

CONJUGADOS FÁRMACO-ANTICUERPO ANTI-CD19

1. REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio y la prioridad a la solicitud de patente provisional de los EE. UU. núm. 63/366.520, presentada el 16 de junio de 2022, y la solicitud de patente provisional de los EE. UU. núm. 63/488.302, presentada el 3 de marzo de 2023, cuyas descripciones se incorporan en la presente descripción como referencia para todos los propósitos.

2. LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene un listado de secuencias que se ha enviado electrónicamente en formato .xml y se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad. Dicha copia .xml, creada el 10 de mayo de 2024, se denomina SeqList-350794-46701.xml y tiene un tamaño de 21.125 bits.

3. CAMPO TÉCNICO

La presente solicitud se refiere, entre otras cosas, a nuevos conjugados fármaco-anticuerpo (ADC, por

sus siglas en inglés) anti-CD19, y métodos para preparar los mismos.

4. ANTECEDENTES

El CD19 es un marcador de células B y es un coactivador del complejo de receptor de células B (BCR, por sus siglas en inglés) que activa proteínas corriente abajo, tales como PI3K, lo que da como resultado un fenotipo proliferativo. Debido a este mecanismo, CD19 es un antígeno de células B requerido, y la pérdida de expresión de CD19 por CRISPR o ARNi hace que las células B normales y líneas de cáncer de células B no sean viables. CD19 es una diana clínicamente validada con alta expresión a través de neoplasias malignas de células B (p. ej., DLBCL, FL, CLL).

Los glucocorticoides sistémicos se usan en el tratamiento de neoplasias malignas de células B. Estos esteroides sistémicos tienen una sólida actividad de monoterapia en dosis altas, pero pueden provocar toxicidades crónicas asociadas a los esteroides, dosificación limitante y potencial de eficacia. Los glucocorticoides funcionan al unirse al receptor de glucocorticoides (GR, por sus siglas en inglés) intracelular que después se dirige al núcleo donde se une a los elementos de respuesta a los glucocorticoides (GRE, por sus siglas en inglés) que impulsan la activación transcripcional. Los cambios transcripcionales inducidos por esteroides incluyen la regulación positiva de las proteínas

proapoptóticas (*p. ej.*, BIM, BAX), la reducción de proteínas antiapoptóticas (*p. ej.*, BCL2), y la inhibición de las señales de proliferación de NF κ B, lo que finalmente da como resultado la muerte de las células cancerosas por apoptosis.

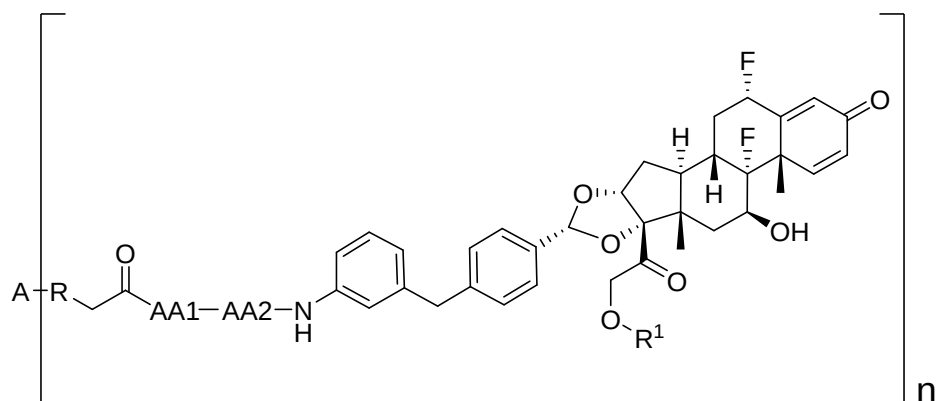
Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de un agente que suministre un modulador de glucocorticoides para tratar linfoma difuso de células B grandes (DLBCL, por sus siglas en inglés), leucemia linfoblástica aguda (ALL, por sus siglas en inglés), linfoma folicular (FL, por sus siglas en inglés), y leucemia linfocítica crónica (CLL, por sus siglas en inglés).

5. SUMARIO

La presente invención proporciona conjugados fármaco-anticuerpo que se dirigen a las células B a través de un anticuerpo anti-CD19 enlazado a una carga útil de agonista del modulador del receptor de glucocorticoides (GRM, por sus siglas en inglés) y proporciona un enfoque novedoso para tratar linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), leucemia linfoblástica aguda (ALL), linfoma folicular (FL), y leucemia linfocítica crónica (CLL). Los ADC agonistas de GRM de anti-CD19 descritos en la presente descripción se diseñaron genéticamente para tener distintos mecanismos de acción: (1) suministro dirigido de una potente carga útil de agonista del modulador del receptor

de glucocorticoides (GRM), (2) inhibición de la señalización de CD19, y (3) funciones efectoras de Fc tal como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés) y la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP, por sus siglas en inglés) a través de afucosilación del anticuerpo CD19. A diferencia de los ADC citotóxicos tradicionales, la carga útil de GRM es un agonista que se une al receptor de glucocorticoides (GR) intracelular que después se dirige al núcleo impulsando eventos transcripcionales asociados al elemento de respuesta glucocorticoide (GRE, por sus siglas en inglés) sostenido, que incluye la modulación de reguladores apoptóticos que dan como resultado en la muerte celular apoptótica impulsada por la carga útil. La ADCC es un mecanismo altamente efectivo en neoplasias malignas de células B. En una modalidad, el anticuerpo anti-CD19 del ADC se diseña genéticamente para mantener una mayor actividad de ADCC después de la conjugación con la carga útil de agonista de GRM. Al diseñarse genéticamente la molécula de esta manera, los ADC agonistas de GRM de anti-CD19 son conjugados fármaco-anticuerpo multimodales diseñados para tener una sólida actividad de agente único y proporcionar un beneficio clínico significativo en una variedad de tumores malignos de células B.

En ciertos aspectos, la presente invención proporciona conjugados fármaco-anticuerpo anti-CD19 que comprenden la siguiente estructura:



en donde:

A es un anticuerpo;

R es el punto de acoplamiento del anticuerpo a través de un residuo de cisteína del anticuerpo que proporciona un grupo -S- cuando se enlaza;

AA1 y AA2 son alanina (Ala);

R¹ es hidrógeno o -P(=O)(OH)₂;

n es un número entero de 1 a 10;

en donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-CD19 que comprende

una región variable de cadena pesada que comprende un dominio CDR-H1, dominio CDR-H2, y un dominio CDR-H3; y

una región variable de cadena ligera que comprende un dominio CDR-L1, un dominio CDR-L2, y un dominio CDR-L3, en donde CDR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos GFTFTTYWIN (sec. con núm. de ident.: 1), CDR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos NIYPSDSYTNYNQKFKD (sec. con núm. de ident.: 2), CDR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos EDYYGSSSYAMDY (sec. con núm. de ident.: 3); CDR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos KASQDVGTAVA (sec. con núm. de ident.: 4), CDR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos WASTRHT (sec. con núm. de ident.: 5), y CDR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos QQYSTYPLT (sec. con núm. de ident.: 6).

6. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La patente o archivo de solicitud contiene al menos una figura ejecutada en color. La Oficina proporcionará copias de esta publicación de patente o solicitud de patente con figura(s) en color, previa solicitud y pago de la tarifa correspondiente.

FIGURA 1: Ensayo de citotoxicidad *in vitro* de la carga útil de GRM en comparación con esteroides de molécula

pequeña aprobados (dexametasona y prednisolona). Se muestra el % de viabilidad celular de RS4;11 en relación con el control del vehículo después de 5 días de tratamiento con compuesto. El EC_{50} de cada compuesto se resume en la tabla.

FIGURA 2: El mAb de CD19 induce la internalización de CD19 en el lisosoma. La tinción con inmunofluorescencia que muestra la localización del receptor CD19 en el compartimento lisosomal después del tratamiento con mAb de CD19 en RS4;11. LAMP-1 se usa como marcador del compartimento del lisosoma.

FIGURA 3: El ADC-1 induce la activación transcripcional del indicador de luciferasa del elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE). Se trataron células K562 que expresaban CD19 humano con ADC-1 durante 72 horas. El % de activación máxima de GRE se calcula dividiendo la señal de luminiscencia de GRE en cada concentración por la señal de luminiscencia de GRE a 333 nM.

FIGURAS 4A-4B: El mAb de CD19 inhibe la proliferación de células DLBCL y la activación de AKT *in vitro*. A, el % de viabilidad de SU-DHL-6 en relación con el control del vehículo después de 5 días de tratamiento con isotipo o mAb de CD19. B, las células SU-DHL-6 se trataron con isotipo o mAb de CD19 durante una hora y después se estimularon con 1 μ g/ml de anti-IgM durante el tiempo indicado antes de la lisis celular. La fosforilación

de S473 en AKT se detectó mediante inmunotransferencia y se usó GAPDH como control de carga.

FIGURAS 5A-5B: El mAb de CD19 y ADC-1 inducen la activación de NFAT en células indicadoras Jurkat que expresan alotipos Fc γ RIIIa V158 y F158. A y B, las células Raji se trataron con anticuerpo de dosis titulada o ADC y se coincubaron con células Jurkat que expresan variantes de Fc γ RIIIa V158 (A) y F158 (B). Se muestra la señal de luminiscencia después de 4 horas (A) o 16 horas (B) de incubación.

FIGURAS 6A-6C: El mAb de CD19 y ADC-1 inducen ADCC en líneas celulares de neoplasias malignas de células B en el ensayo de ADCC de cocultivo de PMBC *ex vivo*. A-C, RS4;11 (A), Raji (B) y KARPAS422 (C) se incuban con anticuerpos de dosis titulada o ADC y se coincuban con PBMC primarias en una relación de efector a diana (E:T, por sus siglas en inglés) de 20:1 para 4 horas. El % de lisis específica de las células se calculó con respecto a la muestra no tratada.

FIGURAS 7A-7B: El ADC-1 induce la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) de líneas celulares de neoplasias malignas de células B en cocultivo con macrófagos derivados de monocitos. A y B, las células NuDHL1 (A) y Raji (B) etiquetadas con CFSE se trataron con 200 nM de agentes indicados y se cocultivaron con macrófagos derivados de monocitos durante 3 horas. CD68⁺ se usa como

marcador para macrófagos maduros y el índice de fagocitosis representa el porcentaje de células diana fagocitadas (CFSE+CD68+) del total de macrófagos maduros (CD68+).

FIGURAS 8A-8B: Inhibición del crecimiento de tumores de linfoma de células B grandes difusos xenoinjertados (OCI-LY19 y SU-DHL-6) en ratones inmunocomprometidos mediante varias dosis de ADC-1. A y B, inhibición del crecimiento de tumores OCI-LY19 xenoinjertados cultivados en ratones CB17/SCID (A) y células SU-DHL-6 (B) mediante administración intraperitoneal (IP) de ADC-1. El volumen de tumores subcutáneos se representó en función del tiempo después de la aleatorización y la dosificación. La inhibición del crecimiento se estudió en ratones con un tumor subcutáneo (volumen del tumor promedio 117-205 mm³) de tumores OCI-LY19 (A) y SU-DHL-6 cultivados en ratones SCID-beige (B) mediante la administración de ADC-1, isotipo-GRM, anticuerpo huCD19, anticuerpo de isotipo como dosis única (QDx1) en varios niveles de dosis (dosis 1-5, con la dosis 2 siendo a 3 veces la dosis de la dosis 1, con la dosis 3 siendo 10 veces la dosis de la dosis 1, con la dosis 4 siendo 30 veces la dosis de la dosis 1, y con la dosis 5 siendo 50 veces la dosis de la dosis 1). Se administró GRM-SM como dosis diarias múltiples (QDx5)³. Cada punto de la curva representa la media de siete (SU-DHL-6) u ocho (OCI-LY19) tumores. Las barras de error ilustran el error típico de la media.

FIGURA 9: Inhibición del crecimiento de la leucemia linfoblástica aguda xenoinjertada (RS4;11) por varias dosis de ADC-1. Inhibición del crecimiento de tumores RS4;11 xenoinjertados (ratones CB17/SCID inmunocomprometidos) mediante la administración de ADC-1. El volumen de tumores subcutáneos se representó en función del tiempo después de la aleatorización y la dosificación. Se estudió la inhibición del crecimiento en ratones con un tumor subcutáneo (volumen de tumor promedio 118 mm³) de células RS4;11 xenoinjertadas mediante la administración de ADC-1, isotipo-GRM, como una dosis única (QDx1) en varias dosis (dosis 1 y dosis 2), con la dosis 2 a 2 veces la dosis de la dosis 1). Cada punto de la curva representa la media de cinco tumores. Las barras de error ilustran el error típico de la media.

FIGURAS 10A-10B: Inhibición del crecimiento de células de linfoma de células B grandes difusas xenoinjertadas (OCI-LY19) mediante varias dosis de ADC-1 en ratones humanizados inmunocompetentes huCD34+ NSG huIL-15. A, Inhibición del crecimiento de tumores OCI-LY19 xenoinjertados mediante la administración IP de mAb de isotipo, mAb de CD19, y ADC-1. El ADC-1 se administró como una dosis única (QDx1) en varios niveles de dosis (dosis 1-3, con la dosis 2 3 veces la dosis de la dosis 1, y con la dosis 3 10 veces la dosis de la dosis 1). Cada punto de la curva representa la media de cuatro o cinco tumores. Las barras de error ilustran el error típico de la media. B, Se

obtuvieron datos de citometría de flujo de células B humanas y células NK humanas, de sangrados de la vena de la cola en los puntos de tiempo indicados. Cada punto de la curva representa la media de cuatro o cinco animales. Las barras de error ilustran de la desviación estándar de la media.

FIGURA 11: El ADC-1 induce una actividad antitumoral superior en comparación con dosis altas de mAb de CD19, prednisolona sola, y mAb de CD19 y combinación de prednisolona. Inhibición del crecimiento de tumores RS4;11 xenoinjertados en ratones CB17/SCID mediante la administración de los tratamientos indicados. El volumen de tumores subcutáneos se representó en función del tiempo después de la aleatorización y la dosificación. En este estudio se usaron mAb fucosilados y ADC-1. Se usaron varios niveles de dosis (dosis 1-3, con la dosis 2 a 10 veces la dosis de la dosis 1, y con la dosis 3 a 33 1/3 veces la dosis de la dosis 1). Cada punto de la curva representa la media de cinco tumores. Las barras de error ilustran el error típico de la media.

FIGURAS 12A-12C: El ADC-1 muestra actividad antitumoral en múltiples modelos de xenoinjertos de tumores malignos de células B *in vivo* en comparación con la prednisolona o control de isotipo GRM. Los modelos de xenoinjerto A-C, DB (A), SUPB15 (B) y RS4;11 (C) se trataron con los agentes indicados. Se usaron varias dosis (dosis 1-5, con la dosis 2 a 3 1/3 veces la dosis de la dosis 1,

con la dosis 3 a 6 2/3 veces la dosis de la dosis 1, con la dosis 4 a 10 veces la dosis de la dosis 1, y con la dosis 5 a 33 1/3 veces la dosis de la dosis 1). La cepa de ratón y el número de copias de la superficie celular in vitro de CD19 para cada modelo de tumor de xenoinjerto se enumeran como se muestra.

FIGURAS 13A-13B: Eficacia antitumoral observada en 10 modelos de xenoinjerto derivado del paciente (PDX) de DLBCL. Los modelos PDX derivados de pacientes con DLBCL tipo centro germinal de células B (GCB) y no GCB se implantaron en ratones NOD-SCID y se aleatorizaron cuando los tumores alcanzaron ~200 mm³. Los ratones se trataron con ADC-1 (dosis 3, I.P) para una dosis única y el crecimiento tumoral se controló en relación con los PDX tratados con control. (A) Inhibición del crecimiento tumoral mostrada como Delta %TGI máx= $1 - (\text{volumen tumoral del grupo tratado en el día X} - \text{volumen tumoral del grupo tratado en la aleatorización}) / (\text{volumen tumoral de control en el día X} - \text{volumen tumoral de control en la aleatorización}) \times 100$. Se determinaron las diferencias máximas entre los grupos de tratamiento y control. Regresión tumoral (respondedor): >105 % delta de TGI máx. - respuesta sí/no. (B) Cambio de volumen del tumor (%) en el momento en que los tumores de control del vehículo alcanzaron 1000 mm³, calculado mediante $[(\text{volumen del tumor en el momento} / \text{volumen del tumor en la aleatorización}) - 1] \times 100$.

FIGURAS 14A-14B: Eficacia antitumoral observada en modelos PDX recurrentes R-CHOP. Los modelos PDX derivados de pacientes con DLBCL que eran de pacientes recurrentes con R-CHOP (tratados durante 4 ciclos) se implantaron en ratones NOD-SCID y se aleatorizaron cuando los tumores alcanzaron ~200 mm³. Los ratones se trataron con ADC-1 o anticuerpo CD19 en la dosis 3 (I.P) para una dosis única y se controló el crecimiento del tumor en relación con los PDX tratados con control. (A) Modelo PDX LY-24-0207, de un hombre de 38 años con GCB DLBCL, tratamiento recurrente con R-CHOP (4 ciclos) y ligera estasis con ibrutinib; y (B) PDX modelo LY-24-0016 de un hombre de 59 años de edad, DLBCL de células B activadas (ABC), tratamiento recurrente con R-CHOP (4 ciclos), resistente a ibrutinib.

FIGURA 15: El GRM y ADC-1 inducen apoptosis en líneas celulares DLBCL. Las células Farage, SU-DHL-6, OCI-LY19 se trataron con GRM o ADC-1 durante el tiempo indicado antes de la lisis celular. Los lisados se resolvieron en SDS-PAGE y se inmunotransfirieron con anticuerpos contra el regulador proapoptótico BIM y marcadores de inducción apoptótica (caspasa-3 escindida, PARP escindida). La flecha indica el producto de escisión apoptótica. Se usó GAPDH como control de carga.

FIGURA 16: Cromatograma reducido de iones totales (A280) de LC-MS de ADC-1. LC = cadena ligera, LC+2 = cadena

ligera + 2 tioles libres, DL(X) = conector de fármaco (número adjunto), HC G0 = cadena pesada con glicano G0.

7. DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente descripción proporciona conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) que comprenden un agonista del modulador de receptor de glucocorticoides enlazado a un anticuerpo anti-CD19.

7.1. Anticuerpos CD19

CD19 representa una diana de inmunoterapia atractiva para los cánceres de origen de células B debido a sus altos niveles de expresión en la mayoría de los tumores malignos de células B, que incluye DLCL, FL, CLL y ALL). Se desarrolló un anticuerpo anti-CD19 humanizado que se une específicamente al CD19 expresado en la superficie de células B y células cancerosas positivas para CD19, inhibiendo de esta manera la señalización de CD19. En una modalidad, el anticuerpo se compone de dos regiones variables de cadena pesada y dos regiones de cadena ligera. En cada región variable, hay tres CDR que permiten que el anticuerpo se una a CD19. En ambas cadenas variables, hay un total de seis CDR diferentes. Adicionalmente, el anticuerpo contiene una región constante de cadena pesada humana que comprende un Fc humano de la inmunoglobulina clase G1 (IgG1). Los anticuerpos anti-

CD19 descritos en la presente descripción pueden ser fucosilados o afucosilados y demostrar una funcionalidad in vitro, inmunoseguridad, y propiedades similares a un fármaco.

En ciertas modalidades, un anticuerpo afucosilado de la invención tiene una mayor afinidad por ciertos receptores $Fc\gamma R$ expresados en células inmunitarias. Como ejemplo, los anticuerpos IgG1 afucosilados han aumentado la unión a $Fc\gamma RIIIA$ expresado en las células NK, lo que da como resultado una mayor actividad en los ensayos ADCC de células asesinas naturales purificadas o células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en comparación con una forma fucosilada de ese anticuerpo. La actividad de ADCC de los anticuerpos anti-CD19 puede demostrarse usando técnicas de bioensayo de ADCC conocidas en la técnica. Por ejemplo, se puede usar el bioensayo de indicador de ADCC en líneas indicadoras de variantes alélicas $Fc\gamma RIIIIa$ V158 o F158 humanas (ver el Ejemplo 3).

En diversas modalidades, los anticuerpos comprenden la totalidad o una porción de una región constante de un anticuerpo. En algunas realizaciones, la región constante es un isotipo seleccionado de: IgA (p. ej., IgA1 o IgA2), IgD, IgE, IgG (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), e IgM. En modalidades específicas, los anticuerpos anti-CD19 descritos en la presente descripción comprenden una IgG1. Como se usa en la presente descripción, la

“región constante” de un anticuerpo incluye la región constante natural, alotipos o variantes.

La región constante ligera de un anticuerpo anti-CD19 puede ser una región ligera kappa (κ) o una región lambda (λ). Una región de luz λ puede ser cualquiera de los subtipos conocidos, p. ej., $\lambda 1$, $\lambda 2$, $\lambda 3$, o $\lambda 4$. En algunas modalidades, un anticuerpo anti-CD19 comprende una región ligera kappa (κ).

El término “anticuerpo monoclonal”, como se usa en la presente descripción, no se limita a anticuerpos producidos a través de tecnología de hibridoma. Un anticuerpo monoclonal deriva de un único clon, que incluye cualquier clon eucariota.

El término anticuerpo “quimérico” tal como se usa en la presente descripción se refiere a un anticuerpo que tiene secuencias variables derivadas de una inmunoglobulina no humana, tal como un anticuerpo de rata o ratón, y regiones constantes de inmunoglobulina humana, típicamente seleccionadas de un molde de inmunoglobulina humana.

Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (p. ej., murino) comprende sustancialmente la totalidad de al menos uno y, típicamente dos dominios variables, en donde todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas correspondientes de una secuencia de inmunoglobulina

humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana.

Los “anticuerpos humanos” incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulina humana o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas funcionales. Pueden realizarse anticuerpos humanos mediante una diversidad de métodos conocidos en la técnica que incluye métodos de presentación en fagos usando genotecas de anticuerpos procedentes de secuencias de inmunoglobulina humana.

Los anticuerpos anti-CD19 de la descripción incluyen moléculas de anticuerpo de longitud completa (intactas).

Los anticuerpos anti-CD19 pueden ser anticuerpos cuyas secuencias se han modificado para alterar al menos una función efectora biológica mediada por región constante. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CD19 descritos en la presente descripción incluyen anticuerpos que se han modificado para adquirir o mejorar al menos una función efectora biológica mediada por región constante con respecto a un anticuerpo no modificado, por ejemplo, para mejorar las interacciones $Fc\gamma R$ (ver, p. ej., la solicitud

de patente de los EE. UU. núm. 2006/0134709, patente de los EE. UU. núm. 8.642.292 B2) o para potenciar la capacidad del anticuerpo para mediar la ADCC. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD19 de la descripción puede tener una región constante que se une a FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIIA y/o FcγRIIIB con mayor afinidad que la correspondiente región constante de tipo salvaje. Un anticuerpo anti-CD19 de la descripción puede ser uno que tiene una región Fc modificada y media una respuesta de ADCC potenciada, en donde la respuesta de ADCC se potencia con respecto a un anticuerpo que tiene las mismas regiones variables (es decir, VH y VL) y una región Fc de IgG1 de tipo silvestre (es decir, CL, CH1, CH2 y CH3 de tipo silvestre). Los anticuerpos anti-CD19 con alta afinidad por el CD19 humano pueden ser deseables para usos terapéuticos y diagnósticos. En consecuencia, la presente descripción contempla anticuerpos que tienen una alta afinidad de unión para CD19 humano. En modalidades específicas, los anticuerpos anti-CD19 se unen a CD19 humano con una afinidad de aproximadamente 15 nM, 10 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, o 0,1 nM. En algunas modalidades, los anticuerpos se unen a CD19 humano con una afinidad en el rango de aproximadamente 0,1 nM a aproximadamente 10 nM.

En algunas modalidades, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD19 monoclonal que comprende dos conjuntos de seis regiones determinantes de la

complementariedad (CDR) diferentes, dos conjuntos de dos regiones variables diferentes, dos cadenas pesadas completas, y dos cadenas ligeras completas.

En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal IgG1 kappa afucosilado humanizado recombinante que se une a CD19 humano.

En una modalidad, el anticuerpo comprende seis CDR que comprenden las siguientes secuencias:

CDR-H1:	GFTFTTYWIN	(sec. con núm. de ident.: 1)
CDR-H2:	NIYPSDSYTNYNQKFKD	(sec. con núm. de ident.: 2)
CDR-H3:	EDYYGSSSYAMDY	(sec. con núm. de ident.: 3)
CDR-L1:	KASQDVGTA	(sec. con núm. de ident.: 4)
CDR-L2:	WASTRHT	(sec. con núm. de ident.: 5)
CDR-L3:	QQYSTYPLT	(sec. con núm. de ident.: 6)

En algunas modalidades, el anticuerpo de esta descripción comprende una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como la sec. con núm. de ident.: 1, una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como la sec. con núm. de ident.: 2; una CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como la sec. con núm. de ident.: 3, una CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como la sec. con núm. de ident.: 4, una CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como la sec. con núm. de ident.: 5; y una CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como la sec. con núm. de ident.: 6;

En algunas modalidades, el anticuerpo de esta descripción comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada como la sec. con núm. de ident.: 7: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTTYWINWVRQAPGKGLEWIGNIYPSDSY TNYNQKFKDRATLSVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTREDYYGSSSYAMDYWG QGTLVTVSS (sec. con núm. de ident.: 7); y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada como la sec. con núm. de ident.: 8: AILMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYSTYPLTFGQGTKVEIK (sec. con núm. de ident.: 8).

En algunas modalidades, el anticuerpo de esta descripción comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada como la sec. con núm. de ident.: 9 o que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada como la sec. con núm. de ident.: 9 (las regiones constantes son texto normal); el dominio pesado variable está subrayado; Las CDR están **subrayadas en negrita** (descritas como las sec. con núms. de ident.: 1-3, respectivamente, en orden de aparición) el sitio de glicosilación enlazado a N se indica con un subíndice “g”):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFTTYWIN**WVRQAPGKGLEWIG
NIYPSDSYTNYNQKFKDRATLSVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRE**DYYGSSSY**
AMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
 ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQYN₉STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
 VLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(secuencia de longitud completa descrita como la sec. con
 núm. de ident.: 9); y una cadena ligera que comprende la
 secuencia de aminoácidos mostrada como la sec. con núm. de
 ident.: 10 o que consiste en la secuencia de aminoácidos
 mostrada como la sec. con núm. de ident.: 10 (regiones
 constantes son texto normal; el dominio ligero variable está
subrayado; Las CDR están **subrayadas en negrita** (secuencias
 de CDR descritas como las sec. con núms. de ident.: 4-6,
 respectivamente, en orden de aparición)):
AILMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTYPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF
 PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS
 TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (secuencia de longitud
 completa descrita como la sec. con núm. de ident.: 10).

En una modalidad, el anticuerpo de la descripción
 comprende o consiste en una cadena ligera de acuerdo con
 la sec. con núm. de ident.: 10, y una cadena pesada de
 acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 11, que es la
 secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 9
 con la lisina del extremo terminal C truncada:
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTTYWIMWVRQAPGKGLEWIGNIYPSDSY
TNYNQKFKDRATLSVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTREDYYGSSSYAMDYWG

QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQYN_gSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
 SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(secuencia truncada de lisina terminal descrita como la sec. con núm. de ident.: 11).

En una modalidad, el anticuerpo es mAb de CD19, que tiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada establecida en la sec. con núm. de ident.: 9 o sec. con núm. de ident.: 11, y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 10.

En una modalidad, la cadena pesada del anticuerpo de esta descripción está codificada por la siguiente secuencia de nucleótidos (secuencia de longitud completa descrita como la sec. con núm. de ident.: 12):

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTCGCGATTTTAAAAGGA
GTCCAGTGCGAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTCAGCCTGGCGGAT
CTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCACCACCTACTGGATCAACTG
GGTCCGACAGGCCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGATCGGCAACATCTACCCAGCGAC
AGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCAAGGACCGGGCCACACTGAGCGTGGACAAGA
GCAAGAATACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTA
CTACTGCACCAGAGAGGACTACTACGGCAGCAGCAGCTACTACGCCATGGACTATTGG
GGCCAGGGCACCCCTGGTTACCGTTAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC
CCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGT

CAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGC
 GGCCTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCG
 TGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCA
 CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGAGACAAAACCT
 CACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCT
 TCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGT
 GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC
 GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACC
 GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA
 GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCC
 AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGA
 CCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
 CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTG
 CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT
 GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA
 CACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

Péptido señal de secreción en *cursiva*; incluye
 codón de terminación final (TGA); la región constante está
 en **negrita**; las CDR están subrayadas.

En una modalidad, la cadena ligera del anticuerpo
 de esta descripción se codifica por la siguiente secuencia
 de nucleótidos (secuencia de longitud completa descrita
 como la sec. con núm. de ident.: 13):
 ATGGACATGCGCGTGCCCGCCCAGCTGCTGGGCCTGCTGCTGCTGTGGTTCCCCGGC
 TCGCGATGCGCCATCCTGATGACACAGAGCCCTTCTAGCCTGAGCGCCAGCGTGGA
 GACAGAGTGACCATCACCTGTAAAGCCAGCCAGGATGTGGGAACAGCCGTGGCCTGG

TATCAGCAGAAGCCTGGAAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACTTGGGCCAGCACAAGA
CACACAGGCGTGCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTG
 ACCATATCTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGC
ACATACCCTCTGACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCT
GCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGGC
TCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAG
GTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGC
AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAG
AAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACA
AAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

Péptido señal de secreción en *cursiva*; incluye codón de terminación final (TGA); la región constante está en **negrita**; las CDR están subrayadas.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada humana que comprende un dominio de CH1 humano, una bisagra humana, un CH2 humano, y un CH3 humano. En algunas modalidades, la región constante de cadena pesada codificada comprende una porción Fc, en donde la porción Fc es un isotipo humano IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, o IgM. En una modalidad, la Fc es una IgG1, y el alotipo es z no a. En una modalidad, la cadena ligera es una cadena ligera kappa.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región constante Fc de IgG1 que está afucosilada. La afucosilación puede llevarse a cabo mediante técnicas conocidas en la técnica. Ver, p. ej., Mol Cancer Ther (2020)

19 (5): 1102-1109) y PNAS (2013)110(14) 5404-5409. Por ejemplo, la producción de anticuerpos en líneas celulares defectuosas en la formación de GDP-fucosa debido, por ejemplo, una deficiencia en GDP-manosa 4,6-deshidratasa; producción de anticuerpos en células que tienen niveles reducidos de fucosiltransferasa; producción de anticuerpos en células que tienen niveles reducidos de transportador de GDP-fucosa; producción de anticuerpos en células que sobreexpresan β -1,4-manosil-glicoproteína 4- β -N-acetilglucosaminiltransferasa (GnT-III); o producción de anticuerpos en células que expresan una GDP-6-desoxi-D-lixo-4-hexulosa reductasa (RMD) bacteriana. En una modalidad, las células usadas para producir los anticuerpos anti-CD19 afucosilados de la invención son células CHO diseñadas genéticamente para expresar Pseudomonas RMD. El grado de afucosilación de anticuerpos puede determinarse mediante técnicas conocidas en la técnica. Típicamente, el anticuerpo está afucosilado en 70 % o más, 80 % o más, 90 % o más, o aproximadamente 99 %, o aproximadamente 100 %. Preferentemente, el grado de afucosilación es igual o mayor que 90 %. En algunas modalidades, el anticuerpo está afucosilado en 70 % o más, 80 % o más, 90 % o más, o aproximadamente 100 % en la posición ASN-303 de la SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 11 (EU: ASN-297). La afucosilación se puede determinar mediante técnicas de ensayo de cromatografía de interacción hidrófila (HILIC), en las que

el grado de afucosilación se determina mediante la separación dependiente de la polaridad de los anticuerpos fragmentados.

En una modalidad, las especies de glicanos afucosilados totales se determinan mediante el análisis de los glicanos enlazados a N liberados por HILIC con detección fluorescente. Los glicanos se liberan usando el péptido N-glucosidasa F (PNGaseF) y posteriormente se marcan con una etiqueta fluorescente. Los glicanos enlazados a N etiquetados con fluorescencia se analizan mediante HILIC con detección de fluorescencia. El porcentaje de especies de glicanos afucosilados se determina basado en la suma de las áreas de los picos de todos los picos de glicanos afucosilados en relación con el área total de los picos de todos los picos de glicanos en el cromatograma. Todos los picos con una abundancia relativa de 0,5 % o superior se incluyen en la determinación del porcentaje de especies de glicanos afucosilados.

La presente descripción abarca moléculas de polinucleótido que codifican genes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina para anticuerpos anti-CD19, vectores que comprenden tales polinucleótidos, y células huésped capaces de producir los anticuerpos anti-CD19 de la descripción.

Un anticuerpo anti-CD19 de la descripción se puede preparar por expresión recombinante de los genes de cadena ligera y cadena pesada de inmunoglobulina en una

célula huésped. Para expresar un anticuerpo en forma recombinante, se transfecta una célula huésped con uno o más vectores de expresión recombinantes que portan fragmentos de ADN que codifican para las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina del anticuerpo, de tal manera que las cadenas ligera y pesada se expresan en la célula huésped y, opcionalmente, se secretan al medio en el que se cultivan las células huéspedes, y los anticuerpos se pueden recuperar a partir de dicho medio.

Para generar polinucleótidos que codifican tales anticuerpos anti-CD19, primero se obtienen los fragmentos de ADN que codifican las regiones variables de la cadena ligera y pesada. Estos ADN se pueden obtener por amplificación y modificación de ADN de línea germinal o ADNc que codifica para las secuencias variables de cadena ligera y pesada, por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Una vez obtenidos los fragmentos de ADN que codifican los segmentos VH y VL relacionados anti-CD19 estos fragmentos de ADN se pueden manipular de manera adicional mediante técnicas de ADN recombinante convencionales, por ejemplo, para convertir los genes de región variable en genes de cadena de anticuerpo de longitud completa, en genes de fragmento Fab o en un gen de scFv. En estas manipulaciones, se liga operativamente un fragmento de ADN que codifica VL o VH con otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal

como una región constante o un conector flexible del anticuerpo. El término “conectado en forma operativa,” tal como se usa en este contexto, significa que los dos fragmentos de ADN se unen en una forma en que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en el mismo marco de lectura.

El ADN aislado que codifica la región VH se puede convertir en un gen de la cadena pesada de longitud completa ligando operativamente el ADN que codifica VH a otra molécula de ADN que codifica las regiones constantes de la cadena pesada (CH1, CH2, CH3 y, opcionalmente, CH4). Las secuencias de genes de región constante de cadena pesada humana se conocen en la técnica (ver, p. ej., Kabat, E. A., et al., (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación del NIH núm. 91-3242) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones pueden obtenerse mediante amplificación convencional por la PCR. La región constante de la cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero en ciertas modalidades es una IgG1 o IgG4. Para un gen de la cadena pesada de Fab fragmento, el ADN que codifica VH se puede ligar operativamente a otra molécula de ADN que solamente codifica la región constante CH1 de la cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región VL se puede convertir en un gen de la cadena ligera de longitud completa (así como un gen de la cadena ligera de Fab) ligando operativamente el ADN que codifica VL en otra molécula de ADN que codifica la región constante de la cadena ligera, CL. Las secuencias de genes de región constante de las cadenas ligeras humanas se conocen en la técnica (ver, p. ej., Kabat, et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación del NIH núm. 91-3242) y los fragmentos de ADN que comprenden estas regiones se pueden obtener por amplificación estándar por PCR. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda, pero en ciertas modalidades es una región constante kappa.

Para expresar los anticuerpos anti-CD19 de la descripción, los ADN que codifican para las cadenas ligera y pesada parciales o de longitud completa, obtenidos como se describió previamente, se insertan en vectores de expresión de forma que los genes se conectan operativamente a secuencias de control de la transcripción y traducción. En este contexto, el término “conectado en forma operativa” significa que un gen de anticuerpo se liga a un vector de forma que las secuencias de control de la transcripción y traducción dentro del vector cumplen con su función pretendida de regular la transcripción y la traducción del

gen del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se seleccionan para ser compatibles con su expresión en la célula huésped usada. El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo se pueden insertar en vectores separados o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión.

Los genes del anticuerpo se insertan en el vector de expresión por métodos convencionales (p. ej., ligadura de los sitios de restricción complementarios sobre el fragmento y el vector del gen del anticuerpo, o ligadura de extremos romos si no están presentes sitios de restricción). Antes de la inserción de las secuencias de cadena ligera o cadena pesada relacionadas con el anticuerpo anti-CD19, el vector de expresión ya puede contener secuencias de regiones constantes de anticuerpo. Por ejemplo, una estrategia para convertir las secuencias de VH y VL relacionadas con el anticuerpo monoclonal anti-CD19 a los genes de longitud completa del anticuerpo es insertarlos en vectores de expresión que ya codifican para la región constante de cadena pesada y las regiones constantes de cadena ligera, respectivamente, de forma que el segmento VH se conecta en forma operativa al o a los segmentos CH dentro del vector, y el segmento VL se conecta en forma operativa al segmento CL dentro del vector. Adicionalmente, o como alternativa, el vector de expresión

recombinante puede codificar un péptido señal que facilite la secreción de la cadena de anticuerpo desde una célula huésped. El gen de la cadena del anticuerpo se puede clonar en el vector de tal manera que el péptido señal se enlaza en el marco con el extremo amino del gen de la cadena del anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no inmunoglobulina).

Además de los genes de cadena del anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la descripción portan secuencias regulatorias que controlan la expresión de los genes de cadena del anticuerpo en una célula huésped. El término “secuencia regulatoria” tiene como intención incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (p. ej., señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de cadena del anticuerpo.

Además de los genes de las cadenas del anticuerpo y secuencias regulatorias, los vectores de expresión recombinantes de la descripción pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células huéspedes (p. ej., orígenes de replicación) y genes marcadores de selección. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células huésped en las que se ha introducido el vector. Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, el(los)

vector(es) de expresión que codifican para las cadenas pesada y ligera se transfectan en una célula huésped mediante técnicas estándares. Las diferentes formas del término “transfección” tienen como intención abarcar una variedad amplia de técnicas comúnmente usadas para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procariota o eucariota, p. ej., electroporación, lipofección, precipitación con fosfato de calcio, transfección con dextrano-DEAE y lo similar.

En ciertas modalidades, la expresión de anticuerpos se realiza en células eucariotas, p. ej., células huéspedes de mamífero, de secreción óptima de un anticuerpo activo inmunológicamente y plegado de manera apropiada. Células huésped de mamífero ilustrativas para expresar los anticuerpos recombinantes de la descripción incluyen ovario de hámster chino (células CHO) (que incluye células DHFR-CHO), descritas en Urlaub y Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, usado con un marcador seleccionable DHFR, p. ej., como se describe en Kaufman y Sharp, 1982, Mol. Biol. 159:601-621), células de mieloma NS0, células COS y células SP2. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican para genes de anticuerpo se introducen en células huéspedes de mamífero, los anticuerpos se producen por cultivo de las células huéspedes durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células

huéspedes o la secreción del anticuerpo al medio de cultivo en el cual se cultivan las células huéspedes. Las células huéspedes también se pueden usar para producir porciones de anticuerpos intactos, tales como fragmentos Fab o moléculas scFv. Se entiende que, dentro del alcance de la presente descripción, se incluyen variaciones del procedimiento anterior. Por ejemplo, se puede desear la transfección de una célula huésped con ADN que codifica para la cadena ligera o para la cadena pesada (pero no ambas) de un anticuerpo anti-CD19 de esta descripción.

La tecnología de ADN recombinante también se puede usar para eliminar parte o todo el ADN que codifica para una o ambas de las cadenas ligera y pesada que no es necesario para la unión a CD19 humano. Las moléculas expresadas a partir de tales moléculas de ADN truncadas también quedan comprendidas por los anticuerpos de la descripción.

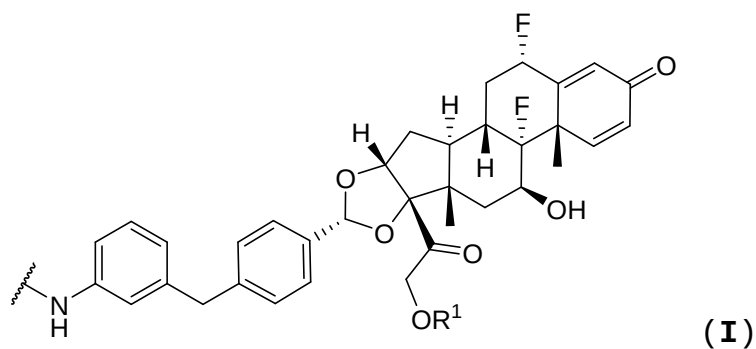
Para la expresión recombinante de un anticuerpo anti-CD19 de la descripción, la célula huésped puede cotransfectarse con dos vectores de expresión de la descripción, el primer vector que codifica un polipéptido derivado de la cadena pesada y el segundo vector que codifica un polipéptido derivado de la cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores idénticos de selección, o cada uno puede contener un marcador de selección separado. Alternativamente, se puede usar un

vector individual el cual codifica para polipéptidos de cadena pesada y ligera.

7.2. Anticuerpos anti-CD19 enlazados a un modulador del receptor de glucocorticoides

En la presente descripción se proporcionan conjugados de fármaco-anticuerpo (ADC) que comprenden un agonista modulador del receptor de glucocorticoides (GRM) enlazado a un anticuerpo anti-CD19.

En ciertas modalidades, se proporcionan conjugados anticuerpo-fármaco que comprenden: (a) un anticuerpo anti-CD19; y (b) un modulador de receptor de glucocorticoides de la Fórmula (I):



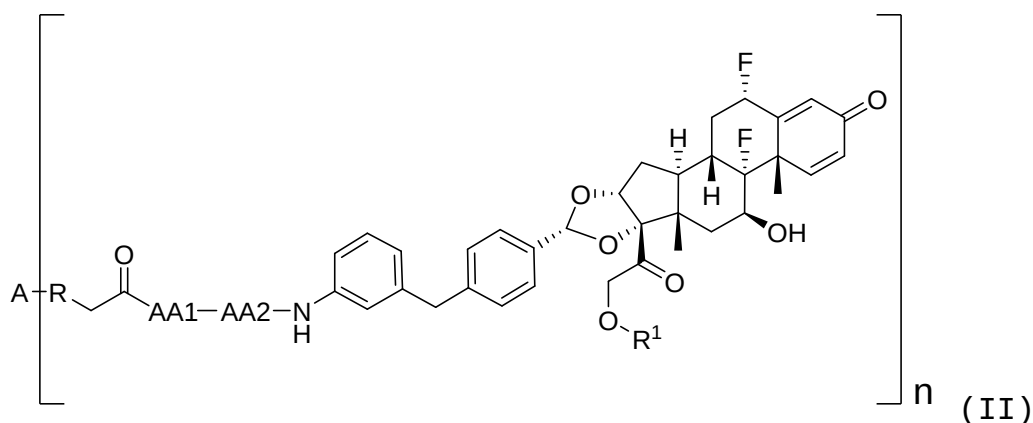
en donde:

R^1 es hidrógeno o $-P(=O)(OH)_2$; y

además en donde el anticuerpo está conjugado con el modulador del receptor de glucocorticoides mediante un enlazador de la fórmula:

en donde R es el punto de acoplamiento del anticuerpo al enlazador a través de un residuo de cisteína del anticuerpo que proporciona un grupo -S- cuando se enlaza. AA1 y AA2 son alanina (Ala), y p y q son 1.

En ciertas modalidades, se proporcionan conjugados fármaco-anticuerpo de la Fórmula (II):



en donde:

A es un anticuerpo anti-CD19, R es el punto de acoplamiento del anticuerpo al enlazador a través de un residuo de cisteína del anticuerpo que proporciona un grupo -S- cuando se enlaza, AA1 y AA2 son alanina (Ala), R¹ es hidrógeno o -P(=O)(OH)₂, y n es de 2 a 10. En modalidades, n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10. En modalidades, n es 2, 3, 4, 5, 6, 7, o 8. En otra modalidad, n es 1, 2, 3, 4, o 5. En otra

modalidad, n es 2, 3, 4, o 5. En una modalidad, n es 2, 4, 6, o 8. En otra modalidad, n es 2, 4 o 6. En otra modalidad, n es 1. En otra modalidad, n es 2. En otra modalidad, n es 3. En otra modalidad, n es 4. En otra modalidad, n es 5. En otra modalidad, n es 6. En otra modalidad, n es 7. En otra modalidad, n es 8.

En ciertas modalidades, el anticuerpo anti-CD19 del ADC comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) establecidas como la sec. con núm. de ident.: 1, sec. con núm. de ident.: 2, sec. con núm. de ident.: 3, sec. con núm. de ident.: 4, sec. con núm. de ident.: 5, y sec. con núm. de ident.: 6. En ciertas modalidades, el anticuerpo anti-CD19 comprende una región variable de cadena pesada establecida como la sec. con núm. de ident.: 7 y una región variable de cadena ligera establecida como la sec. con núm. de ident.: 8. En ciertas modalidades, el anticuerpo anti-CD19 comprende una cadena pesada establecida como la sec. con núm. de ident.: 9 o la sec. con núm. de ident.: 11 y una cadena ligera establecida como la sec. con núm. de ident.: 10 y n es principalmente 2, 4 y 6. En una modalidad, el ADC es ADC-1, en el que el anticuerpo es CD19 de mAb. En ciertas modalidades, la cadena pesada del anticuerpo anti-CD19 se codifica por la secuencia de nucleótidos establecida como la sec. con núm. de ident.: 12 y la cadena ligera está codificada por la

secuencia de nucleótidos establecida como la sec. con núm. de ident.: 13.

7.3. Composiciones

Los ADC agonistas de GRM de anti-CD19 de esta descripción se pueden proporcionar como una composición adecuada para la administración a un sujeto. En algunas modalidades, la composición de ADC agonista de GRM de anti-CD19 es una composición farmacéutica, que comprende un ADC agonista de GRM de anti-CD19 de la presente descripción y un portador farmacéuticamente aceptable.

Una composición de ADC puede comprender una mezcla de ADC que tienen diferentes valores de n enteros, de acuerdo con la fórmula estructural II. El número de fármacos agonistas de GRM enlazados a un ADC depende del número de sitios de acoplamiento disponibles en el anticuerpo. La “relación fármaco a anticuerpo” o “DAR”, como se usa en la presente descripción, se refiere a la relación molar de fármacos de GRM al anticuerpo en la composición de ADC.

En las modalidades, la formulación consiste esencialmente en una mezcla de las ADC de acuerdo con la fórmula estructural II que tiene valores de n de 2, 4 y 6, y la DAR está entre 2 y 6.

7.4. Métodos de uso

En ciertas modalidades, los métodos descritos en la presente descripción implican el tratamiento de pacientes que tienen neoplasias malignas de células B, tal como linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), leucemia linfoblástica aguda (ALL), linfoma folicular (FL) y leucemia linfocítica crónica (CLL) con un ADC agonista de GRM de CD19. En modalidades, una composición que comprende un ADC agonista de GRM de CD19 se administra a un sujeto que lo necesita. En modalidades, el método comprende la administración de un ADC que da como resultado el suministro del compuesto de la Fórmula III, el compuesto de la Fórmula IV, o los compuestos de ambas Fórmulas III y IV al sujeto. En modalidades, el compuesto de la Fórmula III, el compuesto de la Fórmula IV, o los compuestos de ambas Fórmulas III y IV se administran a una neoplasia maligna de células B dentro de un sujeto.

Dados como agente único, los ADC agonistas de CD19-GRM inhiben el crecimiento de xenoinjertos subcutáneos de líneas de células tumorales humanas derivadas de neoplasias malignas de células B, ver los ejemplos relacionados con el linfoma difuso de células B grandes (DLBCL: OCI-LY19 y SU-DHL-6; ver las Figuras 8 y 10) y la leucemia linfoblástica aguda (ALL: RS4;11; ver la Figura 9.

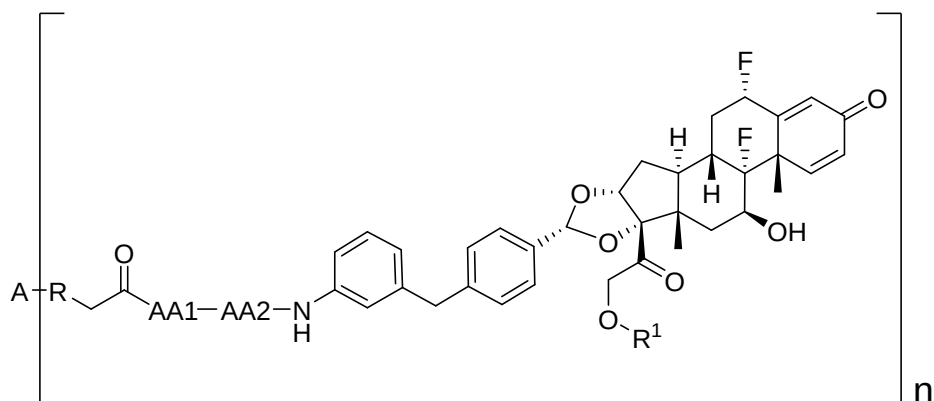
7.5. Proceso para producir ADC anti-CD19

En ciertas modalidades, se describe en la presente un proceso para producir un ADC agonista anti-CD19-GrM. En una modalidad específica, en la presente se describe un proceso para producir un ADC agonista anti-CD19-GRM, en el que el anticuerpo es un anticuerpo anti-CD19 que comprende dos cadenas pesadas, cada una de las cuales consiste en la secuencia de aminoácidos establecida como sec. con núm. de ident. sec. con núm. de ident.: 9 o sec. con núm. de ident.: 11, y dos cadenas ligeras que consisten cada una en la secuencia de aminoácidos establecida como sec. con núm. de ident.: 10; en donde el anticuerpo está afucosilado en la posición ASN-303 (EL: ASN-297). en donde el método comprende reducir un anticuerpo con un exceso de agente reductor y después conjugar el anticuerpo con un exceso del enlazador de fármaco de la Fórmula V.

8. Modalidades ilustrativas

Aunque se han ilustrado y descrito diversas modalidades específicas, y algunas están representadas a continuación, se apreciará que se pueden realizar diversos cambios sin apartarse del espíritu y alcance de las invenciones.

1. Un conjugado fármaco-anticuerpo anti-CD19 que comprende la siguiente estructura:



en donde:

A es un anticuerpo;

R es el punto de acoplamiento del anticuerpo a través de un residuo de cisteína del anticuerpo que proporciona un grupo -S- cuando se enlaza;

AA1 y AA2 son alanina (Ala);

R¹ es hidrógeno o -P(=O)(OH)₂;

n es un número entero de 1 a 10;

en donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-CD19 que comprende

una región variable de cadena pesada que comprende un dominio CDR-H1, dominio CDR-H2, y un dominio CDR-H3; y

una región variable de cadena ligera que comprende un dominio CDR-L1, un

dominio CDR-L2, y un dominio CDR-L3,
en donde

CDR-H1 comprende la secuencia de
aminoácidos GFTFTTYWIN (sec. con
núm. de ident.: 1),

CDR-H2 comprende la secuencia de
aminoácidos NIYPSDSYTNYNQKFKD (sec.
con núm. de ident.: 2),

CDR-H3 comprende la secuencia de
aminoácidos EDYYGSSSYAMDY (sec. con
núm. de ident.: 3);

CDR-L1 comprende la secuencia de
aminoácidos KASQDVGTAVA (sec. con
núm. de ident.: 4),

CDR-L2 comprende la secuencia de
aminoácidos WASTRHT (sec. con núm.
de ident.: 5), y

CDR-L3 comprende la secuencia de
aminoácidos QQYSTYPLT (sec. con núm.
de ident.: 6).

2. El conjugado fármaco-anticuerpo anti-CD19 de la modalidad 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG.
3. El conjugado fármaco-anticuerpo anti-CD19 de la modalidad 2, en donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG1.

4. El conjugado fármaco-anticuerpo anti-CD19 de la modalidad 1, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida como la sec. con núm. de ident.: 7 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida como la sec. con núm. de ident.: 8.
5. El conjugado de fármaco-anticuerpo anti-CD19 de la modalidad 1, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida como la sec. con núm. de ident.: 9 o sec. con núm. de ident.: 11, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida como la sec. con núm. de ident.: 10.
6. El conjugado fármaco-anticuerpo anti-CD19 de la modalidad 1, en donde el anticuerpo consiste en dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas, en donde cada cadena pesada consiste en la secuencia de aminoácidos establecida como la sec. con núm. de ident.: 9 o sec. con núm. de ident.: 11, y en donde cada cadena ligera consiste

en la secuencia de aminoácidos establecida como la sec. con núm. de ident.: 10.

7. El conjugado fármaco-anticuerpo anti-CD19 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-6, en donde el anticuerpo está afucosilado.
8. El conjugado fármaco-anticuerpo anti-CD19 de acuerdo con la modalidad 7, en donde el anticuerpo es 70 % o más, 80 % o más, 90 % o más, o aproximadamente 99 %, o aproximadamente 100 % afucosilado.
9. El conjugado fármaco-anticuerpo anti-CD19 de acuerdo con la modalidad 7 o modalidad 8, en donde la afucosilación está en la posición ASN-303 de la SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 11 (EU: ASN-297).
10. Una composición farmacéutica que comprende un conjugado fármaco-anticuerpo anti-CD19 de una cualquiera de las modalidades 1-9 y un portador farmacéuticamente aceptable.
11. Un método para tratar una neoplasia maligna de células B, el método que comprende administrar un conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-9 a un paciente que lo necesita.

12. El conjugado fármaco-anticuerpo anti-CD19 de una cualquiera de las modalidades 1-9, en donde n es 2, 4 o 6.
13. El conjugado fármaco-anticuerpo anti-CD19 de una cualquiera de las modalidades 1-9, en donde n es 2.
14. El conjugado fármaco-anticuerpo anti-CD19 de una cualquiera de las modalidades 1-9, en donde n es 4.
15. El conjugado fármaco-anticuerpo anti-CD19 de una cualquiera de las modalidades 1-9, en donde n es 6.
16. Un anticuerpo anti-CD19 que comprende
 - una región variable de cadena pesada que comprende un dominio CDR-H1, dominio CDR-H2, y un dominio CDR-H3; y
 - una región variable de cadena ligera que comprende un dominio CDR-L1, un dominio CDR-L2, y un dominio CDR-L3, en donde
 - CDR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos GFTFTTYWIN (sec. con núm. de ident.: 1),
 - CDR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos NIYPSDSYTNYNQKFKD (sec. con núm. de ident.: 2),

CDR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos EDYYGSSSYAMDY (sec. con núm. de ident.: 3);

CDR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos KASQDVGTAVA (sec. con núm. de ident.: 4),

CDR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos WASTRHT (sec. con núm. de ident.: 5), y

CDR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos QQYSTYPLT (sec. con núm. de ident.: 6).

17. El anticuerpo anti-CD19 de la modalidad 16, en donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG.
18. El anticuerpo anti-CD19 de la modalidad 17 en donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG1.
19. El anticuerpo anti-CD19 de acuerdo con la modalidad 16, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida como la sec. con núm. de ident.: 7 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida como la sec. con núm. de ident.: 8.

20. El anticuerpo anti-CD19 de acuerdo con la modalidad 16, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida como la sec. con núm. de ident.: 9 o sec. con núm. de ident.: 11, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida como la sec. con núm. de ident.: 10.
21. El anticuerpo anti-CD19 de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 16-20, en donde el anticuerpo está afucosilado.
22. El anticuerpo anti-CD19 de acuerdo con la modalidad 21, en donde el anticuerpo es 70 % o más, 80 % o más, 90 % o más, o aproximadamente 99 %, o aproximadamente 100 % afucosilado.
23. El anticuerpo anti-CD19 de acuerdo con la modalidad 21 o modalidad 22, en donde la afucosilación está en la posición ASN-303 de la SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 11 (EU: ASN-297).
24. El anticuerpo anti-CD19 de acuerdo con la modalidad 16 o 19, en donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG1, anticuerpo IgG2, anticuerpo IgG3, anticuerpo IgG4, anticuerpo humanizado, anticuerpo monocatenario,

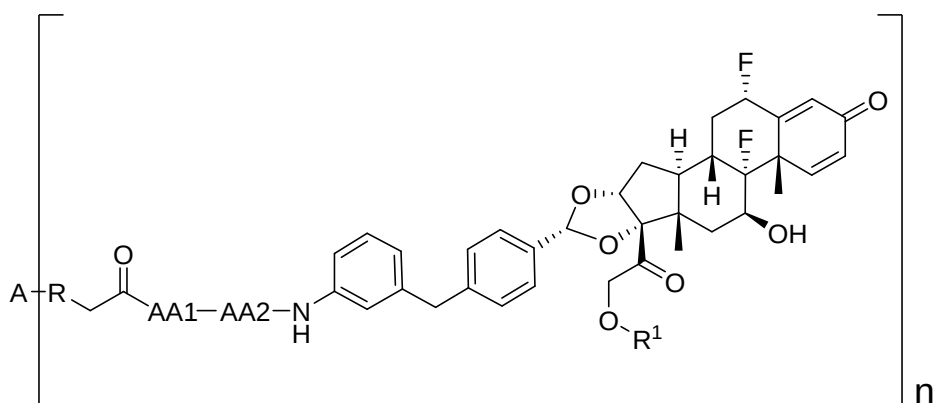
anticuerpo de dominio único, anticuerpo camélido, anticuerpo scFv-Fc, Fab, Fab', (Fab')₂, Fv o un scFv.

25. El anticuerpo anti-CD19 de acuerdo con la modalidad 24, en donde el anticuerpo está afucosilado.

26. El anticuerpo anti-CD19 de acuerdo con la modalidad 25, en donde el anticuerpo es 70 % o más, 80 % o más, 90 % o más, o aproximadamente 99 %, o aproximadamente 100 % afucosilado.

27. El anticuerpo anti-CD19 de acuerdo con la modalidad 25 o modalidad 26, en donde la afucosilación está en la posición ASN-303 de la SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 11 (EU: ASN-297).

28. Un conjugado fármaco-anticuerpo anti-CD19 que comprende la siguiente estructura:



en donde:

A es un anticuerpo;

R es el punto de acoplamiento del anticuerpo a través de un residuo de cisteína del anticuerpo que proporciona un grupo -S- cuando se enlaza;

AA1 y AA2 son alanina (Ala);

R^1 es $-P(=O)(OH)_2$;

n es un número entero de 2 a 8;

en donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-CD19 que comprende

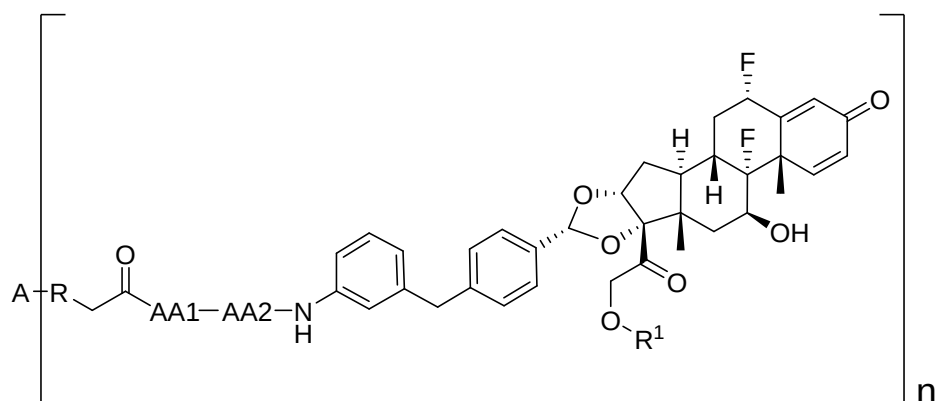
dos cadenas pesadas que consiste cada una en la secuencia de aminoácidos establecida como la sec. con núm. de ident.: 9 o la sec. con núm. de ident.: 11, y dos cadenas ligeras que consiste cada una en la secuencia de aminoácidos establecida como la sec. con núm. de ident.: 10.

en donde el anticuerpo está afucosilado en la posición ASN-303 (EU: ASN-297).

29. El anticuerpo anti-CD 19 de acuerdo con la modalidad 28, en donde n es 2.

30. El anticuerpo anti-CD 19 de acuerdo con la modalidad 28, en donde n es 4.

31. El anticuerpo anti-CD 19 de acuerdo con la modalidad 28, en donde n es 6.
32. El anticuerpo anti-CD 19 de acuerdo con la modalidad 28, en donde n es 8.
33. Uno o más polinucleótidos que codifican el anticuerpo anti-CD 19 de acuerdo con la modalidad 16.
34. Un proceso para producir un conjugado fármaco-anticuerpo anti-CD 19 que comprende la siguiente estructura:



en donde:

A es un anticuerpo;

R es el punto de acoplamiento del anticuerpo a través de un residuo de cisteína del anticuerpo que proporciona un grupo -S- cuando se enlaza;

AA1 y AA2 son alanina (Ala);

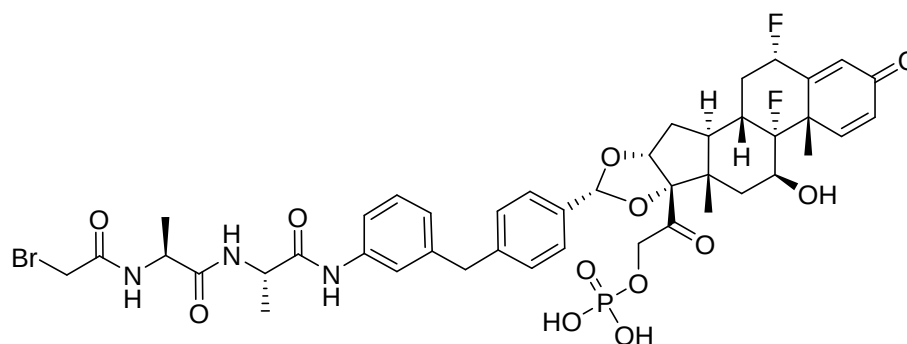
R^1 es $-P(=O)(OH)_2$;

n es un número entero de 2 a 8;

en donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-CD19 que comprende

HOJA DE RECTIFICACIÓN (REGLA 91) ISA/EP
 dos cadenas pesadas que consiste
 cada una en la secuencia de
 aminoácidos establecida como la sec.
 con núm. de ident.: 9 o la sec. con
 núm. de ident.: 11, y dos cadenas
 ligeras que consiste cada una en la
 secuencia de aminoácidos establecida
 como la sec. con núm. de ident.: 10.
 en donde el anticuerpo está afucosilado
 en la posición ASN-303 (EU: ASN-297).

en donde el proceso comprende las
 etapas de reducir el anticuerpo con
 un exceso de agente reductor seguido
 de conjugar el anticuerpo con un
 exceso del enlazador de fármaco que
 comprende la siguiente estructura:



9. Ejemplos

Los siguientes ejemplos, que destacan determinadas características y propiedades de las modalidades ilustrativas de los anticuerpos y los fragmentos de unión que se describen en la presente descripción se proveen con el propósito de ilustración.

9.1. Ejemplo 1: Generación de anticuerpos de CD19

Se aisló un anticuerpo de CD19 que consiste en las regiones determinantes de la complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) de un clon de anticuerpo murino 4B12 (CD19 antihumano de ratón) usando tecnología de hibridoma. Estas secuencias de CDR (sec. con núm. de ident.: 1-6) se clonaron en dominios de región constante de cadena pesada de IgG1 humana y de cadena ligera kappa humana con nueve mutaciones posteriores del marco de la cadena pesada variable murina y dos mutaciones posteriores del marco de la cadena ligera variable murina para generar la cadena H (sec. con núm. de ident.: 9) y secuencias de cadena L (sec.

con núm. de ident.: 10). El anticuerpo CD19 humanizado (mAb de CD19) conserva la potencia de unión a CD19 y la selectividad del clon de hibridoma de ratón parental 4B12.

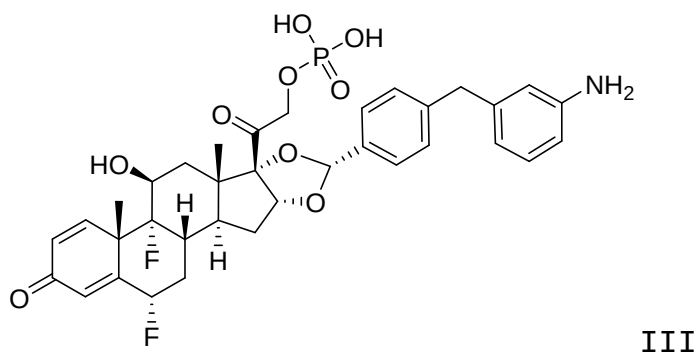
Se transfectaron células de ovario de hámster chino (CHO) mediante electroporación con un vector de expresión (anticuerpo pCD-CD19) diseñado para expresar el anticuerpo CD19. Las células se cultivaron en medio químicamente definido que permite la selección de células que expresan DHFR del vector de expresión y el anticuerpo CD19. Se cultivaron las células y se analizó el crecimiento clonal para determinar la expresión del anticuerpo anti-CD19. Basado en la selección, se identificó un transfectante estable como la línea celular parental para un mayor desarrollo.

Después, este transfectante estable se transfectó con un vector adicional (pYH9neo-RMD, que expresa la enzima de *Pseudomonas* GDP-6-desoxi-D-lixo-4-hexulosa reductasa (RMD)) mediante electroporación. Este vector de expresión permite la producción de anticuerpo CD19 afucosilado (mayor que o igual a 90 % de afucosilado) en una línea celular defectuosa en la formación de GDP-fucosa, debido, por ejemplo, a una deficiencia en GDP-manosa 4,6-deshidratasa. Las células clonales se seleccionaron para determinar el crecimiento y la expresión del anticuerpo CD19 afucosilado. Se seleccionó un subclon final y se generó un banco de célula maestro.

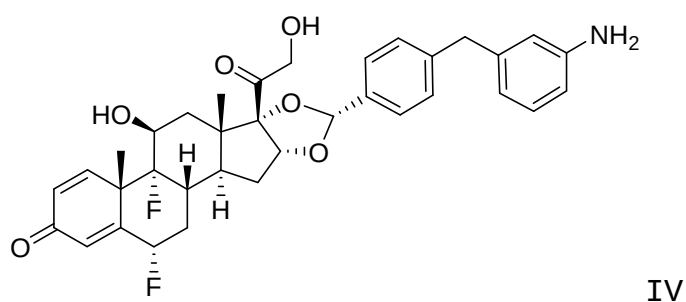
9.2. Ejemplo 2: Síntesis de ADC-1, un ADC del agonista de GRM CD19

9.2.1. Introducción

Se formó un ADC del agonista de GRM de CD19 mediante la conjugación de un anticuerpo anti-CD19 del Ejemplo 1 (a un fármaco enlazador que contiene el GRM de la Fórmula I en el donde R^1 es un grupo fosfato). La carga útil de fosfato-GRM de la Fórmula (III):



se conjuga con el anticuerpo CD19 a través de un enlazador escindible alanina-alanina. Tras la administración del ADC, la carga útil de fosfato-GRM de la Fórmula III se convierte en GRM de la Fórmula IV:



El material conjugado se procesa usando cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC, por sus siglas en inglés) para reducir sustancialmente los anticuerpos que contienen 0 fármacos enlazadores conjugados y los ADC que contienen 8 moléculas de GRM por anticuerpo, lo que da como resultado que el producto farmacológico final comprenda una mezcla de ADC que contiene principalmente 2, 4 o 6 moléculas de GRM, con un DAR de entre 2 y 6.

Los procedimientos analíticos usados para generar ADC-1, un ADC agonista de GRM de CD19, se describen en detalle a continuación.

9.2.2. Procedimientos analíticos de moléculas pequeñas

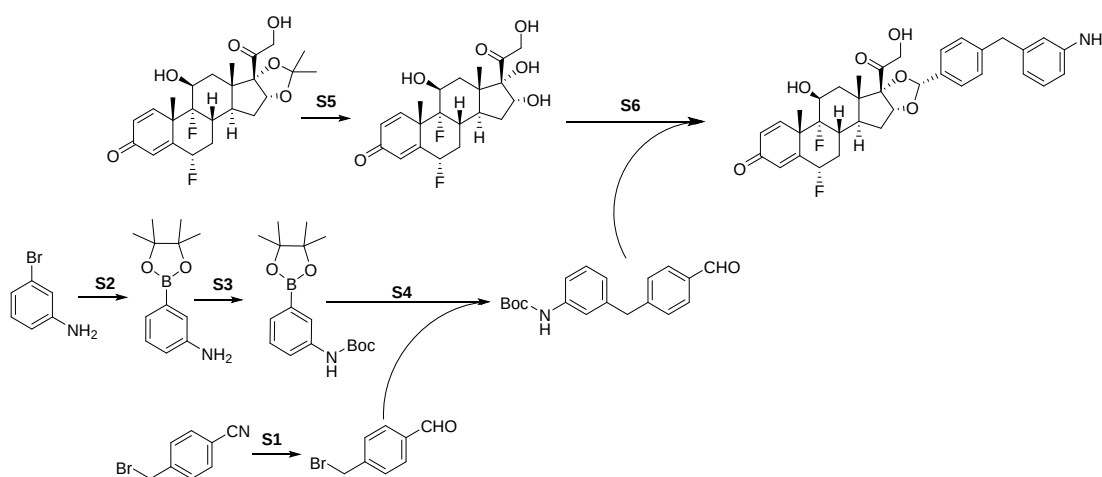
A menos que se indique de cualquier otra manera, todos los datos de RMN (resonancia magnética nuclear) de ^1H y ^{13}C se recopilaron en un instrumento Varian Mercury Plus de 400 MHz, Agilent MR de 400 MHz o Bruker AVIII de 300, 400, 500, o 600 MHz; los cambios químicos se indican en partes por millón (ppm). Los datos analíticos de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y LCMS o bien se detallan dentro del experimento o hacen referencia a las condiciones enumeradas en la Tabla 1.

Tabla 1. Lista de métodos de LCMS y HPLC	
Método	Condiciones
a	Condiciones de LCMS. El gradiente fue 1-90 % de B en 3,4 min, 90-100 % de B en 0,45 min, 100-1 % de B en 0,01 min, y después se mantuvo en 1 % de B durante 0,65 min (velocidad de flujo de 0,8 ml/min). La fase móvil A fue 0,0375 % de ácido trifluoroacético en H ₂ O, la fase móvil B fue 0,018 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo. La columna utilizada para la cromatografía fue una columna Phenomenex Luna-C18 de 2,0 X 50 mm (partículas de 5 µm). Los métodos de detección son detector de haz de diodos (DAD) y detector de dispersión de luz por evaporación (ELSD), así como ionización por electrospray positiva (MS).
b	Condiciones de LCMS: La fase móvil A fue 0,037 % de TFA en agua, y la fase móvil B fue 0,018 % de TFA en acetonitrilo de grado HPLC. El gradiente fue 5-95 % de B en 2,00 min, 5 % B en 0,01 min, 5-95 % de B (0,01-1,00 min), 95-100 % de B (1,00 -1,80 min), 5 % de B en 1,81 min con mantenimiento al 5 % de B durante 0,19 min. La velocidad de flujo fue 1,0 ml/min (0,00-1,80 min) y 1,2 ml/min (1,81 -2,00 min). La columna usada para la cromatografía fue una Luna-C18 de 2,0 x 30 mm (partículas de 3 µm). El rango de MS fue 100-2000. Los métodos de detección fueron con un detector de matriz de diodos (DAD). El modo MS fue ionización por electropulverización positiva.
c	Condiciones de LCMS: Se usó un gradiente de 5-100 % de acetonitrilo (A) y 0,1 % de ácido trifluoroacético en agua (B), a una velocidad de flujo de 1,5 ml/min (0-0,05 min 5 % de A, 0,05-1,2 min 5-100 % de A, 1,2-1,4 min 100 % de A, 1,4-1,5 min 100-5 % de A, 0,25 min de retraso después de la ejecución). La LC-MS analítica se realizó en un espectrómetro de masas Thermo MSQ-Plus y un sistema HPLC Agilent 1100/1200 con Xcalibur 2,0.7, Open-Access 1,4, y software de inicio de sesión personalizado. El espectrómetro de masas se operó en condiciones de ionización APCI o ESI positivas dependiendo del sistema usado. El sistema de HPLC comprendía una bomba binaria Agilent, un desgasificador, un compartimento de columna, un automuestreador y un detector de matriz de diodos, con un detector de dispersión de luz evaporativa ELS-2100 de Polymer Labs. La columna usada fue Phenomenex Kinetex C8, 2,6 µm 100 Å (2,1 mm x 30 mm), a una temperatura de 65 °C.
d	Condiciones de LCMS: Se usó un gradiente de 5-100 % de acetonitrilo (A) y 10 mM de acetato de amonio en agua (B), a una velocidad de flujo de 1,5 ml/min (0-0,05 min 5 % de A, 0,05-1,2 min 5-100 % de A, 1,2-1,4 min 100 % de A, 1,4-1,5 min 100-5 % de A, 0,25 min de retraso tras la ejecución). La LC-MS analítica se realizó en un espectrómetro de masas Thermo MSQ-Plus y un sistema HPLC Agilent 1100/1200 con Xcalibur 2,0.7, Open-Access 1,4, y software de inicio de sesión personalizado. El espectrómetro de masas se hizo funcionar en condiciones de ionización ESI positivas. El sistema de HPLC comprendía una bomba binaria Agilent, un desgasificador, un compartimento de columna, un automuestreador y un detector de matriz de diodos, con un detector de dispersión de luz evaporativa ELS-2100 de Polymer Labs. La columna usada fue Phenomenex Kinetex C8, 2,6 µm 100 Å (2,1 mm x 30 mm), a una temperatura de 65 °C.

9.2.3. Síntesis de moléculas precursoras

9.2.3.1. Síntesis de

(2S, 6aS, 6bR, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-10-(4-(3-aminobencil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-
1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4-ona.
 (GRM de la Fórmula IV)



Etapas 1: Síntesis de 4-(bromometil)benzaldehído.

Se añadió hidruro de diisobutilaluminio (153 ml, 153 mmol, 1 M en tolueno) por goteo a una solución a 0 °C de 4-(bromometil)benzonitrilo (20 g, 102 mmol) en tolueno (400 ml) durante 1 hora. Se prepararon dos reacciones adicionales como se describió anteriormente. Las tres mezclas de reacción se combinaron para la purificación. Las mezclas de reacción combinadas se inactivaron con HCl acuoso al 10 % (1,5 l), se extrajeron con diclorometano (3 x 500 ml), se secaron (Na₂SO₄), y el solvente se eliminó a presión reducida.

La purificación por cromatografía en columna (gel de sílice) eluyendo con éter de petróleo/acetato de etilo 10:1 dio el compuesto del título (50 g, 82 % de rendimiento). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10,02 (s, 1H), 7,91 - 7,82 (m, 2H), 7,56 (d, $J=7,9$ Hz, 2H), 4,55 - 4,45 (m, 2H).

Etapas 2: Síntesis de 3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)anilina. A una solución de 3-bromoanilina (40 g, 233 mmol) en 1,4-dioxano (480 ml) se añadieron 4,4,4',4',5,5,5',5'-octametil-2,2'-bi(1,3,2-dioxaborolano) (94 g, 372 mmol), acetato de potasio (45,6 g, 465 mmol), 2-diciclohexilfosfino-2',4',6'-tri-*i*-propil-1,1'-bifenilo (8,07 g, 13,95 mmol), tris(dibencilidenacetona)dipaladio(0) (8,52 g, 9,30 mmol). Luego, la mezcla resultante se calentó a 80 °C durante 4 horas en nitrógeno. Se preparó una reacción adicional como se describió anteriormente. Las dos mezclas de reacción se combinaron y el solvente se eliminó a presión reducida. La purificación por cromatografía en columna (gel de sílice) eluyendo con éter de petróleo/acetato de etilo 10:1 dio el compuesto del título (60 g, 55,4 % de rendimiento). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7,23 - 7,13 (m, 3H), 6,80 (d, $J=7,5$ Hz, 1H), 3,82 - 3,38 (m, 2H), 1,34 (s, 12H).

Etapas 3: Síntesis de 3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)carbamato de *terc*-butilo. Se mezclaron 3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)anilina (30 g, 137 mmol) y dicarbonato de di-*terc*-butilo (38,9 g, 178 mmol) en tolueno (600 ml) a 100 °C durante 24

horas. Se preparó otra reacción como se describió anteriormente. Las dos mezclas de reacción se combinaron y el solvente se eliminó a presión reducida. El residuo bruto se disolvió en acetato de etilo (1,5 l), se lavó con 0,1 N HCl ac. (3 x 2 l), salmuera (3 l), seco (Na_2SO_4), se filtró y se concentró a presión reducida para dar el compuesto del título (50 g, 57 % de rendimiento). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7,63 (br m, 2H), 7,48 (d, $J=7,1$ Hz, 1H), 7,37 - 7,28 (m, 1H), 1,52 (s, 9H), 1,34 (s, 12H).

Etapas 4: Síntesis de (3-(4-formilbencil)fenil)carbamato de *terc*-butilo Una mezcla de 4-(bromometil)benzaldehído (24,94 g, 125 mmol), diclorometano de 1,1'-bis(difenilfosfino) ferrocenedicloro paladio (II) (13,75 g, 18,80 mmol), (3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)carbamato de *terc*-butilo (20 g, 62,7 mmol) y carbonato de potasio (43,3 g, 313 mmol) en tetrahidrofurano (400 ml) se calentó a 80 °C durante 12 horas. Se preparó otra reacción adicional como se describió anteriormente. Las dos mezclas de reacción se combinó, diluyó con agua (500 ml), y se extrajo con acetato de etilo (3 x 500 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron (Na_2SO_4) y el solvente se eliminó a presión reducida. La purificación por cromatografía en columna (gel de sílice) eluyendo con éter de petróleo/acetato de etilo 10:1 dio el compuesto del título (15 g, 38,4 % de rendimiento). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9,95 (s, 1H), 7,78 (d, $J=7,9$ Hz, 2H), 7,33 (d, $J=7,9$ Hz,

2H), 7,27 - 7,13 (m, 3H), 6,82 (d, $J=7,1$ Hz, 1H), 6,47 (br. s., 1H), 4,00 (s, 2H), 1,48 (s, 9H).

Etapas 5: Síntesis de (6S,8S,9R,10S,11S,13S,14S,16R,17S)-6,9-difluoro-11,16,17-trihidroxi-17-(2-hidroxiacetil)-10,13-dimetil-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahidro-3H-ciclopenta[a]fenantren-3-ona (2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a,10,10-tetrametil-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4-ona (20 g, 44,2 mmol) se suspendió en 40 % de HBF_4 acuoso (440 ml) y la mezcla se agitó a 25 °C durante 48 horas. Después de completarse la reacción, se añadieron 2 l de agua y el sólido se recolectó mediante filtración. Este sólido se lavó con agua (1 l) y después metanol (200 ml) para dar el compuesto del título (11 g, 60,3 % de rendimiento). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7,25 (d, $J=10,1$ Hz, 1H), 6,28 (d, $J=10,1$ Hz, 1H), 6,10 (s, 1H), 5,73 - 5,50 (m, 1H), 5,39 (br. s., 1H), 4,85 - 4,60 (m, 2H), 4,50 (d, $J=19,4$ Hz, 1H), 4,20 - 4,04 (m, 2H), 2,46 - 2,06 (m, 6H), 1,87 - 1,75 (m, 1H), 1,56 - 1,30 (m, 6H), 0,83 (s, 3H).

Etapas 6: Síntesis de (2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobencil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-

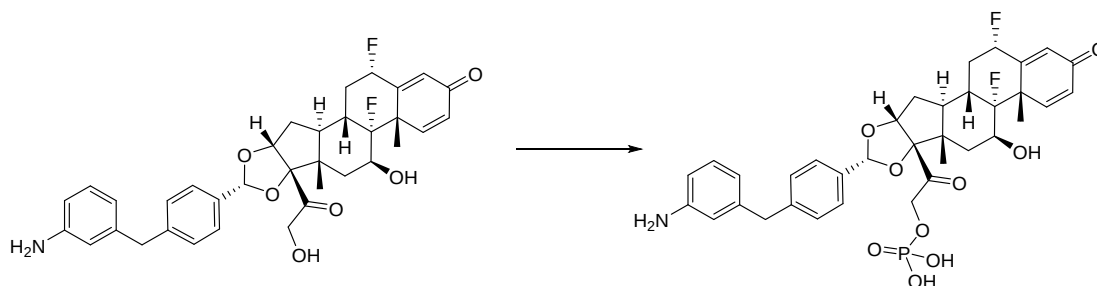
1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4-ona. Una suspensión de (6S,8S,9R,10S,11S,13S,14S,16R,17S)-6,9-difluoro-11,16,17-trihidroxi-17-(2-hidroxiacetil)-10,13-dimetil-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahidro-3H-ciclopenta[a]fenantren-3-ona (4,4 g, 10,67 mmol) y MgSO₄ (6,42 g, 53,3 mmol) en acetonitrilo (100 ml) se agitó a 20 °C durante 1 hora. Se añadió una solución de (3-(4-formilbencil)fenil)carbamato de *terc*-butilo (3,65 g, 11,74 mmol) en acetonitrilo (100 ml) en una porción. Se agregó ácido trifluorometansulfónico (9,01 mL, 53,3 mmol) por goteo mientras se mantenía una temperatura interna por debajo de la temperatura ambiente con un baño de hielo. Después de la adición, la mezcla se agitó a 20 °C durante 2 horas. Se prepararon tres reacciones adicionales como se describió anteriormente. Las cuatro mezclas de reacción se combinaron y el solvente se eliminó a presión reducida. La purificación por HPLC preparativa dio el compuesto del título (4,5 g, 14,2 % de rendimiento). LCMS (método a, Tabla 1) t.a.= 2,65 min. MS m/z = 606,2 (M+H)⁺. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7,34 (d, J = 7,7 Hz, 2H), 7,24 (dd, J = 16,2, 9,0 Hz, 3H), 6,88 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 6,43 – 6,33 (m, 3H), 6,30 (d, J = 10,2 Hz, 1H), 6,13 (s, 1H), 5,75 – 5,55 (m, 1H), 5,52 (d, J = 4,1 Hz, 1H), 5,44 (s, 1H), 5,11 (t, J = 6,0 Hz, 1H), 4,94 (s, 3H), 4,51 (dd, J = 19,6, 6,5 Hz, 1H), 4,29 – 4,07 (m, 2H), 3,73 (s, 2H), 2,76 – 2,55 (m, 1H), 2,39 – 2,13 (m,

2H), 2,10 - 1,96 (m, 1H), 1,85 - 1,61 (m, 3H), 1,61 - 1,39 (m, 4H), 0,86 (s, 3H). Método de HPLC preparativa: Instrumento: Sistema de HPLC semipreparativa Gilson 281. Fase móvil: A: Ácido fórmico/H₂O = 0,01 % v/v; B: Acetonitrilo; Columna: Luna C18 150*25 5 micrones; Caudal: 25 ml/min; Longitud de onda de monitor: 220 y 254 nm.

Tabla 2. Condiciones de fase móvil para el eluyente B							
Tiempo (min)	0,0	10,5	10,6	10,7	13,7	13,8	15,0
% de B	15	35	35	100	100	10	10

9.2.3.2. Síntesis de dihidrogenofosfato de

((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-Aminobencil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodecahidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetilo (fosfato-GRM de la Fórmula III)

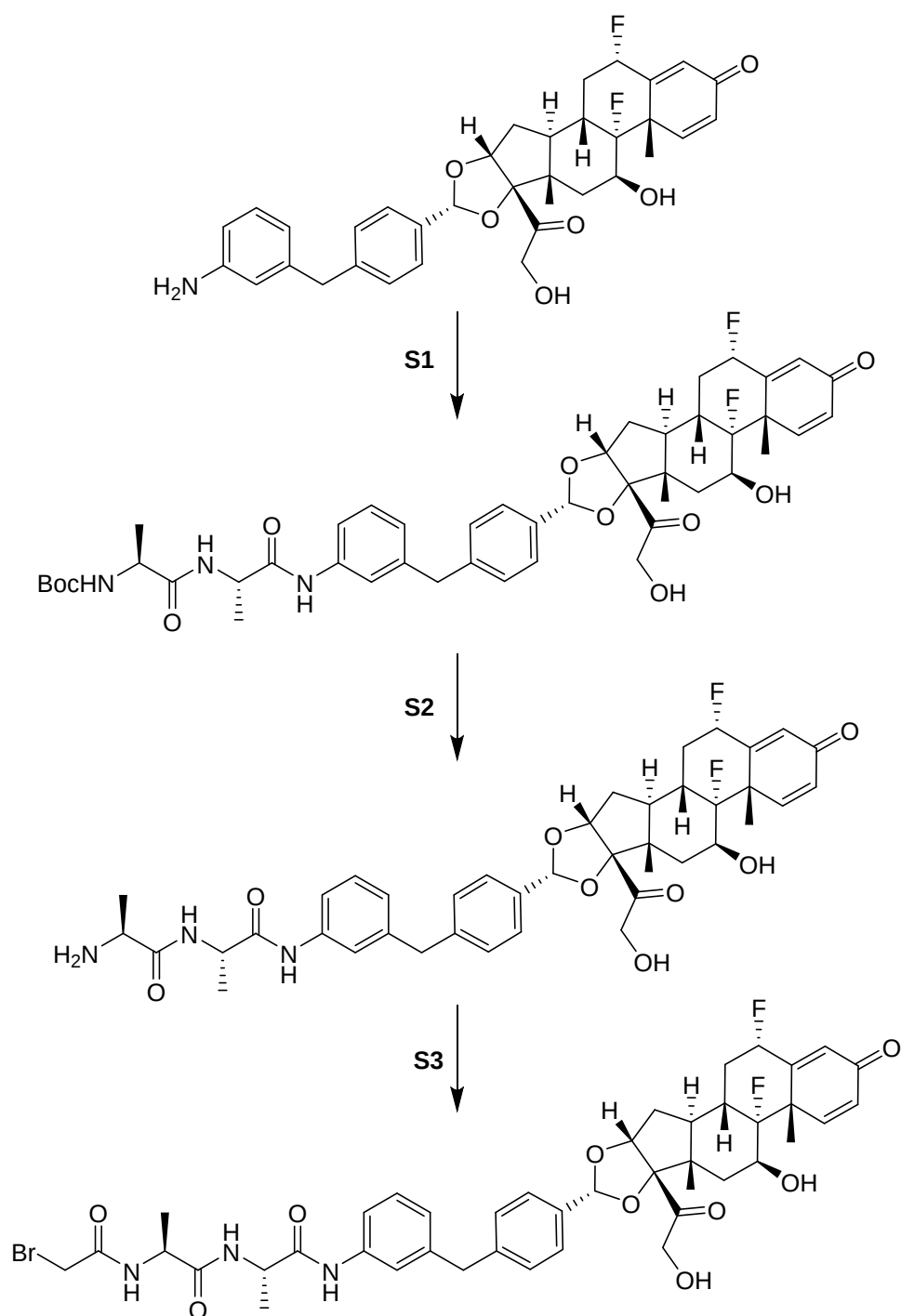


Se añadió gota a gota cloruro de difosforilo (6,86 g, 27,2 mmol) a una solución a -40 °C de ((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-

aminobencil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d[1,3]dioxol-4-ona (3,30 g, 5,45 mmol) y ácido *para*-toluenosulfónico (0,938 g, 5,45 mmol) en tetrahidrofurano (30 ml). La mezcla se agitó a -40 °C durante 2 horas. Se prepararon tres reacciones adicionales como se describió anteriormente. Las mezclas de reacción combinadas se inactivaron con agua (450 ml) a -40 °C, se calentaron a 0 °C y se ajustaron a pH ~7 mediante la adición de solución de NaHCO₃ sat. ac. La suspensión se filtró a pH ~6 debido a un gran volumen de líquido lleno del matraz. El filtrado se ajustó después a pH 7 y se enjuagó a través del sólido filtrado. El filtrado se acidificó de nuevo a pH 3 mediante la adición de 1 M HCl ac. (200 ml), lo que resultó en una suspensión. La mezcla se filtró, y el sólido combinado se enjuagó con las agua madre dos veces y se recolectó. El sólido bruto se secó al vacío y se purificó mediante HPLC preparativa en una columna nano-micro Kromasil C18 de 3 micrones (100 x 40 mm). Se usó un gradiente de acetonitrilo (A) y 1 % de ácido trifluoroacético en agua (B), a una velocidad de flujo de 50 ml/min (0-5,0 min 20 % de A, 5,0-25,0 min gradiente lineal de 20-50 % de A, mantenido durante 5 minutos). Las fracciones purificadas se ajustaron a pH ~5 y se liofilizaron para dar el compuesto del título (3,50 g,

23 % de rendimiento) como un sólido blanco. LCMS (Método b, Tabla 1) t.a.= 0,707 min, m/z 686,2 (M+H⁺). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6) δ 7,35 (d, J = 7,9 Hz, 2H), 7,26 (td, J = 7,3, 6,2, 3,1 Hz, 3H), 7,07 (t, J = 7,9 Hz, 1H), 6,73 – 6,60 (m, 3H), 6,30 (dd, J = 10,2, 1,9 Hz, 1H), 6,12 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 5,75 – 5,55 (m, 1H), 5,54 (s, 1H), 4,98 – 4,86 (m, 2H), 4,59 (dd, J = 18,2, 8,3 Hz, 1H), 4,25 – 4,17 (m, 1H), 3,83 (s, 2H), 2,79 – 2,56 (m, 1H), 2,37 – 2,17 (m, 2H), 2,05 (dt, J = 13,7, 3,6 Hz, 1H), 1,72 (q, J = 9,3, 8,1 Hz, 3H), 1,60 – 1,41 (m, 1H), 1,50 (s, 3H), 0,88 (s, 3H). ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-*d*6) δ -73,76, -164,99, -186,36. ³¹P NMR (162 MHz, DMSO-*d*6) δ -1,17.

9.2.3.3. Síntesis de (S)-2-(2-bromoacetamido)-N-((S)-1-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)propanamida (enlazador de fármaco de la Fórmula VI)



Etapa 1: Síntesis de ((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-

il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)carbamato de *terc*-butilo

Se añadió 2,6-lutidina (0,5 ml, 4,29 mmol) a una suspensión a temperatura ambiente de (2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobencil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12,12a,12b-dodecahidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4-ona (0,505 g, 0,834 mmol), ácido (S)-2-((S)-2-((*terc*-butoxicarbonil)amino)propanamido)propanoico [CAS núm. 27317-69-7, adquirido de Chem-Impex International, Inc.] (0,217 g, 0,835 mmol), y HATU hexafluorofosfato de 3-óxido de (1-[bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio (0,481 g, 1,266 mmol) en tetrahidrofurano (5,5 ml); Después de 16 horas, la reacción se diluyó con EtOAc (40 ml) y se lavó con 1 N HCl ac. (2 X 20 ml), NaHCO₃ (20 ml) sat. ac., salmuera (20 ml), se secó (Na₂SO₄), se filtró y el solvente se eliminó a presión reducida. La purificación por cromatografía (sílice, 40 g) eluyendo con un gradiente de MeOH al 0-10 %/DCM dio el compuesto del título (0,648 g, 92 % de rendimiento) como un sólido blanquecino. LCMS (Método c, ESI, Tabla 1) t.a.= 0,89 min, m/z = 848,6 (M+H⁺). ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,82 (s, 1H), 7,94 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 7,46 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 7,38 (t, J = 2,0 Hz, 1H), 7,38 - 7,33 (m, 2H), 7,26 (dd, J = 10,2, 1,5 Hz, 1H),

7,26 – 7,22 (m, 2H), 7,19 (t, J = 7,9 Hz, 1H), 6,95 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 6,91 (dt, J = 7,7, 1,2 Hz, 1H), 6,29 (dd, J = 10,1, 1,9 Hz, 1H), 6,14 – 6,11 (m, 1H), 5,72 – 5,56 (m, 1H), 5,53 – 5,49 (m, 1H), 5,44 (s, 1H), 5,09 (t, J = 5,9 Hz, 1H), 4,94 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 4,51 (dd, J = 19,4, 6,1 Hz, 1H), 4,35 (t, J = 7,1 Hz, 1H), 4,23 – 4,16 (m, 2H), 3,97 (t, J = 7,2 Hz, 1H), 3,88 (s, 2H), 2,65 (ddt, J = 28,2, 15,3, 7,9 Hz, 1H), 2,36 – 2,16 (m, 2H), 2,07 – 2,01 (m, 1H), 1,78 – 1,63 (m, 3H), 1,57 – 1,50 (m, 1H), 1,49 (s, 3H), 1,36 (s, 9H), 1,26 (d, J = 7,1 Hz, 3H), 1,20 – 1,15 (m, 3H), 0,86 (s, 3H).

Etapla 2: Síntesis de ((S)-2-amino-N-((S)-1-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)propanamida

Se añadió ácido trifluoroacético (2,0 ml, 26,0 mmol) a una solución a temperatura ambiente de ((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)carbamato de *terc*-butilo (0,648 g, 0,764 mmol). La reacción se agitó en un matraz abierto

durante 20 minutos, después se eliminó el solvente a presión reducida. El residuo se disolvió en EtOAc (60 ml), se lavó con NaHCO₃ (3 x 20 ml), NaBr acuoso saturado (20 ml), seco (Na₂SO₄), se filtró y el solvente se eliminó bajo presión reducida. La trituración del residuo con MTBE/heptanos y la eliminación del solvente dio el compuesto del título que se usó sin purificación adicional en la siguiente etapa. LCMS (Método c, ESI, Tabla 1) t.a.= 0,72 min; m/z 748,5 (M+H⁺).

Etapas 3: Síntesis de (S)-2-(-2-bromoacetamido-N-((S)-1-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)propanamida.

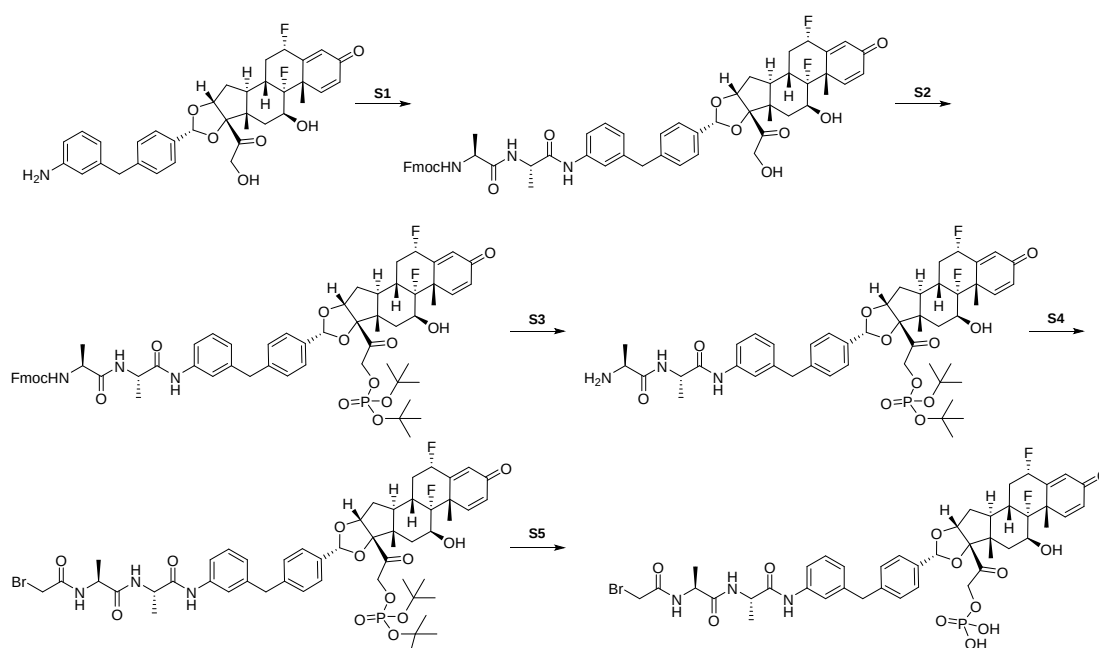
Se añadió 2,6-lutidina (0,2 ml, 1,717 mmol) a una solución a temperatura ambiente de (S)-2-amino-N-((S)-1-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)propanamida (0,286 g, 0,382 mmol) y éster de N-hidroxisuccinimida de ácido bromoacético (0,414 g, 1,753 mmol) en dimetilformamida (4 ml). La reacción se completó dentro de 20 minutos mediante LCMS. Se preparó una segunda reacción del mismo tamaño. Ambas reacciones se combinaron para la

purificación mediante HPLC preparativa en una columna Phenomenex C18(2) de 10 micrones (250 x 50 mm). Se usó un gradiente de acetonitrilo (A) y 1 % de ácido trifluoroacético en agua (B), a una velocidad de flujo de 90 ml/min (0-5,0 min 15 % de A, 5,0-20,0 min gradiente lineal de 15-95 % de A, mantenido durante 5 min). Las fracciones del producto se liofilizaron para dar el compuesto del título (0,254 g, 38 % de rendimiento) como un sólido blanco. LCMS (Método c, ESI, Tabla 1) t.a.= 0,82 min, m/z 868,4, 870,3 (M+H)⁺. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,82 (s, 1H), 8,45 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 8,20 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 7,46 (dd, J = 8,4, 2,2 Hz, 1H), 7,40 (t, J = 1,9 Hz, 1H), 7,38 - 7,33 (m, 2H), 7,28 - 7,19 (m, 4H), 7,19 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 6,91 (dt, J = 7,7, 1,3 Hz, 1H), 6,29 (dd, J = 10,2, 1,9 Hz, 1H), 6,12 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 5,64 (dddd, J = 48,5, 11,4, 6,8, 1,9 Hz, 1H), 5,51 (d, J = 4,4 Hz, 1H), 5,45 (s, 1H), 4,94 (d, J = 5,3 Hz, 1H), 4,51 (d, J = 19,4 Hz, 1H), 4,40 - 4,33 (m, 1H), 4,31 (p, J = 7,2 Hz, 1H), 4,23 - 4,16 (m, 2H), 3,94 - 3,87 (m, 4H), 2,71 - 2,58 (m, 1H), 2,27 (ddq, J = 31,2, 12,4, 6,3, 5,7 Hz, 1H), 2,04 (dt, J = 13,7, 3,7 Hz, 1H), 1,77 - 1,63 (m, 3H), 1,57 - 1,50 (m, 1H), 1,50 (s, 3H), 1,27 (d, J = 7,1 Hz, 3H), 1,21 (d, J = 7,1 Hz, 3H), 0,86 (s, 3H).

9.2.3.4. Síntesis de dihidrógenofosfato de 2-

((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-

((S)-2-((S)-2-(2-Bromoacetamido)propanamido)propanamido)bencil)fenil)-
2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-
1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodecahidro-8bH-
nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-
oxoetilo (Fármaco enlazador de Fórmula V)



Etapla 1: Síntesis de ((S)-1-(((S)-1-((3-(4-
 ((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-
 difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-
 oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-
 nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-
 il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-
 oxopropan-2-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo

Se añadió 2,6-lutidina (1,2 ml, 10,30 mmol) a una solución a temperatura ambiente de (2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobencil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4-ona (1,377 g, 2,27 mmol), (((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)-L-alanil-L-alanina [CAS núm. 87512-31-0, adquirido de Chem-Impex International, Inc.] (0,878 g, 2,295 mmol) y HATU de hexafluorofosfato de 3-óxido de (1-[bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio (1,327 g, 3,49 mmol) en tetrahidrofurano (15 ml). Después de 15 horas, la mezcla se diluyó con EtOAc (100 ml) y se lavó con 1 N HCl ac. (2 x 50 ml), NaHCO₃ (50 ml) sat. ac., salmuera (50 ml), se secó (Na₂SO₄), se filtró y el solvente se eliminó a presión reducida. La purificación por cromatografía (sílice, 120 g) eluyendo con un gradiente de 0-10 % de MeOH/DCM dio el producto (1,98 g, 90 % de rendimiento) como un sólido blanco. LCMS (Método c, APCI, Tabla 1) t.a.= 0,98 min, m/z 970,6 (M+H⁺). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,83 (s, 1H), 8,06 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 7,91 - 7,84 (m, 2H), 7,71 (t, J = 7,8 Hz, 2H), 7,53 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 7,49 - 7,13 (m, 12H), 6,91 (dt, J = 7,7, 1,4 Hz, 1H), 6,29 (dd, J = 10,2, 1,9 Hz, 1H), 6,14 (q, J = 1,6 Hz, 1H), 5,73 - 5,54 (m, 1H), 5,52 (dd, J = 4,4, 1,8 Hz, 1H), 5,44

(s, 1H), 5,10 (t, J = 5,9 Hz, 1H), 4,95 (d, J = 4,8 Hz, 1H), 4,51 (dd, J = 19,5, 6,2 Hz, 1H), 4,37 (p, J = 7,0 Hz, 1H), 4,30 - 4,14 (m, 5H), 4,14 - 4,02 (m, 1H), 3,86 (s, 2H), 2,74 - 2,55 (m, 1H), 2,35 - 2,18 (m, 2H), 2,08 - 1,96 (m, 1H), 1,77 - 1,61 (m, 3H), 1,60 - 1,49 (m, 1H), 1,50 (s, 3H), 1,27 (d, J = 7,1 Hz, 3H), 1,23 (d, J = 7,1 Hz, 3H), 0,86 (s, 3H).

Etapla 2: Síntesis de ((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-terc-butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo.

Se añadió *N,N*-dietilfosforamidita de di-terc-butilo (1,8 ml, 6,02 mmol) a una solución a temperatura ambiente de ((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (1,98 g, 2,041 mmol) y tetrazol (0,45 M en acetonitrilo) (18 ml, 8,10 mmol). Después de 50 minutos, la reacción se trató con peróxido de hidrógeno (30 % en agua, 1,2 ml, 11,75 mmol). Después de 10 minutos, la reacción se trató con 1 M NaS₂O₃

ac. (80 ml) para inactivar cualquier peróxido de hidrógeno sin reaccionar [PRECAUCIÓN: exotérmico!]. La mezcla se extrajo con EtOAc (3 X 60 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (50 ml), se secaron (Na_2SO_4), se filtraron y se eliminó el solvente a presión reducida. La purificación por cromatografía (sílice, 120 g) eluyendo con un gradiente de 0-10 % de MeOH/DCM dio el producto deseado (1,85 g, 78 % de rendimiento) como una espuma blanca. LCM (Método d, ESI, Tabla 1) t.a. = 1,12 min, m/z 1162,7 ($\text{M}+\text{H}^+$).

Etapas 3: Síntesis de fosfato de di-*terc*-butilo de 2-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-2-((S)-2-Aminopropanamido)propanamido)bencil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodecahidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-ol)-2-oxoetilo.

Se añadió piperidina (1,0 ml, 10,10 mmol) a una solución a temperatura ambiente de ((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-*terc*-butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (1,854 g, 1,595 mmol) en tetrahidrofurano (16 ml). Después de 25 minutos, el solvente se eliminó a presión reducida. El residuo se trató iterativamente con tolueno (3 X 30 ml),

que se eliminó a presión reducida después de cada tratamiento para asegurar la eliminación de piperidina. Se asume un rendimiento de 100 % y se usó el producto bruto en la siguiente etapa sin purificación adicional. LCMS (Método d, ESI, Tabla 1) t.a.= 1,11 min, m/z 940,7 (M+H+).

Etapas 4: Síntesis de fosfato de di-terc-butilo de 2-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-2-((S)-2-(2-bromoacetamido)propanamido)propanamido)bencil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodecahidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetilo.

EEDQ (2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina) (1,630 g, 6,59 mmol) se añadió a una solución a temperatura ambiente de ácido bromoacético (0,680 g, 4,90 mmol) en dimetilformamida (4 ml). La mezcla se agitó durante 90 minutos para activar el ácido bromoacético para el acoplamiento. Separadamente, fosfato de di-terc-butilo de 2-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-2-((S)-2-Aminopropanamido)propanamido)bencil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodecahidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-ol)-2-oxoetil (1,499 g, 1,595 mmol) se disolvió en formamida de dimetilo (8 ml). Esta solución se transfirió al vial que contenía el

ácido bromoacético activado. Debido a la reacción incompleta, se preparó una segunda carga de ácido bromoacético activado: ácido bromoacético (0,363 g, 2,61 mmol) a una solución de EEDQ (2-etoxi-1-etoxycarbonil-1,2-dihidroquinolina) (0,813 g, 3,29 mmol) en dimetilformamida (3 ml) y se agitó durante 70 minutos, y después se combinó con la mezcla de reacción. Después de 15 minutos, la reacción se diluyó con EtOAc (60 ml) y se lavó con agua (2 X 20 ml), se secó (Na_2SO_4), se filtró, y el solvente se eliminó a presión reducida. La purificación por cromatografía (sílice, 80 g) eluyendo con un gradiente de 0-10 % de MeOH/DCM dio el producto (0,760 g, 45 % de rendimiento) como un sólido blanco. LCMS (Método c, ESI, Tabla 1) t.a. = 1,03 min, m/z 1060,6, 1062,1 ($\text{M}+\text{H}^+$). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9,83 (s, 1H), 8,47 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 8,22 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 7,49 – 7,43 (m, 1H), 7,41 (t, J = 1,9 Hz, 1H), 7,35 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 7,32 – 7,23 (m, 3H), 7,19 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 6,91 (dt, J = 7,7, 1,4 Hz, 1H), 6,30 (dd, J = 10,2, 1,9 Hz, 1H), 6,12 (d, J = 2,2 Hz, 1H), 5,74 – 5,55 (m, 2H), 5,56 (s, 1H), 5,03 – 4,90 (m, 2H), 4,65 (dd, J = 18,0, 9,3 Hz, 1H), 4,34 (dt, J = 15,6, 7,2 Hz, 2H), 4,26 – 4,16 (m, 1H), 3,94 – 3,86 (m, 4H), 3,31 (s, 1H), 2,75 – 2,56 (m, 1H), 2,35 – 2,17 (m, 2H), 2,07 (d, J = 13,2 Hz, 1H), 1,72 (td, J = 13,9, 4,2 Hz, 2H), 1,67 – 1,52 (m, 1H), 1,49 (s, 3H), 1,42 (s, 9H), 1,42 (s, 9H), 1,27 (d, J = 7,1 Hz, 3H), 1,20 (d, J = 7,0 Hz, 3H), 0,89 (s, 3H).

Etapla 5: Síntesis de dihidrógenofosfato de 2-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-2-((S)-2-(2-bromoacetamido)propanamido)propanamido)bencil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodecahidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetilo.

Se añadió ácido trifluoroacético (2,5 ml, 32,4 mmol) a solución a temperatura ambiente de fosfato de di-terc-butilo de 2-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-2-((S)-2-(2-bromoacetamido)propanamido)propanamido)bencil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodecahidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil (0,760 g, 0,716 mmol) en diclorometano (5 ml). Después de 15 minutos de agitación en un recipiente abierto, el solvente se eliminó a presión reducida para dar una espuma, que se disolvió en 3:1 acetonitrilo/agua (16 ml) y se purificó por HPLC preparativa en una columna Phenomenex C18(2) de 10 micrones (250 x 50 mm). Se usó un gradiente de acetonitrilo (A) y 1 % de ácido trifluoroacético en agua (B), a una velocidad de flujo de 90 ml/min (0-5,0 min 15 % de A, 5,0-20,0 min gradiente lineal de 15-95 % de A, mantenido durante 5 min). Las fracciones del producto se

liofilizaron para dar el compuesto del título (0,291 g, 43 % de rendimiento) como un sólido blanco. LCMS (Método c, APCI, Tabla 1) t.a.= 0,84 min, m/z 948,4, 950,4 (M+H⁺). ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,83 (s, 1H), 8,46 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 8,21 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 7,46 (ddd, J = 8,2, 2,2, 1,1 Hz, 1H), 7,39 (t, J = 1,9 Hz, 1H), 7,38 – 7,33 (m, 2H), 7,29 – 7,23 (m, 3H), 7,19 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 6,91 (dt, J = 7,7, 1,3 Hz, 1H), 6,30 (dd, J = 10,1, 1,9 Hz, 1H), 6,13 (dt, J = 2,6, 1,3 Hz, 1H), 5,64 (dddd, J = 48,3, 11,1, 6,4, 1,9 Hz, 2H), 5,53 (s, 1H), 4,96 – 4,89 (m, 2H), 4,59 (dd, J = 18,1, 8,4 Hz, 1H), 4,34 (dp, J = 23,2, 7,1 Hz, 2H), 4,21 (d, J = 9,0 Hz, 1H), 3,93 – 3,88 (m, 4H), 2,72 – 2,61 (m, 1H), 2,32 – 2,20 (m, 2H), 2,09 – 2,03 (m, 1H), 1,72 (dd, J = 12,8, 6,3 Hz, 2H), 1,68 (s, 1H), 1,57 – 1,49 (m, 1H), 1,49 (s, 3H), 1,27 (d, J = 7,1 Hz, 3H), 1,21 (d, J = 7,1 Hz, 3H), 0,88 (s, 3H).

9.2.4. Conjugación y métodos analíticos

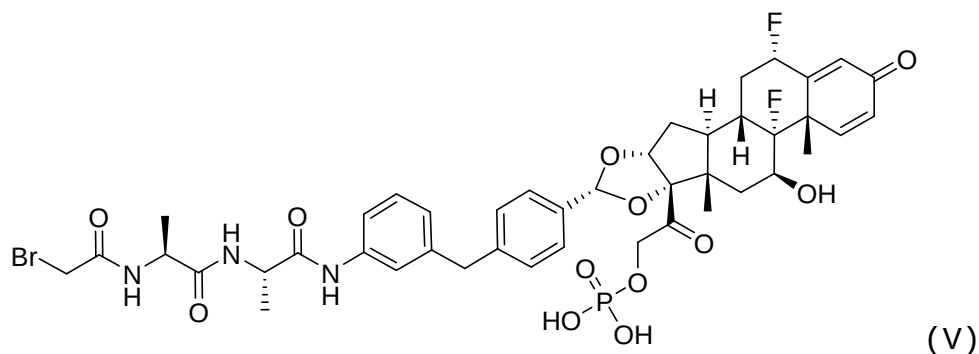
9.2.4.1. Procedimientos analíticos de moléculas pequeñas

Los datos analíticos de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y LCMS o bien se detallan dentro del experimento o hacen referencia a las condiciones enumeradas en la Tabla 3.

Tabla 3. Lista de métodos de LCMS y HPLC	
Método	Condiciones
a	Método de HIC-columna HPLC = columna de fenilo BioSuite, columna de 7,5 × 75 mm, 10 µm, 1000 Å, Waters; Fase móvil A: 25 mM de Na ₂ HPO ₄ , 1,0 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , pH 7,0; Fase móvil B: 25 mM de Na ₂ HPO ₄ pH 7,0/IPA, v/v = 65/35; Caudal: 700 µl/min; Gradiente: 0 min, 18,7 % de B, mantener a 3,6 min a 18,7 % de B después a 94 % de B a 46,4 min, después regresar a 18,7 % de B a 47,9 min y mantener a 59,0 min a 18,7 % de B. Temperatura de la columna: 20 °C; monitor 254 y 280 nm.
b	Método SEC – columna HPLC = Tosoh Bioscience TSK-gel SW3000xl 5 µm, 7,8 × 300 mm; Fase móvil: 7,5 % de isopropanol en fosfato de sodio 100 mM /100 mM de sulfato de sodio, pH 6,8; Caudal: 1,0 ml/min; Temperatura de la columna: 20 °C; monitor 214 y 280 nm.
c	Método de HIC-columna HPLC = Sepax, Proteomix HIC Butilo- NP 4,6 × 35 mm, 1,7 µm; Fase móvil A: 25 mM de Na ₂ HPO ₄ , 1,5 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , pH 7,0; Fase móvil B: 25 mM de Na ₂ HPO ₄ pH 7,0/IPA, v/v = 75/25; Caudal: 300 µl/min; Gradiente: 0 min, 15 % de B a 100 % de B a 17 min, mantener a 20 min a 100 % de B; Temperatura de la columna: 20 °C; monitor 254 y 280 nm.
d	Método SEC – columna HPLC = Acquity UPLC Proteína BEH SEC, 200A, 1,7 µm, 4,6 × 300 mm; Fase móvil: 90 % de regulador de fosfato 100 mM y 10 % de NaCl, pH de 7,0/10 % de MeCN; Caudal: 200 µl/min; Temperatura de la columna: 30 °C; monitor 214 y 280 nm.

9.2.4.2. ADC agonista de GRM fosforilado de CD19

Se diluyeron 170,4 g del anticuerpo CD19 (mAb de CD19) del Ejemplo 1 a una concentración de ~ 50 mg/ml con regulador de PBE (125 mM fosfato 6 mM EDTA pH 7,3) en 1:1 p/p y se redujo parcialmente con clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) (2,6 equivalentes, 0,847 g, 25 mM de solución en agua para inyección (WFI)) a ~ 4 °C durante la noche bajo nitrógeno. A continuación, el anticuerpo reducido se conjugó con el conector de fármaco de fórmula V:



(6,0 equivalentes, 6,92 g, 93,2 % p/p %, solución en dimetilacetamida (DMA) 650 g) por adición a ~ 4 °C seguido de calentamiento a 20 °C y mantenimiento de 6-8 horas hasta que se considere completo. La conjugación se inactivó mediante la adición de N-acetilcisteína (20 equivalentes, 3,71 g, solución 100 mM en WFI). La solución del producto se dividió en 2 porciones seguido de dilución de cada una a ~13 l con WFI seguido de ajuste del pH a ~8,5 con NaOH como la solución de carga. Cada solución de carga se purificó.

9.2.4.3. Espectroscopía de masas

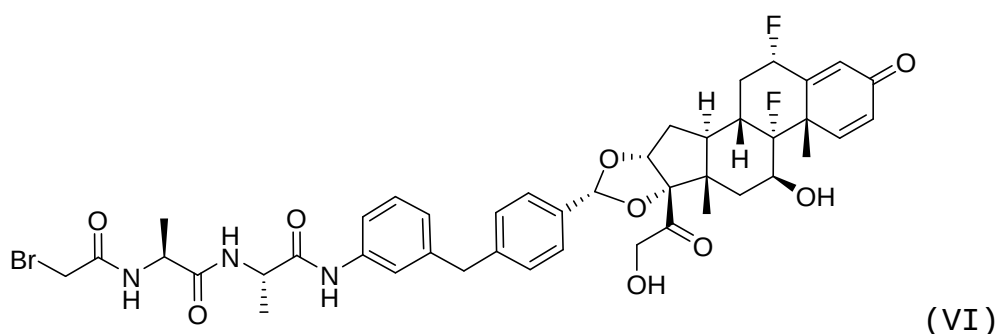
Las muestras de ADC se redujeron por completo antes del análisis de MS. Las condiciones de espectrometría de masa usadas son las siguientes: Columna HPLC = polifenilo de mAb de Waters BioResolve RP 450A 2,7 μ m, 150 x 2,1 mm; Fase móvil A: ácido difluoroacético al 0,1 % en agua; Fase móvil B: ácido difluoroacético al 0,1 % en acetonitrilo; Caudal: 0,4 ml/min; Gradiente: Comenzar con 20 % de B, 0 a 12 min, 20-45 % de B, 14 a 16 min, 45-60 %

de B, 16 a 18 min, 60-100 % de B, reequilibrar 20 % de B durante 4 minutos; Temperatura de la columna: 80 °C; Fuente de ionización de MS: ESI.

Se generó un cromatógrafo de fase inversa reducida (A280) y un espectro de masas deconvolucionado de cada subunidad. Ver la Figura 16. Se resolvieron e identificaron los picos correspondientes a la cadena ligera con cero o una molécula enlazadoras de fármaco unida y la cadena pesada con cero, una, dos o tres moléculas enlazadoras de fármaco unidas.

9.2.4.4. ADC agonista de GRM de desfosfato de CD19

Se diluyeron 2,82 g del anticuerpo de CD19 (mAb de CD19) del Ejemplo 1 en una concentración de ~ 50 mg/ml con regulador de PBE (125 mM fosfato 6 mM EDTA pH 7,3) en 1:1 p/p y se redujo parcialmente con TCEP (2,56 equivalentes, 0,0141 g, solución 4,93 mM en WFI) a ~ 4 °C durante la noche bajo nitrógeno. A continuación, el anticuerpo reducido se conjugó con el enlazador de fármaco de la Fórmula VI.



(6,1 equivalentes, 0,102 g, 90,2 % p/p %, solución en DMA 11 g) por adición a ~ 4 °C seguido de calentamiento a 20 °C y mantenimiento de 6-8 horas hasta que se considere completo. La conjugación se inactivó mediante la adición de N-acetilcisteína (10 equivalentes, 0,031 g, solución 100 mM en WFI). La solución de producto se saló con sulfato de amonio 0,8 M, fosfato de sodio 25 mM pH 7,1 (126 g) para preparar la solución de carga en preparación para la purificación. La solución de carga se purificó.

9.3. Ejemplo 3: Caracterización del anticuerpo y ADC

Se caracterizó la actividad celular y de unión del ADC agonista de GRM fosforilado de CD19 del Ejemplo 2, sección 8.2.4.2 (ADC-1) y su anticuerpo original afucosilado (también denominado mAb de CD19). El ADC-1 y mAb de CD19 se unen a CD19 expresado endógenamente en la superficie de múltiples líneas celulares de linfoma de células B. El ADC-1 provocó potentes efectos antiproliferativos y actividad ADCC contra múltiples líneas celulares de malignidad de células B. Además, el ADC-1 activa las células indicadoras ADCC de NFAT que expresan variantes de FcγRIIIa F158 o V158 con una potencia similar. Si bien el ADC-1 mostró una unión insignificante a CD19 murino o de rata, mostró una alta afinidad de unión a CD19 humano y de mono cynomolgus (cyno)

y activó líneas celulares indicadoras GRE que expresan CD19 humano o mono cyno.

9.3.1. Materiales y métodos

9.3.1.1. Anticuerpos, proteínas, y compuestos

El anticuerpo anti-CD19 humanizado (mAb de CD19) fue fucosilado con tecnología ProBiogen. El ADC-1 se preparó conjugando mAb de CD19 con el enlazador de fármaco de la Fórmula V. Se usó material GLP para mAb de CD19 y ADC-1 para todos los experimentos. El control negativo probado incluye un anticuerpo toxoide antitetánico fucosilado AB095 (mAb de isotipo) y su ADC (Isotipo-GRM), que consiste en conjugado AB095 con el enlazador de fármaco de la Fórmula V. Los compuestos analizados incluyen el GRM de Fórmula IV, dexametasona (Clinigen, núm. de cat. 00641-0367-25) y prednisolona (Clinigen, núm. de cat. 44523-0182-08).

9.3.1.2. Cultivo de células

Las líneas celulares cancerosas Raji (linfoma de Burkitt; ATCC, núm. de cat. CCL-86), SUP-B15 (leucemia linfoblástica aguda; ATCC, núm. de cat. CRL-1929), RS4;11 (leucemia linfoblástica aguda; ATCC, núm. de cat. CRL-1873), SU-DHL-6 (linfoma difuso de células B grandes; ATCC, núm. de cat. CRL-2959) y HCT116 (cáncer colorrectal; ATCC, núm. de cat. CCL-247) se cultivaron en medio RPMI-1640

(Thermo Fisher Scientific, núm. de cat. A1049101) suplementado con FBS al 10 % (Thermo Fisher Scientific, núm. de cat. 26140079). La línea celular cancerosa OCI-LY19 (linfoma difuso de células B grandes; DSMZ, núm. de cat. ACC 528) se cultivaron en medio IMDM con suero humano al 10 %, a partir de plasma humano pobre en plaquetas, filtrado estéril (Sigma-Aldrich, núm. de cat. P2918-100ML). Las células 293T (ATCC, núm. de cat. CRL-3216) se cultivaron en DMEM suplementado con FBS al 10 %. Todas las células se cultivan en una cámara humidificada a 37 °C y CO₂ al 5 %.

9.3.1.3. Generación de líneas celulares diseñadas genéticamente

La línea celular indicadora de luciferasa K562 GRE que expresa CD19 humano se generó en AbbVie. Brevemente, las células K562 se sembraron en una placa de 6 pocillos (Costar, núm. de cat. 3516) con 2 ml de medio de crecimiento completo [RPMI 1640 suplementado con L-glutamina (Thermo Fisher Scientific, núm. de cat. 11835-030), FBS al 10 % (Thermo Fisher Scientific Inc., núm. de cat. 26140-079), piruvato de sodio al 1 % (Thermo Fisher Scientific Inc., núm. de cat. 11360-070) y MEM NEAA al 1 % (Thermo Fisher Scientific Inc., núm. de cat. 111140-50)] a 500.000 células por pocillo durante 24 horas a 37 °C y CO₂ al 5 %: Al día siguiente, se diluyeron 1,5 µg de pGL4.36 [Luc2P/MMTV/Hygro] (Promega núm. de cat. E316) y

3 µl de reactivo PLUS (Thermo Fisher Scientific, núm. de cat. 10964-021) en 244 µl de Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, núm. de cat. 31985-070) y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después de la incubación, la solución de ADN diluido se preincubó con una solución de Lipofectamine LTX 1:1 (Thermo Fisher Scientific, núm. de cat. 94756) (13,2 µl + 256,8 µl Opti-MEM) y se incubó a temperatura ambiente durante 25 minutos para formar complejos de DNA-Lipofectamine LTX. Después de la incubación, se añadieron directamente 500 µl de complejos de ADN-Lipofectamine a la cavidad que contenía las células. Se transfectaron células K562 durante 24 horas a 37° C y 5 % de CO₂. Después de la incubación, las células se lavaron con 3 ml de PBS y se seleccionaron con medio de crecimiento completo que contenía 125 µg/ml de higromicina B (Thermo Fisher Scientific, núm. de cat. 10687-010) durante dos semanas.

Se recolectaron células K562 pGL4.36[Luc2P/MMTV/Hygro] y se sembraron en un tubo cónico de 15 ml (Costar, núm. de cat. 3516) con 1 ml de medio de crecimiento completo (RPMI + L-Glu, FBS al 10 %, piruvato de Na al 1 % y MEM NEAA al 1 %) a 250.000 células por pocillo. Se diluyeron 3 µg de CD19 humano (Origene, núm. RC230267) y 3 µl de reactivo PLUS (Thermo Fisher Scientific, núm. de cat. 10964-021) en 244 µl de Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, núm. de cat. 31985-070) y se incubaron a

temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de la incubación, la solución de ADN diluida se preincubó con una solución de Lipofectamine LTX 1:1 (Thermo Fisher Scientific, núm. de cat. 94756) (11 µl + 239 µl de Opti-MEM) y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos para formar complejos de ADN-Lipofectamine LTX. Posteriormente, se añadieron 500 µl de complejos de ADN-Lipofectamine directamente a células que contenían tubos cónicos. Las células y la ADN-Lipofectamine se mezclaron y sembraron en una placa de 6 pocillos (Costar, núm. de cat. 3516) y se incubaron durante 24 horas a 37 °C y CO₂ al 5 %. Después de una incubación de 24 horas, las células se seleccionaron con 2 ml de medio de crecimiento completo que contenía 125 µg/ml de higromicina B (Thermo Fisher Scientific, núm. de cat. 10687-010) y 225 µg/ml de G418 (Thermo Fisher Scientific, núm. de cat. 10131-027) durante dos semanas.

9.3.1.4. Ensayo de proliferación celular

Las células adherentes (293T y HCT116) se separaron mediante tripsinización. Se sembraron 1000-2000 células por pocillo en placas de cultivo de tejidos de 384 pocillos (Corning, núm. de cat. 3764) en 40 µl en RPMI 1640 completo. Las células adherentes se dejan unir durante la noche. Al día siguiente, las células se tratan con concentraciones indicadas de fármacos en 10 µl y se incuban a 37 °C con CO₂ al 5 % durante 5 días. Al final, se

añadieron 40 µl de un reactivo de ensayo de viabilidad celular (Reactivo de Ensayo de Viabilidad Celular Luminiscente CellTiter-Glo® (Promega, núm. de cat. G7573)) por pocillo. Las placas se leyeron en un lector de microplacas (lector de placas SpectraMax® M5 de Molecular Devices) con configuración de luminiscencia. La viabilidad celular se expresó como un porcentaje en relación con los controles no tratados.

9.3.1.5. Inmunofluorescencia

La línea celular RS4;11 se sembró en placas con fondo en V (Costar, núm. de cat. 3894) a 50k células por pocillo. Las células se bloquearon con Fc con suero humano normal al 5 % (Sigma, núm. de cat. H4522) y FBS al 2 %. Las células se lavaron y se resuspendieron en regulador de tinción (PBS + FBS al 2 %). Las células se tiñeron con el anticuerpo anti-hu-CD19 conjugado con un tinte (tinte Alexa Fluor® 647 (mAb de CD19) a 5 µg/ml en regulador de tinción y se incubaron en hielo durante 1 hora. Después de la incubación, las células se lavaron tres veces con PBS que contenía FBS al 2 % y se persiguieron a 37 °C durante 0,5 horas, 1, 3 y 24 horas para inducir la internalización y se compararon con las células teñidas en hielo para un punto de control T=0. Las células se fijaron y permeabilizaron (BD, núm. de cat. 554714) usando instrucciones de fabricación. Las células se bloquearon con regulador de tinción que

contenía suero de ratón al 2 % al 1 % (Invitrogen, núm. de cat. 3881) y se tiñeron con 2 µg/ml de un tinte fluorescente (tinte Alexa Fluor® 488) conjugado con el anticuerpo LAMP1 (Biolegend, núm. de cat. 328610) durante la noche a 4 °C. Las células se lavaron 3 veces en PBS que contenía FBS al 2 %. Las células se resuspendieron en medio de obtención de imágenes (FluoroBrite: Gibco, núm. de cat. A1896701) y se transfirieron a placas de imágenes de fondo de vidrio (Thermo Fisher Scientific, núm. de cat. 160376) y se analizaron en un generador de imágenes confocal (generador de imágenes IMX MicroConfocal).

9.3.1.6. Inmunoelectrotransferencias

Las células SU-DHL-6 se trataron con mAb de isotipo o mAb de CD19 durante una hora y después se estimularon con 1 µg/ml de anti-IgM durante 0, 5, 15 o 30 minutos. Las células se recolectaron mediante lavado dos veces con PBS helado y después se lisaron en regulador de lisis RIPA (Sigma-Aldrich, núm. de cat. R0278) suplementado con cóctel inhibidor de proteasa y fosfatasa 1x Halt™ (Thermo Fisher Scientific, núm. de cat. 78446). Las concentraciones de proteína de los lisados se midieron con el kit de ensayo de proteínas BCA (Thermo Fisher Scientific, núm. de cat. 23227). Se resolvieron 10-20 µg de lisados en geles de gradiente al 4-12 % (Thermo Fisher Scientific, núm. de cat. NW04120BOX) y se transfirieron a una membrana

de nitrocelulosa (Thermo Fisher Scientific, núm. de cat. IB23001). Las membranas se incubaron con anticuerpos primarios en la concentración sugerida del fabricante a 4 °C durante la noche. Los anticuerpos primarios usados en este estudio incluyen fosfo-AKT Ser473 (Cell Signaling Technology, núm. de cat. 4060) o GAPDH (Cell Signaling Technology, núm. de cat. 97166). Las membranas se lavaron tres veces con 1x PBST (Cell Signaling Technology, núm. de cat. 9809) y posteriormente se incubaron con un anticuerpo secundario (IgG (H+L) de cabra antirratón Peroxidasa AffiniPure, Jackson ImmunoResearch Laboratories, núm. de cat. 115-035-003) o peroxidasa AffiniPure de cabra anticonejo IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, núm. de cat. 111-035-003) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron tres veces con 1x PBST y después se incubaron con sustrato de transferencia Western (sustrato de transferencia Western Pierce™ ECL, Thermo Fisher Scientific, núm. de cat. 32106). Después, las membranas se detectan con un sistema de imágenes para transferencia Western (Azure Image Systems C600).

9.3.1.7. Ensayo de activación del elemento de respuesta de glucocorticoides (GRE)

Células	GRE	parental	K562
(pGL4.36[luc2P/MMTV/Hygro])	y	CD19 GRE humano	K562
(pGL4.36[luc2P/MMTV/Hygro])	o	CD19 GRE de cynomolgus	K562

(pGL4.36[luc2P/MMTV/Hygro]) se sembraron en placas blancas tratadas con cultivo de tejidos de 96 pocillos (Costar, núm. de cat. 3917) a 50.000 células por pocillo en 75 µl de medio de ensayo (1X RPMI + L-Glu, 1 % CSFBS (Thermo Fisher Scientific Inc., núm. de cat. 12676-029), 1 % de piruvato y 1 % de MEAA). Las células parentales GRE K562 o las células que expresan CD19 humano y CD19 de cynomolgus se trataron con 25 µl de CD19-GRM diluido en serie 4x en medio de ensayo y se incubaron durante 72 horas a 37 °C y CO₂ al 5 %. Se añadieron 100 nM de dexametasona como control positivo en estos ensayos. Después de 72 horas de incubación, las células se trataron con 100 µl del sistema de ensayo Dual-Glo Luciferase (Promega-E2920) durante 10 minutos y se analizaron para determinar la luminiscencia mediante Microbeta (PerkinElmer). Los datos de respuesta a la dosis se ajustaron a una curva sigmoideal con regresión no lineal, y los valores de EC₅₀ se calcularon con la ayuda de GraphPad 9.0 (GraphPad Software, Inc.).

9.3.1.8. Ensayo de indicador ADCC de NFAT

El bioensayo indicador de ADCC (variantes V y F; Promega, núm. de cat. G7010 y G9790) se realizaron de acuerdo con el protocolo del fabricante con modificaciones menores. Brevemente, la línea celular diana Raji se colocó en 5 µl del regulador de ensayo de ADCC (medio RPMI que contenía 4 % de suero de baja IgG) a 2500 células por

pocillo. El anticuerpo se tituló en el regulador de ensayo de ADCC y se añadieron 5 µl a la concentración de anticuerpo indicada. Las células efectoras de los kits de variantes de variantes V y F se resuspendieron en regulador de ensayo ADCC y se añadieron a 5 µl por pocillo para lograr una relación de célula efectora a diana de 6:1. Las mezclas de células diana-anticuerpo se incubaron con células efectoras que expresan la variante V y la variante F a 37 °C durante 6 horas y 24 horas, respectivamente. Al final, se añadieron 15 µl de reactivos de luciferasa Bio-Glo y la actividad de luciferasa se midió con el lector de placas SpectraMax M5 de Molecular Devices.

9.3.1.9. Ensayo ADCC de cocultivo de PBMC

Las líneas celulares diana (RS4;11, Raji y KARPAS422) se lavaron con PBS y se marcaron con 1 µM de CFSE en PBS (Thermo Fisher Scientific, núm. de cat. C34554) durante 5 minutos a 37 °C. A continuación, las células diana marcadas se lavaron 3 veces con medio que contenía FBS al 10 %. Se sembraron 20.000 células diana marcadas en 50 µl en placas de 96 pocillos en forma de V. Los anticuerpos y ADC se valoraron en medios de cultivo y se añadieron 10 µl para lograr las concentraciones finales indicadas. Se añadieron PMBC de un donante normal (AllCells) en 40 µl en una proporción de células efectoras a células diana de 20:1 y las células se incubaron a 37 °C durante 4 horas. Después

de la incubación, las células se lavan una vez con PBS y se tiñen con el kit de tinción de células muertas violetas fijables Live/Dead (Thermo Fisher Scientific núm. de cat. L34955) durante 30 minutos a temperatura ambiente y después se lavan una vez con 200 µl de PBS helado. Las células se fijan con paraformaldehído al 4 % en PBS durante 15 minutos y después se lavan una vez con 200 µl de PBS. Las células fijadas se resuspenden en 100 µl de PBS y se almacenan a 4 °C hasta su análisis en el citómetro de flujo Stratifiedigm S1000EON. Se capturó el porcentaje de células positivas para colorante vivo/muerto violeta, y se calculó el % de lisis específica restando el porcentaje de células positivas para colorante vivo/muerto violeta en cada condición tratada con el control no tratado que contenía solo células efectoras y diana.

9.3.1.10. Ensayo de ADCP

Los monocitos humanos (STEMCELL Technologies) se diferenciaron en macrófagos durante 8 días en RPMI-1640 que contenía FBS al 10 % y 50 ng/ml de M-CSF humano recombinante (BioLegend). Se separaron macrófagos completamente diferenciados de los matraces para cocultivarlos con células cancerosas diana en los ensayos de fagocitosis. La línea celular de linfoma no Hodgkins humano Raji y NuDHL1 que expresan CD19 endógeno se seleccionaron como células diana. Después de lavar con PBS, las células cancerosas diana se

marcaron con 5 μ M de solución de colorante CFSE (Thermo Fisher Scientific) durante 15 min y después se coincubaron con macrófagos humanos en una proporción de 1:1. Se añadieron mAb de CD19 o CD19-GRM en diversas concentraciones. Después del cocultivo durante 3 horas a 37 °C, las células se recolectaron, se lavaron y se tiñeron con anticuerpos contra un marcador de maduración de macrófagos, anticuerpo CD68 marcado con APC-Cy7 (BioLegend), seguido de análisis de citometría de flujo. El índice de fagocitosis se calculó contando los macrófagos doblemente positivos CFSE+CD68+ entre el total de macrófagos CD68+, lo que muestra el percentil de población de macrófagos fagocitadores.

9.3.1.11. Ensayo de apoptosis

La apoptosis se detectó usando un ensayo de transferencia Western. Las líneas celulares DLBCL Farage, SU-DHL-6, OCI-LY19 se trataron con carga útil GRM (100 nM) o ADC-1 (1 μ M) durante los tiempos indicados antes de la lisis celular. Los lisados celulares se generaron usando un reactivo de extracción de proteína (reactivo de extracción de proteína de mamífero M-PER™, Thermo Fisher Scientific, núm. de cat. 78501) y se determinó la concentración de proteína usando un ensayo de Bradford (Kit de ensayo de Bradford Compatible con detergente Pierce™, Thermo Fisher Scientific, núm. de cat. 23246). Los lisados de proteínas (10 μ g) de cada condición de tratamiento se

resolvieron en gel de poliacrilamida (Bolt™ 4 al 12 %, Bis-Tris) y se transfirieron a una membrana de PVDF con un dispositivo de transferencia de gel (dispositivo de transferencia de gel iBlot™ 2). La membrana se bloqueó con BSA al 5 % y después se sometió a inmunotransferencia con anticuerpos contra las proteínas de interés: BIM (Cell Signaling, núm. de cat. 2933), caspasa 3 (Cell Signaling, núm. de cat. 9662), PARP (Cell Signaling, núm. de cat. 9532) y GAPDH (Cell Signaling, núm. de cat. 5174). Posteriormente, las membranas se probaron con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) contra IgG de conejo o ratón y se detectaron con un sustrato para peroxidasa de rábano picante quimioluminiscente (sustrato quimioluminiscente SuperSignal™ West Pico PLUS, Thermo Fisher Scientific, núm. de cat. 34580) en un sistema de imágenes para western blot (Azure Imager).

9.3.2. Estudios in vivo

9.3.2.1. Ratones y crianza

Las hembras CB17/SCID y SCID/beige se obtuvieron de Charles River (Wilmington, MA) y la NSG IL-15 humanizada CD34+ se obtuvo de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME), a las 6 a 8 semanas de edad y se alojaron en un máximo de 10 por jaula. El peso corporal tras la llegada fue de 18 a 20

g. El alimento y agua estuvieron disponibles a voluntad. Los ratones se aclimataron a las instalaciones para animales durante un período de al menos tres días antes del comienzo de los experimentos. Se estudió a los animales en la pauta de fase lumínica de 12 horas de luz: 12-de oscuridad (encendido de las luces a las 06:00 horas). Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de AbbVie y la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud.

9.3.2.2. Compuestos

Se usó la vía de administración intraperitoneal. La molécula pequeña de GRM (GRM-SM) se formuló en HPMC al 0,05 %, Tween-80 al 0,02 % en agua y se almacenó a 4 °C, con dosificación oral.

El mAb de CD19 del Ejemplo 1 es un anticuerpo monoclonal afucosilado (IgG1, κ) que tiene una gran afinidad por el CD19 humano y de mono cynomolgus. El ADC-1 es un conjugado de mAb de CD19 enlazado con un enlazador de péptidos de bromoacetamida alanina-alanina a la molécula GRM de la Fórmula V. El anticuerpo de isotipo (AB095) reconoce el antígeno del toxoide tetánico que no se muestra en el xenoinjerto ni en ningún tejido murino.

9.3.2.3. Parámetros de eficacia

Los parámetros de amplitud (inhibición máxima del crecimiento tumoral, $[TGI_{\text{máx}}]$) y durabilidad (retraso del crecimiento tumoral, TGD) de la respuesta terapéutica se usan para referirse a la eficacia del fármaco. El TGI indica la divergencia entre el volumen medio del tumor de un grupo tratado con el fármaco y el volumen medio del tumor del grupo de control tratado con el vehículo del fármaco o el anticuerpo que no se une al isotipo y se expresa como un porcentaje del volumen medio del grupo de control. El valor de $TGI_{\text{máx}}$ se determina en el momento en que la diferencia entre el grupo tratado, y el de control es máxima. El $TGD_{(n)}$ indica la diferencia del tiempo medio de un grupo tratado con fármaco para alcanzar un volumen tumoral definido (1 cm^3) en comparación con el tiempo medio de un grupo de control tratado con vehículo para alcanzar el mismo volumen. Esta diferencia se expresa como un porcentaje de la mediana del tiempo del grupo de control para alcanzar el volumen tumoral especificado.

9.3.2.4. Generación de ratones portadores de tumores y determinación del volumen tumoral de tumores de flanco subcutáneos

Para cada estudio de xenoinjerto subcutáneo, se inocularon células viables en el flanco derecho de los ratones el día 0. El volumen de inyección fue 0,1 ml compuesto por una mezcla 1:1 de S-MEM o HBSS (Fisher

Scientific, MA) y Matrigel (BD, Franklin Lakes, NJ). Los tumores tenían un tamaño similar a aproximadamente 80 a 200 mm³. La terapia generalmente comenzó dentro de las 24 horas posteriores a la aleatorización y la comparación del tamaño de los tumores en las cohortes requeridas. Los ratones pesaron aproximadamente 20-22 g al inicio de la terapia. El volumen tumoral se estimó de una a dos veces por semana. Las mediciones de la longitud (L) y anchura (W) del tumor se obtuvieron mediante calibradores electrónicos y el volumen se calculó según la siguiente ecuación: $V = (L \times W^2)/2$. Los ratones se sacrificaron cuando el volumen del tumor alcanzó un máximo de 2000 mm³ o si la salud animal se vio comprometida, según las pautas institucionales.

9.3.2.5. Estadísticas

Los datos de los experimentos in vivo se analizaron usando la prueba t de Student para valores de TGI_{máx} y una prueba de rango logarítmico (prueba U de Mann-Whitney o Mantel Cox) para TGD. Las diferencias en las tasas de respuesta se evaluaron mediante la prueba exacta de Fisher.

9.3.2.6. Estudios de PDX

Los estudios de xenoinjerto derivado del paciente (PDX) se realizaron en modelos DLBCL establecidos en WuXi, que se originaron a partir de tumores primarios de pacientes extirpados quirúrgicamente. El historial de tratamiento del

paciente se recopiló de acuerdo con los protocolos y las pautas establecidas por las juntas de revisión institucionales. Cada muestra de tumor (suspensión de células individuales o fragmentos de tumor) se preparó en Matrigel (BD Biosciences) y se implantó en el flanco de ratones NOD scid de 6 a 8 semanas de edad. Los ratones se manipularon y alojaron de acuerdo con los protocolos y procedimientos de IACUC/AALAS. Los tumores se midieron dos veces por semana a través de medidas de calibre (longitud x anchura²)/2 y el tratamiento se inició cuando los volúmenes de los tumores alcanzaron aproximadamente 150-200 mm³. Los ratones se trataron por vía intraperitoneal una vez con los artículos de prueba como se indica con n = 5/grupo (vehículo, anticuerpo CD19, ADC-1). Para cada modelo de DLBCL PDX probado (6 células B del centro germinal (GCB) y 4 sin GCB, que incluye un subtipo de células B no activadas por GCB (ABC) difícil de tratar), se determinó la inhibición del crecimiento tumoral después del tratamiento con ADC-1 como sigue: $\Delta \%TGI \text{ máx} = 1 - (\text{volumen tumoral del grupo tratado en el día X} - \text{volumen tumoral del grupo tratado en la aleatorización}) / (\text{volumen tumoral de control en el día X} - \text{volumen tumoral de control en la aleatorización}) \times 100$. El $\Delta \%TGI \text{ máx}$ se determinó cuando la diferencia entre los grupos de tratamiento y control era máxima. Se determinó que un modelo PDX respondía o no respondía basado en su capacidad para inducir la regresión del tumor (respondedor): >105 %

delta de TGI máx. - respuesta sí/no. El cambio de volumen tumoral (%) también se calculó y representó gráficamente basado en el punto temporal en el que los tumores de control con vehículo habían alcanzado 1000 mm³, calculado mediante $[(\text{volumen tumoral en el punto temporal} / \text{volumen tumoral en la aleatorización}) - 1] \times 100$. Ver la Figura 13A-B.

9.3.2.7. Actividad de unión

Se usó citometría de flujo para evaluar la unión de la superficie celular de ADC-1 a diferentes líneas de células cancerosas que expresan endógenamente células CD19 y 293T transducidas con CD19 humano de longitud completa. El ADC-1 mostró un EC₅₀ vinculante que varió entre 0,544 y 1,061 nM en las líneas celulares de linfoma de células B Raji (linfoma de Burkitt), SUP-B15 (leucemia linfoblástica aguda), RS4;11 (leucemia linfoblástica aguda) y OCI-LY19 (leucemia linfoblástica aguda difusa) y OCI-LY19 (leucemia linfoblástica aguda difusa). linfoma celular) (Tabla 4), y unión a EC₅₀ de 1,086 nM en células 293T diseñadas con CD19 humano de longitud completa (Tabla 4). El anticuerpo CD19 afucosilado parental no conjugado del Ejemplo 1 (CD19 mAb) mostró una afinidad de unión similar con EC₅₀ que oscilaba entre 0,401 y 0,836 nM (Tabla 4) y una EC₅₀ de unión de 0,977 nM en células 293T diseñadas con CD19 humano de longitud completa (Tabla 4). Tanto el ADC-1 como el mAb

de CD19 no exhibieron unión detectable a la línea celular de cáncer colorrectal CD19-negativo HCT116.

Tabla 4. Afinidad de unión de ADC-1 a CD19 celular

	EC ₅₀ de unión (nM) ^a	
	mAb de CD19	ADC-1
CD19 celular mediante citometría de flujo		
OCI-LY19 (DLBCL)	0,836	1,061
Raji (BL)	0,713	0,939
RS4;11 (ALL)	0,401	0,544
SUP-B15 (ALL)	0,683	0,928
HCT116 (CD19-negativo- CRC)	n.d.	n.d.
CD19 celular diseñado genéticamente mediante citometría de flujo		
Línea celular diseñada genéticamente de CD19 humano 293T	0,977	1,086
Células 293T parentales	n.d.	n.d.

ALL= leucemia linfoblástica aguda; BL= linfoma de Burkitt; CRC= cáncer colorrectal; DLBCL= linfoma difuso de células B grandes, n.d.= no detectado
a. El EC₅₀ promedio de dos experimentos independientes se muestran.

9.3.2.8. La carga útil del modulador del receptor de glucocorticoides (GRM) es más potente que los glucocorticoides clínicamente aprobados

La potencia de las cargas útiles de GRM se comparó con los glucocorticoides clínicamente aprobados (dexametasona y prednisolona) mediante pruebas en células RS4;11 *in vitro*. La carga útil de GRM de la Fórmula IV mostró una mayor potencia en comparación con la dexametasona o la prednisolona (FIG. 1). Las CE₅₀ fueron 0,23 nM, 3,28 nM y 82,91 nM para la carga útil de GRM de la Fórmula IV, dexametasona y prednisolona, respectivamente.

9.3.2.9. El mAb de CD19 y ADC-1 internalizan y entregan la carga útil de GRM para inhibir la proliferación de células de linfoma de células B

Para investigar la capacidad de CD19 mAb para inducir la internalización de CD19, la línea celular de linfoma linfoblástico agudo (LLA) RS4;11 se trató con mAb de CD19 a 37 °C durante 0, 0,5, 1, 3 y 24 horas. mAb de CD19 induce la internalización de CD19 tan pronto como 0,5 horas y se localiza en el lisosoma, como indica la colocación de CD19 con el marcador lisosomal LAMP1 (Figura 2). De la misma manera, ADC-1 activa el indicador GRE de una manera dependiente de la dosis en células indicadoras del elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) K562, que se diseñaron para expresar CD19 humano (Figura 3).

Para evaluar la citotoxicidad de ADC-1, se realizaron ensayos de proliferación en líneas celulares que expresaban diferentes niveles de CD19. El ADC-1 inhibió la proliferación de líneas de células cancerosas que expresan CD19 que son sensibles a la carga útil del modulador del receptor de glucocorticoides (GRM) de la Fórmula IV y EC_{50} de citotoxicidad *in vitro* de ADC-1 que varía entre 0,082-0,321 nM (Tabla 5).

Tabla 5. Expresión de CD19 y sensibilidad a ADC-1 y tratamiento de la Fórmula IV en líneas celulares *in vitro*

	Número de copias del receptor CD19 (miles) ^a	Compuesto de EC ₅₀ de la Fórmula IV (nM) ^b	EC ₅₀ de ADC-1 (nM) ^b	EC ₅₀ de isotipo-GRM (nM) ^b
SUP-B15 (ALL)	109,3	0,089	0,321	43,1
RS4;11 (ALL)	113,9	0,100	0,082	69,7
OCI-LY19 (DLBCL)	98	0,675	103	511
KARPAS422 (DLBCL)	308,1	0,093	0,210	43,3
SU-DHL-6 (DLBCL)	52,3	1,519	0,311	227
HCT116 (CRC)	n.d.	>1000	>1000	>1000

n.d. = no se detectó

DLBCL = linfoma difuso de células B grandes, BL = linfoma de Burkitt, ALL = linfoma linfoblástico agudo, CRC = cáncer colorrectal

a. Número aproximado de moléculas de CD19 en la superficie celular por células según lo determinado por citometría de flujo como capacidad de unión de anticuerpos para la unión de mAb de CD19 a 67 nM.

b. Se muestra el EC₅₀ promedio del ensayo antiproliferativo en dos experimentos independientes. Los valores de EC₅₀ son representativos de la muerte celular completa como se observa para la Fórmula IV y CD19-GRM.

La carga útil de profármaco de GRM de la Fórmula III se desfosforila *in vitro/in vivo* a la carga útil de GRM desfosforilada de la Fórmula IV y, por lo tanto, la carga útil desfosforilada de la Fórmula IV se usó como control en nuestros estudios. El ADC-1 no era activo en la línea celular de cáncer colorrectal CD19 negativo HCT116 (Tabla 5). En particular, el ADC-1 fue más potente en comparación con el isotipo-GRM (Tabla 5), lo que indica el suministro dependiente de la diana CD19 de la carga útil de carga útil de GRM.

9.3.2.10. El mAb de CD19 inhibe la proliferación de células DLBCL y la activación de AKT *in vitro*

El CD19 es un correceptor para el receptor de células B y puede transactivar la vía PI3K/AKT (Burger, et al., Nat Rev Cancer, 2018. 18(3): p. 148-167). Además, el análisis genómico funcional demostró que un subconjunto de líneas celulares DLBCL depende de CD19 para sobrevivir (Phelan, J.D., et al., Nature, 2018. 560(7718): p. 387-391. El tratamiento con mAb de CD19 (del Ejemplo 1) inhibió la proliferación celular de SU-DHL-6 *in vitro* (Figura 4A). El pretratamiento de mAb de CD19 eliminó la fosforilación de AKT en respuesta a la estimulación de BCR con 1 µg/ml de anti-IgM (Figura 4B), demostrando que mAb de CD19 puede bloquear eficazmente la activación de la ruta de AKT mediada por BCR.

9.3.2.11. El ADC-1 media la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)

El mAb de CD19 y ADC-1 han sido afucosilados para mejorar su capacidad de provocar citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Los polimorfismos en FcγRIIIa (F158 o V158) afectan su unión a IgG1, IgG3 e IgG4 y la eficacia terapéutica de estos anticuerpos (Koene, H.R., et al., Blood, 1997. 90(3): p. 1109-1114; Cartron, G., et al., Blood, 2002. 99(3): p. 754-8; Wu, J., et al., J Clin Invest, 1997. 100(5): p. 1059-70).

Se usaron células Jurkat indicadoras de NFAT diseñadas para expresar FcγRIIIa de alta afinidad (V158) o baja afinidad (F158) para determinar la capacidad de CD19-

GRM para unirse a Fc γ RIIIa y provocar ADCC *in vitro*. El CD19-GRM indujo la activación del indicador ADCC NFAT con EC₅₀ de 0,017 nM y 0,018 nM en las variantes V158 y F158, respectivamente (Figura 5 A y B). Similarmente, el anticuerpo CD19 mAb no conjugado y afucosilado también indujo una potente actividad ADCC con EC₅₀ de 0,027 nM y 0,023 nM en las variantes V158 y F158, respectivamente (Figura 5 A y B).

El cocultivo de líneas celulares de linfoma de células B con PBMC primarias se realizó para evaluar funcionalmente la actividad ADCC de ADC-1. En estos ensayos, ADC-1 provocó la lisis de células cancerosas específicas de CD-19 con un EC₅₀ que oscilaba entre 0,07 y 0,142 nM (Figura 6 A-C). El mAb de CD19 no conjugado también mostró una lisis de células cancerosas específica de CD19 similar con EC₅₀ que oscilaba entre 0,075 y 0,405 nM (Figura 6 A-C).

9.3.2.12. El ADC-1 induce la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP)

La capacidad de ADC-1 para inducir ADCP se evaluó mediante el cultivo conjunto de células de linfoma de células B con macrófagos derivados de monocitos *in vitro*. Los tratamientos con ADC-1 y mAb de CD19 dieron como resultado una inducción de ADCP marcadamente mayor en comparación con los tratamientos con Isotipo mAb o Isotipo-GRM en NuDHL1 y Raji (Figura 7 A y B).

9.3.2.13. El GRM y ADC-1 inducen la apoptosis en líneas celulares DLBCL

El GRM y ADC1 indujeron la apoptosis medida por la regulación al alza de la proteína proapoptótica (BIM) y la inducción de marcadores de apoptosis (caspasa-3 escindida y PARP escindida) en las 3 líneas celulares analizadas (ver la Figura 15).

9.3.2.14. El ADC-1 provoca actividad antitumoral impulsada por GRM y ADCC *in vivo*

El ADC-1 es eficaz en tumores con expresión de superficie celular de CD19. Administrado como agente único, el ADC-1 inhibe el crecimiento de xenoinjertos subcutáneos de líneas de células tumorales humanas derivadas de neoplasias malignas de células B, tal como el linfoma difuso de células B grandes (DLBCL: OCI-LY19 y SU-DHL-6) y leucemia linfoblástica aguda (ALL: RS4;11) (Figura 8 y 9). Los xenoinjertos humanos se estudiaron utilizando ratones CB17/SCID inmunocomprometidos (OCI-LY19, RS4;11: Figura 8A y Figura 9), ratones SCID/beige inmunocomprometidos (SU-DHL-6: Figura 8B) y modelo de ratón humanizado CD34+ NSG-huIL-15 (OCI-LY19: Figura 10). El ADC-1 es eficaz de manera dependiente de la dosis cuando se administra por vía intraperitoneal como un bolo único. En los xenoinjertos de DLBCL (Figura 8), ADC-1 en todas las dosis y la molécula pequeña del modulador del receptor de glucocorticoides de

la Fórmula IV (GRM-SM) indujeron una inhibición del crecimiento tumoral estadísticamente significativa ($p < 0,05$), mayor que el vehículo, isotipo monoclonal anticuerpo, anticuerpo monoclonal humano CD19 y esteroide sistémico (prednisolona, dosificación diaria). Se observaron respuestas duraderas significativas a la dosis más alta en los xenoinjertos DLBCL. El AB095-GRM (isotipo-GRM control) mostró cierta inhibición del crecimiento en las dos dosis más altas, que fue significativamente menor ($p < 0,05$) que ADC-1 en las mismas dosis. El ADC-1 administrado en el modelo de xenoinjerto de ALL (Figura 9), mostró alta sensibilidad con respuestas duraderas a dosis bajas e inhibición del crecimiento tumoral estadísticamente significativa ($p < 0,05$). La regresión del tumor con la dosis 2 duró >100 días. Todas las dosis fueron toleradas, y no se observaron reducciones en el peso corporal.

El ADC-1 es eficaz de manera dependiente de la dosis en un modelo de ratón compatible con citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (huCD34+ NSG-huIL-15). En este modelo de ratón, los ratones NSG inmunocomprometidos se modifican genéticamente para expresar IL-15 humana y se injertan con PBMC humanas (CD34+). La IL-15 humana admite la viabilidad y función de las células NK que permiten el estudio de ADCC. En este sistema de ratón, el ADC-1 indujo la inhibición del crecimiento de xenoinjertos subcutáneos de líneas de células

tumorales humanas derivadas de DLBCL (OCI-LY19:1). Figura 10). Se observaron una inhibición del crecimiento tumoral estadísticamente significativa ($p < 0,05$) y respuestas duraderas (>50 días) en la dosis 3. El impacto de ADC-1 en las células B y las células NK de sangre periférica humana se midió al inicio (4 días antes de la dosis) y 1, 6, 13, 20, y 26 días después de la dosis. Tanto el número de células B humanas por microlitro de sangre de ratón como el porcentaje de células CD45+ humanas totales se redujeron para todos los niveles de dosis de ADC-1. La duración de la supresión de células B se asoció positivamente con el nivel de dosis. Los números de células NK no se vieron afectados significativamente por ADC-1 en ningún nivel de dosis.

La eficacia de ADC-1 también se comparó directamente con la combinación de mAb de CD19 y prednisolona sistémica en el modelo de xenoinjerto RS4;11. En este modelo, mAb de CD19 de agente único de dosis alta o prednisolona (QDx5]x3) mostró una modesta actividad antitumoral mientras que la combinación de ambos agentes condujo a una inhibición del crecimiento tumoral más sostenida (Figura 11). En particular, el tratamiento único de dosis baja de ADC-1 indujo una actividad antitumoral más duradera en comparación con la combinación de mAb de CD19 y prednisolona sistémica ([QDx5]x3).

El ADC-1 demuestra eficacia antitumoral en varios modelos diferentes de malignidad de células B, que

incluye DB (Figura 12A), SUPB15 (Figura 12B), RS4;11 (Figura 12C). La eficacia antitumoral de ADC-1 se comparó directamente con prednisolona, [QDx5]x3 o ADC de isotipo-GRM en modelos de xenoinjerto DB y SUPB15 cultivados en ratones inmunocomprometidos, como se indica. Se observó una eficacia antitumoral sostenida en los modelos de xenoinjerto DB y SUPB15 que fue superior a la prednisolona esteroide sistémica y superior al ADC de isotipo GRM que confirma la actividad del ADC-1 dirigida a CD19. El modelo de tumor ALL SUPB15 (Figura 12B) demuestra una actividad antitumoral sostenida (respuestas completas) que dura más de 50 días después de una dosis única de ADC-1. Se permitió que los tumores RS4;11 (FIG. 12C) crecieran hasta un tamaño grande ($>600 \text{ mm}^3$) y después se trataron con ADC-1 con una única dosis IP. Esta administración única de ADC-1 dio como resultado la regresión tumoral completa de estos tumores grandes que se mantuvo durante >40 días.

9.3.2.15. El ADC-1 provoca actividad antitumoral en modelos DLBCL PDX

Como se muestra en la Figura 13A, los 10 modelos de PDX de DLBCL demostraron una inhibición del crecimiento tumoral en relación con los PDX tratados con control del mismo modelo. Nueve de los 10 modelos exhibieron regresión tumoral usando una dosis única de ADC-1 en la dosis 3 (ver la Figura 13B). Se observó eficacia antitumoral en modelos

PDX derivados de pacientes GCB y sin GCB. Solo un modelo, 0232, no mostró estasis o regresión cuando se trató con la dosis 3 de ADC-1. Este modelo PDSX fue de un paciente que se sometió a 7 ciclos de tratamiento con R-CHOP. 3 modelos PDX de pacientes recurrentes R-CHOP tratados durante 4 ciclos, 0367, 0016 y 0207, respondieron.

Como se muestra en la Figura 14 A y B, una dosis única de ADC-1 en la dosis 3 demostró actividad antitumoral en comparación con el control del vehículo y los tratamientos con anticuerpos CD19. En la Figura 14A, el modelo PDX se derivó de un paciente con DLBCL, GCB que había sido tratado con 4 ciclos de R-CHOP. Este modelo de PDX muestra una ligera estasis cuando se trata con ibrutinib. El modelo derivado de PDX que se muestra en la Figura 14B era de un paciente DLBCL ABC que había recibido 4 ciclos de R-CHOP. Este modelo PDX es resistente al tratamiento con ibrutinib.