

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 989 338**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 47/68 (2007.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)
A61K 51/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.09.2015 E 19219511 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2024 EP 3693391**

(54) Título: **Anticuerpos anti CLL-1 e inmunoconjungados**

(30) Prioridad:

12.09.2014 US 201462049876 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

26.11.2024

(73) Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080, US**

(72) Inventor/es:

**ZHENG, BING;
POLSON, ANDREW;
CHIU, CECILIA;
LIANG, WEI-CHING y
WU, YAN**

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 989 338 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti CLL-1 e inmunoconjungados

5 Referencia a solicitudes relacionadas

Esta solicitud de patente reivindica la prioridad con respecto a la Solicitud Provisional de EE.UU. N.º de Serie 62/049876, presentada el 12 de septiembre de 2014.

10 Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos anti CLL-1 e inmunoconjungados y a métodos para utilizar los mismos.

15 Antecedentes

CLL-1 (también denominado CLEC12A, MICL y DCAL2), codifica un miembro de la superfamilia de lectina de tipo C/dominio similar a lectina de tipo C (CTL/CTLD). Los miembros de esta familia comparten un pliegue de proteína común y tienen diversas funciones, tales como adhesión celular, señalización entre células, renovación de glucoproteínas y papeles en la inflamación y la respuesta inmunitaria. Se ha demostrado que CLL-1 es un receptor transmembrana de tipo II que comprende un único dominio similar a lectina de tipo C (que no se prevé que se una ni al calcio ni al azúcar), una región de tallo, un dominio transmembrana y una cola citoplasmática corta que contiene un motivo ITIM. Además, CLL-1 está presente en monocitos y granulocitos en sangre periférica normal y médula ósea (BM), mientras que está ausente en tejidos no hematológicos. La CLL-1 también se expresa en células de leucemia mieloide aguda (AML), síndrome mielodisplásico (MDS) y leucemia mieloide crónica (CML). En particular, CLL-1 es un antígeno de superficie asociado a células madre leucémicas (LSC) expresado en una fracción de células de AML CD34+CD38- en AML CD34 positiva (CD34+).

La terapia basada en anticuerpos monoclonales (mAb) se ha convertido en una modalidad de tratamiento importante para el cáncer. La leucemia es muy adecuada para este enfoque debido a la accesibilidad de las células neoplásicas en la sangre, la médula ósea, el bazo y los ganglios linfáticos y los inmunofenotipos bien definidos de los diversos linajes y etapas de diferenciación hematopoyética que permiten la identificación de dianas antigenicas. La mayoría de los estudios para la leucemia mieloide aguda (AML) se han centrado en CD33. Sin embargo, las respuestas con el mAb anti CD33 no conjugado lintuzumab han tenido una actividad y un efecto modestos contra la (AML) y no han logrado mejorar los resultados de los pacientes en dos ensayos aleatorizados cuando se combinaron con quimioterapia convencional.

El documento WO 2013/169625 describe anticuerpos específicos de CLL-1 que se unen a células primarias que expresan CLL-1 procedentes de muestras de pacientes con AML.

Existe la necesidad en la técnica de agentes seguros y eficaces que se dirijan a la AML, incluyendo CLL-1, para el diagnóstico y el tratamiento de afecciones asociadas a CLL-1, tales como el cáncer. La invención cumple esta necesidad y proporciona otros beneficios.

Sumario

La invención proporciona anticuerpos anti CLL-1 e inmunoconjungados y sus usos médicos.

En el presente documento se proporcionan anticuerpos anti CLL-1 monoclonales aislados como se expone en las reivindicaciones, en donde el anticuerpo se une a un epítopo y/o se une a un epítopo superpuesto que comprende los aminoácidos de SEQ ID NO:49 y no se une a un epítopo que comprende la SEQ ID NO:50 y/o la SEQ ID NO:51. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti CLL-1 se une a un epítopo que comprende los aminoácidos de SEQ ID NO:49. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti CLL-1 se une a un epítopo que consiste o que consiste esencialmente en los aminoácidos de SEQ ID NO:49. En algunas realizaciones, el epítopo se determina por la huella de radicales hidroxilo.

En el presente documento se proporciona además un anticuerpo aislado que se une a CLL-1, en donde el anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7.

En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende: una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 33 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 32;

En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo se une a CLL-1 humano recombinante. En

algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo se une a CLL-1 de macaco cangrejero recombinante. En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo se une a CLL-1 endógeno sobre la superficie de mononucleocitos de sangre periférica humana (PBMC). En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo se une a CLL-1 endógeno sobre la superficie de PBMC de macaco cangrejero. En 5 algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo se une a CLL-1 endógeno sobre la superficie de una célula cancerosa. En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo se une a CLL-1 endógeno sobre la superficie de una célula cancerosa de AML. En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo se une a CLL-1 endógeno sobre la superficie de células HL-60. En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo se une a CLL-1 endógeno sobre la superficie de células EOL-1. En 10 algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo se une a CLL-1 que comprende una mutación K244Q (SEQ ID NO:1 con K244Q). En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo se une a un epítopo y/o se une a un epítopo superpuesto que comprende los aminoácidos de SEQ ID NO:49. En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo no se une a un epítopo que comprenda la SEQ ID NO:50 15 y/o la SEQ ID NO:51. En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo compite por la unión a CLL-1 humano con el anticuerpo del clon 687317 de R&D System. En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo se une a CLL-1 humano endógeno con una Kd inferior a 15 nM, inferior a 10 nM, inferior a 7 nM, inferior a 5 nM o inferior a 3 nM. En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo se une a CLL-1 humano recombinante con una Kd inferior a 10 nM, inferior a 7 nM, inferior a 5 nM o inferior a 3 nM. En 20 algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo se une a CLL-1 de macaco cangrejero recombinante con una Kd inferior a 10 nM, inferior a 7 nM, inferior a 5 nM o inferior a 3 nM, inferior a 2 nM o inferior a 1 nM.

En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo comprende uno o más residuos de aminoácidos de cisteína libre genomanipulados. En algunas realizaciones, el uno o más residuos de aminoácidos de cisteína libre genomanipulados están ubicados en la cadena ligera. En algunas realizaciones, el uno o más residuos de aminoácidos de cisteína libre genomanipulados en la cadena ligera comprenden V205C de acuerdo con la numeración de Kabat. En algunas realizaciones, el uno o más residuos de aminoácidos de cisteína libre genomanipulados en la cadena ligera comprenden K149C de acuerdo con la numeración de Kabat. En algunas 25 realizaciones, el uno o más residuos de aminoácidos de cisteína libre genomanipulados están ubicados en la cadena pesada. En algunas realizaciones, el uno o más residuos de aminoácidos de cisteína libre genomanipulados en la cadena pesada comprenden A118C de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones, el uno o más residuos de aminoácidos de cisteína libre genomanipulados en la cadena pesada comprenden S400C de acuerdo con 30 la numeración EU.

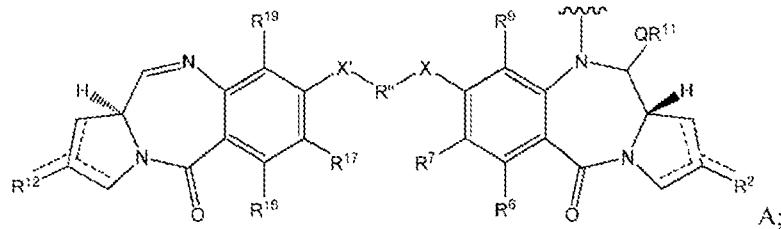
35 En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo es un anticuerpo humano o quimérico. En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo que se une a CLL-1. En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1, IgG2a o IgG2b.

40 Además, en el presente documento se proporcionan ácidos nucleicos aislados que codifican los anticuerpos descritos en el presente documento. Además, en el presente documento se proporcionan células hospedadoras que comprenden el ácido nucleico que codifica los anticuerpos descritos en el presente documento. En el presente documento se proporcionan también métodos para producir un anticuerpo que comprenden cultivar la célula hospedadora que comprende el ácido nucleico que codifica los anticuerpos descritos en el presente documento de 45 manera que se produzca el anticuerpo.

En el presente documento se proporcionan inmunoconjungados que comprenden los anticuerpos descritos en el presente documento y un agente citotóxico. En particular, en el presente documento se proporcionan inmunoconjungados que tienen la Fórmula Ab-(L-D)p, en donde:

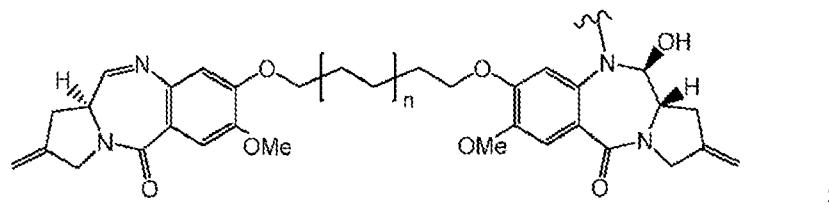
- 50
 (a) Ab es el anticuerpo descrito en el presente documento;
 (b) L es un enlazador;
 (c) D es un agente citotóxico y el agente citotóxico es un fármaco; y
 (d) p varía entre 1-8.

55 En algunas realizaciones de cualquiera de los inmunoconjungados, el agente citotóxico se selecciona de un maitansinoide, una calicheamicina, una pirrolobenzodiazepina y un derivado de nemorubicina. En algunas realizaciones de cualquiera de los inmunoconjungados, D es una pirrolobenzodiazepina de Fórmula A:



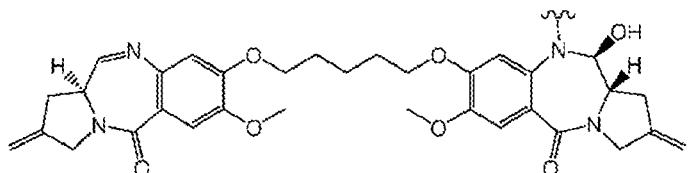
en donde la línea discontinua indica la presencia opcional de un doble enlace entre C1 y C2 o C2 y C3; R² se selecciona independientemente de H, OH, =O, =CH₂, CN, R, OR, =CH-R^D, =C(R^D)₂, O-SO₂-R, CO₂R y COR, y opcionalmente además seleccionados de halo o dihalo, en donde R^D se selecciona independientemente de R, CO₂R, COR, CHO, CO₂H y halo; R⁶ y R⁹ se seleccionan independientemente de H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR', NO₂, Me₃Sn y halo; R⁷ se selecciona independientemente de H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR', NO₂, Me₃Sn y halo; Q se selecciona independientemente de O, S y NH; R¹¹ es H o R o, donde Q es O, SO₃M, donde M es un catión metálico; R y R' se seleccionan cada uno independientemente de grupos alquilo C₁₋₈, heterociclico C₃₋₈ y arilo C₅₋₂₀ opcionalmente sustituidos y, opcionalmente, en relación con el grupo NRR'; R y R' junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo heterocíclico de 4, 5, 6 o 7 miembros opcionalmente sustituido; R¹², R¹⁶, R¹⁹ y R¹⁷ son como se define para R², R⁶, R⁹ y R⁷, respectivamente; R'' es un grupo alquíleno C₃₋₁₂, cuya cadena puede estar interrumpida por uno o más heteroátomos y/o anillos aromáticos que están opcionalmente sustituidos; y X y X' se seleccionan independientemente de O, S y N(H).

- 20 En algunas realizaciones de cualquiera de los inmunoconjungados, D tiene la estructura:

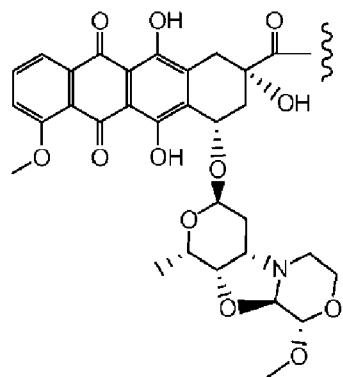


en donde n es 0 o 1.

- En algunas realizaciones de cualquiera de los inmunoconjugados, D tiene una estructura:

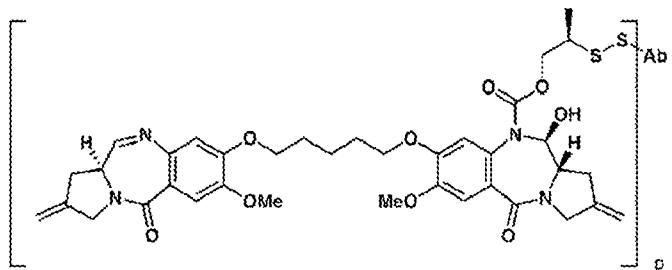


- 30 En algunas realizaciones de cualquiera de los inmunoconjugados, D es un derivado de nemorubicina. En algunas realizaciones de cualquiera de los inmunoconjugados, D tiene una estructura:



En algunas realizaciones de cualquiera de los inmunoconjugados, L es escindible por una proteasa. En algunas realizaciones de cualquiera de los inmunoconjugados, L es lável a los ácidos. En algunas realizaciones de cualquiera de los inmunoconjugados, L comprende hidrazone.

- 5 En algunas realizaciones de cualquiera de los inmunoconjugados, el inmunoconjunto tiene una estructura:



En algunas realizaciones de cualquiera de los inmunoconjugados, p varía entre 2-5.

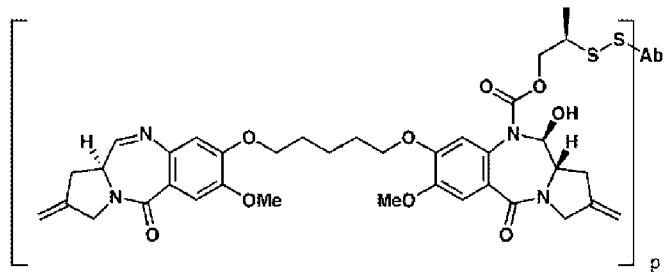
- 10 En algunas realizaciones, se proporcionan formulaciones farmacéuticas. En algunas realizaciones, una formulación farmacéutica comprende un inmunoconjunto descrito en el presente documento y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende un agente terapéutico adicional. En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es una antraciclina. En algunas realizaciones, la antraciclina es daunorrubicina o idarrubicina. En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es citarabina. En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es cladribina. En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es fludarabina o topotecán. En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es 5-azacitidina o decitabina.

- 20 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un inmunoconjunto como se expone en las reivindicaciones para su uso en el tratamiento de un individuo que tiene un cáncer CLL-1 positivo. Esto puede implicar administrar a un individuo una cantidad eficaz de un inmunoconjunto descrito en el presente documento o una formulación farmacéutica descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, el cáncer es leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mieloide crónica (CML) y/o síndrome mielodisplásico (MDS). En algunas realizaciones, el cáncer CLL-1 positivo es AML. En algunas realizaciones, el método comprende administrar un agente terapéutico adicional al individuo. En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es una antraciclina. En algunas realizaciones, la antraciclina es daunorrubicina o idarrubicina. En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es citarabina. En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es cladribina. En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es fludarabina o topotecán. En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es 5-azacitidina o decitabina.

- 30 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo anti CLL-1 como se expone en las reivindicaciones para su uso en la detección de un cáncer CLL-1 positivo en un sujeto. En algunas de dichas realizaciones, el anticuerpo anti CLL-1 marcado comprende un anticuerpo CLL-1 conjugado con un emisor de positrones. En algunas realizaciones, el emisor de positrones es ^{89}Zr .

35 Breve descripción de las figuras

- Las figuras 1A-B muestran la alineación de las secuencias de región variable de cadena ligera (A) y las secuencias de región variable de cadena pesada (B) de 6E7 murino (m), m21C9, m20B1 y m28H12.
- 40 Las figuras 2A-B muestran la alineación de las secuencias de región variable de cadena ligera (A) y las secuencias de región variable de cadena pesada (B) de K1H1, m6E7, 6E7.L4H1e humanizado (h) y h6E7.L4H1e.A54.
- Las figuras 3A-B muestran la alineación de las secuencias de región variable de cadena ligera (A) y las secuencias de región variable de cadena pesada (B) de K1H1, m21C9 y h21C9.L2H3.
- 45 La figura 4 muestra el cambio en el volumen tumoral (mm^3) en el tiempo tras el tratamiento con ch21C9, ch3H10, ch28H12, ch20B1 y ch6E7 conjugados con PNU a través de una cadena pesada genomanipulada con cisteína en el residuo de aminoácido 118 de acuerdo con numeración EU (A118C) a razón de 10 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ en el modelo de xenoinjerto EOL-1.
- La figura 5 muestra el cambio en el volumen tumoral (mm^3) en el tiempo tras el tratamiento con ch21C9, ch3H10, ch28H12, ch20B1 y ch6E7 conjugados con PNU a través de una cadena pesada genomanipulada con cisteína en el residuo de aminoácido 118 de acuerdo con numeración EU (A118C) a razón de 10 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ en el modelo de xenoinjerto HL-60.
- 50 La figura 6 muestra el cambio en el volumen tumoral (mm^3) en el tiempo tras el tratamiento con el anticuerpo humanizado 6E7.L4H1e o 21C9.L2H3 con una cadena pesada genomanipulada con cisteína en el residuo de aminoácido 118 de acuerdo con la numeración EU (A118C) o una cadena ligera genomanipulada con cisteína en el residuo de aminoácido número 149 de acuerdo con la numeración de Kabat (K149C) conjugado con PBD (SG34) a razón de 10 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ o 20 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ en el modelo de xenoinjerto HL-60. A continuación se muestra la estructura del anticuerpo conjugado con SG34:



La figura 7 muestra el cambio en el volumen tumoral (mm^3) en el tiempo tras el tratamiento con el anticuerpo humanizado 6E7.L4H1e o 6E7.L4H1eN54A con una cadena ligera genomanipulada con cisteína en el residuo de aminoácido número 149 de acuerdo con la numeración de Kabat (K149C) conjugado con PBD (SG34) a razón de 5 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 10 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ o 20 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ en un modelo de xenoinjerto HL-60.

Descripción detallada

10

15 Un "marco aceptor humano", a efectos del presente documento, es un marco que comprende la secuencia de aminoácidos de un marco de dominio variable de cadena ligera (VL) o un marco de dominio variable de cadena pesada (VH) procedente de un marco de inmunoglobulina humana o de un marco consenso humano, como se define a continuación. Un marco aceptor humano "procedente de" un marco de inmunoglobulina humana o de un marco consenso humano, puede comprender la misma secuencia de aminoácidos del mismo o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos. En algunas realizaciones, el número de cambios de aminoácidos es de 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos o 2 o menos. En algunas realizaciones, el marco aceptor humano de VL es idéntico en secuencia a la secuencia del marco de inmunoglobulina humana de VL o a la secuencia de marco consenso humana.

20

"Afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y se puede representar generalmente por la constante de dissociación (K_d). La afinidad se puede medir mediante métodos habituales conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. A continuación se describen realizaciones específicas ilustrativas y de ejemplo para medir la afinidad de unión.

Un anticuerpo "madurado por afinidad" se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables (HVR), en comparación con un anticuerpo precursor que no posee dichas alteraciones, dando como resultado dichas alteraciones una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno.

35 Las expresiones "anticuerpo anti CLL-1" y "un anticuerpo que se une a CLL-1" se refieren a un anticuerpo que es
capaz de unirse a CLL-1 con suficiente afinidad de manera que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o
terapéutico para el direccionamiento a CLL-1. En una realización, la extensión de la unión de un anticuerpo anti CLL-
1 con una proteína distinta de CLL-1 no relacionada es inferior a aproximadamente el 10 % de la unión del anticuerpo
40 a CLL-1 según lo medido, por ejemplo, mediante radioinmunoensayo (RIA, por sus siglas en inglés). En determinadas
realizaciones, un anticuerpo que se une a CLL-1 tiene una constante de disociación (K_d) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$,
 $\leq 5 \text{ nm}$, $\leq 4 \text{ nM}$, $\leq 3 \text{ nM}$, $\leq 2 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de
 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M). En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti CLL-1 se une a
un epítopo de CLL-1 que está conservado entre CLL-1 de diferentes especies.

45 El término "anticuerpo" se usa en el presente documento en el sentido más amplio y abarca diversas estructuras de anticuerpos, incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo, en tanto que muestren la actividad de unión a antígeno deseada.

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula diferente a un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto y que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero sin limitación, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenarias (por ejemplo, scFv); y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza

- normalmente por crecimiento/proliferación celular no regulados. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma (por ejemplo, linfoma de Hodgkin y linfoma no Hodgkin), blastoma, sarcoma y leucemia. Los ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen leucemia mieloide aguda (AML), síndrome mielodisplásico (MDS), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia mielomonocítica crónica, leucemia promielocítica aguda (APL), 5 trastorno mieloproliferativo crónico, leucemia trombocítica, leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B precursores (pre-B-ALL), leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T precursores (preT-ALL), mieloma múltiple (MM), enfermedad de los mastocitos, leucemia de mastocitos, sarcoma de mastocitos, sarcomas mieloídes, leucemia linfoide y leucemia 10 indiferenciada. En algunas realizaciones, el cáncer es leucemia mieloide. En algunas realizaciones, el cáncer es leucemia mieloide aguda (AML).
- El término anticuerpo "químérico" se refiere a un anticuerpo en el que una parte de la cadena ligera y/o pesada procede de una fuente o especie particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera procede de una fuente o especie diferente.
- La "clase" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante que tiene su cadena pesada. Hay cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden subdividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α, δ, ε, γ y μ, respectivamente.
- Como se usa en el presente documento, la expresión "agente citotóxico" se refiere a una sustancia que inhibe o previene una función celular y/o provoca la muerte o destrucción celular. Los agentes citotóxicos incluyen, pero sin limitación, isótopos radiactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², Pb²¹² e isótopos radiactivos de Lu); agentes o fármacos quimioterápicos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorrubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes); agentes inhibidores del crecimiento; enzimas y fragmentos de las mismas, tales como enzimas nucleolíticas; antibióticos; toxinas, tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas; y los diversos agentes antitumorales o antineoplásicos divulgados a continuación.
- Las "funciones efectoras" se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, por sus siglas en inglés); unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC, por sus siglas en inglés); fagocitosis; regulación negativa de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B); y activación de linfocitos B.
- Una "cantidad eficaz" de un agente, por ejemplo, una formulación farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, en las dosificaciones y durante los períodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico o profiláctico deseado.
- El término "epítopo" se refiere al sitio particular sobre una molécula de antígeno al que se une un anticuerpo. En algunas realizaciones, el sitio particular en una molécula de antígeno al que se une un anticuerpo se determina por la huella de radicales hidroxilo.
- La expresión "región Fc" en el presente documento se usa para definir una región en el extremo C de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. La expresión incluye regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. En una realización, una región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226 o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina del extremo C (Lys447) de la región Fc puede estar presente o no. A menos que se especifique lo contrario en el presente documento, la numeración de los residuos de aminoácidos en la región Fc o en la región constante es según el sistema de numeración EU, también llamado índice EU, como se describe en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.
- "Marco" o "FR" se refiere a residuos de dominio variable distintos de residuos de la región hipervariable (HVR). La FR de un dominio variable consiste generalmente en cuatro dominios FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. Por consiguiente, las secuencias HVR y FR aparecen generalmente en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.
- Las expresiones "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto", y "anticuerpo completo" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo natural o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como se define en el presente documento.
- La expresión "formas glucosiladas de CLL-1" se refiere a formas de CLL-1 de origen natural que se han modificados después de la traducción mediante la adición de residuos de carbohidrato.

- Las expresiones "célula hospedadora", "línea celular hospedadora", y "cultivo de células hospedadoras", se usan indistintamente y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células hospedadoras incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen a la célula primaria transformada y a la descendencia procedente de la misma, independientemente del número de pasos.
- 5 La descendencia puede no ser completamente idéntica en el contenido de ácidos nucleicos a una célula precursora, sino que puede contener mutaciones. En el presente documento se incluye la descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica cribada o seleccionada en la célula transformada originalmente.
- 10 Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana o que procede de una fuente no humana, que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias codificantes de anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos.
- 15 Un "marco consenso humano" es un marco que representa los restos de aminoácidos más comunes en una selección de secuencias marco de VL o VH de inmunoglobulina humana. Generalmente, la selección de secuencias VL o VH de inmunoglobulina humana procede de un subgrupo de secuencias de dominio variable. Generalmente, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta edición, NIH Publicación 91-3242, Bethesda MD (1991), vol. 1-3. En una realización, para la VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I, como en Kabat *et al.*, citado anteriormente. En una realización, para la VH, el subgrupo es el subgrupo III, como en Kabat *et al.*, citado anteriormente.
- 20 Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo químico que comprende residuos de aminoácido procedentes de HVR no humanas y residuos de aminoácidos procedentes de FR humanas. En determinadas realizaciones, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las HVR (por ejemplo, CDR) corresponden a las de un anticuerpo no humano y todas o sustancialmente todas las FR corresponden con las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado puede comprender opcionalmente al menos una porción de una región constante de anticuerpo procedente de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se ha sometido a humanización.
- 25 Un anticuerpo "región hipervariable" o "HVR", como se usa en el presente documento, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en su secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos ("bucle hipervariable"). Generalmente, los anticuerpos naturales de cuatro cadenas comprenden seis HVR; tres en la VH (H1, H2, H3) y tres en la VL (L1, L2, L3). Las HVR comprenden generalmente residuos de aminoácidos de los bucles hipervariables y/o forman las "regiones determinantes de complementariedad" (CDR), siendo estas últimas las de mayor variabilidad de secuencia y/o que están implicadas en el reconocimiento de antígenos. Los bucles hipervariables de ejemplo se producen en los residuos de aminoácidos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3). (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Las CDR de ejemplo (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3) se producen en los restos de aminoácidos 24-34 de L1, 50-56 de L2, 89-97 de L3, 31-35B de H1, 50-65 de H2 y 95-102 de H3. (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Con la excepción de CDR1 en VH, las CDR comprenden generalmente los residuos de aminoácidos que forman los bucles hipervariables. Las CDR también comprenden "residuos determinantes de especificidad", o "SDR", que son residuos que entran en contacto con el antígeno. Los SDR están contenidos dentro de las regiones de las CDR denominadas CDR-abreviadas o a-CDR. Las a-CDR de ejemplo (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2 y a-CDR-H3) se producen en los residuos de aminoácidos 31-34 de L1, 50-55 de L2, 89-96 de L3, 31-35B de H1, 50-58 de H2 y 95-102 de H3. (Véase Almagro y Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)). A menos que se indique lo contrario, los residuos de HVR y otros residuos en el dominio variable (por ejemplo, residuos de FR) se numeran en el presente documento de acuerdo con Kabat *et al.*, citado anteriormente.
- 30 Un "inmunoconjungado" es un anticuerpo conjugado con una o más moléculas heterólogas, incluyendo, pero sin limitación, un agente citotóxico.
- 35 Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero sin limitación, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, primates humanos y no humanos, tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En determinadas realizaciones, el individuo o sujeto es un ser humano.
- 40 Un "anticuerpo aislado" es un anticuerpo que se ha separado de su entorno natural. En algunas realizaciones, un anticuerpo se purifica hasta una pureza mayor del 95 % o del 99 % como se determina mediante, por ejemplo, electroforesis (por ejemplo, SDS-PAGE, isoelectroenfoque (IEF), electroforesis capilar) o cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico o HPLC de fase inversa). Para una revisión de los métodos para evaluar la pureza de los anticuerpos, véase, por ejemplo, Flatman *et al.*, J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007).
- 45 Un "ácido nucleico aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha separado de un componente de su
- 50
- 55
- 60
- 65

entorno natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que normalmente contienen la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente extracromosómicamente o en una ubicación cromosómica que es diferente a su ubicación cromosómica natural.

- 5 "Ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti CLL-1" se refiere a una o más moléculas de ácido nucleico que codifican cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos (o fragmentos de las mismas), incluyendo dicha una o más moléculas de ácido nucleico en un solo vector o en vectores separados y dicha una o más moléculas de ácido nucleico presentes en una o más ubicaciones de una célula hospedadora.
- 10 El término "CLL-1", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier CLL-1 maduro natural que es resultado del procesamiento de una proteína precursora de CLL-1 en una célula. El término incluye CLL-1 procedente de cualquier fuente de vertebrados, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos y macacos cangrejeros) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. La expresión también abarca variantes de origen natural de CLL-1, por ejemplo, variantes de corte y empalme o variantes alélicas.
- 15 15 La secuencia de aminoácidos de una secuencia de proteína CLL-1 humana de ejemplo se muestra en la SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, la secuencia de proteína CLL-1 humana comprende K244Q SNP (SEQ ID NO:1, en donde K244 es Q). La secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular de ejemplo son los aminoácidos de SEQ ID NO:2. La secuencia de aminoácidos de un dominio similar la lectina de tipo C (CTLD) de ejemplo son los aminoácidos de SEQ ID NO:3. La secuencia de aminoácidos de una proteína CLL-1 de macaco cangrejero de ejemplo se muestra 20 en la SEQ ID NO:4.

La expresión "cáncer CLL-1 positivo" se refiere a un cáncer que comprende células que expresan CLL-1 en su superficie. En algunas realizaciones, la expresión de CLL-1 en la superficie celular se determina, por ejemplo, usando anticuerpos contra CLL-1 en un método tal como inmunohistoquímica, FACS, etc. Como alternativa, se considera que 25 la expresión de ARNm de CLL-1 se correlaciona con la expresión de CLL-1 en la superficie celular y se puede determinar mediante un método seleccionado de hibridación *in situ* y RT-PCR (incluyendo RT-PCR cuantitativa).

La expresión "célula CLL-1 positiva" se refiere a una célula que expresa CLL-1 en su superficie.

- 30 Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítopo, salvo por posibles variantes de anticuerpo, por ejemplo, que contienen mutaciones de origen natural o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, estando dichas variantes generalmente presentes en escasas cantidades. A diferencia de 35 las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales está dirigido contra un solo determinante de un antígeno. Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se ha obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea y no debe interpretarse como que requiera la producción del anticuerpo por ningún método en particular. Por ejemplo, los 40 anticuerpos monoclonales para su uso de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante una diversidad de técnicas, incluyendo, pero sin limitación, el método de hibridoma, métodos de ADN recombinante, métodos de presentación en fagos y métodos que utilizan animales transgénicos que contienen la totalidad o parte de los locus de inmunoglobulinas humanas, describiéndose en el presente documento dichos métodos y otros métodos de ejemplo para preparar anticuerpos monoclonales.

45 45 Un "anticuerpo no marcado" se refiere a un anticuerpo que no está conjugado con un resto heterólogo (por ejemplo, un resto citotóxico) o con un radiomarcador. El anticuerpo no marcado puede estar presente en una formulación farmacéutica.

50 Los "anticuerpos naturales" se refieren a moléculas de inmunoglobulina de origen natural con diversas estructuras. Por ejemplo, los anticuerpos IgG naturales son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 Dalton, compuestas por dos cadenas ligera idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que están unidas por enlaces disulfuro. Desde el extremo N al extremo C, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también denominada dominio variable pesado o dominio variable de cadena pesada, seguida de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). De manera similar, desde el extremo N al extremo C, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también denominada dominio variable ligero o dominio variable de cadena ligera, seguido por un dominio constante ligero (CL). La cadena ligera de un anticuerpo puede asignarse a uno de dos tipos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

60 60 El término "prospecto" se usa para referirse a las instrucciones habitualmente incluidas en los envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, terapia combinada, contraindicaciones y/o advertencias relativas al uso de dichos productos terapéuticos.

65 El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto de la secuencia de un polipéptido de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia del polipéptido de referencia, después de alinear las secuencias e

introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia y sin tomar en consideración ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación para determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de diversas maneras que se encuentran dentro de las capacidades del experto en la técnica, por ejemplo, usando programas informáticos disponibles de manera pública, tales como los programas BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros adecuados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se estén comparando. A efectos del presente documento, sin embargo, los valores del % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue programado por Genentech, Inc. y el código fuente, junto con la documentación para usuarios, se han depositado en la Oficina de Derechos de Autor de los Estados Unidos (U.S. Copyright Office), Washington D.C., 20559, donde está registrada con el n.º de registro de derechos de autor de los Estados Unidos TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible al público a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California o puede compilarse a partir de su código fuente. El programa ALIGN-2 debe compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencia se establecen por el programa ALIGN-2 y no varían.

En las situaciones donde se emplea ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada para, con o contra una secuencia de aminoácidos B dada (que puede citarse, como alternativa, como una secuencia de aminoácidos dada A que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos para, con o contra una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula de la siguiente manera:

100 veces la fracción X/Y
donde X es el número de residuos de aminoácidos valorados como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en la alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de A con respecto a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. A menos que se indique específicamente lo contrario, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente anterior usando el programa informático ALIGN-2.

La expresión "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que se encuentra en una forma que permite que la actividad biológica de un principio activo contenido en la misma sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se le administre la formulación.

Un "portador farmacéuticamente aceptable" es un ingrediente de una formulación farmacéutica, distinto de un principio activo, que no es tóxico para un sujeto. Un portador farmacéuticamente aceptable incluye, pero sin limitación, un tampón, excipiente, estabilizante o conservante.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y variaciones gramaticales del mismo, tales como "tratar" o "que trata") se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo que se esté tratando y puede realizarse tanto para la profilaxis como durante el curso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero sin limitación, prevenir la aparición o reaparición de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la disminución de cualesquiera consecuencias patológicas directas o indirectas de la enfermedad, prevenir la metástasis, disminuir la velocidad de progresión de la enfermedad, la mejora o paliación de la patología y remisión o pronóstico mejorado. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para ralentizar su avance.

Un "agente quimioterápico" se refiere a un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN®); alquilsulfonatos, tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas, tales como benzodopa, carbocuona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilmelaminas, incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiosforamida y trimetilomelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético de topotecán (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos, adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilílico; tenipósido; criptoficinas (particularmente, criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas nitrogenadas, tales como clorambucilo, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, feneстерина, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos, tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, calicheamicina, especialmente calicheamicina gamma1I y calicheamicina omega1I (véase, por ejemplo, Nicolaou *et al.*, Angew. Chem Int. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); CDP323, un inhibidor oral de alfa-4 integrina; dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarcinostatina y cromóforos de antibióticos de enediina relacionados con cromoproteína, aclacinomisinas,

actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorrubicina (incluyendo ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorrubicina, cianomorfólico-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina, inyección de liposomas de HCl de doxorrubicina (DOXIL®), doxorrubicina liposomal TLC D-99 (MYOCET®), doxorrubicina liposomal pegilada (CAELYX®), y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, tales como mitomicina C, ácido micofénolico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, cinostatina, zorrubicia; antimetabolitos, tales como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), una epotilona y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitiostano, testolactona; antisuprarrenales, tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico, tal como ácido frolínico; accglatone; glucósido de aldoftosfamida; ácido aminolevúlico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diacicuona; el fornitin; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidaina; maitansinoles, tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; moidanmol; nitroerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-ethylhidracida; procarbazina; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sизofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2'-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazine; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoide, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®), formulación de nanopartículas de paclitaxel (ABRAXANETM) y docetaxel (TAXOTERE®) genomanipuladas con albúmina; clorambucilo; 6-tioguanina; mercaptoperina; metotrexato; agentes de platino, tales como cisplatino, oxaliplatino (por ejemplo, ELOXATIN®) y carboplatino; vincas, que evitan que la polimerización de tubulina forme microtúbulos, incluyendo vinblastina (VELBAN®), vincristina (ONCOVIN®), vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®) y vinorelbina (NAVELBINE®); etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; leucovorina; novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides, tales como ácido retinoico, incluyendo bexaroteno (TARGRETIN®); bisfosfonatos, tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (AREDIA®), tiludronato (SKELID®) o risedronato (ACTONEL®); troxacicatina (un análogo nucleosídico de 1,3-dioxolano citosina; oligonucleótidos no codificantes, particularmente, los que inhiben la expresión de genes en vías de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras, y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como la vacuna THERATOPE® y vacunas de terapia génica, por ejemplo, la vacuna ALLOVECTIN®, la vacuna LEUVECTIN® y la vacuna VAXID®; inhibidor de topoisomerasa 1 (por ejemplo, LURTOTECAN®); rmRH (por ejemplo, ABARELIX®); BAY439006 (sorafenib; Bayer); SU-11248 (sunitinib, SUTENT®, Pfizer); perifosina, inhibidor de COX-2 (por ejemplo, celecoxib o etoricoxib), inhibidor de proteosomas (por ejemplo, PS341); bortezomib (VELCADE®); CCI-779; tipifarnib (R11577); orafenib, ABT510; inhibidor de Bcl-2, tal como oblimersen sódico (GENASENSE®); pixantrona; inhibidores de EGFR (véase la definición a continuación); inhibidores de tirosina cinasa; inhibidores de serina-treonina cinasa, tales como rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE®); inhibidores de farnesiltransferasa, tales como ionafarnib (SCH 6636, SARASARTM); y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores, tales como CHOP, una abreviatura de una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina y prednisolona; y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxiplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovorina.

Los agentes quimioterápicos, como se definen en el presente documento, incluyen "agentes antihormonales" o "terapéuticos endocrinos" que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer. Pueden ser, en sí, hormonas, incluyendo, pero sin limitación: antiestrógenos con perfil mixto agonista/antagonista, incluyendo, tamoxifeno (NOLVADEX®), 4-hidroxitamoxifeno, toremifeno (FARESTON®), idoxifeno, droloxiifeno, raloxifeno (EVISTA®), trioxifeno, keoxifeno, y moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERM), tales como SERM3; antiestrógenos puros sin propiedades agonistas, tales como fulvestrant (FASLODEX®), y EM800 (dichos agentes pueden bloquear la dimerización del receptor de estrógenos (ER), inhibir la unión de ADN, aumentar la renovación de ER y/o suprimir los niveles de ER); inhibidores de aromatasa, incluyendo inhibidores esteroideos de aromatasa, tales como formestano y exemestano (AROMASIN®), e inhibidores no esteroideos de aromatasa, tales como anastrazol (ARIMIDEX®), letrozol (FEMARA®) y aminoglutetimida, y otros inhibidores de aromatasa incluyen vorozol (RIVISOR®), acetato de megestrol (MEGASE®), fadrozol y 4(5)-imidazoles; agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante, incluyendo leuprolida (LUPRON® y ELIGARD®), goserelina, goserelina, buserelina y tripterelina; esteroides sexuales, incluyendo progestinas tales como acetato de megestrol y acetato de medroxiprogesterona, estrógenos tales como dietilestilbestrol y premarina, y andrógenos/retinoides tales como fluoximesterona, ácido todo-trans-retinóico y fenretinida; onapristona; antiprogesteronas; reguladores negativos del receptor de estrógenos (ERD); antiandrógenos, tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores.

Como se usa en el presente documento, la expresión "agente inmunosupresor" para terapia conjunta se refiere a

sustancias que actúan para suprimir o enmascarar el sistema inmunitario del mamífero que se está tratando en el presente documento. Esto incluiría sustancias que suprinen la producción de citocinas, regulan negativamente o suprinen la expresión de autoantígenos o enmascaran los antígenos del MHC. Los ejemplos de dichos agentes incluyen pirimidinas 2-amino-6-aryl-5-sustituidas (véase, la Pat. de EE. UU. N.º 4.665.077); fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE); ganciclovir, tacrolimus, glucocorticoides, tales como cortisol o aldosterona, agentes antiinflamatorios, tales como un inhibidor de la ciclooxygenasa, un inhibidor de la 5-lipoxigenasa o un antagonista del receptor de leucotrienos; antagonistas de purina, tales como azatioprina o micofenolato de mofetilo (MMF); agentes alquilantes, tales como ciclofosfamida; bromocriptina; danazol; dapsona; glutaraldehído (que enmascara los antígenos del MHC, como se describe en la Pat. de EE. UU. N.º 4.120.649); anticuerpos antiidiotípicos para antígenos del MHC y fragmentos del MHC; ciclosporina A; esteroides, tales como corticosteroides o glucocorticosteroides o análogos de glucocorticoides, por ejemplo, prednisona, metilprednisolona, incluyendo succinato de sodio de metilprednisolona SOLU-MEDROL®, y dexametasona; inhibidores de la dihidrofolato reductasa, tales como metotrexato (oral o subcutáneo); agentes antipalúdicos, tales como cloroquina e hidroxicloroquina; sulfasalazina; leflunomida; anticuerpos contra citocinas o receptores de citocinas, incluyendo anticuerpos anti interferón-alfa, beta o gamma, anticuerpos anti factor de necrosis tumoral (TNF)-alfa (infliximab (REMICADE®) o adalimumab), inmunoadhesina anti TNF-alfa (etanercept), anticuerpos anti TNF-beta, anticuerpos anti interleucina-2 (IL-2) y anticuerpos anti receptor de IL-2, y anticuerpos anti receptor de interleucina-6 (IL-6) y antagonistas (tales como ACTEMRA™ (tocilizumab)); anticuerpos anti LFA-1, incluyendo anticuerpos anti CD11a y anti CD18; anticuerpos anti L3T4; globulina anti linfocitos heteróloga; anticuerpos pan-T, preferentemente anticuerpos anti CD3 o anti CD4/CD4a; péptido soluble que contiene un dominio de unión a LFA-3 (documento WO 90/08187, publicado el 26/07/90); estreptocinasa; factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta); estreptodornasa; ARN o ADN del hospedador; FK506; RS-61443; , clorambucilo; desoxispergualina; rapamicina; receptor de linfocitos T (Cohen *et al.*, Pat. de EE. UU. N.º 5.114.721); fragmentos del receptor de linfocitos T (Offner *et al.*, Science, 251: 430-432 (1991); documento WO 90/11294; Ianeway, Nature, 341: 482 (1989); y documento WO 91/01133); antagonistas BAFF, tales como anticuerpos BAFF y anticuerpos BR3 y antagonistas de zTNF4 (para una revisión, véase Mackay y Mackay, Trends Immunol., 23:113-5 (2002) y véase también la definición a continuación); agentes biológicos que interfieren con las señales de los linfocitos T auxiliares, tales como el receptor anti CD40 o el ligando anti CD40 (CD154), incluyendo anticuerpos bloqueadores contra el ligando CD40-CD40 (por ejemplo, Durie *et al.*, Science, 261: 1328-30 (1993); Mohan *et al.*, J. Immunol., 154: 1470-80 (1995)) y CTLA4-Ig (Finck *et al.*, Science, 265: 1225-7 (1994)); y anticuerpos del receptor de linfocitos T (documento EP 340.109), tales como T10B9. Algunos agentes inmunosupresores preferidos en el presente documento incluyen ciclofosfamida, clorambucilo, azatioprina, leflunomida, MMF o metotrexato.

La expresión "antagonista de unión al eje de PD-1" se refiere a una molécula que inhibe la interacción de un compañero de unión del eje de PD-1 con uno o más de sus compañeros de unión, para eliminar la disfunción de los linfocitos T resultante de la señalización en el eje de señalización PD-1, con el resultado de restaurar o mejorar la función de los linfocitos T (por ejemplo, proliferación, producción de citocinas, destrucción de células diana). Como se usa en el presente documento, un antagonista de unión al eje de PD-1 incluye un antagonista de unión a PD-1, un antagonista de unión a PD-L1 y un antagonista de unión a PD-L2.

La expresión "antagonista de unión a PD-1" se refiere a una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere con la transducción de señales resultante de la interacción de PD-1 con uno o más de sus compañeros de unión, tales como PD-L1, PD-L2. En algunas realizaciones, el antagonista de unión a PD-1 es una molécula que inhibe la unión de PD-1 a uno o más de sus compañeros de unión. En un aspecto específico, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PD-L1 y/o PD-L2. Por ejemplo, los antagonistas de unión a PD-1 incluyen anticuerpos anti PD-1, fragmentos de unión a antígeno de los mismos, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopeptídos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren con la transducción de señales resultante de la interacción de PD-1 con PD-L1 y/o PD-L2. En una realización, un antagonista de unión a PD-1 reduce la señal coestimuladora negativa mediada por o a través de la señalización mediada por proteínas de la superficie celular expresadas en linfocitos T a través de PD-1 para hacer que un linfocito T disfuncional sea menos disfuncional (por ejemplo, potenciando las respuestas efectoras al reconocimiento de antígenos). En algunas realizaciones, el antagonista de unión a PD-1 es un anticuerpo anti PD-1. En un aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es MDX-1106 (nivolumab), descrito en el presente documento. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es MK-3475 (lambrolizumab), descrito en el presente documento. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es CT-011 (pidilizumab), descrito en el presente documento. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es AMP-224, descrito en el presente documento.

La expresión "antagonista de unión a PD-L1" se refiere a una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere con la transducción de señales resultante de la interacción de PD-L1 con uno o más de sus compañeros de unión, tales como PD-1, B7-1. En algunas realizaciones, un antagonista de unión a PD-L1 es una molécula que inhibe la unión de PD-L1 a sus compañeros de unión. En un aspecto específico, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a PD-1 y/o B7-1. En algunas realizaciones, los antagonistas de unión a PD-L1 incluyen anticuerpos anti PD-L1, fragmentos de unión a antígeno de los mismos, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopeptídos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren con la transducción de señales resultante de la interacción de PD-L1 con uno o más de sus compañeros de unión, tales como PD-1, B7-1. En una realización, un antagonista de unión a PD-L1 reduce la señal coestimuladora negativa mediada por o a través de las proteínas de la superficie celular expresadas en los linfocitos T mediada por la señalización a través de PD-L1 para hacer que un

linfocito T disfuncional sea menos disfuncional (por ejemplo, mejorando las respuestas efectoras al reconocimiento de antígenos). En algunas realizaciones, un antagonista de unión a PD-L1 es un anticuerpo anti PD-L1. En un aspecto específico, un anticuerpo anti PD-L1 es YW243.55.S70, descrito en el presente documento. En otro aspecto específico, un anticuerpo anti PD-L1 es MDX-1105, descrito en el presente documento. En otro aspecto específico más, un anticuerpo anti PD-L1 es MPDL3280A, descrito en el presente documento. En otro aspecto específico más, un anticuerpo anti PD-L1 es MEDI4736, descrito en el presente documento.

La expresión "antagonista de unión a PD-L2" se refiere a una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere con la transducción de señales resultante de la interacción de PD-L2 con uno o más de sus compañeros de unión, tales como PD-1. En algunas realizaciones, un antagonista de unión a PD-L2 es una molécula que inhibe la unión de PD-L2 a uno o más de sus compañeros de unión. En un aspecto específico, el antagonista de unión a PD-L2 inhibe la unión de PD-L2 a PD-1. En algunas realizaciones, los antagonistas de PD-L2 incluyen anticuerpos anti PD-L2, fragmentos de unión a antígeno de los mismos, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren con la transducción de señales resultante de la interacción de PD-L2 con uno o más de sus compañeros de unión, tales como PD-1. En una realización, un antagonista de unión a PD-L2 reduce la señal coestimuladora negativa mediada por o a través de las proteínas de la superficie celular expresadas en los linfocitos T mediada por la señalización a través de PD-L2 para hacer que un linfocito T disfuncional sea menos disfuncional (por ejemplo, mejorando las respuestas efectoras al reconocimiento de antígenos). En algunas realizaciones, un antagonista de unión a PD-L2 es una inmunoadhesina.

La expresión "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena ligera o pesada de anticuerpo que está implicada en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo natural tienen generalmente estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones marco (FR) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR). (Véase, por ejemplo, Kindt *et al.* Kuby Immunology, 6.^a ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007)). Un solo dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Además, los anticuerpos que se unen a un antígeno particular pueden aislar usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para cribar una biblioteca de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Véanse, por ejemplo, Portolano *et al.*, J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson *et al.*, Nature 352:624-628 (1991).

El término "vector", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede propagar otro ácido nucleico al que está unido. El término incluye el vector en forma de una estructura de ácido nucleico autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula hospedadora en la que se ha introducido. Determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de los ácidos nucleicos a los que están unidos operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión".

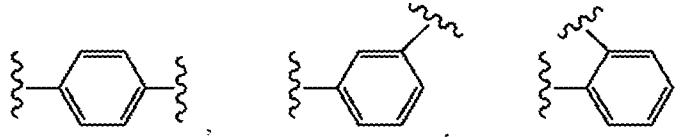
"Alquilo" es un hidrocarburo C₁-C₁₈ que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos. Los ejemplos son metilo (Me, -CH₃), etilo (Et, -CH₂CH₃), 1-propilo (n-Pr, n-propilo, -CH₂CH₂CH₃), 2-propilo (i-Pr, i-propilo, -CH(CH₃)₂), 1-butilo (n-Bu, n-butilo, -CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-metil-1-propilo (i-Bu, i-butilo, -CH₂CH(CH₃)₂), 2-butilo (s-Bu, s-butilo, -CH(CH₃)CH₂CH₃), 2-metil-2-propilo (t-Bu, t-butilo, -C(CH₃)₃), 1-pentilo (n-pentilo, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-pentilo (-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₃), 3-pentilo (-CH(CH₂CH₃)₂), 2-metil-2-butilo (-C(CH₃)₂CH₂CH₃), 3-metil-2-butilo (-CH(CH₃)CH(CH₃)₂), 3-metil-1-butilo (-CH₂CH₂CH(CH₃)₂), 2-metil-1-butilo (-CH₂CH(CH₃)CH₂CH₃), 1-hexilo (-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-hexilo (-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₂CH₃), 3-hexilo (-CH(CH₂CH₃)(CH₂CH₂CH₃)), 2-metil-2-pentilo (-C(CH₃)₂CH₂CH₂CH₃), 3-metil-2-pentilo (-CH(CH₃)CH(CH₃)CH₂CH₃), 4-metil-2-pentilo (-CH(CH₃)CH₂CH(CH₃)₂), 3-metil-3-pentilo (-C(CH₃)(CH₂CH₃)₂), 2-metil-3-pentilo (-CH(CH₂CH₃)CH(CH₃)₂), 2,3-dimetil-2-butilo (-C(CH₃)₂CH(CH₃)₂), 3,3-dimetil-2-butilo (-CH(CH₃)C(CH₃)₃).

La expresión "alquilo C₁-C₈", como se usa en el presente documento, se refiere a un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado que tiene de 1 a 8 átomos de carbono. Los grupos "alquilo C₁-C₈" representativos incluyen, pero sin limitación, -metilo, -etilo, -n-propilo, -n-butilo, -n-pentilo, -n-hexilo, -n-heptilo, -n-octilo, -n-nonilo y -n-deciilo; mientras que los alquilos C₁-C₈ ramificados incluyen, pero sin limitación, -isopropilo, -sec-butilo, -isobutilo, -terc-butilo, -isopentilo, 2-metilbutilo, los alquilos C₁-C₈ insaturados incluyen, pero sin limitación, -vinilo, -alilo, -1-buteno, -2-buteno, -isobutileno, -1-pentenilo, -2-pentenilo, -3-metil-1-buteno, -2-metil-2-buteno, -2,3-dimetil-2-buteno, 1-hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, -acetilenilo, -propinilo, -1-butinilo, -2-butinilo, -1-pentinilo, -2-pentinilo, -3-metil-1-butinilo. Un grupo alquilo C₁-C₈ puede estar sin sustituir o sustituido con uno o más grupos incluyendo, pero sin limitación, -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂ -NHC(O)R', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; donde cada R' se selecciona independientemente de H, alquilo C₁-C₈ y arilo.

La expresión "alquilo C₁-C₁₂", como se usa en el presente documento, se refiere a un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado que tiene de 1 a 12 átomos de carbono. Un grupo alquilo C₁-C₁₂ puede estar sin sustituir o sustituido con uno o más grupos incluyendo, pero sin limitación, -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; donde cada R' se selecciona independientemente de H, alquilo C₁-C₈ y arilo.

- La expresión "alquilo C₁-C₆", como se usa en el presente documento, se refiere a un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. Los grupos "alquilo C₁-C₆" representativos incluyen, pero sin limitación, -metilo, -etilo, -n-propilo, -n-butilo, -n-pentilo, y -n-hexilo; mientras que los alquilos C₁-C₆ ramificados incluyen, pero sin limitación, -isopropilo, -sec-butilo, -isobutilo, -terc-butilo, -isopentilo y 2-metilbutilo; los alquilos C₁-C₆ insaturados incluyen, pero sin limitación, -vinilo, -alilo, -1-butenilo, -2-butenilo e -isobutilenilo, -1-pentenilo, -2-pentenilo, -3-metil-1-butenilo, -2-metil-2-butenilo, -2,3-dimetil-2-butenilo, 1-hexilo, 2-hexilo y 3-hexilo. Un grupo alquilo C₁-C₆ puede estar sin sustituir o sustituido con uno o más grupos, como se ha descrito anteriormente para un grupo alquilo C₁-C₈.
- La expresión "alquilo C₁-C₄", como se usa en el presente documento, se refiere a un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado que tiene de 1 a 4 átomos de carbono. Los grupos "alquilo C₁-C₄" representativos incluyen, pero sin limitación, -metilo, -etilo, -n-propilo, -n-butilo; mientras que los alquilos C₁-C₄ ramificados incluyen, pero sin limitación, -isopropilo, -sec-butilo, -isobutilo, -terc-butilo; los alquilos C₁-C₄ insaturados incluyen, pero sin limitación, -vinilo, -alilo, -1-butenilo, -2-butenilo e -isobutilenilo. Un grupo alquilo C₁-C₄ puede estar sin sustituir o sustituido con uno o más grupos, como se ha descrito anteriormente para un grupo alquilo C₁-C₈.
- "Alcoxi" es un grupo alquilo unido de forma sencilla a un oxígeno. Los grupos alcoxi de ejemplo incluyen, pero sin limitación, metoxi (-OCH₃) y etoxi (-OCH₂CH₃). Un "alcoxi C₁-C₅" es un grupo alcoxi con 1 a 5 átomos de carbono. Los grupos alcoxi pueden estar sin sustituir o sustituidos con uno o más grupos, como se ha descrito anteriormente para grupos alquilo.
- "Alquenilo" es un hidrocarburo C₂-C₁₈ que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos con al menos un sitio de insaturación, es decir, un doble enlace sp² carbono-carbono. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación: etileno o vinilo (-CH=CH₂), alilo (-CH₂CH=CH₂), ciclopentenilo (-C₅H₇) y 5-hexenilo (-CH₂CH₂CH₂CH=CH₂). Un "alquenilo C₂-C₈" es un hidrocarburo que contiene de 2 a 8 átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos con al menos un sitio de insaturación, es decir, un doble enlace sp² carbono-carbono.
- "Alquinilo" es un hidrocarburo C₂-C₁₈ que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos con al menos un sitio de insaturación, es decir, un triple enlace sp carbono-carbono. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación: acetilénico (-C≡CH) y propargilo (-CH₂C≡CH). Un "alquinilo C₂-C₈" es un hidrocarburo que contiene de 2 a 8 átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos con al menos un sitio de insaturación, es decir, un triple enlace sp carbono-carbono.
- "Alquileno" se refiere a un radical hidrocarburo saturado, de cadena lineal o ramificada o cíclico de 1-18 átomos de carbono, y que tiene dos centros radicales monovalentes derivados de la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o dos átomos de carbono diferentes de un alcano precursor. Los radicales alquileno típicos incluyen, pero sin limitación: metileno (-CH₂-), 1,2-etilo (-CH₂CH₂-), 1,3-propilo (-CH₂CH₂CH₂-), 1,4-butilo (-CH₂CH₂CH₂CH₂-) y similares.
- Un "alquileno C₁-C₁₀" es un grupo hidrocarburo de cadena lineal saturado de Fórmula -(CH₂)₁₋₁₀. Los ejemplos de un alquileno C₁-C₁₀ incluyen metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno, heptileno, octileno, nonileno y decaleno.
- "Alquenileno" se refiere a un radical hidrocarburo insaturado, de cadena lineal o ramificada o cíclico de 2-18 átomos de carbono, y que tiene dos centros radicales monovalentes derivados de la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o dos átomos de carbono diferentes de un alqueno precursor. Los radicales alquenileno típicos incluyen, pero sin limitación: 1,2-etileno (-CH=CH-).
- "Alquinileno" se refiere a un radical hidrocarburo insaturado, de cadena lineal o ramificada o cíclico de 2-18 átomos de carbono, y que tiene dos centros radicales monovalentes derivados de la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o dos átomos de carbono diferentes de un alquino precursor. Los radicales alquinileno típicos incluyen, pero sin limitación: acetileno (-C≡C-), propargilo (-CH₂C≡C-) y 4-pentinilo (-CH₂CH₂CH₂C≡C-).
- "Arilo" se refiere a un grupo aromático carbocíclico. Los ejemplos de grupos arilo incluyen, pero sin limitación, fenilo, naftilo y antracenilo. Un grupo carbocíclico aromático o un grupo heterocíclico aromático puede estar sin sustituir o sustituido con uno o más grupos, incluyendo, pero sin limitación, -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; en donde cada R' se selecciona independientemente de H, alquilo C₁-C₈ y arilo.
- Un "arilo C₅-C₂₀" es un grupo arilo con de 5 a 20 átomos de carbono en los anillos aromáticos carbocíclicos. Los ejemplos de grupos arilo C₅-C₂₀ incluyen, pero sin limitación, fenilo, naftilo y antracenilo. Un grupo arilo C₅-C₂₀ puede estar sustituido o sin sustituir como se ha descrito anteriormente para los grupos arilo. Un "arilo C₅-C₁₄" es un grupo arilo con de 5 a 14 átomos de carbono en los anillos aromáticos carbocíclicos. Los ejemplos de grupos arilo C₅-C₁₄ incluyen, pero sin limitación, fenilo, naftilo y antracenilo. Un grupo arilo C₅-C₁₄ puede estar sustituido o sin sustituir como se ha descrito anteriormente para los grupos arilo.
- Un "arileno" es un grupo arilo que tiene dos enlaces covalentes y puede estar en las configuraciones *ortho*, *meta* o *para*

como se muestra en las siguientes estructuras:



- 5 en las que el grupo fenilo puede estar sin sustituir o sustituido con hasta cuatro grupos que incluyen, pero sin limitación, -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; en donde cada R' se selecciona independientemente de H, alquilo C₁-C₈ y arilo.
- 10 "Arilalquilo" se refiere a un radical alquilo acíclico en el que uno de los átomos de hidrógeno unidos a un átomo de carbono, típicamente un átomo de carbono terminal o sp³, se reemplaza por un radical arilo. Los grupos arilalquilo típicos incluyen, pero sin limitación, bencilo, 2-feniletan-1-il, 2-fenileten-1-il, naftilmetilo, 2-naftiletan-1-il, 2-naftileten-1-il, naftobencilo, 2-naftofeniletan-1-il y similares. El grupo arilalquilo comprende de 6 a 20 átomos de carbono, por ejemplo, el resto alquilo, incluyendo los grupos alcanilo, alquenilo o alquinilo, del grupo arilalquilo tiene de 1 a 6 átomos de carbono y el resto arilo tiene de 5 a 14 átomos de carbono.

15 "Heteroarilalquilo" se refiere a un radical alquilo acíclico en el que uno de los átomos de hidrógeno unidos a un átomo de carbono, típicamente un átomo de carbono terminal o sp³, se reemplaza por un radical heteroarilo. Los grupos heteroarilalquilo típicos incluyen, pero sin limitación, 2-bencimidazolilmetilo, 2-furiletilo y similares. El grupo heteroarilalquilo comprende de 6 a 20 átomos de carbono, por ejemplo, el resto alquilo, incluyendo los grupos alcanilo, alquenilo o alquinilo, del grupo heteroarilalquilo tiene de 1 a 6 átomos de carbono y el resto heteroarilo tiene de 5 a 14 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S. El resto heteroarilo del grupo heteroarilalquilo puede ser un monociclo que tiene de 3 a 7 miembros anulares (de 2 a 6 átomos de carbono) o un bíciclo que tiene de 7 a 10 miembros anulares (de 4 a 9 átomos de carbono) y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S), por ejemplo: un sistema bíciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6].

20 "Alquilo sustituido", "arilo sustituido", y "arilalquilo sustituido" significan alquilo, arilo y arilalquilo, respectivamente, en los que uno o más átomos de hidrógeno se reemplazan cada uno independientemente por un sustituyente. Los sustituyentes típicos incluyen, pero sin limitación, -X, -R, -O-, -OR, -SR, -S-, -NR₂, -NR₃, =NR, -CX₃, -CN, -OCN, -SCN, -N=C=O, -NCS, -NO, -NO₂, =N₂, -N₃, NC(=O)R, -C(=O)R, -C(=O)NR₂, -SO₃⁻, -SO₃H, -S(=O)₂R, -OS(=O)₂OR, -S(=O)₂NR, -S(=O)R, -OP(=O)(OR)₂, -P(=O)(OR)₂, -PO₃⁻, -PO₃H₂, -C(=O)R, -C(=O)X, -C(S)R, -CO₂R, -CO₂⁻, -C=S)OR, -C(=O)SR, -C(=S)SR, -C(=O)NR₂, -C(=S)NR₂, -C(=NR)NR₂, donde cada X es independientemente un halógeno: F, Cl, Br o I; y cada R es independientemente -H, alquilo C₂-C₁₈, arilo C₆-C₂₀, heterociclo C₃-C₁₄, un grupo protector o resto de profármaco. Los grupos alquieno, alquenileno y alquinileno como se han descrito anteriormente también se pueden sustituir de manera similar.

25 "Heteroarilo" y "heterociclo" se refieren a un sistema anular en el que uno o más átomos anulares son un heteroátomo, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno y azufre. El radical heterociclo comprende 3 a 20 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S. Un heterociclo puede ser un monociclo que tiene 3 a 7 miembros anulares (2 a 6 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S) o un bíciclo que tiene de 7 a 10 miembros anulares (de 4 a 9 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S), por ejemplo: un sistema bíciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6].

30 Se describen heterociclos de ejemplo, por ejemplo, en Paquette, Leo A., "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, Nueva York, 1968), particularmente los Capítulos 1, 3, 4, 6, 7 y 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, Nueva York, 1950 hasta la actualidad), en particular los Volúmenes 13, 14, 16, 19 y 28; y J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566.

35 Los ejemplos de heterociclos incluyen, a modo de ejemplo y no de limitación, piridilo, dihidropiridilo, tetrahidropiridilo (piperidilo), tiazolilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiofenilo oxidado con azufre, pirimidinilo, furanilo, tienilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tetrazolilo, benzofuranilo, tianaftalenilo, indolilo, indolenilo, quinolinilo, isoquinolinilo, benzoimidazolilo, piperidinilo, 4-piperidonilo, pirrolidinilo, 2-pirrolidonilo, pirrolinilo, tetrahidrofuranilo, bis-tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, bis-tetrahidropiranilo, tetrahydroquinolinilo, tetrahydroisoquinolinilo, decahidroquinolinilo, octahidroisoquinolinilo, azocinilo, triazinilo, 6H-1,2,5-tiadiazinilo, 2H,6H-1,5,2-ditiazinilo, tienilo, tianthrenilo, piranilo, isobenzofuranilo, cromenilo, xantenilo, fenoxatinilo, 2H-pirrolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, pirazinilo, piridazinilo, indolizinilo, isoindolilo, 3H-indolilo, 1H-indazolilo, purinilo, 4H-quinalizinilo, ftalazinilo, naftiridinilo, quinoxalinilo, quinazolinilo, cinolinilo, pteridinilo, 4aH-carbazolilo, carbazolilo, β-carbolinilo, fenantridinilo, acridinilo, pirimidinilo, fenantrolinilo, fenazinilo, fenotiazinilo, furazanilo, fenoxazinilo, isocromanilo, cromanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, piperazinilo, indolinilo, isoindolinilo, quinuclidinilo, morfolinilo, oxazolidinilo, benzotriazolilo, benzoisoxazolilo, oxindolilo, benzoxazolinilo e isatinoílo.

40 A modo de ejemplo y no de limitación, los heterociclos unidos a carbono están unidos en la posición 2, 3, 4, 5 o 6 de

- una piridina, la posición 3, 4, 5 o 6 de una piridazina, la posición 2, 4, 5 o 6 de una pirimidina, la posición 2, 3, 5 o 6 de una pirazina, la posición 2, 3, 4 o 5 de un furano, tetrahidrofurano, tiofurano, tiofeno, pirrol o tetrahidropirrol, la posición 2, 4 o 5 de un oxazol, imidazol o tiazol, la posición 3, 4 o 5 de un isoxazol, pirazol o isotiazol, la posición 2 o 3 de una aziridina, la posición 2, 3 o 4 de una azetidina, la posición 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de una quinolina o la posición 1, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de una isoquinolina. Aún más típicamente, los heterociclos unidos por enlaces de carbono incluyen 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 5-piridilo, 6-piridilo, 3-piridazinilo, 4-piridazinilo, 5-piridazinilo, 6-piridazinilo, 2-pirimidinilo, 4-pirimidinilo, 5-pirimidinilo, 6-pirimidinilo, 2-pirazinilo, 3-pirazinilo, 5-pirazinilo, 6-pirazinilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo o 5-tiazolilo.
- 10 A modo de ejemplo y no de limitación, los heterociclos unidos a nitrógeno están unidos en la posición 1 de una aziridina, azetidina, pirrol, pirrolidina, 2-pirrolina, 3-pirrolina, imidazol, imidazolidina, 2-imidazolina, 3-imidazolina, pirazol, pirazolina, 2-pirazolina, 3-pirazolina, piperidina, piperazina, indol, indolina, 1H-indazol, la posición 2 de un isoindol o isoindolina, la posición 4 de una morfolina y la posición 9 de un carbazol o β-carbolina. Aún más típicamente, los heterociclos unidos por enlaces de nitrógeno incluyen 1-aziridilo, 1-azetedilo, 1-pirrolilo, 1-imidazolilo, 1-pirazolilo y 1-piperidinilo.
- 15 Un "heterociclo C₃-C₈" se refiere a un carbociclo C₃-C₈ aromático o no aromático en el que de uno a cuatro de los átomos de carbono anulares se reemplazan independientemente por un heteroátomo del grupo que consiste en O, S y N. Los ejemplos representativos de un heterociclo C₃-C₈ incluyen, pero sin limitación, benzofuranilo, benzotifeno, indolilo, benzopirazolilo, cumarinilo, isoquinolinilo, pirrolilo, tiofenilo, furanilo, tiazolilo, imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, quinolinilo, pirimidinilo, piridinilo, piridonilo, pirazinilo, piridazinilo, isotiazolilo, isoxazolilo y tetrazolilo. Un heterociclo C₃-C₈ puede estar sin sustituir o sustituido con hasta siete grupos incluyendo, pero sin limitación, -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; en donde cada R' se selecciona independientemente de H, alquilo C₁-C₈ y arilo.
- 20 "Heterociclo C₃-C₈" se refiere a un grupo heterociclo C₃-C₈ definido anteriormente, en donde uno de los átomos de hidrógeno del grupo carbociclo se reemplaza por un enlace. Un heterociclo C₃-C₈ puede estar sin sustituir o sustituido con hasta seis grupos incluyendo, pero sin limitación, -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂-NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; en donde cada R' se selecciona independientemente de H, alquilo C₁-C₈ y arilo.
- 25 "Heterociclo C₃-C₂₀" se refiere a un carbociclo C₃-C₂₀ aromático o no aromático en el que de uno a cuatro de los átomos de carbono anulares se reemplazan independientemente por un heteroátomo del grupo que consiste en O, S y N. Un heterociclo C₃-C₂₀ puede estar sin sustituir o sustituido con hasta siete grupos incluyendo, pero sin limitación, -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂-NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; en donde cada R' se selecciona independientemente de H, alquilo C₁-C₈ y arilo.
- 30 35 "Heterociclo C₃-C₂₀" se refiere a un grupo heterociclo C₃-C₂₀ definido anteriormente, en donde uno de los átomos de hidrógeno del grupo carbociclo se reemplaza por un enlace.
- 40 "Carbociclo" significa un anillo saturado o insaturado que tiene de 3 a 7 átomos de carbono como un monociclo o 7 a 12 átomos de carbono como un bíciclo. Los carbociclos monocíclicos tienen de 3 a 6 átomos anulares, aún más típicamente 5 o 6 átomos anulares. Los carbociclos bicíclicos tienen de 7 a 12 átomos anulares, por ejemplo, dispuestos como un sistema bíciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6], o 9 o 10 átomos anulares dispuestos como un sistema bíciclo [5,6] o [6,6]. Los ejemplos de carbociclos monocíclicos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, 1-ciclopent-1-enilo, 1-ciclopent-2-enilo, 1-ciclopent-3-enilo, ciclohexilo, 1-ciclohex-1-enilo, 1-ciclohex-2-enilo, 1-ciclohex-3-enilo, cicloheptilo y ciclooctilo.
- 45 50 Un "carbociclo C₃-C₈" es un anillo carbociclo no aromático saturado o insaturado de 3, 4, 5, 6, 7 u 8 miembros. Los carbociclos C₃-C₈ representativos incluyen, pero sin limitación, -ciclopropilo, -ciclobutilo, -ciclopentilo, -ciclopentadienilo, -ciclohexilo, -ciclohexenilo, -1,3-ciclohexadienilo, -1,4-ciclohexadienilo, -cicloheptilo, -1,3-cicloheptadienilo, -1,3,5-cicloheptatrienilo, -ciclooctilo y -ciclooctadienilo. Un grupo carbociclo C₃-C₈ puede estar sin sustituir o sustituido con uno o más grupos incluyendo, pero sin limitación, -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂-NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; donde cada R' se selecciona independientemente de H, alquilo C₁-C₈ y arilo.
- 55 60 Un "carbociclo C₃-C₈" se refiere a un grupo carbociclo C₃-C₈ definido anteriormente en donde uno de los átomos de hidrógeno del grupo carbociclo se reemplaza por un enlace.
- 65 "Enlazador" se refiere a un resto químico que comprende un enlace covalente o una cadena de átomos que unen covalentemente un anticuerpo a un resto farmacológico. En diversas realizaciones, los enlazadores incluyen una radical divalente, tal como un alquildiilo, un arildiilo, un heteroarildiilo, restos tales como: -(CR₂)_nO(CR₂)_n-, unidades de repetición de alquiloglioxi (por ejemplo, polietilenoxi, PEG, polimetilenoxi) y alquilamino (por ejemplo, polietilenamino, Jeffamine™); y éster diácido y amidas que incluyen succinato, succinamida, diglicolato,

malonato y caproamida. En diversas realizaciones, los enlazadores pueden comprender uno o más residuos de aminoácidos, tales como valina, fenilalanina, lisina y homolisina.

5 El término "quiral" se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no superposición al compañero de imagen especular, mientras que el término "aquiral" se refiere a moléculas que pueden superponerse sobre sus compañeros de imagen especular.

10 El término "estereoisómeros" se refiere a compuestos que tienen una constitución química idéntica, pero difieren con respecto a la disposición de los átomos o de los grupos en el espacio.

15 "Diastereómero" se refiere a un estereoisómero con dos o más centros de quiralidad y cuyas moléculas no son imágenes especulares entre sí. Los diastereómeros tienen diferentes propiedades físicas, por ejemplo, puntos de fusión, puntos de ebullición, propiedades espectrales y reactividades. Las mezclas de diastereómeros pueden separarse mediante procedimientos analíticos de alta resolución, tales como electroforesis y cromatografía.

20 15 "Enantiómeros" se refiere a estereoisómeros de un compuesto que no son imágenes especulares superponibles entre sí.

25 20 Las definiciones y convenciones estereoquímicas usadas en el presente documento siguen generalmente el S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, Nueva York; y Eliel, E. y Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., Nueva York. Muchos compuestos orgánicos existen en formas ópticamente activas, es decir, tienen la capacidad de rotar el plano de la luz polarizada en un plano. En la descripción de un compuesto ópticamente activo, los prefijos D y L, o R y S, se usan para indicar la configuración absoluta de la molécula en torno a su centro o centros quirales. Los prefijos d y l o (+) y (-) se emplean para designar el sentido de rotación de la luz polarizada en un plano por el compuesto, significando (-) o 1 que el compuesto es levógiro. Un compuesto con el prefijo (+) o d es dextrógiro. Para una estructura química dada, estos estereoisómeros son idénticos salvo por que son imágenes especulares entre sí. Un estereoisómero específico puede denominarse también enantiómero, y una mezcla de dichos isómeros se denomina con frecuencia mezcla enantiomérica. Una mezcla 50:50 de enantiómeros se denomina mezcla racémica o racemato, que puede producirse cuando no ha habido estereoselección ni estereoespecificidad en una reacción o proceso químico. Las expresiones "mezcla racémica" y "racemato" se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, desprovista de actividad óptica.

30 35 "Grupo saliente" se refiere a un grupo funcional que puede estar sustituido por otro grupo funcional. Determinados grupos salientes son bien conocidos en la técnica y los ejemplos incluyen, pero sin limitación, un haluro (por ejemplo, cloruro, bromuro, yoduro), metanosulfonilo (mesilo), p-toluensulfonilo (tosilo), trifluorometilsulfonilo (triflato) y trifluoromethylsulfonato.

40 45 La expresión "grupo protector" se refiere a un sustituyente que se emplea habitualmente para bloquear o proteger una funcionalidad particular mientras que reaccionan otros grupos funcionales en el compuesto. Por ejemplo, un "grupo protector de amino" es un sustituyente fijado a un grupo amino que bloquea o protege la funcionalidad amino en el compuesto. Los grupos protectores de amino adecuados incluyen, pero sin limitación, acetilo, trifluoroacetilo, t-butoxicarbonilo (BOC), benciloxicarbonilo (CBZ) y 9-fluorenilmetilenoxicarbonilo (Fmoc). Para una descripción general de grupos protectores y su uso, véase T. W. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, Nueva York, 1991, o una edición posterior.

II. COMPOSICIONES Y MÉTODOS

50 La invención se basa en anticuerpos que se unen a CLL-1 e inmunoconjungados que comprenden dichos anticuerpos como se expone en las reivindicaciones. Los anticuerpos e inmunoconjungados de la invención son útiles, por ejemplo, para el diagnóstico o tratamiento de cánceres CLL-1 positivos.

55 La invención proporciona anticuerpos anti CLL-1 e inmunoconjungados y sus usos médicos como se expone en las reivindicaciones.

60 En el presente documento se proporcionan anticuerpos anti CLL-1 monoclonales aislados, en donde el anticuerpo se une a un epítopo y/o se une a un epítopo superpuesto que comprende los aminoácidos de SEQ ID NO:49 y no se une a un epítopo que comprende la SEQ ID NO:50 y/o la SEQ ID NO:51. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti CLL-1 se une a un epítopo que comprende los aminoácidos de SEQ ID NO:49. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti CLL-1 se une a un epítopo que consiste o que consiste esencialmente en los aminoácidos de SEQ ID NO:49. En algunas realizaciones, el epítopo se determina por la huella de radicales hidroxilo. En algunas realizaciones, el epítopo como se determina por la huella de radicales hidroxilo tiene una relación de [constante de velocidad del antígeno]/[constante de velocidad del complejo de antígeno-anticuerpo] superior a aproximadamente cualquiera de 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 o 3,0. En algunas realizaciones, el epítopo como se determina por la huella de radicales hidroxilo tiene una relación de [constante de velocidad del antígeno]/[constante de velocidad del complejo de antígeno-anticuerpo] superior a aproximadamente 2,0.

La huella de radicales hidroxilo se puede realizar como se describe en los Ejemplos. Por ejemplo, las muestras se exponen a radicales hidroxilo durante intervalos de 0, 10, 15 y 20 milisegundos (ms) usando la línea de haz X28c en el Brookhaven National Laboratory. Las muestras marcadas pueden someterse a desglucosilación usando PNGase F. Las muestras pueden precipitarse usando ácido tricloroacético en acetona y someterse a análisis por LC-MS. A continuación, las muestras pueden someterse a reducción y alquilación, digestión usando tripsina, seguida de cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas de alto rendimiento (LC-MS). Los datos de MS pueden analizarse usando ProtMapMS, lo que da como resultado gráficos de respuesta a la dosis para cada péptido. Los resultados del antígeno libre pueden compararse con cada una de las formas complejas. Puede generarse un modelo basado en homología del antígeno usando el programa informático Swiss-Model, y las regiones protegidas por disolvente pueden mapearse para cada uno de los tres complejos. Los chromatogramas de iones seleccionados (SIC, por sus siglas en inglés) pueden extraerse e integrarse para las formas no oxidadas y oxidadas del ion peptídico (con una relación m/z particular). Estos valores de área de pico pueden usarse para caracterizar la cinética de la reacción en forma de gráficos de respuesta a la dosis (DR, por sus siglas en inglés), que miden la pérdida de péptido intacto en función de la exposición a radicales hidroxilo. Las regiones protegidas por disolvente en el complejo experimentan una reacción de oxidación gradual a diferencia del antígeno libre, y las diferencias en la tasa de oxidación (llamada constante de velocidad, RC) pueden servir para resaltar la ubicación del epítopo.

En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo se une a CLL-1 humano recombinante. En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo se une a CLL-1 de macaco cangrejero recombinante. En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo se une a CLL-1 endógeno sobre la superficie de mononucleocitos de sangre periférica humana (PBMC). En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo se une a CLL-1 endógeno sobre la superficie de PBMC de macaco cangrejero. En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo se une a CLL-1 endógeno sobre la superficie de una célula cancerosa. En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo se une a CLL-1 endógeno sobre la superficie de una célula cancerosa de AML. En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo se une a CLL-1 endógeno sobre la superficie de células HL-60. En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo se une a CLL-1 que comprende una mutación K244Q (SEQ ID NO:1 con K244Q). En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo se une a un epítopo y/o se une a un epítopo superpuesto que comprende los aminoácidos de SEQ ID NO:49. En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo no se une a un epítopo que comprenda la SEQ ID NO:50 y/o la SEQ ID NO:51. En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo compite por la unión a CLL-1 humano con el anticuerpo del clon 687317 de R&D System. En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo se une a CLL-1 humano endógeno con una Kd inferior a 15 nM, inferior a 10 nM, inferior a 7 nM, inferior a 5 nM o inferior a 3 nM. En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo se une a CLL-1 humano recombinante con una Kd inferior a 10 nM, inferior a 7 nM, inferior a 5 nM o inferior a 3 nM. En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo se une a CLL-1 de macaco cangrejero recombinante con una Kd inferior a 10 nM, inferior a 7 nM, inferior a 5 nM o inferior a 3 nM, inferior a 2 nM o inferior a 1 nM.

En algunas realizaciones, las características del anticuerpo se determinan como se describe en el presente documento en los Ejemplos a continuación.

45 Anticuerpo 6E7 y otras realizaciones

La invención proporciona un anticuerpo anti CLL-1 que comprende las seis HVR: (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, un anticuerpo anti CLL-1 está humanizado. En una realización, un anticuerpo anti CLL-1 comprende las HVR como en cualquiera de las realizaciones anteriores, y comprende además un marco aceptor humano, por ejemplo, un marco de inmunoglobulina humana o un marco consenso humano. En determinadas realizaciones, el marco aceptor humano es el marco consenso de VL kappa I (VL_{KI}) humano y/o el marco de VH VH₁. En determinadas realizaciones, el marco aceptor humano es el marco consenso de VL kappa I (VL_{KI}) humano y/o el marco de VH VH₁ que comprende una cualquiera de las siguientes mutaciones.

En otro aspecto, un anticuerpo anti CLL-1 comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33. En determinadas realizaciones, una secuencia VH que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33 contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o eliminaciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti CLL-1 que comprende esta secuencia conserva la capacidad de unirse a CLL-1. En determinadas realizaciones, un total de 1 a 10 aminoácidos se han

- sustituido, insertado y/o eliminado en la SEQ ID NO:33. En determinadas realizaciones, un total de 1 a 5 aminoácidos se han sustituido, insertado y/o eliminado en la SEQ ID NO:33. Estas sustituciones, inserciones o delecciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti CLL-1 comprende la secuencia VH de SEQ ID NO:33, incluyendo modificaciones posteriores a la traducción de esta secuencia.
- 5 En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti CLL-1, en donde el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:32. En determinadas realizaciones, una secuencia VL que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad 10 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:32 contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o eliminaciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti CLL-1 que comprende esta secuencia conserva la capacidad de unirse a CLL-1. En determinadas realizaciones, un total de 1 a 10 aminoácidos se han sustituido, insertado y/o eliminado en la SEQ ID NO:32. En determinadas realizaciones, un total de 15 de 1 a 5 aminoácidos se han sustituido, insertado y/o eliminado en la SEQ ID NO:32. Estas sustituciones, inserciones o delecciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti CLL-1 comprende las secuencias VL de SEQ ID NO:32, incluyendo modificaciones posteriores a la traducción de esta secuencia.
- 20 En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti CLL-1, en donde el anticuerpo comprende una VH como en cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente, y una VL como en cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente.
- 25 En una realización, el anticuerpo comprende las secuencias VH y VL en la SEQ ID NO:33 y la SEQ ID NO:32, respectivamente, incluyendo modificaciones posteriores a la traducción de estas secuencias
- 30 En un aspecto adicional, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que se unen al mismo epítopo que un anticuerpo anti CLL-1 proporcionado en el presente documento. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, se proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítopo que un anticuerpo anti CLL-1 que comprende una secuencia VH de SEQ ID NO:33 y una secuencia VL de SEQ ID NO:32.
- 35 En el presente documento se proporcionan anticuerpos que comprenden un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia HVR1-LC, HVR2-LC y HVR3-LC de acuerdo con la numeración de Kabat como se representa en la figura 2A y un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia HVR1-HC, HVR2-HC y HVR3-HC de acuerdo con la numeración de Kabat como se representa en la figura 2B. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia HVR1-LC, HVR2-LC y/o HVR3-LC, y la secuencia FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC y/o FR4-LC como se representa en la figura 2A. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia HVR1-HC, HVR2-HC y/o HVR3-HC, y la secuencia FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC y/o FR4-HC como se representa en la figura 2B.
- 40 En un aspecto adicional de la invención, un anticuerpo anti CLL-1 de acuerdo con cualquiera de las anteriores realizaciones es un anticuerpo monoclonal, incluyendo un anticuerpo humano. En una realización, un anticuerpo anti CLL-1 es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento Fv, Fab, Fab', scFv, de diacuerpo o F(ab')₂. En otra realización, el anticuerpo es sustancialmente un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, un anticuerpo de IgG1, un anticuerpo de IgG2a u otra clase de anticuerpo o isotipo como se ha definido en el presente documento.
- 45 1. *Afinidad del anticuerpo*
- En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento tiene una constante de disociación (Kd) de ≤ 1 μM, ≤ 100 nM, ≤ 50 nM, ≤ 10 nM, ≤ 5 nM, ≤ 1 nM, ≤ 0,1 nM, ≤ 0,01 nM, o ≤ 0,001 nM y, opcionalmente, es ≥ 10⁻¹³ M (por ejemplo, 10⁻⁸ M o menos, por ejemplo, de 10⁻⁸ M a 10⁻¹³ M, por ejemplo, de 10⁻⁹ M a 10⁻¹³ M).
- 55 En una realización, la Kd se mide mediante un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno como se describe mediante el siguiente ensayo. La afinidad de unión de Fab en solución por el antígeno se mide equilibrando Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con (¹²⁵I) en presencia de una serie de valoración de antígeno no marcado, capturando a continuación el antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpo anti Fab (véase, por ejemplo, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)). Para establecer las condiciones para el ensayo, se recubren durante una noche placas multipicillo MICROTITER® (Thermo Scientific) con 5 μg/ml de un anticuerpo de captura anti Fab (Cappel Labs) en carbonato de sodio 50 mM (pH 60 9,6) y posteriormente se bloquea con seroalbúmina bovina al 2 % (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no adsorbente (Nunc N.º 269620), se mezclan 100 pM o 26 pM de antígeno [¹²⁵I] con diluciones seriadas de un Fab de interés (por ejemplo, consistente con la evaluación del anticuerpo anti VEGF, Fab-12, en Presta et al., Cancer Res. 57:4593-4599 (1997)). A continuación, el Fab de interés se incuba durante una noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un período más largo (por ejemplo, aproximadamente 65 horas) para asegurarse de que se alcanza el equilibrio. Posteriormente, las mezclas se transfieren a la placa de captura para la incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). A
- 65

continuación, la solución se retira y la placa se lava ocho veces con polisorbato 20 al 0,1 % (TWEEN-20[®]) en PBS. Cuando las placas se han secado, se añaden 150 µl/pocillo de centelleador (MICROSCINT-20TM; Packard), y las placas se cuentan en un contador gamma TOPCOUNT[™] (Packard) durante diez minutos. Se eligen las concentraciones de cada Fab que proporcionan menos de o igual al 20 % de la unión máxima para su uso en ensayos de unión competitiva.

De acuerdo con otra realización, la Kd se mide usando ensayos de resonancia de plasmón superficial usando un BIACORE[®]-2000, BIACORE[®]-T200 o un BIACORE[®]-3000 (BIACore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con chips CM5 de antígeno inmovilizados en ~10 unidades de respuesta (UR). Brevemente, los chips biosensores de dextrano carboximetilados (CM5, BIACORE, Inc.) se activan con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) y/o HBS-P (Hepes 0,01 M a pH 7,4, NaCl 0,15 M, tensioactivo P20 al 0,005 %) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/minuto y/o 30 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos que no han reaccionado. Para las mediciones de cinética, se inyectan diluciones seriadas de factor dos de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con tensioactivo de polisorbato 20 al 0,05 % (TWEEN-20TM) (PBST) a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Las tasas de asociación ($k_{\text{asociación}}$) y las tasas de disociación ($k_{\text{disociación}}$) se calculan usando un modelo de unión Langmuir simple uno a uno (programa informático de evaluación BIACORE[®], versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensorgramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (K_d) se calcula como la relación de $k_{\text{disociación}}/k_{\text{asociación}}$. Véase, por ejemplo, Chen *et al.*, J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999). Si la tasa de asociación supera 10⁶ M⁻¹s⁻¹ mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, la tasa de asociación puede determinarse usando una técnica de inactivación fluorescente que mide el aumento o la reducción de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo anti antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno según lo medido en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con flujo de parada (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO[™] serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

2. Fragmentos de anticuerpo

En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv y scFv, y otros fragmentos descritos a continuación. Para una revisión de determinados fragmentos de anticuerpo, véase Hudson *et al.* Nat. Med. 9:129-134 (2003). Para una revisión de fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Pluckthün, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York), págs. 269-315 (1994); véanse también el documento WO 93/16185; y las Patentes de EE. UU. N.º 5.571.894 y 5.587.458. Para el análisis de los fragmentos Fab y F(ab')₂ que comprenden residuos de epítopo de unión a receptor silvestre y que tienen semividia in vivo aumentada, véase la Patente de EE. UU. N.º 5.869.046.

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véanse, por ejemplo, el documento EP 404.097; el documento WO 1993/01161; Hudson *et al.*, Nat. Med. 9:129-134 (2003); y Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993). También se describen triacuerpos y tetracuerpos en Hudson *et al.*, Nat. Med. 9:129-134 (2003).

Los anticuerpos de un solo dominio son fragmentos de anticuerpos que comprenden todo o una porción del dominio variable de cadena pesada o todo o una porción del dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo. En determinadas realizaciones, un anticuerpo de un solo dominio es un anticuerpo de un solo dominio humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. N.º 6.248.516 B1).

Los fragmentos de anticuerpos pueden fabricarse mediante diversas técnicas, incluyendo, pero sin limitación, digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como la producción por células hospedadoras recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), como se describe en el presente documento.

3. Anticuerpos químéricos y humanizados

En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo químérico. Se describen determinados anticuerpos químéricos, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. N.º 4.816.567; y Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). En un ejemplo, un anticuerpo químérico comprende una región variable no humana (por ejemplo, una región variable procedente de un ratón, rata, hámster, conejo o primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En un ejemplo adicional, un anticuerpo químérico es un anticuerpo "de clase cambiada" en el que la clase o subclase se ha cambiado con respecto a la del anticuerpo precursor. Los anticuerpos químéricos incluyen fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo químérico es un anticuerpo humanizado. Típicamente, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenicidad para seres humanos, conservando al mismo tiempo la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano precursor. Generalmente, un anticuerpo humanizado comprende

uno o más dominios variables en los que las HVR, por ejemplo, las CDR, (o porciones de las mismas) proceden de un anticuerpo no humano y las FR (o porciones de las mismas) proceden de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante humana. En algunas realizaciones, algunos residuos de FR en un anticuerpo humanizado se sustituyen por residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que proceden los residuos de la HVR), por ejemplo, para restablecer o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

5 Los anticuerpos humanizados y los métodos para producirlos se revisan, por ejemplo, en Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008), y se describen además, por ejemplo, en Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); 10 Queen *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); Patentes de EE. UU. N.º 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321 y 7.087.409; Kashmire *et al.*, *Methods* 36:25-34 (2005) (que describen un injerto SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (que describe la "modificación de la superficie"); Dall'Acqua *et al.*, *Methods* 36:43-15 60 (2005) (que describe "reordenamiento de FR"); y Osbourn *et al.*, *Methods* 36:61-68 (2005) y Klimka *et al.*, *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (que describen la estrategia de "selección guiada" para el reordenamiento de FR).

15 Las regiones marco humanas que pueden usarse para humanización incluyen, pero sin limitación: regiones marco seleccionadas usando el método de "mejor ajuste" (véase, por ejemplo, Sims *et al.* *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); regiones marco procedentes de la secuencia consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de cadena ligera o pesada (véanse, por ejemplo, Carter *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); y Presta *et al.* *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); regiones marco maduras humanas (mutadas somáticamente) o regiones marco de línea germinal humana (véase, por ejemplo, Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); y regiones marco procedentes del cribado de bibliotecas de FR (véanse, por ejemplo, Baca *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) y Rosok *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

25 4. Anticuerpos humanos

En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos se pueden producir usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Se describen anticuerpos humanos, de manera general, en van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) y Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008).

30 Pueden prepararse anticuerpos humanos administrando un inmunógeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a la exposición a antígenos. Dichos animales típicamente contienen la totalidad o una porción de los locus de inmunoglobulina humanos, que sustituyen los locus endógenos de la inmunoglobulina, o que están presentes extracromosómicamente o integrados de forma aleatoria en los cromosomas de los animales. En dichos ratones transgénicos, generalmente se han inactivado los locus de inmunoglobulina endógenos. Para una revisión de los métodos para obtener anticuerpos humanos procedentes de animales transgénicos, véase Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005). Véanse también, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. N.º 6.075.181 y 6.150.584, que describen la tecnología XENOMOUSE™, Patente de EE. UU. N.º 5.770.429, que describe la tecnología HUMAB®, Patente de EE. UU. N.º 7.041.870, que describe la tecnología K-M MOUSE®, y Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. N.º US 2007/0061900, que describe la tecnología VELOCIMOUSE®). Las regiones variables humanas procedentes de anticuerpos intactos generados por dichos animales pueden modificarse, además, por ejemplo, por combinación con una región constante humana diferente.

35 45 También pueden prepararse anticuerpos humanos mediante métodos basados en hibridoma. Se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Véanse, por ejemplo, Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147: 50 86 (1991)). También se describen anticuerpos humanos generados a través de la tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos en Li *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006). Los métodos adicionales incluyen los descritos, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. N.º 7.189.826 (que describe la producción de anticuerpos IgM monoclonal humanos a partir de líneas celulares de hibridoma) y Ni, Xiandai Miyanixue, 26(4):265-268 (2006) (que describe hibridomas humano-humano). La tecnología de hibridoma humano (tecnología Trioma) también se describe en Vollmers y Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) y Vollmers y Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005).

55 60 También pueden generarse anticuerpos humanos aislando secuencias de dominio variable de clon de Fv seleccionadas de bibliotecas de presentación en fagos de origen humano. Posteriormente, pueden combinarse dichas secuencias de dominio variable con un dominio constante humano deseado. Más adelante se describen técnicas para seleccionar anticuerpos humanos de bibliotecas de anticuerpos.

65 5. Anticuerpos procedentes de bibliotecas

65 Los anticuerpos de la invención pueden aislar criando bibliotecas combinatorias con respecto a anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, en la técnica se conocen diversos métodos para generar bibliotecas

- de presentación en fagos y para cribar dichas bibliotecas para determinar anticuerpos que posean las características de unión deseadas. Dichos métodos se revisan, *por ejemplo*, en Hoogenboom *et al.* en Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y se describen además, *por ejemplo*, en McCafferty *et al.*, Nature 348:552-554; Clackson *et al.*, Nature 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992); 5 Marks y Bradbury, en Methods in Molecular Biology 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu *et al.*, J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee *et al.*, J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132(2004).
- 10 En determinados métodos de presentación en fagos, se clonian por separado repertorios de genes de VH y VL mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se recombinan aleatoriamente en fagotecas, que a continuación pueden someterse a cribado para determinar los fagos de unión a antígeno como se describe en Winter *et al.*, Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994). Los fagos típicamente presentan fragmentos de anticuerpo, ya sea en forma de fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o en forma de fragmentos Fab. Las bibliotecas de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad para el inmunógeno sin necesidad de construir hibridomas. Como alternativa, 15 el repertorio sin tratar se puede clonar (por ejemplo, a partir de un ser humano) para proporcionar una única fuente de anticuerpos contra una amplia gama de antígenos no propios y también propios sin ninguna inmunización como se describe por Griffiths *et al.*, EMBO J, 12: 725-734 (1993). Por último, también pueden producirse sintéticamente bibliotecas sin exposición previa clonando segmentos de gen V no reordenados de células madre y usando cebadores 20 para la PCR que contienen secuencia aleatoria para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para lograr el reordenamiento *in vitro*, como se describe por Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992). Las publicaciones de patente que describen fagotecas de anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo: Patente de EE. UU. N.º 5.750.373, y Publicaciones de Patente de EE. UU. N.º 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 y 2009/0002360.
- 25 En el presente documento, se considera que los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos aislados de bibliotecas de anticuerpos humanos, son anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos humanos.
- 6. Anticuerpos multiespecíficos**
- 30 En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos sitios diferentes. En determinadas realizaciones, una de las especificidades de unión es por CLL-1 y la otra es por cualquier otro antígeno. En determinadas realizaciones, una de las especificidades de unión es por CLL-1 y la otra es por CD3. Véase, *por ejemplo*, la Patente de EE. UU. N.º 5821337. En determinadas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos se pueden unir a dos epítopos diferentes de CLL-1. También se pueden usar anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos en células que expresan CLL-1. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o como fragmentos de anticuerpo. En algunas realizaciones, los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos sitios diferentes.
- 40 En algunas realizaciones, los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión para al menos dos sitios de unión a antígeno diferentes (tal como un anticuerpo biespecífico). En algunas realizaciones, el primer dominio de unión a antígeno y el segundo dominio de unión a antígeno del anticuerpo multiespecífico pueden unirse a los dos epítopos dentro de una misma molécula (unión intramolecular). Por ejemplo, el primer dominio de unión a antígeno y el segundo dominio de unión a antígeno del anticuerpo multiespecífico pueden unirse a dos epítopos diferentes en la misma molécula de CLL-1. En determinadas realizaciones, los dos epítopos diferentes a los que se une un anticuerpo multiespecífico son epítopos que normalmente no están unidos al mismo tiempo por un anticuerpo monoespecífico, tal como, por ejemplo, un anticuerpo convencional o un dominio variable único de inmunoglobulina. En algunas realizaciones, el primer dominio de unión a antígeno y el segundo dominio de unión a antígeno del anticuerpo multiespecífico pueden unirse a epítopos ubicados dentro de dos moléculas distintas (unión intermolecular). Por ejemplo, el primer dominio de unión a antígeno del anticuerpo multiespecífico puede unirse a un epítopo en una molécula de CLL-1, mientras que el segundo dominio de unión a antígeno del anticuerpo multiespecífico puede unirse a otro epítopo en una molécula de CLL-1 diferente, reticulando así las dos moléculas.
- 45 En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo multiespecífico (tal como un anticuerpo biespecífico) comprende dos unidades VH/VL, en donde una primera unidad VH/VL se une a un primer epítopo y una segunda unidad VH/VL se une a un segundo epítopo, en donde cada unidad VH/VL comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) y un dominio variable de cadena ligera (VL). Dichos anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero sin limitación, anticuerpos de longitud completa, anticuerpos que tienen dos o más dominios VL y VH, y fragmentos de anticuerpos (tales como Fab, Fv, dsFv, scFv, diacuerpos, diacuerpos biespecíficos y triacuerpos, fragmentos de anticuerpos que se han unido de forma covalente o no covalente). Una unidad VH/VL que comprende además al menos una porción de una región variable de cadena pesada y/o al menos una porción de una región variable de cadena ligera también puede denominarse "brazo" o "hemímero" o "semianticuerpo". En algunas realizaciones, un hemímero comprende una porción suficiente de una región variable de cadena pesada para permitir que se formen enlaces disulfuro intramoleculares con un segundo hemímero. En algunas realizaciones, un hemímero comprende una mutación de botón o una mutación de ojal, por ejemplo, para permitir la heterodimerización con un
- 50
- 55
- 60
- 65

segundo hemímero o semianticuerpo que comprende una mutación de ojal complementaria o mutación de botón. Las mutaciones de botón y las mutaciones de ojal se analizan más adelante.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo multiespecífico proporcionado en el presente documento puede ser un anticuerpo biespecífico. Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo biespecífico" se refiere a un anticuerpo multiespecífico que comprende un dominio de unión a antígeno que es capaz de unirse a dos epítopos diferentes en una molécula o es capaz de unirse a epítopos en dos moléculas diferentes. Un anticuerpo biespecífico también puede denominarse en el presente documento como que tiene "doble especificidad" o como que es "específico doble". Los anticuerpos biespecíficos de ejemplo pueden unirse tanto a CLL-1 como a cualquier otro antígeno. En determinadas realizaciones, una de las especificidades de unión es por CLL-1 y la otra es por CD3. Véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. N.º 5821337. En determinadas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítopos diferentes de la misma molécula de CLL-1. En determinadas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítopos diferentes en dos moléculas de CLL-1 diferentes. También se pueden usar anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos en células que expresan CLL-1. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o como fragmentos de anticuerpo.

Las técnicas para producir anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero sin limitación, la coexpresión recombinante de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina que tienen diferentes especificidades (véanse Milstein y Cuello, Nature 305: 537 (1983), documento WO 93/08829, y Traunecker *et al.*, EMBO J. 10: 3655 (1991)), e ingeniería de "botón en ojal" (véanse, por ejemplo, la Patente de EE. UU. N.º 5.731.168), los documentos WO2009/089004, US2009/0182127, US2011/0287009, Marvin y Zhu, Acta Pharmacol. Sin. (2005) 26(6):649-658, y Kontermann (2005) Acta Pharmacol. Sin., 26:1-9). Como se usa en el presente documento, la expresión "botón en ojal" o tecnología "KnH" se refiere a la tecnología que dirige el emparejamiento de dos polipéptidos juntos *in vitro* o *in vivo* mediante la introducción de una protuberancia (botón) en un polipéptido y una cavidad (ojal) en el otro polipéptido en una interfase en la que interactúan. Por ejemplo, los KnH se han introducido en las interfases de unión Fc:Fc, las interfases CL:CH1 o las interfases VH/VL de los anticuerpos (véanse, por ejemplo, los documentos US 2011/0287009, US2007/0178552, WO 96/027011, WO 98/050431 y Zhu *et al.*, 1997, Protein Science 6:781-788). En algunas realizaciones, Los KnH dirigen el emparejamiento de dos cadenas pesadas diferentes entre sí durante la producción de anticuerpos multiespecíficos. Por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos que tienen KnH en sus regiones Fc pueden comprender además dominios variables únicos unidos a cada región Fc, o comprender además diferentes dominios variables de cadena pesada que se emparejan con dominios variables de cadena ligera similares o diferentes. La tecnología KnH también se puede usar para emparejar dos dominios extracelulares de receptor diferentes entre sí o cualquier otra secuencia polipeptídica que comprenda diferentes secuencias de reconocimiento de diana (por ejemplo, incluyendo aficuerpos, pepticuerpos y otras fusiones Fc).

Como se usa en el presente documento, la expresión "mutación de botón" se refiere a una mutación que introduce una protuberancia (botón) en un polipéptido en una interfase en la que el polipéptido interactúa con otro polipéptido. En algunas realizaciones, el otro polipéptido tiene una mutación de ojal.

Como se usa en el presente documento, la expresión "mutación de ojal" se refiere a una mutación que introduce una cavidad (ojal) en un polipéptido en una interfase en la que el polipéptido interactúa con otro polipéptido. En algunas realizaciones, el otro polipéptido tiene una mutación de botón.

Se proporciona a continuación un análisis breve no limitante.

Una "protuberancia" se refiere a al menos una cadena lateral de un aminoácido que se proyecta desde la interfase de un primer polipéptido y que, por lo tanto, se puede introducir en una cavidad de compensación en la interfase adyacente (es decir, la interfase de un segundo polipéptido de manera que se estabiliza el heteromultímero y, de este modo, se favorece la formación del heteromultímero sobre la formación del homomultímero, por ejemplo. La protuberancia puede existir en la interfase original o puede introducirse sintéticamente (por ejemplo, alterando el ácido nucleico que codifica la interfase). En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica la interfase del primer polipéptido está alterado para codificar la protuberancia. Para conseguir esto, el ácido nucleico que codifica al menos un residuo de aminoácido "original" en la interfase del primer polipéptido se sustituye por un ácido nucleico que codifica al menos un residuo de aminoácido importado que tiene un volumen de la cadena lateral más grande que el residuo de aminoácido original. Se apreciará que puede haber más de un residuo original y un residuo importado correspondiente. Se muestran los volúmenes de las cadenas laterales de los diversos residuos amino, por ejemplo, en la Tabla 1 del documento US2011/0287009. Una mutación para introducir una "protuberancia" puede denominarse una "mutación de botón".

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

Una "cavidad" se refiere a al menos una cadena lateral de un aminoácido que se proyecta desde la interfase de un

- segundo polipéptido y, por lo tanto, aloja una protuberancia correspondiente sobre la interfase adyacente de un primer polipéptido. La cavidad puede existir en la interfase original o puede introducirse sintéticamente (por ejemplo, alterando el ácido nucleico que codifica la interfase). En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica la interfase del primer polipéptido está alterado para codificar la cavidad. Para conseguir esto, el ácido nucleico que codifica al menos un residuo de aminoácido "original" en la interfase del segundo polipéptido se reemplaza por ADN que codifica al menos un residuo de aminoácido importado que tiene un volumen de la cadena lateral más pequeño que el residuo de aminoácido original. Se apreciará que puede haber más de un residuo original y un residuo importado correspondiente. En algunas realizaciones, los residuos importados para la formación de una cavidad son residuos de aminoácidos de origen natural seleccionados de alanina (A), serina (S), treonina (T) y valina (V). En algunas realizaciones, un residuo importado es serina, alanina o treonina. En algunas realizaciones, el residuo original para la formación de la cavidad tiene un volumen de cadena lateral grande, tal como tirosina, arginina, fenilalanina o triptófano. Una mutación para introducir una "cavidad" puede denominarse una "mutación de ojal".
- La protuberancia se "puede posicionar" en la cavidad, lo que significa que la localización espacial de la protuberancia y la cavidad sobre la interfase de un primer polipéptido y un segundo polipéptido respectivamente y los tamaños de la protuberancia y la cavidad son tales que la protuberancia puede introducirse en la cavidad sin perturbar significativamente la asociación normal del primer y el segundo polipéptidos en la interfase. Debido a que las protuberancias tales como Tyr, Phe y Trp no se extienden típicamente de forma perpendicular desde el eje de la interfase y tienen conformaciones preferidas, la alineación de una protuberancia con una cavidad correspondiente puede, en algunos casos, depender del modelado del par protuberancia/cavidad en función de una estructura tridimensional tal como la obtenida por cristalográfica de rayos X o resonancia magnética nuclear (RMN). Esto se puede conseguir usando técnicas ampliamente aceptadas en la técnica.
- En algunas realizaciones, una mutación de botón en una región constante de IgG1 es T366W (numeración EU). En algunas realizaciones, una mutación de ojal en una región constante de IgG1 comprende una o más mutaciones seleccionadas de T366S, L368A e Y407V (numeración EU). En algunas realizaciones, una mutación de ojal en una región constante de IgG1 comprende T366S, L368A e Y407V (numeración EU).
- En algunas realizaciones, una mutación de botón en una región constante de IgG4 es T366W (numeración EU). En algunas realizaciones, una mutación de ojal en una región constante de IgG4 comprende una o más mutaciones seleccionadas de T366S, L368A e Y407V (numeración EU). En algunas realizaciones, una mutación de ojal en una región constante de IgG4 comprende T366S, L368A e Y407V (numeración EU).
- Los anticuerpos multiespecíficos también se pueden preparar mediante la ingeniería de efectos de dirección electrostática para preparar moléculas heterodiméricas de anticuerpo Fc (documento WO 2009/089004A1); entrecruzamiento de dos o más anticuerpos o fragmentos (véanse, por ejemplo, la Patente de EE. UU. N.º 4.676.980 y Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)); usando cremalleras de leucina para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kostelnik et al., *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992)); usando tecnología de "diacuerpos" para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); y usando dímeros Fv monocatenarios (sFv) (véase, por ejemplo, Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); y preparando anticuerpos triespecíficos, como se describe, por ejemplo, en Tutt et al. *J. Immunol.* 147: 60 (1991).
- Los anticuerpos genomanipulados con tres o más sitios de unión a antígeno funcionales, incluyendo los "anticuerpos Octopus" o las "inmunoglobulinas de dominio variable dual" (DVD) también se incluyen en el presente documento (véanse, por ejemplo, el documento US 2006/0025576A1 y Wu et al. *Nature Biotechnology* (2007)). El anticuerpo o fragmento del presente documento también incluye un "FAB de doble acción" o "DAF" que comprende un sitio de unión a antígeno que se une a CLL-1, así como a otro antígeno diferente (véase, el documento US 2008/0069820, por ejemplo).
- 7. Variantes de anticuerpo**
- En determinadas realizaciones, se contemplan variantes de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Pueden prepararse variantes de secuencias de aminoácidos de un anticuerpo mediante la introducción de modificaciones adecuadas en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, delecciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se puede realizar cualquier combinación de delección, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, la unión a antígeno.
- a) Variantes de sustitución, inserción y delección**
- En determinadas realizaciones, se proporcionan variantes de anticuerpos que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las HVR y las FR. En la tabla 1 se muestran sustituciones conservativas bajo el encabezado de "sustituciones preferidas". Se proporcionan cambios más

sustanciales en la Tabla 1 bajo el encabezado "sustituciones de ejemplo", y como se describen más adelante en referencia a las clases de las cadenas laterales de aminoácidos. En un anticuerpo de interés pueden introducirse sustituciones de aminoácidos y los productos pueden cribarse para determinar una actividad deseada, por ejemplo, unión a antígeno conservada/mejorada, inmunogenicidad reducida o ADCC o CDC mejoradas.

5

TABLA 1

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

Los aminoácidos pueden agruparse de acuerdo con las propiedades comunes de la cadena lateral:

- 10 (1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
 (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
 (3) ácidos: Asp, Glu;
 (4) básicos: His, Lys, Arg;
 (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
 15 (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

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

- 20 Un tipo particular de variante de sustitución implica sustituir uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo precursor (por ejemplo, un anticuerpo humano o humanizado). Generalmente, la una o más variantes resultantes seleccionadas para su estudio posterior tendrán modificaciones (por ejemplo, mejoras) en determinadas propiedades biológicas (por ejemplo, afinidad mejorada, inmunogenicidad reducida) con respecto al anticuerpo precursor y/o tendrán determinadas propiedades biológicas sustancialmente conservadas del anticuerpo precursor. Una variante de sustitución de ejemplo es un anticuerpo madurado por afinidad, que puede generarse de manera conveniente, por ejemplo, usando técnicas de maduración por afinidad basadas en presentación en fagos, tales como las descritas en el presente documento. Brevemente, se mutan uno o más residuos de HVR y los anticuerpos variantes se presentan sobre fagos y se criban para determinar una actividad biológica particular (por ejemplo, afinidad de unión).
- 25 30 Pueden efectuarse alteraciones (por ejemplo, sustituciones) en las HVR, *por ejemplo*, para mejorar la afinidad del anticuerpo. Dichas alteraciones pueden efectuarse en "puntos calientes" de la HVR, es decir, residuos codificados por codones que experimentan mutación con elevada frecuencia durante el proceso de maduración somática (véase, *por ejemplo*, Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008)), y/o SDR (a-CDR), ensayándose la afinidad de unión de la VH o VL variante resultante. La maduración por afinidad mediante la construcción y reselección de bibliotecas secundarias se ha descrito, por ejemplo, en Hoogenboom *et al.* en Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)). En algunas realizaciones de maduración por afinidad, se introduce diversidad en los genes variables elegidos para su maduración mediante cualquiera de diversos métodos (por ejemplo, PCR propensa a errores, transferencia de cadenas o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos). A continuación, se crea una biblioteca secundaria. A continuación, la biblioteca se criba para identificar cualquier variante de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro método para introducir diversidad implica estrategias dirigidas a las HVR, en las que se asignan al azar varios residuos de HVR (por ejemplo, 4-6 residuos a la vez). Los residuos de HVR implicados en la unión al antígeno se pueden identificar de manera específica, por ejemplo, usando mutagénesis por barrido de alanina o modelización. Con frecuencia, se usan como diana, en particular, CDR-H3 y CDR-L3.
- 35 40

- En determinadas realizaciones, pueden producirse sustituciones, inserciones o delecciones en una o más HVR en tanto que dichas alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo para unirse al antígeno. Por ejemplo, pueden efectuarse alteraciones conservadoras (por ejemplo, sustituciones conservadoras, tal como se proporcionan en el presente documento) que no reduzcan sustancialmente la afinidad de unión en las HVR. Dichas alteraciones 5 pueden realizarse fuera de los "puntos calientes" de las HVR o SDR. En determinadas realizaciones de las secuencias variantes de VH y VL proporcionadas anteriormente, cada HVR bien está inalterada o bien no contiene más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.
- Un método útil para la identificación de residuos o regiones de un anticuerpo que pueden usarse como diana para 10 mutagénesis se denomina "mutagénesis por barrido de alanina" como se describe por Cunningham y Wells (1989) Science, 244:1081-1085. En este método, se identifica un residuo o un grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se reemplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno se ve afectada. Pueden 15 introducirse sustituciones adicionales en las ubicaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. Como alternativa, o adicionalmente, se usa una estructura cristalina de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos adyacentes pueden seleccionarse como diana o eliminarse como candidatos para la sustitución. Las variantes pueden 20 cribarse para determinar si contienen las propiedades deseadas.
- Las inserciones en secuencias de aminoácidos incluyen fusiones en el extremo amino y/o carboxilo con un intervalo 25 de longitudes de un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuencia de residuos de aminoácidos individuales o múltiples. Los ejemplos de inserciones en los extremos incluyen un anticuerpo con un residuo metionilo en el extremo N. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo de una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.
- b) Variantes de glucosilación
- En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento se altera para aumentar o 30 reducir el alcance de glucosilación del anticuerpo. La adición o eliminación de sitios de glucosilación a un anticuerpo puede lograrse convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos, de tal forma que se crea o elimina más de un sitio de glucosilación.
- Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, el carbohidrato unido a la misma puede alterarse. Los anticuerpos 35 naturales producidos por células de mamífero comprenden típicamente un oligosacárido biantenario ramificado que está unido generalmente mediante un enlace N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright *et al.* TIBTECH 15:26-32 (1997). El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetil glucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como fucosa unida a una GlcNAc en el "tallo" de la estructura del oligosacárido biantenario. En algunas realizaciones, pueden realizarse modificaciones del oligosacárido en un 40 anticuerpo de la invención para crear variantes de anticuerpos con determinadas propiedades mejoradas.
- En una realización, se proporcionan variantes de anticuerpos que tienen una estructura de carbohidratos que carece 45 de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicho anticuerpo puede ser del 1 % al 80 %, del 1 % al 65 %, del 5 % al 65 % o del 20 % al 40 %. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297, en relación con la suma de todas las glucoestructuras unidas a Asn 297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y con alto contenido de manosa) según lo medido mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe en el documento WO 2008/077546, por ejemplo. Asn297 se refiere al residuo de asparagina ubicado aproximadamente en la posición 297 en la región Fc (numeración EU de los residuos de la región Fc); sin embargo, Asn297 también puede estar ubicado a aproximadamente ±3 aminoácidos cadena arriba o cadena abajo de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a escasas variaciones de secuencia en los anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación pueden 50 tener mejorada la función ADCC. Véanse, por ejemplo, las Publicaciones de Patente de EE. UU. N.º US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpos "desfucosiladas" o "deficientes en fucosa" incluyen: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki *et al.* J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al.* Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Los ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos desfucosilados incluyen las 55 células CHO Lec13 deficientes en fucosilación de proteínas (Ripka *et al.* Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); Sol. de Pat. de EE. UU. N.º US 2003/0157108 A1, Presta, L; y el documento WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, especialmente en el ejemplo 11) y líneas celulares con supresión génica, tal como el gen de la alfa-1,6-fucosiltransferasa, FUT8, células CHO con supresión génica (véase, por ejemplo, Yamane-Ohnuki *et al.* Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. *et al.*, Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006); y el documento WO2003/085107).
- 60 Las variantes de anticuerpo se proporcionan adicionalmente con oligosacáridos bisectados, por ejemplo, en las que se bisecciona un oligosacárido biantenario unido a la región Fc del anticuerpo mediante GlcNAc. Dichas variantes de 65

anticuerpos pueden tener una fucosilación reducida y/o una función de ADCC mejorada. Se describen ejemplos de dichas variantes de anticuerpo, por ejemplo, en el documento WO 2003/011878 (Jean-Mairet *et al.*); la Patente de EE. UU. N.º 6.602.684 (Umana *et al.*); y el documento US 2005/0123546 (Umana *et al.*). También se proporcionan variantes de anticuerpo con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener una función CDC mejorada. Dichas variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en los documentos WO 1997/30087 (Patel *et al.*); WO 1998/58964 (Raju, S.); y WO 1999/22764 (Raju, S.).

- 5 c) Variantes de la región Fc
- 10 10 En determinadas realizaciones, pueden introducirse una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en el presente documento, generando de este modo una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos.
- 15 15 En determinadas realizaciones, la invención contempla una variante de anticuerpo que tiene algunas, pero no todas, las funciones efectoras, lo que la convierte en un candidato deseable para aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante pero determinadas funciones efectoras (tales como el complemento y ADCC) son innecesarias o perjudiciales. Pueden llevarse a cabo ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/agotamiento de las actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, se pueden realizar ensayos de unión al receptor de Fc (FcR) para garantizar que el anticuerpo carece de unión a FcγR (por lo tanto, carece probablemente de actividad ADCC), pero conserva la capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar en la ADCC, linfocitos NK, expresan únicamente FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991). Se describen ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés en la Patente de EE. UU. N.º 5.500.362 (véase, por ejemplo, Hellstrom, I. *et al.* Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)) y Hellstrom, I *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985); 5.821.337 (véase Bruggemann, M. *et al.*, J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)). Como alternativa, pueden emplearse métodos de ensayos no radiactivos (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACT™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y el ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal, tal como se divulga en Clynes *et al.* Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998). También pueden llevarse a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unirse a C1q y, por lo tanto, carece de actividad CDC. Véase, *por ejemplo*, el ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro *et al.*, J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M.S. *et al.*, Blood 101:1045-1052 (2003); y Cragg, M.S. y M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004)). También pueden realizarse determinaciones de unión a FcRn y de aclaramiento/semitvida *in vivo* usando métodos conocidos en la técnica (véase, *por ejemplo*, Petkova, S. B. *et al.*, Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)).
- 30 40 En algunas realizaciones, pueden introducirse una o más modificaciones de aminoácidos en la porción Fc del anticuerpo proporcionado en el presente documento para aumentar la unión de la IgG al receptor de Fc neonatal. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende las tres siguientes mutaciones de acuerdo con la numeración EU: M252Y, S254T y T256E (la "mutación YTE") (Patente de EE. UU. N.º 8.697.650; véase también Dall'Acqua *et al.*, Journal of Biological Chemistry 281(33):23514-23524 (2006)). En determinadas realizaciones, la mutación YTE no afecta a la capacidad del anticuerpo para unirse a su antígeno análogo. En determinadas realizaciones, la mutación YTE aumenta la semivida en suero del anticuerpo en comparación con el anticuerpo natural (es decir, mutante diferente de YTE). En algunas realizaciones, la mutación YTE aumenta la semivida en suero del anticuerpo 3 veces en comparación con el anticuerpo natural (es decir, mutante diferente de YTE). En algunas realizaciones, la mutación YTE aumenta la semivida en suero del anticuerpo 2 veces en comparación con el anticuerpo natural (es decir, mutante diferente de YTE). En algunas realizaciones, la mutación YTE aumenta la semivida en suero del anticuerpo 4 veces en comparación con el anticuerpo natural (es decir, mutante diferente de YTE). En algunas realizaciones, la mutación YTE aumenta la semivida en suero del anticuerpo al menos 5 veces en comparación con el anticuerpo natural (es decir, mutante diferente de YTE). En algunas realizaciones, la mutación YTE aumenta la semivida en suero del anticuerpo al menos 10 veces en comparación con el anticuerpo natural (es decir, mutante diferente de YTE). Véase, *por ejemplo*, la Patente de EE. UU. N.º 8.697.650; véase también Dall'Acqua *et al.*, Journal of Biological Chemistry 281(33):23514-23524 (2006).
- 45 55 En determinadas realizaciones, el mutante YTE proporciona un medio para modular la actividad de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). En determinadas realizaciones, el mutante YTEO proporciona un medio para modular la actividad ADCC de un anticuerpo de IgG humanizado dirigido contra un antígeno humano. Véase, *por ejemplo*, la Patente de EE. UU. N.º 8.697.650; véase también Dall'Acqua *et al.*, Journal of Biological Chemistry 281(33):23514-23524 (2006).
- 60 65 En determinadas realizaciones, el mutante YTE permite la modulación simultánea de la semivida en suero, la

distribución en el tejido y la actividad del anticuerpo (por ejemplo, la actividad ADCC de un anticuerpo IgG). Véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. N.º 8.697.650; véase también Dall'Acqua *et al.*, Journal of Biological Chemistry 281(33):23514-23524 (2006).

- 5 Los anticuerpos con función efectora reducida incluyen aquellos con la sustitución de uno o más de los residuos de la
10 región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 de acuerdo con la numeración EU (Patente de EE. UU. N.º 6.737.056). Dichos mutantes Fc incluyen mutantes Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácidos 265, 269,
15 270, 297 y 327 de acuerdo con la numeración EU, incluyendo el mutante Fc denominado "DANA" con sustitución de los residuos 265 y 297 por alanina de acuerdo con la numeración EU (es decir, D265A y N297A de acuerdo con la
20 numeración EU) (Patente de EE. UU. N.º 7.332.581). En determinadas realizaciones, el mutante Fc comprende las siguientes dos sustituciones de aminoácidos: D265A y N297A. En determinadas realizaciones, el mutante Fc consiste en las siguientes dos sustituciones de aminoácidos: D265A y N297A.
- En determinadas realizaciones, la prolina en la posición 329 (numeración EU) (P329) de una región Fc humana de tipo natural se sustituye con glicina o arginina o un residuo de aminoácido lo suficientemente grande como para destruir la intercalación de prolina dentro de la interfase del receptor Fc/Fc γ , que se forma entre P329 de la Fc y los residuos de triptófano W87 y W110 de FcgRIII (Sondermann *et al.*: Nature 406, 267-273 (20 de julio de 2000)). En una realización adicional, al menos una sustitución de aminoácidos adicional en la variante Fc es S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D o P331S y, en otra realización más, dicha al menos una sustitución de aminoácidos adicional es L234A y L235A de la región Fc de la IgG1 humana o S228P y L235E de la región Fc de la IgG4 humana, todas de acuerdo con la numeración EU (Patente de EE. UU. N.º 8.969.526).
- En determinadas realizaciones, un polipéptido comprende la variante Fc de una región Fc de IgG humana de tipo natural, en donde el polipéptido tiene P329 de la región Fc de IgG humana sustituida con glicina, y en donde la variante Fc comprende al menos dos sustituciones de aminoácidos adicionales en L234A y L235A de la región Fc de IgG1 humana o S228P y L235E de la región Fc de IgG4 humana, y en donde los residuos están numerados de acuerdo con la numeración EU (Patente de EE. UU. N.º 8.969.526).
- En determinadas realizaciones, el polipéptido que comprende las sustituciones P329G, L234A y L235A (numeración EU) exhibe una afinidad reducida por Fc γ RIIA y Fc γ RIIA humanos, para la modulación negativa de ADCC con respecto al menos el 20 % de la ADCC inducida por el polipéptido que comprende la región Fc de IgG humana de tipo natural, y/o para la modulación negativa de ADCP (Patente de EE. UU. N.º 8.969.526).
- En una realización específica, el polipéptido comprende un Fc variante de un polipéptido Fc humano natural que comprende una mutación triple: una sustitución de aminoácidos en la posición Pro329, una mutación L234A y una mutación L235A de acuerdo con la numeración EU (P329/LALA) (Patente de EE. UU. N.º 8.969.526). En realizaciones específicas, el polipéptido comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos: P329G, L234A y L235A de acuerdo con la numeración EU.
- Se describen determinadas variantes de anticuerpo con unión mejorada o reducida a FcR. (Véanse, por ejemplo, la Patente de EE. UU. N.º 6.737.056; el documento WO 2004/056312 y Shields *et al.*, J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)).
- En determinadas realizaciones, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU).
- En algunas realizaciones, se realizan alteraciones en la región Fc que dan como resultado una unión de C1q alterada (es decir, mejorada o disminuida) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo, como se describe en la Patente de EE. UU. N.º 6.194.551, el documento WO 99/51642 e Idusogie *et al.* J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).
- Los anticuerpos con semivididas aumentadas y unión mejorada al receptor de Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, J. Immunol. 117:587 (1976) y Kim *et al.*, J. Immunol. 24:249 (1994)), se describen en el documento US2005/0014934A1 (Hinton *et al.*). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Dichas variantes de Fc incluyen aquellas que tienen sustituciones en uno o más de los residuos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, la sustitución del residuo 434 de la región Fc (Patente de EE. UU. N.º 7.371.826) de acuerdo con la numeración EU. Véanse también Duncan y Winter, Nature 322:738-40 (1988); Patente de EE. UU. N.º 5.648.260; Patente de EE. UU. N.º 5.624.821; y el documento WO 94/29351 en referencia a otros ejemplos de variantes de la región Fc.
- d) Variantes de anticuerpos genomanipuladas con cisteína
- En determinadas realizaciones, puede ser deseable crear anticuerpos genomanipulados con cisteína, por ejemplo, "anticuerpo "THIOMAB"TM", en los que uno o más residuos de un anticuerpo se sustituyen con residuos de cisteína. En

- realizaciones particulares, los residuos sustituidos se producen en sitios accesibles del anticuerpo. Al sustituir estos residuos por cisteína, se posicionan de este modo grupos tiol reactivos en sitios accesibles del anticuerpo y pueden usarse para conjugar el anticuerpo con otros restos, tales como restos farmacológicos o intermedios enlazador-fármaco, para crear un inmunoconjuguado, como se describe adicionalmente en el presente documento. En determinadas realizaciones, puede sustituirse uno cualquiera o más de los siguientes residuos con cisteína: V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A140 (numeración EU) de la cadena pesada; L174 (numeración EU) de la cadena pesada; Y373 (numeración EU) de la cadena pesada; K149 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de cadena pesada. En realizaciones específicas, los anticuerpos descritos en el presente documento comprenden la sustitución de la cisteína de HC-A140C (numeración EU). En realizaciones específicas, los anticuerpos descritos en el presente documento comprenden la sustitución de la cisteína de LC-K149C (numeración de Kabat). En realizaciones específicas, los anticuerpos descritos en el presente documento comprenden la sustitución de la cisteína de HC-A118C (numeración EU). Pueden generarse anticuerpos genomanipulados con cisteína como se describe, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. N.º 7.521.541.
- 5 En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una de las siguientes sustituciones de cisteína de cadena pesada:
- 10
- 15

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

- 20 En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una de las siguientes sustituciones de cisteína de la cadena ligera:

Cadena (HC/LC)	Residuo	n.º del sitio de mutación, EU	n.º del sitio de mutación, Kabat
LC	I	106	106
LC	R	108	108
LC	R	142	142
LC	K	149	149

e) Derivados de anticuerpos

- 25 En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento puede modificarse adicionalmente para que contenga restos no proteicos adicionales conocidos en la técnica y fácilmente disponibles. Los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo incluyen, pero sin limitación, polímeros solubles en agua. Los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de prolipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede tener cualquier peso molecular y puede estar o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar y, si se une más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros usados para la derivatización se puede determinar basándose en consideraciones que incluyen, pero sin limitación, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo a mejorar, si el derivado de anticuerpo se usará en una terapia en condiciones definidas, etc.
- 30
- 35
- 40
- 45

B. Métodos y composiciones recombinantes

- Los anticuerpos pueden producirse usando métodos y composiciones recombinantes, por ejemplo, como se describe en la Patente de EE. UU. N.º 4.816.567. En una realización, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti CLL-1 descrito en el presente documento. Dicho ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende la VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo (por ejemplo, las cadenas ligera y/o pesada del anticuerpo). En una realización adicional, se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En una realización adicional, se proporciona una célula hospedadora que comprende dicho ácido nucleico. En una de tales realizaciones, una célula hospedadora comprende (por ejemplo, se ha transformado con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo. En una realización, la célula hospedadora es eucariota, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula linfocitaria (por ejemplo, una célula Y0, NS0, Sp20). En una realización, se proporciona un método para preparar un anticuerpo anti CLL-1, en donde el método comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, como se ha proporcionado anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo y, opcionalmente, recuperar el anticuerpo de la célula hospedadora (o del medio de cultivo de la célula hospedadora).
- Para la producción recombinante de un anticuerpo anti CLL-1, el ácido nucleico que codifica un anticuerpo, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, se aísla y se inserta en uno o más vectores para la clonación y/o expresión adicional en una célula hospedadora. Dicho ácido nucleico puede aislarse y secuenciarse rápidamente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas de oligonucleótidos que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo).
- Las células hospedadoras adecuadas para la clonación o expresión de los vectores que codifican anticuerpos incluyen células procariotas o eucariotas descritas en el presente documento. Por ejemplo, los anticuerpos pueden producirse en bacterias, en particular cuando la glucosilación y la función efectora de Fc no son necesarias. Para la expresión de fragmentos de anticuerpos y polipéptidos en bacterias, véanse, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. N.º 5.648.237, 5.789.199, y 5.840.523. (Véase también Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), págs. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*). Después de la expresión, el anticuerpo puede aislarse de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y puede purificarse adicionalmente.
- Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos filamentosos o levaduras, son hospedadores de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos, incluyendo cepas de hongos y levaduras cuyas vías de glucosilación se han "humanizado", lo que da como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcial o completamente humano. Véase Gerngross, *Nat. Biotech.* 22: 1409-1414 (2004), y Li *et al.*, *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).
- Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de un anticuerpo glucosilado también proceden de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas baculoviricas que pueden usarse junto con células de insecto, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.
- También se pueden utilizar cultivos de células vegetales como hospedadores. Véase, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. N.º 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).
- También pueden usarse como hospedadores células de vertebrado. Por ejemplo, pueden ser útiles líneas celulares de mamífero que están adaptadas para crecer en suspensión. Otros ejemplos de células de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada mediante SV40 (COS-7); la línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 como se describe, por ejemplo, en Graham *et al.*, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK); células de Sertoli de ratón (células TM4 como se describe, por ejemplo, en Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma de cuello del útero humano (HELA); células de riñón canino (MDCK); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); tumor de mama de ratón (MMT 060562); células TRI, como se describe, por ejemplo, en Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); células MRC 5; y células FS4. Otras líneas celulares hospedadoras de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO DHFR⁻ (Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); y líneas celulares de mieloma, tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas celulares hospedadoras de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), págs. 255-268 (2003).
- C. Ensayos

Los anticuerpos anti CLL-1 proporcionados en el presente documento se pueden identificar, cribar o caracterizar para determinar sus propiedades fisicoquímicas y/o sus actividades biológicas mediante diversos ensayos conocidos en la técnica.

- 5 En un aspecto, se ensaya un anticuerpo de la invención para determinar su actividad de unión a antígeno, *por ejemplo*, por métodos conocidos tales como ELISA, BIACore®, FACS o transferencia de Western.
- En otro aspecto, pueden usarse ensayos de competencia para identificar un anticuerpo que compite con cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento por la unión a CLL-1. En determinadas realizaciones, tal anticuerpo de competición se une al mismo epítopo (por ejemplo, un epítopo lineal o conformacional) que está unido por un anticuerpo descrito en el presente documento. Se proporcionan métodos detallados para mapear el epítopo al que se une un anticuerpo en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", en Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ).
- 10 15 En un ensayo de competición de ejemplo, el CLL-1 inmovilizado se incuba en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une a CLL-1 (por ejemplo, cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento) y un segundo anticuerpo no marcado del que se está ensayando su capacidad para competir con el primer anticuerpo por la unión a CLL-1. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control, el CLL-1 inmovilizado se incuba en una solución que comprende el primer anticuerpo marcado, pero no el segundo anticuerpo no marcado. Después de la incubación en condiciones que permiten la unión del primer anticuerpo a CLL-1, se retira el exceso de anticuerpo no unido y se mide la cantidad de marcador asociado con el CLL-1 inmovilizado. Si la cantidad de marcador asociado a CLL-1 inmovilizado se encuentra sustancialmente reducida en la muestra de ensayo con respecto a la muestra de control, entonces, esto indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primer anticuerpo por la unión a CLL-1. Véase Harlow y Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual cap. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).
- 20 25

D. Inmunoconjungados

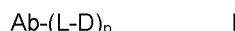
- 30 La invención también proporciona inmunoconjungados que comprenden un anticuerpo anti CLL-1 proporcionado en el presente documento conjugado con uno o más agentes citotóxicos, tales como agentes o fármacos quimioterápicos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo, toxinas proteicas, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas), o isótopos radiactivos (es decir, un radioconjungado).
- 35 Los inmunoconjungados permiten el suministro dirigido de un resto farmacológico a un tumor y, en algunas realizaciones, la acumulación intracelular en el mismo, donde la administración sistémica de fármacos no conjugados puede dar como resultado niveles inaceptables de toxicidad para las células normales (Polakis P. (2005) Current Opinion in Pharmacology 5:382-387).
- 40 Los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) son moléculas quimioterápicas dirigidas que combinan propiedades tanto de anticuerpos como de fármacos citotóxicos al dirigir fármacos citotóxicos potentes a células tumorales que expresan抗ígenos (Teicher, B.A. (2009) Current Cancer Drug Targets 9:982-1004), mejorando así el índice terapéutico maximizando la eficacia y minimizando la toxicidad inespecífica (Carter, P.J. y Senter P.D. (2008) The Cancer Jour. 14(3):154-169; Chari, R.V. (2008) Acc. Chem. Res. 41:98-107).
- 45 50 Los compuestos ADC de la invención incluyen aquellos con actividad antineoplásica. En algunas realizaciones, los compuestos ADC incluyen un anticuerpo conjugado, es decir, unido covalentemente, al resto farmacológico. En algunas realizaciones, el anticuerpo está unido covalentemente al resto del fármaco mediante un enlazador. Los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención suministran selectivamente una dosis eficaz de un fármaco al tejido tumoral, con lo que se puede lograr una mayor selectividad, es decir, una dosis eficaz más baja, al tiempo que se aumenta el índice terapéutico ("ventana terapéutica").
- 55 60 El resto farmacológico (D) de los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) puede incluir cualquier compuesto, resto o grupo que tenga un efecto citotóxico o citostático. Los restos farmacológicos pueden transmitir sus efectos citotóxicos y citostáticos mediante mecanismos que incluyen, pero sin limitación, la unión a tubulina, la unión o intercalado de ADN, y la inhibición de la ARN polimerasa, la síntesis de proteínas y/o la topoisomerasa. Los restos farmacológicos de ejemplo incluyen, pero sin limitación, un maitansinoide, dolastatina, auristatina, calicheamicina, pirrolobenzodiazepina (PBD), nemorubicina y sus derivados, PNU-159682, antraciclina, duocarmicina, alcaloides de la vinca, taxano, tricoteceno, CC1065, camptotecina, elinafida y estereoisómeros, isósteros, y derivados de los mismos que tienen actividad citotóxica. Se analizan con mayor detalle a continuación los ejemplos no limitantes de dichos inmunoconjungados.

1. Conjugados de anticuerpo-fármaco de ejemplo

- 65 Una realización de ejemplo de un compuesto de conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) comprende un anticuerpo (Ab) que se dirige a una célula tumoral, un resto farmacológico (D) y un resto enlazador (L) que une Ab a D. En algunas

realizaciones, el anticuerpo se une al resto enlazador (L) mediante uno o más residuos de aminoácidos, tales como lisina y/o cisteína.

Un ADC de ejemplo tiene la Fórmula I:



donde p es de 1 a aproximadamente 20. En algunas realizaciones, el número de restos farmacológicos que se pueden conjugar con un anticuerpo está limitado por el número de residuos de cisteína libre. En algunas realizaciones, los residuos de cisteína libre se introducen en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo con los métodos descritos en el presente documento. El ADC de ejemplo de Fórmula I incluye, pero sin limitación, anticuerpos que tienen 1, 2, 3 o 4 aminoácidos de cisteína genomanipulados (Lyon, R. et al. (2012) Methods in Enzym. 502: 123-138). En algunas realizaciones, uno o más residuos de cisteína libre están ya presentes en un anticuerpo, sin el uso de ingeniería genética, en cuyo caso, los residuos de cisteína libre existentes pueden usarse para conjugar el anticuerpo a un fármaco. En algunas realizaciones, un anticuerpo se expone a condiciones reductoras antes de la conjugación del anticuerpo a fin de generar uno o más residuos de cisteína libre.

a) Enlazadores de ejemplo

20 Un "enlazador" (L) es una porción bifuncional o multifuncional que se puede usar para unir una o más restos farmacológicos (D) a un anticuerpo (Ab) para formar un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) de Fórmula I. En algunas realizaciones, los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) se pueden preparar usando un enlazador que tiene funcionalidades reactivas para unirse covalentemente al fármaco y al anticuerpo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un tiol de cisteína de un anticuerpo (Ab) puede formar un enlace con un grupo funcional reactivo de un enlazador o un intermedio de fármaco-enlazador para formar un ADC.

25

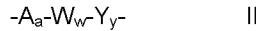
En un aspecto, un enlazador tiene una funcionalidad que es capaz de reaccionar con una cisteína libre presente en un anticuerpo para formar un enlace covalente. Los ejemplos no limitantes de tales funcionalidades reactivas incluyen maleimida, haloacetamidas, α -haloacetilo, ésteres activados, tales como ésteres de succinimida, ésteres de 4-nitrofenilo, ésteres de pentafluorofenilo, ésteres de tetrafluorofenilo, anhídridos, cloruros ácidos, cloruros de sulfonilo, isocianatos e isotiocianatos. Véase, por ejemplo, el método de conjugación en la página 766 de Klussman, et al. (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773, y los Ejemplos del presente documento.

En algunas realizaciones, un enlazador tiene una funcionalidad que es capaz de reaccionar con un grupo electrófilo presente en un anticuerpo. Los ejemplos de tales grupos electrófilos incluyen, pero sin limitación, grupos carbonilo de aldehído y cetona. En algunas realizaciones, un heteroátomo de la funcionalidad reactiva del enlazador puede reaccionar con un grupo electrófilo en un anticuerpo y formar un enlace covalente a una unidad de anticuerpo. Los ejemplos no limitantes de tales funcionalidades reactivas incluyen, pero sin limitación, hidrazida, oxima, amino, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina y arilhidrazida.

Un enlazador puede comprender uno o más componentes enlazadores. Los componentes enlazadores de ejemplo incluyen 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit" o "vc"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobenciloxicarbonilo (un "PAB"), 4-(2-piridiltio)pentanoato de N-succinimidilo ("SPP") y ciclohexano-1 carboxilato de 4-(N-maleimidometilo) ("MCC"). Se conocen diferentes componentes enlazadores en la técnica, algunos de los cuales se describen a continuación.

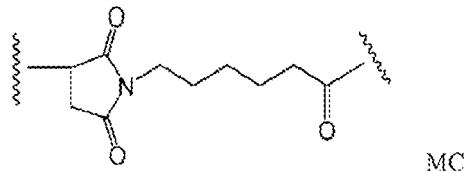
Un enlazador puede ser un "enlazador escindible", que facilita la liberación de un fármaco. Los enlazadores escindibles de ejemplo no limitantes incluyen enlazadores lábiles a ácidos (por ejemplo, que comprenden hidrazona), enlazadores sensibles a proteasas (por ejemplo, sensibles a peptidasas), enlazadores fotolábiles o enlazadores que contienen disulfuro (Chari *et al.*, Cancer Research 52:127-131 (1992); documento US 5208020).

En determinadas realizaciones, un enlazador tiene la siguiente Fórmula II:

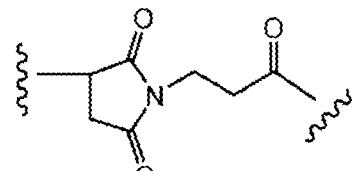


en donde A es una "unidad de extensión" y a es un número entero de 0 a 1; W es una "unidad de aminoácidos" y w es un número entero de 0 a 12; Y es una "unidad espaciadora", e y es 0, 1 o 2; y Ab, D y p se definen como se ha indicado anteriormente para la Fórmula I. Se describen realizaciones de ejemplo de dichos enlazadores en la Patente de EE. UU. N.º 7.498.298.

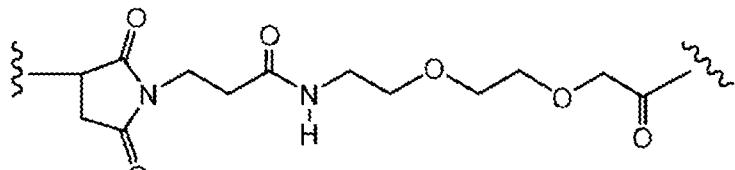
En algunas realizaciones, un componente enlazador comprende una "unidad de extensión" que une un anticuerpo a otro componente enlazador o al resto farmacológico. A continuación se muestran unidades de extensión de ejemplo no limitantes (en donde la línea ondulada indica sitios de unión covalente a un anticuerpo, fármaco o componentes enlazadores adicionales):



MC

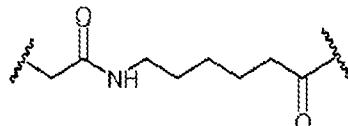


MP



5

mPEG

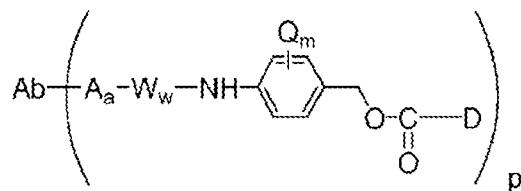


10 En algunas realizaciones, el enlazador puede ser un enlazador peptidomimético tales como los descritos en los documentos WO2015/095227, WO2015/095124 o WO2015/095223.

En algunas realizaciones, un componente enlazador comprende una "unidad de aminoácidos". En algunas de dichas realizaciones, la unidad de aminoácidos permite la escisión del enlazador por una proteasa, facilitando así la liberación del fármaco del inmunonconjunto tras la exposición a proteasas intracelulares, tales como enzimas lisosomales (Doronina *et al.* (2003) *Nat. Biotechnol.* 21:778-784). Las unidades de aminoácidos de ejemplo incluyen, pero sin limitación, dipéptidos, tripéptidos, tetrapéptidos y pentapéptidos. Los dipéptidos de ejemplo incluyen, pero sin limitación, valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe); fenilalanina-lisina (fk o phe-lys); fenilalanina-homolisina (phe-homolys); y N-metil-valina-citrulina (Me-val-cit). Los tripéptidos de ejemplo incluyen, pero sin limitación, glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Una unidad de aminoácidos puede comprender residuos de aminoácidos que se encuentran de forma natural y/o aminoácidos menores y/o análogos de aminoácidos de origen no natural, tales como citrulina. Las unidades de aminoácidos se pueden diseñar y optimizar para la escisión enzimática por una enzima en particular, por ejemplo, una proteasa asociada a tumores, catepsina B, C y D, o una proteasa de plasmina.

25 En algunas realizaciones, un componente enlazador comprende una unidad "espaciadora" que enlaza el anticuerpo a un resto farmacológico, ya sea directamente o mediante una unidad de extensión y/o una unidad de aminoácidos. Una unidad espaciadora puede ser "autoinmolativa" o "no autoinmolativa". Una unidad espaciadora "no autoinmolativa" es aquella en la que parte o la totalidad de la unidad espaciadora permanece unida al resto farmacológico tras la escisión del ADC. Los ejemplos de unidades espaciadoras no autoinmolativas incluyen, pero sin limitación, una unidad espaciadora de glicina y una unidad espaciadora de glicina-glicina. En algunas realizaciones, la escisión enzimática de un ADC que contiene una unidad espaciadora de glicina-glicina por una proteasa asociada a células tumorales da como resultado la liberación de un resto glicina-glicina-fármaco del resto del ADC. En algunas de dichas realizaciones, el resto glicina-glicina-fármaco se somete a una etapa de hidrólisis en la célula tumoral, escindiendo así la unidad espaciadora de glicina-glicina del resto farmacológico.

35 Una unidad espaciadora "autoinmolativa" permite la liberación del resto farmacológico. En determinadas realizaciones, una unidad espaciadora de un enlazador comprende una unidad p-aminobencílico. En algunas de dichas realizaciones, un alcohol p-aminobencílico se une a una unidad de aminoácido a través de un enlace amida y se forma un carbamato, metilcarbamato o carbonato entre el alcohol bencílico y el fármaco (Hamann *et al.* (2005) *Expert Opin. Ther. Patents* 15:1087-1103). En algunas realizaciones, la unidad espaciadora es p-aminobencílico carbonilo (PAB). En algunas realizaciones, un ADC que comprende un enlazador autoinmolativo tiene la estructura:

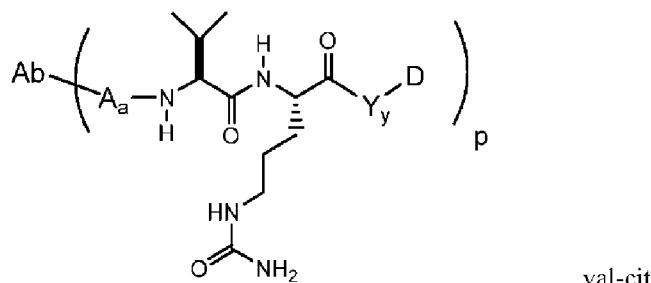


en donde Q es -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero que varía de 0 a 4; y p varía de 1 a aproximadamente 20. En algunas realizaciones, p varía de 1 a 10, de 1 a 7, de 1 a 5 o de 1 a 4.

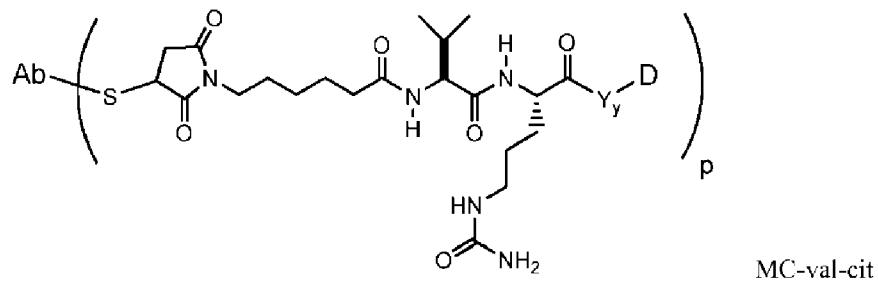
Otros ejemplos de espaciadores autoinmolativos incluyen, pero sin limitación, compuestos aromáticos que son electrónicamente similares al grupo PAB, tales como derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol (Patente de EE. UU. N.º 7.375.078; Hay *et al.* (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237) y *ortho*- o *para*-aminobencilacetales. En algunas realizaciones, se pueden usar espaciadores que experimentan ciclización tras la hidrólisis del enlace amida, tales como amidas de ácido 4-aminobutírico sustituidas y sin sustituir (Rodrigues *et al.* (1995) Chemistry Biology 2:223), sistemas anulares biciclo[2.2.1] y biciclo[2.2.2] apropiadamente sustituidos (Storm *et al.* (1972) J. Amer. Chem. Soc. 94:5815) y amidas de ácido 2-aminofenilpropiónico (Amsberry, *et al.* (1990) J. Org. Chem. 55:5867). La unión de un fármaco al carbono α de un residuo de glicina es otro ejemplo de un espaciador autoinmolativo que puede ser útil en el ADC (Kingsbury *et al.* (1984) J. Med. Chem. 27: 1447).

En algunas realizaciones, el enlazador L puede ser un enlazador de tipo dendrítico para la unión covalente de más de un resto farmacológico a un anticuerpo a través de un resto enlazador multifuncional de ramificación (Sun *et al.* (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sun *et al.* (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768). Los enlazadores dendríticos pueden aumentar la relación molar de fármaco con respecto a anticuerpo, es decir, la carga, que está relacionada con la potencia del ADC. Por lo tanto, donde un anticuerpo lleva únicamente un grupo tiol de cisteína reactivo, gran cantidad de restos farmacológicos pueden unirse mediante un enlazador dendrítico.

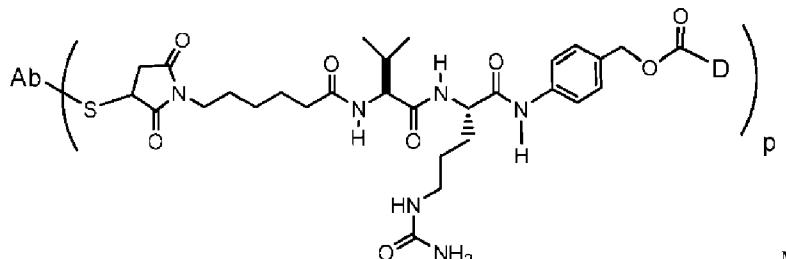
Los enlazadores de ejemplo no limitantes se muestran a continuación en el contexto de un ADC de Fórmula I:



25



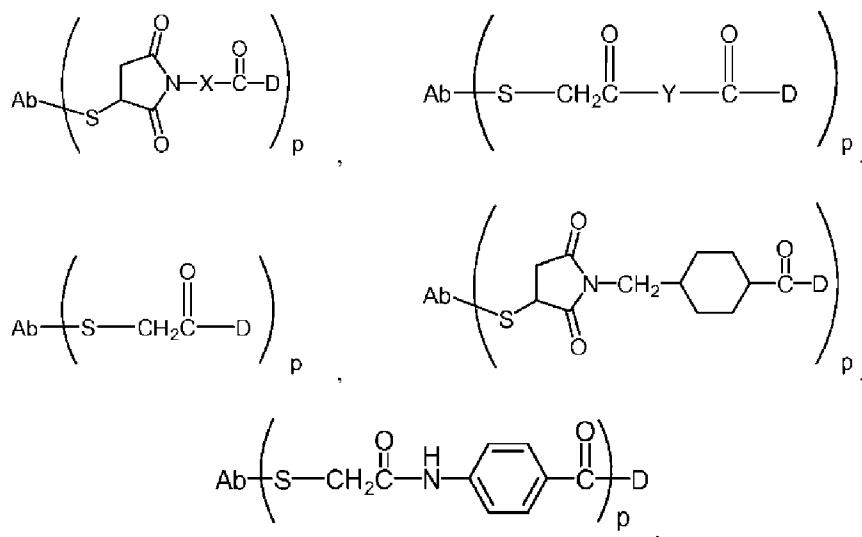
MC-val-cit



MC-val-cit-PAB

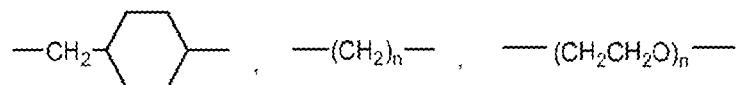
30

Otros ADC de ejemplo no limitantes incluyen las estructuras:

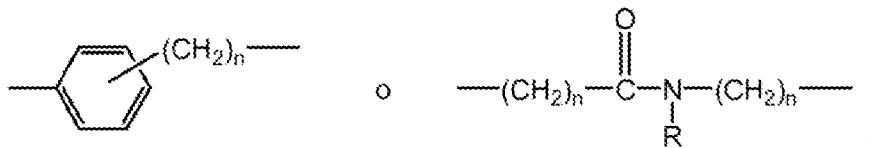
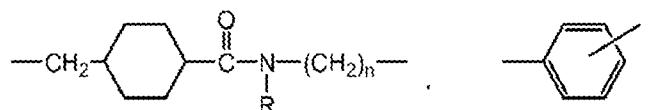


5

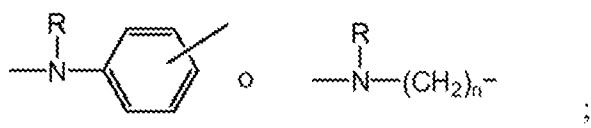
donde X es:



10



15 Y es:



20

cada R es independientemente H o alquilo C₁-C₆; y n es de 1 a 12.

Típicamente, los enlazadores de tipo péptido se pueden preparar formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos peptídicos. Tales enlaces peptídicos se pueden preparar, por ejemplo, de acuerdo con un método de síntesis en fase líquida (por ejemplo, E. Schröder y K. Lübke (1965) "The Peptides", volumen 1, págs. 76-136, Academic Press).

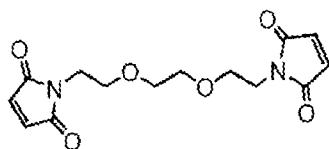
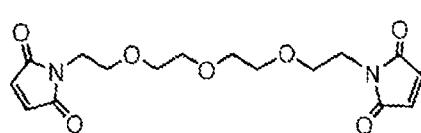
25

En algunas realizaciones, un enlazador está sustituido con grupos que modulan la solubilidad y/o la reactividad. Como ejemplo no limitante, un sustituyente cargado tal como sulfonato (-SO₃⁻) o amonio puede aumentar la solubilidad en agua del reactivo enlazador y facilitar la reacción de acoplamiento del reactivo enlazador con el anticuerpo y/o el resto farmacológico, o facilitar la reacción de acoplamiento de Ab-L (intermedio de anticuerpo-enlazador) con D o D-L (intermedio de fármaco-enlazador) con Ab, dependiendo de la vía de síntesis empleada para preparar el ADC. En algunas realizaciones, una porción del enlazador se acopla al anticuerpo y una porción del enlazador se acopla al fármaco y, a continuación, el Ab-(porción de enlazador)^a se acopla al fármaco-(porción de enlazador)^b para formar el ADC de Fórmula I. En algunas de dichas realizaciones, el anticuerpo comprende más de un sustituyente (porción de enlazador)^a, de manera que más de un fármaco se acople al anticuerpo en el ADC de Fórmula I.

35

Los compuestos de la invención contemplan expresamente, pero sin limitación, ADC preparado con los siguientes reactivos enlazadores: bis-maleimido-trioxietenglicol (BMPEO), N-(β-maleimidopropiloxi)-N-hidroxisuccinimida éster (BMPS), N-(ε-maleimidocaproiloxi)succinimida éster (EMCS), N-[γ-maleimidobutiriloxi]succinimida éster (GMBS), 1,6-

hexano-bis-vinilsulfona (HBVS), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxi-(6-amidocaproato) de succinimidilo (LC-SMCC), m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida éster (MBS), hidrazida del ácido 4-(4-N-maleimidofenil)butírico (MPBH), 3-(bromoacetamido)propionato de succinimidilo (SBAP), yodoacetato de succinimidilo (SIA), (4-yodoacetil)aminobenzoato de succinimidilo (SLAB), Nsuccinimidil-3-(2-piridildito) propionato (SPDP), 4-(2-piridiltio)pentanoato de N-succinimidilo (SPP), 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), 4-(p-maleimidofenil)butirato de succinimidilo (SMPB), 6-[β -maleimidopropionamido]hexanoato de succinimidilo (SMPH), iminotiolano (IT), sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPBv y succinimidil-(4-vinylsulfone)benzoato (SVSB) e incluyendo reactivos de bis-maleimida: dietobiomaleimidoetano (DTME), 1,4-bismaleimidobutano (BMB), 1,4 bismaleimidil-2,3-dihidroxibutano (BMDB), bismaleimidohexano (BMH), bismaleimidoetano (BMOE), BM(PEG)₂ (mostrado a continuación) y BM(PEG)₃ (mostrado a continuación); derivados bifuncionales de imidioésteres (tales como adipimidato HCl de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis-(p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). En algunas realizaciones, los reactivos de bis-maleimida permiten la unión del grupo tiol de una cisteína en el anticuerpo a un resto farmacológico que contiene tiol, a un enlazador o a un intermedio de enlazador-fármaco. Otros grupos funcionales que son reactivos con grupos tiol incluyen, pero sin limitación, yodoacetamida, bromoacetamida, vinil piridina, disulfuro, disulfuro de piridilo, isocianato e isotiocianato.

20 BM(PEG)₂BM(PEG)₃

Se pueden obtener determinados reactivos enlazadores útiles a partir de diversas fuentes comerciales, tales como Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL), Molecular Biosciences Inc. (Boulder, CO), o sintetizarse de acuerdo con los procedimientos descritos en la técnica; por ejemplo, en Toki *et al.* (2002) J. Org. Chem. 67:1866-1872; Dubowchik, *et al.* (1997) Tetrahedron Letters, 38:5257-60; Walker, M.A. (1995) J. Org. Chem. 60:5352-5355; Frisch *et al.* (1996) Bioconjugate Chem. 7:180-186; los documentos US 6214345; WO 02/088172; US 2003130189; US2003096743; WO 03/026577; WO 03/043583; y WO 04/032828.

El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminopentaacético marcado con carbono-14 (MX-DTPA) es un agente quelante de ejemplo para la conjugación del radionucleótido con el anticuerpo. Véase, por ejemplo, el documento WO94/11026.

b) Restos farmacológicos de ejemplo

35 (1) *Maitansina y maitansinoides*

En algunas realizaciones, un inmunoconjunto comprende un anticuerpo conjugado con una o más moléculas de maitansinoide. Los maitansinoides son derivados de la maitansina y son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto del este de África *Maytenus serrata* (Patente de EE. UU. N.º 3896111). Posteriormente, se descubrió que determinados microbios también producen maitansinoides, tal como maitansinol y ésteres de maitansinol C-3 (Patente de EE. UU. N.º 4.151.042). Se divulgan maitansinoides sintéticos, por ejemplo, en las Patentes de EE. UU. N.º 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; y 4.371.533.

45 Los restos farmacológicos maitansinoides son restos farmacológicos atractivos en los conjugados de anticuerpo-fármaco ya que son: (i) relativamente fáciles de preparar por fermentación o modificación o derivatización química de los productos de fermentación, (ii) susceptibles a la derivatización con grupos funcionales adecuados para la conjugación a través de enlaces diferentes de disulfuro a los anticuerpos, (iii) estables en plasma y (iv) eficaces contra diversas líneas celulares tumorales.

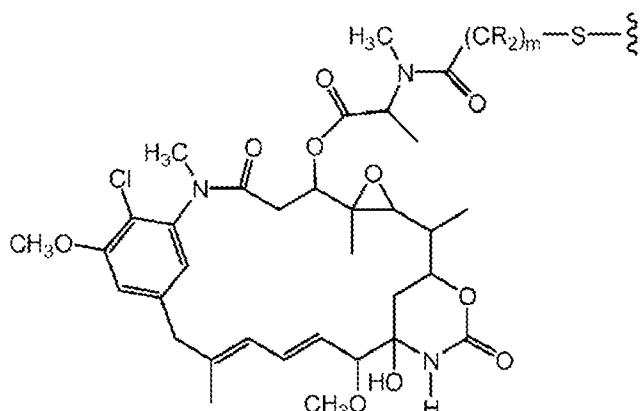
55 Determinados maitansinoides adecuados para su uso como restos farmacológicos maitansinoides son conocidos en la técnica y pueden aislarse de fuentes naturales de acuerdo con métodos conocidos o producirse usando técnicas de ingeniería genética (véase, por ejemplo, Yu *et al.* (2002) PNAS 99:7968-7973). Los maitansinoides también se pueden preparar sintéticamente de acuerdo con métodos conocidos.

Los restos farmacológicos maitansinoides de ejemplo incluyen, pero sin limitación, los que tienen un anillo aromático modificado, tales como: C-19-decloro (Pat. de EE. UU. N.º 4256746) (preparado, por ejemplo, por reducción con hidruro de litio y aluminio de ansamiticina P2); C-20-hidroxi (o C-20-desmetil) +/-C-19-decloro (Pat. de EE. UU.

N.º 4361650 y 4307016) (preparado, por ejemplo, por desmetilación usando *Streptomyces* o *Actinomyces* o descloración usando LAH); y C-20-desmetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/-decloro (Pat. de EE. UU. N.º 4.294.757) (preparado, por ejemplo, por acilación usando cloruros de acilo), y los que tienen modificaciones en otras posiciones del anillo aromático.

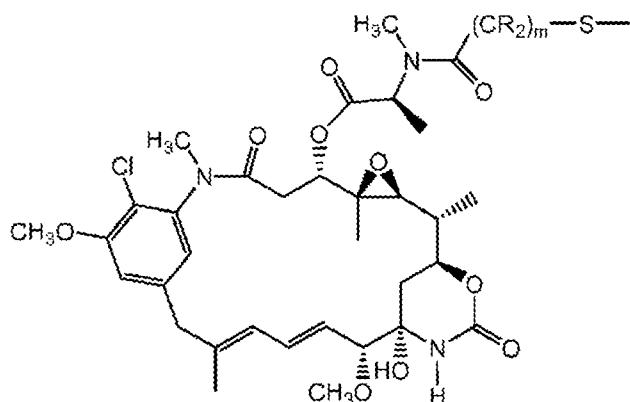
- 5 Los restos farmacogénicos maitansinoides de ejemplo también incluyen los que tienen modificaciones tales como: C-9-SH (Pat. de EE. UU. N.º 4424219) (preparado, por ejemplo, por la reacción de maitansinol con H₂S o P₂S₅); C-14-alcoximetil(desmetoxi/CH₂OR) (documento US 4331598); C-14-hidroximetilo o aciloximetilo (CH₂OH o CH₂OAc) (Pat. de EE. UU. N.º 4450254) (preparado, por ejemplo, a partir de *Nocardia*); C-15-hidroxi/aciloxi (documento US 4364866) (preparado, por ejemplo, por la conversión de maitansinol por *Streptomyces*); C-15-metoxi (Pat. de EE. UU. N.º 4313946 y 4315929) (por ejemplo, aislado de *Trewia nudiflora*); C-18-N-desmetilo (Pat. de EE. UU. N.º 4362663 y 4322348) (preparado, por ejemplo, por la desmetilación de maitansinol por *Streptomyces*); y 4,5-desoxi (documento US 4371533) (preparado, por ejemplo, por la reducción de tricloruro de titanio/LAH de maitansinol).
- 10 15 Muchas posiciones de los compuestos maitansinoides son útiles como posición de enlace. Por ejemplo, se puede formar un enlace éster por reacción con un grupo hidroxilo usando técnicas de acoplamiento convencionales. En algunas realizaciones, la reacción puede tener lugar en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En algunas realizaciones, el enlazador se forma en la posición C-3 del maitansinol o un análogo de maitansinol.
- 20

Los restos farmacológicos maitansinoides incluyen los que tienen la estructura:



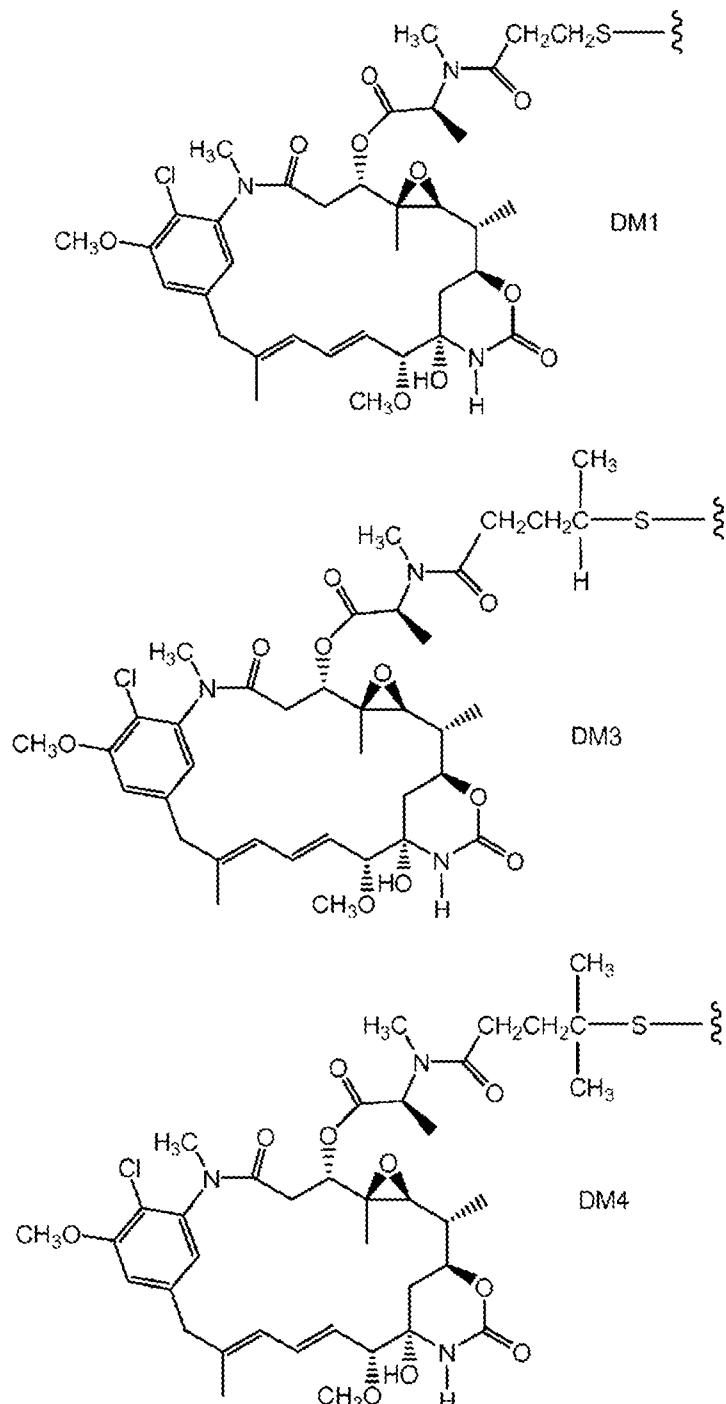
- 25 donde la línea ondulada indica la unión covalente del átomo de azufre del resto farmacológico maitansinoide a un enlazador de un ADC. Cada R puede ser independientemente H o un alquilo C₁-C₆. La cadena de alquíleno que une el grupo amida al átomo de azufre puede ser metanilo, etanilo o propilo, es decir, m es 1, 2 o 3 (documentos US 633410; US 5208020; Chari *et al.* (1992) Cancer Res. 52:127-131; Liu *et al.* (1996) Proc. Natl. Acad. Sci USA 93:8618-8623).
- 30

Todos los estereoisómeros del resto farmacológico maitansinoide se contemplan para el ADC de la invención, es decir, cualquier combinación de las configuraciones R y S en los carbonos quirales (documentos US 7276497; US 6913748; US 6441163; US 633410 (RE39151); US 5208020; Widdison *et al.* (2006) J. Med. Chem. 49:4392-4408). En algunas 35 realizaciones, el resto farmacológico maitansinoide tiene la siguiente estereoquímica:



Las realizaciones de ejemplo de restos farmacológicos maitansinoides incluyen, pero sin limitación, DM1; DM3; y DM4,

que tienen las estructuras:

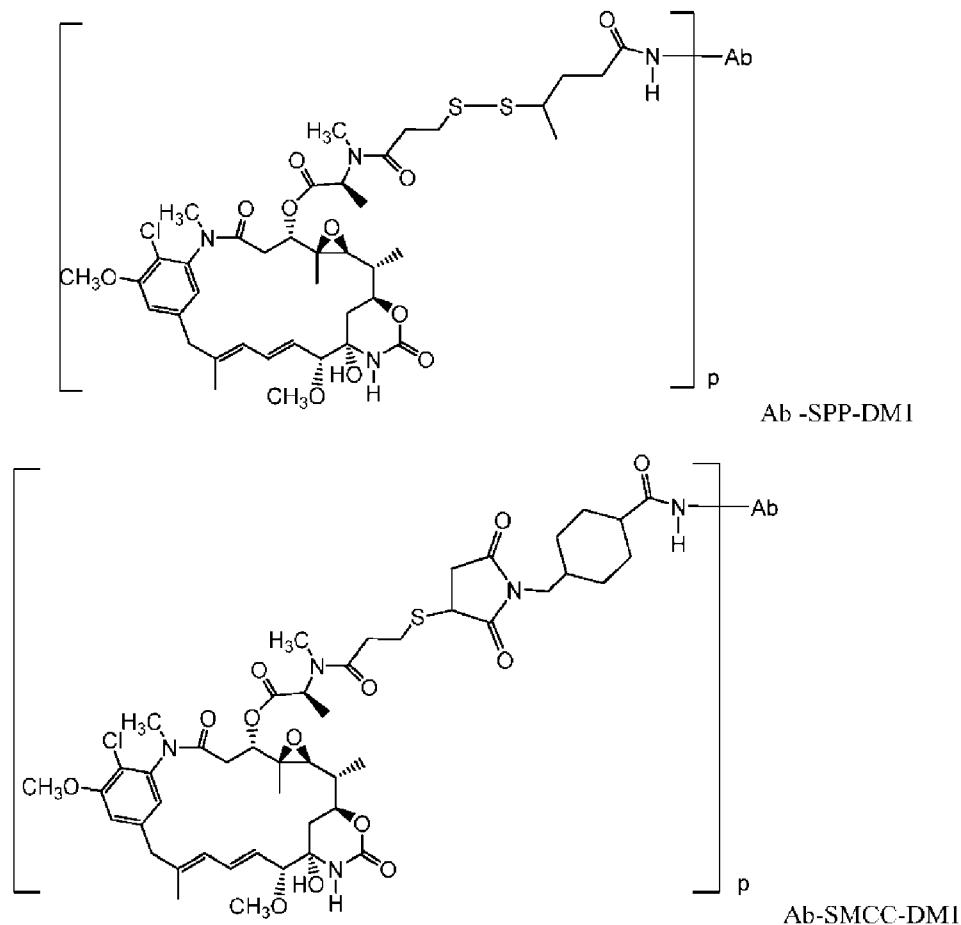


5

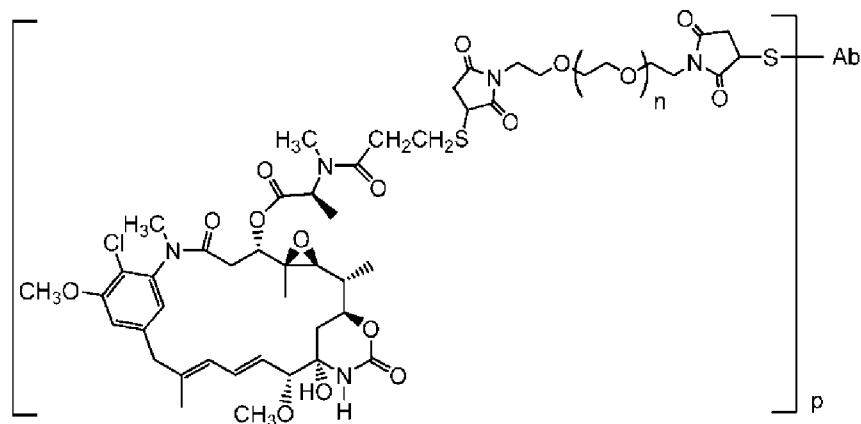
en donde la línea ondulada indica la unión covalente del átomo de azufre del fármaco a un enlazador (L) de un conjugado de anticuerpo-fármaco.

Otros conjugados de anticuerpo-fármaco maitansinoides de ejemplo tienen las siguientes estructuras y abreviaturas (en donde Ab es anticuerpo y p es de 1 a aproximadamente 20. En algunas realizaciones, p es de 1 a 10, p es de 1 a 7, p es de 1 a 5 o p es de 1 a 4):

15



- 5 Los ejemplos de conjugados de anticuerpo-fármaco donde DM1 se une a través de un enlazador de BMPEO a un grupo tiol del anticuerpo tienen la estructura y abreviatura:



- 10 donde Ab es anticuerpo; n es 0, 1 o 2; y p es de 1 a aproximadamente 20. En algunas realizaciones, p es de 1 a 10, p es de 1 a 7, p es de 1 a 5 o p es de 1 a 4.

Los inmunoconjugados que contienen maitansinoides, métodos para prepararlos y su uso terapéutico se divultan, por ejemplo, en las Patentes de EE. UU. N.º 5.208.020 y 5.416.064; el documento US 2005/0276812 A1; y la Patente Europea EP 0 425 235 B1. Véanse también Liu *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996); y Chari *et al.* Cancer Research 52:127-131 (1992).

- En algunas realizaciones, los conjugados de anticuerpo-maitansinoide pueden prepararse uniendo químicamente un anticuerpo a una molécula de maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica del anticuerpo o de la molécula de maitansinoide. Véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. N.º 5.208.020. En algunas realizaciones, el ADC con un promedio de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo ha mostrado eficacia

para aumentar la citotoxicidad de las células diana sin afectar negativamente a la función o solubilidad del anticuerpo. En algunos casos, se espera que incluso una molécula de toxina/anticuerpo mejore la citotoxicidad con respecto al uso de anticuerpo no marcado.

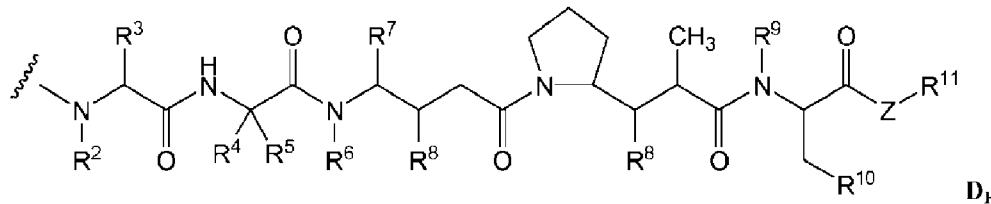
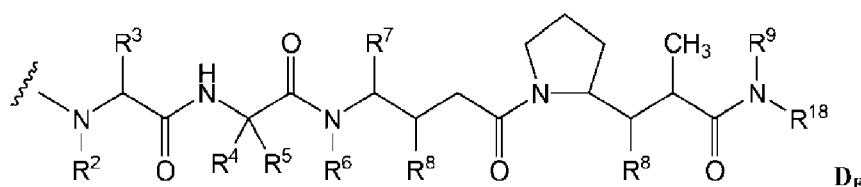
5 Los grupos de unión de ejemplo para preparar conjugados de anticuerpo-maitansinoide incluyen, por ejemplo, los descritos en el presente documento y los divulgados en la Patente de EE. UU. N.º 5208020; la Patente EP 0 425 235 B1; Chari *et al.* Cancer Research 52:127-131 (1992); el documento US 2005/0276812 A1; y el documento US 2005/016993 A1.

10 (2) *Auristatinas y dolastatinas*

Los restos farmacológicos incluyen dolastatinas, auristatinas y análogos y derivados de las mismas (documentos US 5635483; US 5780588; US 5767237; US 6124431). Las auristatinas son derivados del compuesto de molusco marino dolastatina-10. Sin pretender quedar ligado a ninguna teoría en particular, se ha demostrado que las dolastatinas y las auristatinas interfieren con la dinámica de los microtúbulos, la hidrólisis de GTP y la división nuclear y celular (Woyke *et al.* (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584) y tienen actividad antineoplásica (documento US 5663149) y actividad antifúngica (Pettit *et al.* (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). El resto farmacológico de dolastatina/auristatina puede unirse al anticuerpo a través del extremo N (amino) o del extremo C (carboxilo) del resto farmacológico peptídico (documento WO 02/088172; Doronina *et al.* (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784; Francisco *et al.* (2003) Blood 102(4):1458-1465).

Las realizaciones de auristatina de ejemplo incluyen los restos farmacológicos de monometilaristatina unidos al extremo N D_E y D_F, divulgados en los documentos US 7498298 y US 765924:

25



en donde la línea ondulada de D_E y D_F indica el sitio de unión covalente a un anticuerpo o componente de anticuerpo-enlazador, e independientemente en cada ubicación:

30 R² se selecciona de H y alquilo C₁-C₈;

R³ se selecciona de H, alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, alquil C₁-C₈-arilo, alquil C₁-C₈-(carbociclo C₃-C₈), heterociclo C₃-C₈ y alquil C₁-C₈-(heterociclo C₃-C₈);

35 R⁴ se selecciona de H, alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, alquil C₁-C₈-arilo, alquil C₁-C₈-(carbociclo C₃-C₈), heterociclo C₃-C₈ y alquil C₁-C₈-(heterociclo C₃-C₈);

R⁵ se selecciona de H y metilo;

o R⁴ y R⁵ forman conjuntamente un anillo carbocíclico y tienen la fórmula -(CR^aR^b)_n-, en donde R^a y R^b se seleccionan independientemente de H, alquilo C₁-C₈ y carbociclo C₃-C₈ y n se selecciona de 2, 3, 4, 5 y 6;

40 R⁶ se selecciona de H y alquilo C₁-C₈;

R⁷ se selecciona de H, alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, alquil C₁-C₈-arilo, alquil C₁-C₈-(carbociclo C₃-C₈), heterociclo C₃-C₈ y alquil C₁-C₈-(heterociclo C₃-C₈);

cada R⁸ se selecciona independientemente de H, OH, alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈ y -O-(alquilo C₁-C₈);

R⁹ se selecciona de H y alquilo C₁-C₈;

R¹⁰ se selecciona de arilo o heterociclo C₃-C₈;

Z es O, S, NH o NR¹², en donde R¹² es alquilo C₁-C₈;

R¹¹ se selecciona de H, alquilo C₁-C₂₀, arilo, heterociclo C₃-C₈, -(R¹³O)_m-R¹⁴ o -(R¹³O)_m-CH(R¹⁵)₂;

m es un número entero que varía entre 1-1000;

R¹³ es alquilo C₂-C₈;

R¹⁴ es H o alquilo (C₁-C₈);

cada aparición de R¹⁵ es independientemente H, COOH, -(CH₂)_n-N(R¹⁶)₂, -(CH₂)_n-SO₃H o -(CH₂)_n-SO₃-alquilo C₁-C₈;

cada aparición de R¹⁶ es independientemente H, alquilo C₁-C₈ o -(CH₂)_n-COOH;

R¹⁸ se selecciona de -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-arilo, -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-(heterociclo C₃-C₈) y -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-(carbociclo C₃-C₈); y

n es un número entero que varía de 0 a 6.

En una realización, R³, R⁴ y R⁷ son independientemente isopropilo o sec-butilo y R⁵ es -H o metilo. En una realización de ejemplo, R³ y R⁴ son cada uno isopropilo, R⁵ es -H, y R⁷ es sec-butilo.

- 5 En otra realización más, R² y R⁶ son cada uno metilo, y R⁹ es -H.
- Aún en otra realización, cada aparición de R⁸ es -OCR₃.

- 10 En una realización de ejemplo, R³ y R⁴ son cada uno isopropilo, R² y R⁶ son cada uno metilo, R⁵ es -H, R⁷ es sec-butilo, cada aparición de R⁸ es -OCH₃, y R⁹ es -H.

En una realización, Z es -O- o -NH-.

- 15 En una realización, R¹⁰ es arilo.

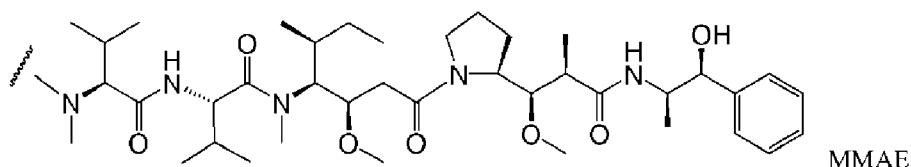
En una realización de ejemplo, R¹⁰ es fenilo.

En una realización de ejemplo, cuando Z es -O-, R¹¹ es -H, metilo o t-butilo.

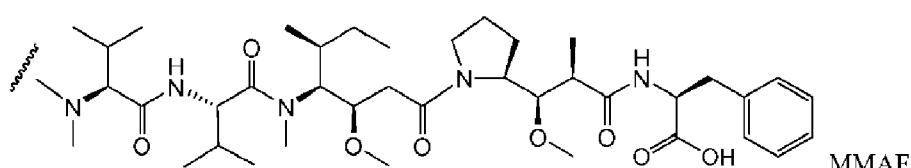
- 20 En una realización, cuando Z es -NH, R¹¹ es -CH(R¹⁵)₂, en donde R¹⁵ es -(CH₂)_n-N(R¹⁶)₂, y R¹⁶ es -alquilo C₁-C₈ o -(CH₂)_n-COOH.

En otra realización, cuando Z es -NH, R¹¹ es -CH(R¹⁵)₂, en donde R¹⁵ es -(CH₂)_n-SO₃H.

- 25 Una realización de auristatina de ejemplo de Fórmula D_E es MMAE, en donde la línea ondulada indica la unión covalente a un enlazador (L) de un conjugado de anticuerpo-fármaco:

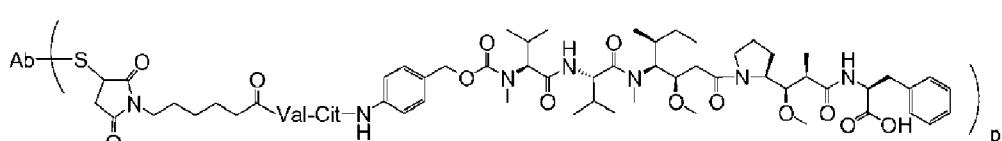


- 30 Una realización de auristatina de ejemplo de Fórmula DF es MMAF, en donde la línea ondulada indica la unión covalente a un enlazador (L) de un conjugado de anticuerpo-fármaco:

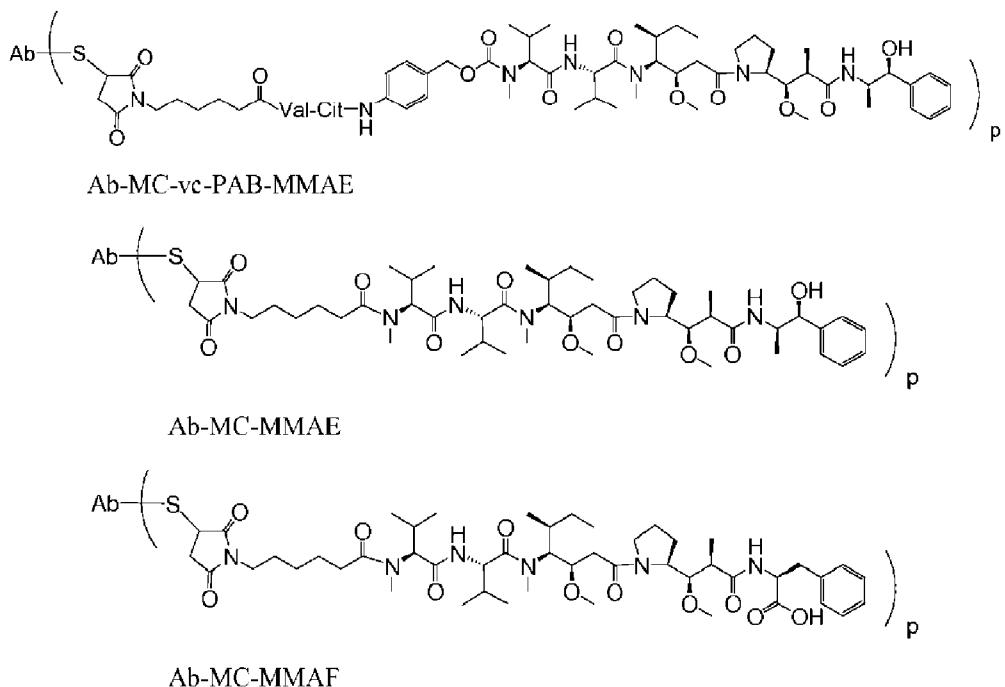


- 35 Otras realizaciones de ejemplo incluyen compuestos de monometilvalina que tienen modificaciones de carboxi de fenilalanina en el extremo C del resto farmacológico de auristatina pentapeptídica (documento WO 2007/008848) y compuestos de monometilvalina que tienen modificaciones de cadena lateral de fenilalanina en el extremo C del resto farmacológico de auristatina pentapeptídica (documento WO 2007/008603).

- 40 Las realizaciones de ejemplo no limitantes de ADC de Fórmula I que comprenden MMAE o MMAF y diversos componentes enlazadores tienen las siguientes estructuras y abreviaturas (en donde "Ab" es un anticuerpo; p es de 1 a aproximadamente 8, "Val-Cit" es un dipéptido de valina-citrulina; y "S" es un átomo de azufre):



45 Ab-MC-vc-PAB-MMAF



5

Las realizaciones de ejemplo no limitantes de ADC de Fórmula I que comprenden MMAF y diversos componentes enlazadores incluyen además Ab-MC-PAB-MMAF y Ab-PAB-MMAF. Se ha demostrado que los inmunoconjugados que comprenden MMAF unido a un anticuerpo mediante un enlazador que no es proteolíticamente escindible poseen una actividad comparable a la de los inmunoconjugados que comprenden MMAF unido a un anticuerpo mediante un enlazador proteolíticamente escindible (Doronina *et al.* (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124). En algunas de dichas realizaciones, se cree que la liberación del fármaco se efectúa mediante la degradación del anticuerpo en la célula.

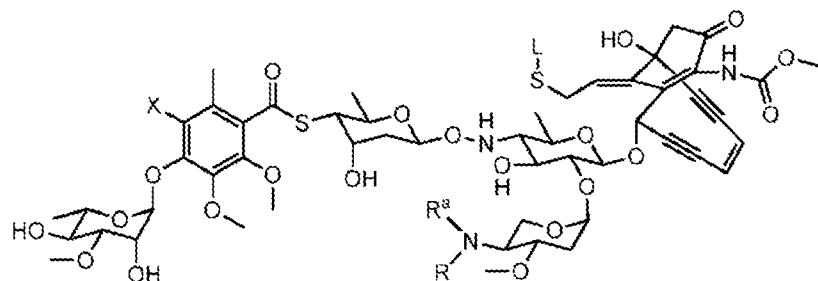
Típicamente, los restos farmacológicos a base de péptidos se pueden preparar formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos peptídicos. Tales enlaces peptídicos se pueden preparar, por ejemplo, de acuerdo un método de síntesis en fase líquida (véase, por ejemplo, E. Schröder y K. Lübke, "The Peptides", volumen 1, págs. 76-136, 1965, Academic Press). Los restos farmacológicos de auristatina/dolastatina pueden prepararse, en algunas realizaciones, de acuerdo con los métodos de: Los documentos US 7498298; US 5635483; US 5780588; Pettit *et al.* (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:5463-5465; Pettit *et al.* (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13:243-277; Pettit, G.R., *et al.* *Synthesis*, 1996, 719-725; Pettit *et al.* (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 5:859-863; y Doronina (2003) *Nat. Biotechnol.* 21(7):778-784.

En algunas realizaciones, los restos farmacológicos de auristatina/dolastatina de las Fórmulas D_E, tal como MMAE, y D_F, tal como MMAF, e intermedios de fármaco-enlazador y derivados de los mismos, tales como MC-MMAF, MC-MMAE, MC-vc-PAB-MMAF y MC-vc-PAB-MMAE, pueden prepararse usando los métodos descritos en el documento US 7498298; Doronina *et al.* (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124; y Doronina *et al.* (2003) *Nat. Biotech.* 21:778-784 y a continuación conjugándolos con un anticuerpo de interés.

(3) Calicheamicina

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo conjugado con una o más moléculas de calicheamicina. La familia de antibióticos calicheamicina y análogos de los mismos, son capaces de producir roturas de ADN biciatenario a concentraciones subpicomolares (Hinman *et al.*, (1993) *Cancer Research* 53:3336-3342; Lode *et al.*, (1998) *Cancer Research* 58:2925-2928). La calicheamicina tiene sitios de acción intracelulares pero, en determinados ejemplos, no cruza fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes a través de la internalización mediada por anticuerpos puede, en algunas realizaciones, mejorar en gran medida sus efectos citotóxicos. Se describen métodos de preparación de ejemplo no limitantes de conjugados de anticuerpo-fármaco con un resto farmacológico de calicheamicina, por ejemplo, en los documentos US 5712374; US 5714586; US 5739116; y US 5767285.

En algunas realizaciones, el resto farmacológico de calicheamicina conjugado con el anticuerpo es un compuesto que tiene la Fórmula:



en donde X es Br o I; L es un enlazador; R es hidrógeno, alquilo C₁₋₆ o -C(=O)alquilo C₁₋₆; y R^a es hidrógeno o alquilo C₁₋₆.

- 5 En algunas realizaciones, X es Br, R^a es hidrógeno y R es isopropilo.

En otras realizaciones, X es Br, R^a es hidrógeno y R es etilo.

- 10 En otras realizaciones, X es I, R^a es hidrógeno y R es isopropilo.

En otras realizaciones, X es I, R^a es hidrógeno y R es etilo.

En algunas realizaciones, X es Br, R^a es hidrógeno y R es -C(=O)CH₃.

- 15 En otras realizaciones, X es I, R^a es hidrógeno y R es -C(=O)CH₃.

En otras realizaciones, X es I, R^a es etilo y R es -C(=O)CH₃.

- 20 En otras realizaciones, X es Br, R^a es etilo y R es -C(=O)CH₃.

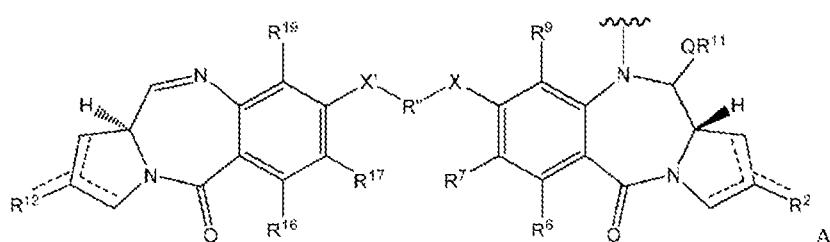
(4) Pirrolobenzodiazepinas

- 25 En algunas realizaciones, un ADC comprende una pirrolobenzodiazepina (PBD). En algunas realizaciones, los dímeros de PDB reconocen y se unen a secuencias de ADN específicas. El producto natural antramicina, una PBD, se notificó por primera vez en 1965 (Leimgruber, *et al.*, (1965) J. Am. Chem. Soc., 87:5793-5795; Leimgruber, *et al.*, (1965) J. Am. Chem. Soc., 87:5791-5793). Desde entonces, se han notificado varias PBD, tanto de origen natural como análogas (Thurston, *et al.*, (1994) Chem. Rev. 1994, 433-465 incluyendo dímeros del armazón de PBD tricíclico (documentos US 6884799; US 7049311; US 7067511; US 7265105; US 7511032; US 7528126; US 7557099). Sin pretender quedar ligados a ninguna teoría particular alguna, se cree que la estructura del dímero imparte la forma tridimensional apropiada para la isohelicidad con el surco menor del ADN en forma B, lo que conduce a un ajuste perfecto en el sitio de unión (Kohn, In Antibiotics III. Springer-Verlag, Nueva York, págs. 3-11 (1975); Hurley y Needham-VanDevanter, (1986) Acc. Chem. Res., 19:230-237). Se ha demostrado que los compuestos de PBD diméricos que llevan sustituyentes arilo C2 son útiles como agentes citotóxicos (Hartley *et al.* (2010) Cancer Res. 70(17):6849-6858; Antonow (2010) J. Med. Chem. 53(7):2927-2941; Howard *et al.* (2009) Bioorganic and Med. Chem. Letters 19(22):6463-6466).

- 40 En algunas realizaciones, los compuestos de PBD se pueden emplear como profármacos protegiéndolos en la posición N10 con un grupo protector de nitrógeno que se puede eliminar *in vivo* (documentos WO 00/12507; WO 2005/023814).

- 45 Los dímeros de PBD se han conjugado con anticuerpos y se ha demostrado que el ADC resultante tiene propiedades antineoplásicas (documento US 2010/0203007). Los sitios de enlace de ejemplo no limitantes en el dímero de PBD incluyen el anillo de pirrolo de cinco miembros, la unión entre las unidades de PBD y el grupo imina N10-C11 (documentos WO 2009/016516; US 2009/304710; US 2010/047257; US 2009/036431; US 2011/0256157; WO 2011/130598).

Los componentes diméricos de PBD de ejemplo no limitantes de los ADC son de Fórmula A:



y sales y solvatos de los mismos, en donde:

- la línea ondulada indica el sitio de unión covalente al enlazador;
la línea discontinua indica la presencia opcional de un doble enlace entre C1 y C2 o C2 y C3;
R² se selecciona independientemente de H, OH, =O, =CH₂, CN, R, OR, =CH-R^D, =C(R^D)₂, O-SO₂-R, CO₂R y COR, y opcionalmente además seleccionados de halo o dihalo, en donde R^D se selecciona independientemente de R, CO₂R, COR, CHO, CO₂H y halo;
R⁶ y R⁹ se seleccionan independientemente de H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR', NO₂, Me₃Sn y halo;
R⁷ se selecciona independientemente de H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR', NO₂, Me₃Sn y halo;
Q se selecciona independientemente de O, S y NH;
R¹¹ es H o R o, donde Q es O, SO₃M, donde M es un catión metálico;
R y R' se seleccionan cada uno independientemente de grupos alquilo C₁₋₈, alquilo C₁₋₁₂, heterociclo C₃₋₈, heterociclo C₃₋₂₀ y arilo C₅₋₂₀ opcionalmente sustituidos y, opcionalmente, en relación con el grupo NRR', R y R' junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo heterocíclico de 4, 5, 6 o 7 miembros opcionalmente sustituido;
R¹², R¹⁶, R¹⁹ y R¹⁷ son como se define para R², R⁶, R⁹ y R⁷, respectivamente;
R'' es un grupo alquíleno C₃₋₁₂, cuya cadena puede estar interrumpida por uno o más heteroátomos, por ejemplo, O, S, N(H), NMe y/o anillos aromáticos, por ejemplo, benceno o piridina, cuyos anillos están opcionalmente sustituidos; y
X y X' se seleccionan independientemente de O, S y N(H).

En algunas realizaciones, R y R' se seleccionan cada uno independientemente de grupos alquilo C₁₋₁₂, heterociclo C₃₋₂₀ y arilo C₅₋₂₀ opcionalmente sustituidos y, opcionalmente, en relación con el grupo NRR', R y R' junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo heterocíclico de 4, 5, 6 o 7 miembros opcionalmente sustituido.

En algunas realizaciones, R⁹ y R¹⁹ son H.

En algunas realizaciones, R⁶ y R¹⁶ son H.

En algunas realizaciones, R⁷ y R¹⁷ son ambos OR^{7A}, en donde R^{7A} es alquilo C₁₋₄ opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R^{7A} es Me. En algunas realizaciones, R^{7A} es Ch₂Ph, donde Ph es un grupo fenilo.

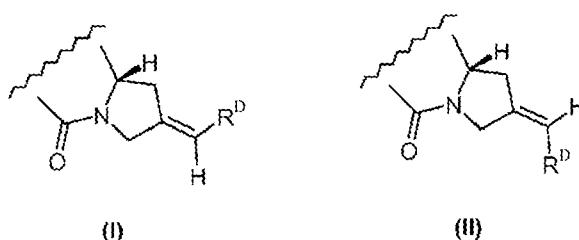
En algunas realizaciones, X es O.

En algunas realizaciones, R¹¹ es H.

En algunas realizaciones, hay un doble enlace entre C2 y C3 en cada unidad monomérica.

En algunas realizaciones, R² y R¹² se seleccionan independientemente de H y R. En algunas realizaciones, R² y R¹² son independientemente R. En algunas realizaciones, R² y R¹² son independientemente arilo C₅₋₂₀ o arilo C₅₋₇ o arilo C₈₋₁₀ opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R² y R¹² son independientemente fenilo, tienilo, naftilo, piridilo, quinolinilo o isoquinolinilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R² y R¹² se seleccionan independientemente de =O, =CH₂, =CH-R^D y =C(R^D)₂. En algunas realizaciones, R² y R¹² son cada uno =CH₂. En algunas realizaciones, R² y R¹² son cada uno H. En algunas realizaciones, R² y R¹² son cada uno =O. En algunas realizaciones, R² y R¹² son cada uno =CF₂. En algunas realizaciones, R² y/o R¹² son independientemente =C(R^D)₂. En algunas realizaciones, R² y/o R¹² son independientemente =CH-R^D.

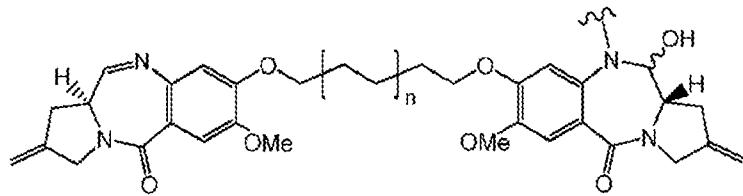
En algunas realizaciones, cuando R² y/o R¹² es =CH-R^D, cada grupo puede tener independientemente cualquiera de las configuraciones que se muestran a continuación:



En algunas realizaciones, un $=CH-R^D$ está en la configuración (I).

- ⁵⁵ See also the discussion of the relationship between the two in the previous section.

En algunas realizaciones, un componente dinámico de PBD de ejemplo de un ABC tiene la estructura de Fórmula A(1):

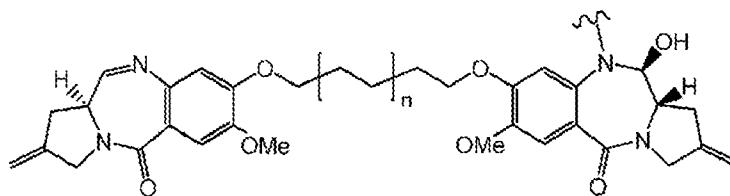


A(I);

en donde n es 0 o 1.

5

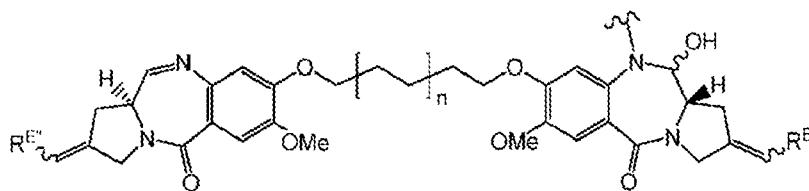
En algunas realizaciones, un componente dimérico de PBD de ejemplo de un ADC tiene la estructura de Fórmula A(II):



A(II);

10 en donde n es 0 o 1.

En algunas realizaciones, un componente dimérico de PBD de ejemplo de un ADC tiene la estructura de Fórmula A(III):



A(III);

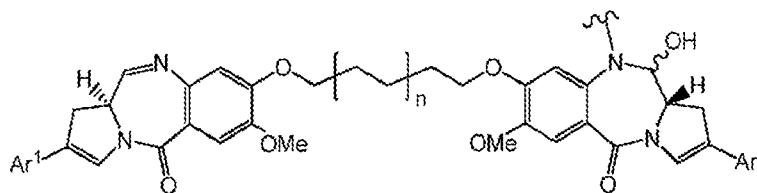
15 en donde R^E y R^{E'} se seleccionan cada uno independientemente de H o R^D, en donde R^D es como se ha definido anteriormente; y

en donde n es 0 o 1.

20

En algunas realizaciones, n es 0. En algunas realizaciones, n es 1. En algunas realizaciones, R^E y/o R^{E'} es H. En algunas realizaciones, R^E y R^{E'} son H. En algunas realizaciones, R^E y/o R^{E'} es R^D, en donde R^D es alquilo C₁₋₁₂ opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R^E y/o R^{E'} es R^D, en donde R^D es metilo.

25 30 En algunas realizaciones, un componente dimérico de PBD de ejemplo de un ADC tiene la estructura de Fórmula A(IV):

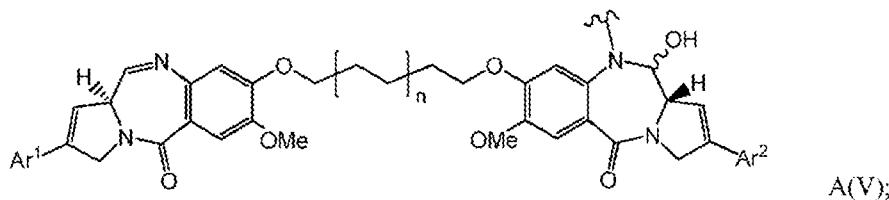


A(IV);

en donde Ar¹ y Ar² son cada uno independientemente arilo C₅₋₂₀ opcionalmente sustituido; en donde Ar¹ y Ar² pueden ser iguales o diferentes; y

en donde n es 0 o 1.

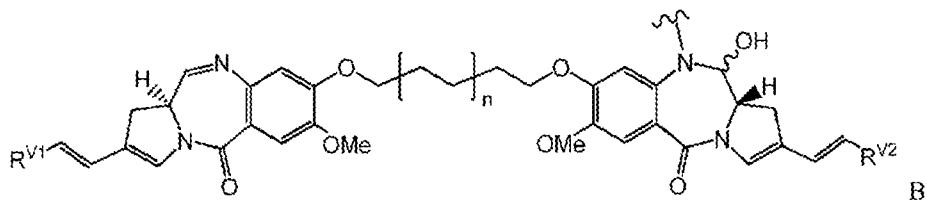
35 En algunas realizaciones, un componente dimérico de PBD de ejemplo de un ADC tiene la estructura de Fórmula A(V):



en donde Ar¹ y Ar² son cada uno independientemente arilo C₅-20 opcionalmente sustituido; en donde Ar¹ y Ar² pueden ser iguales o diferentes; y
5 en donde n es 0 o 1.

En algunas realizaciones, Ar¹ y Ar² se seleccionan cada uno independientemente de fenilo, furanilo, tiofenilo y piridilo opcionalmente sustituidos. En algunas realizaciones, Ar¹ y Ar² son cada uno independientemente fenilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, Ar¹ y Ar² son cada uno independientemente tien-2-il o tien-3-il opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, Ar¹ y Ar² son cada uno independientemente quinolinilo o isoquinolinilo opcionalmente sustituidos. El grupo quinolinilo o isoquinolinilo puede estar unido al núcleo de PBD a través de cualquier posición disponible en el anillo. Por ejemplo, el quinolinilo puede ser quinolin-2-il, quinolin-3-il, quinolin-4-il, quinolin-5-il, quinolin-6-il, quinolin-7-il y quinolin-8-il. En algunas realizaciones, el quinolinilo se selecciona de quinolin-3-il y quinolin-6-il. El isoquinolinilo puede ser isoquinolin-1-il, isoquinolin-3-il, isoquinolin-4-il, isoquinolin-5-il, isoquinolin-6-il, isoquinolin-7-il e isoquinolin-8-il. En algunas realizaciones, el isoquinolinilo se selecciona de isoquinolin-3-il e isoquinolin-6-il.
10
15

Los componentes diméricos de PBD de ejemplo no limitantes adicionales de los ADC son de Fórmula B:



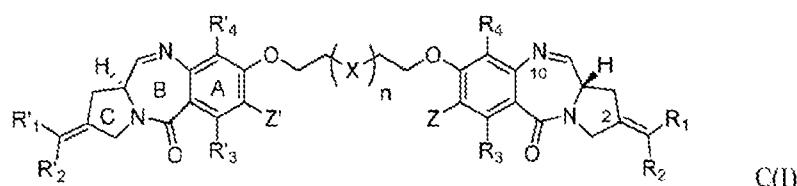
20 y sales y solvatos de los mismos, en donde:

la línea ondulada indica el sitio de unión covalente al enlazador;
25 la línea ondulada conectada al OH indica la configuración S o R;
R^{V1} y R^{V2} se seleccionan independientemente de H, metilo, etilo y fenilo (fenilo el cual puede estar opcionalmente sustituido con flúor, particularmente en la posición 4) y heterociclico C₅₋₆; en donde R^{V1} y R^{V2} pueden ser iguales o diferentes; y
n es 0 o 1.
30

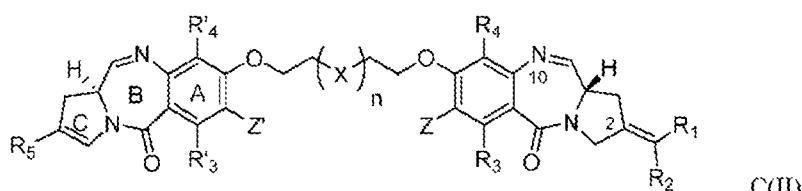
En algunas realizaciones, R^{V1} y R^{V2} se seleccionan independientemente de H, fenilo y 4-fluorofenilo.

35 En algunas realizaciones, se puede unir un enlazador en uno de diversos sitios del resto farmacológico dimérico de PBD, incluyendo la imina N10 del anillo B, la posición endo/exo C-2 del anillo C, o la unidad de unión que une los anillos A (véase estructuras C(I) y C(II) a continuación).

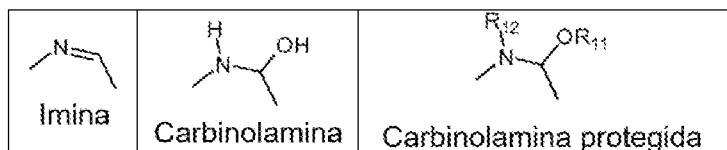
Los componentes diméricos de PBD de ejemplo no limitantes de los ADC incluyen las Fórmulas C(I) y C(II):



40



Las Fórmulas C(I) y C(II) se muestran en su forma de imina N10-C11. Los restos farmacológicos de PBD de ejemplo también incluyen las formas carbinolamina y carbinolamina protegida, como se muestra en la tabla a continuación:



5 en donde:

X es CH₂ (n = 1 a 5), N u O;

Z y Z' se seleccionan independientemente de OR y NR₂, donde R es una cadena alquilo primaria, secundaria o terciaria que contiene de 1 a 5 átomos de carbono;

10 R₁, R'₁, R₂ y R'₂ se seleccionan cada uno independientemente de H, alquilo C₁-C₈, alquenilo C₂-C₈, alquinilo C₂-C₈, arilo C₅-20 (incluyendo arilos sustituidos), grupos heteroarilo C₅-20, -NH₂, -NHMe, -OH y -SH, donde, en algunas realizaciones, las cadenas alquilo, alquenilo y alquinilo comprenden hasta 5 átomos de carbono;

R₃ y R'₃ se seleccionan independientemente de H, OR, NHR y NR₂, donde R es una cadena alquilo primaria, secundaria o terciaria que contiene de 1 a 5 átomos de carbono;

15 R₄ y R'₄ se seleccionan independientemente de H, Me y OMe;

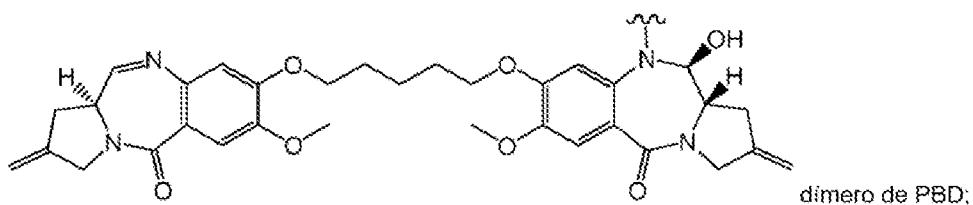
R₅ se selecciona de alquilo C₁-C₈, alquenilo C₂-C₈, alquinilo C₂-C₈, arilo C₅-20 (incluyendo arilos sustituidos con halo, nitró, ciano, alcoxi, alquilo, heterociclico) y grupos heteroarilo C₅-20, donde, en algunas realizaciones, las cadenas alquilo, alquenilo y alquinilo comprenden hasta 5 átomos de carbono;

20 R₁₁ es H, alquilo C₁-C₈ o un grupo protector (tal como acetilo, trifluoroacetilo, t-butoxicarbonilo (BOC), benciloxicarbonilo (CBZ), 9-fluorenilmetilenoxicarbonilo (Fmoc), o un resto que comprende una unidad autoinmolativa tal como valina-citrulina-PAB);

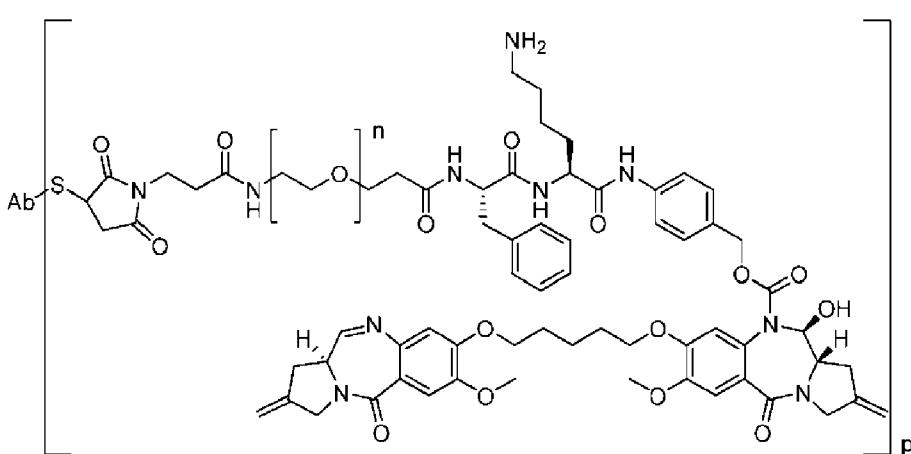
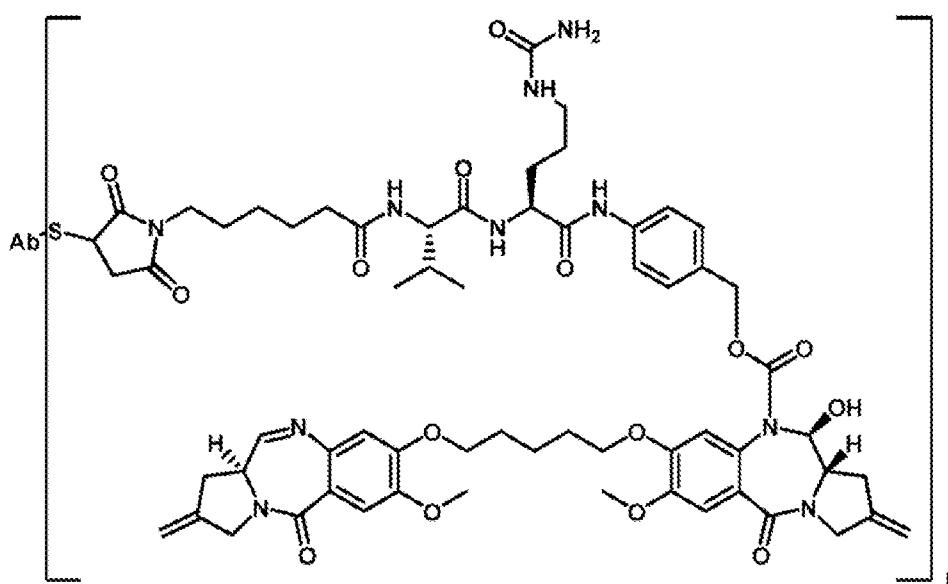
R₁₂ es H, alquilo C₁-C₈ o un grupo protector;

en donde un hidrógeno de uno de R₁, R'₁, R₂, R'₂, R₅ o R₁₂ o un hidrógeno del espaciador -OCH₂CH₂(X)_nCH₂CH₂O- entre los anillos A se reemplaza por un enlace conectado al enlazador del ADC.

25 Las porciones diméricas de PDB de ejemplo de ADC incluyen, pero sin limitación, (la línea ondulada indica el sitio de unión covalente al enlazador):



30 Las realizaciones de ejemplo no limitantes de ADC que comprenden dímeros de PBD tienen las siguientes estructuras:

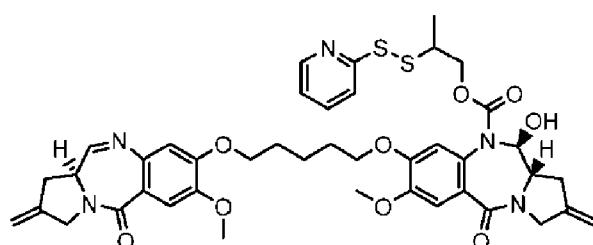


5

en donde: n es de 0 a 12. En algunas realizaciones, n es de 2 a 10. En algunas realizaciones, n es de 4 a 8. En algunas realizaciones, n se selecciona de 4, 5, 6, 7 y 8.

- 10 En algunas realizaciones, un ADC que comprende un dímero de PBD descrito en el presente documento puede prepararse conjugando un intermedio de fármaco-enlazador que incluye un grupo saliente de piridina a través de un átomo de azufre con un tiol de cisteína de un anticuerpo para formar un enlace disulfuro. Además, en algunas realizaciones, un ADC que comprende un dímero de PBD descrito en el presente documento puede prepararse conjugando un intermedio de fármaco-enlazador que incluye un grupo saliente de tiopiridilo, en donde el anillo de piridina está sustituido con uno o más grupos nitro. En algunas realizaciones, el anillo de piridilo está monosustituido con -NO₂. En algunas realizaciones, la monosustitución -NO₂ se encuentra *para* con respecto al disulfuro. En algunas realizaciones, el dímero de PBD está conectado a través de la posición N10. Por ejemplo, un ADC de ejemplo no limitante que comprende un dímero de PBD puede prepararse conjugando disulfuro de monometiletil piridilo, un intermedio de enlazador de PBD unido a N10 (mostrado a continuación) con un anticuerpo:
- 15

20



Los enlazadores del dímero de PBD-val-cit-PAB-Ab y el dímero de PBD-Phe-Lys-PAB-Ab son escindibles por proteasa, mientras que el enlazador del dímero de PBD-maleimida-acetal es lábil a los ácidos.

- 5 Los dímeros de PBD y los ADC que comprenden dímeros de PBD pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, los documentos WO 2009/016516; US 2009/304710; US 2010/047257; US 2009/036431; US 2011/0256157; WO 2011/130598; WO 2013/055987.

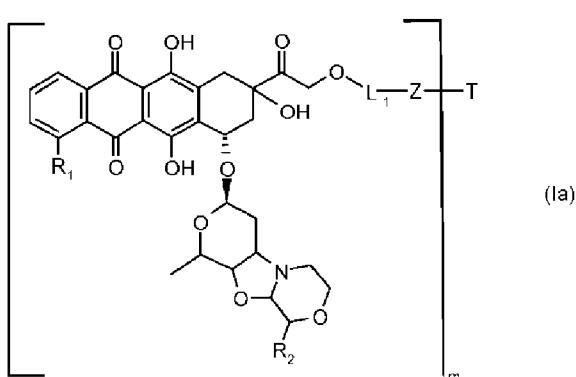
(5) Antraciclinas

- 10 En algunas realizaciones, un ADC comprende antraciclinas. Las antraciclinas son compuestos antibióticos que muestran actividad citotóxica. Sin pretender quedar ligado a ninguna teoría en particular, los estudios han indicado que las antraciclinas pueden funcionar destruyendo células mediante diversos mecanismos diferentes, incluyendo: 1) intercalación de las moléculas farmacológicas en el ADN de la célula, inhibiendo de este modo la síntesis de ácido nucleico dependiente de ADN; 2) producción por parte del fármaco de radicales libres que a continuación reaccionan con macromoléculas celulares para causar daño a las células, y/o 3) interacciones de las moléculas farmacológicas con la membrana celular (véase, por ejemplo, C. Peterson *et al.*, "Transport And Storage Of Anthracycline In Experimental Systems And Human Leukemia" en *Anthracycline Antibiotics In Cancer Therapy*; N.R. Bachur, "Free Radical Damage" id. en las págs. 97-102). Debido a su potencial citotóxico, se han usado antraciclinas en el tratamiento de numerosos cánceres, tales como leucemia, carcinoma de mama, carcinoma de pulmón, adenocarcinoma de ovario y sarcomas (véase, por ejemplo, P.H. Wiernik, en *Anthracycline: Current Status And New Developments* pág. 11).

- 25 Las antraciclinas de ejemplo no limitantes incluyen doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, daunomicina, nemorubicina y derivados de las mismas. Se han preparado y estudiado inmunoconjungados y profármacos de daunorubicina y doxorubicina (Kratz *et al.* (2006) Current Med. Chem. 13:477-523; Jeffrey *et al.* (2006) Bioorganic & Med. Chem. Letters 16:358-362; Torgov *et al.* (2005) Bioconj. Chem. 16:717-721; Nagy *et al.* (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:829-834; Dubowchik *et al.* (2002) Bioorg. & Med. Chem. Letters 12:1529-1532; King *et al.* (2002) J. Med. Chem. 45:4336-4343; documento EP 0328147; US 6630579). El conjugado de anticuerpo-fármaco BR96-doxorrubicina reacciona específicamente con el antígeno asociado a tumores Lewis-Y y se ha evaluado en estudios de fase I y II (Saleh *et al.* (2000) J. Clin. Oncology 18:2282-2292; Ajani *et al.* (2000) Cancer Jour. 6:78-81; Tolcher *et al.* (1999) J. Clin. Oncology 17:478-484).

- 35 PNU-159682 es un potente metabolito (o derivado) de la nemorubicina (Quintieri, *et al.* (2005) Clinical Cancer Research 11(4):1608-1617). La nemorubicina es un análogo semisintético de la doxorubicina con un grupo 2-metoximorfolino en el aminoglucósido de la doxorubicina y ha estado bajo evaluación clínica (Grandi *et al.* (1990) Cancer Treat. Rev. 17:133; Ripamonti *et al.* (1992) Brit. J. Cancer 65:703;), incluyendo ensayos de fase II/III para carcinoma hepatocelular (Sun *et al.* (2003) Proceedings of the American Society for Clinical Oncology 22, Abs1448; Quintieri (2003) Proceedings of the American Association of Cancer Research, 44: 1.^a Ed., Abs 4649; Pacciarini *et al.* (2006) Jour. Clin. Oncology 24:14116).

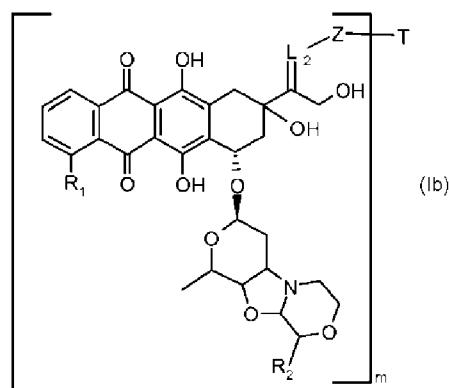
- 40 En la Fórmula la se muestra un ADC de ejemplo no limitativo que comprende nemorubicina o derivados de nemorubicina:



- 45 en donde R₁ es un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxi o metoxi y R₂ es un grupo alcoxi C₁-C₅ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
 L₁ y Z juntos son un enlazador (L) como se describe en el presente documento;
 T es un anticuerpo (Ab) como se describe en el presente documento; y
 50 m es de 1 a aproximadamente 20. En algunas realizaciones, m es de 1 a 10, de 1 a 7, de 1 a 5 o de 1 a 4.

En algunas realizaciones, R₁ y R₂ son ambos metoxi (-OMe).

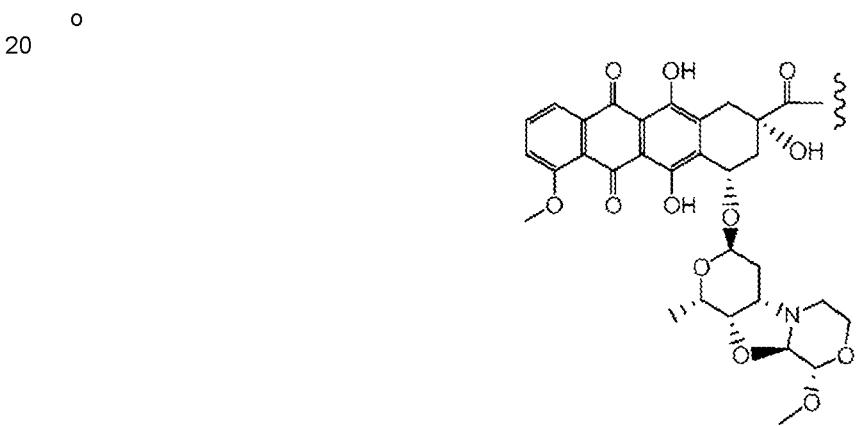
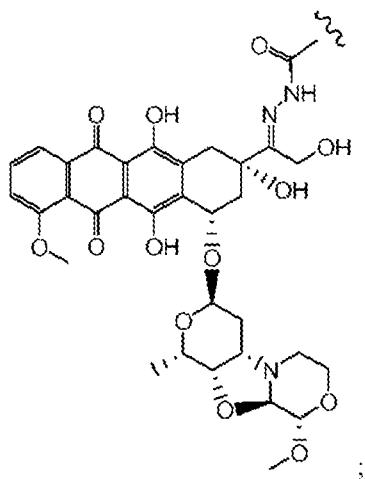
En la fórmula Ib se muestra un ADC de ejemplo no limitante adicional que comprende nemorubicina o derivados de nemorubicina:



- 5 en donde R_1 es un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxi o metoxi y R_2 es un grupo alcoxi C_1-C_5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
- 10 L_2 y Z juntos son un enlazador (L) como se describe en el presente documento;
- 15 T es un anticuerpo (Ab) como se describe en el presente documento; y
m es de 1 a aproximadamente 20. En algunas realizaciones, m es de 1 a 10, de 1 a 7, de 1 a 5 o de 1 a 4.

En algunas realizaciones, R_1 y R_2 son ambos metoxi (-OMe).

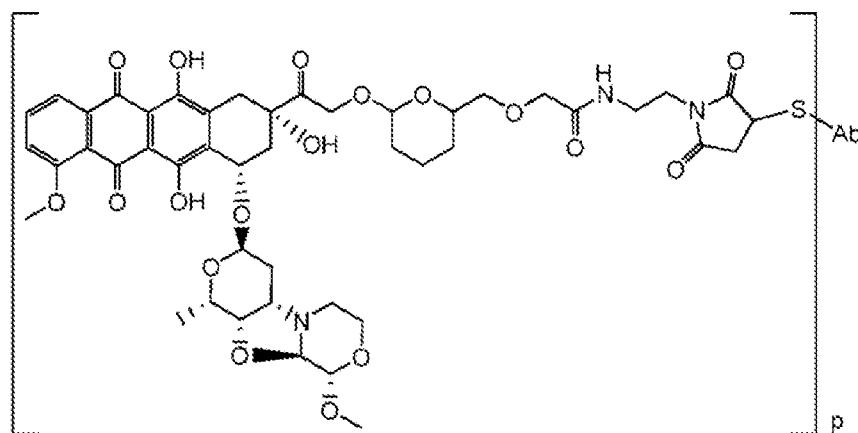
En algunas realizaciones, el componente nemorubicina de un ADC que contiene nemorubicina es PNU-159682. En algunas de dichas realizaciones, la porción de fármaco del ADC puede tener una de las siguientes estructuras:



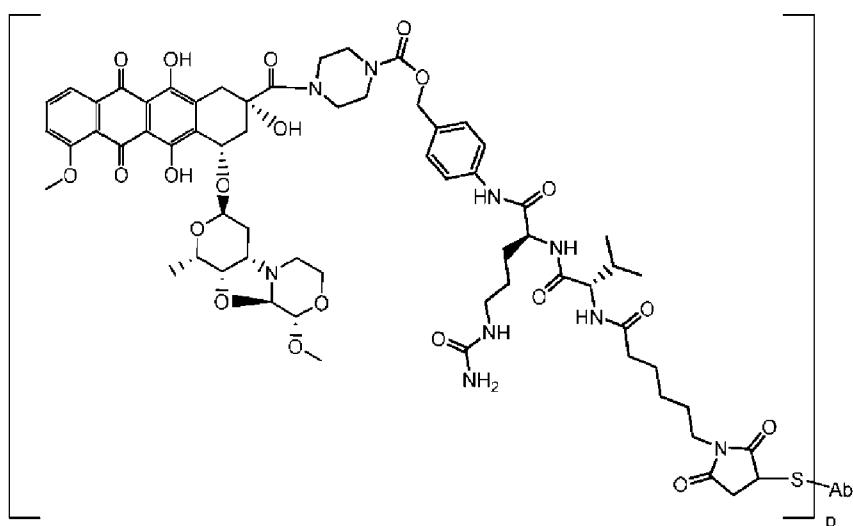
en donde la línea ondulada indica la unión al enlazador (L).

Las antraciclinas, incluyendo PNU-159682, pueden conjugarse con anticuerpos a través de varios sitios de unión y una diversidad de enlazadores (documentos US 2011/0076287; WO2009/099741; US 2010/0034837; WO 2010/009124), incluyendo los enlazadores descritos en el presente documento.

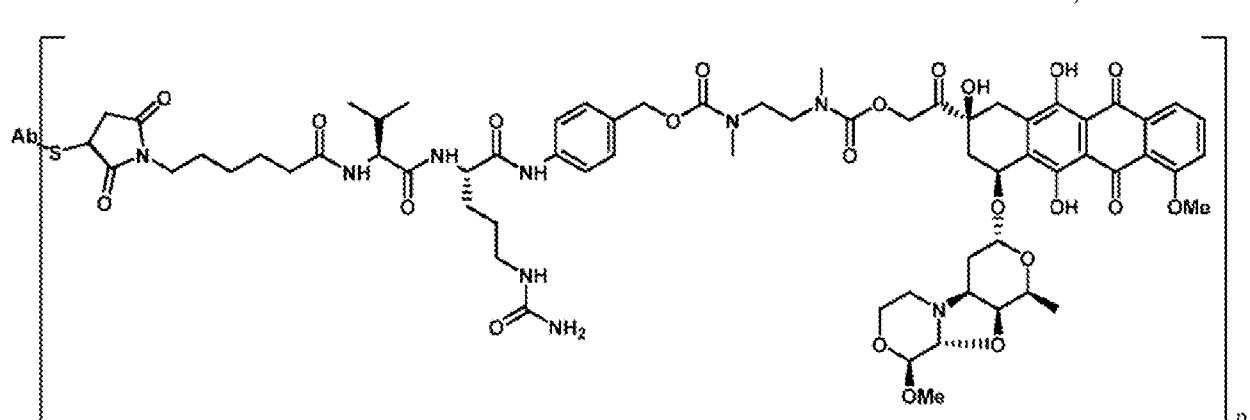
- 5 Los ADC de ejemplo que comprenden una nemorubicina y un enlazador incluyen, pero sin limitación:



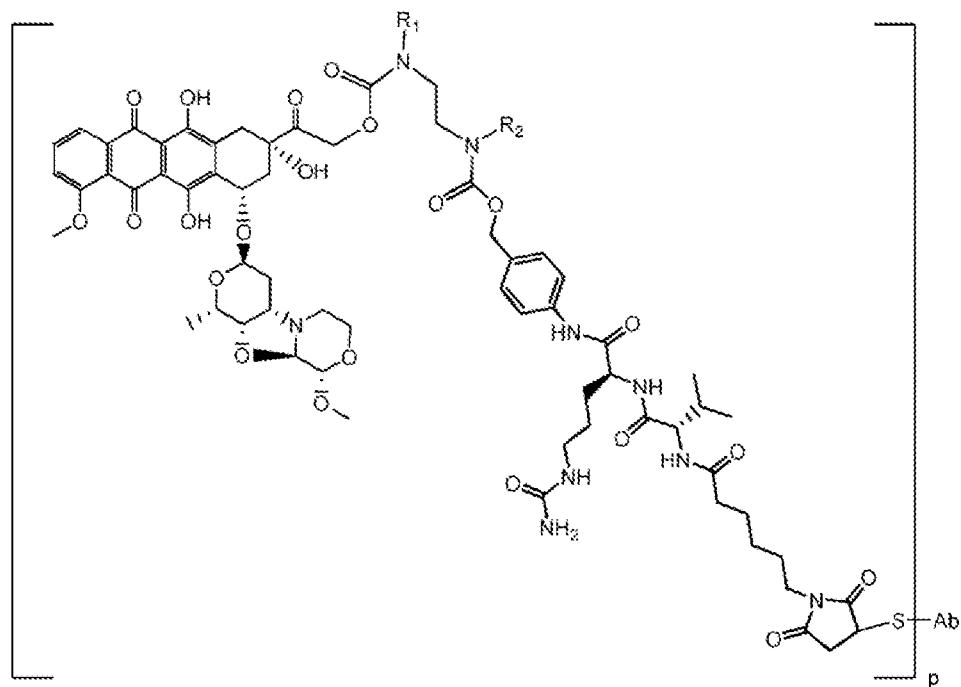
PNU-159682 maleimide acetal-Ab:



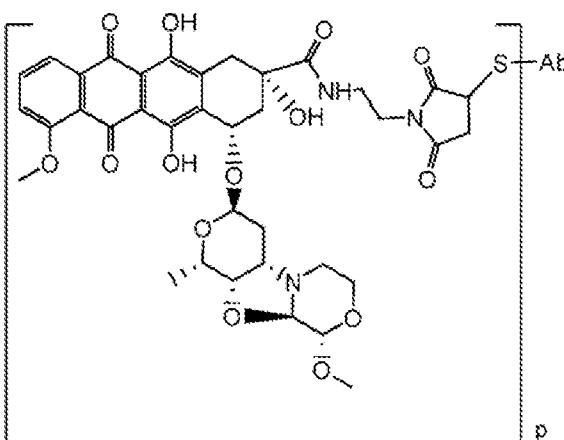
PNU-159682-val-cit-PAB-Ab;



PNU-159682-val-cit-PAB-espaciador-Ab;



en donde: R_1 y R_2 se seleccionan independientemente de H y alquilo C₁-C₆; y



5

El enlazador de maleimida acetal-Ab PNU-159682 es lábil a los ácidos, mientras que los enlazadores de PNU-159682-val-cit-PAB-Ab, PNU-159682-val-cit-PAB-espaciador-Ab y PNU-159682-val-cit-PAB-espaciador(R^1R^2)-Ab son escindibles por proteasas.

10

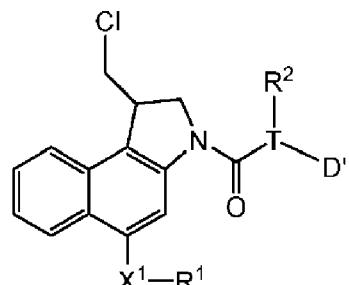
(6) Restos farmacológicos diméricos de 1-(clorometil)-2,3-dihidro-1H-benzo[e]indol (CBI)

En algunas realizaciones, un ADC comprende 1-(clorometil)-2,3-dihidro-1H-benzo[e]indol (CBI). La clase 5-amino-1-(clorometil)-1,2-dihidro-3H-benz[e]indol (amino CBI) de alquilantes del surco menor del ADN son potentes citotoxinas (Atwell, *et al.* (1999) J. Med. Chem., 42:3400), y se han utilizado como unidades efectoras en varias clases de profármacos diseñados para la terapia contra el cáncer. Entre estos se incluyen conjugados de anticuerpos, (Jeffrey, *et al.* (2005) J. Med. Chem., 48:1344), profármacos para terapia génica basados en carbamatos de nitrobencílo (Hay, *et al.* (2003) J. Med. Chem. 46:2456) y los derivados de nitro-CBI correspondientes como profármacos activados por hipoxia (Tercel, *et al.* (2011) Angew. Chem., Int. Ed., 50:2606-2609). Los farmacóforos de CBI y pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina (PBD) se han unido entre sí mediante una cadena alquilo (Tercel *et al.* (2003) J. Med. Chem 46:2132-2151).

En algunas realizaciones, un ADC comprende un dímero de 1-(clorometil)-2,3-dihidro-1H-benzo[e]indol (CBI) (documento WO 2015/023355). En algunas de dichas realizaciones, el dímero es un heterodímero en donde una mitad

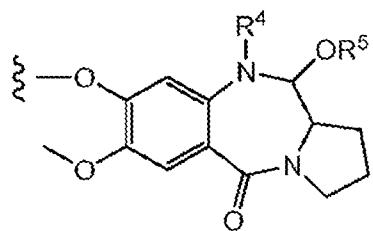
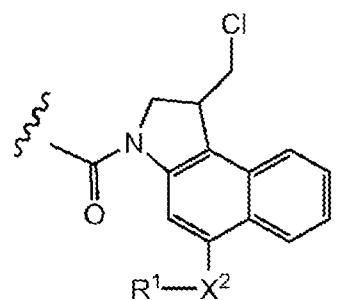
del dímero es un resto de CBI y la otra mitad del dímero es un resto de PBD.

En algunas realizaciones, un dímero de CBI comprende la fórmula:



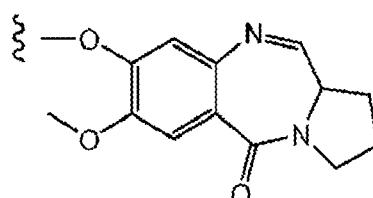
donde

- R¹ se selecciona de H, P(O)₃H₂, C(O)NR^aR^b o un enlace a un enlazador (L);
- R² se selecciona de H, P(O)₃H₂, C(O)NR^aR^b o un enlace a un enlazador (L);
- R^a y R^b se seleccionan independientemente de H y alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido con uno o más F, o R^a y R^b forman un grupo heterocíclico de cinco o seis miembros;
- T es un grupo de unión seleccionado de alquíleno C₃-C₁₂, Y, (alquíleno C₁-C₆)-Y-(alquíleno C₁-C₆), (alquíleno C₁-C₆)-Y-(alquíleno C₁-C₆)-Y-(alquíleno C₁-C₆), (alquenileno C₂-C₆)-Y-(alquenileno C₂-C₆) y (alquinileno C₂-C₆)-Y-(alquinileno C₂-C₆);
- donde Y se selecciona independientemente de O, S, NR¹, arilo y heteroarilo;
- donde alquíleno, alquenileno, arilo y heteroarilo están sustituidos independiente y opcionalmente con F, OH, O(alquilo C₁-C₆), NH₂, NHCH₃, N(CH₃)₂, OP(O)₃H₂ y alquilo C₁-C₆, donde alquilo está opcionalmente sustituido con uno o más F;
- o alquíleno, alquenileno, arilo y heteroarilo están sustituidos independiente y opcionalmente con un enlace a L;
- D' es un resto farmacológico seleccionado de:



25

y



30

- donde la línea ondulada indica el sitio de unión a T;
- X¹ y X² se seleccionan independientemente de O y NR³, en donde R³ se selecciona de H y alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido con uno o más F;

R⁴ es H, CO₂R o un enlace a un enlazador (L), donde R es alquilo C₁-C₆ o bencilo; y R⁵ es H o alquilo C₁-C₆.

5 (6) *Amatoxina*

En algunas realizaciones, el inmunoconjunto comprende un anticuerpo conjugado con una o más moléculas de amatoxina. Las amatoxinas son péptidos cíclicos compuestos por 8 aminoácidos. Se pueden aislar de la seta *Amanita phalloides* o prepararse sintéticamente. Las amatoxinas inhiben específicamente la ARN polimerasa II dependiente de ADN de células de mamífero y, de este modo, también la transcripción y la biosíntesis de proteínas de las células afectadas. La inhibición de la transcripción en una célula produce la detención del crecimiento y la proliferación. Véanse, por ejemplo, Moldenhauer *et al.* JNCI 104:1-13 (2012), WO2010115629, WO2012041504, WO2012119787, WO2014043403, WO2014135282 y WO2012119787. En algunas realizaciones, la una o más moléculas de amatoxina son una o más moléculas de α-amanitina.

10 15 (7) *Otros restos farmacológicos*

Los restos farmacológicos también incluyen geldanamicina (Mandler *et al.* (2000) J. Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581; Mandler *et al.* (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028; Mandler *et al.* (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791); y toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas, incluyendo, pero sin limitación, la cadena A de difteria, fragmentos activos que no son fragmentos de unión de la toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232.

20 25 Los restos farmacológicos también incluyen compuestos con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una ADN endonucleasa).

30 En determinadas realizaciones, un inmunoconjunto puede comprender un átomo muy radiactivo. Está disponible una diversidad de isótopos radioactivos para la producción de anticuerpos radioconjungados. Los ejemplos incluyen At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radioactivos de Lu. En algunas realizaciones, cuando se usa un inmunoconjunto para la detección, este puede comprender un átomo radiactivo para realizar estudios escintigráficos, por ejemplo, Tc⁹⁹ o I¹²³ o un marcador de espín para obtención de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como imágenes por resonancia magnética, IRM), tales como circonio-89, yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro. El circonio-89 puede complejarse con diversos agentes quelantes metálicos y conjugarse con anticuerpos, por ejemplo, para formación de imágenes por TEP (documento WO 2011/056983).

40 45 Los marcadores radioactivos u otros marcadores pueden incorporarse al conjugado según modos conocidos. Por ejemplo, se puede biosintetizar o sintetizar químicamente un péptido usando precursores de aminoácidos adecuados que comprenden, por ejemplo, uno o más átomos de flúor-19 en lugar de uno o más hidrógenos. En algunas realizaciones, los marcadores tales como Tc⁹⁹, I¹²³, Re¹⁸⁶, ¹⁸⁸Re y ¹¹¹In se pueden unir mediante un resto de cisteína del anticuerpo. En algunas realizaciones, el triptófano-90 se puede unir mediante un residuo de lisina del anticuerpo. En algunas realizaciones, el método IODOGEN (Fraker *et al.* (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57 se puede usar para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe determinados métodos diferentes.

50 55 En determinadas realizaciones, un inmunoconjunto puede comprender un anticuerpo conjugado con una enzima activadora de profármacos. En algunas de dichas realizaciones, una enzima activadora de profármacos convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterápico peptídico, véase el documento WO 81/01145) en un fármaco activo, tal como un fármaco antineoplásico. Dichos inmunoconjungados son útiles, en algunas realizaciones, en la terapia con profármacos mediada por enzimas dependiente de anticuerpos ("ADEPT"). Las enzimas que pueden conjugarse con un anticuerpo incluyen, pero sin limitación, fosfatases alcalinas, que son útiles para convertir profármacos que contienen fosfatasa en fármacos libres; arilsulfatas, que son útiles para convertir los profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa, que es útil para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco antineoplásico, 5-fluorouracilo; proteasas, tales como proteasa de serratia, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como las catepsinas B y L), que son útiles para convertir los profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, que son útiles para convertir los profármacos que contienen sustituyentes de D-aminoácidos; enzimas que escinden carbohidratos tales como β-galactosidasa y neuramidasa, que son útiles para convertir los profármacos glucosilados en fármacos libres; β-lactamasa, que es útil para convertir los fármacos derivatizados con β-lactamas en fármacos libres; y penicilina amidasa, tales como penicilina V amidasa o penicilina G amidasa, que son útiles para convertir los fármacos derivatizados en sus nitrógenos de amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. En algunas realizaciones, las enzimas pueden unirse covalentemente a anticuerpos mediante técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Neuberger *et al.*, Nature 312:604-608 (1984).

c) Carga farmacológica

La carga farmacológica se representa por p, el número promedio de restos farmacológicos por anticuerpo en una molécula de Fórmula I. La carga farmacológica puede variar de 1 a 20 restos farmacológicos (D) por anticuerpo. Los

5 ADC de Fórmula I incluyen colecciones de anticuerpos conjugados con una gama de restos farmacológicos, de 1 a 20. El número promedio de restos farmacológicos por anticuerpo en preparaciones de ADC procedentes de reacciones de conjugación puede caracterizarse por medios convencionales tales como espectroscopia de masas, ensayo ELISA y HPLC. También puede determinarse la distribución cuantitativa de ADC en términos de p. En algunos casos, la separación, la purificación y la caracterización del ADC homogéneo donde p es un determinado valor de ADC con 10 otras cargas farmacológicas pueden lograrse por medios tales como HPLC de fase inversa o electroforesis.

Para algunos conjugados de anticuerpo-fármaco, p puede estar limitado por el número de sitios de unión en el anticuerpo. Por ejemplo, cuando la unión es un tiol de cisteína, como en determinadas realizaciones de ejemplo anteriores, un anticuerpo puede tener únicamente uno o varios grupos tiol de cisteína o puede tener solo uno o varios

15 grupos tiol suficientemente reactivos a través de los cuales puede unirse un enlazador. En determinadas realizaciones, una mayor carga farmacológica, por ejemplo, p >5, puede provocar agregación, insolubilidad, toxicidad o pérdida de la permeabilidad celular de determinados conjugados de anticuerpo-fármaco. En determinadas realizaciones, la carga farmacológica promedio de un ADC varía de 1 a aproximadamente 8; de aproximadamente 2 a aproximadamente 6; 20 o de aproximadamente 3 a aproximadamente 5. De hecho, se ha demostrado que, para determinados ADC, la relación óptima de restos farmacológicos por anticuerpo puede ser inferior a 8, y puede ser de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 (documento US 7498298).

En determinadas realizaciones, se conjugan menos del máximo teórico de restos farmacológicos con un anticuerpo durante una reacción de conjugación. Un anticuerpo puede contener, por ejemplo, residuos de lisina que no reaccionan

25 con el intermedio de fármaco-enlazador o el reactivo enlazador, como se ha analizado anteriormente. Generalmente, los anticuerpos no contienen muchos grupos tiol de cisteína libre ni reactivos que puedan unirse a un resto farmacológico; de hecho, la mayoría de los residuos tiol de cisteína en los anticuerpos se encuentran en forma de puentes disulfuro. En determinadas realizaciones, un anticuerpo puede reducirse con un agente reductor tal como ditiotreitol (DTT) o tricarboniletilfostina (TCEP), en condiciones reductoras parciales o totales, para generar grupos tiol 30 de cisteína reactivos. En determinadas realizaciones, un anticuerpo se somete a condiciones desnaturalizantes para revelar grupos nucleófilos reactivos tales como lisina o cisteína.

La carga (relación de fármaco/anticuerpo) de un ADC puede controlarse de varias maneras diferentes, y por ejemplo, mediante: (i) limitación del exceso molar del intermedio de fármaco-enlazador o reactivo enlazador con respecto al anticuerpo, (ii) limitación del tiempo o la temperatura de la reacción de conjugación, y (iii) limitación o reducción parcial 35 de las condiciones reductoras para la modificación del tiol de cisteína.

Debe entenderse que cuando más de un grupo nucleófilo reacciona con un intermedio de fármaco-enlazador o un reactivo enlazador, entonces el producto resultante es una mezcla de compuestos ADC con una distribución de uno o

40 más restos farmacológicos unidos a un anticuerpo. El número promedio de fármacos por anticuerpo puede calcularse a partir de la mezcla mediante un ensayo de anticuerpos ELISA doble, que es específico del anticuerpo y específico del fármaco. Las moléculas de ADC individuales pueden identificarse en la mezcla mediante espectroscopía de masas y separarse mediante HPLC, por ejemplo, cromatografía de interacción hidrófoba (véanse, por ejemplo, McDonagh *et*

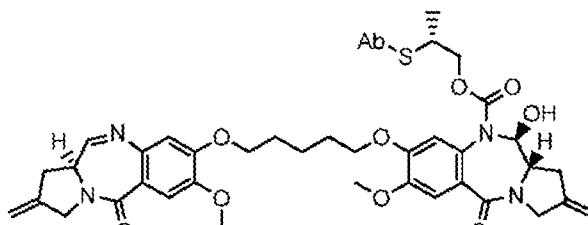
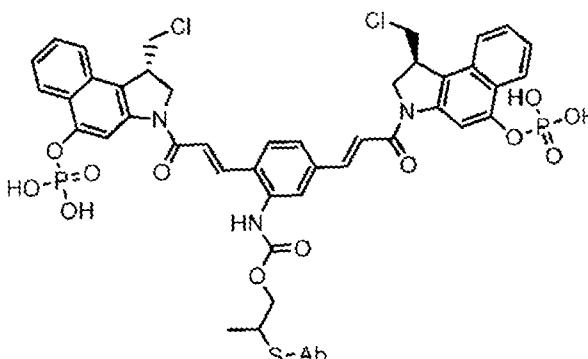
45 *al.* (2006) Prot. Engr. Design & Selection 19(7):299-307; Hamblett *et al.* (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070; Hamblett, K.J., *et al.* "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate", Resumen n.º 624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, 27-31 de marzo de 2004, Proceedings of the AACR, Volumen 45, marzo de 2004; Alley, S.C., *et al.* "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates", Resumen n.º 627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, 27-31 de marzo de 2004, Proceedings of the AACR, Volumen 45, marzo de 2004). En determinadas 50 realizaciones, un ADC homogéneo con un único valor de carga puede aislarse de la mezcla de conjugación mediante electroforesis o cromatografía.

Los conjugados de anticuerpo-fármaco 51-58 de la Tabla A pueden prepararse acoplando un resto farmacológico con un reactivo enlazador, y de acuerdo con los procedimientos de los documentos WO 2013/055987; WO 2015/023355;

55 WO 2010/009124; WO 2015/095227, y conjugarse con cualquiera de los anticuerpos anti CLL1, incluyendo los anticuerpos genomanipulados con cisteína, descritos en el presente documento. Los conjugados de anticuerpo-fármaco específicos se enumeran en la Tabla B.

Tabla A Conjugados de anticuerpo-fármaco 51-58

N.º de ADC	Estructura
------------	------------

51	
52	

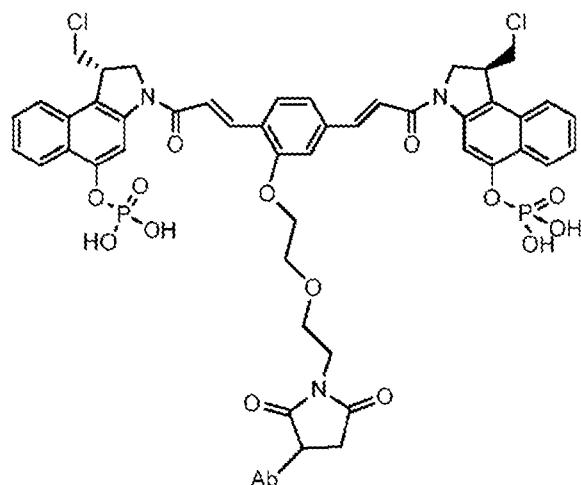
(continuación)

N.º de ADC	Estructura
53	
54	
55	
56	
57	

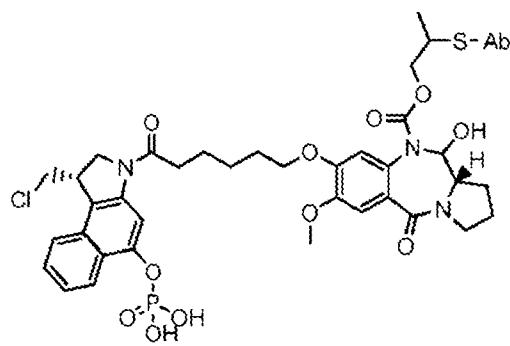
(continuación)

N.º de ADC	Estructura
58	

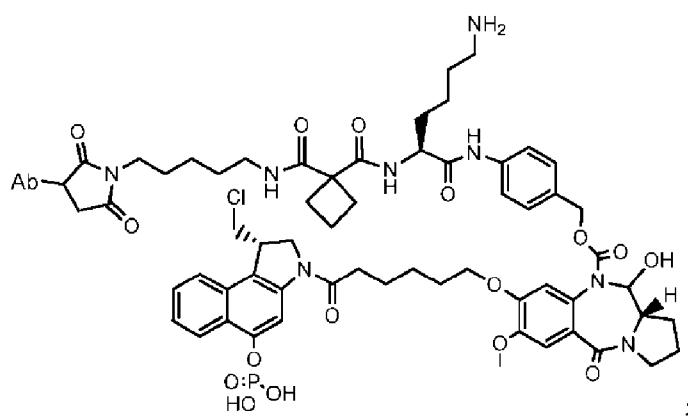
Los conjugados de anticuerpo-fármaco de ejemplo adicionales incluyen:



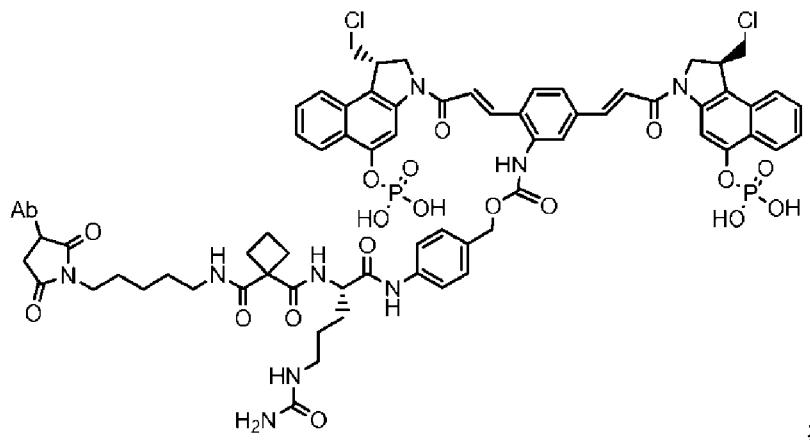
5



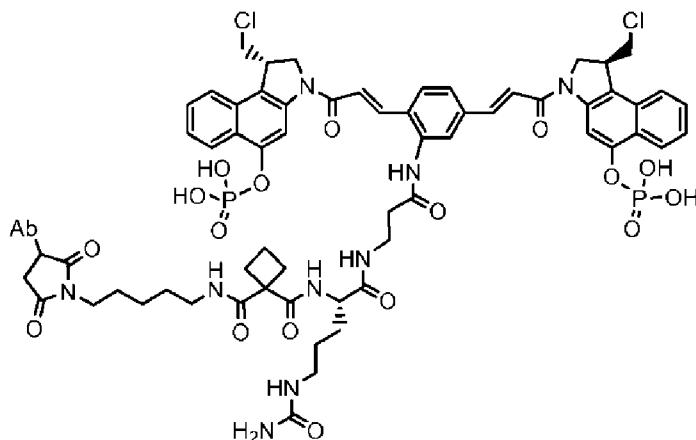
;



;



5 y/o



10 Se observa que, para simplificar, las estructuras anteriores y las de los ADC 51 a 58 solo muestran un grupo de enlazador-fármaco unido a un anticuerpo. Como se ha mencionado anteriormente, se puede unir más de un grupo de enlazador-fármaco a un anticuerpo.

Tabla B Conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) específicos

N.º de ADC	Fórmula de ADC	N.º de LD de enlazador-fármaco (Tabla 1)	DAR*
ADC-101	Tio Ch Anti CLL-1 21C9 HC A118C-(LD-55)	55	2,0
ADC-102	Tio Ch Anti CLL-1 3H10 HC A118C-(LD-55)	55	2,0
ADC-103	Tio Ch Anti CLL-1 28H12 HC A118C-(LD-55)	55	1,9
ADC-104	Tio Ch Anti CLL-1 20B1 HC A118C-(LD-55)	55	1,8
ADC-105	Tio Ch Anti CLL-1 6E7 HC A118C-(LD-55)	55	1,9
ADC-106	Tio Hu anti CLL-1 6E7.H1eL4 HC A118C-(LD-54)	54	1,95
ADC-107	Tio Hu anti CLL-1 21C9.H3L2 HC A118C-(LD-54)	54	1,96

(continuación)

N.º de ADC	Fórmula de ADC	N.º de LD de enlazador-fármaco (Tabla 1)	DAR*
ADC-108	Tio Hu anti CLL-1 21C9.H3L2 LC K149C-(LD-54)	51	1,9
ADC-109	Tio Hu anti CLL-1 6E7.H1eL4 LC K149C-(LD-51)	51	1,91
ADC-110	Tio Hu anti CLL-1 6E7.N54A LC K149C-(LD-51)	51	2,0
ADC-111	Tio Hu anti CLL-1 6E7.H1eL4.N54A LC K149C-(LD-53)	53	2,0
ADC-112	Tio Hu anti CLL-1 6E7.H1eL4.N54A LC K149C-(LD-52)	52	1,9
ADC-113	Tio Hu anti CLL-1 6E7.N54A LC K149C-(LD-51)	51	1,9
ADC-114	Tio Hu anti CLL-1 6E7.N54A LC K149C-(LD-56)	56	2,0
ADC-115	Tio Hu anti CLL-1 6E7.N54A LC K149C-(LD-57)	57	1,7
ADC-116	Tio Hu anti CLL-1 6E7.N54A LC K149C-(LD-58)	58	1,9

DAR = Relación fármaco/anticuerpo promedio
A118C (numeración EU) = A121C (numeración secuencial) = A114C (numeración de Kabat)
Tipo natural ("WT"), anticuerpo mutante genomanipulado con cisteína ("tio"), cadena ligera ("LC"), cadena pesada ("HC"), 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit" o "vc"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobencílo ("PAB") y p-aminobencíloxcarbonilo ("PABC")

d) Determinados métodos para preparar inmunoconjungados

- 5 Se puede preparar un ADC de Fórmula I mediante varias rutas usando reacciones de química orgánica, condiciones y reactivos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo: (1) reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo con un reactivo enlazador bivalente para formar Ab-L a través de un enlace covalente, seguida de la reacción con un resto farmacológico D; y (2) reacción de un grupo nucleófilo de un resto farmacológico con un reactivo enlazador bivalente, para formar D-L, por un enlace covalente, seguida de la reacción con un grupo nucleófilo de un anticuerpo.
- 10 10 Se describen métodos de ejemplo para preparar un ADC de Fórmula I a través de la última vía en el documento US 7498298.

15 Los grupos nucleófilos en anticuerpos incluyen, pero sin limitación: (i) grupos amino en el extremo N, (ii) grupos amino de cadena lateral, por ejemplo, lisina, (iii) grupos tiol de cadena lateral, por ejemplo, cisteína, y (iv) grupos hidroxilo o amino de azúcar donde el anticuerpo está glucosilado. Los grupos amina, tiol e hidroxilo son nucleófilos y capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos enlazadores y reactivos enlazadores que incluyen: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, esteres de HOBt, haloformiatos y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencílo, tales como haloacetamidas; y (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxilo y maleimida. Determinados anticuerpos tienen disulfuros intercatenarios reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden 20 volverse reactivos para la conjugación con reactivos enlazadores mediante tratamiento con un agente reductor tal como DTT (ditiotreitol) o tricarboniletilfosfina (TCEP), de tal manera que el anticuerpo está completa o parcialmente reducido. Por lo tanto, cada puente de cisteína formará, teóricamente, dos nucleófilos de tiol reactivos. Se pueden introducir grupos nucleófilos adicionales en los anticuerpos mediante la modificación de residuos de lisina, por ejemplo, haciendo reaccionar residuos de lisina con 2-iminotiolano (reactivo de Traut), dando como resultado la conversión de 25 una amina en un tiol. Los grupos tiol reactivos también pueden introducirse en un anticuerpo introduciendo uno, dos, tres, cuatro o más residuos de cisteína (por ejemplo, mediante la preparación de anticuerpos variantes que comprendan uno o más residuos de aminoácidos de cisteína no naturales).

30 Los conjugados de anticuerpo-fármaco de la invención también pueden producirse mediante reacción entre un grupo electrófilo en un anticuerpo, tal como un grupo carbonilo de aldehído o cetona, con un grupo nucleófilo de un reactivo o fármaco enlazador. Los grupos nucleófilos útiles de un reactivo enlazador incluyen, pero sin limitación, hidrazida, oxima, amino, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina y arilhidrazida. En una realización, un anticuerpo se modifica para introducir restos electrófilos que son capaces de reaccionar con sustituyentes nucleófilos en el reactivo enlazador o fármaco. En otra realización, los azúcares de los anticuerpos glucosilados pueden oxidarse, por ejemplo, con reactivos oxidantes de peryodato, para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de reactivos enlazadores o restos farmacológicos. Los grupos de base de Schiff de imina resultantes pueden formar un enlace estable, o pueden reducirse, por ejemplo, mediante reactivos de borohidruro para formar enlaces de amina estables. En una realización, la reacción de la porción de carbohidrato de un anticuerpo glucosilado con galactosa oxidasa o meta-peroxydato de sodio puede producir grupos carbonilo (aldehído y cetona) en el anticuerpo 35 que pueden reaccionar con grupos apropiados en el fármaco (Hermanson, Bioconjugate Techniques). En otra realización, los anticuerpos que contienen residuos de serina o treonina en el extremo N pueden reaccionar con metaperyodato de sodio, dando como resultado la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan y Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; documento US 5362852). Tal aldehído se hace reaccionar con un resto farmacológico o un nucleófilo enlazador.

40 45 Los grupos nucleófilos de ejemplo de un resto farmacológico incluyen, pero sin limitación: grupos amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina y arilhidrazida que pueden reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos enlazadores y reactivos enlazadores, incluyendo: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, esteres de HOBt, haloformiatos y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo

y bencilo, tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxilo y maleimida.

Los reactivos de reticulación de ejemplo no limitantes que pueden usarse para preparar ADC se describen en el presente documento en la sección titulada "Enlazadores de ejemplo". En la técnica se conocen métodos para usar dichos reactivos de reticulación para unir dos restos, incluyendo un resto proteínico y un resto químico. En algunas realizaciones, se puede preparar una proteína de fusión que comprende un anticuerpo y un agente citotóxico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis peptídica. Una molécula de ADN recombinante puede comprender regiones que codifican el anticuerpo y porciones citotóxicas del conjugado tanto adyacentes entre sí como separadas por una región que codifica un péptido enlazador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

En otra realización más, un anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (tal como estreptavidina) para su utilización en el predirecciónamiento de tumores, en donde el conjugado de anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación del conjugado no unido de la circulación usando un agente de limpieza y, a continuación, la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que está conjugado con un agente citotóxico (por ejemplo, un fármaco o un radionucleótido).

E. Métodos y composiciones para diagnósticos y detección

En determinadas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos anti CLL-1 proporcionados en el presente documento es útil para detectar la presencia de CLL-1 en una muestra biológica. Como se usa en el presente documento, el término "detectar" abarca la detección cuantitativa o cualitativa. Una "muestra biológica" comprende, por ejemplo, una célula o tejido (por ejemplo, material de biopsia, incluyendo tejido linfoide canceroso o potencialmente canceroso, tales como linfocitos, linfoblastos, monocitos, mielomonocitos y mezclas de los mismos).

En una realización, se proporciona un anticuerpo anti CLL-1 para su uso en un método de diagnóstico o detección. En un aspecto adicional, se proporciona un método para detectar la presencia de CLL-1 en una muestra biológica. En determinadas realizaciones, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti CLL-1 como se describe en el presente documento en condiciones que permitan la unión del anticuerpo anti CLL-1 a CLL-1, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti CLL-1 y CLL-1 en la muestra biológica. Dicho método puede ser un método *in vitro* o *in vivo*. En una realización, se usa un anticuerpo anti CLL-1 para seleccionar sujetos aptos para la terapia con un anticuerpo anti CLL-1, por ejemplo, cuando CLL-1 es un biomarcador para la selección de pacientes. En una realización adicional, la muestra biológica es una célula o tejido.

En una realización adicional, se usa un anticuerpo anti CLL-1 *in vivo* para detectar, por ejemplo, mediante imágenes *in vivo*, un cáncer CLL-1 positivo en un sujeto, por ejemplo, con fines de diagnóstico, pronóstico o estadificación del cáncer, para determinar el curso apropiado de la terapia, o seguir la respuesta del cáncer a la terapia. Un método conocido en la técnica para la detección *in vivo* es la tomografía por emisión de positrones inmunológica (inmuno-PET), como se describe, por ejemplo, en van Dongen *et al.*, The Oncologist 12:1379-1389 (2007) y Verel *et al.*, J. Nucl. Med. 44: 1271-1281 (2003). En dichas realizaciones, se proporciona un método para detectar un cáncer CLL-1 positivo en un sujeto, comprendiendo el método administrar un anticuerpo anti CLL-1 marcado a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene un cáncer CLL-1 positivo, y detectar el anticuerpo anti CLL-1 marcado en el sujeto, en donde la detección del anticuerpo anti CLL-1 marcado indica un cáncer CLL-1 positivo en el sujeto. En determinadas realizaciones de este tipo, el anticuerpo anti CLL-1 marcado comprende un anticuerpo anti CLL-1 conjugado con un emisor de positrones, tal como ⁶⁸Ga, ¹⁸F, ⁶⁴Cu, ⁸⁶Y, ⁷⁶Br, ⁸⁹Zr e ¹²⁴I. En una realización particular, el emisor de positrones es ⁸⁹Zr.

En realizaciones adicionales, un método de diagnóstico o detección comprende poner en contacto un primer anticuerpo anti CLL-1 inmovilizado en un sustrato con una muestra biológica a ensayar para detectar la presencia de CLL-1, exponer el sustrato a un segundo anticuerpo anti CLL-1 y detectar si el segundo anti CLL-1 está unido a un complejo entre el primer anticuerpo anti CLL-1 y CLL-1 en la muestra biológica. Un sustrato puede ser cualquier medio de soporte, por ejemplo, vidrio, metal, cerámica, perlas poliméricas, portaobjetos, chips y otros sustratos. En determinadas realizaciones, una muestra biológica comprende una célula o un tejido. En determinadas realizaciones, el primer o segundo anticuerpo anti CLL-1 es cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento.

Los trastornos de ejemplo que pueden diagnosticarse o detectarse de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores incluyen cánceres CLL-1 positivos, tales como AML CLL-1 positiva, CML CLL-1 positiva, MDS CLL-1 positivo, leucemia mielomonocítica crónica CLL-1 positiva, APL CLL-1 positiva, trastorno mieloproliferativo crónico CLL-1 positivo, leucemia trombocítica CLL-1 positiva, pre-B-ALL CLL-1 positiva, preT-ALL CLL-1 positiva, mieloma múltiple CLL-1 positivo, enfermedad de mastocitos CLL-1 positiva, leucemia de mastocitos CLL-1 positiva, sarcoma de mastocitos CLL-1 positivo, sarcomas mieloides CLL-1 positivos, leucemia linfoide CLL-1 positiva y leucemia indiferenciada CLL-1 positiva. En algunas realizaciones, un cáncer CLL-1 positivo es un cáncer que recibe una puntuación de inmunohistoquímica (IHC) o hibridación *in situ* (ISH) anti CLL-1 superior a "0", que corresponde a una tinción muy débil o nula en >90 % de las células tumorales, en las condiciones descritas en el presente documento en el Ejemplo B. En otra realización, un cáncer CLL-1 positivo expresa CLL-1 en un nivel 1+, 2+ o 3+, como se define en las condiciones descritas en el presente documento en el Ejemplo B. En algunas realizaciones, un cáncer CLL-1 positivo es un cáncer que expresa CLL-1 de acuerdo con un ensayo de PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) que

detecta el ARNm de CLL-1. En algunas realizaciones, la RT-PCR es una RT-PCR cuantitativa.

En determinadas realizaciones, se proporcionan anticuerpos anti CLL-1 marcados. Los marcadores incluyen, pero sin limitación, marcadores o restos que se detectan directamente (tales como marcadores fluorescentes, cromóforos, densos en electrones, quimioluminiscentes y radiactivos), así como restos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, mediante una reacción enzimática o interacción molecular. Los marcadores de ejemplo incluyen, pero sin limitación, los radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^{3}H e ^{131}I , fluoróforos tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbelíferona, luciferasas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (Patente de EE. UU. N.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalacínadionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasa, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasa heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas a una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un colorante precursor tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de espín, marcadores de bacteriófagos, radicales libres estables y similares. En otra realización, un marcador es un emisor de positrones. Los emisores de positrones incluyen, pero sin limitación, ^{68}G , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{86}Y , ^{76}Br , ^{89}Zr e ^{124}I . En una realización particular, un emisor de positrones es ^{89}Zr .

F. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo anti CLL-1 o inmunoconjuguado como se describe en el presente documento se preparan mezclando dicho anticuerpo o inmunoconjuguado que tiene el grado deseado de pureza con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16.^a edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores farmacéuticamente aceptables son generalmente no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen, pero sin limitación: tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilo amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; parabenos de alquilo, tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como polietilenglicol (PEG). Los portadores farmacéuticamente aceptables de ejemplo en el presente documento incluyen además agentes de dispersión de fármacos intersticiales, tales como glucoproteínas de hialuronidasa neutras-activas solubles (sHASEGP), por ejemplo, glucoproteínas de hialuronidasa PH-20 solubles humanas, tales como rHuPH20 (HYLENEX[®], Baxter International, Inc.). Determinadas sHASEGP de ejemplo y métodos de uso, incluyendo rHuPH20, se describen en las Publicaciones de Patente de EE. UU. N.º 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, una sHASEGP se combina con una o más glucosaminoglucanasas adicionales, tales como condroitinas.

Se describen formulaciones de anticuerpo o inmunoconjuguado de ejemplo en la Patente de EE. UU. N.º 6.267.958. Las formulaciones acuosas de anticuerpos o inmunoconjugados incluyen las descritas en la Patente de EE. UU. N.º 6.171.586 y el documento WO2006/044908, incluyendo estas últimas formulaciones un tampón de histidina-acetato.

La formulación del presente documento puede contener también más de un principio activo necesario para la indicación particular que se está tratando, preferentemente los que tienen actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí.

Los principios activos pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divultan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16.^a edición, Osol, A. Ed. (1980).

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo o el inmunoconjuguado, teniendo dichas matrices la forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas.

Las formulaciones a usar para la administración *in vivo* son generalmente estériles. La esterilidad puede lograrse fácilmente, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

G. Métodos terapéuticos y composiciones

Cualquiera de los anticuerpos anti CLL-1 o inmunoconjugados proporcionados en el presente documento pueden usarse en los métodos, por ejemplo, métodos terapéuticos.

- En un aspecto, un anticuerpo anti CLL-1 o inmunoconjugado proporcionado en el presente documento se usa en un método para inhibir la proliferación de una célula CLL-1 positiva, comprendiendo el método exponer la célula al anticuerpo anti CLL-1 o inmunoconjugado en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo anti CLL-1 o inmunoconjugado a CLL-1 en la superficie de la célula, inhibiendo así la proliferación de la célula. En determinadas realizaciones, el método es un método *in vitro* o *in vivo*. En realizaciones adicionales, la célula es un linfocito, linfoblasto, monocito o mielomonocito. En realizaciones adicionales, la célula es un monocito, granulocito y/o progenitores del linaje de monocitos/granulocitos. En algunas realizaciones, la célula es positiva para la presencia de repeticiones internas en tandem de FLT3. En algunas realizaciones, la célula es positiva para la presencia de un gen de fusión MLL-AF9 (por ejemplo, translocación MLL-AF9). En algunas realizaciones, la célula es positiva para la presencia de una translocación del cromosoma 11q23. En algunas realizaciones, la célula es positiva para la presencia de una translocación t(9;11)(p22;q23).
- La inhibición de la proliferación celular *in vitro* puede ensayarse usando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo™, que está disponible comercialmente en Promega (Madison, WI). Este ensayo determina el número de células viables en un cultivo basándose en la cuantificación del ATP presente, que es un indicador de células metabólicamente activas. Véanse Crouch *et al.* (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88, Pat. de EE. UU. N.º 6602677. El ensayo puede realizarse en un formato de 96 o 384 pocillos, haciéndolo apto para un cribado automatizado de alto rendimiento (HTS). Véase Cree *et al.* (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404. El procedimiento de ensayo implica añadir un único reactivo (reactivo CellTiter-Glo®) directamente a las células cultivadas. Esto da como resultado la lisis celular y la generación de una señal luminiscente producida por la reacción de la luciferasa. La señal luminiscente es proporcional a la cantidad de ATP presente, que es directamente proporcional al número de células viables presentes en el cultivo. Se pueden registrar los datos mediante un luminómetro o un dispositivo de formación de imágenes de una cámara CCD. La salida de la luminiscencia se expresa como unidades de luz relativa (ULR).
- En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti CLL-1 o inmunoconjugado para su uso como medicamento. En determinadas realizaciones, se proporciona un anticuerpo anti CLL-1 o inmunoconjugado para su uso en el tratamiento de un cáncer CLL-1 positivo. En determinadas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo anti CLL-1 o inmunoconjugado para su uso en un método para tratar a un individuo que tiene un cáncer CLL-1 positivo, comprendiendo el método administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo anti CLL-1 o inmunoconjugado. En una de tales realizaciones, el método comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación.
- En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti CLL-1 o inmunoconjugado para su uso en un método para tratar un cáncer CLL-1 positivo, comprendiendo el método administrar a un individuo que tiene cáncer CLL-1 positivo una cantidad eficaz del medicamento. En una de tales realizaciones, el método comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación.
- En algunas realizaciones, el cáncer es AML. En una de tales realizaciones, el método comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, como se describe a continuación.
- Un cáncer CLL-1 positivo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores puede ser, por ejemplo, AML CLL-1 positiva, CML CLL-1 positiva, síndrome mielodisplásico (MDS) CLL-1 positivo, leucemia mielomonocítica crónica (CML) CLL-1 positiva, APL CLL-1 positiva, trastorno mieloproliferativo crónico CLL-1 positivo, leucemia trombocítica CLL-1 positiva, pre-B-ALL CLL-1 positiva, preT-ALL CLL-1 positiva, mieloma múltiple CLL-1 positivo, enfermedad de mastocitos CLL-1 positiva, leucemia de mastocitos CLL-1 positiva, sarcoma de mastocitos CLL-1 positivo, sarcomas mieloides CLL-1 positivos, leucemia linfoide CLL-1 positiva y leucemia indiferenciada CLL-1 positiva. En algunas realizaciones, un cáncer CLL-1 positivo es un cáncer que recibe una puntuación de inmunohistoquímica (IHC) o hibridación *in situ* (ISH) anti CLL-1 superior a "0", que corresponde a una tinción muy débil o nula en >90 % de las células tumorales, en las condiciones descritas en el presente documento en el Ejemplo B. En otra realización, un cáncer CLL-1 positivo expresa CLL-1 en un nivel 1+, 2+ o 3+, como se define en las condiciones descritas en el presente documento en el Ejemplo B. En algunas realizaciones, un cáncer CLL-1 positivo es un cáncer que expresa CLL-1 de acuerdo con un ensayo de PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) que detecta el ARNm de CLL-1. En algunas realizaciones, la RT-PCR es una RT-PCR cuantitativa.
- En algunas realizaciones, el trastorno proliferativo celular de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores puede ser, por ejemplo, AML, CML y/o MDS. En algunas realizaciones, el trastorno proliferativo celular CLL-1 positivo es una AML CLL-1 positiva, CML CLL-1 positiva, MDS CLL-1 positivo. En algunas realizaciones, la AML es uno o más del subtipo 1 de AML, subtipo 2 de AML, subtipo 3 de AML, subtipo 4 de AML, subtipo 5 de AML, subtipo 6 de AML y subtipo 7 de AML. En algunas realizaciones, la AML es un subtipo 3 de AML (leucemia promielocítica aguda, APML). En algunas realizaciones, la AML es uno o más del subtipo 1 de AML, subtipo 2 de AML, subtipo 4 de AML, subtipo 5 de AML, subtipo 6 de AML y subtipo 7 de AML, y no el AML 3 de AML.

- En algunas realizaciones, el trastorno proliferativo celular (por ejemplo, cáncer y/o AML CLL-1 positivos) es positivo para la presencia de una mutación en FLT3, nucleofosmina (NPM1), proteína de unión a potenciador/CCAAT alfa (C/EBP α) (CEBPA) y/o c-KIT. En algunas realizaciones, el trastorno proliferativo celular (por ejemplo, cáncer y/o AML CLL-1 positivos) es positivo para la presencia de repeticiones en tandem internas de FLT3. En algunas realizaciones, el trastorno proliferativo celular (por ejemplo, cáncer y/o AML CLL-1 positivos) es positivo para la presencia de mutaciones puntuales del dominio de tirosina cinasa FLT3. En algunas realizaciones, el trastorno proliferativo celular (por ejemplo, cáncer y/o AML CLL-1 positivos) es positivo para la presencia de una mutación en la isocitrato deshidrogenasa 1 y/o 2 (IDH1 y/o IDH2). En algunas realizaciones, el trastorno proliferativo celular (por ejemplo, cáncer y/o AML CLL-1 positivos) es positivo para la presencia de una mutación en la ADN metiltransferasa 3A (DNMT3A). En algunas realizaciones, el trastorno proliferativo celular (por ejemplo, cáncer y/o AML CLL-1 positivos) es NK-AML positivo para la presencia de (a) una mutación en NPM1 y FLT3, (b) NPM1 de tipo natural y FLT3 mutado, y/o (c) NPM1 de tipo natural y FLT3.
- En algunas realizaciones, el trastorno proliferativo celular (por ejemplo, cáncer y/o AML CLL-1 positivos) es una anomalía citogenética positiva tal como una o más de oft(15;17), t(8;21), inv(16), t(16;16), t(9;11)(p22;q23), t(6;9)(p23;q34), inv(3)(q21 q26.2), inv(3)(q21;q26.2), t(1;22)(p13;q13), t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13;1q22), t(16;16)(p13.1;q22) y/o t(15;17)(q22;q12). En algunas realizaciones, el trastorno proliferativo celular (por ejemplo, cáncer y/o AML CLL-1 positivos) es positivo para la presencia de un gen de fusión MLL-AF9 (por ejemplo, translocación MLL-AF9). En algunas realizaciones, el trastorno proliferativo celular (por ejemplo, cáncer y/o AML CLL-1 positivos) es positivo para la presencia de una translocación del cromosoma 11q23. En algunas realizaciones, el trastorno proliferativo celular (por ejemplo, cáncer CLL-1 positivo) es un trastorno proliferativo celular (por ejemplo, cáncer y/o AML CLL-1 positivos) positivo para la presencia de una translocación t(9;11)(p22;q23).
- Un "individuo" de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores puede ser un ser humano.
- En un aspecto adicional, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti CLL-1 o inmunoconjungados proporcionados en el presente documento, por ejemplo, para su uso en cualquiera de los métodos terapéuticos anteriores. En una realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti CLL-1 o inmunoconjungados proporcionados en el presente documento y un portador farmacéuticamente aceptable. En otra realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti CLL-1 o inmunoconjungados proporcionados en el presente documento y al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación.
- Los anticuerpos o inmunoconjungados de la invención se pueden usar tanto solos como junto con otros agentes en una terapia. Por ejemplo, un anticuerpo o inmunoconjungado de la invención puede administrarse conjuntamente con al menos un agente terapéutico adicional. En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es una antraciclina. En algunas realizaciones, la antraciclina es daunorubicina o idarrubicia. En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es citarabina. En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es cladribina. En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es fludarabina o topotecán. En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es 5-azacitidina o decitabina. En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es ATRA (ácido todo *trans*-retinoico). En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es trióxido de arsénico. En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es hidroxiurea. En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es etopósido. En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es mitoxantrona. En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es clofarabina. En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es quizartinib. En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un inhibidor de FLT3, tal como idarutinib. En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un inhibidor de IDH2. En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un inhibidor de CHK1. En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un inhibidor de PIK, tal como volasertib.
- En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos, el agente terapéutico adicional es un inhibidor de BCL2. En algunas realizaciones, el inhibidor de BCL2 es venatoclax.
- En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos, el agente terapéutico adicional es un modificador epigenético. En algunas realizaciones, el modificador epigenético es un inhibidor de histona desacetilasa. En algunas realizaciones, el modificador epigenético es un inhibidor de ADN metiltransferasas I. En algunas realizaciones, el modificador epigenético es un inhibidor de histonas metiltransferasas. En algunas realizaciones, el modificador epigenético es un inhibidor de BET. En algunas realizaciones, el inhibidor de BET se dirige selectivamente al primer bromodominio (BD1). En algunas realizaciones, el inhibidor de BET se dirige selectivamente al segundo bromodominio (BD2). En algunas realizaciones, el inhibidor de BET es uno o más de GSK1210151A, GSK525762, OTX-01, TEN-010, CPI-203 y CPI-0610.
- En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender además una terapia adicional. La terapia adicional puede ser radioterapia, cirugía, quimioterapia, genoterapia, terapia de ADN, terapia vírica, terapia de ARN, inmunoterapia, trasplante de médula ósea, nanoterapia, terapia con anticuerpos monoclonales o una combinación de los anteriores. La terapia adicional puede ser en forma de una terapia adyuvante o neoadyuvante. En algunas realizaciones, la terapia adicional es la administración de inhibidor enzimático de molécula pequeña o un agente antimestastásico. En algunas

- realizaciones, la terapia adicional es la administración de agentes limitantes de efectos secundarios (por ejemplo, agentes pensados para aminorar la aparición y/o gravedad de los efectos secundarios del tratamiento, tales como agentes antináuseas, etc.). En algunas realizaciones, la terapia adicional es radioterapia. En algunas realizaciones, la terapia adicional es cirugía. En algunas realizaciones, la terapia adicional es una combinación de radioterapia y cirugía.
- 5 En algunas realizaciones, la terapia adicional es irradiación gamma. En algunas realizaciones, la terapia adicional es trasplante de células madre. En algunas realizaciones, la terapia adicional puede ser una administración separada de uno o más de los agentes terapéuticos descritos anteriormente.
- 10 En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos, la terapia adicional comprende inmunoterapias contra el cáncer. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos, la inmunoterapia contra el cáncer comprende un antagonista de unión al eje PD-1. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos, la inmunoterapia contra el cáncer comprende un antagonista de unión a PD-1. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos, la inmunoterapia contra el cáncer comprende un antagonista de unión a PD-L1. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos, la terapia de inmunoterapia contra el cáncer comprende un antagonista de unión a PD-L2. En algunas 15 realizaciones de cualquiera de los métodos, la inmunoterapia contra el cáncer comprende inhibición de CTLA-4. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos, la inmunoterapia contra el cáncer comprende agonistas inmunitarios.
- 20 Dichas terapias combinadas indicadas anteriormente abarcan la administración combinada (donde dos o más agentes terapéuticos se incluyen en la misma formulación o en formulaciones separadas) y la administración por separado, en cuyo caso, la administración del anticuerpo o inmunoconjungado de la invención puede producirse antes de, de manera simultánea y/o después de, la administración del agente terapéutico y/o adyuvante adicional. Los anticuerpos o inmunoconjungados de la invención también se pueden usar junto con radioterapia.
- 25 Un anticuerpo o inmunoconjungado de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) se puede administrar por cualquier medio adecuado, incluyendo parenteral, por vía intrapulmonar e intranasal, y, si se desea para un tratamiento local, administración intralesional. Las infusions parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, mediante inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.
- 30 Se contemplan en el presente documento varias pautas de dosificación incluyendo, pero sin limitación, administraciones individuales o múltiples a lo largo de varios instantes, administración de bolo e infusión pulsada.
- 35 Los anticuerpos o inmunoconjungados de la invención podrían formularse, dosificarse y administrarse de una forma acorde con la buena práctica médica. Los factores a tener en cuenta en este contexto incluyen el trastorno particular que se va a tratar, el mamífero particular que se va a tratar, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el lugar donde se va a suministrar el agente, el método de administración, la pauta de administración y otros factores conocidos por los profesionales sanitarios. El anticuerpo o inmunoconjungado no necesita estar formulado, pero opcionalmente se formula con uno o más agentes usados en la actualidad para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo o inmunoconjungado 40 presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores analizados anteriormente. Estos se usan generalmente en las mismas dosis y con las vías de administración que se describen en el presente documento, o aproximadamente del 1 al 99 % de las dosis descritas en el presente documento, o en cualquier dosis y por cualquier vía que se determine empíricamente/clínicamente como apropiada.
- 45 Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosificación adecuada de un anticuerpo o inmunoconjungado de la invención (cuando se usa solo o junto con uno o más agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, del tipo de anticuerpo o inmunoconjungado, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si el anticuerpo o inmunoconjungado se administra con fines preventivos o terapéuticos, la terapia anterior, los antecedentes clínicos del paciente y la respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico responsable del tratamiento. El 50 anticuerpo o inmunoconjungado se administra de manera adecuada al paciente de una vez o a lo largo de una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1 mg/kg-10 mg/kg) de anticuerpo o inmunoconjungado puede ser una dosis candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante infusión continua. Una dosificación diaria habitual estará en el intervalo de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o un período mayor, dependiendo de la afección, se continuará generalmente con el tratamiento hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosificación de ejemplo del anticuerpo o inmunoconjungado estará en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por lo tanto, pueden administrarse al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis pueden administrarse de manera intermitente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de tal modo que el paciente recibe de aproximadamente dos a aproximadamente veinte o, por ejemplo, aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Puede administrarse una dosis de carga inicial más alta, seguida de una o más dosis más bajas. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas posológicas. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.
- 55 60 65 Se entiende que cualquiera de las anteriores formulaciones o métodos terapéuticos puede realizarse usando un

inmunoconjuguado de la invención y un anticuerpo anti CLL-1.

H. Artículos de fabricación

- 5 En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto sobre o asociado al recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, bolsas de solución IV, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. El envase contiene una composición que está sola o combinada con otra
- 10 composición eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar el trastorno y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón que es perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo o inmunoconjuguado de la invención. La etiqueta o el prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer envase con una composición
- 15 contenida en el mismo, en donde la composición comprende un anticuerpo o inmunoconjuguado de la invención; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en donde la composición comprende un agente citotóxico o de otro modo terapéutico adicional. En esta realización de la invención, el artículo de fabricación puede comprender además un prospecto que indica que las composiciones se pueden usar para tratar una afección particular. Como alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o
- 20 tercero) envase que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI, por sus siglas en inglés), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer o solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

25 III. Ejemplos

Los siguientes son ejemplos de métodos y composiciones de la invención. Se entiende que pueden ponerse en práctica diversas realizaciones diferentes, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

30 *Ejemplo 1*

A. Generación de anticuerpos monoclonales

- 35 Se generaron anticuerpos monoclonales contra CLL-1 humano (hu) y de macaco cangrejero (cyno) usando los siguientes procedimientos inmunizando animales con dominio extracelular de CLL-1 humano y cyno recombinante (ECD, aminoácidos de 65-265 huCLL-1 y 65-265 cynoCLL-1) fusionado a una etiqueta en el extremo N (DYKDDDDK) expresada en un sistema de expresión de mamífero. La proteína huCLL1 ECD (aminoácidos 65-265) comprendía un SNP, AAA(Lys, K) 244>CAA(GLN, Q), que tiene una frecuencia de alelos menores (MAF, por sus siglas en inglés) del 29 %.
- 40 Los clones positivos se expandieron y se volvieron a cribar para determinar su unión a huCLL-1 y cynoCLL-1 mediante ELISA y FACS. Se identificaron cinco clones: m3H10, m6E7, m20B1, m21C9 y m28H12 que reaccionaron fuertemente mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) con líneas celulares estables que expresaban huCLL-1 y cynoCLL-1 recombinante, y con CLL-1 procedente tumores expresado en líneas de células tumorales de leucemia mieloide aguda. La alineación de las secuencias de aminoácidos de los dominios variables pesados y ligeros murinos se muestra en la figura 1A y B. m3H10 y m21C9 comparten las mismas CDR de cadena pesada y ligera, solo las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y ligera m21C9 se muestran en la figura 1.
- 45

B. Reactividad cruzada y afinidad de unión entre especies

- 50 Se ensayaron anticuerpos monoclonales para determinar si reaccionan de forma cruzada con el dominio extracelular (ECD) de cynoCLL-1 (que es un 85,07 % idéntico y un 87,35 % similar al ECD de la proteína huCLL-1). La IgG humana anti CLL-1 químérica se capturó con IgG anti humana de ratón recubierta en el chip sensor CM5. Para las mediciones de cinética, se inyectaron diluciones seriadas triples de CLL-1 humano o cyno (4,1 nM a 1000 nM) en tampón HBS-EP. Las tasas de asociación (kasociación) y las tasas de disociación (kdisociación) se calcularon usando un modelo de unión Langmuir simple de uno a uno. La constante de disociación de equilibrio (KD) se calculó como la relación de kdisociación/kasociación. La Tabla 2 a continuación muestra que la versión químérica de los cinco anticuerpos (m3H10, m6E7, m20B1, m21C9 y m28H12) reconoció tanto a huCLL-1 recombinante como a cynoCLL-1 y proporciona detalles sobre la cinética de la interacción con huCLL-1 y cyno-CLL-1. Se realizó una confirmación adicional de la reactividad cruzada con cyno CLL-1 mediante análisis FACS de sangre de macaco cangrejero (origen mauriciano) (datos no mostrados).

Tabla 2. Biacore de anticuerpos anti CLL-1

Ligando	Analito	Ka ($M^{-1}s^{-1}$)	Kd (s^{-1})	KD (M)
ch3H10	huCLL-1-Etiqueta	2,7 x 10 ⁵	2,4 x 10 ⁻³	8,7 nM
	CynoCLL-1-Etiqueta	1,7 x 10 ⁵	7,7 x 10 ⁻⁴	4,3 nM

ch6E7	huCLL-1-Etiqueta	$4,6 \times 10^5$	$4,4 \times 10^{-4}$	0,9 nM
	CynoCLL-1-Etiqueta	$4,0 \times 10^5$	$4,6 \times 10^{-4}$	1,1 nM
ch20B1	huCLL-1-Etiqueta	$2,2 \times 10^5$	$1,0 \times 10^{-3}$	4,5 nM
	CynoCLL-1-Etiqueta	$1,9 \times 10^5$	$1,2 \times 10^{-3}$	6,1 nM
ch21C9	huCLL-1-Etiqueta	$2,5 \times 10^5$	$2,4 \times 10^{-3}$	9,7 nM
	CynoCLL-1-Etiqueta	$1,6 \times 10^5$	$1,2 \times 10^{-3}$	7,1 nM
ch28H12	huCLL-1-Etiqueta	$5,0 \times 10^5$	$9,5 \times 10^{-3}$	18 nM
	CynoCLL-1-Etiqueta	$6,7 \times 10^5$	$2,3 \times 10^{-4}$	0,3 nM

El análisis de Scatchard se realizó siguiendo procedimientos estándar (Holmes *et al.*, Science 256:1205-1210 (1992)) para determinar las afinidades de unión relativas de los anticuerpos, incluyendo ch6E7 y ch21C9.

- 5 Los anticuerpos anti CLL-1 se marcaron con [^{125}I] usando el método de lodogen indirecto. Los anticuerpos anti CLL-1 marcados con [^{125}I] se purificaron a partir de ^{125}I -Na libre mediante filtración en gel usando una columna NAP-5 (GE Healthcare); los anticuerpos anti CLL-1 yodados purificados tenían un intervalo de actividades específicas de 8-10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$. Las mezclas de ensayo de competencia de 50 μl de volumen que contenían una concentración fija de anticuerpo marcado con [^{125}I] y concentraciones decrecientes de anticuerpo no marcado diluido en serie se colocaron en placas de 96 pocillos. Las células HEK293AD que expresan de forma estable huCLL-1 o cynoCLL-1 recombinante o las células tumorales HL-60 que expresan CLL-1 endógeno se cultivaron en medio de crecimiento a 37 °C en CO₂ al 5 %. Las células se desprendieron del matraz usando la solución de disociación celular Sigma y se lavaron con un tampón de unión, que consistía en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con albúmina sérica bovina (BSA) al 1 %, IgG humana 300 mM y azida de sodio al 0,1 %. Las células lavadas se añadieron a las placas de 96 pocillos a una densidad de 100.000 células en 0,2 ml de tampón de unión. La concentración final del anticuerpo marcado con [^{125}I] en cada pocillo fue de -250 pM. La concentración final del anticuerpo no marcado en el ensayo de competición varió de 1000 nM a través de diez etapas de dilución doble hasta un ensayo de solo tampón de 0 nM. Los ensayos de competición se realizaron por triplicado. Los ensayos de competición se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Despues de la incubación durante 2 horas, los ensayos de competición se transfirieron a una placa de filtro Millipore Multiscreen (Billerica, MA) y se lavaron 4 veces con tampón de unión para separar el anticuerpo marcado con [^{125}I] libre del unido. Los filtros se contaron en un contador gamma Wallac Wizard 1470 (PerkinElmer Life and Analytical Sciences Inc.; Wellesley, MA). Los datos de unión se evaluaron usando el programa informático NewLigand (Genentech), que usa el algoritmo de ajuste de Munson y Robard para determinar la afinidad de unión del anticuerpo (Munson y Robard 1980).
- 10
- 15
- 20
- 25

La Tabla 3 muestra la afinidad (intervalo de kD de 0,45-1,2 nM) a huCLL-1 y cynoCLL-1 recombinante expresado por células estables HEK293AD CLL-1 y a células HL-60.

Tabla 3. Afinidad de anticuerpos [kD = nM] a CLL-1 (análisis de Scatchard).

Células		ch6E7	ch21C9
HL-60	K _D (nM)	0,65	0,45
EOL-1	K _D (nM)		
293AD/huCLL-1	K _D (nM)	0,80	0,59
293AD/cynoCLL-1	K _D (nM)	1,0	1,2

30

C. Agrupamiento de epítopos de anticuerpos monoclonales

El agrupamiento de epítopos también se determinó usando un ensayo FACS de unión competitiva basado en células. Las células HL-60 se incubaron previamente con o sin un exceso de 50-100 veces de anticuerpos competitivos no marcados, a continuación se tiñeron con anticuerpos de detección marcados directamente, una reducción de la señal del anticuerpo de detección indica que el anticuerpo competitivo no marcado se une a la misma región o a una similar en CLL-1 que el anticuerpo de detección; esto debería ocurrir cuando se usa el mismo anticuerpo como detector y competidor. Cuando no hay bloqueo de la señal del detector por un anticuerpo no marcado diferente, el anticuerpo no marcado se une a una región diferente en CLL-1.

40

Tabla 4. Experimentos de competición anti CLL-1

Anticuerpos de detección	Anticuerpos competitivo				
	ch6E7	ch20B1	ch21C9	ch28H12	R&D
R&D Systems-PE (Clon 687317)	✓	X	✓	X	✓
ch6E7-DyLight650	✓	X	n/d	X	n/d

(continuación)

	Anticuerpos competitivo				
ch28H12-DyLight650	n/d	X	n/d	✓	n/d
ch21C9-DyLight650	✓	X	✓	X	✓
eBioscience HB3-PE	X	X	X	X	✓
BD Biosciences 50C1-PE	X	X	X	X	X

La Tabla 4 muestra la agrupación de epítopos de los anticuerpos contra CLL-1. ch6E7 y ch21C9, pero no ch20B1 y ch28H12, se unieron con R&D Systems-PE (clon 687317). R&D Systems también bloqueó el clon HB3 de eBioscience, pero ch6E7 y ch21C9 no pudieron bloquear la unión del clon HB3 de eBioscience. ch20B1 y ch28H12 no pudieron competir con ningún otro anticuerpo, lo que sugiere que cada anticuerpo se une a un epítopo distinto. Todos los anticuerpos no pudieron competir con el clon 50C1 de BD Biosciences, lo que también sugiere que se une a un epítopo distinto.

10 D. Humanización de anticuerpos anti CLL-1

El anticuerpo monoclonal 6E7 y 21C9 se humanizó como se describe a continuación. Los números de residuos se calculan de acuerdo con Kabat *et al.*, Sequences of proteins of immunological interest, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991).

15 Las variantes construidas durante la humanización de 6E7 y 21C9 se evaluaron en forma de IgG. Los dominios VL y VH de 6E7 y 21C9 murinos se alinearon con las secuencias consenso VL kappa I (VLKI) y subgrupo I de VH (VHI) humanas. Las regiones hipervariables de los anticuerpos murinos se genomanipularon en marcos aceptores de VLKI y VHI. Específicamente, del dominio VL de mu6E7 y mu21C9, las posiciones 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) se injertaron en VLKI y del dominio VH de mu6E7 y mu21C9, las posiciones 26-35 (H1), 50-65 (H2) y 93-102 (H3) se injertaron en VHI.

20 La afinidad de unión de los anticuerpos en esta sección se determinó mediante el formato BIACore™ T200. Brevemente, los chips CM5 de grado de investigación BIACore™ se activaron con reactivos de 1-etyl-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se acoplaron IgG anti Fc humano de cabra a los chips para lograr aproximadamente 10.000 unidades de respuesta (UR) en cada celda de flujo. Los grupos de acoplamiento que no reaccionaron se bloquearon con etanolamina 1 M. Para las mediciones de cinética, se capturaron anticuerpos para lograr aproximadamente 300 UR. Se inyectaron diluciones seriadas triples de CLL-1 humano en tampón HBS-P (HEPES 0,01 M a pH 7,4, NaCl 0,15 M, tensioactivo P20 al 0,005 %) a 25 °C con un caudal de 30 µl/min. Las tasas de asociación (kasociación) y de disociación (kdisociación) se calcularon usando un modelo de unión de Langmuir 1:1 (programa informático de evaluación BIACore™ T200, versión 2.0). La constante de disociación de equilibrio (Kd) se calculó como la relación de kdisociación/kasociación.

25 30 La afinidad de unión del anticuerpo 6E7 humanizado con injerto de CDR se comparó con el 6E7 químérico. Se realizaron variantes adicionales del anticuerpo 6E7 humanizado con injerto de CDR para evaluar la contribución de otras posiciones de Vernier a la unión a CLL-1. Para 6E7, inicialmente cuatro cadenas ligeras adicionales (L1: injerto de CDR + (L4, L48 y K49), L2: injerto de CDR + L4, L3: injerto de CDR + K49, y L4: injerto de CDR + K49) y cinco cadenas pesadas adicionales (H1: injerto de CDR + (A67, L69, V71, K73), H2: injerto de CDR + A67, H3: injerto de CDR + L69, H4: injerto de CDR + V71, y H5: injerto de CDR + K73). K49 en la cadena ligera fue el residuo clave de vernier de ratón, y se determinó que L69 y V71 en la cadena pesada eran los residuos de Vernier de ratón clave según el análisis mutacional (datos no mostrados). El 6E7 químérico se unió con una KD de 9,59E-10M, mientras que los injertos de CDR + K49(LC) + (A67, L69, V71, K73 (HC)), injertos de CDR + K49(LC) + (L69, V71 (HC)) se unieron con una KD de 1,40E-9M y 1,37E-9M, respectivamente.

35 40 45 La afinidad de unión del anticuerpo 21C9 humanizado con injerto de CDR se comparó con el anticuerpo 21C9 químérico. Se realizaron variantes adicionales del anticuerpo 21C9 humanizado con injerto de CDR para evaluar la contribución de otras posiciones de Vernier a la unión a CLL-1. Para 21C9, inicialmente tres cadenas ligeras adicionales (L1: injerto de CDR + (F36 y S43), L2: injerto de CDR + F36, L3: injerto de CDR + S43) y cinco cadenas pesadas adicionales (H1: injerto de CDR + (A67, L69, V71, K73), H2: injerto de CDR + A67, H3: injerto de CDR + L69, H4: injerto de CDR + V71, y H5: injerto de CDR + K73). F36 en la cadena ligera fue el residuo de Vernier de ratón clave. El 21C9 químérico se unió con una KD de 8,615E-9M, mientras que los injertos de CDR + (F36 y S43(LC)) + L69 (HC) y los injertos de CDR + F36 (LC) + L69 (HC), se unieron con una KD de 1,053E-8M y 9,785-9M, respectivamente. Se determinó que L69 en la cadena pesada eran los residuos de Vernier de ratón clave.

50 55 60 Se ensayaron los 6E7.L4H1e y 21C9.L2H3 humanizados para determinar su capacidad de unirse a CLL-1 humana y cyno como se ha descrito anteriormente, excepto que cynoCLL-1 reemplazó a huCLL-1 en el ensayo de unión de cyno. Las propiedades de unión de los anticuerpos humanizados se muestran a continuación en la Tabla 5. La afinidad de unión del 6E7.L4H1e humanizado fue de 0,34, 0,29, 0,22 y 0,35 Kd (nM) según lo determinado por Scatchard usando células HL-60, EOL-1, 293AD/cynoCLL1 y 293AD/huCLL-1, respectivamente. La afinidad de unión del

ES 2 989 338 T3

21C9.L2H3 humanizado fue de 1,3, 0,74, 2,4 y 3,6 Kd (nM) según lo determinado por Scatchard usando células HL-60, EOL-1, 293AD/cynoCLL1 y 293AD/huCLL-1, respectivamente.

Tabla 5

Anticuerpo	huKD (M)	huka (1/Ms)	hukd (1/s)	cynoKD (M)	cynoka (1/Ms)	cynokd (1/s)
6E7.L4H1e	6,218E-10	8,236E+5	5,121E-4	3,170E-10	7,391E+5	2,343E-4
21C9.L2H3	1,171E-8	2,244E+5	2,628E-3	9,472E-9	1,683E+5	1,594E-3

- 5 Los anticuerpos humanizados 6E7.L4H1e y 21C9.L2H3 se ensayaron bajo estrés térmico (40 °C, pH 5,5, 2 semanas) y análisis de clorhidrato de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (AA�). Las muestras se sometieron a estrés térmico para imitar la estabilidad durante la semivida del producto. Las muestras se intercambiaron con tampón en acetato de His 20 mM, sacarosa 240 mM, pH 5,5 y se diluyeron a una concentración de 1 mg/ml. Un ml de muestra se sometió a estrés a 40 °C durante 2 semanas y un segundo ml se almacenó a -70 °C como control. A continuación, ambas 10 muestras se dirigieron usando tripsina para crear péptidos que pudieran analizarse mediante análisis de cromatografía líquida (LC) - espectrometría de masas (MS). Para cada péptido en el tiempo de retención de la muestra, a partir de la LC, así como de alto rendimiento, se adquirieron en la MS la masa precisa e información de la fragmentación de 15 iones peptídicos (información de secuencias de aminoácidos). Se tomaron cromatogramas de iones extraídos (XIC) para los péptidos de interés (iones de péptidos naturales y modificados) de los conjuntos de datos en una ventana de +10 ppm y se integraron los picos para determinar el área. Los porcentajes relativos de modificación se calcularon para cada muestra tomando el (área del péptido modificado) dividido por (área del péptido modificado más el área del péptido natural) multiplicado por 100.
- 20 Tanto 6E7.L4H1e como h21C9.L2H3 tienen N⁵⁴G⁵⁵ en DR-H2, que es susceptible a la desaminación (10 = 13,2 % y t_{2wk} al 14,5 % para 6E7.L4H1e y r₀ = 11 % y t_{2wk} = 11,9 %). Se ensayaron las variantes N54 de ambos anticuerpos para determinar si se podía reducir la posible desaminación sin afectar la unión a huCLL-1 y cynoCLL-1. Véase la Tabla 6.

Tabla 6

Anticuerpo	huKD (M)	huka (1/Ms)	hukd (1/s)	cynoKD (M)	cynoka (1/Ms)	cynokd (1/s)
6E7.L4H1eN54	1,082E-9	9,096E+5	9,837E-4	2,256E-9	8,044E+5	1,815E-3
6E7.L4H1eA54	3,082E-9	7,103E+5	2,189E-3	3,143E-9	6,087E+5	1,913E-3
6E7.L4H1eE54	5,090E-9	4,882E+5	2,485E-3	4,256E-9	6,641E+5	2,827E-3
6E7.L4H1eS54	1,413E-8	5,098E+5	7,205E-3	6,371E-9	5,133E+5	3,270E-3
6E7.L4H1eD54	1,132E-7	3,044E+5	3,444E-2	4,870E-8	1,785E+5	8,694E-3
21C9.L2H3N54	1,510E-8	1,889E+5	2,853E-3	9,302E-9	2,358E+5	2,194E-3
21C9.L2H3S54	2,859E-7	1,416E+5	4,047E-2	5,669E-6	3656	2,072E-2
21C9.L2H3A54	6,215E-7	1,113E+5	6,915E-2	4,818E-5	445,3	2,146E-2
21C9.L2H3E54	8,625E-7	1,022E+5	8,816E-2	4,961E-5	747,5	3,709E-2
21C9.L2H3D54	8,017E-7	2,858E+5	2,291E-2	2,172E-7	4,072E+4	8,846E-3

- 25 Para las variantes de anticuerpo humanizado 6E7.L4H1e CDR-H2 N54, A54 tenía características de unión aceptables que eran más similares a N54. Para las variantes de anticuerpo humanizado 21C9.L2H3 CDR-H2 N54, todas las variantes mostraron un descenso en la afinidad a huCLL-1 en la tasa de asociación (10-30 veces) y cynoCLL-1 en la tasa de disociación (60-500 veces). La afinidad de unión del 6E7.L4H1c humanizado fue de 0,67, 0,68, 0,6 y 0,25 Kd (nM) según lo determinado por Scatchard usando células 293AD/cynoCLL1, 293AD/huCLL-1, HL-60 y EOL-1, respectivamente. La afinidad de unión del 6E7.L4H1eN54A humanizado fue de 0,9, 0,89, 0,64 y 0,32 Kd (nM) según lo determinado por Scatchard usando células 293AD/cynoCLL1, 293AD/huCLL-1, HL-60 y EOL-1, respectivamente. La alineación de las secuencias de aminoácidos de los dominios variables pesado y ligero de los anticuerpos humanizados 6E7 y 21C9 se muestra en la figura 2A-B y la figura 3A-B, respectivamente.

E. Mapeo de epítopos

- 40 Para determinar el epítopo de unión del CLL-1, se realizó el examen de (a) CLL-1 de antígeno libre y (b) tres complejos de antígeno-mAb diferentes usando técnicas de huella de radicales hidroxilo (HRF). Las muestras se expusieron a radicales hidroxilo durante intervalos de 0, 10, 15 y 20 milisegundos (ms) usando la línea de haz X28c en el Brookhaven National Laboratory. Las muestras marcadas se sometieron a desglucosilación usando PNGase F. Primero se realizó un experimento piloto en las muestras desglucosiladas para optimizar el protocolo experimental. La investigación piloto usando MS reveló que las muestras contenían una cantidad significativa de contaminación polimérica, lo que requirió una limpieza adicional. Para eliminar la contaminación polimérica, las muestras se precipitaron usando ácido tricloroacético en acetona y se sometieron a un análisis por LC-MS. La etapa de precipitación fue exitosa y la señal de contaminación polimérica en la MS se atenuó significativamente. Las muestras limpias se sometieron a reducción y alquilación, digestión usando tripsina, seguida de cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas de alto rendimiento (LC-MS). Los datos de MS se analizaron usando ProtMapMS, lo que dio como resultado gráficos de respuesta a la dosis para cada péptido. Los resultados del antígeno libre se compararon con cada una de las formas complejas. Se generó un modelo basado en homología del antígeno usando el programa

informático Swiss-Model, y las regiones protegidas por disolvente se mapearon para cada uno de los tres complejos.

- La cobertura de secuencia general obtenida usando el mapeo de tripsina fue del 90,05 %. Las regiones faltantes estaban compuestas principalmente por péptidos trípticos que tenían una longitud menor a 4 residuos, que pueden ser inherentemente difíciles de detectar debido a sus débiles propiedades de retención en la columna LC. El proceso HRF introduce modificaciones oxidativas estables de la cadena lateral que dan como resultado cambios de masa específicos, que se identificaron a partir de los datos de espectrometría de masas en tandem. Los cromatogramas de 5 iones seleccionados (SIC) se extrajeron y se integraron para las formas no oxidadas y oxidadas del ion peptídico (con una relación m/z particular). Estos valores de área de pico se usaron para caracterizar la cinética de la reacción en 10 forma de gráficos de respuesta a la dosis (DR), que miden la pérdida de péptido intacto en función de la exposición a radicales hidroxilo. Las regiones protegidas por disolvente en el complejo experimentan una reacción de oxidación gradual a diferencia del antígeno libre. Las diferencias en la tasa de oxidación (denominada constante de velocidad, 15 RC) sirven para destacar la ubicación del epítopo.
- Se usó ProtMapMS para procesar los datos de MS, lo que dio como resultado valores de RC para cada péptido. Los resultados finales se muestran en la Tabla 1. La ubicación del péptido y la secuencia correspondiente se muestran en las columnas 1 y 2. La tercera columna muestra la relación de protección, PR (=RCAntígeno/RCComplejo) para el 20 complejo 1 (anticuerpo 6E7.L4H1eA54 y antígeno CLL-1). De manera similar, la cuarta y quinta columnas muestran las relaciones de protección correspondientes para el complejo 2 (anticuerpo 21C9.L2H3 genomanipulado con una cadena ligera que comprende un residuo de cisteína en K149 de acuerdo con la numeración de Kabat (K149C) y 25 antígeno CLL-1) y el complejo 3 (anticuerpo anti CLL1 monoclonal de R&D Systems (clon 687317) y antígeno CLL-1). Si el valor de PR para un péptido dado para un particular es inferior a 1, la región correspondiente experimentó una ganancia en la accesibilidad al disolvente debido a los cambios estructurales introducidos durante la formación del complejo. Un valor de PR cercano a 1 indica que la accesibilidad al disolvente de la región permanece inalterada, 30 mientras que una PR >1 sugiere que la región correspondiente exhibe protección del disolvente en función de la formación del complejo. Los valores de PR para la mayoría de los péptidos para cada complejo son cercanos a 1, lo que indica un cambio mínimo en la accesibilidad al disolvente para las regiones correspondientes. El péptido 142-158 muestra consistentemente el valor de PR más alto para los tres anticuerpos, lo que implica una protección significativa para la región. Además de la protección del péptido 142-158, el anticuerpo monoclonal anti CLL1 de R&D Systems (clon 687317, a diferencia de 6E7.L4H1eAG y 21C9.L2H3, también mostró una protección significativa de la región 103-116 como lo evidencian los péptidos superpuestos 103-116 y 105-116.

Ubicación de los péptidos de SEQ ID NO:1	Secuencia	SEQ ID NO:	RCA/RC1	RCA/RC2	RCA/RC3
65-69	DYKDDDDKLEHVTLK	52	1,4	1,0	1,0
68-69	DDDDKLEHVTLK	53	1,1	0,9	0,8
75-87	MNKLQNISEELQR	54	1,4	1,1	0,90
78-87	LQNISEELQR	55	1,3	1,0	0,8
88-102	NISLQLMSNMNISNK	56	1,1	0,5	0,5
103-116	IRNLSTTLQTIATK	50	1,1	0,8	2,1
105-116	NLSTTLQTIATK	51	1,2	1,0	2,2
105-119*	NLSTTLQTIATKLCR	57	ND	ND	ND
120-124*	ELYSK	58	ND	ND	ND
137-141	WIWHK	59	1,0	0,6	1,3
142-158	DSCYFLSDDVQTWQESK	49	3,1	2,0	3,1
159-160	MACAAQNASLLK	60	1,0	1,2	0,8
171-181	INNIKNALEFIK	61	1,7	1,3	1,1
175-181	NALEFIK	62	1,3	1,0	1,3
175-185*	NALEFIKSQSR	63	ND	ND	ND
186-201	SYDYWLGLSPEEDSTR	64	1,0	1,0	1,0
186-204*	SYDYWLGLSPEEDSTRGM R	65	ND	ND	ND
205-117	VDNIIINSSAWIR	66	1,2	1,0	1,0
218-232	NAPDLNNMYCGYINR	67	1,2	1,0	0,9
233-243	LYVQYYHCTYK	68	1,0	1,1	1,0
246-250*	MICEK	69	ND	ND	ND
251-263	MANPVQLGSTYFR	70	0,99	1,1	1,0

F. Internalización del anticuerpo anti CLL-1

- Un atributo deseable de una diana ADC es la capacidad de internalizar el anticuerpo en un compartimento degradativo en la célula. Para determinar si el anticuerpo anti CLL-1 se internaliza tras la unión, las células HL-60 o HL-60 se incubaron previamente durante 2 horas a 37 °C con 0,3 mg/ml de hIgG en medio RPMI para reducir la unión no específica a FcR antes de sembrarlas en portaobjetos de cámara de 4 pocillos tratados con cultivo celular (Nalge Nunc 35

International). El anticuerpo conjugado directamente con Dylight 488 a una concentración final de 1 µg/ml se incubó con células bloqueadas con hlgG en hielo durante 30 minutos en la oscuridad. Las células se fotografiaron inmediatamente para mostrar la tinción de la membrana (T0) seguido de una fotografía con lapso de tiempo durante un período de 10 horas a 37 °C con un microscopio confocal Leica SP5. Un ejemplo representativo, ch21C9, es rápidamente internalizado en 30 minutos por las células HL-60 (datos no mostrados). La ubicación de ch21C9 en el lisosoma se confirmó usando un ensayo basado en células *in vitro* que mide la capacidad de un conjugado de anticuerpo-fármaco para destruir células diana.

5 *G. Producción de conjugados de anticuerpo anti CLL-1-fármaco*

10 Para la producción de anticuerpos a mayor escala, los anticuerpos se produjeron en células CHO. Los vectores que codifican VL y VH se transfecaron en células CHO y la IgG se purificó a partir de medios de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad con proteína A.

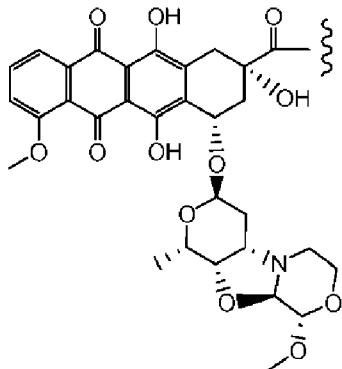
15 Los conjugados de anticuerpo anti CLL-1-fármaco (ADC) se produjeron conjugando los anticuerpos ch21C9, ch3H10, ch28H12, ch20B1, ch6E7, 6E7.L4H1e, 6E7.L4H1eA54, 21C9.L2H3 a través de enlaces a derivados de PBD y PNU.

20 Según se aislaron inicialmente, los residuos de cisteína genomanipulados de los anticuerpos existen como disulfuros mixtos con tioles celulares (por ejemplo, glutatión) y, por lo tanto, no están disponibles para la conjugación. La reducción parcial de estos anticuerpos (por ejemplo, con DTT), la purificación y la reoxidación con ácido deshidroascórbico (DHAA) proporciona anticuerpos con grupos sulfhidrilo de cisteína libre disponibles para la conjugación, como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, en Junutula *et al.* (2008) Nat. Biotechnol. 26:925-932 y el documento US 2011/0301334. Brevemente, los anticuerpos se combinaron con el resto de fármaco-enlazado para permitir la conjugación del resto de fármaco-enlazador con los residuos de cisteína libre del anticuerpo. Después de 25 varias horas, los ADC se purificaron.

25 *H. Eficacia de los conjugados de anticuerpo anti CLL-1-fármaco en modelos de xenoinjerto de líneas celulares de leucemia mieloide aguda humana HL-60 y EOL-1*

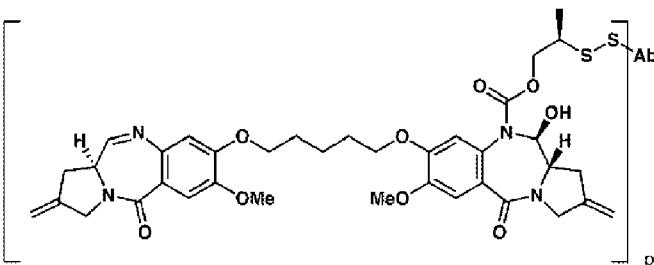
30 Se investigó la eficacia de los ADC anti CLL-1 usando modelos de xenoinjerto de leucemia mieloide aguda humana, HL-60 (subtipo M2 de AML) y EOL-1 (subtipo M4a de AML). Ambos están asociados con un pronóstico intermedio a malo como resultado de su genética y aberraciones moleculares. Ratones SCID C.B-17 hembra (Charles River Laboratories; Hollister, CA) se inocularon cada uno por vía subcutánea en el área del costado con cinco millones de células de HL-60 o EOL-1. Cuando los tumores del xenoinjerto alcanzaron un volumen tumoral promedio de 100-300 mm³ (denominado Día 0), los animales se asignaron al azar en grupos de 7-10 ratones cada uno y recibieron una única inyección intravenosa de los ADC. Aproximadamente 4 horas antes de la administración de los ADC, los animales recibieron una dosis por vía intraperitoneal de una cantidad en exceso (30 mg/kg) de anticuerpo de control anti gD para bloquear posibles sitios de unión de anticuerpos no específicos en las células tumorales. Los tumores y el peso corporal de los ratones se midieron 1-2 veces una semana a lo largo del estudio. Los ratones se sacrificaron de inmediato cuando la pérdida de peso corporal fue >20 % de su peso inicial. Todos los animales se sacrificaron antes de que los tumores alcanzaran 3.000 mm³ o mostraran signos de ulceración inminente. La presencia de los anticuerpos se confirmó mediante hemorragias de PK 1, 7 y 14 días posteriores a la inyección.

40 Como se muestra en la figura 4, 21C9, ch28H12, ch20B1, ch6E7 y ch3H10 conjugados con el resto farmacológico de PNU:



50 a través de una cisteína libre en el aminoácido de cadena pesada 118 de acuerdo con la numeración EU (A118C) redujeron significativamente el volumen del tumor EOL-1 mientras que ch20B1 redujo moderadamente el volumen del tumor y ch28H12 tuvo poco efecto. Se observaron resultados similares usando HL-60, como se muestra en la figura 5.

Los anticuerpos humanizados, 6E7.L4H1e y 21C9.L2H3, se conjugaron con derivados de PBD (SG34) a través de diferentes sitios de conjugación genomanipulados con cisteína en varias dosis (10 y 20 µg/m²). Los anticuerpos comprendían una cisteína libre genomanipulada en el aminoácido de cadena pesada 118 de acuerdo con la numeración EU (A118C) o el aminoácido de cadena ligera 149 de acuerdo con la numeración de Kabat (K149C). Las estructuras de los conjugados de anticuerpo-fármaco se muestran a continuación:

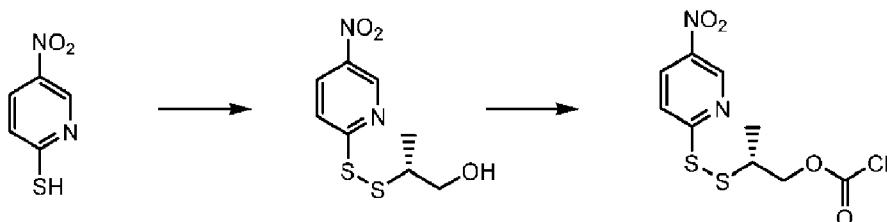


Como se muestra en la figura 6 en el modelo de xenoinjerto HL-60, el inmunoconjugado genomanipulado con cisteína K149C de cadena ligera que comprende 6E7L4H1e o 21C9.L2H3 mostró una mayor reducción en el volumen tumoral que el inmunoconjugado genomanipulado con cisteína A118C de cadena pesada que comprende 6E7.L4H1e o 21C9.L2H3.

También se comparó la capacidad de reducir el volumen tumoral entre 6E7.L4H1e y la variante genomanipulada para eliminar el sitio de desaminación potencial 6E7.L4H1eA54 para determinar si se conservaba la actividad y la unión del anticuerpo. Como se muestra en la figura 7, tanto 6E7L4H1e como 6E7 redujeron significativamente el volumen tumoral en el modelo de xenoinjerto HL-60.

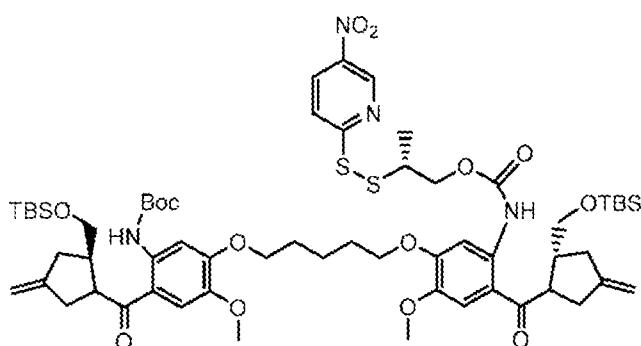
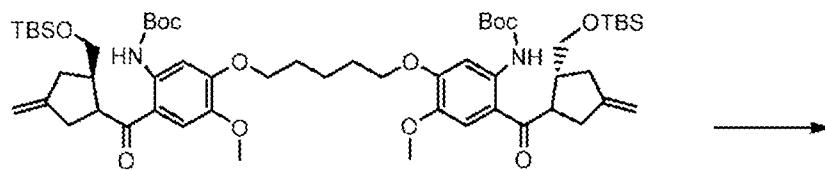
Ejemplo 2. Síntesis de intermedios de fármaco-enlazador (LD) usados para elaborar los conjugados de anticuerpo-fármaco ilustrados en la (Tabla A).

Intermedio de enlazador-fármaco de ADC-51: (11S,11aS)-11-hidroxi-7-metoxi-8-((5-((S)-7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,5,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-2-metilen-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (R)-2-((5-nitropiridin-2-il)disulfanil)propilo (MS (ESI): 875 [M+H]⁺) se preparó mediante los procedimientos del documento WO2013/055987.

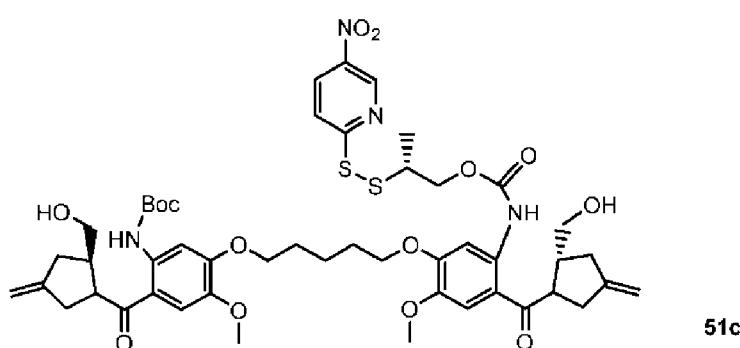


Se añadió gota a gota cloruro de sulfurilo (2,35 ml de una solución 1,0 M en DCM, 2,35 mmol) a una suspensión agitada de 5-nitropiridin-2-tiol (334 mg, 2,14 mmol) en DCM seco (7,5 ml) a 0 °C (hielo/acetona) en una atmósfera de argón. La mezcla de reacción pasó de una suspensión de color amarillo a una solución de color amarillo y se dejó calentar a temperatura ambiente y a continuación se agitó durante 2 horas, después de lo cual el disolvente se eliminó por evaporación al vacío para proporcionar un sólido de color amarillo. El sólido se disolvió de nuevo en DCM (15 ml) y se trató gota a gota con una solución de (R)-2-mercaptopropan-1-ol (213 mg, 2,31 mmol) en DCM seco (7,5 ml) a 0 °C en una atmósfera de argón. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 20 horas, momento en el que el análisis por LC/MS reveló una formación sustancial de producto a un tiempo de retención de 1,41 minutos (ES+) m/z 247 ([M+ H]⁺, ~100 % de intensidad relativa). El precipitado se eliminó por filtración y el filtrado se evaporó al vacío para dar un sólido de color naranja que se trató con H₂O (20 ml) y se basificó con una solución de hidróxido de amonio. La mezcla se extrajo con DCM (3 x 25 ml) y los extractos combinados se lavaron con H₂O (20 ml), salmuera (20 ml), se secaron (MgSO₄), se filtraron y se evaporaron al vacío para dar el producto en bruto. La purificación por cromatografía ultrarrápida (elución en gradiente en aumentos del 1 %: DCM al 100 % a 98:2 v/v de DCM/MeOH) dio (R)-2-((5-nitropiridin-2-il)disulfanil)propan-1-ol en forma de un aceite (111 mg, 21 % de rendimiento).

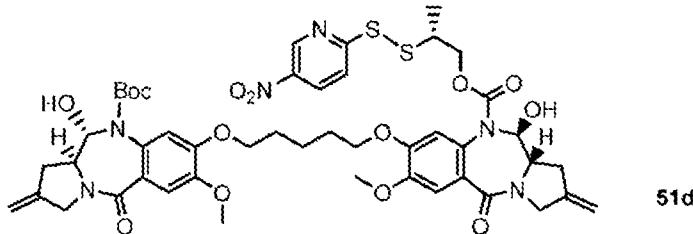
Se añadió trifosgeno (48 mg, 0,16 mmol) a una solución agitada de (R)-2-((5-nitropiridin-2-il)disulfanil)propan-1-ol (111 mg, 0,45 mmol) y piridina (34 µl, 33,5 mg, 0,42 mmol) en DCM seco (5 ml). La mezcla de reacción se dejó en agitación en una atmósfera de argón durante 45 minutos, después de lo cual el disolvente se eliminó por evaporación al vacío para proporcionar carbonoclorhidrato de (R)-2-((5-nitropiridin-2-il)disulfanil)propilo en forma de una película de color amarillo. El producto pasó a la siguiente etapa sin purificación ni análisis.



Se añadió gota a gota una solución de carbonoclorhidrato de (*R*)-2-((5-nitropiridin-2-il)disulfani)propilo (-139 mg, 0,45 mmol) en DCM seco (5 ml) a una solución agitada de ((pentano-1,5-diilbis(oxi))bis(6-((2*R*)-2-(((terc-butildimethylsili)oxi)methyl)-4-metileneciclopentano-1-carbonil)-4-metoxi-3,1-fenilen))dicarbamato de di-*terc*-butilo 51a, elaborada mediante los procedimientos del Ejemplo 1 en el documento WO 2013/055987, (430 mg, ~0,45 mmol) y piridina (40 μ l, 39 mg, 0,49 mmol) en DCM seco (12 ml) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se dejó en agitación en una atmósfera de argón durante 2,5 horas, momento en el que el análisis por LC/MS reveló una formación de producto sustancial a un tiempo de retención de 2,42 minutos (ES+) m/z 1226 ([M+ H]⁺, ~20 % de intensidad relativa), 1248 ([M+ Na]⁺, ~60 % de intensidad relativa). La mezcla se diluyó con DCM (20 ml) y se trató con SiO₂ y el disolvente se eliminó por evaporación al vacío. El residuo resultante se sometió a purificación por cromatografía ultrarrápida (elución en gradiente en aumentos del 10 %: 80:20 v/v de hexano/EtOAc a 70:30 v/v de hexano/EtOAc) para dar (2-((S)-2-(((terc-butildimethylsili)oxi)methyl)-4-metilenpirrolidin-1-carbonil)-5-((5-(4-((S)-2-((terc-butildimethylsili)oxi)methyl)-4-metilenpirrolidin-1-carbonil)-2-metoxi-5-(((R)-2-((5-nitropiridin-2-il)disulfani)propoxi)carbonil)amino)fenoxy)pentil)oxi)-4-metoxifenil)carbamato de *terc*-butilo 51b en forma de una espuma de color amarillo (419 mg, 76 % de rendimiento). (MS (ESI): 1224 [M+H]⁺)



Se añadió ácido acético glacial (24 ml) a una solución agitada del 51b protegido con TBS (419 mg, 0,34 mmol) en THF (8 ml) y H₂O (8 ml). La mezcla de reacción se dejó en agitación durante 16 horas, momento en el que el análisis por LC/MS reveló la finalización de la reacción con un producto deseado observado a un tiempo de retención de 1,82 minutos (ES+) m/z 997 ([M+ H]⁺, ~100 % de intensidad relativa), 1019 ([M+ Na]⁺, ~45 % de intensidad relativa). La mezcla de reacción se añadió gota a gota a una solución saturada enfriada (0-5 °C) de NaHCO₃ (400 ml). La solución neutra se dejó calentar a temperatura ambiente y se extrajo con EtOAc (4 x 100 ml), las capas orgánicas combinadas se lavaron con H₂O (80 ml), salmuera (100 ml), se secaron (MgSO₄), se filtraron y se evaporaron al vacío para dar el producto en bruto. La purificación por cromatografía ultrarrápida (elución en gradiente en aumentos del 1 %: DCM al 100 % a 98:2 v/v de DCM/MeOH) dio (2-((S)-2-(hidroximetil)-4-metilenpirrolidin-1-carbonil)-5-((5-(4-((S)-2-(hidroximetil)-4-metilenpirrolidin-1-carbonil)-2-metoxi-5-(((R)-2-((5-nitropiridin-2-il)disulfani)propoxi)carbonil)amino)fenoxy)pentil)oxi)-4-metoxifenil)carbamato de *terc*-butilo 51c en forma de una espuma de color amarillento (341 mg, 100 % de rendimiento). (MS (ESI): 995 [M+H]⁺).



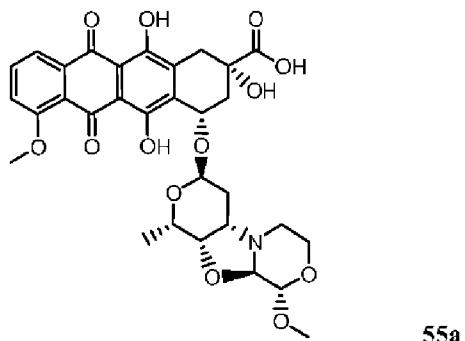
Se añadió gota a gota una solución de DMSO anhidro (107 μ l, 188 mg, 1,50 mmol) en DCM seco (7,5 ml) a una solución agitada de cloruro de oxalilo (410 μ l de una solución 2,0 M en DCM, 0,82 mmol) en DCM seco (7,5 ml) a -

- 5 45 °C (hielo seco/CH₃CN) en una atmósfera de argón. Después de 15 minutos de agitación a -45 °C, la mezcla de reacción se trató gota a gota con una solución de 51c (341 mg, 0,34 mmol) en DCM seco (15 ml). Después de la agitación a -45 °C durante 1 hora más, la mezcla de reacción se trató gota a gota con una solución de TEA (476 μ l, 342 mg, 3,42 mmol) en DCM seco (7,5 ml). La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente durante un período de 1,5 horas y se diluyó con DCM (50 ml), a continuación se lavó con NH₄Cl saturado (15 ml), NaHCO₃ saturado (15 ml), salmuera (15 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó al vacío para dar el producto en bruto. La purificación por cromatografía ultrarrápida (elución en gradiente en aumentos del 0,4 %: DCM al 100 % a 98,4:1,6 v/v de DCM/MeOH) dio (11S,11aS)-11-hidroxi-8-((5-(((11S,11aS)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metilen-10-((R)-2-((5-nitropiridin-2-il)disulfanil)propoxi)carbonil)-5-oxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-benzo[e]pirrolo[11,2-a][1,4]diazepin-8(5H)-oxi)pentil)oxi)-7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de terc-butilo 51d en forma de una espuma de color amarillento (227 mg, 67 % de rendimiento): Tiempo de retención de LC/MS 1,69 minutos (ES+) *m/z* 993 ([M+ H]⁺, ~80 % de intensidad relativa), 1015 ([M+ Na]⁺, ~20 % de intensidad relativa).

- 20 Se añadió una solución de 95:5 v/v de TFA/H₂O (4 ml) a una muestra en bruto de 51d (216 mg, 0,22 mmol) a 0 °C (hielo/acetona). Después de la agitación a 0 °C durante 30 minutos, la reacción se consideró completa como se determinó por LC/MS, pico de producto deseado a un tiempo de retención de 1,60 minutos (ES+) *m/z* 875 ([M+ H]⁺, ~100 % de intensidad relativa). La mezcla de reacción se mantuvo fría y se añadió gota a gota a una solución acuosa saturada enfriada de NaHCO₃ (100 ml). La mezcla se extrajo con DCM (3 x 30 ml) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (50 ml), se secaron (MgSO₄), se filtraron y se evaporaron al vacío para proporcionar el producto en bruto. La purificación por cromatografía ultrarrápida (elución en gradiente en aumentos del 0,4 %: CHCl₃ al 100 % a 98,4:1,6 v/v de CHCl₃/MeOH) dio LD-51 en forma de una espuma de color amarillo (127 mg, 66 % de rendimiento): LC/MS (15 minutos de ejecución), tiempo de retención 6,18 minutos (ES+) *m/z* 875 ([M+ H]⁺, ~100 % de intensidad relativa); ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 9,21 (s, 1H), 8,30 (d, 1H, *J* = 8,8 Hz), 7,69 (d, 1H, *J* = 4,5 Hz), 7,62 (d, 1H, *J* = 8,9 Hz), 7,49 (s, 1H), 7,25 (s, 1H), 6,79 (s, 1H), 6,74 (s, 1H), 5,58 (dd, 1H, *J* = 4,4, 9,8 Hz), 5,22-5,10 (m, 4H), 4,43 (d, 1H, *J* = 3,7 Hz), 4,33-4,25 (m, 4H), 4,15-3,98 (m, 5H), 3,95-3,80 (m, 7H), 3,68-3,59 (m, 1H), 3,20-3,07 (m, 2H), 2,99-2,87 (m, 2H), 2,76-2,68 (m, 2H), 1,99-1,83 (m, 4H), 1,72-1,57 (m, 2H), 1,19 (d, 3H, *J* = 6,6 Hz).

- 35 Intermedio de enlazador-fármaco de ADC-52: (2,5-bis((E)-3-((S)-1-(clorometil)-5-(fosfonooxi)-1,2-dihidro-3H-benzo[e]indol-3-il)-3-oxoprop-1-en-1-il)fenil)carbamato de 2-((5-nitropiridin-2-il)disulfanil)propilo (MS (ESI): 1098 [M+H]⁺) se preparó mediante los procedimientos del documento WO 2015/023355LD-53: dihidrogenofosfato de (S)-1-(clorometil)-3-((E)-3-(4-(E)-3-((S)-1-(clorometil)-5-(fosfonooxi)-1,2-dihidro-3H-benzo[e]indol-3-il)-3-oxoprop-1-en-1-il)-2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)fenil)acriloil)-2,3-dihidro-1H-benzo[e]indol-5-ilo (MS (ESI): 994 [M+H]⁺) se preparó mediante los procedimientos del documento WO 2015/023355

- 40 Intermedio de enlazador-fármaco de ADC-54: (11S,11aS)-11-hidroxi-7-metoxi-8-((5-(((S)-7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,5,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8(5H)-oxi)pentil)oxi)-2-metilen-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(SH)-carboxilato de (R)-2-((3-nitropiridin-2-il)disulfanil)propilo (MS (ESI): 876 [M+H]⁺) se preparó mediante los procedimientos del documento WO 2013/055987.
- 45 Intermedio de enlazador-fármaco de ADC-55: (2-oxo-2-((2S,4S)-2,5,12-trihidroxi-7-metoxi-4-((1S,3R,4aS,9S,9aR,10aS)-9-metoxi-1-metiloctahidro-1H-pirano[4',3':4,5]oxazolo[2,3-c][1,4]oxazin-3-il)oxi)-6,11-dioxo-1,2,3,4,6,11-hexahidrotetracen-2-il)etano-1,2-diilbis(metilcarbamato) de 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencilo.
- 50 Siguiendo el Ejemplo 3 del documento US 8389697, a una solución de PNU-159682 (15,3 mg, 0,02038 mmol), preparada como se informa en el documento WO 1998/02446 y el Ejemplo 1 del documento US 8470984, en 3 ml de metanol y 2 ml de H₂O, se le añadió una solución de NaIO₄ (5,1 mg, 0,0238 mmol) en 1 ml de H₂O. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas, hasta que no se detectó material de partida (análisis por TLC y HPLC). Los disolventes se eliminaron a presión reducida y el sólido de color rojo en bruto, ácido (2S,4S)-2,5,12-trihidroxi-7-metoxi-4-[(1S,3R,4aS,9S,9aR,10aS)-9-metoxi-1-metiloctahidro-1H-pirano[4',3':4,5][1,3]oxazolo[2,3-c][1,4]oxazin-3-il]oxi)-6,11-dioxo-1,2,3,4,6,11-hexahidrotetraceno-2-carboxílico 55a (MS (ESI): 628 [M+H]⁺) que se convirtió en LD-55 (MS (ESI): 1355 [M+H]⁺) mediante los procedimientos del documento WO 2010/009124.



Intermedio de enlazador-fármaco de ADC-56: (2S,4S)-2,5,12-trihidroxi-7-metoxi-4-(((1S,3R,4aS,9S,9aR,10aS)-9-metoxi-1-methioctahidro-1H-pirano[4',3':4,5]oxazolo[2,3-c][1,4]oxazin-3-il)oxi)-N-(2-((5-nitropiridin-2-il)disulfanil)ethyl)-6,11-dioxo-1,2,3,4,6,11-hexahidrotetraceno-2-carboxamida (MS (ESI): 842 [M+H]⁺) se preparó mediante los procedimientos del documento WO 2013/055987.

Intermedio de enlazador-fármaco de ADC-57: (2S,4S)-2,5,12-trihidroxi-7-metoxi-4-(((1S,3R,4aS,9S,9aR,10aS)-9-metoxi-1-methioctahidro-1H-pirano[4',3':4,5]oxazolo[2,3-c][1,4]oxazin-3-il)oxi)-N-(2-((5-nitropiridin-2-il)disulfanil)propil)-6,11-dioxo-1,2,3,4,6,11-hexahidrotetraceno-2-carboxamida (MS (ESI): 856 [M+H]⁺) se preparó mediante los procedimientos del documento US8389697.

Intermedio de enlazador-fármaco de ADC-58: (2S,4S)-2,5,12-trihidroxi-7-metoxi-4-(((1S,3R,4aS,9S,9aR,10aS)-9-metoxi-1-methioctahidro-1H-pirano[4',3':4,5]oxazolo[2,3-c][1,4]oxazin-3-il)oxi)-N-(2-metil-2-((5-nitropiridin-2-il)disulfanil)propil)-6,11-dioxo-1,2,3,4,6,11-hexahidrotetraceno-2-carboxamida (MS ((ESI): 870 [M+H]⁺) se preparó mediante los procedimientos del documento US8389697.

Aunque la invención anterior se ha descrito con determinado nivel de detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad de comprensión, no debe interpretarse que las descripciones y ejemplos limitan el alcance de la invención.

20

Tabla de secuencias

NOMBRE	SECUENCIA	SEQ ID NO
CLL-1 humano (UniProt N.º Q5QGZ9; NCBI Ref. NP_612210.4)	MSEEVTYADL QFQNSSEMEK IPEIGKFGEK APPAPSHVWR PAALFLTL LLC LLLLIGLGVL ASMPHVTLKI EMKKMNKLQN ISEELQRNIS LQLMSNMNIS NKIRNLSTTL QTATKLCRE LYSKEQEHKC KPCPRRWIWH KDSCYFLSDD VQTWQESKMA CAAQNASLLK INNKNALEFI KSQSRSYDYW LGLSPEEDST RGMRVDNIIN SSAWVIRNAP DLNNMYCGYI NRYVQYYHC TYKKRMICEK MANPVQLGST YFREA	1
ECD de CLL-1 humano (aa 65-265 de SEQ ID NO:1)	HVTLKIEMKKMNKLQNISEELQRNISLQLMSNMNISNKIRNL STTLLQTATKLCRELYSKEQEHKCKPCPRRWIWHKDSCYFL SDDVQTWQESKMACAAQNASLLKINNKNALEFIKSQSRSY DYWLGLSPEEDSTRGMRVNDNIINSSAWVIRNAPDLNNMYC GYINRLYVQYYHCTYKKRMICEKMANPVQLGSTYFREA	2
Dominio similar a lectina de tipo C (CTLD) CLL-1 humano (aa 133-250 de SEQ ID NO:1)	CPRRWIWHKDSCYFLSDDVQTWQESKMACAAQNASLLKIN NKNNALEFIKSQSRSYDYWLGLSPEEDSTRGMRVNDNIINSSA WVIRNAPDLNNMYCGYINRLYVQYYHCTYKKRMICEK	3

ES 2 989 338 T3

(continuación)

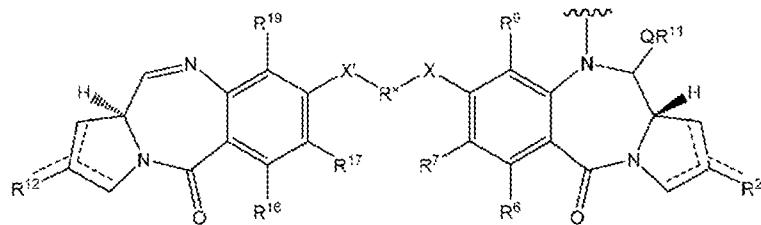
NOMBRE	SECUENCIA	SEQ ID NO
Cyno CLL-1	MSEEVTYADLKFQNSSETEKIQEIAKFGGKAPPAPSCVWRP AALFLTVLCLLMLIGLGVLSMFHITLKTAMKKMNKLQNIN EELQRNVSLQLMSNMNSS NKIRNLSTTLQTIATRLCRELYSKEQEHKCKPCPRRWIWHK DSCYFLSDDVRTWQESRMACAAQNASLLKINNKALEFIKS QSTSYPYWLGLSPEKDYS YGTTSVDDIHNSSAWVTRNASDLNNMFCGYINRIYVHYDYCI YRKKMICEKMANPVQLGFIHFREA	4
m6E7-HVR L1	RASQSVSTSSSYNMH	5
6E7L4H1e-HVRL1		
6E7L4H1eA54-HVR L1		
m6E7-HVR L2	YASNLES	6
6E7L4H1e-HVR L2		
6E7L4H1eA54-HVR L2		
m6E7-HVR L3	QHSWEIPLT	7
6E7L4H1e-HVR L3		
6E7L4H1eA54-HVR L3		
m6E7-HVR H1	DYYMH	8
6E7L4H1e-HVR H1		
6E7L4H1eA54-HVR H1		
m6E7-HVR H2	RINPYNGAAFYSQNFKD	9
6E7L4H1e-HVR H2		
m6E7-HVR H3	ERGADLEGYAMDY	10
6E7L4H1e-HVR H3		
6E7L4H1eA54-HVR H3		
6E7L4H1eA54-HVR H2	RINPYAGAAFYSQNFKD	11
m20B1-HVR L1	SASSISYMY	12
m20B1-HVR L2	DTSKLAS	13
m20B1-HVR L3	HQRSSWT	14
m20B1-HVR H1	SYDIN	15
m20B1-HVR H2	WIYPGDTTEYNERFKG	16
m20B1-HVR H3	SYDODYAMDY	17
m21C9-HVR L1	KASQDVSTAVA	18
21C9.L2H-HVR L1		
m21C9-HVR L2	SPSYRYT	19
21C9.L2H-HVR L2		
m21C9-HVR L3	QQLYSTPYT	20
21C9.L2H-HVR L3		
m21C9-HVR H1	DYYLD	21
21C9.L2H-HVR H1		
m21C9-HVR H2	RVNPYNGGTIYNQKFKG	22
21C9.L2H-HVR H2		
m21C9-HVR H3	DHYRYDPPLDY	23
21C9.L2H-HVR H3		
m28H12-HVR L1	RASQSVSSSSSYMH	24
m28H12-HVR L2	YASNLES	25
m28H12-HVR L3	QHSWEIPYT	26
m28H12-HVR H1	DTYMH	27
m28H12-HVR H2	RIDPANGTDYDPKFQG	28
m28H12-HVR H3	SGPPYYVMYD	29
m6E7 V _L	DIVLTQSPSSLIVSLGQRATISCRASQSVSTSSSYNMHWYQQ KPGQPPKLLLKYASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEE EDTATYYCQHSWEIPLTEGAGTKLEIK	30
m6E7 V _H	QVQLQQSGPELVKGASVKISCKASGYSFTDYYMHWVKQS HIKSLEWIGRINPYNGAAFYSQNFKDKASLTVDKSSSTAYM ELHSLTSEDSAVYYCAIERGADLEGYAMDYWGQGTSVTVS S	31

(continuación)

NOMBRE	SECUENCIA	SEQ ID NO
6E7L4H1e V _L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSTSSSYNMHWYQ QKPGKPPKLLIKYASNLESGVPSRFSGSQSGTDFLTISSLQP EDFATYYCQHSWEIPLTFGQGTKEIK	32
6E7L4H1e V _H	EVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYSFTDYYMHWVRQ APGQGLEWIGRINPYANGAAFYSQNFKDRVTLTVDTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCAIERGADLEGYAMDYWGQGTLTVSS	33
6E7L4H1eAG V _H	EVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYSFTDYYMHWVRQ APGQGLEWIGRINPYAGAAFYSQNFKDRVTLTVDTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCAIERGADLEGYAMDYWGQGTLTVSS	34
m20B1 V _L	DIVLTQSPAAMSASPGEKVMTCSASSISYMYWYQQKPGTS PKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTYSLTISMEAEDAAT YYCHQRSSWTFGQGTKEIK	35
m20B1 V _H	EVQLQQSGPELVKPGALVKISCKASGYTFTSYDINWLKQRP GQGLEWIGWIYPGDGTTEYNERFKGKATLTADKSSTAYLQLSSLTSENAVYYCARSDYDYAMDYWGQGTSVTVSS	36
m21C9 V _L	DIQMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWFQQKP GQSPKLIYSPSYRYTGVPDRFTGSGSGTDFLTFTISSVQAEDL AVYYCQQLYSTPYTFGGGTKEIK	37
m21C9 V _H	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYLDWVKQS HGESFEWIGRVNPYNGTIYNQKFKGKATLTVDKSSSTAY MDLNSLTSEDSAVYYCARDHYRDPLLDYWQGQTTLVSS	38
21C9.L2H3 V _L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWFQQKPG KAPKLLIYSPSYRYTGVPDRFTGSGSGTDFLTISSLQPEDFA TYYCQQLYSTPYTFGQGTLKEIK	39
21C9.L2H3 V _H	EVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTDYYLDWVRQ APGQGLEWIGRNPYNGTIYNQKFGRVTLTRDTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCARDHYRDPLLDYWQGQGTLTVSS	40
m28H12 V _L	DIQMTQSPASLAVALQQRATISCRASQSVSSSSYSYMHWYQ QKPGQPPKLLIKYASNLESGVPARFSGRGSQTDFTLNIPVE EEDTATYYCQHSWEIPTYTFGGTRLEIK	41
m28H12 V _H	QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHWVKQR PEQGLEWIGRIDPANGDTDYDPKFQGKATVTADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCTISGPPYYVMDYWGQGTSVTVSS	42
6E7L4H1eE54-HVR H2	RINPYEGAAFYSQNFKD	43
6E7L4H1eS54-HVR H2	RINPYSGAAFYSQNFKD	44
6E7L4H1 eConsenso-HVR H2	RINPYX ₁ GAAFYSQNFKD, en donde X ₁ es A, E, S o N	45
6E7L4H1 eConsenso-HVR VH	EVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYSFTDYYMHWVRQ APGQGLEWIGRINPY X ₁ GAAFYSQNFKDRVTLTVDTSTSTAYLELSSLRSEDTAVYYCAIERGADLEGYAMDYWGQGTLTVSS, wherein X ₁ is A, E, S or N	46
6E7L4H1 eConsenso2-HVR H2	RINPYX ₂ GAAFYSQNFKD, en donde X ₂ es A, E o S	47
6E7L4H1 eConsenso2-HVR VH	EVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYSFTDYYMHWVRQ APGQGLEWIGRINPY X ₂ GAAFYSQNFKDRVTLTVDTSTSTAYLELSSLRSEDTAVYYCAIERGADLEGYAMDYWGQGTLTVSS, wherein X ₂ is A, E, or S	48

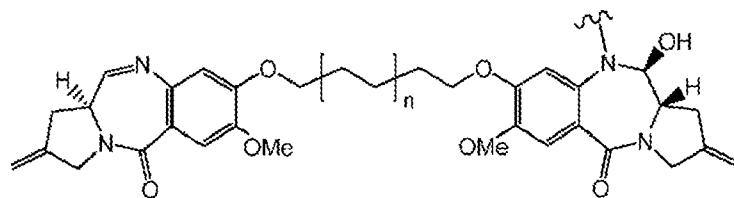
REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti CLL-1 monoclonal aislado, en donde el anticuerpo comprende:
 - 5 (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8;
 - (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9;
 - (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10;
 - (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5;
 - (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y
 - 10 (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32.
 - 15 3. Un anticuerpo anti CLL-1 monoclonal aislado, en donde el anticuerpo comprende:
 - (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21;
 - (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22;
 - 20 (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23;
 - (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18;
 - (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19; y
 - (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.
- 25 4. El anticuerpo de la reivindicación 3, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37.
- 30 5. El anticuerpo de la reivindicación 3, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39.
- 35 6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el anticuerpo comprende uno o más residuos de aminoácidos de cisteína libre genomanipulados, opcionalmente, en donde el uno o más residuos de aminoácidos de cisteína libre genomanipulados están ubicados en la cadena ligera, opcionalmente, en donde el uno o más residuos de aminoácidos de cisteína libre genomanipulados en la cadena ligera comprenden K149C de acuerdo con la numeración de Kabat.
- 40 7. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que es un anticuerpo humanizado, un fragmento de anticuerpo que se une a CLL-1, o un anticuerpo IgG1, IgG2a o IgG2b.
8. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 conjugado con un marcador, opcionalmente, en donde el marcador es un emisor de positrones, opcionalmente, en donde el emisor de positrones es ^{89}Zr .
- 45 9. El anticuerpo de la reivindicación 8 para su uso en la detección de un cáncer CLL-1 positivo en un sujeto.
10. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
- 50 11. Una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 10.
12. Un método para producir un anticuerpo que comprende cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 11 de tal manera que se produzca el anticuerpo.
- 55 13. Un inmunoconjuguado que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y un agente citotóxico, opcionalmente, en donde el inmunoconjuguado tiene la Fórmula Ab-(L-D)p, en donde Ab es el anticuerpo, L es un enlazador, D es un agente citotóxico y el agente citotóxico es un fármaco y p varía de 1-8, opcionalmente, en donde D es un agente citotóxico seleccionado de maitansinoide, una calicheamicina, una pirrolobenzodiazepina y un derivado de nemorubicina.
- 60 14. El inmunoconjuguado de la reivindicación 13, en donde D es una pirrolobenzodiazepina de Fórmula A:

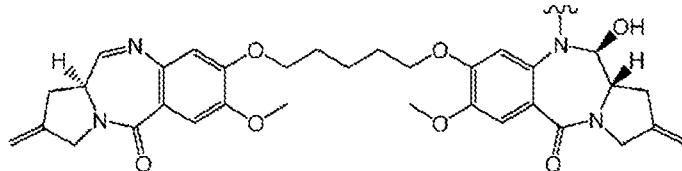


en donde la línea discontinua indica la presencia opcional de un doble enlace entre C1 y C2 o C2 y C3;

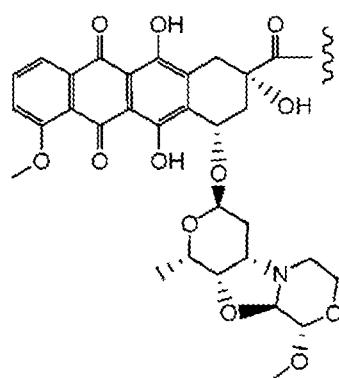
- 5 R² se selecciona de H, OH, =O, =CH₂, CN, R, OR, =CH-R^D, =C(R^D)₂, O-SO₂-R, CO₂R y COR, y opcionalmente además seleccionados de halo o dihalo, en donde R^D se selecciona independientemente de R, CO₂R, COR, CHO, CO₂H y halo;
R⁶ y R⁹ se seleccionan independientemente de H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR', NO₂, Me₃Sn y halo;
R⁷ se selecciona de H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR', NO₂, Me₃Sn y halo;
- 10 Q se selecciona de O, S y NH, y R¹¹ es H o R; o Q es O, y R¹¹ es SO₃M, donde M es un catión metálico;
R y R' se seleccionan cada uno independientemente de grupos alquilo C₁₋₈, heterocíclico C₃₋₈ y arilo C₅₋₂₀ opcionalmente sustituidos y, opcionalmente, en relación con el grupo NRR', R y R' junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo heterocíclico de 4, 5, 6 o 7 miembros opcionalmente sustituido;
R¹², R¹⁶, R¹⁹ y R¹⁷ son como se define para R², R⁶, R⁹ y R⁷, respectivamente;
- 15 R'' es un grupo alquíleno C₃₋₁₂, cuya cadena puede estar interrumpida por uno o más heteroátomos y/o anillos aromáticos que están opcionalmente sustituidos; y
X y X' se seleccionan independientemente de O, S y N(H); opcionalmente, en donde D tiene una estructura:



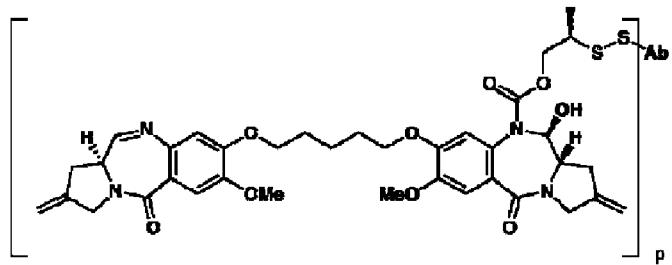
- 20 en donde n es 0 o 1; opcionalmente, en donde la estructura es:



- 25 15. El inmunoconjunto de la reivindicación 13, en donde D es un derivado de nemorubicina, opcionalmente, en donde D tiene una estructura:



- 30 16. El inmunoconjunto de la reivindicación 14, en donde el inmunoconjunto tiene la estructura:

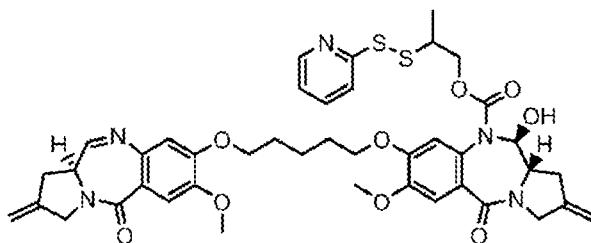


17. El inmunoconjuguado de una cualquiera de las reivindicaciones 13-16, en donde p varía entre 1-5, opcionalmente, en donde p es 1 o 2.

- 5 18. El inmunoconjuguado de la reivindicación 15 o 16, en donde el anticuerpo comprende:
- 10 (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7;
- 15 (ii) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32;
- (iii) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22; HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18; HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19; y HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20;
- 20 (iv) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37; o
- (v) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39,

en donde el anticuerpo comprende uno o más residuos de cisteína libre genomanipulados en la cadena ligera, en donde el uno o más residuos de cisteína libre genomanipulados en la cadena ligera comprenden K149C de acuerdo con la numeración de Kabat; y en donde p es 1 o 2, opcionalmente en donde p es 2.

25 19. El inmunoconjuguado de la reivindicación 13, producido mediante un proceso que comprende conjugar un disulfuro de monometiletil piridilo, un intermedio de enlazador de PBD unido a N10 que tiene la estructura:



30 con el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, opcionalmente, en donde el anticuerpo comprende uno o más residuos de cisteína libre genomanipulados, y en donde el uno o más residuos de aminoácidos de cisteína libre genomanipulados en la cadena ligera comprenden K149C de acuerdo con la numeración de Kabat, opcionalmente, en donde el anticuerpo comprende:

- 35 (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7;
- (ii) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32;
- (iii) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22; HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18; HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19; y HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20;
- 40 (iv) comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37; o
- (v) comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID

NO: 40 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39.

20. Una formulación farmacéutica que comprende el inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 13-19 y un portador farmacéuticamente aceptable.

5 21. El inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 13-19 para su uso en el tratamiento de un individuo que tiene un cáncer CLL-1 positivo, opcionalmente, en donde el cáncer CLL-1 positivo es AML.

10 22. El inmunoconjugado para su uso de la reivindicación 21, en donde:

(i) el inmunoconjugado es para su uso junto con un agente terapéutico adicional, en donde el agente terapéutico adicional se selecciona de 5-azacitidina y decitabina;

(ii) el inmunoconjugado es para su uso junto con un agente terapéutico adicional, en donde el agente terapéutico adicional es un inhibidor de BCL2; o

15 (iii) el inmunoconjugado es para su uso junto con un agente terapéutico adicional, en donde el agente terapéutico adicional es venetoclax.

Región variable de cadena ligera

	CDR L1 - Contact		CDR L1 - Chothia		CDR L1 - Kabat	
	CDR L1	CDR L1	CDR L1	CDR L1	CDR L1	CDR L1
Numeración de Kabat						
m6E7	1	2	3	4	5	6
m21C9	2	3	4	5	6	7
m6CB1	3	4	5	6	7	8
m28H12	4	5	6	7	8	9
	5	6	7	8	9	10
	6	7	8	9	10	11
	7	8	9	10	11	12
	8	9	10	11	12	13
	9	10	11	12	13	14
	10	11	12	13	14	15
	11	12	13	14	15	16
	12	13	14	15	16	17
	13	14	15	16	17	18
	14	15	16	17	18	19
	15	16	17	18	19	20
	16	17	18	19	20	21
	17	18	19	20	21	22
	18	19	20	21	22	23
	19	20	21	22	23	24
	20	21	22	23	24	25
	21	22	23	24	25	26
	22	23	24	25	26	27
	23	24	25	26	27	28
	24	25	26	27	28	29
	25	26	27	28	29	30
	26	27	28	29	30	31
	27	28	29	30	31	32
	28	29	30	31	32	33
	29	30	31	32	33	34
	30	31	32	33	34	35
	31	32	33	34	35	36
	32	33	34	35	36	37
	33	34	35	36	37	38
Numeración de Kabat						
m6E7	39	40	41	42	43	44
m21C9	40	41	42	43	44	45
m6CB1	41	42	43	44	45	46
m28H12	42	43	44	45	46	47
	43	44	45	46	47	48
	44	45	46	47	48	49
	45	46	47	48	49	50
	46	47	48	49	50	51
	47	48	49	50	51	52
	48	49	50	51	52	53
	49	50	51	52	53	54
	50	51	52	53	54	55
	51	52	53	54	55	56
	52	53	54	55	56	57
	53	54	55	56	57	58
	54	55	56	57	58	59
	55	56	57	58	59	60
	56	57	58	59	60	61
	57	58	59	60	61	62
	58	59	60	61	62	63
	59	60	61	62	63	64
	60	61	62	63	64	65
	61	62	63	64	65	66
	62	63	64	65	66	67
	63	64	65	66	67	68
	64	65	66	67	68	69
	65	66	67	68	69	70
	66	67	68	69	70	71
	67	68	69	70	71	72
	68	69	70	71	72	73
	69	70	71	72	73	74
	70	71	72	73	74	75
	71	72	73	74	75	76
	72	73	74	75	76	77
	73	74	75	76	77	78
	74	75	76	77	78	79
Numeración de Kabat						
m6E7	781	82	83	84	85	86
m21C9	782	83	84	85	86	87
m6CB1	783	83	84	85	86	87
m28H12	784	83	84	85	86	87
	785	84	85	86	87	88
	786	85	86	87	88	89
	787	86	87	88	89	90
	788	87	88	89	90	91
	789	88	89	90	91	92
	790	89	90	91	92	93
	791	90	91	92	93	94
	792	91	92	93	94	95
	793	92	93	94	95	96
	794	93	94	95	96	97
	795	94	95	96	97	98
	796	95	96	97	98	99
	797	96	97	98	99	100
	798	97	98	99	100	101
	799	98	99	100	101	102
	800	99	100	101	102	103
	801	100	101	102	103	104
	802	101	102	103	104	105
	803	102	103	104	105	106
	804	103	104	105	106	107
Numeración de Kabat						
m6E7	805	82	83	84	85	86
m21C9	806	82	83	84	85	86
m6CB1	807	82	83	84	85	86
m28H12	808	82	83	84	85	86
	809	83	84	85	86	87
	810	84	85	86	87	88
	811	85	86	87	88	89
	812	86	87	88	89	90
	813	87	88	89	90	91
	814	88	89	90	91	92
	815	89	90	91	92	93
	816	90	91	92	93	94
	817	91	92	93	94	95
	818	92	93	94	95	96
	819	93	94	95	96	97
	820	94	95	96	97	98
	821	95	96	97	98	99
	822	96	97	98	99	100
	823	97	98	99	100	101
	824	98	99	100	101	102
	825	99	100	101	102	103
	826	100	101	102	103	104
	827	101	102	103	104	105
	828	102	103	104	105	106
	829	103	104	105	106	107

FIG. 1A

Región variable de cadena pesada

	Numeración de Kabat		Numeración de Kabat		Numeración de Kabat	
	CDR H1 - Chothia	CDR H1 - Kabat		CDR H2 - Chothia	CDR H2 - Kabat	
	G	V	G	G	V	G
m6E7	T	E	A	A	A	A
m21C9	V	E	S	S	S	S
m26B1	E	V	S	S	S	S
m28H12	Q	V	S	S	S	S
	Numeración de Kabat		Numeración de Kabat		Numeración de Kabat	
	CDR H1 - Contact	CDR H2 - Contact		CDR H3 - Contact	CDR H4 - Contact	
	G	V	G	G	V	G
m6E7	A	T	A	A	A	A
m21C9	S	E	S	S	S	S
m26B1	S	P	S	S	S	S
m28H12	S	L	S	S	S	S

FIG. 1B

ES 2 989 338 T3

Región variable de cadena ligera

		CDR11 - Contact
		CDR11 - Chetia
		CDR11 - Kabat
Numeración de Kabat		
K1H1	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 20 31 32 33 34 35 36 37 38	
m6E7	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 20 31 32 33 34 35 36 37 38	
h6E7 L4H1e A54	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 20 31 32 33 34 35 36 37 38	
h6E7 L4H1e A54	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 20 31 32 33 34 35 36 37 38	
		CDR12 - Contact
		CDR12 - Chetia
		CDR12 - Kabat
Numeración de Kabat		
K1H1	39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80	
m6E7	2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 20 31 32 33 34 35 36 37 38	
h6E7 L4H1e	2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 20 31 32 33 34 35 36 37 38	
h6E7 L4H1e A54	2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 20 31 32 33 34 35 36 37 38	
		CDR13 - Contact
		CDR13 - Chetia
		CDR13 - Kabat
Numeración de Kabat		
K1H1	81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107	
m6E7	3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 20 31 32 33 34 35 36 37 38	
h6E7 L4H1e	3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 20 31 32 33 34 35 36 37 38	
h6E7 L4H1e A54	3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 20 31 32 33 34 35 36 37 38	

FIG. 2A

ES 2 989 338 T3

Región variable de cadena pesada

Numeración de Kabat	KIH1	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42	CDR H1 - Contact
	m6E7	2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42	CDR H1 - Chothia
Numeración de Kabat	h6E7.14H1e	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42	CDR H1 - Kabat
	h6E7.14H1e.A54	2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42	CDR H1 - Chothia
Numeración de Kabat	KIH1	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42	CDR H2 - Contact
	m6E7	2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42	CDR H2 - Chothia
Numeración de Kabat	h6E7.14H1e	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42	CDR H2 - Kabat
	h6E7.14H1e.A54	2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42	CDR H2 - Chothia
Numeración de Kabat	KIH1	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42	CDR H3 - Contact
	m6E7	2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42	CDR H3 - Chothia
Numeración de Kabat	h6E7.14H1e	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42	CDR H3 - Kabat
	h6E7.14H1e.A54	2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42	CDR H3 - Chothia

FIG. 28

ES 2 989 338 T3

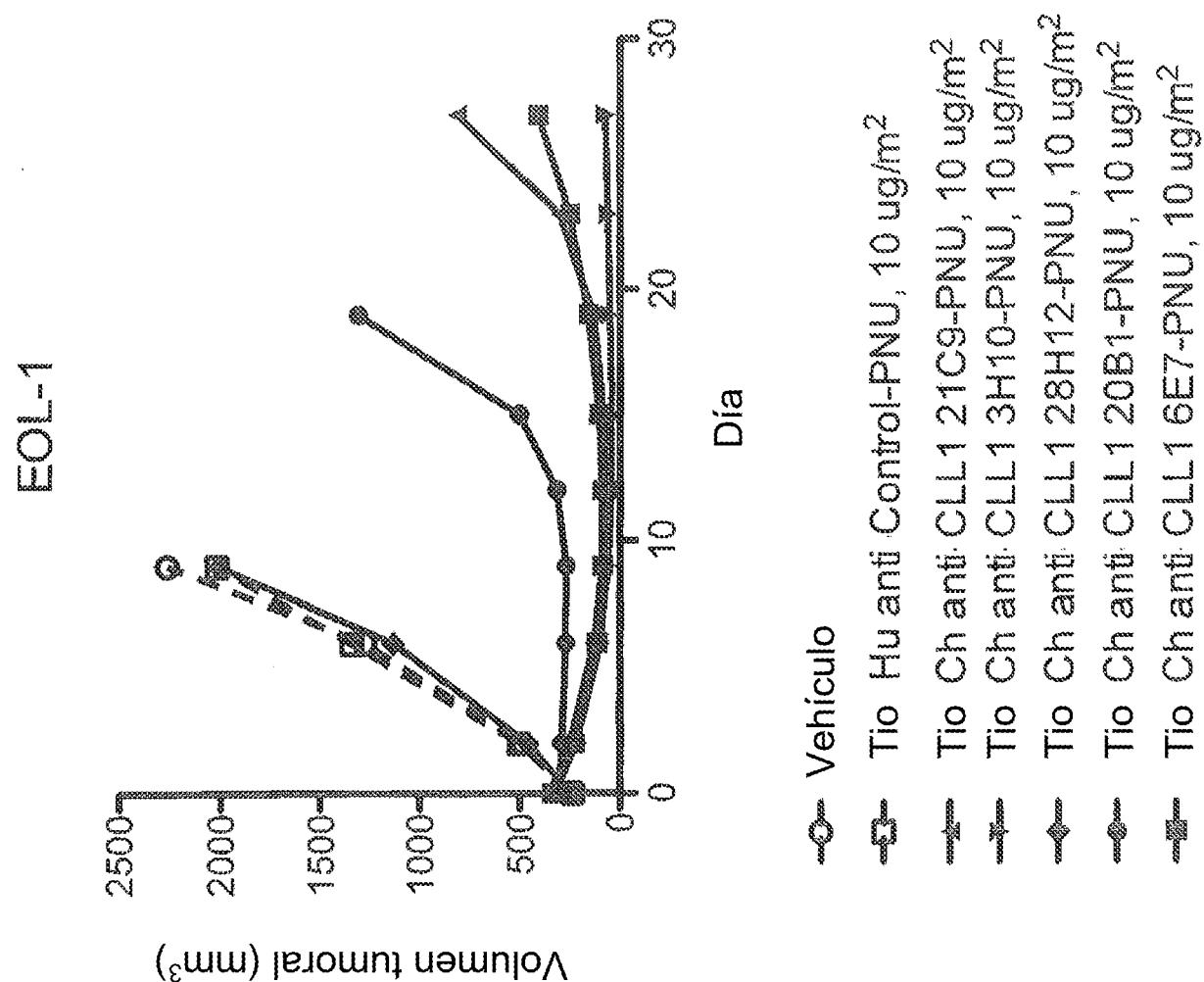
Región variable de cadena ligera

FIG. 3A

ES 2 989 338 T3

Región variable de cadena pesada

三〇



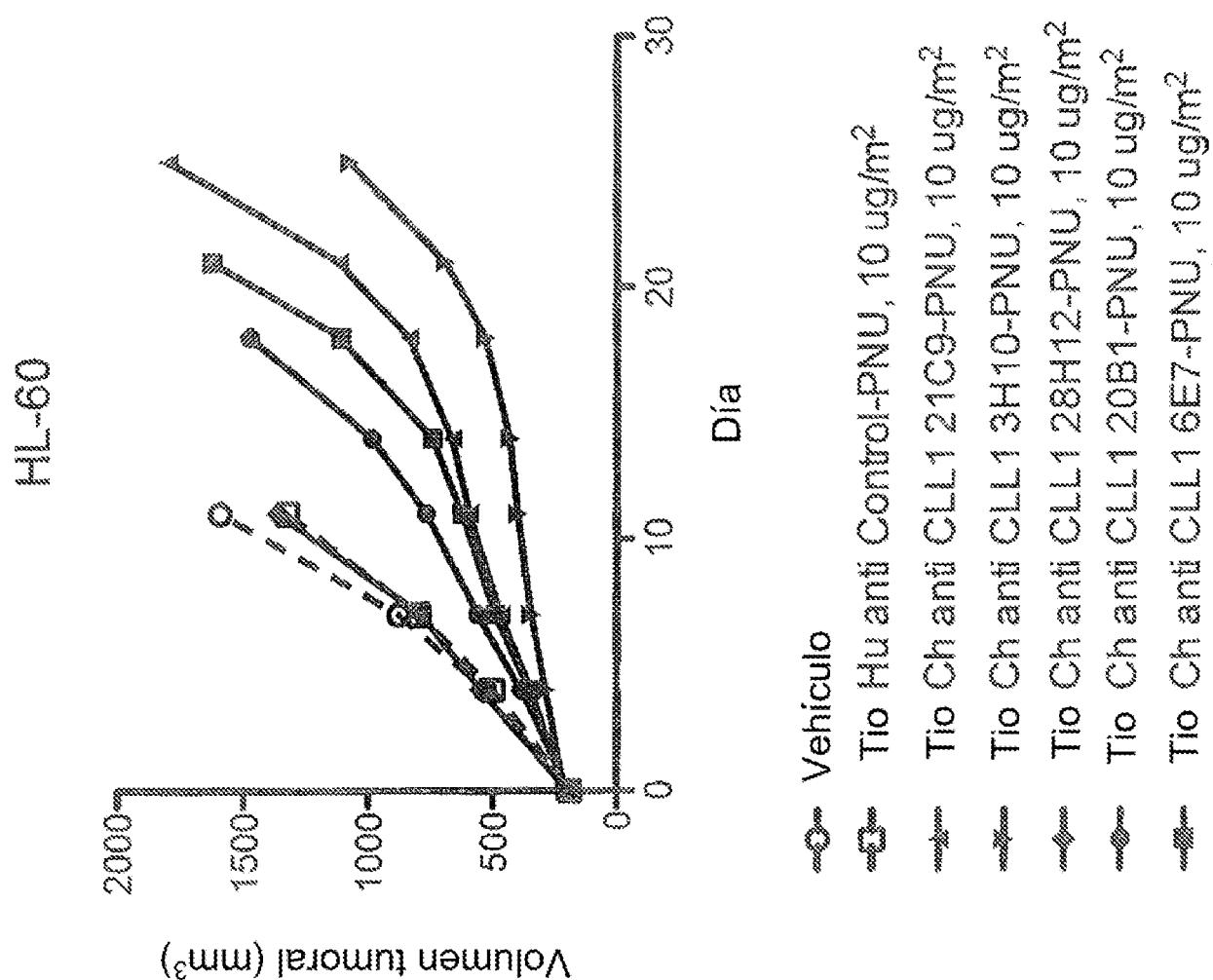


FIG. 5

