3J), la IgG de longitud completa pero no el formato anti-cKIT Fab'–toxina DAR4 muestra desgranulación aumentada. Esto sugiere que el fragmento Fab' no produce desgranulación de mastocitos incluso cuando está sujeto y multimerizado dentro de complejos más grandes como se puede observar si un paciente desarrolló o tenía anticuerpos anti-droga preexistentes que reconocen fragmentos Fab o Fab'.

Ejemplo 7 Ablación in vivo de HSCs humana de huésped de ratón

[00392] Para evaluar agentes de ensayo para eficacia *in vivo* contra HSCs humana, ratones que son severamente inmuno deficientes (NOD.Cg–*Prkdc*^{scid} *IL2rg*^{tm1Wjl}/SzJ, Jackson Laboratory, número de lote 005557, a.k.a. NSG) fueron trasplantados con HSCs humana después de irradiación subletal (250 RADS en un irradiador gamma ¹³⁷Cs). CD34+ células madre hematopoyéticas (HSCs) fueron obtenidas de AICells (número de catálogo CB008F–

S). Cada vial de ~1 millón de células se congeló, se diluyó dentro de 10 ml 1X HBSS y centrifugó durante 7 minutos a 1200 rpm. Los microgránulos fueron resuspendidos en HBSS a 100.000 células/ml. Un total de 20.000 células fueron trasplantadas por ratón a través de inyección retro orbital 24 horas después de irradiación. HSCs humanas se dejaron injertar en los ratones NSG durante al menos 4 semanas. Quimerismo humano porcentual se determinó mediante citometría de flujo de muestras de sangre. Para esto, la sangre se tiñó con los siguientes anticuerpos: anti-human CD45-e450 (eBioscience, catálogo #48-0459-42), anti-ratón CD45-APC (Becton Dickinson, catálogo #559864) anti-humana CD33-Pe anti-humana (Becton Dickinson, catálogo #347787), CD19-FITC anti-humana (Becton Dickinson, catálogo #555422), y CD3-PeCy7 anti-humana (Becton Dickinson, catálogo #557851). Una vez que se confirmó el quimerismo, ratones NSG humanizados fueron dosificados con un agente de ensayo intraperitonealmente b.i.d. El grado de quimerismo humano fue re evaluado después de dosificación. Para evaluar la presencia o ausencia de HSCs humanas, los ratones fueron sometidos a eutanasia y la médula ósea se aisló y tiñó con los siguientes anticuerpos: CD45-e450 anti-humana (eBioscience, catálogo #48-0459-42), CD45-APC anti-ratón (Becton Dickinson, catálogo #559864), CD34-PE anti-humana (Becton Dickinson, catálogo #348057), CD38-FITC anti-humana (Becton Dickinson, catálogo #340926), CD11b-PE anti-humana (Becton Dickinson, catálogo #555388), CD33-PeCy7 anti-humana (Becton Dickinson, catálogo #333946), CD19-FITC anti-humana (Becton Dickinson, catálogo #555412), y CD3-PeCy7 anti-humana (Becton Dickinson, catálogo #557851). Las poblaciones celulares fueron evaluadas mediante citometría de flujo y analizadas con FlowJo.

[00393] En un experimento particular, ratones fueron dosificados con 10 mg/kg de conjugado J7 (descrito en Tabla 2) dos veces al día durante 1 2, o 4 días o conjugado control isotipo J8 dos veces al día durante 4 días. Los ratones fueron sometidos a eutanasia en el día 21 y se analizó su médula ósea. Como se muestra en FIG. 4, ratones tratados con conjugado J7 por incluso 1 día mostraron reducción de HSCs humanas (CD45 + humana, CD34+ humana, CD38- humana), mientras que ratones tratados con conjugado control isotipo J8 mostraron quimerismo variable probablemente debido a variación de la humanización previo al tratamiento, en base a comparación con el grupo vehículo tratado (PBS).

[00394] En un experimento particular, ratones fueron dosificados con 10 mg/kg de conjugado anti-cKIT J1, J2, o J3, o conjugado isotipo control J6 durante 2 días. Los ratones fueron sometidos a eutanasia en el día 21 y se analizó su médula ósea. Como se muestra en FIG. 5, ratones tratados con un conjugado anti-cKIT J1, J2, o J3 mostraron HSCs humanas

reducidas (CD45+ humana, CD34+ humana, CD38– humana), mientras ratones tratados con conjugado isotipo control J6 mostraron quimerismo variable.

[00395] En un experimento particular, ratones fueron dosificados con 10 mg/kg de conjugado anti-cKIT JW, JX, JY, o JZ durante 2 días. Los ratones fueron sometidos a eutanasia en el día 21 y se analizó su médula ósea. Como se muestra en FIG. 13, ratones tratados con un conjugado anti-cKIT JW, JX, JY, o JZ mostraron HSCs humanas reducidas (CD45+ humana, CD34+ humana, CD38– humana).

[00396] Estos tres experimentos juntos muestran que los conjugados anti-cKIT Fab–toxina o anti-cKit Fab’–toxina fueron capaces de reducir HSCs de la médula ósea. Ambos conjugados anti-cKIT Fab–amanitina (por ej., J7) como conjugados anti-cKIT Fab’–auristatina (por ej., J1, J2, J3, JW, JX, JY) fueron capaces de ablación de HSCs humanas *in vivo*.

Ejemplo 8 Ablación *in vivo* de HSCs de ratón en ratones inmuno–competentes

[00397] Para evaluar agentes de ensayo para eficacia *in vivo* contra HSCs de ratones, ratones C57BL/6J (machos, 10 semanas de edad, Jackson Laboratory, lote #000664) fueron dosificados con un agente de ensayo intraperitonealmente b.i.d. Se evaluó perfil hematológico tan pronto como un día después de la última dosis o hasta 21 días después de la última dosis por métodos estándar. Para evaluar presencia o ausencia de HSCs de ratón, los ratones se sometieron a eutanasia y se aisló la médula ósea y se tiñó con los siguientes anticuerpos: anti–ratón CD45–PerCP–Cy5.5 (Becton Dickinson, catálogo #550994), cKIT–APC anti–ratón (Becton Dickinson, catálogo #553356), CD48–FITC anti–ratón (eBioscience, catálogo #11–0481–82), CD150–PE anti–ratón (BioLegend, catálogo #115904), Sca–V450 anti–ratón (Becton Dickinson, catálogo #560653), Lin–biotina anti–ratón (Miltenyi, catálogo #120–001–547), y Pe–Cy7–estreptavidina (Becton Dickinson, catálogo #557598). Poblaciones celulares fueron evaluadas mediante citometría de flujo y analizaron con FlowJo.

[00398] En un experimento particular, ratones fueron dosificados dos veces al día con 10 mg/kg de conjugado anti-cKIT J4 o J5 (descritos en Tabla 2), o PBS durante 4 días. Los ratones fueron sometidos a eutanasia en el día 13 para análisis de médula ósea. Grupos tratados con conjugado anti-cKIT J4 o J5 mostraron niveles significativamente reducidos de células madre y progenitoras (cKIT+) en la médula ósea en comparación con grupo control tratado con PBS (FIG. 6), demostrando que tratamiento con conjugados anti-cKIT Fab’–auristatina tal como J4 o J5 fueron capaces de ablación HSCs *in vivo* en ratones normales.

[00399] A fin de determinar si la ablación mediante conjugados anticuerpo anti-cKIT o fragmento de anticuerpo de la invención es suficiente para posibilitar trasplante, a los ratones tratados según lo antes mencionado se les puede seguidamente dar trasplante HSC. Por ejemplo, ratones CD45.2 tratados con un conjugado anti-cKIT Fab'-toxina pueden ser trasplantados con HSCs donantes que son de ratones CD45.1 aproximadamente una semana después de dosificación. En otro ejemplo, ratones tratados con un conjugado anti-cKIT Fab'-toxina pueden ser tratados con un agente inmuno-supresor, tal como un agente que produce reducción de células T aproximadamente una semana después de dosificación y aproximadamente 1-2 días previo a ser trasplantado con HSCs donantes que son de ratones CD45.1. Un método para reducción de células T es dosificar ratones con 0,5 mg por ratón de anticuerpo TCR de cadena β anti-ratón (clon H57-597; Biolegend) 4 veces al día durante dos días. Reducción de células T puede confirmarse tomando una muestra de sangre para perfil hematológico después de dosificación. En dichos ejemplos, el progreso del trasplante sería supervisado observando el quimerismo CD45.1 en muestras de sangre. En dichos ejemplos, el éxito de trasplante puede determinarse mediante eutanasia de ratones aproximadamente 3-4 meses o 5-6 meses después de trasplante de análisis de médula ósea observando poblaciones de CD45.1 y CD45.2 HSCs. Alternativamente, trasplante exitoso puede determinarse mediante eutanasia de los ratones al menos 4 o 6 meses después del trasplante primario y realizando trasplante secundario en ratones huéspedes irradiados totalmente y observando quimerismo CD45.1 en muestras de sangre después del trasplante secundario.

Ejemplo 9 Ensayo in vitro de desgranulación de mastocitos humanos mediante anticuerpo anti-cKIT de longitud completa, sus fragmentos $F(ab')_2$ y Fab, y sus conjugados

[00400] Mastocitos maduros fueron generados y ensayados con anticuerpo anti-cKIT y fragmentos $F(ab')_2$ Fab o sus conjugados toxina como se describe en Ejemplo 6.

[00401] Como se muestra en FIGs. 7A-7C, anti-cKIT Ab4 (HC-E152C-S375C) de longitud completa y fragmento $F(ab')_4$ (HC-E152C) conjugado con compuesto (4) produjo desgranulación de mastocitos al entrecruzarse, mientras que no se activó desgranulación de mastocitos por fragmento Fab4 (HC-E152C) en todas las concentraciones ensayadas. FIGs 7D-7F muestran que anti-cKIT Ab3 de longitud completa (HC-E152C-S375C) y fragmento $F(ab')_3$ (HC-E152C) conjugado con compuesto (3) produjo desgranulación de mastocitos al entrecruzarse, mientras que no se activó desgranulación de mastocitos por fragmento Fab3

(E152C) conjugado con compuesto (4) en todas las concentraciones ensayadas. Esto sugiere que el fragmento Fab o sus conjugados no producen desgranulación de mastocitos incluso cuando están sujetos y multimerizados en complejos más grandes como se puede observar si un paciente desarrolló o tenía anticuerpos anti-droga preexistentes que reconocen fragmentos Fab. Por otro lado, fragmentos $F(ab')_2$ y conjugados producen desgranulación de mastocitos a un nivel similar al anticuerpo anti-cKIT de longitud completa cuando está sujeto y multimerizado en complejos más grandes.

Ejemplo 10 Ensayo in vitro de desgranulación de mastocitos humanos mediante anticuerpo anti-cKIT de longitud completa y sus fragmentos $F(ab')_2$ y Fab

[00402] Mastocitos maduros fueron generados y ensayados con anticuerpo anti-cKIT y fragmentos $F(ab')_2$ y Fab como se describe en Ejemplo 6.

[00403] Como se muestra en FIGs. 8A–8C, anti-cKIT Ab4 de longitud completa y fragmento $F(ab')_4$ produjo desgranulación de mastocitos al entrecruzarse, mientras que no se activó desgranulación de mastocitos por fragmento Fab4 (HC–E152C) en todas las concentraciones ensayadas. FIGs 8D–8F muestran que anti-cKIT Ab1 de longitud completa y fragmento $F(ab')_1$ produjo desgranulación de mastocitos al entrecruzarse, mientras que no se activó desgranulación de mastocitos por fragmento Fab1 (HC–E152C) en todas las concentraciones ensayadas. FIGs 8G–8I muestran que anti-cKIT Ab2 de longitud completa y fragmento $F(ab')_2$ produjo desgranulación de mastocitos al entrecruzarse, mientras que no se activó desgranulación de mastocitos por fragmento Fab2 (HC–E152C) en todas las concentraciones ensayadas. FIGs 8J–8L muestran que anti-cKIT Ab3 de longitud completa y fragmento $F(ab')_3$ produjo desgranulación de mastocitos al entrecruzarse, mientras que no se activó desgranulación de mastocitos por fragmento Fab3 (HC–E152C) en todas las concentraciones ensayadas. Esto sugiere que los fragmentos Fab no producen desgranulación de mastocitos incluso cuando están sujetos y multimerizados en complejos más grandes como se puede observar si un paciente desarrolló o tenía anticuerpos anti-droga preexistentes que reconocen fragmentos Fab. Por otro lado, fragmentos $F(ab')_2$ produce desgranulación de mastocitos a un nivel similar al anticuerpo anti-cKIT de longitud completa cuando está sujeto y multimerizado en complejos más grandes

Ejemplo 11 Trasplante de médula ósea singénico en ratones inmuno-competentes

[00404] En un experimento particular, ratones C57BL/6J (CD45.2, machos, 10 semanas de edad, Jackson Laboratory, stock #000664) fueron dosificados con 2,5, 5, o 10

mg/ml anti-c-KIT Fab'5-(1) (Fab'-DAR4) en una mini-bomba (Alzet, catálogo #2001) colocada subcutáneamente en la parte posterior. La mini-bomba contenía un volumen de 200 μ l e infundió a una velocidad constante de 1 μ l/hora, durante el curso de 7 días. Siete días después de que la mini-bomba fue implantada, luego se extrajo para detener cualquier adicional administración de droga. Cuarenta y ocho horas después de la extracción de la mini-bomba, los ratones fueron trasplantados con médula ósea de ratones donantes que estaban de forma congénita marcados en CD45 (CD45.1, B6.SJL-Ptprca^a Pepcb^b/BoyJ, machos, 10 semanas de edad, Jackson Laboratory, stock #002014). El progreso del trasplante fue supervisado en la sangre periférica observando quimerismo CD45.1 en intervalos de un mes. En este experimento, el quimerismo de sangre ha sido supervisado durante 4 meses como se muestra en FIG. 10. Quimerismo en sangre periférica fue evaluado mediante citometría de flujo. Las muestras de sangre fueron teñidas con anti-mCD45.1-PerCP-Cy5.5 (1:100, BD #560580), anti-mCD45.2-BUV395 (1:100, BD #564616), anti-Mac-PE (1:500, BD #553331), anti-GR1-FITC (1:100, BD #553127), anti-B220-APC (1:400, BD #553092), y anti-CD3-V450 (1:100, BD #560801) adquiridas en un equipo de citometría de flujo Fortessa (Becton Dickinson), y se analizaron con FlowJo software (TreeStar). El nivel de quimerismo se determinó comparando poblaciones que eran positivas tanto para CD45.2 (host) como CD45.1 (donante). Quimerismo donante total representó la población total de glóbulos blancos. Además, subpoblaciones de células T, células B, y células mieloide fueron evaluadas adicionalmente para determinar quimerismo donante. Quimerismo donante de célula T se basó en observar a CD45.2 (huésped) vs. CD45.1 (donante) en células CD3⁺. Quimerismo donante de célula B se basó en observar a CD45.2 (huésped) vs. CD45.1 (donante) en células CD45R⁺. Quimerismo mieloide se basó en observar a CD45.2 (huésped) vs. CD45.2 (donante) en células Mac-1⁺/Gr-1⁺. Este experimento muestra que ratones acondicionados con un conjugado anti-cKit-Fab' puede ser injertado con células donantes que reconstituyen los linajes mieloide, célula B, y célula T que es indicativo de injerto HSC exitoso.

[00405] En otro experimento, C57BL/6J (CD45.2, machos, 10 semanas de edad, Jackson Laboratory, lote #000664) ratones fueron dosificados con 2,5, 5, o 10 mg/ml anti-c-KIT Fab'5-(1) (Fab'-DAR4) o 10 mg/ml anti-c-KIT Fab'5-mc-MMAF (Fab'-DAR4) en una mini-bomba (Alzet, catálogo #2001) colocada subcutáneamente en la parte posterior. La mini-bomba contenía un volumen de 200 μ l e infundió a una velocidad constante de 1 μ l/hora, durante el curso de 7 días. Cinco días después de que la mini-bomba fue implantada, luego

se extrajo para detener cualquier adicional administración de droga . Dentro de las 24 horas después de extracción de mini-bomba, los ratones fueron luego trasplantados con médula ósea de ratones donantes que fueron marcados de forma congénita en CD45 (CD45.1, B6.SJL-Ptprc^a Pepc^b/BoyJ, males 10 semanas de edad, Jackson Laboratory, stock #002014). El progreso del trasplante fue supervisado en la sangre periférica observando quimerismo CD45.1 en intervalos de un mes. En este experimento, el quimerismo de sangre ha sido supervisado durante 2 meses como se muestra en FIG. 11. Quimerismo en sangre periférica fue evaluado mediante citometría de flujo. Las muestras de sangre fueron teñidas con (anti-mCD45.1-PerCP-Cy5.5 (1:100, BD #560580), anti-mCD45.2-BUV395 (1:100, BD #564616), anti-Mac-PE (1:500, BD #553331), anti-GR1-FITC (1:100, BD #553127), anti-B220-APC (1:400, BD #553092), y anti-CD3-V450 (1:100, BD #560801)), adquiridas en un equipo de citometría de flujo Fortessa (Becton Dickinson), y se analizaron con software FlowJo (TreeStar). El nivel de quimerismo se determinó comparando poblaciones que eran positivas tanto para CD45.2 (huésped) como CD45.1 (donante). Quimerismo donante total representó la población total de glóbulos blancos. Además, células mieloide en la sangre periférica fueron evaluadas adicionalmente para determinar quimerismo donante. Quimerismo mieloide se basó en observar a CD45.2 (huésped) vs. CD45.2 (donante) en células Mac-1+/Gr-1+. Este experimento muestra que ratones acondicionados con un conjugado anti-cKit-Fab' pueden ser exitosamente injertados con células donantes que reconstituyen el compartimento mieloide en un alcance similar a ratones acondicionados con irradiación letal (FIG. 11B). Niveles más bajos de quimerismo donante total en ratones acondicionados con anti-cKit en relación a ratones irradiados (FIG. 11A) son probablemente debido a la naturaleza más direccionada del agente de acondicionamiento anti-cKit que no extrae CD45.2+ células B y células T de larga vida de la circulación.

[00406] En otro experimento, C57BL/6J (CD45.2, machos, 10 semanas de edad, Jackson Laboratory, stock #000664) ratones fueron irradiados con 300 RADS. Después de tres días fueron dosificados con 2,5 o 5 mg/ml anti-c-KIT Fab'5-(1) (Fab'-DAR4) en una mini-bomba (Alzet, catálogo #2001) colocada subcutáneamente en la parte posterior. Un grupo se trató solamente con irradiación u un grupo se trató solamente con 2,5 mg/ml anti-c-KIT Fab'5-(1) (Fab'-DAR4). La mini-bomba contenía un volumen de 200 ul e infundió a una velocidad constante de 1 ul/hora, durante el curso de 7 días. Tres días después de que la mini-bomba fue implantada, luego se extrajo para detener cualquier adicional administración de droga . Dentro de las 48 horas después de extracción de la mini-bomba, los ratones

fueron luego trasplantados con médula ósea de ratones donantes que fueron de forma congénita marcados en CD45 (CD45.1, B6.SJL–Ptprca^a Pepc^b/BoyJ, machos 10 semanas de edad, Jackson Laboratory, stock #002014). El progreso del trasplante fue supervisado en la sangre periférica observando quimerismo CD45.1 en intervalos de un mes. En este experimento, el quimerismo de sangre ha sido supervisado durante 4 meses como se muestra en FIG. 12. Quimerismo en sangre periférica fue evaluado mediante citometría de flujo. Las muestras de sangre fueron teñidas con (anti-mCD45.1–PerCP–Cy5.5 (1:100, BD #560580), anti-mCD45.2–BUV395 (1:100, BD #564616), anti-Mac–PE (1:500, BD #553331), anti-GR1–FITC (1:100, BD #553127), anti-B220–APC (1:400, BD #553092), y anti-CD3–V450 (1:100, BD #560801)), adquiridas en un equipo de citometría de flujo Fortessa (Becton Dickinson), y se analizaron con software FlowJo (TreeStar). El nivel de quimerismo se determinó comparando poblaciones que eran positivas tanto para CD45.2 (huésped) como CD45.1 (donante). Quimerismo donante total representó la población total de glóbulos blancos. Además, células mieloide en la sangre periférica fueron evaluadas adicionalmente para determinar quimerismo donante. Quimerismo mieloide se basó en observar a CD45.2 (huésped) vs. CD45.2 (donante) en células Mac–1+/Gr–1+. Este experimento muestra que el conjugado anti-cKit–Fab’ puede ser usado como un agente de acondicionamiento en combinación con otros agentes tal como irradiación de dosis baja y que los ratones acondicionados de este modo puede ser exitosamente injertados con células donantes.

[00407] A menos que se defina de otra forma, los términos técnicos y científicos que se usan en la presente tienen el mismo significado que aquel que se entiende generalmente por un especialista familiar con el área a la cual pertenece la revelación.

[00408] A menos que se indique de otra forma, todos los métodos, pasos, técnicas y manipulaciones que no se describen específicamente en detalle pueden ser realizadas y han sido realizadas de un modo conocido per se, como resultará claro para la persona con experiencia. Referencia por ejemplo se hace nuevamente respecto a manuales estándar y los antecedentes del arte general que se mencionan en la presente y a las referencias adicionales enumeradas en la presente. A menos que se indique de otra forma, cada una de las referencias enumeradas en la presente se incorpora en su totalidad a modo de referencia.

[00409] Las reivindicaciones de la invención no son limitativas y se proporcionan debajo.

[00410] Si bien aspectos particulares y reivindicaciones han sido reveladas en la presente en detalle, esto se ha realizado a modo de ejemplo con fines ilustrativos solamente, y no pretende ser limitativo con respecto al alcance de las reivindicaciones anexas, o el alcance del tema de las reivindicaciones de cualquier solicitud futura correspondiente. En particular, se contempla por parte de los inventores que varias sustituciones, alteraciones, y modificaciones se pueden hacer a la revelación sin apartarse del espíritu y alcance de la revelación según se define mediante las reivindicaciones. La elección de material de partida de ácido nucleico, clon de interés, o tipo de colección se cree que es una cuestión de rutina para una persona con experiencia común en el arte con conocimiento de los aspectos que se describen en la presente. Otros aspectos, ventajas, y modificaciones se consideran que están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones. Aquellos con experiencia en el arte reconocerán o serán capaces de determinar, usando la experimentación de rutina, muchas equivalentes de los aspectos específicos de la invención que se describe en la presente. Dichas equivalentes pretenden estar abarcados por las siguientes reivindicaciones. La nueva redacción del alcance de las

[00411] reivindicación en solicitudes correspondiente presentadas más adelante puede ser debido a limitaciones por la ley de patentes de varios países y no debe ser interpretada como que renuncian al objetivo de las reivindicaciones.