

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 599 172**

(51) Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 38/05** (2006.01)  
**C07K 16/30** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.10.2008 PCT/US2008/080373**  
(87) Fecha y número de publicación internacional: **23.04.2009 WO09052431**  
(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2008 E 08840713 (5)**  
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016 EP 2211904**

---

(54) Título: **Agentes de unión a CD19 y usos de éstos**

(30) Prioridad:

**19.10.2007 US 981206 P  
04.01.2008 US 19214 P  
11.07.2008 US 80169 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**31.01.2017**

(73) Titular/es:

**SEATTLE GENETICS, INC. (100.0%)  
21823 30TH DRIVE, S.E.  
BOTHELL, WA 98021, US**

(72) Inventor/es:

**MCDONAGH, CHARLOTTE;  
CERVENY, CHARLES G.;  
BENJAMIN, DENNIS;  
CARTER, PAUL y  
GERBER, HANS PETER**

(74) Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

### Observaciones :

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

**ES 2 599 172 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**

Agentes de unión a CD19 y usos de éstos

**Campo**

En la presente memoria se describen conjugados ligando-fármaco que contienen un anticuerpo que se une específicamente a CD19, y su uso para tratar enfermedades.

**Antecedentes**

En los seres humanos, las células B pueden producir un número enorme de moléculas de anticuerpos. Dicha producción de anticuerpos típicamente cesa (o disminuye sustancialmente) cuando se ha neutralizado un antígeno extraño. Ocasionalmente, sin embargo, la proliferación de una célula B particular continuará sin cesar y puede resultar en un cáncer conocido como un linfoma de células B. Los linfomas de células B, tales como el subtipo de células B de linfoma no de Hodgkin, son contribuyentes significativos a la mortalidad por cáncer. La respuesta de las malignidades de células B a varias formas de tratamiento es mixta. A pesar de la importancia médica, la investigación en las enfermedades mediadas por células B tales como linfoma no de Hodgkin sólo ha producido un pequeño número de datos usables clínicamente y las estrategias convencionales para tratar dichas enfermedades siguen siendo tediosas y desagradables y/o tienen un alto riesgo de recidiva. Por ejemplo, aunque la quimioterapia de alta dosis como un tratamiento primario para el linfoma no de Hodgkin de alto grado puede mejorar la supervivencia global, aproximadamente el 50% de los pacientes todavía mueren de esta enfermedad. Devesa et al., *J. Nat'l Cancer Inst.* 79: 701 (1987). Además, la leucemia linfocítica crónica semejante al linfoma no de Hodgkin de bajo grado y el linfoma de las células del manto todavía son incurables. Esto ha estimulado la búsqueda de estrategias alternativas como la inmunoterapia. Los anticuerpos dirigidos frente a moléculas de la superficie celular definidos por antígenos CD representan una oportunidad única para el desarrollo de reactivos terapéuticos.

La mayoría de las leucemias linfocíticas crónicas son del linaje de células B. Freedman, *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 4: 405, 1990. Este tipo de malignidad de células B es la leucemia más común en el mundo occidental. Goodman et al., *Leukemia and Lymphoma* 22:1, 1996. El historial natural de la leucemia linfocítica crónica se divide en varias fases. En la fase temprana, la leucemia linfocítica crónica es una enfermedad indolente, caracterizada por la acumulación de células B malignas pequeñas maduras funcionalmente incompetentes que han alargado su media de vida. Eventualmente, el tiempo de duplicación de las células B malignas disminuye y los pacientes se vuelven sintomáticos de forma creciente. Aunque el tratamiento puede proporcionar un alivio sintomático, la supervivencia global de los pacientes se ve afectada sólo mínimamente. Los estadios tardíos de la leucemia linfocítica crónica se caracterizan por una anemia y/o trombocitopenia significativa. En este punto, la supervivencia media es menos de dos años. Foon et al., *Annals Int. Medicine* 113: 525 (1990).

Las células B expresan proteínas en la superficie celular que pueden utilizarse como marcadores para diferenciación e identificación. CD19 es una glicoproteína general de la membrana de las células B que se expresa desde los estadios tempranos del desarrollo de las células pre-B hasta la diferenciación terminal, regulando el desarrollo y función de los linfocitos B. La expresión de CD19 se identificó en la mayor parte de los cánceres de origen linfoides, en la vasta mayoría de linfoma no de Hodgkin (NHL) y en leucemias, incluyendo leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfoblástica aguda (ALL) y macroglobulinemia de Waldenstrom (WM). A pesar de mejoras importantes en el tratamiento de los pacientes con NHL y CLL, la mayoría continuará recidiendo y se requieren regímenes de rescate con compuestos sin resistencia cruzada para mejorar la supervivencia de los pacientes. Existe una necesidad en la técnica de métodos de tratamiento mejorados. La presente descripción aborda ésta y otras necesidades.

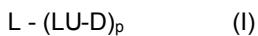
Flavell et al., *Br J Cancer*. 1995 Dic;72(6):1373-9 describe estudios preclínicos con una inmunotoxina anti-CD19-saporina, BU12-SAPORINA, que usa la proteína inactivadora de ribosomas de cadena única, saporina, acoplada con anticuerpo BU12. BU12-SAPORINA presentó una citotoxicidad selectiva para las células diana CD19+ tanto *in-vitro* como *in-vivo*.

La Patente US No. 7.109.304 describe anticuerpos anti-CD19 humanizados, químéricos y humanos, proteínas de fusión de anticuerpo anti-CD19, y fragmentos de éstos que se unen a CD19. Dichos anticuerpos, proteínas de fusión y fragmentos de éstos se describen como útiles para el tratamiento y diagnóstico de varios trastornos de células B, incluyendo malignidades de células B y enfermedades autoinmunes.

Pietersz GA, et al.. *Cancer Immunol Immunother.* 1995 Jul;41(1):53-60 describe la actividad antitumoral *in-vitro* e *in-vivo* de un anticuerpo anti-CD19 químérico (cCD19). También se describe la actividad antitumoral *in-vitro* de un conjugado idarrubicina-cCD 19.

**Resumen**

La presente invención proporciona un compuesto de conjugado ligando-fármaco de la fórmula siguiente:



o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de éste;

en la que:

L es una unidad de ligando en la que la unidad de ligando es un anticuerpo que se une específicamente a CD19 humana, que comprende una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO:9; y una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO:24, en la que el anticuerpo se une a CD 19 con una constante de disociación de menos de 10<sup>-7</sup> M; y

(LU-D) es un resto unidad de conector-unidad de fármaco, en la que:

LU- es una unidad de conector, y

-D es una unidad de fármaco que tiene actividad citostática o citotóxica frente a las células diana; y

10 p es un número entero de 1 a aproximadamente 20, en el que el anticuerpo comprende una región constante de IgG humana, en el que el isotipo de la región constante de IgG es IgG1, IgG2, o IgG1V1.

En algunos aspectos, el anticuerpo tiene un efecto citotóxico, citostático y/o inmunomodulador en las células que expresan CD19. Dicho efecto puede estar mediado, por ejemplo, por la depleción o inhibición de la proliferación o diferenciación de células que expresan CD19. En algunas realizaciones, el anticuerpo puede mediar la función efectora.

15 También se proporcionan conjugados ligando-fármaco de la invención para uso como un medicamento, por ejemplo, para tratar un trastorno inmune o cáncer.

Los cánceres que se van a tratar por los métodos descritos en la presente memoria incluyen cánceres que expresan CD19, incluyendo, por ejemplo, malignidades del linaje de células B tales como, por ejemplo, linfomas de células B o leucemias de células B, incluyendo, pero no limitado a, linfoma no de Hodgkin, leucemia linfocítica crónica, y leucemia linfoblástica aguda.

20 En la presente memoria se describen métodos para matar células tumorales que expresan CD19 y métodos para inhibir la proliferación o diferenciación de células tumorales que expresan CD19. Dichos métodos incluyen la administración a las células de un conjugado ligando-fármaco de la invención que se une específicamente a y puede, por ejemplo, matar o inhibir la proliferación o diferenciación de células que expresan CD19 humano. En algunas realizaciones, los métodos serán efectivos para deplecionar células B, por ejemplo, periféricas; nódulos linfáticos periféricos; esplénicos, mesentéricos y mandibulares.

25 En la presente memoria se describen métodos para inducir la depleción de células B, por ejemplo, células B periféricas, que están asociadas con un trastorno inmune. Dichos métodos incluyen la administración a las células de un conjugado ligando-fármaco de la invención. En algunas realizaciones, el trastorno inmune es artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple o enfermedad inflamatoria del intestino.

30 Se describe la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades. En dichas realizaciones, se usará un conjugado ligando-fármaco de la invención.

35 Se describe la fabricación de un medicamento para la depleción de células B. En dichas realizaciones, se usará un conjugado ligando-fármaco de la invención.

Se describe la fabricación de un medicamento para matar o inhibir la proliferación o diferenciación de células que expresan CD19. En dichas realizaciones, se usará un conjugado ligando-fármaco de la invención.

40 En la presente memoria también se describen composiciones farmacéuticas en las que la composición comprende un agente de unión a CD19 y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En dichas realizaciones, la composición farmacéutica comprenderá un conjugado ligando-fármaco de la invención.

También se describen métodos para fabricar compuestos de conjugado ligando-fármaco. El agente de unión a CD19 puede conjugarse con un agente citotóxico, citostático y/o terapéutico bien directamente o a través de un conector, como se describe más completamente a continuación.

45 La invención se entenderá más completamente por referencia a la descripción detallada siguiente, los ejemplos no limitativos de realizaciones específicas, y las figuras y listado de secuencias adjuntos.

#### **Descripción breve de los dibujos**

Figura 1: Resultados de FACS para la unión de anticuerpos de CD19 a células de bazo de primate no humano.

Figura 2: Análisis de unión de las regiones variables de cadena pesada y ligera a CD19.

Figura 3: Actividad antitumoral de anticuerpo mBU12 desnudo y mBU12-mcMMAF en un modelo SCID de xenoinjerto

Ramos. Grupos de ratones (5/grupo) no se trataron o recibieron anticuerpo mBU12 desnudo (1 mg/kg), anticuerpo mBU12 desnudo (5 mg/kg), mBU12-mcMMAF4 (1 mg/kg) y mBU12-mcMMAF4 (5 mg/kg) cuando los tamaños tumorales promediaron aproximadamente 100 mm<sup>3</sup>. El esquema de dosis fue q4dx3.

Figura 4: Actividad antitumoral de conjugados anticuerpo anti-CD19-fármaco en modelo de tumor Ramos en ratones SCID. Grupos de ratones (5/grupo) no se trataron o se trataron con cBU12-mcMMAF8 (3 mg/kg; respuesta completa 1/5 ratones), cHD37-mcMMAF8 (3 mg/kg; respuesta completa 5/5 ratones), c4g7-mcMMAF8 (3 mg/kg; respuesta completa 0/5 ratones), o cFMC63-mcMMAF8 (3 mg/kg; respuesta completa 5/5 ratones) cuando el tamaño tumoral promedió aproximadamente 100 mm<sup>3</sup>. El esquema de dosis fue q4dx3 iv. En una respuesta CR, el volumen tumoral es menor de 13,5 mm<sup>3</sup> para tres mediciones consecutivas durante el curso del estudio.

Figura 5: Actividad antitumoral de conjugados anticuerpo anti-CD19-fármaco en modelo de tumor Ramos en ratones SCID. Grupos de ratones (10/grupo) no se trataron o se trataron con cBU12-mcMMAF8 (3 mg/kg; respuesta completa 6/10 ratones), hBU12-mcMMAF8 (3 mg/kg; respuesta completa 10/10 ratones; región constante de IgG<sub>1</sub>),, hBU12-mcMMAF8 (3 mg/kg; respuesta completa 6/10 ratones; región constante de IgG<sub>4</sub>),, cHD37-mcMMAF8 (3 mg/kg; respuesta completa 10/10 ratones), cFMC63-mcMMAF8 (3 mg/kg; respuesta completa 10/10 ratones), c4g7-mcMMAF8 (3 mg/kg; respuesta completa 10/10 ratones), o cAC10-mcMMAF8 (3 mg/kg; respuesta completa 0/10 ratones) cuando el tamaño tumoral promedió aproximadamente 100 mm<sup>3</sup>. El esquema de dosis fue q4dx4 iv.

Figura 6: Niveles valle de cBU12-mcMMAF8 frente a cHD37-mcMMAF8.

Figura 7: Actividad antitumoral de conjugados anticuerpo anti-CD19-fármaco en un modelo de tumor Ramos en ratones SCID. Grupos de ratones (10/grupo) no se trataron o se trataron con hBU12-mcMMAF8 (3 mg/kg; respuesta completa 10/10 ratones), cHD37-mcMMAF8 (3 mg/kg; respuesta completa 10/10 ratones), o cAC10-mcMMAF8 (3 mg/kg; respuesta completa 0/10 ratones) cuando el tamaño tumoral promedió aproximadamente 100 mm<sup>3</sup>. El esquema de dosis fue q4dx4 iv.

Figura 8: Actividad antitumoral de conjugados anticuerpo anti-CD19-fármaco en un modelo de tumor DoHH2 en ratones SCID. Grupos de ratones (5/grupo) no se trataron o se trataron con cAC10-mcMMAF8 (3 mg/kg), cBU12-mcMMAF8 (3 mg/kg), hBU12-mcMMAF8 (3 mg/kg); cHD37-mcMMAF8 (3 mg/kg) o cFMC63-mcMMAF8 (3 mg/kg) cuando el tamaño tumoral promedió aproximadamente 100 mm<sup>3</sup>. El esquema de dosis fue q4dx4, ip.

Figura 9: Ensayo de supervivencia para ratones SCID tratados con conjugados anticuerpo anti-CD19-fármaco en un modelo de tumor Nalm-6. Grupos de ratones (5/grupo) no se trataron o se trataron con cAC10-mcMMAF8 (3 mg/kg), cBU12-mcMMAF8 (3 mg/kg), hBU12-mcMMAF8 (3 mg/kg); cHD37-mcMMAF8 (3 mg/kg) o cFMC63-mcMMAF8 (3 mg/kg). El esquema de dosis fue q4dx4, iv.

Figura 10: Niveles valle de hBU12-mcMMAF8 (3 mg/kg) frente a cHD37-mcMMAF8 (3 mg/kg). 5 ratones se trataron en cada grupo.

Figura 11: Actividad antitumoral de conjugados anticuerpo hBU12-fármaco en modelo de tumor Ramos en ratones SCID. Grupos de ratones (10/grupo) no se trataron o se trataron con hBU12-vcMMAE4 (1 mg/kg; respuesta completa 0/10), hBU12-vcMMAE4 (3 mg/kg; respuesta completa 7/10), hBU12-vcMMAF4 (0,3 mg/kg; respuesta completa 0/10), hBU12-vcMMAF4 (1 mg/kg; respuesta completa 0/10), hBU12-vcMMAF4 (3 mg/kg; respuesta completa 1/10), hBU12-mcMMAF8 (1 mg/kg; respuesta completa 0/10), o hBU12-mcMMAF8 (3 mg/kg; respuesta completa 10/10). El esquema de dosis fue q4dx4, iv.

Figura 12: Actividad antitumoral de conjugados anticuerpo anti-CD19-fármaco en un modelo de tumor DoHH2 en ratones SCID. Grupos de ratones (1/grupo) se trataron con variado 1 mg/kg, 3 mg/kg, ó 10 mg/kg de hBU12-vcMMAE4, -mcMMAF4, y -mcMMAF8. El esquema de dosis fue una única dosis, ip.

Figura 13: Las células Ramos se cultivaron con anticuerpos anti-CD19 entrecruzados con un exceso de 2 veces de conjugado ligando anti-ratón de cabra fármaco (vcMMAF8). Los cultivos se incubaron durante 96 horas y se marcaron con 50 µM resazurina. Los valores son la media ± SD de cuatro replicados en un único experimento.

Figura 14: Niveles de expresión de CD19 y CD21 y la citotoxicidad de hBU12-vcMMAE4 y hBU12-mcMMAF4 frente a líneas celulares tumorales de ALL, CLL, y NHL crecidas en cultivo.

Figura 15: Cinéticas de internalización y tráfico intracelular de hBU12-vcMMAE4 en las líneas celulares tumorales de NHL y ALL.

Figuras 16A-16E: Experimentos de xenoinjerto que ensayan hBU12-vcMMAE4 en modelos de NHL. Se implantaron a ratones SCID subcutáneamente 5x10<sup>6</sup> células de células tumorales en el flanco derecho y el tratamiento se inició cuando el volumen tumoral promedio alcanzó 100mm<sup>3</sup>. El tratamiento fue intraperitonealmente con 1 ó 3mg/kg, q4dx4 de hBU12-vcMMAE4. Hubo 7-10 ratones por cada grupo de tratamiento. 16A.) Curva de crecimiento de la línea celular de NHL (linfoma de Burkitt); 16B.) Curva de crecimiento de las líneas celulares de linfoma folicular DOHH2. 16C.) Curva de crecimiento de la línea celular de linfoma de células B grandes difuso (DLBCL) DLCL2. 16D.) Curva de supervivencia de ratones implantados con la línea celular ALL RS4;11 a través de la vena de la cola.

El tratamiento de los ratones se inició en el día 7 después del implante del tumor en un esquema q4dx4, intraperitonealmente. 16E.) Curva de supervivencia de ratones implantados con la línea celular ALL Nalm-6 través de la vena de la cola. El tratamiento se inició en el día 7 después del implante del tumor, con una única dosis de hBU12-vcMMAE4 a la dosis indicada, mediante inyecciones intraperitoneales.

- 5 Figuras 17A-17D: Eficacia de hBU12-vcE en linfomas resistentes a rituximab. 17A.) Se implantaron en ratones SCID  $5 \times 10^6$  de las líneas celulares parentales Ramos-P usadas para generar tumores resistentes a rituximab. Se consiguieron niveles comparables de inhibición del crecimiento tumoral con rituximab (12mg/kg, q4dx4) y hBU12-vcE (3mg/kg, q4dx4) 17B.) Curva de crecimiento tumoral de tumores Ramos resistentes a rituximab (R-Ramos) tratados con hBU12-vcE (1 y 3mg/kg, IP, q4dx4) o rituximab (12mg/kg, q4dx4, IP). Hubo una diferencia estadísticamente significativa en el retraso del crecimiento tumoral inducido por estos compuestos 17C.) Análisis FACS de la expresión de CD19 y CD20 en células aisladas de tumores Ramos-P (sensibles) y R-Ramos (resistentes). Se identificaron niveles de expresión comparables para ambos antígenos en ambos tumores. 17D.) Efectos anti-linfoma de hBU12-vcE frente a tumores Raji2R resistentes a rituximab implantados subcutáneamente (NHL, linfoma de Burkitt) tratados con 1 y 3mg/kg, q4dx4 de hBU12-vcE o conjugado control. Se observaron 9 de 10 regresiones duraderas en los ratones tratados con hBU12-vcE, mientras rituximab (12mg/kg, q4dx4) no afectó significativamente el crecimiento tumoral. Hubo 5-10 ratones por grupo. Una respuesta duradera (DR) se define como la ausencia completa de tumor palpable durante todo el experimento.

Figura 18: Actividad de hBU12 en un modelo diseminado de ALL. Los ratones recibieron una única dosis de 10 mg/kg hBU12, hBU12-vcE(4) o hBU12-mcF(4), IP, en el día 1 después del implante del tumor. Hubo 10 ratones por grupo.

- 20 Figura 19: Efectos anti-tumorales limitados de hBU12 en un modelo subcutáneo de NHL (SUDHL4). Hubo 8-10 ratones por grupo de tratamiento. El esquema de dosis fue q4dx4, IP.

#### **Descripción detallada**

En la presente memoria se describen compuestos de conjugado ligando-fármaco que comprenden un anticuerpo que se une específicamente a CD19 humano. Específicamente, los presentes inventores han diseñado compuestos de conjugado ligando-fármaco que comprenden anticuerpos BU12 humanizados.

En la presente memoria también se describen agentes de unión a CD19 que comprenden al menos una de las regiones CDR del anticuerpo mBU12. Los agentes de unión a CD19 pueden comprender las seis regiones CDR del anticuerpo mBU12. En algunas realizaciones, las regiones CDR tienen al menos una, al menos dos, o al menos tres sustituciones conservativas de aminoácidos de una CDR del anticuerpo mBU12.

- 30 También se describen agentes de unión a CD19 que comprenden una región variable de cadena pesada de anticuerpo y/o una región variable de cadena ligera de anticuerpo, incluyendo derivados de éstos.

El compuesto de conjugado ligando-fármaco de la presente invención comprende un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada humanizada y una región variable de cadena ligera humanizada del anticuerpo BU12, y comprende las seis regiones CDR del anticuerpo mBU12. El anticuerpo también incluye una región constante de IgG humana, en el que el isotipo del dominio constante del anticuerpo es IgG1, IgG2, o IgG1V1.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tiene patrones de glicosilación alterados.

- 40 Para claridad de la descripción, y no como limitación, la descripción detallada de la invención se divide en las subsecciones que siguen.

#### **Definiciones y abreviaturas**

Cuando se usa un nombre comercial en la presente memoria, la referencia al nombre comercial también se refiere a la formulación del producto, el fármaco genérico, y el o los ingredientes farmacéuticos activos del producto de nombre comercial, a no ser que se indique otra cosa por el contexto.

- 45 Los términos "agente de unión a CD19" y "agente de unión anti-CD19" tal y como se usan en la presente memoria se refieren a una molécula, por ejemplo, una proteína, que se une específicamente a CD19. Los ejemplos pueden incluir un anticuerpo anti-CD19 de longitud completa, un fragmento de un anticuerpo anti-CD19 de longitud completa, u otro agente que incluya una región variable de cadena pesada y/o ligera de anticuerpo, y derivados de éstos.

50 Los términos "unión específica" y "se une específicamente" significan que el agente de unión a CD19 reaccionará, de una manera altamente selectiva, con su diana correspondiente, CD19 y no con la multitud de otros antígenos. Típicamente, el agente de unión a C19 se une con una afinidad de al menos aproximadamente  $1 \times 10^{-7}$  M, y preferiblemente  $10^{-8}$  M a  $10^{-9}$  M,  $10^{-10}$  M,  $10^{-11}$  M, ó  $10^{-12}$  M y se une al antígeno predeterminado con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad para la unión a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno altamente relacionado.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "funcional", en el contexto de un agente de unión a CD19, indica que el agente de unión es capaz de unirse específicamente a CD19.

Los términos "inhibe" o "inhibición de" tal y como se usan en la presente memoria significan reducir en una cantidad mensurable, o prevenir completamente.

5 El término "deplecionar", en el contexto del efecto de un agente de unión a CD19 en células que expresan CD19, se refiere a una reducción del número de o eliminación de las células que expresan CD19.

"Anticuerpos nativos" e "inmunoglobulinas nativas" se definen en la presente memoria como glicoproteínas heterotetraméricas, típicamente de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas por dos cadenas ligeras (L) y dos cadenas pesadas (H). Cada cadena ligera está unida covalentemente a una cadena pesada por un enlace disulfuro para formar un heterodímero. El heterotetrámero está formado por la unión covalente disulfuro entre las dos cadenas pesadas de dichos heterodímeros. Aunque las cadenas ligeras y pesadas están unidas entre sí por un enlace disulfuro, el número de uniones disulfuro entre las dos cadenas pesadas varía según el isotipo de inmunoglobulina (Ig). Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracadena espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene en el extremo amino una dominio variable ( $V_H$ ), seguido de tres o cuatro dominios constantes ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ , y/o  $C_{H4}$ , según sea apropiado para el tipo de anticuerpo), así como una región bisagra (J) entre  $C_{H1}$  y  $C_{H2}$ . Cada cadena ligera tiene dos dominios, un dominio variable amino terminal ( $V_L$ ) y un dominio constante carboxi terminal ( $C_L$ ). El dominio  $V_L$  se asocia no covalentemente con el dominio  $V_H$ , mientras el dominio  $C_L$  comúnmente está unido covalentemente al dominio  $C_{H1}$  mediante un enlace disulfuro. Se cree que residuos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de cadena ligera y pesada (véase, por ejemplo, Chothia *et al.*, 1985, *J. Mol. Biol.* 186:651-663).

El término "hipervariable" se refiere a determinadas secuencias en los dominios variables de una inmunoglobulina que se diferencian extensamente en secuencia entre anticuerpos y contienen residuos que están implicados directamente en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su determinante antigenógeno específico. La hipervariabilidad, tanto en los dominios variables de cadena ligera como de cadena pesada, se concentra en tres segmentos conocidos como regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o bucles hipervariables (HVL). Las localizaciones de las CDR se definen por comparación de secuencia en Kabat *et al.*, 1991, En: *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD., mientras los HVL se definen estructuralmente según la estructura tridimensional del dominio variable, como se describe por Chothia y Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917. Como se define por Kabat, CDR-L1 está posicionada en aproximadamente los residuos 24-34, CDR-L2 en aproximadamente los residuos 50-56, y CDR-L3 en aproximadamente los residuos 89-97 en el dominio variable de cadena ligera. CDR-H1 está posicionada en aproximadamente los residuos 31-35, CDR-H2 en aproximadamente los residuos 50-65, y CDR-H3 en aproximadamente 95-102 en el dominio variable de cadena pesada.

35 Las tres CDR en cada una de las cadenas pesada y ligera están separadas por regiones marco (FR). Desde el extremo amino al extremo carboxi de los dominios variables de cadena pesada y ligera, las FR y CDR están dispuestas en el orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, y FR4. La configuración en gran medida de lámina  $\beta$  de las FR hace que las CDR en cada una de las cadenas estén muy cerca entre sí así como de las CDR de la otra cadena. La conformación resultante contribuye al sitio de unión al antígeno (véase, por ejemplo, Kabat *et al.*, 1991, Publ. NIH No. 91-3242, Vol. I, páginas 647-669), aunque no todos los residuos de CDR están necesariamente implicados de forma directa en la unión al antígeno.

40 Los residuos de FR y dominios constantes de Ig no están típicamente implicados de forma directa en la unión al antígeno, pero pueden contribuir a la unión al antígeno o mediar la función efectora del anticuerpo. Algunos residuos de FR pueden tener un efecto significativo en la unión al antígeno de al menos tres maneras: mediante la unión no covalente de forma directa con un epítopo, mediante la interacción con uno o más residuos de CDR, y mediante la afectación de la interfase entre las cadenas pesada y ligera. En algunas realizaciones, los dominios constantes median varias funciones efectoras de Ig, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y/o fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (ADCP).

45 Las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas de vertebrados se asignan a una de dos clases claramente distintas, kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), sobre la base de la secuencia de aminoácidos del dominio constante. Por comparación, las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas de mamíferos se asignan a una de cinco clases principales, según la secuencia de los dominios constantes: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM. IgG e IgA se dividen además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, e IgG<sub>4</sub>; e IgA<sub>1</sub>, e IgA<sub>2</sub>, respectivamente. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , y  $\mu$ , respectivamente. 55 Se conocen bien las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las clases de las inmunoglobulinas nativas.

55 Los términos "anticuerpo", "anticuerpo anti-CD19", "anticuerpo anti-CD19 humanizado", y "anticuerpo anti-CD19 humanizado variante" se usan en la presente memoria en el sentido más amplio y engloban específicamente anticuerpos de longitud completa y nativos, anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de

- longitud completa), anticuerpos policlonales y anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos). En la presente memoria también se describen fragmentos de anticuerpo, tales como dominios variables y otras partes de anticuerpos que presentan unión a CD19. Los términos "fragmento de anticuerpo anti-CD19", "fragmento de anticuerpo anti-CD19 humanizado", y "fragmento de anticuerpo anti-CD19 humanizado variante" se refieren a una parte de un anticuerpo anti-CD19 de longitud completa en el que se retiene una región variable o una capacidad funcional, por ejemplo, unión específica a epítopo de CD19. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no están limitados a, un fragmento Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv, scFv y scFv-Fc, un anticuerpo divalente, un anticuerpo lineal, un minicuerpo y un anticuerpo multiespecífico formado a partir de fragmentos de anticuerpo que unen antígeno. Los fragmentos de anticuerpo no están incluidos en la definición de "anticuerpo".
- 5 Los términos "anticuerpo monoclonal" o "mAb" se refieren a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos; esto es, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos a un único determinante antigenético, también referido como un epítopo. El modificador "monoclonal" es indicativo de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos dirigidos al epítopo idéntico y no debe considerarse como que requiere la producción del anticuerpo por ningún método particular. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse por cualquier técnica o metodología conocida en la técnica; por ejemplo, el método del hibridoma se describió en primer lugar por Köhler *et al.*, 1975, *Nature* 256:495, o métodos de ADN recombinante conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente U.S. No. 4.816.567). En otro ejemplo, los anticuerpos monoclonales también pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos en fagos, usando técnicas descritas en Clackson *et al.*, 1991, *Nature* 352: 624-628, y Marks *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.* 222: 581-97.
- 10 El término anticuerpo "químérico", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a un tipo de anticuerpo monoclonal en el que una parte de o la secuencia de aminoácidos completa en una o más regiones o dominios de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a, homóloga a, o una variante de, la secuencia correspondiente en un anticuerpo monoclonal a otra especie o que pertenece a otra clase o isotipo de inmunoglobulina, o de una secuencia consenso. Un ejemplo de un anticuerpo químérico es uno que tiene una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal no humano y una región constante de inmunoglobulina IgG humana. Los anticuerpos químéricos incluyen fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que el fragmento de anticuerpo presente la actividad biológica deseada de su anticuerpo parental, por ejemplo, unión al mismo epítopo (véase, por ejemplo, la Patente U.S. No. 4.816.567; y Morrison *et al.*, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855). Los métodos para producir anticuerpos químéricos son conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Morrison, 1985, *Science* 229:1202; Oi *et al.*, 1986, *BioTechniques* 4:214; Gillies *et al.*, 1989, *J. Immunol. Methods* 125:191-202; Patentes U.S. Nos. 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397).
- 15 25 30 35 Un fragmento de anticuerpo "Fv de cadena única" o "scFv" es una variante Fv de cadena única que comprende los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de un anticuerpo en el que los dominios están presentes en una única cadena polipeptídica y que es capaz de reconocer y unirse al antígeno. El polipéptido scFv contiene opcionalmente un conector polipeptídico posicionado entre los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> que permite al scFv formar una estructura tridimensional deseada para la unión a antígeno, (véase, por ejemplo, Plückthun, 1994, En *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Vol. 113, Rosenburg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, p. 269-315).
- 40 45 El término "anticuerpo divalente" se refiere a un fragmento de anticuerpo pequeño que tiene dos sitios de unión a antígeno. Cada fragmento contiene un dominio variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) concatenado con un dominio variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>) para formar un polipéptido V<sub>H</sub> - V<sub>L</sub> o V<sub>L</sub>- V<sub>H</sub>. Mediante el uso de un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> conectados se fuerzan a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena, creando dos sitios de unión a antígeno. Los anticuerpos divalentes se describen más completamente, por ejemplo, en EP 0 404 097; WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448.
- 50 El término "anticuerpo lineal" se refiere a un anticuerpo que tiene una pareja de segmentos Fd en tandem (V<sub>H</sub> -C<sub>H1</sub>-V<sub>H</sub> -C<sub>H1</sub>) que forman una pareja de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos, como se describe en Zapata *et al.*, 1995, *Protein Eng.* 8(10):1057-1062.
- 55 Un anticuerpo "humanizado" para los propósitos de la presente memoria es una variante de secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina que es capaz de unirse a un antígeno predeterminado y que comprende una región marco que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana y una CDR que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina no humana.
- Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se refieren en la presente memoria como residuos "de importación", que se toman típicamente de un dominio de anticuerpo "de importación", particularmente un dominio variable. Un residuo, secuencia, o anticuerpo de importación tiene una afinidad y/o especificidad deseada, u otra actividad biológica de anticuerpo deseable como se discute en la presente memoria.
- Un "agente terapéutico" es un agente que ejerce un efecto citotóxico, citostático, y/o inmunomodulador en las células cancerosas o células inmunes activadas. Los ejemplos de agentes terapéuticos incluyen agentes citotóxicos, agentes

quimioterapéuticos, agentes citostáticos, y agentes inmunomoduladores.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer.

Un "efecto citotóxico" se refiere a la depleción, eliminación y/o matar una o unas células diana. Un "agente citotóxico" se refiere a un agente que tiene un efecto citotóxico y/o citostático en una célula. Se pretende que el término incluya isótopos radiactivos (por ejemplo, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, y Re<sup>186</sup>), agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, de plantas, o animales, y fragmentos de éstos.

Un "efecto citostático" se refiere a la inhibición de la proliferación celular. Un "agente citostático" se refiere a un agente que tiene un efecto citostático en una célula, inhibiendo de esta manera el crecimiento y/o expansión de un subconjunto específico de células.

- 10 El término "marcador" se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directamente o indirectamente con un agente de unión (por ejemplo, un anticuerpo). El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, un marcador isotópico o un marcador fluorescente) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar una alteración química de un compuesto o composición sustrato que es detectable. Los agentes de unión a CD19 marcados pueden prepararse y usarse en varias aplicaciones incluyendo diagnóstico *in vitro* e *in vivo*: Los marcadores útiles incluyen agentes de diagnóstico tales como agentes de contraste (tales como para la formación de imágenes por resonancia magnética, tomografía computerizada o ultrasonidos, por ejemplo, manganeso, hierro o gadolinio).
- 15

Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está asociada habitualmente en la fuente natural del ácido nucleico. Una molécula de ácido nucleico aislada es distinta en la forma o entorno del que se encuentra en la naturaleza. Las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen por lo tanto de la molécula de ácido nucleico que existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que habitualmente expresan el ácido nucleico donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

- 20
- 25 El término "secuencia control" se refiere a una secuencia de polinucleótido necesaria para la expresión de una secuencia codificadora unida de forma operativa en un organismo huésped particular. Las secuencias control adecuadas para uso en células procariotas incluyen, por ejemplo, secuencias de promotor, operador y sitio de unión a ribosomas. Las secuencias de control eucariotas incluyen, pero no están limitadas a, promotores, señales de poliadenilación, y potenciadores. Estas secuencias control pueden utilizarse para la expresión y producción de agentes de unión a CD19 en células huésped procariotas y eucariotas.
- 30

35 Una secuencia de ácido nucleico está "unida de forma operativa" cuando se pone en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, una presecuencia de ácido nucleico o líder de secreción está unida de forma operativa a un ácido nucleico que codifica un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido de forma operativa a una secuencia codificadora si afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosomas está unido de forma operativa a una secuencia codificadora si está posicionada de manera que facilita la traducción. Generalmente, "unido de forma operativa" significa que las secuencias de ácido nucleico que se están uniendo son contiguas, y, en el caso de un líder de secreción, contiguas y en marco de lectura. Sin embargo, los potenciadores son contiguos opcionalmente. La unión puede conseguirse, por ejemplo, por ligación en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, 40 pueden usarse adaptadores, conectores de oligonucleótidos sintéticos u otros métodos conocidos en la técnica.

- 45 El término "polipéptido" se refiere a un polímero de aminoácidos y su equivalente y no se refiere a una longitud específica de un producto; así, "péptidos" y "proteínas" se incluyen en la definición de un polipéptido. También están incluidos en la definición de polipéptidos "anticuerpos" como se define en la presente memoria. Una "región polipeptídica" se refiere a un segmento de un polipéptido, segmento que puede contener, por ejemplo, uno o más dominios o restos (por ejemplo, una región polipeptídica de un anticuerpo puede contener, por ejemplo, una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR)). El término "fragmento" se refiere a una parte de un polipéptido que tiene preferiblemente al menos 20 aminoácidos contiguos o al menos 50 aminoácidos contiguos del polipéptido.

- 50 A no ser que se indique otra cosa por el contexto, un "derivado" es un polipéptido o fragmento de éste que tiene una o más sustituciones no conservativas o conservativas de aminoácidos respecto a un segundo polipéptido (también referido como una "variante"); o un polipéptido o fragmento de éste que está modificado por la unión covalente de una segunda molécula tal como, por ejemplo, por la unión de un polipéptido heterólogo, o por glicosilación, acetilación, fosforilación, y semejantes. En la definición de "derivado" se incluyen además, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (por ejemplo, aminoácidos no naturales y semejantes), polipéptidos con uniones no sustituidas, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto naturales como no naturales.
- 55

Un polipéptido "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos de

diagnóstico o terapéuticos para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteináceos o no proteináceos. Un polipéptido aislado incluye un anticuerpo aislado, o un fragmento o derivado de éste.

En determinadas realizaciones, el polipéptido se purificará (1) hasta más del 95% en peso de polipéptido según se determina por el método de Lowry, y en otros aspectos hasta más del 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna por el uso de secuenciador de taza giratoria, o (3) hasta homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. "Anticuerpo aislado" incluye el anticuerpo *in situ* con células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente.

El término "heterólogo", en el contexto de un polipéptido, significa de una fuente diferente (por ejemplo, una célula, tejido, organismo, o especie) comparado con otro polipéptido, de manera que los dos polipéptidos son diferentes. Típicamente, un polipéptido heterólogo es de una especie diferente.

En el contexto de los polipéptidos de inmunoglobulina, o fragmentos de éstos, como se ha definido anteriormente, "sustitución conservativa" significa una o más sustituciones de aminoácidos que no reducen sustancialmente la unión específica (por ejemplo, según se mide por la  $K_D$ ) del polipéptido de inmunoglobulina o fragmento de éste a un antígeno (por ejemplo, sustituciones que incrementan la unión, que no alteran significativamente la unión, o que reducen la unión no más de aproximadamente 40%, típicamente no más de aproximadamente 30%, más típicamente no más de aproximadamente 20%, incluso más típicamente no más de aproximadamente 10%, o lo más típicamente no más de aproximadamente 5%, según se determina pro ensayos estándar de unión tales como, por ejemplo, ELISA).

Los términos "idéntico" o "porcentaje de identidad", en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o polipéptido, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de residuos de nucleótidos o aminoácidos que son iguales, cuando se compara y alinea para correspondencia máxima. Para determinar el porcentaje de identidad, las secuencias se alinean para propósitos de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o ácido nucleico para el alineamiento óptimo con una segunda secuencia de aminoácidos o ácido nucleico). Entonces se comparan los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que en la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = nº de posiciones idénticas/nº total de posiciones (por ejemplo, posiciones superpuestas) x 100). En algunas realizaciones, las dos secuencias tienen la misma longitud.

El término "sustancialmente idéntico", en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% de identidad, o al menos 99% de identidad (por ejemplo, según se determina usando uno de los métodos mostrados *infra*).

En el contexto de agentes de unión a CD19 descritos en la presente memoria, una proteína que tiene una o más regiones polipeptídicas sustancialmente idénticas a una o más regiones de unión a antígeno (por ejemplo, una región variable de cadena pesada o ligera, o una CDR de cadena pesada o ligera) de un anticuerpo anti-CD19 retiene la unión específica a un epítopo de CD19 reconocido por el anticuerpo anti-CD19, según se determina usando cualquiera de varios inmunoensayos estándar conocidos en la técnica o como se refiere en la presente memoria.

La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencia puede conseguirse usando un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitativo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877. Dicho algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410. Las búsquedas de nucleótidos por BLAST pueden realizarse con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a un ácido nucleico que codifica una proteína de interés. Las búsquedas de proteínas por BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una proteína de interés. Para obtener alineamientos con huecos para propósitos de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.*, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402. Alternativamente, puede usarse PSI-Blast para realizar una búsqueda iterada que detecta relaciones distantes entre moléculas (*id.*). Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST, y PSI-BLAST, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Otro ejemplo no limitativo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, CABIOS (1989). Dicho algoritmo se incorpora en el programa ALIGN (versión 2.0) que es parte del paquete de software de alineamiento de secuencias GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, puede usarse una tabla de pesos de residuos PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12, y una penalización por hueco de 4. Los algoritmos adicionales para el análisis de secuencias se conocen en la técnica e incluyen ADVANCE y ADAM como se describe en Torellis y Robotti, 1994, *Comput. Appl. Biosci.* 10:3-5; y FASTA descrito en Pearson y Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444-8. En FASTA, ktup

es una opción de control que ajusta la sensibilidad y velocidad de la búsqueda. Si ktup=2, se encuentran regiones similares en las dos secuencias que se están comparando mirando en parejas de residuos alineados; si ktup=1, se examinan aminoácidos alineados únicos. ktup puede ajustarse a 2 ó 1 para secuencias de proteínas, o de 1 a 6 para secuencias de ADN. El valor por defecto si ktup no se especifica es 2 para proteínas y 6 para ADN. Alternativamente, el alineamiento de secuencias de proteína puede llevarse a cabo usando el algoritmo CLUSTAL W, como se describe por Higgins *et al.*, 1996, *Methods Enzymol.* 266:383-402.

Opcionalmente, cualquiera de dos secuencias de anticuerpo pueden alinearse, por ejemplo, para determinar el porcentaje de identidad, mediante el uso del sistema de numeración de Kabat de manera que cada aminoácido en una secuencia de anticuerpo se alinea con el aminoácido en la otra secuencia que tiene el mismo número Kabat.

Después del alineamiento, si una región del anticuerpo objeto (por ejemplo, la región variable madura completa de una cadena pesada o ligera) se está comparando con la misma región de un anticuerpo de referencia, el porcentaje de identidad de secuencia entre las regiones de anticuerpo objeto y de referencia es el número de posiciones ocupadas por el mismo aminoácido tanto en la región de anticuerpo objeto como de referencia dividido por el número total de posiciones alineadas de las dos regiones, con los huecos no contados, multiplicado por 100 para convertirlo en porcentaje.

"Célula efectora" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a una célula que expresa un receptor de superficie para la región Fc de una inmunoglobulina (FcR). Por ejemplo, las células que expresan FcR de superficie para IgG incluyendo FcγRIII (CD16), FcγRII (CD32) y FcγRI (CD64) pueden actuar como células efectoras. Dichas células efectoras incluyen monocitos, macrófagos, células asesinas naturales (NK), neutrófilos y eosinófilos.

El término "función o funciones efectoras de anticuerpo" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a una función a la que contribuye una o unas regiones Fc de una Ig. Dicha función puede verse afectada, por ejemplo, por la unión de una o unas regiones efectoras Fc a un receptor de Fc en una célula inmune con actividad fagocítica o lítica o por la unión de una o unas regiones efectoras Fc a componentes del sistema del complemento. El compuesto de conjugado ligando-fármaco de la descripción puede tener o no función efectora.

Un "trastorno", tal y como se usa en la presente memoria, y los términos "trastorno asociado a CD19" y "enfermedad asociada a CD19" se refieren a cualquier afección que se beneficiaría de tratamiento con un compuesto de conjugado ligando-fármaco descrito en la presente memoria. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicos y agudos incluyendo aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitativos de trastornos que se pueden tratar en la presente memoria incluyen cánceres que expresan CD19, incluyendo malignidades hematológicas, tumores benignos y malignos, leucemias y malignidades linfoides, así como trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos. Los ejemplos específicos de trastornos se describen *infra*.

Las malignidades de células B también referidas como malignidades del linaje de células B son tratables por los métodos descritos en la presente memoria. El término malignidades de células B incluye cualquier malignidad que deriva de una célula del linaje de células B.

Los términos "tratamiento" y "terapia", y semejantes, tal y como se usan en la presente memoria, se pretende que incluyan medidas terapéuticas o supresoras para una enfermedad o trastorno que dan lugar a cualquier efecto clínicamente deseable o beneficioso, incluyendo, pero no limitado a, alivio o mitigación de uno o más síntomas, regresión, ralentización o cese de la progresión de la enfermedad o trastorno. Por ejemplo, el tratamiento puede incluir una disminución o eliminación de un síntoma clínico o de diagnóstico de un trastorno que expresa CD19 después del inicio del síntoma clínico o de diagnóstico mediante la administración de un compuesto de conjugado ligando-fármaco a un sujeto. El tratamiento puede ponerse de manifiesto como una disminución en la gravedad de un síntoma, el número de síntomas, o frecuencia de recidiva.

Excepto cuando se indica, los términos "sujeto" o "paciente" se usan indistintamente y se refieren a mamíferos tales como pacientes humanos y primates no humanos, así como animales experimentales tales como conejos, perros, gatos, ratas, ratones, y otros animales. De acuerdo con esto, el término "sujeto" o "paciente" tal y como se usa en la presente memoria significa cualquier paciente o sujeto mamífero al que puede administrarse el compuesto de conjugado ligando-fármaco. Los sujetos incluyen aquellos que han sido diagnosticados con un cáncer que expresa CD19, incluyendo, por ejemplo, linfoma de células B o leucemia de células B, incluyendo, pero no limitado a, linfoma no de Hodgkin, leucemia linfocítica crónica, y leucemia linfoblástica aguda. En determinadas realizaciones, el sujeto tendrá un cáncer que expresa CD19 refractario o recidivante. Los sujetos incluyen aquellos que han sido diagnosticados con un trastorno autoinmune.

Un sujeto con un cáncer que expresa CD19 refractario es un sujeto que no responde a terapia, es decir, el sujeto continúa experimentando la progresión de la enfermedad a pesar de la terapia.

Un sujeto con un cáncer que expresa CD19 recidivante es un sujeto que ha respondido a la terapia en un punto, pero que ha tenido una reaparición o progresión adicional de la enfermedad después de la respuesta.

El término "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad de un conjugado ligando-fármaco que es suficiente para inhibir la aparición de o mejora uno o más síntomas clínicos o de diagnóstico de un trastorno asociado a CD19 en un sujeto.

Una cantidad efectiva de un agente se administra según los métodos descritos en la presente memoria en un "régimen efectivo". El término "régimen efectivo" se refiere a una combinación de cantidad del agente y una frecuencia de dosificación adecuada para conseguir el tratamiento o prevención de un trastorno asociado a CD19.

- 5 El término "leucemia" se refiere a enfermedades progresivas, malignas, de los órganos formadores de la sangre y se caracteriza generalmente por una proliferación y desarrollo distorsionados de leucocitos y sus precursores en la sangre y médula ósea. La leucemia generalmente se clasifica clínicamente sobre la base de (1) la duración y carácter de la enfermedad--aguda o crónica; (2) el tipo de célula implicada; mieloide (mielógena), linfóide (linfógena), o monocítica; y (3) el incremento o no incremento en el número de células anormales en la sangre--leucémica o aleucémica (subleucémica). La leucemia incluye, por ejemplo, leucemia no linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia granulocítica aguda, leucemia granulocítica crónica, leucemia promielocítica aguda, leucemia de células T del adulto, leucemia aleucémica, una leucemia leucocitémica, leucemia basofílica, leucemia de blastos, leucemia bovina, leucemia mielocítica crónica, leucemia cutis, leucemia embrionario, leucemia eosinofílica, leucemia de Gross, leucemia de células pilosas, leucemia hemoblástica, leucemia hemocitoblastica, leucemia histiocítica, leucemia de células madre, leucemia monocítica aguda, leucemia leucopénica, leucemia linfática, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, leucemia linfógena, leucemia linfoide, leucemia de células de linfosarcoma, leucemia de mastocitos, leucemia megacariocítica, leucemia micromieloblastica, leucemia monocítica, leucemia mieloblastica, leucemia mielocítica, leucemia granulocítica mieloide, leucemia mielomonocítica, leucemia Naegeli, leucemia de células plasmáticas, leucemia plasmacítica, leucemia promielocítica, leucemia de células de Rieder, leucemia de Schilling, leucemia de células madre, leucemia subleucémica, y leucemia de células indiferenciadas.
- 10
- 15
- 20
- 25
- El término "farmacéuticamente aceptable" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones, y/o formas de dosificación que, en el alcance del criterio médico sólido, son adecuadas para contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica excesivas, u otros problemas o complicaciones commensuradas con una relación beneficio/riesgo razonable. El término "ingrediente farmacéuticamente compatible" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo farmacéuticamente aceptable con el que se administra el conjugado ligando-fármaco.

El término "ingrediente farmacéuticamente compatible" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo farmacéuticamente aceptable con el que se administra el conjugado ligando-fármaco.

- 30 El término "compuesto" se refiere a y engloba el compuesto químico en sí mismo así como, ya se afirme explícitamente o no, y a no ser que el contexto aclare que los siguientes se deben excluir: formas amorfas y cristalinas del compuesto, incluyendo formas polimórficas, donde estas formas pueden ser parte de una mezcla o estar solas; formas de ácido libre o base libre del compuesto, que son típicamente las formas mostradas en las estructuras proporcionadas en la presente memoria; isómeros del compuesto, que se refiere a isómeros ópticos, e isómeros tautoméricos, en los que los isómeros ópticos incluyen enantiómeros y diastereómeros, isómeros quirales e isómeros no quirales, y los isómeros ópticos incluyen isómeros ópticos aislados así como mezclas de isómeros ópticos incluyendo mezclas racémicas y no racémicas; en los que un isómero puede estar en forma aislada o mezclada con uno o más isómeros adicionales; isótopos del compuesto, incluyendo compuestos que contienen deuterio y tritio, e incluyendo compuestos que contienen radioisótopos, incluyendo radioisótopos efectivos terapéuticamente y en diagnóstico; formas multiméricas del compuesto, incluyendo formas diméricas, triméricas, etc.; sales del compuesto, preferiblemente sales farmacéuticamente aceptables, incluyendo sales de adición a ácido y sales de adición a base, incluyendo sales que tienen contraiones orgánicos y contraiones inorgánicos, e incluyendo formas zwiteriónicas, en las que si un compuesto se asocia con dos o más contraiones, los dos o más contraiones pueden ser iguales o diferentes; y solvatos del compuesto, incluyendo hemisolvatos, monosolvatos, disolvatos, etc., incluyendo solvatos orgánicos y solvatos inorgánicos, incluyendo dichos solvatos inorgánicos hidratos; en los que si un compuesto se asocia con dos o más moléculas de disolvente, las dos o más moléculas de disolvente pueden ser iguales o diferentes. En algunos casos, en la presente memoria la referencia a un compuesto incluirá una referencia explícita a una de las formas anteriores, por ejemplo, sales y/o solvatos, sin embargo, esta referencia es sólo para enfatizar, y no debe considerarse como excluyente de otras de las formas anteriores como se ha identificado anteriormente.
- 35
- 40
- 45

- 50 Tal y como se usa en la presente memoria, "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a derivados de los compuestos descritos en los que el compuesto parental se modifica preparando sales ácidas o básicas de éste. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no están limitadas a, sales de ácido mineral u orgánico de residuos básicos tales como aminas; sales de álcali u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos; y semejantes. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales no tóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternario del compuesto parental formadas, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Por ejemplo, dichas sales no tóxicas convencionales incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico y semejantes; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pamoico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etano disulfónico, oxálico, isetiónico, y semejantes. Estas sales fisiológicamente aceptables se preparan por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, disolviendo las bases amina libres con un exceso del ácido en alcohol acuoso, o neutralizando un ácido carboxílico libre con una base de metal alcalino tal como un hidróxido, o con una amina.
- 55
- 60

A no ser que se indique otra cosa, el término "alquilo" se refiere a un hidrocarburo saturado lineal o ramificado que tiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en él), prefiriéndose de aproximadamente 1 a aproximadamente 8 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquilo son metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo, *n*-butilo, *iso*-butilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, *n*-pentilo, 2-pentilo, 3-pentilo, 2-metil-2-butilo, *n*-hexilo, *n*-heptilo, *n*-octilo, *n*-nonilo, *n*-decilo, 3-metil-2-butilo, 3-metil-1-butilo, 2-metil-1-butilo, 1-hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, 2-metil-2-pentilo, 3-metil-2-pentilo, 4-metil-2-pentilo, 3-metil-3-pentilo, 2-metil-3-pentilo, 2,3-dimetil-2-butilo, y 3,3-dimetil-2-butilo.

Los grupos alquilo, ya sea solos o como parte de otro grupo, pueden estar sustituidos opcionalmente con uno o más grupos, preferiblemente 1 a 3 grupos (y cualesquiera sustituyentes adicionales seleccionados de halógeno), incluyendo, pero no limitado a, halógeno, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, arilo sustituido opcionalmente, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR', -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -NHC(O)R', -SR', -SO<sub>3</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)R', -OH, =O, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> y -CN, en el que cada R' se selecciona independientemente de H, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, o arilo sustituido opcionalmente, y en el que dichos grupos O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, arilo sustituido opcionalmente, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, y -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente pueden estar sustituidos además opcionalmente con uno o más grupos incluyendo, pero no limitado a, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, halógeno, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR', -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -NHC(O)R', -SR', -SO<sub>3</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)R', -OH, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> y -CN, en el que cada R" se selecciona independientemente de H, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, o arilo.

A no ser que se indique otra cosa, los términos "alquenilo" y "alquinilo" se refieren a cadenas de carbono lineales y ramificadas que tienen de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en él), prefiriéndose de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 átomos de carbono. Una cadena alquenilo tiene al menos un doble enlace en la cadena y una cadena alquinilo tiene al menos un triple enlace en la cadena. Los ejemplos de grupos alquenilo incluyen, pero no están limitados a, etileno o vinilo, alilo, -1-butenilo, -2-butenilo, -isobutilenilo, -1-pentenilo, -2-pentenilo, -3-metil-1-butenilo, -2-metil-2-butenilo, y -2,3-dimetil-2-butenilo. Los ejemplos de grupos alquinilo incluyen, pero no están limitados a, acetilénico, propargilo, acetilenilo, propinilo, -1-butinilo, -2-butinilo, -1-pentinilo, -2-pentinilo, y -3-metil-1 butinilo.

Los grupos alquenilo y alquinilo, ya sea solos o como parte de otro grupo, pueden estar sustituidos opcionalmente con uno o más grupos, preferiblemente 1 a 3 grupos (y cualesquiera sustituyentes adicionales seleccionados de halógeno), incluyendo, pero no limitado a, halógeno, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, arilo sustituido opcionalmente, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR', -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -NHC(O)R', -SR', -SO<sub>3</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)R', -OH, =O, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> y -CN, en el que cada R' se selecciona independientemente de H, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, o arilo sustituido opcionalmente, y en el que dichos grupos O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, arilo sustituido opcionalmente, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, y -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente pueden estar sustituidos además opcionalmente con uno o más sustituyentes incluyendo, pero no limitado a, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, halógeno, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR', -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -NHC(O)R', -SR', -SO<sub>3</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)R', -OH, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> y -CN, en el que cada R" se selecciona independientemente de H, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, o arilo.

A no ser que se indique otra cosa, el término "alquileno" se refiere a un radical hidrocarburo saturado de cadena ramificada o lineal que tiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en él), prefiriéndose de aproximadamente 1 a aproximadamente 8 átomos de carbono y que tiene dos centros radicales monovalentes derivados de la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o de dos átomos de carbono diferentes de un alcano parental. Los alquilenos típicos incluyen, pero no están limitados a, metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno, heptileno, octileno, nonileno, decaleno, 1,4-ciclohexileno, y semejantes. Los grupos alquileno, ya sea solos o como parte de otro grupo, pueden estar sustituidos opcionalmente con uno o más grupos, preferiblemente 1 a 3 grupos (y cualesquiera sustituyentes adicionales seleccionados de halógeno), incluyendo, pero no limitado a, halógeno, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, arilo sustituido opcionalmente, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR', -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -NHC(O)R', -SR', -SO<sub>3</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)R', -OH, =O, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> y -CN, en el que cada R' se selecciona independientemente de H, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, o arilo sustituido opcionalmente, y en el que dichos grupos O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, arilo sustituido opcionalmente, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, y -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, arilo sustituido opcionalmente, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, y -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente.

<sup>5</sup> C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, y -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente pueden estar sustituidos además opcionalmente con uno o más sustituyentes incluyendo, pero no limitado a, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, halógeno, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), -arilo, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR", -C(O)N(R")<sub>2</sub> -NHC(O)R", -SR", -SO<sub>3</sub>R", -S(O)<sub>2</sub>R", -S(O)R", -OH, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R"), -N(R")<sub>2</sub> y -CN, en el que cada R" se selecciona independientemente de H, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, o arilo.

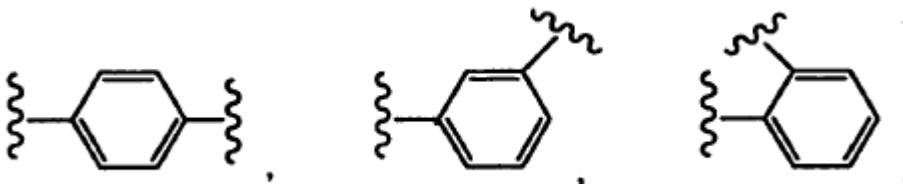
A no ser que se indique otra cosa, el término "alquenileno" se refiere a un grupo alquíleno sustituido opcionalmente que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono. Los grupos alquenileno ejemplares incluyen, por ejemplo, etenileno (-CH=CH-) y propenileno (-CH=CHCH<sub>2</sub>-).

<sup>10</sup> A no ser que se indique otra cosa, el término "alquinileno" se refiere a un grupo alquíleno sustituido opcionalmente que contiene al menos un triple enlace carbono-carbono. Los grupos alquinileno ejemplares incluyen, por ejemplo, acetileno (-C≡C-), propargilo (-CH<sub>2</sub>C≡C-), y 4-pentinilo (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C≡CH-).

<sup>15</sup> A no ser que se indique otra cosa, el término "arilo" se refiere a un radical hidrocarburo aromático monovalente de 6-20 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en él) derivado por la eliminación de un átomo de hidrógeno de un único átomo de carbono de un sistema de anillos aromáticos parental. Algunos grupos arilo se representan en las estructuras ejemplares como "Ar". Los grupos arilo típicos incluyen pero no están limitados a, radicales derivados de benceno, benceno sustituido, fenilo, naftaleno, antraceno, bifenilo, y semejantes.

<sup>20</sup> Un grupo arilo, ya sea solo o como parte de otro grupo, puede estar sustituido opcionalmente con uno o más, preferiblemente 1 a 5, o incluso 1 a 2 grupos, incluyendo, pero no limitado a, halógeno, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquinilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, arilo sustituido opcionalmente, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR', -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -NHC(O)R', -SR', -SO<sub>3</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)R', -OH, -NO<sub>2</sub>, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> y -CN, en el que cada R' se selecciona independientemente de H, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, o arilo sustituido opcionalmente y en el que dichos grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, y arilo sustituido opcionalmente pueden estar sustituidos además opcionalmente con uno o más sustituyentes incluyendo, pero no limitado a, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, halógeno, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), -arilo, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR", -C(O)N(R")<sub>2</sub>, -NHC(O)R", -SR", -SO<sub>3</sub>R", -S(O)<sub>2</sub>R", -S(O)R", -OH, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R"), -N(R")<sub>2</sub> y -CN, en el que cada R" se selecciona independientemente de H, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, o arilo.

<sup>35</sup> A no ser que se indique otra cosa, el término "arileno" se refiere a un grupo arilo sustituido opcionalmente que es divalente (es decir, deriva de la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o de dos átomos de carbono diferentes de un sistema de anillos aromáticos parental) y puede estar en las configuraciones orto, meta, o para como se muestra en las estructuras siguientes con fenilo como el grupo arilo ejemplar:



<sup>40</sup> Los grupos "-(alquíleno C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)arilo", "-(alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)arilo", y -(alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)arilo" típicos incluyen, pero no están limitados a, bencilo, 2-feniletan-1-ilo, 2-feneileten-1-ilo, naftilmetilo, 2-neftiletan-1-ilo, 2-naftileten-1-ilo, naftobencilo, 2-neftofeniletan-1-ilo y semejantes.

<sup>45</sup> A no ser que se indique otra cosa, el término "heterociclo", se refiere a un sistema de anillos monocíclicos, bicíclicos, o policíclicos que tiene de 3 a 14 átomos en el anillo (también referidos como miembros del anillo) en el que al menos un átomo del anillo en al menos un anillo es un heteroátomo seleccionado de N, O, P, o S (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono y heteroátomos en él). El heterociclo puede tener de 1 a 4 heteroátomos en el anillo seleccionados independientemente de N, O, P, o S. Uno o más átomos de N, C, o S en un heterociclo pueden estar oxidados. Un heterociclo monocíclico tiene preferiblemente 3 a 7 miembros del anillo (por ejemplo, 2 a 6 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados independientemente de N, O, P, o S), y un heterociclo bicíclico tiene preferiblemente 5 a 10 miembros del anillo (por ejemplo, 4 a 9 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados independientemente de N, O, P, o S). El anillo que incluye el heteroátomo puede ser aromático o no aromático. A no ser que se indique otra cosa, el heterociclo está unido a su

grupo lateral en cualquier heteroátomo o átomo de carbono que resulta en una estructura estable.

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

A no ser que se indique otra cosa, el término "heterociclo" se refiere a un grupo heterociclo sustituido opcionalmente como se define en la presente memoria que es divalente (es decir, deriva de la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o de dos átomos de carbono diferentes de un sistema de anillos heterocíclicos parentales).

Los ejemplos de grupos "heterociclo" incluyen como ejemplo y no como limitación piridilo, dihidropiridilo, tetrahidropiridilo (piperidilo), tiazolilo, pirimidinilo, furanilo, tienilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tetrazolilo, benzofuranilo, tianaftalenilo, indolilo, indolenilo, quinolinilo, isoquinolinilo, bencimidazolilo, 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-quinolizinilo, ftalazinilo, naftiridinilo, quinoxalinilo, quinazolinilo, cinolinilo, pteridinilo, 4aH-carbazolilo, carbazolilo,  $\beta$ -carbolinilo, fenantridinilo, acridinilo, pirimidinilo, fenantrolinilo, fenazinilo, fenotiazinilo, furazanilo, fenoxazinilo, isocromanilo, cromanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, piperazinilo, indolinilo, isoindolinilo, quinuclidinilo, morfolinilo, oxazolidinilo, benzotriazolilo, bencisoxazolilo, oxindolilo, benzoaxazolnilo, e isatinoilo. Los grupos "heterociclo" preferidos incluyen, pero no están limitados a, benzofuranilo, benzotiofenilo, indolilo, benzopirazolilo, coumarinilo, isoquinolinilo, pirrolilo, tiofenilo, furanilo, tiazolilo, imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, quinolinilo, pirimidinilo, pirdinilo, piridinilo, pirazinilo, piridazinilo, isotiazolilo, isoxazolilo y tetrazolilo.

Un grupo heterociclo, ya sea solo o como parte de otro grupo, puede estar sustituido opcionalmente con uno o más grupos, preferiblemente 1 a 2 grupos, incluyendo pero no limitado a, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, - alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, halógeno, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, arilo sustituido opcionalmente, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR', -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -NHC(O)R', -SR', -SO<sub>3</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)R', -OH, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> y -CN, en el que cada R' se selecciona independientemente de H, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, o arilo sustituido opcionalmente en el que dichos grupos O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, y arilo sustituido opcionalmente pueden estar además sustituidos opcionalmente con uno o más sustituyentes incluyendo, pero no limitado a, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, halógeno, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR', -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -NHC(O)R', -SR', -SO<sub>3</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)R', -OH, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> y -CN, en el que cada R" se selecciona independientemente de H, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, o arilo.

Como ejemplo y no limitación, los heterociclos unidos por carbono pueden estar unidos en las posiciones siguientes: posición 2, 3, 4, 5, ó 6 de una piridina; posición 3, 4, 5, ó 6 de una piridazina; posición 2, 4, 5, ó 6 de una pirimidina; posición 2, 3, 5, ó 6 de una pirazina; posición 2, 3, 4, ó 5 de un furano, tetrahidrofuranano, tiofurano, tiofeno, pirrol o tetrahidropirrol; posición 2, 4, ó 5 de un oxazol, imidazol o tiazol; posición 3, 4, ó 5 de un isoxazol, pirazol, o isotiazol; posición 2 ó 3 de una aziridina; posición 2, 3, ó 4 de una azetidina; posición 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8 de una quinolina; o posición 1, 3, 4, 5, 6, 7, u 8 de una isoquinolina. Aún más típicamente, los heterociclos unidos por 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, ó 5-tiazolilo.

Como ejemplo y no limitación, los heterociclos unidos por nitrógeno pueden estar 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, ó 1H-indazol; posición 2 de un isoindol, o isoindolina; posición 4 de una morfolina; y posición 9 de un carbazol, o  $\beta$ -carbolina. Aún más típicamente, los heterociclos unidos por nitrógeno incluyen 1-aziridilo, 1-azetedilo, 1-pirrolilo, 1-imidazolilo, 1-pirazolilo, y 1-piperidinilo.

A no ser que se indique otra cosa, el término "carbociclo", se refiere a un sistema de anillos no aromáticos saturados o insaturados monocíclicos, bicíclicos, o policíclicos que tiene de 3 a 14 átomos en el anillo (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en él) en el que todos los átomos del anillo son átomos de carbono. Los carbociclos monocíclicos tienen preferiblemente 3 a 6 átomos en el anillo, aún más preferiblemente 5 ó 6 átomos en el anillo. Los carbociclos bicíclicos tienen preferiblemente 7 a 12 átomos en el anillo, por ejemplo, dispuestos como un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6], ó 9 ó 10 átomos en el anillo dispuestos como un sistema biciclo [5,6] o [6,6]. El término "carbociclo" incluye, por

ejemplo, un anillo carbociclo monocíclico fusionado con un anillo arilo (por ejemplo, un anillo carbociclo monocíclico fusionado a un anillo benceno). Los carbociclos tienen preferiblemente 3 a 8 átomos de carbono en el anillo.

Los grupos carbociclo, ya sean solos o como parte de otro grupo, pueden estar sustituidos opcionalmente, por ejemplo, con uno o más grupos, preferiblemente 1 ó 2 grupos (y cualesquiera sustituyentes adicionales seleccionados de halógeno), incluyendo, pero no limitado a, halógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, arilo sustituido opcionalmente, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR', -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -NHC(O)R', -SR', -SO<sub>3</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)R', -OH, =O, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> y -CN, en el que cada R' se selecciona independientemente de H, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, o arilo sustituido opcionalmente y en el que dichos grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, y arilo sustituido opcionalmente pueden estar además sustituidos opcionalmente con uno o más sustituyentes incluyendo, pero no limitado a, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, halógeno, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), -arilo, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR", -C(O)N(R")<sub>2</sub>, -NHC(O)R", -SR", -SO<sub>3</sub>R", -S(O)<sub>2</sub>R", -S(O)R", -OH, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R"), -N(R")<sub>2</sub> y -CN, en el que cada R" se selecciona independientemente de H, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, o arilo.

Los ejemplos de sustituyentes carbocílicos 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. -1,3-ciclohexadienilo. -1,4-ciclohexadienilo, -1,3-cicloheptadienilo, -1,3,5-cicloheptatrienilo, y -ciclooctadienilo.

Un "carbociclo", ya se use solo o como parte de otro grupo, se refiere a un grupo carbociclo sustituido opcionalmente como se ha definido anteriormente que es divalente (es decir, deriva de la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o de dos átomos de carbono diferentes de un sistema de anillos carbocílicos parentales).

Cuando cualquier variable aparece más de una vez en cualquier constituyente o en cualquier fórmula, su definición en cada aparición es independiente de su definición en cualquier otra. Las combinaciones de sustituyentes y/o variables son sólo permisibles si dichas combinaciones resultan en compuestos estables.

A no ser que se indique otra cosa por el contexto, un guión (-) designa el punto de unión de la molécula lateral. De acuerdo con esto, el término "-(alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)arilo" o "-alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> (arilo)" se refiere a un radical alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> como se define en la presente memoria en el que el radical alquieno está unido a la molécula lateral en cualquiera de los átomos de carbono del radical alquieno y uno de los átomos de hidrógeno unidos a un átomo de carbono del radical alquieno se reemplaza por un radical arilo como se define en la presente memoria.

Cuando un grupo particular está "sustituido", ese grupo puede tener uno o más sustituyentes, preferiblemente de uno a cinco sustituyentes, más preferiblemente de uno a tres sustituyentes, lo más preferiblemente de uno a dos sustituyentes, seleccionados independientemente de la lista de sustituyentes. El grupo, sin embargo, puede tener generalmente cualquier número de sustituyentes seleccionados de halógeno. Los grupos que están sustituidos se indican.

Se pretende que la definición de cualquier sustituyente o variable en una localización particular en una molécula sea independiente de sus definiciones en otro lugar en esa molécula. Se entiende que los sustituyentes y patrones de sustitución en los compuestos de esta invención pueden seleccionarse por un experto en la técnica para proporcionar compuestos que son químicamente estables y que pueden sintetizarse fácilmente por técnicas conocidas en la técnica así como aquellos métodos mostrados en la presente memoria.

Grupos protectores tal y como se usa en la presente memoria se refiere a grupos que bloquean selectivamente, bien temporalmente o permanentemente, un sitio reactivo en un compuesto multifuncional. Los grupos protectores hidroxi adecuados para uso en la presente invención pueden administrarse a un sujeto en el contexto de la presente invención y pueden o no necesitar ser escindidos del compuesto parental después de la administración a un sujeto con el fin de que el compuesto sea activo. La escisión es mediante procesos metabólicos normales en el cuerpo. Los grupos protectores hidroxi son muy conocidos en la técnica, véase, Protective Groups in Organic Synthesis por T. W. Greene y P. G. M. Wuts (John Wiley & sons, 3a Edición) e incluyen, por ejemplo, grupos protectores éter (por ejemplo, éteres de alquilo y éteres de sililo incluyendo, por ejemplo, dialquilsililéter, trialquilsililéter, dialquilalcoxilsililéter), éster, carbonato, carbamatos, sulfonato, y fosfato. Los ejemplos de grupos protectores hidroxi incluyen, pero no están limitados a, metil éter; éter de metoximetilo, éter de metiltiometilo, éter de (fenildimethylsili)metoximetilo, éter de benciloximetilo, éter de p-metoxibenciloximetilo, éter de p-nitrobenciloximetilo, éter de o-nitrobenciloximetilo, éter de (4-metoxifenoxy)metilo, éter de guaiacolmetilo, éter de t-butoximetilo, éter de 4-penteniloximetilo, éter de siloximetilo, éter de 2-metoxietoximetilo, éter de 2,2,2-tricloroetoximetilo, éter de bis(2-cloroetoxi)metilo, éter de 2-(trimetilsilil)etoximetilo, éter de mentoximetilo, éter de tetrahidropiranilo, éter de 1-metoxicilcohexilo, éter de 4-metoxitetrahidrotiopiranilo, éter de 4-metoxitetrahidrotiopiranilo S,S-Dióxido, éter de 1-[(2-coro-4-metil)fenil]-4-metoxipiperidin-4-ilo, éter de 1-(2-fluorofenil)-4-metoxipiperidin-4-ilo, éter de 1,4-dioxan-2-ilo, éter

de tetrahidrofuranilo, éter de tetrahidrotifuranilo; éteres de etilo sustituidos tales como éter de 1-etoxietilo, éter de 1-(2-cloroetoxi)etilo, éter de 1-[2-(trimetilsilil)etoxi]etilo, éter de 1-metil-1-metoxietilo, éter de 1-metil-1-bencilogoxietilo, éter de 1-metil-1-bencilogoxi-2-fluoroetilo, éter de 1-metil-1fenoxietilo, éter de 2-trimetilsililo, éter de t-butilo, éter de alilo, éteres de propargilo, éter de p-clorofenilo, éter de p-metoxifenilo, éter de bencilo, éter de p-metoxibencilo, éter de 3,4-dimetoxibencilo, éter de trimetilsililo, éter de trietilsililo, éter de tripropilsililo, éter de dimetilisopropilsililo, éter de dietilisopropilsililo, éter de dimetilhexilsililo, éter de t-butildimetsililo, éter de difenilmetilsililo, éster de benzoilformato, éster de acetato, éster de cloroacetato, éster de dicloroacetato, éster de tricloroacetato, éster de trifluoroacetato, éster de metoxiacetato, éster de trifenilmethoxiacetato, éster de fenilacetato, éster de benzoato, alquil metil carbonato, alquil 9-fluorenilmetil carbonato, alquil etil carbonato, alquil 2,2,2-tricloroetil carbonato, 1,1-dimetil-2,2,2-tricloroetil carbonato, alquilsulfonato, metanosulfonato, bencilsulfonato, tosilato, metilen acetal, etiliden acetal, y t-butilmetiliden cetal.

Los grupos protectores preferidos se representan por las fórmulas -Ra, -Si(Ra)(Ra)(Ra), -C(O)Ra, -C(O)ORa, -C(O)NH(Ra), -S(O)2Ra, -S(O)2OH, P(O)(OH)2, y -P(O)(OH)ORa, en las que Ra es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, -alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo), arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>, -alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (arilo), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (arilo), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (arilo), - alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo), o -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo) en el que dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquieno, alquenileno, y alquinileno ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1, dichos radicales carbociclo ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A2, dichos radicales arilo ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A3, y dichos radicales heterociclo ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A4. A1, A2, A3, y A4 son como se definen en la presente memoria.

La abreviatura "AFP" se refiere a dimetilvalina-valina-dolaisoleuina-dolaproína-fenilalanina-p-fenilendiamina (véase la Fórmula XVI *infra*).

La abreviatura "MMAE" se refiere a monometil auristatina E (véase la Fórmula XI *infra*).

La abreviatura "AEB" se refiere a un éster producido haciendo reaccionar la auristatina E con ácido paraacetil benzoico (véase la Fórmula XX *infra*)

La abreviatura "AEVB" se refiere a un éster producido haciendo reaccionar la auristatina E con ácido benzoilvalérico (véase la Fórmula XXI *infra*).

La abreviatura "MMAF" se refiere a dovalina-valina-dolaisoleuina-dolaproína-fenilalanina (véase la Fórmula XVII *infra*).

#### Agentes de unión a CD19

Los métodos descritos en la presente memoria engloban el uso de compuestos de conjugado ligando-fármaco en los que la unidad de ligando es un anticuerpo que se une específicamente a CD19.

El anticuerpo contenido en el conjugado ligando-fármaco de la presente invención incluye secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y ligera como se muestra en SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 24, respectivamente. Cada región variable comprende un conjunto de tres CDR idénticas a las CDR correspondientes de mAb mBU12.

Las regiones marco elegidas para la región variable de cadena pesada del anticuerpo son el exón de línea germinal humana V<sub>H</sub>, V<sub>H</sub>4-31, y el exón de la línea germinal humana J<sub>H</sub>4 para la secuencia FR4 humanizada. También se describe la unión de secuencia FR4 humanizada. En algunas realizaciones, el exón de la línea germinal humana J<sub>H</sub>1, J<sub>H</sub>2, J<sub>H</sub>3, J<sub>H</sub>5, o J<sub>H</sub>6 se usa en lugar del exón de la línea germinal humana, J<sub>H</sub>4, para la secuencia FR4 humanizada.

La descripción engloba realizaciones en las que las regiones marco elegidas para la región variable de cadena ligera de los agentes de unión a CD19 de la presente invención son los exones de la línea germinal humana V<sub>L</sub>, V<sub>L</sub>-L6 o V<sub>L</sub>A10, y el exón de la línea germinal humana J<sub>k</sub>2 para la secuencia FR4 humanizada. En algunas realizaciones, el exón de la línea germinal humana J<sub>k</sub>1, J<sub>k</sub>3, J<sub>k</sub>4, ó J<sub>k</sub>5 se usa en lugar del exón de la línea germinal humana, J<sub>k</sub>2, para la secuencia FR4 humanizada.

La descripción engloba realizaciones en las que los residuos donantes de ratón se reintroducen en la secuencia de la región marco de los agentes de unión a CD19. Dichos residuos pueden incluir, por ejemplo, la reintroducción del residuo donante de ratón en una o más posiciones 75, 79, 81, 82, 82A, 82B, 82C y 89, según el sistema de numeración de Kabat, de la línea germinal V<sub>H</sub>2-70/J<sub>H</sub>4, posiciones 24, 27, 29, 71, 75, 78, 79, y 89, según el sistema de numeración de Kabat, de la línea germinal V<sub>H</sub>4-31/J<sub>H</sub>4, posiciones 2, 40, 41, 42, 69, 70, 71, 72, y 83, según el sistema de numeración de Kabat, de la línea germinal V<sub>L</sub>-L6/J<sub>k</sub>2, y posiciones 2 y 71, según el sistema de numeración de Kabat, de la línea germinal V<sub>L</sub>A10/J<sub>k</sub>2. Pueden reintroducirse en las secuencias residuos donantes de ratón adicionales en posiciones alternativas.

- La descripción engloba realizaciones en las que los agentes de unión a CD19 descritos en la presente memoria tienen modificación o modificaciones en la secuencia de aminoácidos en el exón de la línea germinal humana aceptora además de la reintroducción de residuos donantes de ratón así como modificación o modificaciones en la secuencia de aminoácidos en las regiones hipervariables. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/o otras propiedades biológicas de un anticuerpo. Las variantes de la secuencia de aminoácidos de agentes de unión a CD19 pueden prepararse introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico de un anticuerpo, o por síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, delecciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, residuos en las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo. Cualquier combinación de delección, inserción, y sustitución puede prepararse para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Las sustituciones pueden ser sustituciones conservativas o no conservativas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos posteriores a la traducción de un anticuerpo, tales como el cambio en el número o posición de sitios de glicosilación.
- Un método útil para la identificación de determinados residuos o regiones del agente de unión a CD19 que son localizaciones favoritas para mutagénesis se denomina "mutagénesis por escaneo de alanina" como se describe por Cunningham y Wells *Science*, 244:1081-1085 (1989). Aquí, se identifica un residuo o 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 (lo más preferiblemente alanina o polialanina) para afectar la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Aquellas localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan introduciendo variantes adicionales u otras en, o para, los sitios de sustitución. Así, aunque el sitio para introducir una variación de la secuencia de aminoácidos está predeterminado, la naturaleza de la mutación *per se* no necesita predeterminarse. Por ejemplo, para analizar el comportamiento de una mutación en un sitio dado, se lleva a cabo escaneo de ala o mutagénesis aleatoria en el codón o región diana y las variantes expresadas se criban para la actividad deseada.
- Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxilo terminales así como inserciones intrasecuencia de un único o múltiples residuos de aminoácidos. Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un residuo de aminoácido en la molécula de anticuerpo reemplazado por un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para mutagénesis por sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan las alteraciones en FR.
- Las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del agente de unión a CD19 se consiguen seleccionando sustituciones que se diferencian significativamente en su efecto para mantener (a) la estructura del núcleo polipeptídico en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina o hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos naturales se dividen en grupos sobre la base de propiedades comunes de la cadena lateral:
- (1) hidrofóbicos: met, ala, val, leu, ile;
  - (2) hidrofílicos neutros: cys, ser, thr;
  - (3) ácidos: asp, glu;
  - (4) básicos: asn, gin, his, lys, arg;
  - (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y
  - (6) aromáticos: trp, tyr, phe.
- Las sustituciones no conservativas conllevarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Las sustituciones conservativas conllevarán el intercambio de miembros de la misma clase.
- Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más residuos de la región hipervariable. En algunas realizaciones, la o las variantes resultantes seleccionadas para desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas mejoradas respecto al agente de unión parental a partir del que se generan. Una forma conveniente de generar dichas variantes de sustitución implica maduración por afinidad usando exposición en fagos. Brevemente, varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) se mutan para generar todas las sustituciones amino posibles en cada sitio. Las variantes así generadas se exponen en una forma monovalente de partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto génico III de M13 empaquetado en cada partícula. Las variantes expuestas en fagos se criban entonces para su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) como se describe en la presente memoria. Con el fin de identificar sitios de la región hipervariable candidatos para modificación, puede realizarse mutagénesis por escaneo de alanina para identificar los residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión de antígeno. Alternativamente, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura de cristal del complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el agente de unión y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos vecinos son candidatos para la sustitución según las técnicas elaboradas en la presente memoria. Una vez se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a cribado como se describe en la presente memoria y los agentes de unión con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes pueden seleccionarse para desarrollo adicional.

- En algunas realizaciones, el anticuerpo contenido en el conjugado ligando-fármaco de la presente invención tiene modificaciones (por ejemplo, sustituciones, delecciones o adiciones) en residuos de aminoácidos que interaccionan con los receptores Fcγ. En algunos aspectos, el anticuerpo tiene modificaciones en residuos de aminoácidos que están implicados en la interacción de unión entre el dominio Fc y uno o más receptores Fcγ. En algunas 5 realizaciones, el anticuerpo tiene modificaciones en residuos de aminoácidos que están implicados en la interacción entre el dominio anti-Fc y el receptor FcRn (véase, por ejemplo, Publicación Internacional No. WO 97/34631).
- En algunas realizaciones, la unión a uno o más receptores Fcγ puede alterarse usando una o más estrategias de ingeniería de anticuerpos conocidas en la técnica. En algunas realizaciones, la unión a uno o más receptores Fcγ puede alterarse reduciendo las funciones efectoras del agente de unión diana usando una o más estrategias de 10 ingeniería de anticuerpos conocidas en la técnica. Más adelante, se proporcionan ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichas estrategias.
- La unión al receptor Fcγ está mediada a través de la interacción de una región de un anticuerpo con un receptor Fc gamma (Fcγ) (FcγR). La región o dominio Fc se refiere a la o las regiones de la región constante del anticuerpo que 15 está implicada en la interacción de unión de la región Fc con uno o más receptores Fcγ (por ejemplo, FcγRI (CD64), FcγRIIb (CD32b) o FcγRIIIa (CD16)). Tanto el estado de glicosilación como la secuencia primaria de aminoácidos de la región Fc de IgG tienen efectos funcionales en la interacción Fc-FcγR.
- La sustitución de posiciones de aminoácidos particulares en la región Fc de las regiones constantes del isotipo IgG 20 se sabe que tienen efectos funcionales en la capacidad de un anticuerpo de unirse a uno o más receptores Fcγ. Véase, por ejemplo, Shields *et al.*, 2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604, y Canfield y Morrison, 1991, *J. Exp. Med.* 173:1483-1491. La región Fc incluye, por ejemplo y no para limitación, residuos de aminoácidos en la región bisagra y el dominio CH2. La sustitución de uno o más residuos de aminoácidos en la región o parte Fc de la región constante de una IgG con aminoácidos no conservativos puede esperarse que altere, es decir, reduzca o incremente, la afinidad de la interacción región Fc-FcγR. Los métodos para introducir sustituciones de aminoácidos no conservativas 25 son muy conocidos en la técnica.
- Alternativamente o adicionalmente, pueden introducirse residuo(s) de cisteína en o en la proximidad de la región o parte Fc de la región constante de una IgG, permitiendo de esta manera la formación de enlace disulfuro intercadena en esta región. Dicha formación de enlace disulfuro intercadena puede esperarse que cause impedimento estérico, 30 reduciendo de esta manera la afinidad de la interacción de unión región Fc-FcγR. El o los residuos de cisteína introducidos en o en la proximidad de la región Fc de la región constante de una IgG también pueden servir como sitios para la conjugación a agentes terapéuticos (es decir, acoplamiento de fármacos citotóxicos usando reactivos específicos de tiol tales como derivados de maleimida de fármacos). La presencia de un agente terapéutico puede 35 esperarse que cause impedimento estérico, reduciendo de esta manera la afinidad de la interacción de unión región Fc-FcγR. Los métodos para introducir residuos de cisteína en anticuerpos o derivados de éstos son muy conocidos en la técnica.
- Alternativamente o adicionalmente, pueden introducirse uno o más sitios de glicosilación ligados a N en o en la proximidad de la región o parte Fc de la región constante de una IgG, permitiendo de esta manera la glicosilación posterior a la traducción en esta región. Dicha glicosilación ligada a N puede esperarse que cause impedimento estérico, 40 reduciendo de esta manera la afinidad de la interacción de unión región Fc-FcγR. Los métodos para introducir sitios de glicosilación ligados a N en anticuerpos o derivados de éstos son muy conocidos en la técnica.
- Una sustitución sistemática de aminoácidos expuestos a disolvente de la región Fc de IgG1 humana ha generado 45 derivados de IgG con afinidades de unión a FcγR alteradas (Shields *et al.*, 2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591-604). Por ejemplo, cuando se compara con la IgG1 parental, un subconjunto de estos derivados que implican sustituciones en Thr256/Ser298, Ser298/Glu333, Ser298/Lys334, o Ser298/Glu333/Lys334 a Ala demuestran incrementos tanto en la afinidad de unión hacia FcγR como en la actividad ADCC (Shields *et al.*, 2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591-604; Okazaki 50 *et al.*, 2004, *J. Mol. Biol.* 336:1239-49). Por el contrario, cuando se compara con IgG1 parental, un subconjunto de estos derivados que implican sustituciones en Glu233 a Pro/Leu234 a Val/Leu235 a Ala y delección de Gly 236, Pro238 a Ala, Asp265 a Ala, Asn297 a Ala, Ala 327 a Gln, o Pro329 a Ala demuestran disminuciones en las afinidades de unión a todos los FcγR; la sustitución Asp265 a Ala también resultó en actividad ADCC disminuida (Shields *et al.*, 2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591-604). Se ha mostrado que los aminoácidos en la región bisagra y el dominio CH2 contribuyen a alta afinidad de IgG humana para FcγR (Canfield y Morrison, 1991, *J. Exp. Med.* 173:1483-1491). Estas posiciones de aminoácidos, o aminoácidos en proximidad a éstos, implicadas en mediar la interacción de unión región Fc-FcγR son dianas potenciales para el reemplazo por aminoácidos no conservativos y/o la introducción de una o más cisteínas, y/o la introducción de uno o más sitios de glicosilación ligados a N.
- La vida media *in vivo* de un anticuerpo también puede afectar a sus funciones efectoras. En algunas realizaciones, es 55 deseable incrementar la vida media de un anticuerpo para modificar sus actividades terapéuticas. En algunas realizaciones, es deseable disminuir la vida media de un anticuerpo para modificar sus actividades terapéuticas. FcRn es un receptor que es estructuralmente similar al antígeno MHC de Clase I que se asocia no covalentemente con β2-microglobulina. FcRn regula el catabolismo de las IgG y su transcitosis a través de los tejidos (Ghetie y Ward, 2000, *Annu. Rev. Immunol.* 18:739-766; Ghetie y Ward, 2002, *Immunol. Res.* 25:97-113). La interacción IgG-FcRn tiene lugar a pH 6,0 (pH de las vesículas intracelulares) pero no a pH 7,4 (pH de la sangre); esta interacción permite

- a las IgG reciclarse de nuevo a la circulación (Ghetie y Ward, 2000, *Ann. Rev. Immunol.* 18:739-766; Ghetie y Ward, 2002, *Immunol. Res.* 25:97-113). La región en IgG<sub>1</sub> humana implicada en la unión a FcRn se ha mapeado (Shields *et al.*, 2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591-604). Las sustituciones de alanina en las posiciones Pro238, Thr256, Thr307, Gln311, Asp312, Glu380, Glu382, o Asn434 de IgG<sub>1</sub> humana potencian la unión a FcRn (Shields *et al.*, 2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591-604). Se espera que las moléculas de IgG<sub>1</sub> que portan estas sustituciones tengan vidas medias en suero más largas. Consecuentemente, estas moléculas de IgG<sub>1</sub> modificadas también pueden ser capaces de llevar a cabo sus funciones efectoras, y por lo tanto ejercer sus eficacias terapéuticas, durante un periodo de tiempo mayor comparado con IgG<sub>1</sub> no modificada.
- En algunas realizaciones, el anticuerpo contenido en el conjugado ligando-fármaco de la presente invención que tiene unión alterada a uno o más FcγR retiene, al menos en algún grado, la capacidad de unirse a FcRn. En algunas realizaciones, los agentes de unión, que tienen unión alterada a uno o más FcγR, retienen la capacidad de unirse a FcRn. La capacidad de un anticuerpo o derivado de éste de unirse a FcRn puede medirse por técnicas conocidas en la técnica (por ejemplo, Shields *et al.*, 2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591-604).
- Un anticuerpo modificado respecto a la función efectora puede, en algunas realizaciones, tener una capacidad mejorada de internalización y/o capacidad de matar células mediada por complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) incrementadas. Véase Caron *et al.* *J. Exp Med.* 176:1191-1195 (1992) y Shope, B. J. *Immunol.* 148:2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con actividad anti-tumoral aumentada también pueden prepararse usando entrecruzadores heterobifuncionales como se describe en Wolff *et al.* *Cancer Research* 53:2560-2565 (1993). Alternativamente, puede prepararse por ingeniería un anticuerpo que tiene regiones Fc duales y puede tener de esta manera lisis por complemento y capacidades ADCC aumentadas. Véase Stevenson *et al.* *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989).
- En determinadas realizaciones, pueden introducirse residuo(s) de cisteína en la región Fc con el fin de afectar la interacción de unión de la región Fc con el receptor FcγRIIIa. En algunas realizaciones, se introduce una sustitución de aminoácido del aminoácido nativo a un residuo de cisteína en la posición de aminoácido 239, 265, 269 ó 327, según el sistema de numeración de Kabat. En algunas realizaciones, se introduce una sustitución de aminoácido del aminoácido nativo a un residuo de cisteína en la posición de aminoácido 239 ó 269, según el sistema de numeración de Kabat. En algunas realizaciones, se introduce una sustitución de aminoácido del aminoácido nativo a un residuo de cisteína en la posición de aminoácido 239, según el sistema de numeración de Kabat. En algunas realizaciones, se introduce una sustitución de aminoácido del aminoácido nativo a un residuo de cisteína en la posición de aminoácido 265, según el sistema de numeración de Kabat. En algunas realizaciones, se introduce una sustitución de aminoácido del aminoácido nativo a un residuo de cisteína en la posición de aminoácido 269, según el sistema de numeración de Kabat. En algunas realizaciones, se introduce una sustitución de aminoácido del aminoácido nativo a un residuo de cisteína en la posición de aminoácido 327, según el sistema de numeración de Kabat.
- En otras realizaciones, se introduce una sustitución de aminoácido del aminoácido nativo a un residuo de cisteína en la posición de aminoácido 236 ó 238, según el sistema de numeración de Kabat. En algunas realizaciones, se introduce una sustitución de aminoácido del aminoácido nativo a un residuo de cisteína en la posición de aminoácido 236, según el sistema de numeración de Kabat. En algunas realizaciones, se introduce una sustitución de aminoácido del aminoácido nativo a un residuo de cisteína en la posición de aminoácido 238, según el sistema de numeración de Kabat.
- En otras realizaciones, se introduce una sustitución de aminoácido del aminoácido nativo a un residuo de cisteína en la posición de aminoácido 234, 235, 237, 267, 298, 299, 326, 330, ó 332, según el sistema de numeración de Kabat. En otras realizaciones, se introduce una sustitución de aminoácido del aminoácido nativo a un residuo de cisteína en la posición de aminoácido 237, 298, 299, 326, 330, ó 332, según el sistema de numeración de Kabat. En otras realizaciones, se introduce una sustitución de aminoácido del aminoácido nativo a un residuo de cisteína en la posición de aminoácido 298, 299, 326, ó 330, según el sistema de numeración de Kabat. En algunas realizaciones, se introduce una sustitución de aminoácido del aminoácido nativo a un residuo de cisteína en la posición de aminoácido 234, según el sistema de numeración de Kabat. En algunas realizaciones, se introduce una sustitución de aminoácido del aminoácido nativo a un residuo de cisteína en la posición de aminoácido 235, según el sistema de numeración de Kabat. En algunas realizaciones, se introduce una sustitución de aminoácido del aminoácido nativo a un residuo de cisteína en la posición de aminoácido 237, según el sistema de numeración de Kabat. En algunas realizaciones, se introduce una sustitución de aminoácido del aminoácido nativo a un residuo de cisteína en la posición de aminoácido 267, según el sistema de numeración de Kabat. En algunas realizaciones, se introduce una sustitución de aminoácido del aminoácido nativo a un residuo de cisteína en la posición de aminoácido 298, según el sistema de numeración de Kabat. En algunas realizaciones, se introduce una sustitución de aminoácido del aminoácido nativo a un residuo de cisteína en la posición de aminoácido 299, según el sistema de numeración de Kabat. En algunas realizaciones, se introduce una sustitución de aminoácido del aminoácido nativo a un residuo de cisteína en la posición de aminoácido 326, según el sistema de numeración de Kabat. En algunas realizaciones, se introduce una sustitución de aminoácido del aminoácido nativo a un residuo de cisteína en la posición de aminoácido 330, según el sistema de numeración de Kabat. En algunas realizaciones, se introduce una sustitución de aminoácido del aminoácido nativo a un residuo de cisteína en la posición de aminoácido 332, según el sistema de numeración de Kabat.

En algunas realizaciones, para incrementar adicionalmente la vida media en suero de un anticuerpo, puede modificarse un epítopo de unión de receptor salvaje del anticuerpo como se describe en la Patente U.S. No. 5.739.277, por ejemplo. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "epítopo de unión de receptor salvaje" se refiere a un epítopo de la región Fc de una molécula de IgG que es responsable de incrementar la vida media en suero *in vivo* de la molécula de IgG. Alternativamente, la vida media en suero del anticuerpo puede incrementarse modificando la región Fc (por ejemplo, dominio constante de IgG) respecto a la unión a receptores Fc gamma (Fcγ), como se describe *infra*.

Los anticuerpos pueden glicosilarse en posiciones conservadas en sus regiones constantes (véase, por ejemplo, Jefferis y Lund, 1997, *Chem. Immunol.* 65:111-128; Wright y Morrison, 1997, *TibTECH* 15:26-32). Las cadenas laterales de oligosacárido de las inmunoglobulinas pueden afectar la función de la proteína (véase, por ejemplo, Boyd *et al.*, 1996, *Mol. Immunol.* 32:1311-1318; Wittwe y Howard, 1990, *Biochem.* 29:4175-4180), y la interacción intramolecular entre partes de la glicoproteína que puede afectar la conformación y superficie tridimensional presentada de la glicoproteína (véase, por ejemplo, Jefferis y Lund, *supra*; Wyss y Wagner, 1996, *Current Opin. Biotech.* 7:409-416). Los oligosacáridos también pueden servir para dirigir una glicoproteína dada a determinadas moléculas sobre la base de estructuras de reconocimiento específicas. Por ejemplo, se ha reportado que en IgG agalactosilada, el resto de oligosacárido 'se despliega' fuera del espacio inter-C<sub>2</sub>H y los residuos terminales de N-acetilglucosamina se convierten en disponibles para unirse a proteína de unión a manosa (véase, por ejemplo, Malhotra *et al.*, 1995, *Nature Med.* 1:237-243). La eliminación por glicopeptidasa de los oligosacáridos de CAMPATH-1H (un anticuerpo IgG1 monoclonal murino humanizado recombinante que reconoce el antígeno CDw52 de linfocitos humanos) producida en células de ovario de hámster chino (CHO) resultó en una reducción completa de la lisis mediada por complemento (CMCL) (Boyd *et al.*, 1996, *Mol. Immunol.* 32:1311-1318), mientras la eliminación selectiva de residuos de ácido siálico usando neuraminidasa no resultó en pérdida de DMCL. También se ha reportado que la glicosilación de anticuerpos afecta ADCC. En particular, las células CHO con expresión regulada por tetraciclina de β(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), una glicosiltransferasa que cataliza la formación de GlcNAc bisecada, se reportó que tenía capacidad ADCC mejorada (véase, por ejemplo, Umana *et al.*, 1999, *Mature Biotech.* 17:176-180).

La glicosilación de anticuerpos está típicamente ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la unión del resto de carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de triptíptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Así, la presencia de cualquiera de estas secuencias de triptíptido en un polipéptido crea un sitio potencial de glicosilación. La glicosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un ácido hidroxiamino, lo más comúnmente serina o treonina, aunque también pueden usarse 5-hidroxiprolina ó 5-hidroxilisina.

Los derivados de glicosilación de anticuerpos son derivados en los que se altera el patrón de glicosilación de un anticuerpo. Determinados anticuerpos de la presente invención tienen patrones de glicosilación alterados. Mediante alteración se quiere decir elecciónar uno o más restos de carbohidratos encontrados en el anticuerpo, añadir uno o más restos de carbohidratos al anticuerpo, cambiar la composición de glicosilación (es decir, patrón de glicosilación), el grado de glicosilación, o semejantes. En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención tienen una fucosilación central reducida.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo puede conseguirse convenientemente, por ejemplo, alterando la secuencia de aminoácidos de manera que contenga una o más de las secuencias de triptíptido descritas anteriormente (para sitios de glicosilación ligados a N). La alteración también puede hacerse, por ejemplo, por la adición de, o sustitución con, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación ligados a O). De forma similar, la eliminación de sitios de glicosilación puede conseguirse por la alteración de aminoácidos en los sitios de glicosilación nativos del anticuerpo.

La secuencia de aminoácidos se altera habitualmente mediante la alteración de la secuencia de ácido nucleico subyacente. Estos métodos incluyen, pero no están limitados a, aislamiento de una fuente natural (en el caso de derivados de secuencia de aminoácidos naturales) o preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótido (o dirigida a sitio), mutagénesis por PCR, o mutagénesis por casete de un derivado preparado antes o una versión no derivada del anticuerpo.

La glicosilación (incluyendo patrón de glicosilación) de anticuerpos también puede alterarse sin alterar la secuencia de aminoácidos o la secuencia de nucleótidos subyacente. La glicosilación depende en gran medida de la célula huésped usada para expresar el anticuerpo. Como el tipo celular usado para la expresión de glicoproteínas recombinantes, por ejemplo, anticuerpos, como terapéuticos potenciales es raramente la célula nativa, pueden esperarse variaciones significativas en el patrón de glicosilación de los anticuerpos. Véase, por ejemplo, Hse *et al.*, 1997, *J. Biol. Chem.* 272:9062-9070. Además de la elección de las células huésped, los factores que afectan la glicosilación durante la producción recombinante de anticuerpos incluyen el modo de crecimiento, formulación de los medios, densidad de los cultivos, oxigenación, pH, esquemas de purificación, y semejantes. Se han propuesto varios métodos para alterar el patrón de glicosilación conseguido en un organismo huésped particular, incluyendo la introducción o sobreexpresión de determinadas enzimas implicadas en la producción de oligosacáridos (véase, por ejemplo, las Patentes U.S. Nos. 5.047.335; 5.510.261; y 5.278,299). La glicosilación, o determinados tipos de

glicosilación, puede eliminarse enzimáticamente de la glicoproteína, por ejemplo, usando endoglicosidasa H (Endo H). Además, la célula huésped recombinante puede prepararse por ingeniería, por ejemplo, hacerse defectuosa en el procesamiento de determinados tipos de polisacáridos. Éstas y técnicas similares son muy conocidas en la técnica.

- 5 La estructura de glicosilación de anticuerpos puede analizarse fácilmente por técnicas convencionales de análisis de carbohidratos, incluyendo cromatografía de lecitina, RMN, espectrometría de masa, HPLC, GPC, análisis composicional de monosacáridos, digestión enzimática secuencial, y HPAEC-PAD, que usa cromatografía de intercambio aniónico a alto pH para separar oligosacáridos sobre la base de la carga. Los métodos para liberar oligosacáridos para propósitos analíticos también son conocidos, e incluyen, sin limitación, tratamiento enzimático (realizado comúnmente usando péptido-N-glicosidasa F/endo- $\beta$ -galactosidasa), eliminación usando entorno alcalino severo para liberar principalmente estructuras ligadas a O, y métodos químicos usando hidrazina anhidra para liberar oligosacáridos tanto ligados a N como a O.
- 10

La tabla siguiente proporciona un resumen de las regiones de BU12 quimérico y humanizado a las que corresponde cada identificador de secuencia (SEQ ID NO.).

MOLÉCULA	Nucleótido o aminoácido	SEQ ID NO
Secuencia líder (Región de cadena pesada)	Aminoácido	1
Región de variable de cadena pesada (línea germinal VH2-70/J <sub>H4</sub> )/También referida como Variante HA	Aminoácido	2
Dominio constante de cadena pesada (IgG <sub>1</sub> )	Aminoácido	3
Variante HB Región variable de cadena pesada (línea germinal VH2-70/J <sub>H4</sub> )	Aminoácido	4
Variante HC Región variable de cadena pesada (línea germinal VH2-70/J <sub>H4</sub> )	Aminoácido	5
Variante HD Región variable de cadena pesada (línea germinal VH2-70/J <sub>H4</sub> )	Aminoácido	6
Variante HE Región variable de cadena pesada (línea germinal VH2-70/J <sub>H4</sub> )	Aminoácido	7
Región de variable de cadena pesada (murina)	Aminoácido	8
Región de variable de cadena pesada (línea germinal VH4-31/J <sub>H4</sub> )/también referida como Variante HF	Aminoácido	9
Variante HG Región variable de cadena pesada (línea germinal VH4-31/J <sub>H4</sub> )	Aminoácido	10
Variante HH Región variable de cadena pesada (línea germinal VH4-31/J <sub>H4</sub> )	Aminoácido	11
Variante HI Región variable de cadena pesada (línea	Aminoácido	12

germinal VH4-31/J <sub>H4</sub> )		
Variante HJ Región variable de cadena pesada (línea germinal VH4-31/J <sub>H4</sub> )	Aminoácido	13
Variante HK Región variable de cadena pesada (línea germinal VH4-31/J <sub>H4</sub> )	Aminoácido	14
Variante HL Región variable de cadena pesada (línea germinal VH4-31/J <sub>H4</sub> )	Aminoácido	15
Secuencia líder (Región de cadena ligera)	Aminoácido	16
Región de variable de cadena ligera (línea germinal VL-L6/J <sub>k2</sub> )/También referida como Variante LA	Aminoácido	17
Dominio constante de cadena ligera (dominio kappa)	Aminoácido	18
Variante LB Región variable de cadena ligera (línea germinal VL-L6/J <sub>k2</sub> )	Aminoácido	19
Variante LC Región variable de cadena ligera (línea germinal VL-L6/J <sub>k2</sub> )	Aminoácido	20
Variante LD Región variable de cadena ligera (línea germinal VL-L6/J <sub>k2</sub> )	Aminoácido	21
Variante LE Región variable de cadena ligera (línea germinal VL-L6/J <sub>k2</sub> )	Aminoácido	22
Variante LF Región variable de cadena ligera (línea germinal VL-L6/J <sub>k2</sub> )	Aminoácido	23
Variante LG Región variable de cadena ligera (línea germinal VL-L6/J <sub>k2</sub> )	Aminoácido	24
Región de cadena ligera (murina)	Aminoácido	25
Región de variable de cadena ligera (línea germinal VL-A10/J <sub>k2</sub> )/También referida como dominio Variante LH	Aminoácido	26
Variante LI Región variable de cadena ligera (línea germinal VL-A10/J <sub>k2</sub> )	Aminoácido	27
Secuencia consenso para la región variable de cadena pesada (línea germinal VH2-70/J <sub>H4</sub> )	Aminoácido	28

Secuencia consenso para la región variable de cadena pesada (línea germinal VH4-31/J <sub>H</sub> 4)	Aminoácido	29
Secuencia consenso para la región variable de cadena ligera (línea germinal VL-L6/J <sub>k</sub> 2)	Aminoácido	30
Secuencia consenso para la región variable de cadena ligera (línea germinal VL-A10/J <sub>k</sub> 2)	Aminoácido	31
Secuencia consenso para la región variable de cadena pesada (línea germinal VH2-70/J <sub>H</sub> 1-6)	Aminoácido	32
Secuencia consenso para la región variable de cadena pesada (línea germinal VH4-31/J <sub>H</sub> 1-6)	Aminoácido	33
Secuencia consenso para la región variable de cadena ligera (línea germinal VL-L6/J <sub>k</sub> 1-5)	Aminoácido	34
Secuencia consenso para la región variable de cadena ligera (línea germinal VL-A10/J <sub>k</sub> 1-5)	Aminoácido	35
Dominio constante de cadena pesada (IgG <sub>2</sub> )	Aminoácido	36
Dominio constante de cadena pesada (IgG <sub>3</sub> )	Aminoácido	37
Dominio constante de cadena pesada (IgG <sub>4</sub> )	Aminoácido	38
Variante de dominio constante de cadena pesada (IgG <sub>1</sub> V <sub>1</sub> )	Aminoácido	39
Secuencia líder (región de cadena pesada)	Nucleótido	40
Región variable de cadena pesada (línea germinal VH4-31/J <sub>H</sub> 4)/también referida como Variante HF	Nucleótido	41
Dominio constante de cadena pesada (IgG <sub>1</sub> )	Nucleótido	42
Secuencia líder (región de cadena ligera)	Nucleótido	43
Variante LG Región variable de cadena ligera (línea germinal VL-L6/J <sub>k</sub> 2)	Nucleótido	44
Dominio constante de cadena ligera (dominio kappa)	Nucleótido	45
CDR1 de cadena pesada	Aminoácido	46
CDR2 de cadena pesada	Aminoácido	47
CDR3 de cadena pesada	Aminoácido	48
CDR1 de cadena ligera	Aminoácido	49

CDR2 de cadena ligera	Aminoácido	50
CDR3 de cadena ligera	Aminoácido	51
Secuencia de cadena pesada alternativa (incluyendo líder, región variable (Variante HF), y dominio constante)	Nucleótido	53
Secuencia líder alternativa (región de cadena pesada)	Nucleótido	54
Dominio constante de cadena pesada alternativo (IgG1)	Nucleótido	55
Secuencia de cadena pesada alternativa (incluyendo líder, región variable (Variante HF), y dominio constante)	Aminoácido	56
Secuencia líder alternativa (región de cadena pesada)	Aminoácido	57
Secuencia de cadena ligera alternativa (incluyendo líder, región variable (Variante LG), y dominio constante)	Nucleótido	58
Secuencia líder alternativa (región de cadena ligera)	Nucleótido	59
Secuencia de cadena ligera alternativa (incluyendo líder, región variable (Variante LG), y dominio constante)	Aminoácido	60
Secuencia líder alternativa (región de cadena ligera)	Aminoácido	61

La presente descripción engloba realizaciones en las que el agente de unión a CD19 comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente idéntica (es decir, que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ó 100% de identidad) a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:2. La secuencia de aminoácidos puede ser, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 que tiene cualquier número de sustituciones siempre que el agente de unión a CD19 retenga la actividad funcional (es decir, actividad de unión a CD19) y que la secuencia retenga una identidad sustancial o completa con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:2. Las regiones variables de cadena pesada ejemplares comprenden una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos

5 mostrada en SEQ ID NO:2 que tiene opcionalmente al menos una sustitución de aminoácido, preferiblemente 0, 1 ó 2 sustituciones de aminoácidos, en las posiciones 75, 79, 81, 82, 82A, 82B, 82C ó 89 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:2, según los sistemas de numeración de Kabat. Las secuencias ejemplares incluyen, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NOs:2, 4, 5, 6, y 7. En un aspecto, el agente de unión a CD19 que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente idéntica (es decir, que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ó 100% de identidad) a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:2 comprende las regiones CDR del anticuerpo mBU12, es decir, SEQ 1D NO:46, 47, y 48.

La presente descripción engloba realizaciones en las que el agente de unión a CD19 comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente idéntica (es decir, que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ó 100% de identidad) a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:9. La secuencia de aminoácidos puede ser, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 que tiene cualquier número de sustituciones siempre que el agente de unión a CD19 retenga la actividad funcional y que la secuencia retenga una identidad sustancial o completa con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:9. Las regiones variables de cadena pesada ejemplares comprenden una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:9 que tiene opcionalmente al menos una sustitución de aminoácido, preferiblemente 0, 1 ó 2 sustituciones de aminoácidos, en las posiciones 24, 27, 29, 75, 78, 79, ó 89 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:9, según los sistemas de numeración de Kabat. Las secuencias ejemplares, incluyen, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NOs:9, 10, 11, 12, 13, 14, y 15. En un aspecto, el agente de unión a CD19 que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente idéntica (es decir, que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%,

98%, 99%, ó 100% de identidad) a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:9 comprende las regiones CDR del anticuerpo mBU12, es decir, SEQ ID NO:46, 47, y 48.

La presente descripción engloba realizaciones en las que el agente de unión a CD19 comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente idéntica (es decir, que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ó 100% de identidad) a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:17. La secuencia de aminoácidos puede ser, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17 que tiene cualquier número de sustituciones siempre que el agente de unión a CD19 retenga la actividad funcional y que la secuencia retenga una identidad sustancial o completa con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:17. Las regiones variables de cadena ligera ejemplares comprenden una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:17 que tiene opcionalmente al menos una sustitución de aminoácido, preferiblemente 0, 1 ó 2 sustituciones de aminoácidos, en las posiciones 2, 40, 41, 69, 70, 71, 72 y 83 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:17, según los sistemas de numeración de Kabat. Las secuencias ejemplares, incluyen, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NOS:17, 19, 20, 21, 22, 23, y 24. En un aspecto, el agente de unión a CD19 que comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente idéntica (es decir, que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ó 100% de identidad) a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:17 comprende las regiones CDR del anticuerpo mBU12, es decir, SEQ ID NO:49, 50, y 51.

La presente descripción engloba realizaciones en las que el agente de unión a CD19 comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente idéntica (es decir, que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ó 100% de identidad) a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:26. La secuencia de aminoácidos puede ser, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26 que tiene cualquier número de sustituciones siempre que el agente de unión a CD19 retenga la actividad funcional y que la secuencia retenga una identidad sustancial o completa con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:26. Las regiones variables de cadena ligera ejemplares comprenden una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:26 que tiene opcionalmente al menos una sustitución de aminoácido en las posiciones 2 y 71 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:26, según los sistemas de numeración de Kabat. Las secuencias ejemplares incluyen, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NOS: 26 y 27. En un aspecto, el agente de unión a CD19 que comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente idéntica (es decir, que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ó 100% de identidad) a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:26 comprende las regiones CDR del anticuerpo mBU12, es decir, SEQ ID NO:49, 50, y 51.

La presente descripción engloba realizaciones en las que el agente de unión a CD19 comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente idéntica (es decir, que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ó 100% de identidad) a la SEQ ID NO:2 como se ha proporcionado anteriormente, y que comprende además una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente idéntica (es decir, que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ó 100% de identidad) a la SEQ ID NO:17, como se ha proporcionado anteriormente. En cualquiera de estas realizaciones, la región variable de cadena pesada puede estar unida a una región constante y la región variable de cadena ligera puede estar unida a una región constante. En algunas realizaciones, la región constante de cadena pesada comprenderá la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NOS:3, ó 36-39. En algunas realizaciones, la región constante de cadena ligera comprenderá la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:18. En determinadas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprenderá además la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO:57 y la región variable de cadena ligera comprenderá además la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:61.

De acuerdo con esto, en determinadas realizaciones, el agente de unión a CD19 comprenderá una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:2 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 17, 19, 20, 21, 22, 23 ó 24; una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:4 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 17, 19, 20, 21, 22, 23 ó 24; una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:5 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 17, 19, 20, 21, 22, 23 ó 24; una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:6 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 17, 19, 20, 21, 22, 23 ó 24; o una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:7 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 17, 19, 20, 21, 22, 23 ó 24. En cualquiera de estas realizaciones, la región variable de cadena pesada puede estar unida a una región constante y la región variable de cadena ligera puede estar unida a una región constante. En algunas realizaciones, la región constante de cadena pesada comprenderá la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NOS:3, ó 36-39. En algunas realizaciones, la región constante de cadena ligera comprenderá la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:18. En determinadas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprenderá además la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO:57 y la región variable de cadena ligera comprenderá además la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:61.



secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:57 y la región variable de cadena ligera comprenderá además la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:61.

La presente descripción engloba realizaciones en las que el agente de unión a CD19 comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente idéntica (es decir, que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ó 100% de identidad) a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:9 como se ha proporcionado anteriormente, y que comprende además una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente idéntica (es decir, que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ó 100% de identidad) a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:26, como se ha proporcionado anteriormente. En cualquiera de estas realizaciones, la región variable de cadena pesada puede estar unida a una región constante y la región variable de cadena ligera puede estar unida a una región constante. En algunas realizaciones, la región constante de cadena pesada comprenderá la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NOs:3, ó 36-39. En algunas realizaciones, la región constante de cadena ligera comprenderá la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:18. En determinadas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprenderá además la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 ó SEQ ID NO:57 y la región variable de cadena ligera comprenderá además la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:61.

De acuerdo con esto, en determinadas realizaciones, el agente de unión a CD19 comprenderá una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:9 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 26 ó 27; una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:10 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 26 ó 27; una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:11 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 26 ó 27; una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:12 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 26 ó 27; una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:13 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 26 ó 27; una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:14 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 26 ó 27; o una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:15 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 26 ó 27. En cualquiera de estas realizaciones, la región variable de cadena pesada puede estar unida a una región constante y la región variable de cadena ligera puede estar unida a una región constante. En algunas realizaciones, la región constante de cadena pesada comprenderá la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NOs:3, ó 36-39. En algunas realizaciones, la región constante de cadena ligera comprenderá la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:18. En determinadas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprenderá además la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:57 y la región variable de cadena ligera comprenderá además la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:61.

La presente descripción engloba realizaciones en las que el agente de unión a CD19 comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente idéntica (es decir, que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ó 100% de identidad) a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:28 o SEQ ID NO: 32. La secuencia de aminoácidos puede ser, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos consenso de SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 32 que tiene cualquier número de sustituciones siempre que el agente de unión a CD19 retenga la actividad funcional (es decir, actividad de unión a CD19) y que la secuencia retenga una identidad sustancial o completa con la secuencia de aminoácidos consenso mostrada en SEQ ID NO:28 o SEQ ID NO: 32, respectivamente.

La presente descripción engloba realizaciones en las que el agente de unión a CD19 comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente idéntica (es decir, que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ó 100% de identidad) a la secuencia de aminoácidos consenso mostrada en SEQ ID NO:29 o SEQ ID NO: 33. La secuencia de aminoácidos puede ser, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29 o SEQ ID NO: 33 que tiene cualquier número de sustituciones siempre que el agente de unión a CD19 retenga la actividad funcional y que la secuencia retenga una identidad sustancial o completa con la secuencia de aminoácidos consenso mostrada en SEQ ID NO: 29 o SEQ ID NO:33, respectivamente.

La presente descripción engloba realizaciones en las que el agente de unión a CD19 comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente idéntica (es decir, que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ó 100% de identidad) a la secuencia de aminoácidos consenso mostrada en SEQ ID NO:30 o SEQ ID NO: 34. La secuencia de aminoácidos puede ser, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO:34 que tiene cualquier número de sustituciones siempre que el agente de unión a CD 19 retenga la actividad funcional y que la secuencia retenga una identidad sustancial o completa con la secuencia de aminoácidos consenso mostrada en SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO:34, respectivamente.

La presente descripción engloba realizaciones en las que el agente de unión a CD19 comprende una región variable

5 de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente idéntica (es decir, que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ó 100% de identidad) a la secuencia de aminoácidos consenso mostrada en SEQ ID NO:31 o SEQ ID NO: 35. La secuencia de aminoácidos puede ser, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:31 o SEQ ID NO: 35 que tiene cualquier número de sustituciones siempre que el agente de unión a CD19 retenga la actividad funcional y que la secuencia retenga una identidad sustancial o completa con la secuencia de aminoácidos consenso mostrada en SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO:35, respectivamente.

10 La presente descripción engloba realizaciones en las que el agente de unión a CD19 comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente idéntica (es decir, que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ó 100% de identidad) a la SEQ ID NO:28 o SEQ ID NO: 32 como se ha proporcionado anteriormente, y que comprende además una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente idéntica (es decir, que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ó 100% identidad) a la SEQ ID NO:30 o SEQ ID NO:34, como se ha proporcionado anteriormente.

15 La presente descripción engloba realizaciones en las que el agente de unión a CD19 comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente idéntica (es decir, que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ó 100% de identidad) a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:28 o SEQ ID NO: 32 como se ha proporcionado anteriormente, y que comprende además una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente idéntica (es decir, que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ó 100% de identidad) a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:31 o SEQ ID NO: 35, como se ha proporcionado anteriormente.

20 La presente descripción engloba realizaciones en las que el agente de unión a CD19 comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente idéntica (es decir, que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ó 100% de identidad) a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:29 o SEQ ID NO: 33 como se ha proporcionado anteriormente, y que comprende además una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente idéntica (es decir, que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ó 100% de identidad) a SEQ ID NO:30 o SEQ ID NO: 34, como se ha proporcionado anteriormente.

25 La presente descripción engloba realizaciones en las que el agente de unión a CD19 comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente idéntica (es decir, que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ó 100% de identidad) a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:29 o SEQ ID NO: 33 como se ha proporcionado anteriormente, y que comprende además una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente idéntica (es decir, que tiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ó 100% de identidad) a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:31 o SEQ ID NO: 35, como se ha proporcionado anteriormente.

30 En algunas realizaciones, un agente de unión a CD19 de la presente comprende un anticuerpo humanizado. Un anticuerpo humanizado que comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:9 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:17 tiene las seis CDR intactas del anticuerpo BU12 de ratón y aminoácidos marco de la región variable completamente humanos. A diferencia de muchos otros anticuerpos humanizados, dicho anticuerpo tiene una afinidad de unión útil a su antígeno incluso sin ninguna sustitución adicional. Sin embargo, dicho anticuerpo también proporciona un punto de partida para preparar variantes. Algunas de dichas variantes comprenden una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90% de identidad de secuencia (abarcando su longitud total) con SEQ ID NO:9 y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:17. Algunas variantes no tienen más de 5, 4, 3, 2 ó 1 aminoácidos que se diferencian de SEQ ID NO:9 en la región variable de cadena pesada y no más de 5, 4, 3, 2, ó 1 aminoácidos que se diferencian de SEQ ID NO:17 en la región variable de cadena ligera.

35 40 45 50 55 60 Algunas variantes se diferencian del anticuerpo anterior por sustitución de uno o más aminoácidos en el marco de la región variable respecto a SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:17. La sustitución puede ser con un aminoácido que ocupa la posición correspondiente (a no ser que se indique otra cosa las posiciones indicadas son por la numeración Kabat) en la región variable de cadena pesada o ligera respectivamente del anticuerpo BU12 (algunas veces referido como un anticuerpo donante). Las sustituciones con aminoácidos donantes incrementan frecuentemente la afinidad del anticuerpo humanizado resultante para su antígeno confiriendo una conformación marco en el anticuerpo humanizado que se parece más de cerca a la del anticuerpo de ratón donante. Una sustitución donante en la posición L83 es particularmente ventajosa para incrementar la afinidad como se muestra en la Fig. 2 (comparar la cadena ligera G con la sustitución y H sin la sustitución). Otras posiciones que se diferencian entre SEQ ID NO:9 y la cadena pesada de BU12 en las que las sustituciones donantes pueden realizarse incluyen, por ejemplo, H24, H27, H29, H71, H75, H789, H79, y H89 en las que, después de la sustitución donante, las posiciones están ocupadas por F, F, L, K, S, V, F, y A respectivamente. Las posiciones marco de región variable de cadena ligera que se diferencian entre SEQ ID NO:17 y la cadena ligera de BU12 incluyen las posiciones L2, L40, L41, L42, L69, L70, L71, L72 y L83

ocupadas por N, S, S, T, N, S, H, F, y V respectivamente en la cadena ligera de BU12 de ratón. El efecto de muchas de estas sustituciones en la afinidad del anticuerpo también se muestra en la Fig. 2. Puede observarse que algunas de estas sustituciones o combinaciones de sustituciones incrementan la afinidad. Algunas sustituciones de cadena pesada preferidas incluyen una o más de H71, H75, H78 y H79 ocupadas por K, S, V, y F respectivamente después de la sustitución donante. Algunas sustituciones de cadena ligera preferidas incluyen una o más de las posiciones L2, L69, L71, L72 y L83 ocupadas por N, N, H, F, y V respectivamente después de la sustitución donante. Ninguna de las sustituciones o combinaciones ensayadas causó una pérdida inaceptable de afinidad.

La cantidad de sustituciones donantes a incluir refleja un equilibrio de consideraciones de competencia. En general, son deseables las sustituciones que incrementan significativamente la afinidad. Sin embargo, el minimizar el número total de sustituciones marco en la región variable también es ventajoso para reducir la inmunogenicidad potencial. Un anticuerpo humanizado que no tiene sustituciones en el marco de la región variable de cadena pesada y una sustitución donante L83 del marco de la región variable de cadena ligera representa un equilibrio preferido entre maximizar la afinidad y minimizar la inmunogenicidad. Son posibles muchas otras permutaciones.

Así como o en lugar de sustituciones donantes, un aminoácido de marco de la región variable puede sustituirse con el aminoácido que ocupa la posición correspondiente en otra secuencia de anticuerpo humano o un consenso de secuencias de anticuerpos humanos (véase, por ejemplo, Queen, US 7.022.500). La base racional para dicha sustitución es frecuentemente sustituir un aminoácido relativamente raro en secuencias de inmunoglobulinas humanas con un aminoácido más común para esa posición con la vista puesta en reducir la inmunogenicidad. En los anticuerpos humanizados en los que los marcos de región variable se proporcionan por secuencias de la línea germinal, dichas sustituciones son posibles pero generalmente no necesarias porque las secuencias de la línea germinal carecen de aminoácidos raros que pueden introducirse por mutación somática.

Los aminoácidos marco de región variable también pueden sustituirse con aminoácidos que no son aminoácidos donantes o aminoácidos consenso. Dichas sustituciones son preferiblemente sustituciones de aminoácidos conservativas. Aunque muchas sustituciones tienen poco efecto en la afinidad, pueden incrementar la inmunogenicidad y así en general no se prefieren.

La sustitución de uno o más residuos CDR u omisión de una o más CDR también es posible. Se han descrito en la bibliografía científica numerosos anticuerpos en los que una o dos CDR pueden dispensarse para unión. Padlan et al., FASEB Journal 9: 133-139 (1995) analizaron las regiones de contacto entre anticuerpos y sus antígenos, sobre la base de estructuras de cristal publicadas, y concluyeron que sólo aproximadamente un quinto a un tercio de los residuos CDR se ponen realmente en contacto con el antígeno. Padlan et al. denominaron a estos residuos SDR (para residuos que determinan la especificidad). Padlan también encontró muchos anticuerpos en los que una o dos CDR no tenían aminoácidos en contacto con el antígeno. Asimismo, Vajdos et al (Journal of Molecular Biology, vol. 320, pp. 415-428 (2002) reportaron que CDR1 de la cadena ligera de un anticuerpo frente a ErbB2 no estaba implicada en la unión. Dicha enseñanza se ha aplicado a la humanización de anticuerpos, por ejemplo, por Iwahashi et al., Mol. Immunol. 36:1079-1091, (1999), que mostraron que podían insertar sólo L1 y L3, o L2 y L3, del anticuerpo murino CR49 en un marco humano y retener la interacción de alta afinidad con el antígeno. De forma similar, Tamura et al. Journal of Immunology, 2000, 164:1432-1441 (2000) reportaron que las CDR 1 y 2 de cadena ligera podían dispensarse con totalidad en un anticuerpo anti-carcinoma humanizado, como podían varios residuos en las CDR restantes. La sustitución de determinadas regiones en las CDR se basa en el mismo principio que omitir CDR dispensables, concretamente que sólo un pequeño subconjunto de los residuos CDR, los SDR, se ponen realmente en contacto con el antígeno.

Los residuos CDR que no se ponen en contacto con el antígeno pueden identificarse sobre la base de estudios previos (por ejemplo, los residuos H60-H65 en CDRH2 no se requieren frecuentemente), de regiones de las CDR Kabat que se encuentran fuera de las CDR Chothia, por modelado molecular y/o empíricamente. Si una CDR o residuo(s) de ésta se omite, se sustituye habitualmente con un aminoácido que ocupa la posición correspondiente en la secuencia aceptora humana suministrando las secuencias marco de región variable (en este ejemplo, VH4-31/JH4 para la cadena pesada y VL-L6 JK2 para la cadena ligera). El número de dichas sustituciones a incluir refleja un equilibrio de consideraciones competentes. Dichas sustituciones son potencialmente ventajosas para disminuir el número de aminoácidos de ratón en un anticuerpo humanizado y consecuentemente disminuir la inmunogenicidad potencial. Sin embargo, las sustituciones también pueden causar cambios en la afinidad, y se evitan preferiblemente las reducciones significativas en la afinidad. Las posiciones para sustitución en las CDR y aminoácidos para sustituir también pueden seleccionarse empíricamente. Las sustituciones empíricas pueden ser sustituciones conservativas o no conservativas. Sin embargo, en general, las sustituciones empíricas no tienen la ventaja de sustituciones de ratón a humano en la reducción de la inmunogenicidad. Las sustituciones empíricas pueden incrementar o disminuir la afinidad del anticuerpo humanizado resultante.

En general, los anticuerpos humanizados con afinidad de unión satisfactoria a CD19 y que carecen de inmunogenicidad sustancial pueden obtenerse por cribado individual de variantes preparadas según los principios anteriores y/o según los presentes ejemplos. Sin embargo, pueden cribarse simultáneamente números muy grandes de variantes usando un método de selección por exposición tal como exposición en fagos (véase (Dower et al., WO91/17271; McCafferty et al., WO92/001047; y Winter, WO92/20791). Las mismas consideraciones se aplican mutatis mutandis en el diseño de variantes de otros anticuerpos humanizados o cadenas de anticuerpos descritas en

- la presente memoria. Por ejemplo, SEQ ID NO:2 proporciona un punto de partida alternativo a SEQ ID NO:9 para el diseño de variantes de cadena pesada. SEQ ID NO:2 comprende las tres CDR de cadena pesada del anticuerpo BU12 con una secuencia marco de región variable completamente humana de los genes VH2-70 y JH4. SEQ ID NO:26 proporciona un punto de partida alternativo a SEQ ID NO:17 para el diseño de variantes de cadena ligera.
- 5 SEQ ID NO:26 comprende las tres CDR de cadena ligera del anticuerpo BU12 en una secuencia marco completamente humana de los genes A10 y JK2. Las posiciones marco de región variable de cadena pesada específicas para sustitución potencial y los aminoácidos a sustituir en dichas posiciones se indican en la tabla "residuos FR no homólogos BU12 frente a VH431) en el Ejemplo 1. Las posiciones marco de región variable de cadena ligera específicas para sustitución potencial en SEQ ID NO:26 se indican en la tabla "residuos FR no homólogos BU12 VL frente a L6 y A10" en el Ejemplo 2.
- 10 La presente descripción engloba realizaciones en las que la región variable de cadena pesada comprende además una secuencia líder. Las secuencias líder de cadena pesada ejemplares se muestran en SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:57.
- 15 La presente descripción engloba realizaciones en las que la región variable de cadena ligera comprende además una secuencia líder. Las secuencias líder de cadena ligera ejemplares se muestran en SEQ ID NO:16 y SEQ ID NO:61.
- El anticuerpo contenido en el conjugado ligando-fármaco descrito en la presente memoria incluye una región efectora de anticuerpo.
- 20 La presente descripción engloba realizaciones en las que la región variable de cadena pesada está unida a una región constante de IgG humana, específicamente la región constante de IgG1 o la región constante de IgG2, o la región constante alterada de IgG1V1. Los dominios de región constante ejemplares se proporcionan como SEQ ID NO:3 y 36-39.
- La presente descripción también engloba realizaciones en las que la región variable de cadena ligera está unida a una región constante, tal como una región constante kappa. Un dominio de región constante ejemplar se proporciona como SEQ ID NO:18.
- 25 La presente descripción engloba realizaciones en las que la región variable de cadena ligera está unida a una región constante, tal como una región constante kappa. Un dominio de región constante ejemplar se proporciona como SEQ ID NO: 18 y la región variable de cadena pesada está unida a una región constante de IgG humana, específicamente la región constante de IgG1 o la región constante de IgG2, o la región constante alterada de IgG1V1. Los dominios de región constante ejemplares se proporcionan como SEQ ID NO:3 y 36-39.
- 30 El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tal como un anticuerpo, puede ser monoespecífico, biespecífico, triespecífico, o con una mayor multiespecificidad. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítopes de CD19 y/o pueden ser específicos tanto para CD19 como para una proteína heteróloga. (Véase, por ejemplo, las Publicaciones PCT WO 93/17715, WO 92/08802, WO 91/00360, y WO 92/05793; Tutt *et al.*, 1991, *J. Immunol.* 147:60-69; Patentes U.S. Nos. 4.474.893; 4.714.681; 4.925.648; 5.573.920; y 5.601.819; Kostelný *et al.*, 1992, *J. Immunol.* 148:1547-1553.) Los anticuerpos multiespecíficos, incluyendo anticuerpos biespecíficos y triespecíficos, útiles para poner en práctica los métodos descritos en la presente memoria son anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente tanto a CD19 como a un segundo receptor o complejo de receptor de la superficie de las células, es decir, uno que media ADCC, ADCP, y/o CDC.
- 35 Los agentes de unión a CD19 también pueden describirse o especificarse en términos de su afinidad de unión a CD19. Las afinidades de unión típicas incluyen aquellas con una constante de disociación o Kd menor de  $5 \times 10^{-6}$  M,  $10^{-6}$  M,  $5 \times 10^{-7}$  M,  $10^{-7}$  M,  $5 \times 10^{-8}$  M,  $10^{-3}$  M,  $5 \times 10^{-9}$  M,  $10^{-9}$  M,  $5 \times 10^{-10}$  M,  $10^{-10}$  M,  $5 \times 10^{-11}$  M,  $10^{-11}$  M,  $5 \times 10^{-12}$  M,  $10^{-12}$  M,  $5 \times 10^{-13}$ ,  $10^{-13}$  M,  $5 \times 10^{-14}$  M,  $10^{-14}$ ,  $5 \times 10^{-15}$  M, ó  $10^{-15}$  M.
- 40 En la presente memoria también se describen ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, por ejemplo, un anticuerpo completamente humanizado o un fragmento de unión a antígeno humanizado. También se describen ácidos nucleicos que codifican una cadena polipeptídica que tiene la secuencia de aminoácidos o que tiene una identidad sustancial con las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NOS: 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26 ó 27. En algunas realizaciones, un ácido nucleico codificará una cadena polipeptídica que tiene la secuencia de aminoácidos o que tiene una identidad sustancial con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NOS: 1, 3, 16, 18, 56, 57, 60 ó 61. En determinadas realizaciones, un ácido nucleico comprenderá la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NOS. 40, 41, 42, 43, 44, 45, 53, 54, 55, 58, ó 59. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico codificará una región variable de cadena pesada de un anticuerpo y comprenderá SEQ ID NO. 41, y opcionalmente una o más de las secuencias mostradas en SEQ ID NOS. 40, y 42. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico codificará una región variable de cadena pesada de un anticuerpo y comprenderá SEQ ID NO. 41, y opcionalmente una o más de las secuencias mostradas en SEQ ID NOS. 54, y 55. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico codificará una región variable de cadena pesada de un anticuerpo y comprenderá SEQ ID NO. 53. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico codificará una región variable de cadena ligera de un anticuerpo y comprenderá SEQ ID NO. 44, y opcionalmente una o más de las secuencias mostradas en SEQ ID NOS. 43, y 45. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico codificará una

región variable de cadena ligera de un anticuerpo y comprenderá SEQ ID NO. 44, y opcionalmente una o más de las secuencias mostradas en SEQ ID NOS. 59, y 45. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico codificará una región variable de cadena ligera de un anticuerpo y comprenderá SEQ ID NO. 58.

5 También se incluyen en algunas realizaciones ácidos nucleicos que codifican un agente de unión a CD19 que hibrida en condiciones de astringencia baja, moderada y alta, como se define en la presente memoria, con todo o una parte de una secuencia de nucleótidos que codifica un agente de unión a CD19 descrito en la presente memoria, o por su complemento. Las condiciones de astringencia alta, astringencia moderada y astringencia baja para la hibridación de ácidos nucleicos son conocidas en la técnica. Ausubel, F.M. et al., "Current Protocols in Molecular Biology" (John Wiley & Sons 1998), páginas 2.10.1-2.10.16; 6.3.1-6.3.6. Las condiciones exactas que determinan la astringencia de 10 la hibridación dependen no sólo de la fuerza iónica (por ejemplo, 0,2XSSC, 0,1XSSC), temperatura (por ejemplo, temperatura ambiente, 42°C, 68°C) y la concentración de agentes desestabilizantes tales como formamida o agentes 15 desnaturizantes tales como SDS, sino también de factores tales como la longitud de la secuencia de ácido nucleico, composición de bases, porcentaje de emparejamiento erróneo entre las secuencias que hibridan y la frecuencia de aparición de subconjuntos de esa secuencia en otras secuencias no idénticas. Por ejemplo, un lavado de 20 astringencia baja puede comprender lavar en una disolución que contiene 0,2XSSC/0,1% SDS durante 10 min a temperatura ambiente; un lavado de astringencia moderada puede comprender lavar en una disolución precalentada (42°C) que contiene 0,2XSSC/0,1% SDS durante 15 min a 42°C; y un lavado de astringencia alta puede comprender lavar en una disolución precalentada (68°C) que contiene 0,1XSSC/0,1% SDS durante 15 min a 68°C. Además, los lavados pueden realizarse repetidamente o secuencialmente para obtener un resultado deseado como se conoce en la técnica.

La presente descripción engloba realizaciones en las que el agente de unión a CD19 es, por ejemplo, un anticuerpo de longitud completa humanizado, fragmento de anticuerpo humanizado, o un derivado de éstos.

25 Los agentes de unión a CD19 pueden generarse por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos monoclonales usando una amplia variedad de técnicas incluyendo, por ejemplo, el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes, y de exposición en fago, o una combinación de éstas. Las técnicas de hibridoma se discuten generalmente, por ejemplo, en Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2a·ed., 1988; Harlow y Lane, *Using Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1999); y Hammerling et al., En *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, p. 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981). Los ejemplos de métodos de exposición en fagos que pueden usarse para preparar 30 anticuerpos anti-CD19 incluyen, por ejemplo,, aquellos descritos en Hoogenboom y Winter, 1991, *J. Mol. Biol.* 227:381; Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581; Quan y Carter, 2002, *The rise of monoclonal antibodies as therapeutics in Anti-IgE and Allergic Disease*, Jardieu y Fick Jr., eds.; Marcel Dekker, Nueva York, NY, Capítulo 20, p. 427-469; Brinkman et al., 1995, *J. Immunol. Methods* 182:41-50; Ames et al., 1995, *J. Immunol. Methods* 184:177-35 186; Kettleborough et al., 1994, *Eur. J. Immunol.* 24:952-958; Persic et al., 1997, *Gene* 187:9-18; Burton et al., 1994, *Advances in Immunology* 57:191-280; Solicitud PCT No. PCT/GB91/01134; Publicaciones PCT WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982, WO 95/20401, y Patentes U.S. Nos. 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108.

40 Como se discute en la presente memoria, los agentes de unión a CD19 pueden incluir la secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada y/o ligera humanizada. Los anticuerpos pueden humanizarse usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica incluyendo, por ejemplo,, injerto de CDR (véase, por ejemplo, EP 0 239 400; Publicación PCT WO 91/09967;Patentes U.S. Nos. 5.225.539; 5.530.101; y 5.585.089), recubrimiento o modificación en superficie (véase, por ejemplo, EP 0 592 106; EP 0 519 596; Padlan, *Molecular Immunology*, 1991, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, *Protein Engineering* 7(6):805-814; Roguska et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:969-973), e intercambio de cadenas (véase, por ejemplo, Patente U.S. No. 5.565.332). Los anticuerpos humanizados y los fragmentos de éstos pueden producirse por técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica, por ejemplo, usando métodos descritos en Publicación Internacional No. WO 87/02671; Publicación de Patente Europea No. 0 184 187; Publicación de Patente Europea No. 0 171 496; Publicación de Patente Europea No. 0 173 494; Publicación Internacional No. WO 86/01533; Patente U.S. No. 4.816.567; Publicación de Patente Europea 45 No. 0 012 023; Berter et al., 1988, *Science* 240:1041-43; Liu et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-43; Liu et al., 1987, *J. Immunol.* 139:3521-26; Sun et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-18; Nishimura et al., 1987, *Cancer. Res.* 47:999-1005; Wood et al., 1985, *Nature* 314:446-449; Shaw et al., 1988, *J. Natl Cancer Inst.* 80:1553-59; Morrison, 1985, *Science* 229:1202-07; Oi et al., 1986, *BioTechniques* 4:214; Patente U.S. 5.225.539; Jones et al., 1986, *Nature* 321:552-25; Verhoeven et al., 1988, *Science* 239:1534; y Beidler et al., 1988, *J. Immunol.* 141:4053-60;

50 55 Los ejemplos de técnicas que pueden usarse para producir anticuerpos de cadena única incluyen aquellas descritas en Patentes U.S. Nos. 4.946.778 y 5.258.498; Huston et al., 1991, *Methods in Enzymology* 203:46-88; Shu et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7995-7999; y Skerra et al., 1988, *Science* 240:1038-1040.

60 60 Los métodos para preparar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos parejas de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en las que las dos cadenas tienen diferentes especificidades (véase, por ejemplo, Milstein et al., 1983, *Nature* 305:537-39). Debido a la selección aleatoria de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina,

estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diferentes moléculas de anticuerpo, de las que una tiene la estructura biespecífica correcta. Procedimientos similares se describen en la Publicación Internacional No. WO 93/08829, y en Traunecker *et al.*, 1991, *EMBO J.* 10:3655-59.

Según una estrategia diferente, dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan con secuencias de dominios constantes de inmunoglobulina. La fusión es típicamente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, C<sub>H</sub>2, y C<sub>H</sub>3. En algunas realizaciones, la fusión incluye una primera región constante de cadena pesada (C<sub>H</sub>1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ácidos nucleicos con secuencias que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se co-transfектan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en realizaciones con relaciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción que proporcionan rendimientos óptimos. Es, sin embargo, posible insertar las secuencias codificadoras para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en relaciones iguales resulta en rendimientos altos o cuando las relaciones no tienen una significancia particular.

En un ejemplo de esta estrategia, los anticuerpos biespecíficos tienen una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una forma fácil de separación (véase, por ejemplo, Publicación Internacional No. WO 94/04690).

Para una discusión adicional de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, 1986, *Methods in Enzymology* 121:210; Rodrigues *et al.*, 1993, *J. Immunology* 151:6954-61; Carter *et al.*, 1992, *Bio/Technology* 10:163-67; Carter *et al.*, 1995, *J. Hematotherapy* 4:463-70; Merchant *et al.*, 1998, *Nature Biotechnology* 16:677-81. Usando dichas técnicas, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos para uso en el tratamiento o prevención de enfermedades como se define en la presente memoria.

Los anticuerpos bifuncionales también se describen en Publicación de Patente Europea No. 0 105 360. Como se describe en esta referencia, los anticuerpos híbridos o bifuncionales se pueden derivar biológicamente, es decir, por técnicas de fusión celular, o químicamente, especialmente con agentes de entrecruzamiento o reactivos que forman puentes disulfuro, y pueden comprender anticuerpos completos o fragmentos de éstos. Los métodos para obtener dichos anticuerpos híbridos se describen, por ejemplo, en Publicación Internacional WO 83/03679 y Publicación de Patente Europea No. 0 217 577.

El anticuerpo contenido en el conjugado ligando-fármaco de la invención puede ser un derivado de un anticuerpo anti-CD19. En determinadas realizaciones, un derivado de anticuerpo anti-CD19 comprende un anticuerpo anti-CD19 y al menos una región polipeptídica u otro resto heterólogo al anticuerpo anti-CD19. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD19 puede modificarse, por ejemplo, por la unión covalente de cualquier tipo de molécula, de manera que la unión covalente no evita que el derivado de anticuerpo sea una específicamente a CD19 mediante la región de unión a antígeno o región derivada de ésta, o, si se desea, la región efectora o parte de ésta sea una específicamente al receptor Fc. Las modificaciones típicas incluyen, por ejemplo, glicosilación desglicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización con grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, y semejantes. Puede llevarse a cabo cualquiera de numerosas modificaciones químicas por técnicas conocidas, incluyendo, pero no limitado a, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc.

En algunas realizaciones, el derivado de anticuerpo es un multímero, tal como, por ejemplo, un dímero, que comprende uno o más monómeros, en el que cada monómero incluye (i) un anticuerpo anti-CD19, y (ii) una región polipeptídica multimerizante (por ejemplo, dimerizante), de manera que el derivado de anticuerpo forma multímeros (por ejemplo, homodímeros) que se unen específicamente a CD19. En realizaciones típicas, un anticuerpo anti-CD19, se fusiona recombinantemente o químicamente con una proteína heteróloga, en el que la proteína heteróloga comprende un dominio de dimerización o multimerización. Antes de la administración del derivado de anticuerpo a un sujeto para el propósito de tratar o prevenir cánceres que expresan CD19, el derivado se somete a condiciones que permiten la formación de un homodímero o heterodímero. Un heterodímero, tal y como se usa en la presente memoria, puede comprender dominios de dimerización idénticos pero diferentes regiones de unión a antígeno CD19, regiones idénticas de unión a antígeno CD19 pero diferentes dominios de dimerización, o diferentes regiones de unión a antígeno CD19 y dominios de dimerización.

Los dominios de dimerización típicos son aquellos que se originan de factores de transcripción. En una realización, el dominio de dimerización es el de una región básica de cremallera de leucina ("bZIP") (véase, por ejemplo, Vinson *et al.*, 1989, *Science* 246:911-916). Los dominios de cremallera de leucina útiles incluyen, por ejemplo, aquellos del factor de transcripción de levadura GCN4, el factor de transcripción de mamíferos CCAAT/proteína de unión

potenciadora C/EBP, y la transformación nuclear en productos oncogénicos, Fos y Jun. (Véase, por ejemplo, Landschultz et al., 1988, *Science* 240:1759-64; Baxevanis y Vinson, 1993, *Curr. Op. Gen. Devel.* 3:278-285; O'Shea et al., 1989, *Science* 243:538-542.) En otra realización, el dominio de dimerización es el de una proteína de región básica hélice-bucle-hélice ("bHLH"). (Véase Murre et al., 1989, *Cell* 56:777-783. Véase también Davis et al., 1990, *Cell* 60:733-746; Voronova y Baltimore, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4722-26.) Las proteínas hHLH particularmente útiles son myc, max, y mac.

En otras realizaciones más, el dominio de dimerización es una región constante de inmunoglobulina tal como, por ejemplo, una región constante de cadena pesada o un dominio de ésta (por ejemplo, un dominio CH1, un dominio CH2, y/o un dominio CH3). Véase, por ejemplo, Patentes U.S. Nos. 5.155.027; 5.336.603; 5.359.046; y 5.349.053; EP 0 367 166; y WO 96/04388.)

Se sabe que los heterodímeros se forman entre Fos y Jun (Bohmann et al., 1987, *Science* 238:1386-1392), entre miembros de la familia ATF/CREB (Hai et al., 1989, *Genes Dev.* 3:2083-2090), entre miembros de la familia C/EBP (Cao et al., 1991, *Genes Dev.* 5:1538-52; Williams et al., 1991, *Genes Dev.* 5:1553-67; Roman et al., 1990, *Genes Dev.* 4:1404-15), y entre miembros de las familias ATF/CREB y Fos/Jun (Hai y Curran, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3720-24). Por lo tanto, cuando un agente de unión a CD19 se administra a un sujeto como un heterodímero que comprende diferentes dominios de dimerización, puede usarse cualquier combinación de los anteriores.

En otras realizaciones, un derivado de anticuerpo anti-CD19 es un anticuerpo anti-CD19 conjugado con un segundo anticuerpo (un "heteroconjuguado de anticuerpo") (véase, por ejemplo, Patente U.S. No. 4.676.980). Los heteroconjugados pueden formarse, por ejemplo, entre un anticuerpo que se une a CD19 y un anticuerpo que se une a un receptor o complejo de receptor de superficie que media ADCC, fagocitosis, y/o CDC, tal como CD16/FcγRIII, CD64/FcγRI, receptores activadores o inhibidores de células asesinas, o la proteína de control de complemento CD59. En una realización, la unión de la parte del anticuerpo multiespecífico a la segunda molécula o complejo de receptor de la superficie celular potencia las funciones efectoras de un anticuerpo anti-CD19.

Los anticuerpos y otros agentes de unión pueden ensayarse para unión específica a CD19 (por ejemplo, CD19 humano) por cualquiera de varios métodos conocidos. Los inmunoensayos que pueden usarse incluyen, por ejemplo, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos. Dichos ensayos son rutinarios y muy conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Ausubel et al., eds., *Short Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, 4a ed. 1999); Harlow y Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999.))

Además, la afinidad de unión de un agente de unión a CD19 (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD19 o derivado de éste) a CD19 y la velocidad de disociación de una interacción agente de unión-CD19 puede determinarse por ensayos de unión competitivos. Un ejemplo de un ensayo de unión competitivo es un radioinmunoensayo que comprende la incubación de CD19 marcado (por ejemplo,  $^3\text{H}$  o  $^{125}\text{I}$ ) con el anticuerpo de interés en presencia de cantidades crecientes de CD19 no marcado, y la detección del anticuerpo unido al CD19 marcado. La afinidad del anticuerpo para CD19 y las velocidades de disociación de unión pueden determinarse a partir de los datos por análisis de representación Scatchard. La competición con un segundo anticuerpo también puede determinarse usando radioinmunoensayos. En este caso, CD19 se incuba con el anticuerpo de interés conjugado con un compuesto marcado (por ejemplo,  $^3\text{H}$  o  $^{125}\text{I}$ ) en presencia de cantidades crecientes de un segundo anticuerpo no marcado. Alternativamente, la afinidad de unión de un anticuerpo para CD19 y las velocidades de asociación y disociación de una interacción anticuerpo-CD19 pueden determinarse por resonancia de plasmón superficial. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD19 o derivados de éstos pueden dirigirse a y acumularse en la membrana de una célula que expresa CD19.

El anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-CD19 o derivado de éste) puede producirse por métodos conocidos en la técnica para la síntesis de proteínas, típicamente, por ejemplo, por técnicas de expresión recombinante. La expresión recombinante de un anticuerpo o derivado de éste implica típicamente la construcción de un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica el agente de unión. Un vector para la producción de la molécula de proteína puede producirse por tecnología de ADN recombinante usando técnicas conocidas en la técnica. Las técnicas estándar tales como, por ejemplo, aquellas descritas en Sambrook y Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 3a ed., 2001); Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2a ed., 1989); *Short Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., John Wiley and Sons, Nueva York, 4a ed., 1999); y Glick y Pasternak, *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA* (ASM Press, Washington, D.C., 2a ed., 1998) pueden usarse para métodos de ácido nucleico recombinante, síntesis de ácidos nucleicos, cultivo celular, incorporación de transgenes, y expresión de proteínas recombinantes.

Por ejemplo, para la expresión recombinante de un anticuerpo anti-CD19, un vector de expresión puede codificar una cadena pesada o ligera de éste, o un dominio variable de cadena pesada o ligera, unido de manera operativa a un promotor. Un vector de expresión puede incluir, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (véase, por ejemplo, Publicación PCT WO 86/05807; Publicación PCT WO 89/01036; y Patente U.S. No. 5.122.464), y el dominio variable del anticuerpo puede clonarse en dicho vector para la expresión de la cadena pesada o ligera completa. El vector de expresión se transfiere a una célula huésped por

técnicas convencionales, y las células transfectadas se cultivan por técnicas convencionales para producir el anticuerpo anti-CD19. En realizaciones típicas para la expresión de anticuerpos de doble cadena, los vectores que codifican tanto las cadenas pesadas como ligeras pueden co-expresarse en la célula huésped para la expresión de la molécula de inmunoglobulina completa.

5 Puede utilizarse una variedad de sistemas de huésped procariota y eucariota-vector de expresión para expresar el anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-CD19 o derivado de éste). Típicamente, las células eucariotas, particularmente para moléculas de anticuerpo anti-CD19 recombinantes completas, se usan para la expresión de la proteína recombinante. Por ejemplo, las células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO; por ejemplo, DG44), conjuntamente con un vector tal como el elemento promotor del gen intermedio temprano 10 principal del citomegalovirus humano, es un sistema de expresión efectivo para la producción de anticuerpos anti-CD19 y derivados de éstos (véase, por ejemplo, Foecking *et al.*, 1986, *Gene* 45:101; Cockett *et al.*, 1990, *Bio/Technology* 8:2). Los agentes de unión a CD19 también pueden expresarse usando el sistema CHEF. (Véase, por ejemplo, Patente U.S. No. 5.888.809.)

15 Otros sistemas de expresión en huésped incluyen, por ejemplo, sistemas de expresión basados en plásmidos en células bacterianas (véase, por ejemplo, Ruther *et al.*, 1983, *EMBO* 1,2:1791; Inouye e Inouye, 1985, *Nucleic Acids Res.* 13:3101-3109; Van Heeke y Schuster, 1989, *J. Biol. Chem.* 24:5503-5509); sistemas de insectos tales como, por ejemplo, el uso del vector de expresión del virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) en 20 células de *Spodoptera frugiperda*; y sistemas de expresión basados en virus en células de mamífero tales como, por ejemplo, sistemas basados en adenovirus (véase, por ejemplo, Logan y Shenk, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:355-359; Bittner *et al.*, 1987, *Methods in Enzymol.* 153:51-544).

25 Además, puede elegirse una cepa de célula huésped que module la expresión de las secuencias insertadas, o modifique y procese el producto génico en la forma específica deseada. Pueden elegirse líneas celulares o sistemas de huésped apropiados para asegurar la modificación y procesamiento correcto (por ejemplo, glicosilación, fosforilación, y escisión) de la proteína expresada. Para este fin, pueden usarse células huésped eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcripto primario y producto génico. Dichas células huésped de mamífero incluyen, por ejemplo, CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293,3T3, y W138.

Típicamente, se usa un sistema de expresión estable para la producción a largo plazo, con alto rendimiento, de un anticuerpo recombinante. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan de forma estable el anticuerpo anti-CD19 o derivado de éste pueden prepararse por ingeniería por transformación de células huésped con ADN controlado por 30 elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación) y un marcador seleccionable, seguido de crecimiento de las células transformadas en un medio selectivo. El marcador seleccionable confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de forma estable el ADN en sus cromosomas y crecer para formar foci que a su vez pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Pueden usarse varios sistemas de selección, incluyendo, por ejemplo, los genes de 35 timidina quinasa del virus del herpes simple, hipoxantinaguanaína fosforibosiltransferasa, y adenina fosforibosiltransferasa, que pueden emplearse en células tk-, hgprt- o aprt-, respectivamente. También, puede usarse la resistencia a antimetabolitos como la base de la selección para los genes siguientes: dhfr, que confiere resistencia a metotrexato; gpt, que confiere resistencia a ácido micofénólico; neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418; e hygro, que confiere resistencia a higromicina. Los métodos conocidos comúnmente en la técnica de tecnología 40 de ADN recombinante pueden aplicarse rutinariamente para seleccionar el clón recombinante deseado, y dichos métodos se describen, por ejemplo, en Ausubel *et al.*, eds., en la serie de *Current Protocols in Molecular Biology* de manuales de técnicas de laboratorio, 1987-1999 *Current Protocols*, © 1994-1999 John Wiley and Sons, Inc.); Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual* (Stockton Press, N.Y., 1990); *Current Protocols in Human Genetics* (Dracopoli *et al.* eds., John Wiley and Sons, N.Y., 1994, Capítulos 12 y 13); y Colberre-Garapin *et al.*, 1981, *J. Mol. Biol.* 150:1.

45 Los niveles de expresión de un anticuerpo o derivado pueden incrementarse por amplificación del vector. (Véase, generalmente, Bebbington y Hentschel, *The Use of Vectors Based on Gene Amplification for the Expression of Cloned Genes in Mammalian Cells in DNA Cloning*, Vol.3 (Academic Press, Nueva York, 1987).) Cuando un marcador en el sistema de vector que expresa un anticuerpo anti-CD19 o derivado de éste es amplificable, un incremento en el nivel de inhibidor presente en el medio de cultivo de la célula huésped seleccionará las células huésped que tienen un número incrementado de copias de un gen marcador que confiere resistencia al inhibidor. El número de copias de un gen de anticuerpo asociado también se incrementará, incrementado de esta manera la expresión del anticuerpo o derivado de éste (véase, por ejemplo, Crouse *et al.*, 1983, *Mol. Cell. Biol.* 3:257).

55 La célula huésped puede co-transfектarse con dos vectores de expresión, codificando el primer vector la proteína de cadena pesada y codificando el segundo vector la proteína de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos lo que permite una expresión igual de proteínas de cadena pesada y ligera. Alternativamente, puede usarse un único vector que codifica, y es capaz de expresar, las proteínas tanto de cadena pesada como ligera. En dichas situaciones, la cadena ligera se pone típicamente antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (véase, por ejemplo, Proudfoot, 1986, *Nature* 322:52; Kohler, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2197). Las secuencias codificadoras para las cadenas pesada y ligera pueden 60 comprender ADNc o ADN genómico.

Una vez el anticuerpo se ha producido (por ejemplo, por un animal, síntesis química, o expresión recombinante), puede purificarse por cualquier método adecuado de purificación de proteínas, incluyendo, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico o de afinidad (tal como, por ejemplo, cromatografía de Proteína A para la purificación de anticuerpos que tienen una región Fc intacta)), centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Un anticuerpo anti-CD19 o derivado de éste puede fusionarse, por ejemplo, a una secuencia marcadora, tal como un péptido, para facilitar la purificación por cromatografía de afinidad. Las secuencias de aminoácidos marcadoras adecuadas incluyen, por ejemplo, un péptido hexa-histidina, tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA, 91311), y la etiqueta "HA", que corresponde a un epítopo derivado de la proteína hemaglutinina de influenza (Wilson *et al.*, 1984, *Cell* 37:767), y la etiqueta "flag".

Típicamente, el anticuerpo se purifica sustancialmente (por ejemplo, carece sustancialmente de sustancias que limitan su efecto o producen efectos secundarios no deseados). En algunas realizaciones, es al menos aproximadamente 40% puro, al menos aproximadamente 50% puro, o al menos aproximadamente 60% puro. En algunas realizaciones, el anticuerpo es al menos aproximadamente 60-65%, 65-70%, 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, 90-95%, ó 95-98% puro. En algunas realizaciones, el anticuerpo es aproximadamente 99% puro.

Los anticuerpos pueden incluir proteínas de fusión (es decir, proteínas que se fusionan recombinantemente o se conjugan químicamente, incluyendo conjugación tanto covalente como no covalente) a proteínas heterólogas (típicamente de al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o al menos 100 aminoácidos). En algunas realizaciones, dicho anticuerpo incluye la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y ligera humanizada que se une específicamente a CD19 y una región efectora de inmunoglobulina o un equivalente funcional de ésta. Tal y como se usa en la presente memoria, un equivalente funcional de una región efectora de inmunoglobulina se une a un receptor Fc en una célula inmune con actividad fagocítica o lítica, o la región efectora de inmunoglobulina se une a uno o más componentes del sistema del complemento. La unión de la parte de unión a CD19 a la proteína heteróloga no es necesariamente directa, sino que puede ocurrir a través de una o unas secuencias conectoras.

Por ejemplo, un anticuerpo puede producirse recombinantemente fusionando una región variable humanizada en marco con una secuencia que codifica una proteína heteróloga. La proteína heteróloga puede incluir opcionalmente una región efectora o un equivalente funcional de ésta y puede proporcionar una o más de las características siguientes: promover la expresión estable; proporcionar un medio para facilitar la expresión recombinante con alto rendimiento; y/o proporcionar un dominio de multimerización.

Un agente de unión a CD19 como se describe en la presente memoria puede identificarse usando cualquier método adecuado para cribar interacciones proteína-proteína. Típicamente, las proteínas se identifican inicialmente por su capacidad de unirse específicamente a CD19. Entre los métodos tradicionales que pueden emplearse están las técnicas de "clonación por interacción" que conllevan ensayar bibliotecas de expresión con CD19 marcado de una manera similar a la técnica de ensayo de anticuerpos de bibliotecas λgt11. Como ejemplo y no limitación, esto puede conseguirse como sigue: un clon de ADNc que codifica CD19 puede modificarse en el extremo C mediante la inserción del sitio de fosforilación para la quinasa de músculo cardiaco (HMK) (véase, por ejemplo, Blanar y Rutter, 1992, *Science* 256:1014-18). La proteína recombinante se expresa en *E. coli* y se purifica en una columna de afinidad de GDP hasta homogeneidad (Edery *et al.*, 1988, *Gene* 74:517-25) y se marca usando  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP y quinasa de músculo cardiaco bovino (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) hasta una actividad específica de  $1 \times 10^8$  cpm/μg, y se usa para cribar una biblioteca de ADNc de placenta humana λgt11 en un "ensayo far-Western" (Blanar y Rutter, 1992, *Science* 256:1014-18). Las placas que interaccionan con la sonda CD19 se aíslan. Los insertos de ADNc de placas λ positivas se liberan y se subclonian en un vector adecuado para secuenciación, tal como pBluescript KS (Stratagene, La Jolla, CA).

Un método que detecta las interacciones de proteínas *in vivo* es el sistema de dos híbridos. Se ha descrito una versión de este sistema (Chien *et al.*, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9578-82) y está disponible comercialmente en Clontech (Palo Alto, CA).

#### **Compuestos de conjugado ligando-fármaco**

En la presente memoria se describen compuestos de conjugado ligando-fármaco para la administración dirigida de fármacos. Los inventores han hecho el descubrimiento de que los compuestos de conjugado ligando-fármaco tienen una potente actividad citotóxica y/o citostática frente a células B que expresan CD19. Los compuestos de conjugado ligando-fármaco comprenden una unidad de ligando unida covalentemente al menos a una unidad de fármaco. Las unidades de fármaco pueden estar unidas covalentemente directamente o mediante una unidad de conector (-LU-).

El compuesto de conjugado ligando-fármaco tiene la siguiente:



o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de éste; en la que:

L es una unidad de ligando, en la que la unidad de ligando es un anticuerpo que se une específicamente a CD19

humano, que comprende una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO:9; y una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO:24, en la que el anticuerpo se une a CD19 con una constante de disociación de menos de  $10^{-7}$  M; y

(LU-D) es un resto unidad de conector-unidad de fármaco, en la que:

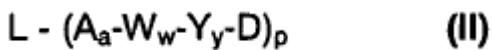
5 LU- es una unidad de conector, y

-D es una unidad de fármaco que tiene actividad citostática o citotóxica frente a una célula diana; y

p es un número entero de 1 a aproximadamente 20, en el que el anticuerpo comprende una región constante de IgG humana, en el que el isotipo de la región constante de IgG es IgG1, IgG2, o IgG1V1.

10 En algunas realizaciones, p varía de 1 a 10, 1 a 9, 1 a 8, 1 a 7, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, ó 1 a 2. En algunas realizaciones, p varía de 2 a 10, 2 a 9, 2 a 8, 2 a 7, 2 a 6, 2 a 5, 2 a 4 ó 2 a 3. En otras realizaciones, p es 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. En algunas realizaciones, p es 2 ó 4.

En algunas realizaciones, el compuesto de conjugado ligando-fármaco tiene la fórmula siguiente:



o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de éste;

15 en la que:

L es la unidad de ligando descrita anteriormente; y

-A<sub>a</sub>-W<sub>w</sub>-Y<sub>y</sub>- es una unidad de conector (LU), en la que:

-A- es una unidad de elongación,

a es 0 ó 1,

20 cada -W- es independientemente una unidad de aminoácido,

w es un número entero que varía de 0 a 12,

-Y- es una unidad de espaciador auto-destructiva,

y es 0, 1 ó 2;

-D es una unidad de fármaco que tiene actividad citostática o citotóxica frente a la célula diana; y

25 p es un número entero de 1 a aproximadamente 20.

En algunas realizaciones, a es 0 ó 1, w es 0 ó 1, e y es 0, 1 ó 2. En algunas realizaciones, a es 0 ó 1, w es 0 ó 1, e y es 0 ó 1. En algunas realizaciones, p varía de 1 a 10, 1 a 9, 1 a 8, 1 a 7, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, ó 1 a 2. En algunas realizaciones, p varía de 2 a 8, 2 a 7, 2 a 6, 2 a 5, 2 a 4 ó 2 a 3. En otras realizaciones, p es 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. En algunas realizaciones, p es 2 ó 4. En algunas realizaciones, cuando w no es cero, y es 1 ó 2. En algunas realizaciones, cuando w es 1 a 12, y es 1 ó 2. En algunas realizaciones, w es 2 a 12 e y es 1 ó 2. En algunas realizaciones, a es 1 y w e y son 0.

35 La carga de fármaco se representa por p, el número promedio de moléculas de fármaco por ligando, es decir, anticuerpo en una molécula. La carga de fármaco puede variar de 1 a 20 fármacos (D) por ligando. El número promedio de fármacos por ligando en la preparación de reacciones de conjugación puede caracterizarse por medios convencionales tales como espectroscopía de masa, ensayo ELISA, y HPLC. También puede determinarse la distribución cuantitativa de conjugados ligando-fármaco en términos de p. En algunos casos, la separación, purificación, y caracterización de conjugados ligando-fármaco homogéneos en los que p es un valor determinado de conjugados ligando-fármaco con otras cargas de fármaco puede conseguirse mediante HPLC de fase inversa o electroforesis. En realizaciones ejemplares, p es de 2 a 8.

40 La generación de compuestos de conjugado ligando-fármaco puede conseguirse por cualquier técnica conocida para el experto en la técnica. Brevemente, los compuestos de conjugado ligando-fármaco comprenden el anticuerpo como la unidad de ligando, un fármaco, y opcionalmente un conector que une el fármaco y el agente de unión. Están disponibles varias reacciones diferentes para la unión covalente de fármacos y/o conectores a agentes de unión. Esto se consigue frecuentemente por reacción de los residuos de aminoácidos del agente de unión, por ejemplo, molécula de anticuerpo, incluyendo los grupos amino de lisina, los grupos ácido carboxílico libres de ácido glutámico y aspártico, los grupos sulfhidrilo de cisteína y los diferentes restos de los aminoácidos aromáticos. Uno de los

- métodos no específicos más comúnmente usados de unión covalente es la reacción de carbodiimida para unir un grupo carboxi (o amino) de un compuesto a grupos amino (o carboxi) del anticuerpo. Adicionalmente, se han usado agentes bifuncionales tales como dialdehídos o imidoésteres para unir el grupo amino de un compuesto a grupos amino de una molécula de anticuerpo. También está disponible para la unión de fármacos a agentes de unión la reacción de base de Schiff. Este método implica la oxidación de peryodato de un fármaco que contiene grupos glicol o hidroxi, formando así un aldehído que se hace reaccionar con el agente de unión. La unión ocurre mediante la formación de una base de Schiff con grupos amino del agente de unión. También pueden usarse isotiocianatos como agentes de acoplamiento para la unión covalente de fármacos a agentes de unión. Otras técnicas son conocidas para el experto en la técnica y están en el alcance de la presente invención.
- 10 En determinadas realizaciones, se hace reaccionar un intermedio, que es el precursor del conector, con el fármaco en condiciones apropiadas. En determinadas realizaciones, se usan grupos reactivos en el fármaco y/o el intermedio. El producto de la reacción entre el fármaco y el intermedio, o el fármaco derivatizado, se hace reaccionar posteriormente con el anticuerpo en condiciones apropiadas.
- 15 Cada una de las unidades particulares de los compuestos de conjugado ligando-fármaco se describe con más detalle en la presente memoria. La síntesis y estructura de unidades de conector, unidades de elongación, unidades de aminoácido, unidad de espaciador auto-destructiva, y unidades de fármaco ejemplares también se describen en Publicaciones de Solicitud de Patente U.S. Nos. 2003-0083263, 2005-0238649 y 2005-0009751.
- Unidades de conector**
- 20 Típicamente, los compuestos de conjugado ligando-fármaco comprenden una región conectora entre la unidad de fármaco y la unidad de ligando. En algunas realizaciones, el conector es escindible en condiciones intracelulares, de manera que la escisión del conector libera la unidad de fármaco del ligando en el entorno intracelular. En otras realizaciones más, la unidad de conector no es escindible y el fármaco se libera, por ejemplo, por la degradación del anticuerpo.
- 25 En algunas realizaciones, el conector es escindible por un agente de escisión que está presente en el entorno intracelular (por ejemplo, en un lisosoma o endosoma o caveolas). El conector puede ser, por ejemplo, un conector peptídico que se escinde por una enzima peptidasa o proteasa intracelular, incluyendo, pero no limitado a, una proteasa lisosomal o endosomal. En algunas realizaciones, el conector peptídico tiene una longitud de al menos dos aminoácidos o una longitud de al menos tres aminoácidos. Los agentes de escisión pueden incluir catepsinas B y D y plasmina, todas las cuales se sabe que hidrolizan derivados de fármaco dipéptido resultando en la liberación del fármaco activo en el interior de las células diana (véase, por ejemplo, Dubowchik y Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123). Los más típicos son los conectores peptídico que son escindibles por enzimas que están presentes en células que expresan CD19. Por ejemplo, puede usarse un conector peptídico que es escindible por la proteasa dependiente de tiol catepsina-B, que está altamente expresada en tejido canceroso (por ejemplo, un conector Phe-Leu o Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 52)). Otros ejemplos de dichos conectores se describen, por ejemplo, en Patente U.S. No. 6.214.345. En una realización específica, el conector peptídico escindible por una proteasa intracelular es un conector Val-Cit o un conector Phe-Lys (véase, por ejemplo, Patente U.S. 6.214.345, que describe la síntesis de doxorrubicina con el conector val-cit). Una ventaja de usar la liberación proteolítica intracelular del agente terapéutico es que el agente se atenúa típicamente cuando se conjuga y las estabilidades en suero de los conjugados son típicamente altas.
- 30 40 En otras realizaciones, el conector escindible es sensible al pH, es decir, sensible a hidrólisis a determinados valores de pH. Típicamente, el conector sensible a pH es hidrolizable en condiciones ácidas. Por ejemplo, puede usarse un conector ácido lábil que es hidrolizable en el lisosoma (por ejemplo, una hidrazona, semicarbazona, tiosemicarbazona, amida cis-acontíca, ortoéster, acetal, cetal, o semejantes). (Véase, por ejemplo, Patentes U.S. Nos. 5.122.368; 5.824.805; 5.622.929; Dubowchik y Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123; Neville *et al.*, 1989, *Biol. Chem.* 264:14653-14661.) Dichos conectores son relativamente estables en condiciones de pH neutro, tales como las de la sangre, pero son inestables a pH por debajo de 5,5 ó 5,0, el pH aproximado del lisosoma. En determinadas realizaciones, el conector hidrolizable es un conector tioéter (tal como, por ejemplo, un tioéter unido al agente terapéutico mediante un enlace acilhidrazona (véase, por ejemplo, Patente U.S. No. 5.622.929).
- 45 50 En otras realizaciones más, el conector es escindible en condiciones reductoras (por ejemplo, un conector disulfuro). En la técnica se conoce una variedad de conectores disulfuro, incluyendo, por ejemplo, aquellos que pueden formarse usando SATA (N-succinimidil-S-acetiltioacetato), SPDP (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato), SPDB (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)butirato) y SMPT (N-succinimidil-oxicarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridil-ditio)tolueno), SPDB y SMPT (Véase, por ejemplo, Thorpe *et al.*, 1987, *Cancer Res.* 47:5924-5931; Wawrzynczak *et al.*, En *Immunoconjugates. Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer* (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. Véase también Patente U.S. No. 4.880.935).
- 55 En otras realizaciones específicas más, el conector es un conector malonato (Johnson *et al.*, 1995, *Anticancer Res.* 15:1387-93), un conector maleimidobenzoilo (Lau *et al.*, 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3(10):1299-1304), o un análogo 3'-N-amida (Lau *et al.*, 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3(10):1305-12).

En otras realizaciones más, la unidad de conector no es escindible y el fármaco se libera por la degradación del anticuerpo. (Véase Publicación U.S. No. 20050238649).

Típicamente, el conector no es sustancialmente sensible al entorno extracelular. Tal y como se usa en la presente memoria, "no sustancialmente sensible al entorno extracelular", en el contexto de un conector, significa que no más de aproximadamente el 20%, típicamente no más de aproximadamente el 15%, más típicamente no más de aproximadamente el 10%, e incluso más típicamente no más de aproximadamente el 5%, no más de aproximadamente el 3%, o no más de aproximadamente el 1% de los conectores, en una muestra de compuesto de conjugado ligando-fármaco, se escinden cuando el compuesto de conjugado ligando-fármaco está presente en un entorno extracelular (por ejemplo, en plasma). Si un conector no es sustancialmente sensible al entorno extracelular puede determinarse, por ejemplo, incubando con plasma el compuesto de conjugado ligando-fármaco durante un periodo de tiempo predeterminado (por ejemplo, 2, 4, 8, 16, ó 24 horas) y después cuantificando la cantidad del fármaco libre presente en el plasma.

En otras realizaciones no mutuamente exclusivas, el conector promueve la internalización celular. En determinadas realizaciones, el conector promueve la internalización celular cuando se conjuga con el agente terapéutico (es decir, en el medio del resto de conector-agente terapéutico del compuesto de conjugado ligando-fármaco como se describe en la presente memoria). En otras realizaciones más, el conector promueve la internalización celular cuando se conjuga tanto con el compuesto de auristatina como con el anticuerpo anti-CD19.

Una variedad de conectores ejemplares que pueden usarse con las presentes composiciones y métodos se describen en WO 2004-010957, Publicación U.S. No. 20060074008, Publicación U.S. No. 20050238649, y Publicación U.S. No. 20060024317.

Una "unidad de conector" (LU) es un compuesto bifuncional que puede usarse para unir la unidad de fármaco y una unidad de ligando para formar un compuesto de conjugado ligando-fármaco. En algunas realizaciones, la unidad de conector tiene la fórmula:



en la que :-A- es una unidad de elongación,  
 a es 0 ó 1,  
 cada -W- es independientemente una unidad de aminoácido,  
 w es un número entero que varía de 0 a 12,  
 -Y- es una unidad de espaciador auto-destructiva, y  
 y es 0, 1 ó 2.

En algunas realizaciones, a es 0 ó 1, w es 0 ó 1, e y es 0, 1 ó 2. En algunas realizaciones, a es 0 ó 1, w es 0 ó 1, e y es 0 ó 1. En algunas realizaciones, cuando w es 1 a 12, y es 1 ó 2. En algunas realizaciones, w es 2 a 12 e y es 1 ó 2. En algunas realizaciones, a es 1 y w e y son 0.

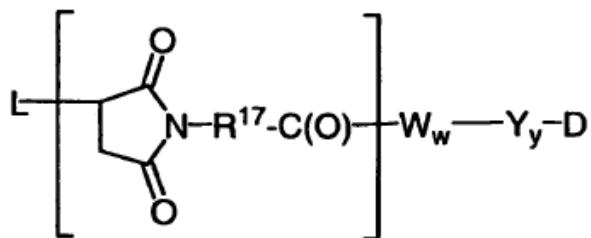
### **La unidad de elongación**

La unidad de elongación ( A ), cuando está presente, es capaz de unir una unidad de ligando a una unidad de aminoácido (-W-), si está presente, a una unidad de espaciador (-Y-), si está presente; o a una unidad de fármaco (-D). Los grupos funcionales útiles que pueden estar presentes en un agente de unión a CD19, bien de forma natural o mediante manipulación química incluyen, pero no están limitados a, sulfhidrilo, amino, hidroxilo, el grupo hidroxilo anomérico de un carbohidrato, y carboxilo. Los grupos funcionales adecuados son sulfhidrilo y amino. En un ejemplo, pueden generarse grupos sulfhidrilo por reducción de los enlaces disulfuro intramoleculares de un anticuerpo anti-CD19. En otra realización, los grupos sulfhidrilo pueden generarse por reacción de un grupo amino de un resto de lisina de un anticuerpo anti-CD19 con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) u otros reactivos que generan sulfhidrilo. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CD19 es un anticuerpo recombinante y se prepara por ingeniería para portar una o más lisinas. En determinadas otras realizaciones, el anticuerpo anti-CD 19 recombinante se prepara por ingeniería para portar grupos sulfhidrilo adicionales, por ejemplo, cisteínas adicionales.

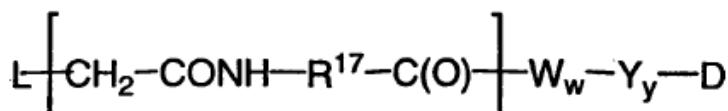
En una realización, la unidad de elongación forma un enlace con un átomo de azufre de la unidad de ligando. El átomo de azufre puede derivar de un grupo sulfhidrilo de un ligando. Las unidades de elongación representativas de esta realización se representan en los corchetes de las Fórmulas IIIa y IIIb, en las que L-, -W-, -Y-, -D, w e y son como se han definido anteriormente, y R<sub>17</sub> se selecciona de -alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -alquenileno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -alquinileno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, carbociclo-, -O-(alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-, O-(alquenileno C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-, -O-(alquinileno C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-, -arileno-, -alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-arileno-, -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-arileno-, -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-arileno-, -arileno-alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -arileno-alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-, -arileno-alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-, -alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-(carbociclo)-, -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-( carbociclo)-, -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-(carbociclo)-, -(carbociclo)-alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -(carbociclo)-alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-, -(carbociclo)-alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>,

5 -heterociclo-, -alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-(heterociclo)-, -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-(heterociclo)-, -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-(heterociclo)-, -(heterociclo)-alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -(heterociclo)-alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-, -(heterociclo)-alquinileno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>, o -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)CH<sub>2</sub>-, y r es un número entero que varía de 1-10, en el que dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquileno, alquenileno, alquinileno, arilo, carbociclo, heterociclo, y arileno, ya sean solos o como parte de otro grupo, están sustituidos opcionalmente. Los radicales alquileno, alquenileno, alquinileno, ya sean solos o como parte de otro grupo, pueden estar sustituidos opcionalmente, por ejemplo, con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1; los radicales carbociclo, ya sean solos o como parte de otro grupo, pueden estar sustituidos opcionalmente, por ejemplo, con uno o más grupos seleccionados independientemente de A2; los radicales arileno, ya sean solos o como parte de otro grupo, pueden estar sustituidos opcionalmente, por ejemplo, con uno o más grupos seleccionados independientemente de A3; los radicales heterociclo, ya sean solos o como parte de otro grupo, pueden estar sustituidos opcionalmente, por ejemplo, con uno o más grupos seleccionados independientemente de A4. A1, A2, A3, y A4 son como se definen en la presente memoria. Debe entenderse de todas las realizaciones ejemplares que incluso cuando no se indica expresamente, pueden estar unidos de 1 a 20 restos de fármaco a un ligando (p = 1-20).

10



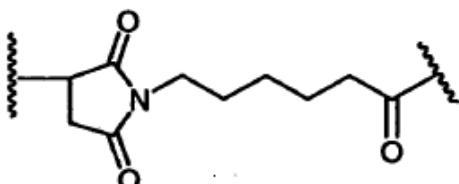
IIIa



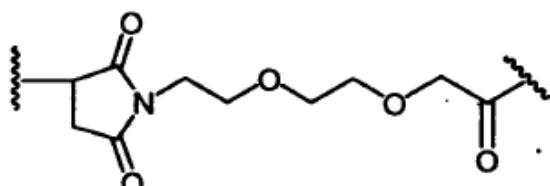
IIIb

15

Una unidad de elongación ilustrativa es la de Fórmula IIIa en la que R<sup>17</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>:

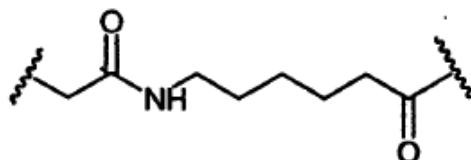


Otra unidad de elongación ilustrativa es la de Fórmula IIIa en la que R<sup>17</sup> es -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>-; y r es 2:



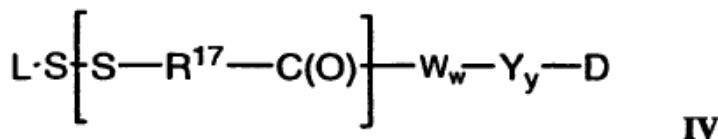
20 Una unidad de elongación ilustrativa es la de Fórmula IIIa en la que R<sup>17</sup> es -arileno- o arileno-alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>. En algunas realizaciones, el grupo arilo es un grupo fenilo no sustituido.

Otra unidad de elongación ilustrativa más es la de Fórmula IIIb en la que R<sup>17</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>:

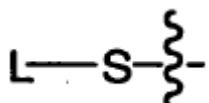


25 En determinadas realizaciones, la unidad de elongación está unida a la unidad de ligando mediante un enlace disulfuro entre un átomo de azufre de la unidad de ligando y un átomo de azufre de la unidad de elongación. Una

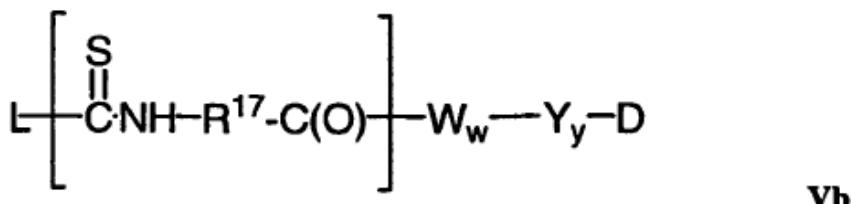
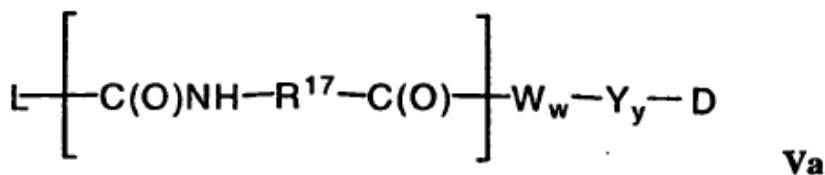
unidad de elongación representativa de esta realización se representa en los corchetes de la Fórmula IV, en la que R<sup>17</sup>, L-, -W-, -Y-, -D, w e y son como se han definido anteriormente.



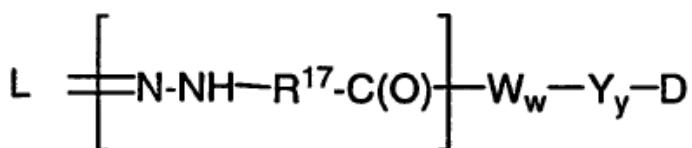
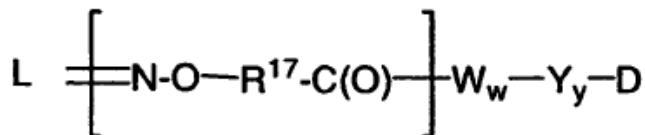
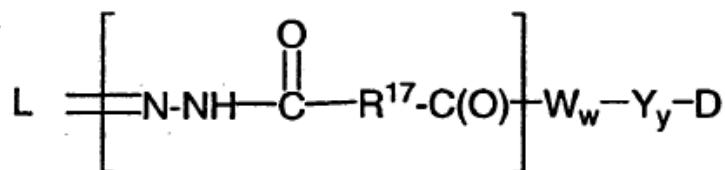
- 5 Debe indicarse que a lo largo de esta solicitud, el resto S en la fórmula siguiente se refiere a un átomo de azufre de la unidad de ligando, a no ser que se indique otra cosa por el contexto.



- 10 En otras realizaciones más, la unidad de elongación contiene un sitio reactivo que puede formar un enlace con un grupo amino primario o secundario de un ligando. Los ejemplos de estos sitios reactivos incluyen, pero no están limitados a, ésteres activados tales como ésteres de succinimida, ésteres de 4 nitrofenilo, ésteres de pentafluorofenilo, ésteres de tetrafluorofenilo, anhídridos, cloruros de ácido, cloruros de sulfonilo, isocianatos e isotiocianatos. Las unidades de elongación representativas de esta realización se representan en los corchetes de las Fórmulas Va y Vb, en las que -R<sup>17</sup>-, L-, -W-, -Y-, -D, w e y son como se han definido anteriormente.



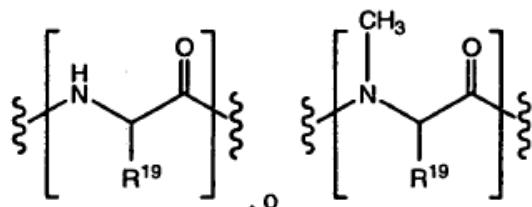
- 15 En algunas realizaciones, la unidad de elongación contiene un sitio reactivo que es reactivo para un grupo carbohidrato modificado (-CHO) que puede estar presente en un ligando. Por ejemplo, un carbohidrato puede oxidarse moderadamente usando un reactivo tal como periyodato de sodio y la unidad (-CHO) resultante del carbohidrato oxidado puede condensarse con una unidad de elongación que contiene una funcionalidad tal como una hidrazida, una oxima, una amina primaria o secundaria, una hidrazina, una tiosemicarbazona, un carboxilato de hidrazina, y una arilhidrazida tales como los descritos por Kaneko *et al.*, 1991, *Bioconjugate Chem.* 2:133-41. Las unidades de elongación representativas de esta realización se representan en los corchetes de las Fórmulas VIa, VIb, y VIc en las que -R<sup>17</sup>-, L-, -W-, -Y-, -D, w e y son como se han definido anteriormente.

**VIa****VIb****VIc**

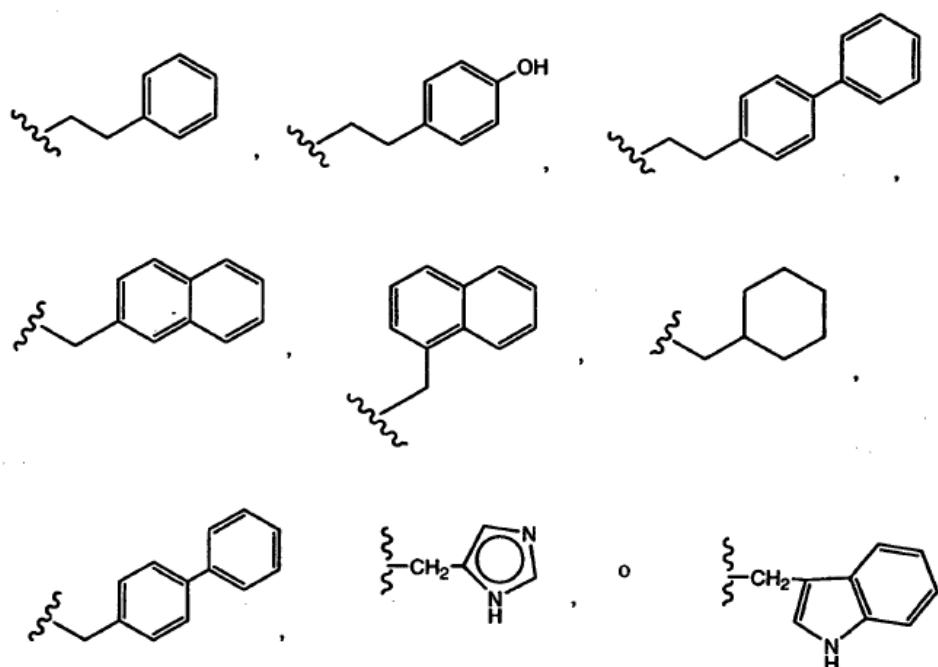
### La unidad de aminoácido

La unidad de aminoácido (-W-), cuando está presente, une la unidad de elongación con la unidad de espaciador si la unidad de espaciador está presente, une la unidad de elongación con el resto de fármaco si la unidad de espaciador está ausente, y une la unidad de ligando con la unidad de fármaco si la unidad de elongación y la unidad de espaciador están ausentes.

W<sub>w</sub>- puede ser, por ejemplo, una unidad de monopéptido, dipéptido, tripéptido, tetrapéptido, pentapéptido, hexapéptido, heptapéptido, octapéptido, nonapéptido, decapéptido, undecapéptido o dodecapéptido. Cada unidad -W- tiene independientemente la fórmula indicada más adelante en los corchetes, y w es un número entero que varía de 0 a 12:

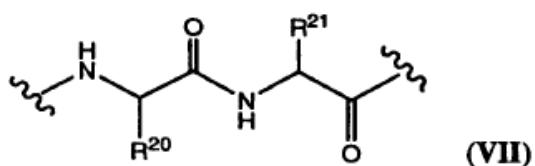


en el que R<sup>19</sup> es hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, bencilo, p-hidroxibencilo, -CH<sub>2</sub>OH, -CH(OH)CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>COOH, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCOCH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCHO, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCOCH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCHO, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, 2-piridilmetil-, 3-piridilmetil-, 4-piridilmetil-, fenilo, ciclohexilo,

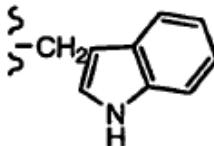


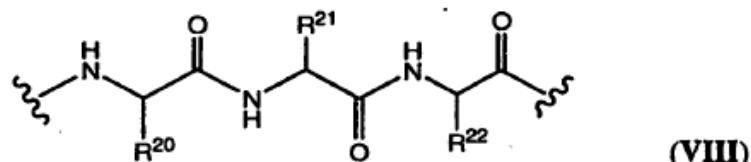
En algunas realizaciones, la unidad de aminoácido puede escindirse enzimáticamente por una o más enzimas, incluyendo una proteasa de cáncer o asociada a tumor, para liberar la unidad de fármaco (-D), que en una realización se protona *in vivo* después de la liberación para proporcionar un fármaco (D).

- 5 En determinadas realizaciones, la unidad de aminoácido puede comprender aminoácidos naturales. En otras realizaciones, la unidad de aminoácido puede comprender aminoácidos no naturales. Las unidades Ww ilustrativas se representan por las fórmulas (VII)-(IX):



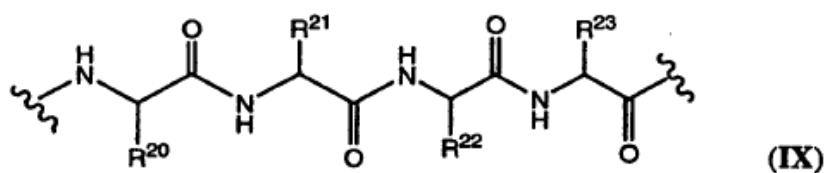
en las que  $R^{20}$  y  $R^{21}$  son como sigue:

<u>R<sup>20</sup></u>	<u>R<sup>21</sup></u>
Bencilo	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub> ;
metilo	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub> ;
isopropilo	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub> ;
isopropilo	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NHCONH <sub>2</sub> ;
bencilo	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NHCONH <sub>2</sub> ;
isobutilo	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NHCONH <sub>2</sub> ;
sec-butilo	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NHCONH <sub>2</sub> ;
	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NHCONH <sub>2</sub> ;
bencilo	metilo;
bencilo	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NHC(=NH)NH <sub>2</sub> ;



en la que R<sup>20</sup>, R<sup>21</sup>, R<sup>22</sup> y R<sup>23</sup> son como sigue:

<u>R<sup>20</sup></u>	<u>R<sup>21</sup></u>	<u>R<sup>22</sup></u>
bencilo	bencilo	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub> ;
isopropilo	bencilo	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub> ; y
H	bencilo	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub> ;



5

en la que R<sup>20</sup>, R<sup>21</sup>, R<sup>22</sup> y R<sup>23</sup> son como sigue:

<u>R<sup>20</sup></u>	<u>R<sup>21</sup></u>	<u>R<sup>22</sup></u>	<u>R<sup>23</sup></u>
H	bencilo	isobutilo	H; y
metilo	isobutilo	metilo	isobutilo.

Las unidades de aminoácido ejemplares incluyen, pero no están limitadas a, las unidades de fórmula VII en la que:

$R^{20}$  es bencilo y  $R^{21}$  es  $-(CH_2)_4NH_2$ ;  $R_{20}$  es isopropilo y  $R^{21}$  es  $-(CH_2)_4NH_2$ ; o  $R^{20}$  es isopropilo y  $R^{21}$  es  $-(CH_2)_3NHCNH_2$ . Otra unidad de aminoácido ejemplar es una unidad de fórmula VIII en la que  $R^{20}$  es bencilo,  $R^{21}$  es bencilo, y  $R^{22}$  es  $-(CH_2)_4NH_2$ .

5 Las unidades  $-W_w-$  útiles pueden diseñarse y optimizarse en su selectividad para escisión enzimática por una enzima particular, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor. En una realización, una unidad  $-W_w-$  es aquella cuya escisión está catalizada por catepsina B, C y D, o una proteasa plasmina.

En una realización,  $-W_w-$  es un dipéptido, tripéptido, tetrapéptido o pentapéptido. Cuando  $R^{19}$ ,  $R^{20}$ ,  $R^{21}$ ,  $R^{22}$  ó  $R^{23}$  es distinto de hidrógeno, el átomo de carbono al que se une  $R^{19}$ ,  $R^{20}$ ,  $R^{21}$ ,  $R^{22}$  ó  $R^{23}$  es quiral.

Cada átomo de carbono al que se une  $R^{19}$ ,  $R^{20}$ ,  $R^{21}$ ,  $R^{22}$  ó  $R^{23}$  está independientemente en la configuración (S) o (R).

10 En un aspecto de la unidad de aminoácido, la unidad de aminoácido es valina-citrulina (vc o val-cit). En otro aspecto, la unidad de aminoácido es fenilalanina-lisina (es decir, fk). En otro aspecto más de la unidad de aminoácido, la unidad de aminoácido es N-metilvalina-citrulina. En otro aspecto más, la unidad de aminoácido es ácido 5-aminovalérico, homo fenilalanina lisina, tetraisoquinolincarboxilato lisina, ciclohexilalanina lisina, ácido isonepecótico lisina, beta-alanina lisina, glicina serina valina glutamina y ácido isonepecótico.

### 15 La unidad de espaciador

La unidad de espaciador ( $-Y-$ ), cuando está presente, une la unidad de aminoácidos a la unidad de fármaco cuando está presente una unidad de aminoácido. Alternativamente, la unidad de espaciador une la unidad de elongación a la unidad de fármaco cuando está ausente la unidad de aminoácido. La unidad de espaciador también une la unidad de fármaco a la unidad de ligando cuando están ausentes tanto la unidad de aminoácido como la unidad de elongación.

20 Las unidades de espaciador son de dos tipos generales: no auto-destructivas o auto-destructivas. Una unidad de espaciador no auto-destructiva es una en la que parte o toda de la unidad de espaciador permanece unida al resto de fármaco después de la escisión, particularmente enzimática, de una unidad de aminoácido del conjugado ligando-fármaco. Los ejemplos de una unidad de espaciador no auto-destructiva incluyen, pero no están limitadas a, una unidad de espaciador (glicina-glicina) y una unidad de espaciador glicina (ambas representadas en el Esquema 1)

25 (infra). Cuando un conjugado que contiene una unidad de espaciador glicina-glicina o una unidad de espaciador glicina experimenta escisión enzimática mediante una enzima (por ejemplo, una proteasa asociada a células tumorales, una proteasa asociada a células cancerosas o una proteasa asociada a linfocitos), un resto glicina-glicina-fármaco o un resto glicina-fármaco se escinde de L-Aa-Ww-. En una realización, tiene lugar una reacción de hidrólisis independiente en la célula diana, escindiendo el enlace del resto glicina-fármaco y liberando el fármaco.

### 30 Esquema 1

En algunas realizaciones, una unidad de espaciador no auto-destructiva ( $-Y-$ ) es  $-Gly-$ . En algunas realizaciones, una unidad de espaciador no auto-destructiva ( $-Y-$ ) es  $-Gly-Gly-$ .

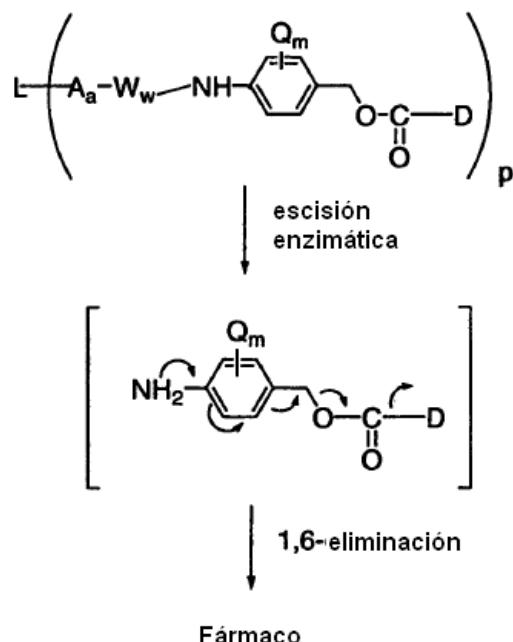
En una realización, se proporciona un conjugado fármaco-conector en el que la unidad de espaciador está ausente ( $y=0$ ), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de éste.

35 Alternativamente, un conjugado que contiene una unidad de espaciador auto-destructiva puede liberar  $-D$ . Tal y como se usa en la presente memoria, el término "espaciador auto-destructivo" se refiere a un resto químico bifuncional que es capaz de unir covalentemente entre sí dos restos químicos espaciados en una molécula tripartita estable. Se separará espontáneamente del segundo resto químico si se escinde su enlace con el primer resto.

40 En algunas realizaciones,  $-Y_y-$  es una unidad de p-aminobencil alcohol (PAB) (véanse los Esquemas 2 y 3) cuya parte de fenileno está sustituida con  $Q_m$  en el que Q es -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alquinilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -O-(alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -O-(alquinilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -halógeno, -nitro o -ciano; y m es un número entero que varía de 0-4. Los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo, ya sean solos o como parte de otro grupo, pueden estar sustituidos opcionalmente con A1 como se define en la presente memoria.

45 En algunas realizaciones,  $-Y-$  es un grupo PAB que está unido a  $W_w-$  mediante el átomo de nitrógeno amino del grupo PAB, y conectado directamente a  $-D$  mediante un grupo carbonato, carbamato o éter. Sin estar vinculado a ninguna teoría o mecanismo particular, el Esquema 2 representa un posible mecanismo de liberación de fármaco de un grupo PAB que está unido directamente a  $-D$  mediante un grupo carbamato o carbonato como se describe por Toki *et al.*, 2002, *J. Org. Chem.* 67:1866-1872.

Esquema 2

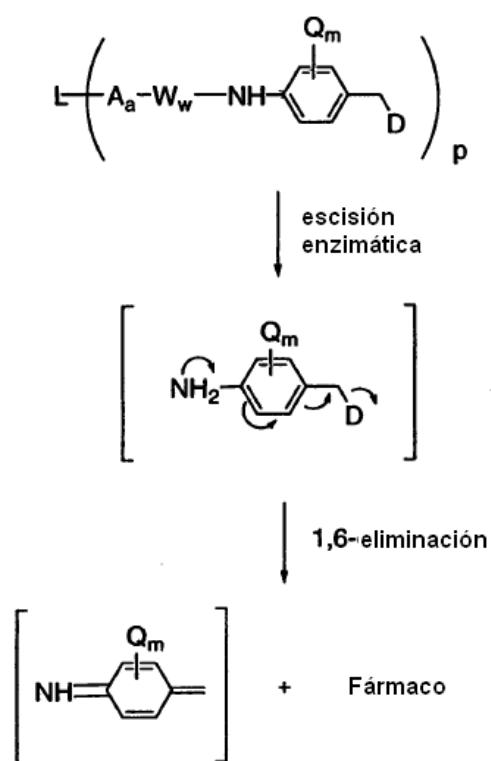


En el Esquema 2, Q es -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alquinilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -O-(alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -O-(alquinilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero que varía de 0-4; y p varía de 1 a aproximadamente 20. Los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo, ya sean solos o como parte de otro grupo, pueden estar sustituidos opcionalmente con A<sub>1</sub> como se define en la presente memoria.

5

Sin estar vinculado a ninguna teoría o mecanismo particular, el Esquema 3 representa un mecanismo posible de liberación del fármaco de un grupo PAB que está unido directamente a -D mediante una unión éter o amina, en el que D incluye el grupo oxígeno o nitrógeno que es parte de la unidad de fármaco.

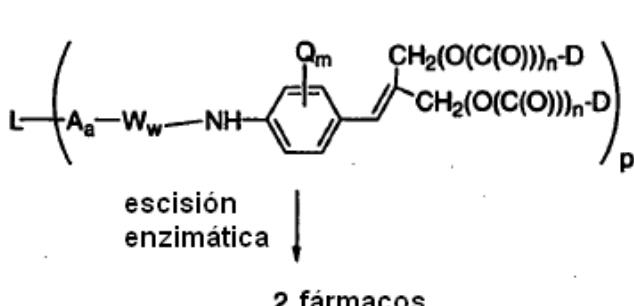
## 10 Esquema 3



En el Esquema 3, Q es -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alquinilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -O-(alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -O-(alquinilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero que varía de 0-4; y p varía de 1 a aproximadamente 20. Los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo, ya sean solos o como parte de otro grupo, pueden estar sustituidos opcionalmente con A1 como se define en la presente memoria.

- 5 Otros ejemplos de espaciadores auto-destructivos incluyen, pero no están limitados a, compuestos aromáticos que son electrónicamente similares al grupo PAB tales como derivados 2-aminoimidazol-5-metanol (Hay *et al.*, 1999, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237) y orto o para-aminobencilacetales. Pueden usarse espaciadores que experimentan ciclación después de la hidrólisis del enlace amida, tales como amidas del ácido 4-aminobutírico sustituidas y no sustituidas (Rodrigues *et al.*, 1995, *Chemistry Biology* 2:223), sistemas de anillos biciclo[2.2.1] y biciclo[2.2.2] sustituidos apropiadamente (Storm *et al.*, 1972, *J. Amer. Chem. Soc.* 94:5815) y amidas del ácido 2-aminofenilpropiónico (Amsberry *et al.*, 1990, *J. Org. Chem.* 55:5867). La eliminación de fármacos que contienen amina que están sustituidos en la posición  $\alpha$  de glicina (Kingsbury *et al.*, 1984, *J. Med. Chem.* 27:1447) también son ejemplos de espaciadores auto-destructivos.
- 10 En una realización, la unidad de espaciador es una unidad de bis(hidroximetil)-estireno (BHMS) ramificado como se representa en el Esquema 4, que puede usarse para incorporar y liberar múltiples fármacos.

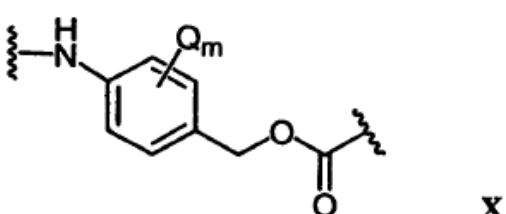
#### Esquema 4



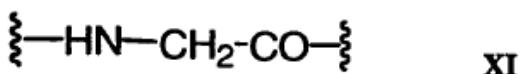
- 20 En el Esquema 4, Q es -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alquinilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -O-(alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -O-(alquinilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero que varía de 0-4; n es 0 ó 1; y p varía de 1 a aproximadamente 20. Los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo, ya sean solos o como parte de otro grupo, pueden estar sustituidos opcionalmente con A1 como se define en la presente memoria.

En algunas realizaciones, los restos -D son iguales. En otra realización más, los restos -D son diferentes.

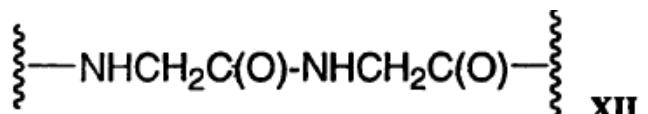
En un aspecto, las unidades de espaciador (-Y<sub>y</sub>) se representan por las Fórmulas (X)-(XII):



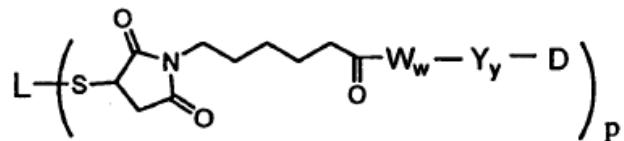
- 25 en las que Q es -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alquinilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -O-(alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -O-(alquinilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -halógeno, -nitro o -ciano; y m es un número entero que varía de 0-4. Los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo, ya sean solos o como parte de otro grupo, pueden estar sustituidos opcionalmente con A1 como se define en la presente memoria.



30 y

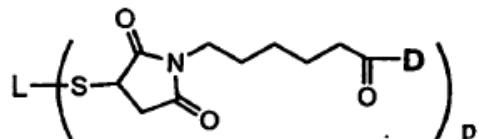


Las realizaciones de la Fórmula I y II que comprenden compuestos de conjugado ligando-fármaco pueden incluir:



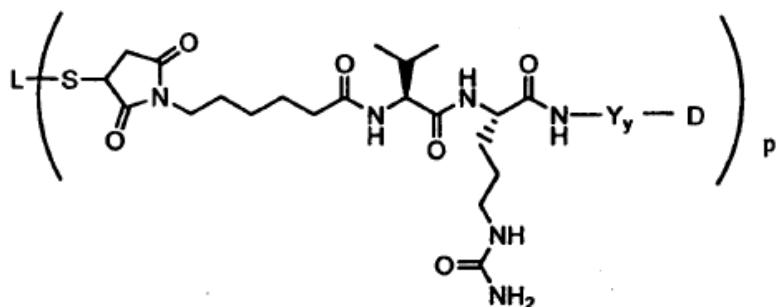
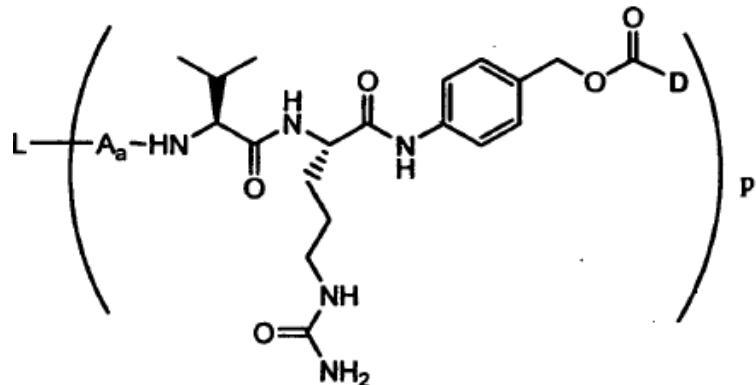
en la que w e y son cada uno 0, 1 ó 2,

y,

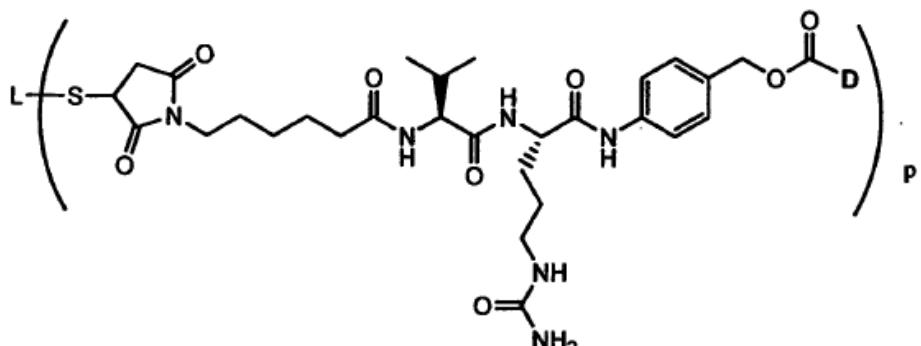


5

en la que w e y son cada uno 0,



y



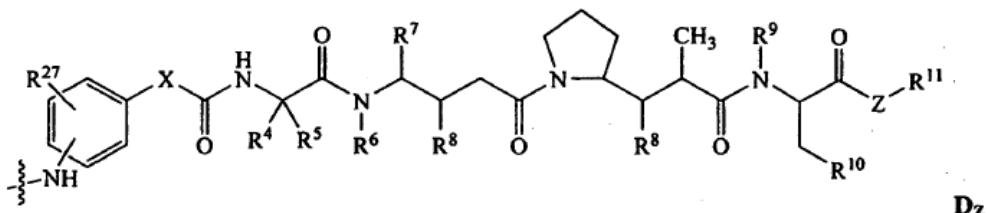
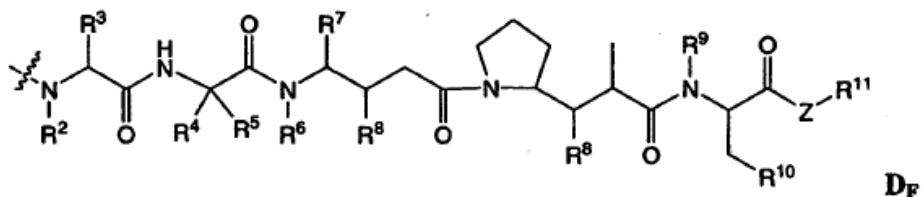
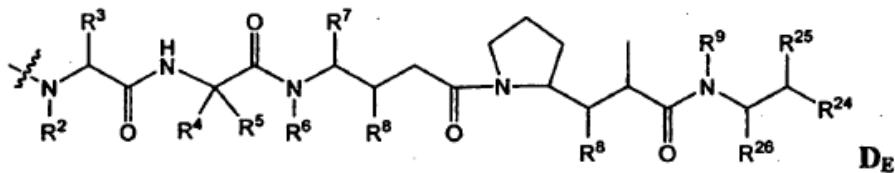
10

### La unidad de fármaco

- El resto de fármaco (D) puede ser cualquier fármaco citotóxico, citostático o inmunomodulador (por ejemplo, inmunosupresor). Es una unidad de fármaco (resto) que tiene un átomo que puede formar un enlace con la unidad de espaciador, con la unidad de aminoácido, con la unidad de elongación o con la unidad de ligando. En algunas 5 realizaciones, la unidad de fármaco D tiene un átomo de nitrógeno que puede formar un enlace con la unidad de espaciador. Tal y como se usa en la presente memoria, los términos "unidad de fármaco" y "resto de fármaco" son sinónimos y se usan indistintamente.
- Las clases útiles de agentes citotóxicos o inmunomoduladores incluyen, por ejemplo, agentes antitubulina, auristatinas, ligantes del surco menor del ADN, inhibidores de la replicación de ADN, agentes alquilantes (por 10 ejemplo, complejos de platino tales como cis-platino, mono(platino), bis(platino) y complejos de platino tri-nuclear y carboplatino), antraciclinas, antibióticos, antifolatos, antimetabolitos, sensibilizadores de quimioterapia, duocarmicinas, camptotecinas, etopósidos, pirimidinas fluoradas, ionóforos, lexitropsinas, nitrosoureas, platinoles, compuestos pre-formados, antimetabolitos de purina, puromicinas, sensibilizadores de la radiación, esteroides, taxanos, inhibidores de la topoisomerasa, alcaloides de vinca, o semejantes.
- 15 Los agentes citotóxicos o inmunomoduladores individuales incluyen, por ejemplo, un andrógeno, antramicina (AMC), asparaginasa, 5-azacitidina, azatioprina, bleomicina, busulfán, butionina sulfoximina, caliqueamicina, camptotecina, carboplatino, carmustina (BSNU), CC-1065, clorambucilo, cisplatino, colchicina, ciclofosfamida, catarabina, citidina arabinósido, citocalasina B, dacarbazine, dactinomicina (anteriormente actinomicina), daunorrubicina, decarbazine, docetaxel, doxorrubicina, etopósido, un estrógeno, 5-fluorodesoxiuridina, 5-fluorouracilo, gemcitabina, gramicidina D, hidroxiurea, idarrubicina, ifosfamida, irinotecán, lomustina (CCNU), maitansina, meclorethamina, melfalán, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitramicina, mitomicina C, mitoxantrona, nitroimidazol, paclitaxel, palitoxina, plicamicina, procarbizina, rizoxina, estreptozotocina, tenopósido, 6-tioguanina, tioTEPA, topotecán, vinblastina, vincristina, vinorelbina, VP-16 y VM-26.
- 20 En algunas realizaciones típicas, los agentes citotóxicos adecuados incluyen, por ejemplo, ligantes del surco menor del ADN (por ejemplo, enediinas y lexitropsinas, un compuesto CBI; véase también Patente U.S. No. 6.130.237), duocarmicinas, taxanos (por ejemplo, paclitaxel y docetaxel), puromicinas, alcaloides de vinca, CC-1065, SN-38, topotecán, morfolino-doxorrubicina, rizoxina, cianomorfolino-doxorrubicina, equinomicina, combretastatina, netropsina, epotilona A y B, estramustina, criptofisinas, cemadotina, maitansinoides, discodermolida, eleuterobina, y mitoxantrona.
- 25 En algunas realizaciones, el fármaco es un agente anti-tubulina. Los ejemplos de agentes anti-tubulina incluyen, pero no están limitados a, auristatinas, taxanos (por ejemplo, Taxol® (paclitaxel), Taxotere® (docetaxel)), T67 (Tularik) y alcaloides de vinca (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vindesina, y vinorelbina). Otros agentes antitubulina incluyen, por ejemplo, derivados de bacatina, análogos de taxano (por ejemplo, epotilona A y B), nocodazol, colchicina y colcimida, estramustina, criptofisinas, cemadotina, maitansinoides, combretastatinas, discodermolida, y eleuterobina.
- 30 En algunas realizaciones, el fármaco es una auristatina, tal como auristatina E (también conocida en la técnica como un derivado de dolastatina-10) o un derivado de ésta. Típicamente, el derivado de auristatina E es, por ejemplo, un éster formado entre la auristatina E y un ceto ácido. Por ejemplo, la auristatina E puede reaccionar con ácido paraacetil benzoico o ácido benzoilvalérico para producir AEB y AEVB, respectivamente. Otros derivados típicos de auristatina incluyen AFP, MMAF, y MMAE. La síntesis y estructura de los derivados de auristatina se describen en Publicación de Solicitud de Patente U.S. Nos. 2003-0083263, 2005-0238649 y 2005-0009751; Publicación de Patente 35 Internacional No. WO 04/010957, Publicación de Patente Internacional No. WO 02/088172, y Patentes U.S. Nos. 6.323.315; 6.239.104; 6.034.065; 5.780.588; 5.665.860; 5.663.149; 5.635.483; 5.599.902; 5.554.725; 5.530.097; 5.521.284; 5.504.191; 5.410.024; 5.138.036; 5.076.973; 4.986.988; 4.978.744; 4.879.278; 4.816.444; y 4.486.414.
- 40 Se ha mostrado que las auristatinas interfieren con las dinámicas de los microtúbulos y la división nuclear y celular y tienen actividad anticancerosa. Las auristatinas de la presente invención se unen a la tubulina y pueden ejercer un efecto citotóxico o citostático en una línea celular que expresa CD19. Existen varios ensayos diferentes, conocidos en la técnica, que pueden usarse para determinar si una auristatina o el conjugado anticuerpo-fármaco resultante ejerce un efecto citostático o citotóxico en una línea celular deseada, véase por ejemplo, el Ejemplo 7.
- 45 Los métodos para determinar si un compuesto se une a la tubulina son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Muller et al., *Anal. Chem* 2006, 78, 4390-4397; Hamel et al., *Molecular Pharmacology*, 1995 47: 965-976; y Hamel et al., *The Journal of Biological Chemistry*, 1990 265:28, 17141-17149. Para los propósitos de la presente descripción, puede determinarse la afinidad relativa de un compuesto para la tubulina. Algunas auristatinas preferidas de la presente invención se unen a la tubulina con una afinidad que varía de 10 veces menor (afinidad menor) que la afinidad de unión de MMAE a la tubulina a 10 veces, 20 veces o incluso 100 veces mayor (mayor afinidad) que la

afinidad de unión de MMAE a la tubulina.

En algunas realizaciones, -D es una auristatina de la fórmula D<sub>E</sub>, D<sub>F</sub> o D<sub>Z</sub>:



5

o una forma de sal o solvato farmacéuticamente aceptable de éste;

en el que, independientemente en cada localización:

R<sup>2</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, o alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>;

10 R<sup>3</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, carbociclo, -alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo), arilo, -alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (arilo), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (arilo), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (arilo), heterociclo, -alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo), o -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo);

15 R<sup>4</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, carbociclo, -alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo), arilo, -alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (arilo), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (arilo), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (arilo), heterociclo, -alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo), o -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo);

R<sup>5</sup> es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;

o R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> conjuntamente forman un anillo carbocíclico y tiene la fórmula -(CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)<sub>s</sub>- en la que R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> son independientemente H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, o carbociclo y s es 2, 3, 4, 5 ó 6,

20 R<sup>6</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, o alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>;

R<sup>7</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, carbociclo, -alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo), arilo, -alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (arilo), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (arilo), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (arilo), heterociclo, -alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo), o -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo);

25 cada R<sup>8</sup> es independientemente H, OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>), -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), -O-(alquinilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>), o carbociclo;

R<sup>9</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, o alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>;

R<sup>24</sup> es arilo, heterociclo, o carbociclo;

30 R<sup>25</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, carbociclo, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>), -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), -O-(alquinilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>), o OR<sup>18</sup> en el que R<sup>18</sup> es H, un grupo protector hidroxilo, o un enlace directo en el que OR<sup>18</sup> representa =O;

- R<sup>26</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, o alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, arilo, heterociclo, o carbociclo;
- R<sup>10</sup> es arilo o heterociclo;
- Z es O, S, NH, o NR<sup>12</sup>, en el que R<sup>12</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, o alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>;
- 5 R<sup>11</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, carbociclo, -alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo), arilo, -alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (arilo), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (arilo), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (arilo), heterociclo, -alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo) -(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-R<sup>14</sup>, o -(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-CH(R<sup>15</sup>)<sub>2</sub>;
- m es un número entero que varía de 1-1.000;
- R<sup>13</sup> es alquieno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, o alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>;
- 10 R<sup>14</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, o alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>;
- cada aparición de R<sup>15</sup> es independientemente H, COOH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-N(R<sup>16</sup>)<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>H, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>-alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>-alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>;
- cada aparición de R<sup>16</sup> es independientemente H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOH;
- n es un número entero que varía de 0 a 6;
- 15 R<sup>27</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>), -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), halógeno, -NO<sub>2</sub>, -COOH, o -C(O)OR<sup>28</sup> en el que R<sup>28</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, arilo heterociclo, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)-H, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)-CH<sub>3</sub>, o -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)OH; en el que r es un número entero que varía de 1-10; y
- 20 X es -(CR<sup>29</sup>)<sub>r</sub> en el que R<sup>29</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> y l es un número entero que varía de 0 a 10;
- en el que dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquieno, alquenileno, alquinileno, arilo, carbociclo, y heterociclo, ya sean solos o como parte de otro grupo, están sustituidos opcionalmente.
- Las auristatinas de la fórmula DE, D<sub>F</sub> o D<sub>Z</sub> incluyen aquellas en las que
- 25 R<sup>2</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, o alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, cada uno de los cuales está sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1;
- R<sup>3</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> monocíclico, -alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> monocíclico), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> monocíclico), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> monocíclico), arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>, -alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), heterociclo, -alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo), o -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo); en el que dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquieno, alquenileno, y alquinileno ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1, dichos radicales carbociclo ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A2, dichos radicales arilo ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A3, y dichos radicales heterociclo ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A4;
- 30 R<sup>4</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> monocíclico, -alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> monocíclico), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> monocíclico), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> monocíclico), arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>, -alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), heterociclo, -alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo), o -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo); en el que dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquieno, alquenileno, y alquinileno ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A<sub>1</sub>, dichos radicales carbociclo ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A<sub>2</sub>, dichos radicales arilo ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A<sub>3</sub>, y dichos radicales heterociclo ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A<sub>4</sub>;
- 35 R<sup>5</sup> es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;
- 40 o R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> conjuntamente forman un anillo carbocíclico y tiene la fórmula -(CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)<sub>s</sub> en la que R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> son independientemente H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, o carbociclo, y s es 2, 3, 4, 5 ó 6;
- 45

R<sup>6</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, o alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, en el que dichos radicales alquilo, alquenilo y alquinilo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1;

5 R<sup>7</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> monocíclico, -alquieneno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> monocíclico), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> monocíclico), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> monocíclico), arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>, -alquieneno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), heterociclo, -alquieneno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo), o -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo); en el que dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquieneno, alquenileno, y alquinileno ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1, dichos radicales carbociclo ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A2, dichos radicales arilo ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A3, y dichos radicales heterociclo ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A4;

10 15 cada R<sup>8</sup> es independientemente H, OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>), -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), -O-(alquinilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>), o carbociclo, en el que dichos radicales alquilo, alquenilo, y alquinilo, ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1 y dicho carbociclo está sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A2;

20 25 R<sup>9</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, o alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>; en el que dicho radical alquilo, alquenilo y alquinilo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1;

30 R<sup>24</sup> es arilo, heterociclo, o carbociclo; en el que dicho radical carbociclo está sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A2, dicho radical arilo está sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A3, y dicho radical heterociclo está sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A4;

35 40 R<sup>25</sup> se selecciona de H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, carbociclo, OH, - O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>), -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>)o OR<sup>18</sup>, en el que dichos radicales alquilo, alquenilo, y alquinilo, ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1, y dicho radical carbociclo está sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A2;

45 50 R<sup>18</sup> es H, un grupo protector hidroxilo, o un enlace directo en el que OR<sup>18</sup> representa =O;

R<sup>26</sup> se selecciona de H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, o carbociclo; en el que dichos radicales alquilo, alquenilo, y alquinilo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1, y dicho radical carbociclo está sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A2;

Z es O, S, NH, o NR<sup>12</sup>, en el que R<sup>12</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, o alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, cada uno de los cuales está sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1;

55 60 R<sup>11</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, carbociclo, -alquieneno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo), arilo, -alquieneno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (arilo), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (arilo), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (arilo), heterociclo, -alquieneno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo) -(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-R<sup>14</sup>, o -(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-CH(R<sup>15</sup>)<sub>2</sub> en el que dichos radicales alquilo, alquenilo, y alquinilo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1, dicho radical carbociclo está sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A2, dicho radical arilo está sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A3, y dicho heterociclo está sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A4;

m es un número entero que varía de 1-1.000;

R<sup>13</sup> es alquieneno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, o alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, cada uno de los cuales está sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1;

55 60 R<sup>14</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, o alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, en el que dichos radicales alquilo, alquenilo y alquinilo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1;

cada aparición de R<sup>15</sup> es independientemente H, COOH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-N(R<sup>16</sup>)<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>H, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>-alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>-alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> en el que dichos radicales alquilo, alquenilo, y alquinilo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1;

cada aparición de R<sup>16</sup> es independientemente H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOH en el que dichos radicales alquilo, alquenilo y alquinilo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1;

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

5 R<sup>27</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>), -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), halógeno, -NO<sub>2</sub>, -COOH, o -C(O)OR<sup>28</sup> en el que dichos radicales alquilo, alquenilo y alquinilo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1 y R<sup>28</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, arilo, heterociclo, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)-H, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)-CH<sub>3</sub>, o -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)OH; en el que r es un número entero que varía de 1-10 y en el que dichos radicales alquilo, alquenilo y alquinilo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1; dicho radical arilo está sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A3; y dicho radical heterociclo está sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A4; y

X es -(CR<sup>29</sup>)<sub>2</sub>I- en el que R<sup>29</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> y I es un número entero que varía de 0 a 10 y en el que dichos radicales alquilo, alquenilo y alquinilo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1;

A1 es halógeno, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -arilo sustituido opcionalmente, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR', -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -NHC(O)R', -SR', -SO<sub>3</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)R', -OH, =O, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> y -CN, en el que cada R' se selecciona independientemente de H, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, o arilo sustituido opcionalmente, y en el que dichos grupos O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, arilo sustituido opcionalmente, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, y -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente pueden estar sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, halógeno, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR", -C(O)N(R")<sub>2</sub>-NHC(O)R". -SR", -SO<sub>3</sub>R", -S(O)<sub>2</sub>R", -S(O)R", -OH, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R"), -N(R")<sub>2</sub> y -CN, en el que cada R" se selecciona independientemente de H, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, o arilo;

A2 es halógeno, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, arilo sustituido opcionalmente, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR', -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -NHC(O)R', -SR', -SO<sub>3</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)R', -OH, =O, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> y -CN, en el que cada R' se selecciona independientemente de H, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, o arilo sustituido opcionalmente y en el que dichos grupos -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquino C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, y arilo sustituido opcionalmente pueden estar sustituidos opcionalmente con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, halógeno, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), -arilo, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR", -C(O)N(R")<sub>2</sub>-NHC(O)R", -SR", -SO<sub>3</sub>R", -S(O)<sub>2</sub>R", -S(O)R", -OH, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R"), -N(R")<sub>2</sub> y -CN, en el que cada R" se selecciona independientemente de H, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, o arilo;

A3 es halógeno, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquino C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -arilo sustituido opcionalmente, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR', -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -NHC(O)R', -SR', -SO<sub>3</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)R', -OH, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> y -CN, en el que cada R' se selecciona independientemente de H, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquino C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, y arilo sustituido opcionalmente y en el que dichos grupos -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquino C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, y arilo sustituido opcionalmente pueden estar sustituidos opcionalmente además con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, halógeno, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), -arilo, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR", -C(O)N(R")<sub>2</sub>-NHC(O)R", -SR", -SO<sub>3</sub>R", -S(O)<sub>2</sub>R", -S(O)R", -OH, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R"), -N(R")<sub>2</sub> y -CN, en el que cada R" se selecciona independientemente de H, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, o arilo;

y A4 es -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, halógeno, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -arilo sustituido opcionalmente, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR', -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -NHC(O)R', -SR', -SO<sub>3</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)R', -OH, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R")<sub>2</sub> y -CN, en el que cada R' se selecciona independientemente de H, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente,

- alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, o arilo sustituido opcionalmente y en el que dichos grupos O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente, -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) sustituido opcionalmente -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> sustituido opcionalmente, , y arilo sustituido opcionalmente pueden estar sustituidos opcionalmente además con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente de -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, halógeno, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), -arilo, -C(O)R<sup>a</sup>, -OC(O)R<sup>a</sup>, -C(O)OR<sup>a</sup>, -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR<sup>a</sup>, -C(O)N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub> -NHC(O)R<sup>a</sup>, -SR<sup>a</sup>, -SO<sub>3</sub>R<sup>a</sup>, -S(O)<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -S(O)R<sup>a</sup>, -OH, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R<sup>a</sup>), -N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub> y -CN, en el que cada R<sup>a</sup> se selecciona independientemente de H, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, -alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, o arilo; o una forma de sal o solvato farmacéuticamente aceptable de éste.
- 5 Las auristatinas de la fórmula D<sub>E</sub> incluyen aquellas en las que dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquileno, alquinileno, alquinileno, arilo, carbociclo, y heterociclo no están sustituidos.
- 10 Las auristatinas de la fórmula D<sub>E</sub> incluyen aquellas en las que los grupos de R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, y R<sup>9</sup> no están sustituidos y los grupos de R<sup>24</sup>, R<sup>25</sup> y R<sup>26</sup> están sustituidos opcionalmente como se describe en la presente memoria.
- Las auristatinas de la fórmula D<sub>E</sub> incluyen aquellas en las que
- 15 R<sup>2</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1;
- R<sup>3</sup> y R<sup>7</sup> se seleccionan independientemente de H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> monocíclico, -alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> monocíclico), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> monocíclico), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> monocíclico), arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>, -alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), heterociclo, -alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo), o -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo); en el que dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquileno, alquenileno, y alquinileno ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1, dichos radicales carbociclo ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A2, dichos radicales arilo ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A3, y dichos radicales heterociclo ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A4;
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- R<sup>4</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> monocíclico, -alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> monocíclico), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> monocíclico), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> monocíclico), arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>, -alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), heterociclo, -alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo), o -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo); en el que dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquileno, alquenileno, y alquinileno ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1, dichos radicales carbociclo ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A2, dichos radicales arilo ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A3, y dichos radicales heterociclo ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A4;
- R<sup>5</sup> es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;
- o R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> conjuntamente forman un anillo carbocíclico y tiene la fórmula -(CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)<sub>s</sub> en la que R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> se seleccionan independientemente de H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, o carbociclo, y s se selecciona de 2, 3, 4, 5 ó 6;
- R<sup>6</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1;
- cada R<sup>8</sup> se selecciona independientemente de OH, O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>), -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), o -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>) en el que dichos radicales alquilo, alquenilo, y alquinilo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1;
- R<sup>9</sup> es hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1;
- R<sup>24</sup> es arilo, heterociclo, o carbociclo; en el que dicho radical carbociclo está sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A2, dicho radical arilo está sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A3, y dicho radical heterociclo está sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A4;
- 50 R<sup>25</sup> es OR<sup>18</sup>; en el que R<sup>18</sup> es H, un grupo protector hidroxilo, o un enlace directo en el que OR<sup>18</sup> representa =O;
- R<sup>26</sup> se selecciona de H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, o carbociclo; en el que dichos radicales alquilo, alquenilo, y alquinilo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados

independientemente de A1, y dicho radical carbociclo está sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A2;

y A1, A2, A3, y A4 son como se definen en la presente memoria; o una forma de sal o solvato farmacéuticamente aceptable de éste.

5 Las auristatinas de la fórmula D<sub>E</sub> incluyen aquellas en las que

R<sup>2</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;

R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>7</sup> se seleccionan independientemente de H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> monocíclico, -alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> monocíclico), -alquenileno (carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> monocíclico), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> monocíclico), arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>, -alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), heterociclo, -alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo), o -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo); en el que dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquieno, alquenileno, y alquinileno ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1, dichos radicales carbociclo ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A2, dichos radicales arilo ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A3, y dichos radicales heterociclo ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A4;

R<sup>5</sup> es hidrógeno;

R<sup>6</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;

20 cada R<sup>8</sup> se selecciona independientemente de OH, O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>), -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), o -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>) en el que dichos radicales alquilo, alquenilo, y alquinilo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1;

R<sup>9</sup> es hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;

R<sup>24</sup> es fenilo sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A3;

25 R25 es OR<sup>18</sup>; en el que R<sup>18</sup> es H, un grupo protector hidroxilo, o un enlace directo en el que OR<sup>18</sup> representa =O;

R<sup>26</sup> se selecciona de H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, o carbociclo; en el que dichos radicales alquilo, alquenilo, y alquinilo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1, y dicho radical carbociclo está sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A2; y

30 A1, A2, A3, y A4 son como se definen en la presente memoria; o una forma de sal o solvato farmacéuticamente aceptable de éste.

Las auristatinas de la fórmula D<sub>E</sub> incluyen aquellas en las que

R<sup>2</sup> es metilo;

35 R<sup>3</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, o alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, en el que dichos radicales alquilo, alquenilo y alquinilo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1;

R<sup>4</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> monocíclico, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>, -alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> (arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> (arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> (arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> (carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> monocíclico), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> (carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> monocíclico), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> (carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> monocíclico); en el que dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquenileno, y alquinileno ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1; dichos radicales carbociclo ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A2; y dichos radicales arilo ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A3;

R<sup>5</sup> es H; R<sup>6</sup> es metilo;

45 R<sup>7</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> o alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>;

cada R<sup>8</sup> es metoxi;

R<sup>9</sup> es hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;

R<sup>24</sup> es fenilo;

$R^{25}$  es  $OR^{18}$ ; en el que  $R^{18}$  es H, un grupo protector hidroxilo, o un enlace directo en el que  $OR^{18}$  representa =O;

$R^{26}$  es metilo; y A1, A2, y A3 son como se definen en la presente memoria; o una forma de sal o solvato farmacéuticamente aceptable de éste.

Las auristatinas de la fórmula D<sub>E</sub> incluyen aquellas en las que

- 5  $R^2$  es metilo;  $R^3$  es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>;  $R^4$  es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>;  $R^5$  es H;  $R^6$  es metilo;  $R^7$  es isopropilo o sec-butilo;  $R^8$  es metoxi;  $R^9$  es hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;  $R^{24}$  es fenilo;  $R^{25}$  es  $OR^{18}$ ; en el que  $R^{18}$  es H, un grupo protector hidroxilo, o un enlace directo en el que  $OR^{18}$  representa =O; y  $R^{26}$  es metilo; o una forma de sal o solvato farmacéuticamente aceptable de éste.

Las auristatinas de la fórmula D<sub>F</sub> o D<sub>Z</sub> incluyen aquellas en las que

- 10  $R^2$  es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, o alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, cada uno de los cuales está sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1;

$R^3$ ,  $R^4$ , y  $R^7$  se seleccionan independientemente de H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> monocíclico, -alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> monocíclico), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> monocíclico), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> monocíclico), arilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, -alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), heterociclo, -alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo), o -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo); en el que dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquienileno, alquenileno, y alquinileno ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1, dichos radicales carbociclo ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A2, dichos radicales arilo ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A3, y dichos radicales heterociclo ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A4;

$R^5$  es H;

- 25  $R^6$  es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, o alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, en el que dichos radicales alquilo, alquenilo y alquinilo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1;

30 cada  $R^8$  se selecciona independientemente de H, OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>), -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), o carbociclo, en el que dichos radicales alquilo, alquenilo, y alquinilo, ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1 y dicho carbociclo está sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A2;

35  $R^9$  es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, o alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>; en el que dicho radical alquilo, alquenilo y alquinilo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1;

40  $R^{10}$  es fenilo sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A3;

- 45 Z es O, S, NH, o NR<sup>12</sup>, en el que R<sup>12</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, o alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, cada uno de los cuales está sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1;

50  $R^{11}$  es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, arilo, heterociclo, -(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-R<sup>14</sup>, o -(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-CH(R<sup>15</sup>)<sub>2</sub> en el que dichos radicales alquilo, alquenilo y alquinilo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1, dicho radical arilo está sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A3, y dicho heterociclo está sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A4;

m es un número entero que varía de 1-1.000;

55  $R^{13}$  es alquienilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, o alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, cada uno de los cuales está sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1;

- 55  $R^{14}$  es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, o alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, en el que dichos radicales alquilo, alquenilo y alquinilo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1;

55 cada aparición de  $R^{15}$  es independientemente H, COOH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-N(R<sup>16</sup>)<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>H, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>-alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>-alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> en el que dichos radicales alquilo, alquenilo, y alquinilo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1;

55 cada aparición de  $R^{16}$  es independientemente H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOH en el que dichos radicales alquilo, alquenilo y alquinilo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A1;

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

R<sup>27</sup> es H; y

X es -(CR<sup>29</sup>)<sub>2</sub>I- en el que I es 0; y A1, A2, A3, y A4 son como se definen en la presente memoria; o una forma de sal o solvato farmacéuticamente aceptable de éste.

5 Las auristatinas de la fórmula D<sub>F</sub> o D<sub>Z</sub> incluyen aquellas en las que

R<sup>2</sup> es metilo;

R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, y R<sup>7</sup> se seleccionan independientemente de H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> monocíclico, -alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> monocíclico), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> monocíclico),

10 -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> monocíclico), arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>, -alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), heterociclo, -alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo), o -alquinileno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo); en el que dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquieno, alquenileno, y alquinileno ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A<sub>1</sub>, dichos radicales carbociclo ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A<sub>2</sub>, dichos radicales arilo ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A<sub>3</sub>, y dichos radicales heterociclo ya sean solos o como parte de otro grupo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A<sub>4</sub>;

R<sub>5</sub> es H;

20 R<sup>6</sup> es metilo;

cada R<sup>8</sup> es metoxi;

R<sup>9</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, o alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>; en el que dicho radical alquilo, alquenilo y alquinilo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A<sub>1</sub>;

25 R<sup>10</sup> es arilo sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A<sub>3</sub>, o heterociclo sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A<sub>4</sub>;

Z es O, S, NH, o NR<sup>12</sup>, en el que R<sup>12</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, o alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, cada uno de los cuales está sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A<sub>1</sub>;

30 R<sup>11</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, arilo, heterociclo, -(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-R<sup>14</sup>, o -(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-CH(R<sup>15</sup>)<sub>2</sub> en el que dichos radicales alquilo, alquenilo y alquinilo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A<sub>1</sub>, dicho radical arilo está sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A<sub>3</sub>, y dicho heterociclo está sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A<sub>4</sub>;

m es un número entero que varía de 1-1.000;

35 R<sup>13</sup> es alquieno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, o alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, cada uno de los cuales está sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A<sub>1</sub>;

R<sup>14</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, o alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, en el que dichos radicales alquilo, alquenilo y alquinilo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A<sub>1</sub>;

40 cada aparición de R<sup>15</sup> es independientemente H, COOH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-N(R<sup>16</sup>)<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>H, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>-alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>-alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> en el que dichos radicales alquilo, alquenilo, y alquinilo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A<sub>1</sub>;

cada aparición de R<sup>16</sup> es independientemente H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOH en el que dichos radicales alquilo, alquenilo y alquinilo están sustituidos opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A<sub>1</sub>;

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

45 R<sup>27</sup> es H; y

X es -(CR<sup>29</sup>)<sub>2</sub>I- en el que I es 0; y A1, A2, A3, y A4 son como se definen en la presente memoria; o una forma de sal o solvato farmacéuticamente aceptable de éste.

En determinadas de estas realizaciones, R<sup>10</sup> es fenilo sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A<sub>3</sub>.

Las auristatinas de la fórmula D<sub>F</sub> incluyen aquellas en las que los grupos de R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, y R<sup>9</sup> no están sustituidos y los grupos de R<sup>10</sup> y R<sup>11</sup> son como se describe en la presente memoria.

Las auristatinas de la fórmula D<sub>F</sub> incluyen aquellas en las que dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquileno, alquenileno, alquinileno, arilo, carbociclo, y heterociclo no están sustituidos.

5 Las auristatinas de la fórmula D<sub>F</sub> incluyen aquellas en las que

R<sup>2</sup> es metilo; R<sup>3</sup> es H o alquilo-C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>; R<sup>4</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>; R<sup>5</sup> es H; R<sup>6</sup> es metilo; R<sup>7</sup> es isopropilo o sec-butilo; R<sup>8</sup> es metoxi; R<sup>9</sup> es hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>; R<sup>10</sup> fenilo sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A3; Z es O, S, o NH; R<sup>11</sup> es como se define en la presente memoria; o una forma de sal o solvato farmacéuticamente aceptable de éste.

10 Las auristatinas de la fórmula D<sub>F</sub> incluyen aquellas en las que

R<sup>1</sup> es hidrógeno; R<sup>2</sup> es metilo; R<sup>3</sup> es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>; R<sup>4</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>; R<sup>5</sup> es H; R<sup>6</sup> es metilo; R<sup>7</sup> es isopropilo o sec-butilo; R<sup>8</sup> es metoxi; R<sup>9</sup> es hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>; R<sup>10</sup> es fenilo; Z es O o NH; R<sup>11</sup> es como se define en la presente memoria; o una forma de sal o solvato farmacéuticamente aceptable de éste.

15 Las auristatinas de la fórmula D<sub>Z</sub> incluyen aquellas en las que los grupos de R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup>, R<sup>27</sup>, R<sup>28</sup>, y R<sup>29</sup> no están sustituidos y los grupos de R<sup>10</sup> y R<sup>11</sup> son como se describe en la presente memoria.

Las auristatinas de la fórmula D<sub>Z</sub> incluyen aquellas en las que dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquileno, alquenileno, alquinileno, arilo, carbociclo, y heterociclo no están sustituidos.

Las auristatinas de la fórmula D<sub>Z</sub> incluyen aquellas en las que

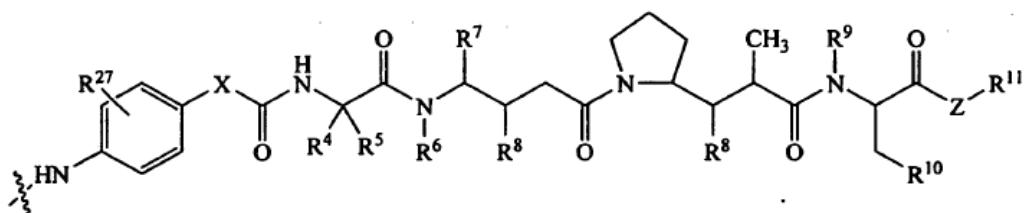
20 R<sup>1</sup> es hidrógeno; R<sup>2</sup> es metilo; R<sup>3</sup> es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>; R<sup>4</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>; R<sup>5</sup> es H; R<sup>6</sup> es metilo; R<sup>7</sup> es isopropilo o sec-butilo; R<sup>8</sup> es metoxi; R<sup>9</sup> es hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>; R<sup>10</sup> es fenilo sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados independientemente de A3; Z es O, S, o NH; R<sup>11</sup> es como se define en la presente memoria; R<sup>27</sup> es H; y X es -(CR<sup>29</sup><sub>2</sub>)<sub>r</sub> en el que l es 0; o una forma de sal o solvato farmacéuticamente aceptable de éste.

Las auristatinas de la fórmula D<sub>Z</sub> incluyen aquellas en las que

25 R<sup>1</sup> es hidrógeno; R<sup>2</sup> es metilo; R<sup>3</sup> es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>; R<sup>4</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>; R<sup>5</sup> es H; R<sup>6</sup> es metilo; R<sup>7</sup> es isopropilo o sec-butilo; R<sup>8</sup> es metoxi; R<sup>9</sup> es hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>; R<sup>10</sup> es fenilo; R<sup>11</sup> es como se define en la presente memoria; R<sup>27</sup> es H; X es -(CR<sup>29</sup><sub>2</sub>)<sub>r</sub> en el que l es 0; y Z es O o NH; o una forma de sal o solvato farmacéuticamente aceptable de éste.

30 Las auristatinas de la fórmula D<sub>Z</sub> incluyen aquellas en las que R<sup>11</sup> es -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>H, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>CH<sub>3</sub>, o -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)OH; en el que r es un número entero que varía de 1-10; o una forma de sal o solvato farmacéuticamente aceptable de éste.

Las auristatinas de la fórmula DZ incluyen aquellas en las que el grupo fenilo en el extremo amino está sustituido en para como se muestra a continuación:



35 Las auristatinas de la fórmula D<sub>E</sub>, D<sub>F</sub> o D<sub>Z</sub> incluyen aquellas en las que R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>7</sup> son independientemente isopropilo o sec-butilo y R<sup>5</sup> es -H. En una realización ejemplar, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son cada uno isopropilo, R<sup>5</sup> es H, y R<sup>7</sup> es sec-butilo. El resto de los sustituyentes son como se define en la presente memoria.

Las auristatinas de la fórmula D<sub>E</sub>, D<sub>F</sub> o D<sub>Z</sub> incluyen aquellas en las que R<sup>2</sup> y R<sup>6</sup> son cada una metilo, y R<sup>9</sup> es H. El resto de los sustituyentes son como se define en la presente memoria.

40 Las auristatinas de la fórmula D<sub>E</sub>, D<sub>F</sub> o D<sub>Z</sub> incluyen aquellas en las que cada aparición de R<sup>8</sup> es -OCH<sub>3</sub>. El resto de los sustituyentes son como se define en la presente memoria.

Las auristatinas de la fórmula D<sub>E</sub>, D<sub>F</sub> o D<sub>Z</sub> incluyen aquellas en las que R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son cada uno isopropilo, R<sup>2</sup> y R<sup>6</sup> son cada uno metilo, R<sup>5</sup> es H, R<sup>7</sup> es sec-butilo, cada aparición de R<sup>8</sup> es -OCH<sub>3</sub>, y R<sup>9</sup> es H. El resto D<sub>E</sub> los sustituyentes son como se define en la presente memoria.

Las auristatinas de la fórmula D<sub>F</sub> o D<sub>Z</sub> incluyen aquellas en las que Z es -O- o -NH-. El resto de los sustituyentes son

como se define en la presente memoria.

Las auristatinas de la fórmula D<sub>F</sub> o D<sub>Z</sub> incluyen aquellas en las que R<sup>10</sup> es arilo. El resto de los sustituyentes son como se define en la presente memoria.

5 Las auristatinas de la fórmula D<sub>F</sub> o D<sub>Z</sub> incluyen aquellas en las que R<sup>10</sup> es -fenilo. El resto de los sustituyentes son como se define en la presente memoria.

Las auristatinas de la fórmula D<sub>F</sub> o D<sub>Z</sub> incluyen aquellas en las que Z es -O-, y R<sub>11</sub> es H, metilo o t-butilo. El resto de los sustituyentes son como se define en la presente memoria.

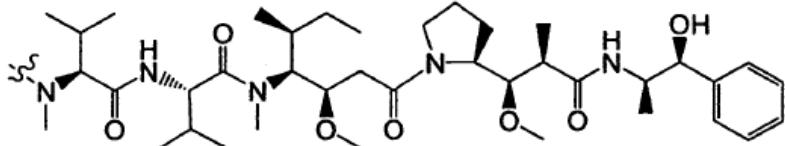
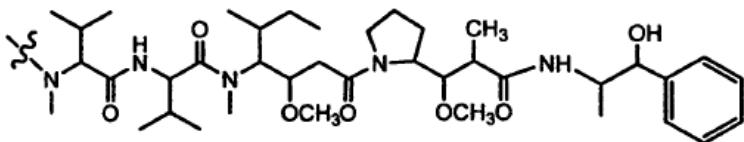
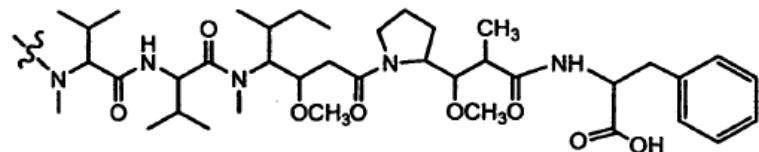
10 Las auristatinas de la fórmula D<sub>F</sub> o D<sub>Z</sub> incluyen aquellas en las que, cuando Z es -NH, R<sup>11</sup> es -(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-CH(R<sup>15</sup>)<sub>2</sub>, en el que R<sup>15</sup> es -(CH<sub>2</sub>)O-N(R<sup>16</sup>)<sub>2</sub>, y R<sup>16</sup> es -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOH. El resto de los sustituyentes son como se define en la presente memoria.

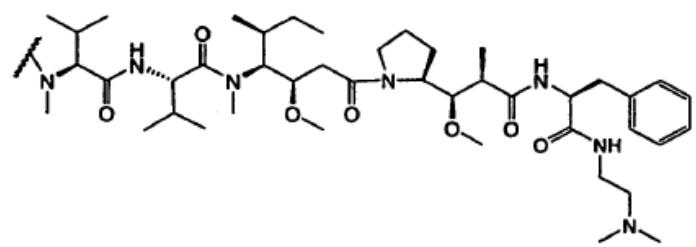
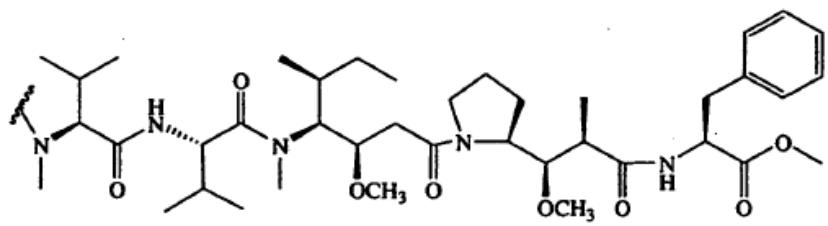
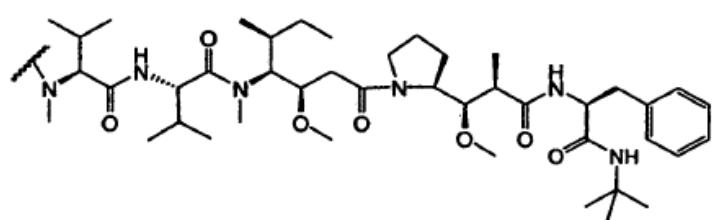
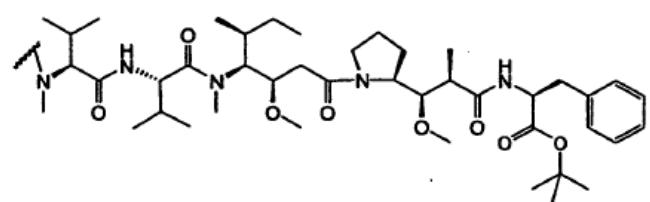
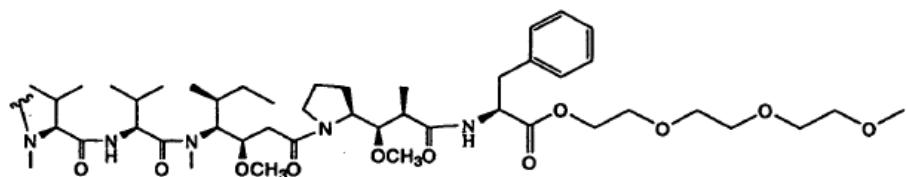
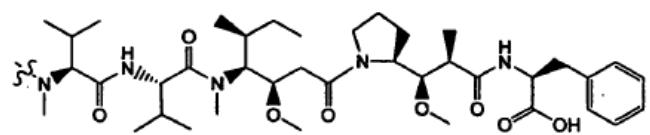
Las auristatinas de la fórmula D<sub>F</sub> o D<sub>Z</sub> incluyen aquellas en las que cuando Z es -NH, R<sup>11</sup> es -(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-CH(R<sup>15</sup>)<sub>2</sub>, en el que R<sup>15</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>H. El resto de los sustituyentes son como se define en la presente memoria.

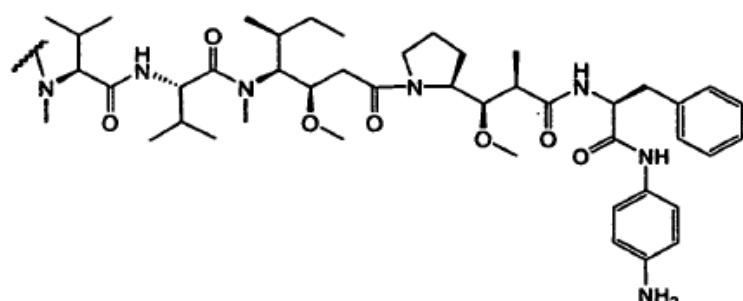
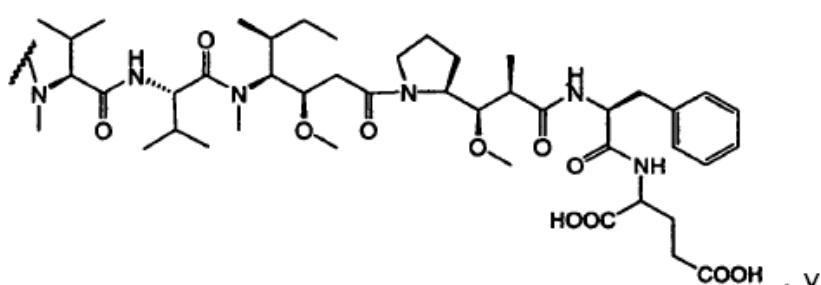
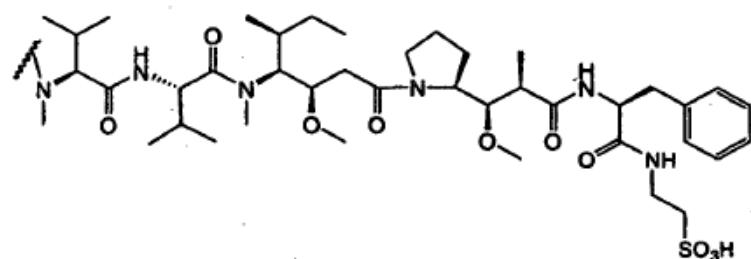
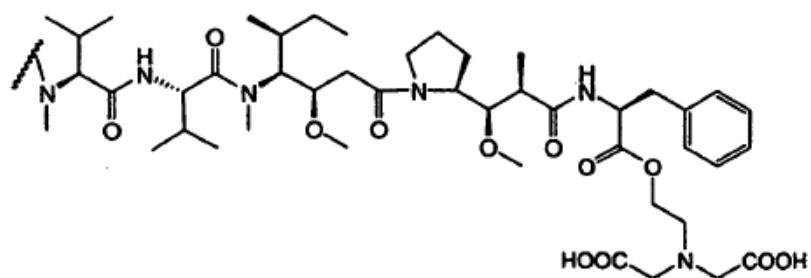
En realizaciones preferidas, cuando D es una auristatina de fórmula D<sub>E</sub>, w es un número entero que varía de 1 a 12, preferiblemente 2 a 12, y a es 1 ó 2, y a es preferiblemente 1.

15 En algunas realizaciones, cuando D es una auristatina de fórmula D<sub>F</sub>, a es 1 y w e y son 0.

Las unidades de fármaco (-D) ilustrativas incluyen las unidades de fármaco que tienen las estructuras siguientes:





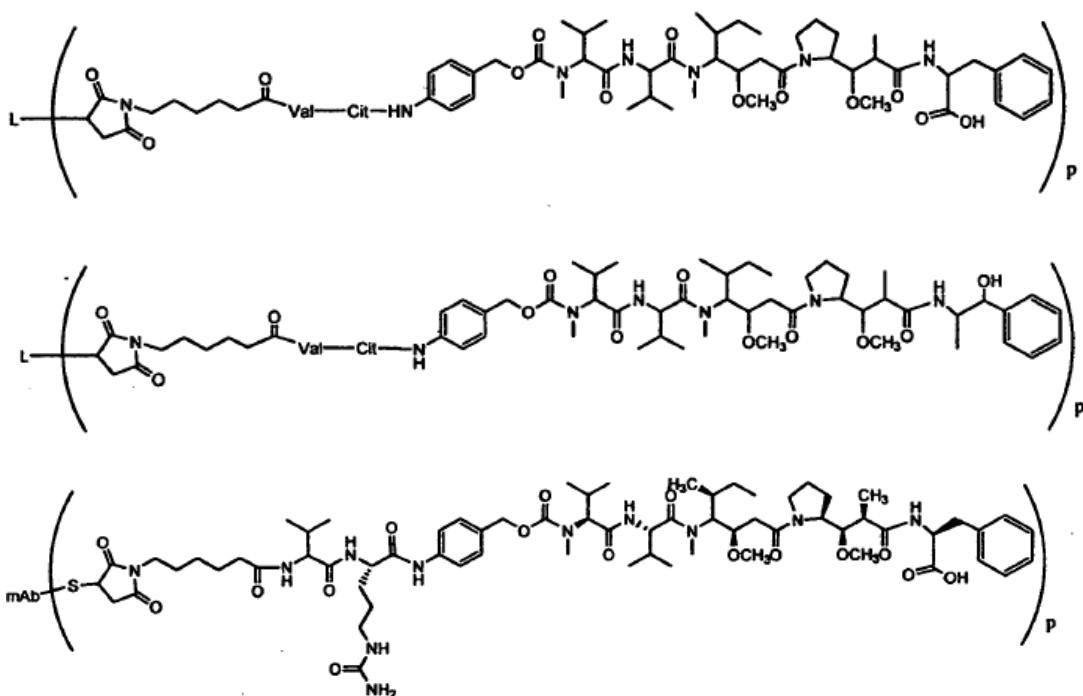
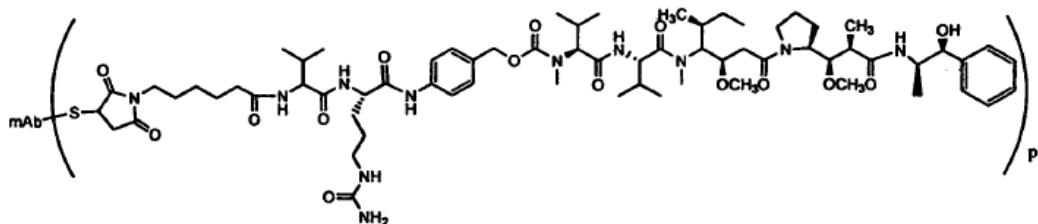
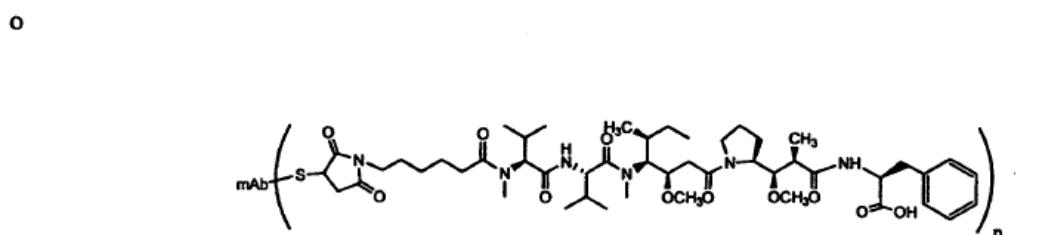


o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de éstos.

5 En un aspecto, pueden unirse grupos hidrofílicos, tales como pero no limitado a ésteres de trietilen glicol (TEG) a la unidad de fármaco en R<sup>11</sup>. Sin vinculación a teoría, los grupos hidrofílicos ayudan en la internalización y no aglomeración de la unidad de fármaco.

En algunas realizaciones, la unidad de fármaco no es TZT-1027. En algunas realizaciones, la unidad de fármaco no es auristatina E, dolastatina 10, o auristatina PE.

10 Los compuestos de conjugado ligando-fármaco ejemplares tienen las estructuras siguientes en las que "mAb-s-" representa un anticuerpo anti-CD 19:

**L-MC-vc-PAB-MMAF****L-MC-vc-PAB-MMAE**

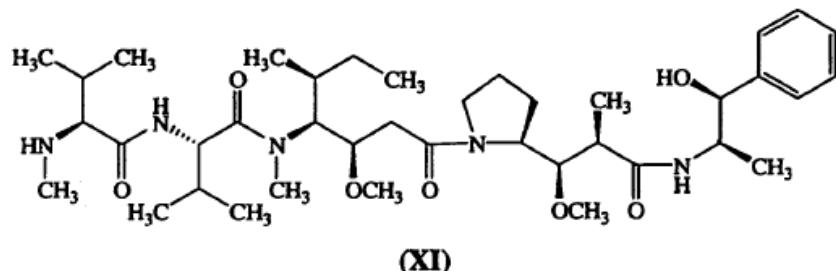
5

o formas de sal o solvato farmacéuticamente aceptables de éstos, en el que Val es valina, y Cit es citrulina.

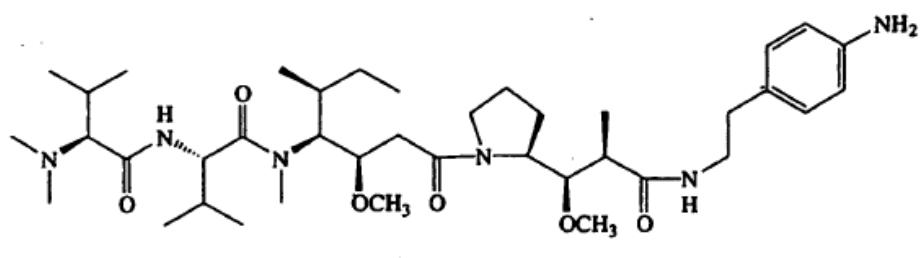
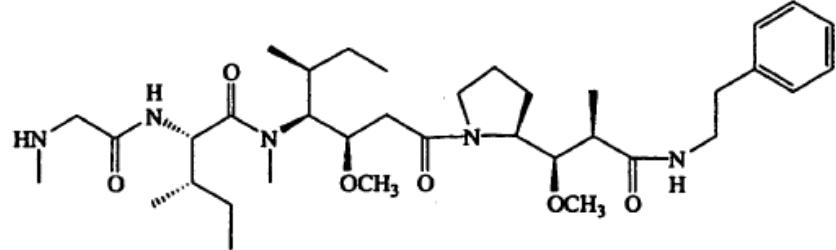
En determinadas realizaciones, el fármaco es un antimetabolito. El antimetabolito puede ser, por ejemplo, un antagonista de purina (por ejemplo, azotioprina o micofenolato mofetil), un inhibidor de dihidrofolato reductasa (por ejemplo, metotrexato), aciclovir, gangciclovir, zidovudina, vidarabina, ribavirina, azidotimidina, citidina arabinósido, amantadina, didesoxiuridina, yododesoxiuridina, poscarbet, o trifluridina.

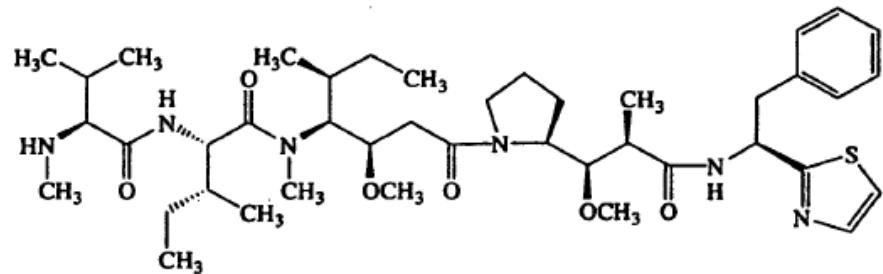
En otras realizaciones, el fármaco es tacrolimus, ciclosporina o rapamicina. En realizaciones adicionales, el fármaco es aldeslequina, alemtuzumab, altretinoína, allopurinol, altretamina, amifostina, anastrozol, trióxido de arsénico, bexaroteno, bexaroteno, calusterona, capecitabina, celecoxib, cladribina, Darbepoyetina alfa, Denileuquina diftitox, dexrazoxano, propionato de dromostanolona, epirubicina, Epoetina alfa, estramustina, exemestano, Filgrastim,

- 5 floxuridina, fludarabina, fulvestrant, gemcitabina, gemtuzumab ozogamicina, goserelina, idarrubicina, ifosfamida, mesilato de imatinib, Interferón alfa-2a, irinotecán, letrozol, leucovorina, levamisol, mecloretamina o mostaza de nitrógeno, megestrol, mesna, metotrexato, metoxsaleno, mitomicina C, mitotano, fenpropionato de nandrolona, oprelvequina, oxaliplatino, pamidronato, pegademasa, pegaspargasa, pegfilgrastim, pentostatina, pipobromán, plicamicina, porfimer sodio, procarbazina, quinacrina, rasburicasa, Rituximab, Sargramostim, estreptozocina, tamoxifeno, temozolomida, tenipósido, testolactona, tioguanina, toremifeno, Tositumomab, Trastuzumab, tretinoína, mostaza de uracilo, valrubicina, vinblastina, vincristina, vinoerelbina y zoledronato.
- 10 En algunas realizaciones, el resto de fármaco es un agente inmunomodulador. El agente inmunomodulador puede ser, por ejemplo, ganciclovir, etanercept, tacrolimus, ciclosporina, rapamicina, ciclofosfamida, azatioprina, 15 micofenolato mofetil o metotrexato. Alternativamente, el agente inmunomodulador puede ser, por ejemplo, un glucocorticoide (por ejemplo, cortisol o aldosterona) o un análogo de glucocorticoide (por ejemplo, prednisona o dexametasona).
- 15 En algunas realizaciones, el agente inmunomodulador es un agente anti-inflamatorio, tal como derivados arilcarboxílicos, derivados que contienen pirazol, derivados oxicam y derivados del ácido nicotínico. Las clases de agentes anti-inflamatorios incluyen, por ejemplo, inhibidores de ciclooxygenasa, inhibidores de 5-lipoxigenasa, y antagonistas del receptor de leucotrienos.
- 20 Los inhibidores de ciclooxygenasa adecuados incluyen ácido meclofenámico, ácido mefenámico, carprofeno, diclofenac, diflunisal, fenbufeno, fenoprofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, nabumetona, naproxeno, sulindac, tenoxicam, tolmetina, y ácido acetilsalicílico.
- 25 Los inhibidores de lipoxigenasa adecuados incluyen inhibidores redox (por ejemplo, derivados de catecol butano, ácido nordihidroguaiarético (NDGA), masoprolol, fenidona, lanopaleno, indazolinonas, nafazatrom, benzofuranol, alquilhidroxilamina), e inhibidores no redox (por ejemplo, hidroxitiazoles, metoxialquiltiazoles, benzopiranos y derivados de éstos, metoxitetrahidropirano, ácidos boswellicos y derivados acetilados de ácidos boswellicos, y ácidos quinolinmetoxifenilacético sustituidos con radicales cicloalquilo), y precursores de inhibidores redox.
- 30 Otros inhibidores de lipoxigenasa adecuados incluyen antioxidantes (por ejemplo, fenoles, galato de propilo, flavonoides y/o sustratos naturales que contienen flavonoides, derivados hidroxilados de las flavonas, flavonol, dihidroqueracetina, luteolina, galangina, orobol, derivados de chalcona, 4,2',4'-trihidroxichalcona, orto-aminofenoles, N-hidroxiureas, benzofuranoles, ebseleno y especies que incrementan la actividad de las selenoenzimas reductoras), agentes quelantes de hierro (por ejemplo, ácidos hidroxámicos y derivados de éstos, N-hidroxiureas, 2-bencil-1-naftol, cateoles, hidroxilaminas, carnosol trolox C, catecol, naftol, sulfasalazina, zileutón, ácido 5-hidroxyantranílico y ácidos 4-(omega-arilalquil)fenilalcanoicos), compuestos que contienen imidazol (por ejemplo, quetoconazol e itraconazol), fenotiazinas, y derivados de benzopirano.
- 35 Otros inhibidores de lipoxigenasa adecuados más incluyen inhibidores de eicosanoides (por ejemplo, ácidos octadecatetraenoico, eicosatetraenoico, docosapentaenoico, eicosahexaenoico y ésteres de éstos, PGE1 (prostaglandina E1), PGA2 (prostaglandina A2), viprostol, ácidos 15-monohidroxieicosatetraenoico, 15-monohidroxi-eicosatrienoico y 15-monohidroxieicosapentaenoico, y leucotrienos B5, C5 y D5), compuestos que interfieren con los flujos de calcio, fenotiazinas, difenilbutilaminas, verapamil, fuscósido, curcumina, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico (ETYA), hidroxifenilretinamida, ionopaleno, esculina, dietylcarbamazina, fenantrolina, baicaleína, proxicromil, tioéteres, sulfuro de dialilo y sulfuro de di-(1-propenilo).
- 40 Los antagonistas del receptor de leucotrienos incluyen calcitriol, ontazolast, Bayer Bay-x-1005, Ciba-Geigy CGS-25019C, ebselen, Leo Denmark ETH-615, Lilly LY-293111, Ono ONO-4057, Terumo TMK-688, Boehringer Ingelheim BI-RM-270, Lilly LY 213024, Lilly LY 264086, Lilly LY 292728, Ono ONO LB457, Pfizer 105696, Perdue Frederick PF 10042, Rhone-Poulenc Rorer RP 66153, SmithKline Beecham SB-201146, SmithKline Beecham SB-201993, SmithKline Beecham SB-209247, Searle SC-53228, Sumitomo SM 15178, American Home Products WAY 121006, 45 Bayer Bay-o-8276, Warner-Lambert CI-987, Warner-Lambert CI-987BPC-15LY 223982, Lilly LY 233569, Lilly LY-255283, MacroNex MNX-160, Merck and Co. MK-591, Merck and Co. MK-886, Ono ONO-LB-448, Purdue Frederick PF-5901, Rhone-Poulenc Rorer RG 14893, Rhone-Poulenc Rorer RP 66364, Rhone-Poulenc Rorer RP 69698, Shionogi S-2474, Searle SC-41930, Searle SC-50505, Searle SC-51146, Searle SC-52798, SmithKline Beecham SK&F-104493, Leo Denmark SR-2566, Tanabe T-757 y Teijin TEI-1338.
- 50 En determinadas realizaciones, el agente citotóxico o citostático es una dolastatina. En determinadas realizaciones, el agente citotóxico o citostático es de la clase auristatina. Así, en una realización específica, el agente citotóxico o citostático es MMAE (Fórmula XI). En otra realización específica, el agente citotóxico o citostático es AFP (Fórmula XVI).

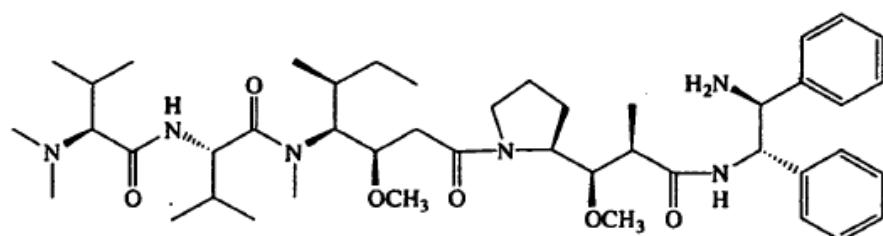


En determinadas realizaciones, el agente citotóxico o citostático es un compuesto de fórmulas XII-XXI o forma de sal o solvato farmacéuticamente aceptable de éste:

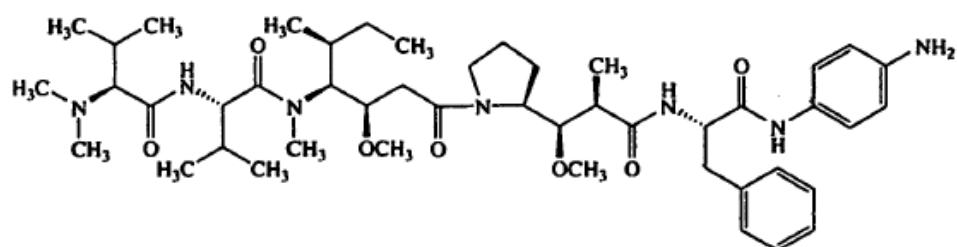
**(XII)****(XIII)**



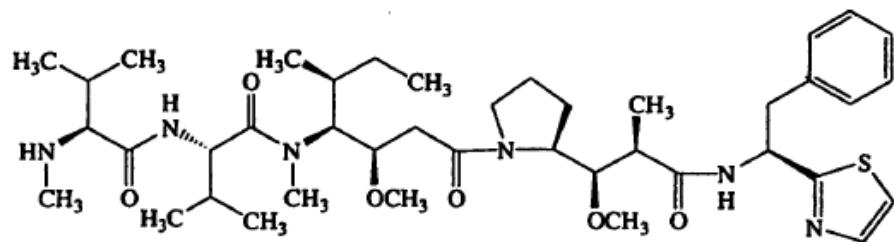
(XIV)



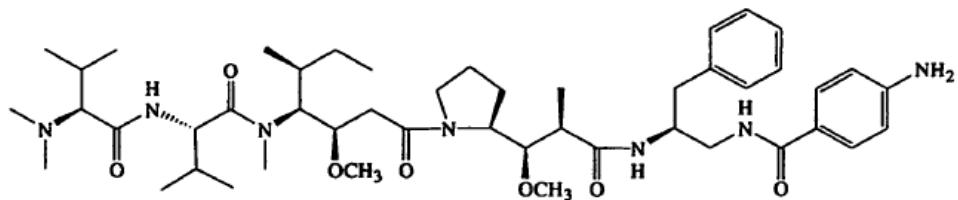
(XV)



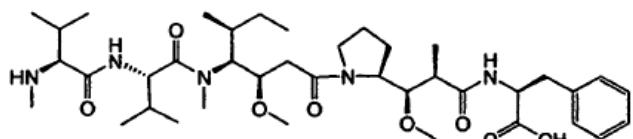
(XVI)



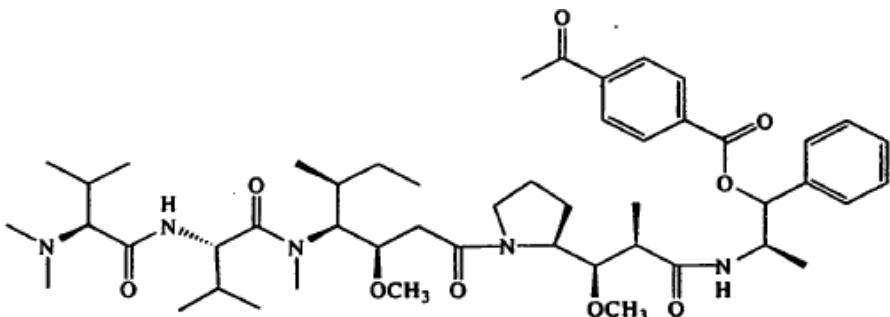
(XVII)



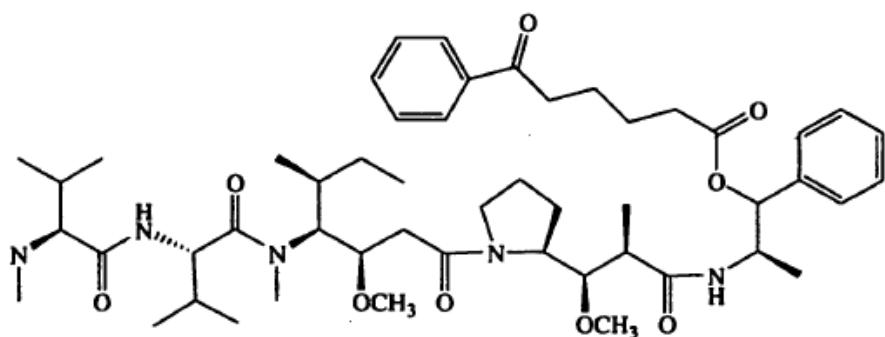
(XVIII)



(XIV)



(XX)



(XXI)

- 5 Son conocidos los métodos para determinar si un fármaco o conjugado ligando-fármaco ejerce un efecto citostático  
y/o citotóxico en una célula. Generalmente, la actividad citotóxica o citostática de un conjugado ligando fármaco  
puede medirse: exponiendo las células de mamífero que expresan una proteína diana del conjugado ligando fármaco  
en un medio de cultivo celular; cultivar las células durante un periodo de aproximadamente 6 horas a  
aproximadamente 5 días; y medir la viabilidad celular. Los ensayos basados en células *in vitro* pueden usarse para  
medir la viabilidad (proliferación), citotoxicidad, e inducción de apoptosis (activación de caspasas) del conjugado  
ligando fármaco.
- 10

Para determinar si un conjugado ligando fármaco ejerce un efecto citostático, puede usarse un ensayo de incorporación de timidina. Por ejemplo, pueden cultivarse células cancerosas que expresan un antígeno diana a una densidad de 5.000 células/pocillo de una placa de 96 pocillos durante un periodo de 72 horas y exponerse a 0,5  $\mu\text{Ci}$

de  $^3\text{H}$ -timidina durante las 8 horas finales del periodo de 72 horas. La incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina en las células del cultivo se mide en presencia y ausencia del conjugado ligando fármaco.

Para determinar la citotoxicidad, puede medirse la necrosis o apoptosis (muerte celular programada). La necrosis está acompañada típicamente de permeabilidad incrementada de la membrana plasmática; hinchazón de la célula, y ruptura de la membrana plasmática. La apoptosis se caracteriza típicamente por la formación de vacuolas en la membrana, condensación del citoplasma, y la activación de endonucleasas endógenas. La determinación de cualquiera de estos efectos en las células cancerosas indica que un conjugado ligando fármaco es útil en el tratamiento de cánceres.

La viabilidad celular puede medirse determinando en una célula la captación de un colorante tal como rojo neutro, azul de tripán, o ALAMAR™ azul (véase, por ejemplo, Page *et al.*, 1993, *Intl. J. Oncology* 3:473-476). En dicho ensayo, las células se incuban en medio que contiene el colorante, las células se lavan, y el colorante remanente, que refleja la captación celular del colorante, se mide espectrofotométricamente. El colorante de unión a proteínas sulfurodiamina B (SRB) también puede usarse para medir la citotoxicidad (Skehan *et al.*, 1990, *J. Natl. Cancer Inst.* 82:1107-12).

Alternativamente, se usa una sal de tetrazolio, tal como MTT, en un ensayo colorimétrico cuantitativo para la supervivencia y proliferación de células de mamífero mediante la detección de células vivas, pero no muertas (véase, por ejemplo, Mosmann, 1983, *J. Immunol. Methods* 65:55-63).

La apoptosis puede cuantificarse midiendo, por ejemplo, la fragmentación del ADN. Están disponibles métodos fotométricos comerciales para la determinación cuantitativa *in vitro* de la fragmentación del ADN. Los ejemplos de dichos ensayos, incluyendo TUNEL (que detecta la incorporación de nucleótidos marcados en ADN fragmentado) y ensayos basados en ELISA, se describen en *Biochemica*, 1999, no. 2, p. 34-37 (Roche Molecular Biochemicals).

La apoptosis también puede determinarse midiendo cambios morfológicos en una célula. Por ejemplo, como con la necrosis, la pérdida de la integridad de la membrana plasmática puede determinarse midiendo la captación de determinados colorantes (por ejemplo, un colorante fluorescente tal como, por ejemplo, naranja de acridina o bromuro de etidio). Un método para medir el número de células apoptóticas ha sido descrito por Duke y Cohen, *Current Protocols in Immunology* (Coligan *et al.* eds., 1992, p. 3.17.1-3.17.16). Las células también pueden marcarse con un colorante de ADN (por ejemplo, naranja de acridina, bromuro de etidio, o yoduro de propidio) y las células observadas para condensación de cromatina y marginación a lo largo de la membrana nuclear interna. Otros cambios morfológicos que pueden medirse para determinar la apoptosis incluyen, por ejemplo, condensación citoplásrica, formación incrementada de vacuolas en la membrana, y encogimiento celular.

La presencia de células apoptóticas puede medirse en los compartimentos tanto unidos como "flotantes" de los cultivos. Por ejemplo, ambos compartimentos pueden recogerse mediante la retirada del sobrenadante, tripsinizando las células adheridas, combinando las preparaciones después de una etapa de lavado con centrifugación (por ejemplo, 10 minutos a 2.000 rpm), y detectando la apoptosis (por ejemplo, midiendo la fragmentación del ADN). (Véase, por ejemplo, Piazza *et al.*, 1995, *Cancer Research* 55:3110-16).

Los efectos de los conjugados ligando fármaco pueden ensayarse o validarse en modelos animales. El experto en la técnica conoce varios modelos animales establecidos de cánceres, cualquiera de los cuales puede usarse para ensayar la eficacia de un conjugado ligando fármaco. Los ejemplos no limitativos de dichos modelos se describen *infra*. Además, pueden crearse modelos animales pequeños para examinar las eficacias *in vivo* de los conjugados ligando fármaco mediante el implante de líneas celulares tumorales humanas en cepas de roedores inmunodeficientes apropiadas, por ejemplo, ratones desnudos atípicos o ratones SCID.

### **Unidad de ligando**

La unidad de ligando (*L*) tiene al menos un grupo funcional que puede formar un enlace con un grupo funcional de una unidad de conector. Los grupos funcionales útiles que pueden estar presentes en una unidad de ligando, bien de forma natural o mediante manipulación química o mediante ingeniería, incluyen, pero no están limitados a, sulfhidrilo (-SH), amino, hidroxilo, carboxi, el grupo hidroxilo anomérico de un carbohidrato, y carboxilo. En algunas realizaciones, un grupo funcional de una unidad de ligando es un grupo sulfhidrilo. El grupo sulfhidrilo es típicamente un grupo sulfhidrilo accesible para el disolvente, tal como un grupo sulfhidrilo accesible para el disolvente de un residuo de cisteína. Los grupos sulfhidrilo pueden generarse por reducción de un enlace disulfuro intramolecular o intermolecular de un ligando. Los grupos sulfhidrilo también pueden generarse por reacción de un grupo amino de un resto de lisina de un ligando usando 2-iminotiolano (reactivo de Traut) u otro reactivo que genera sulfhidrilo.

En algunas realizaciones, uno o más grupos sulfhidrilo se preparan por ingeniería en una unidad de ligando, tal como por sustitución de aminoácidos. Por ejemplo, un grupo sulfhidrilo puede introducirse en una unidad de ligando. En algunas realizaciones, un grupo sulfhidrilo se introduce por una sustitución de aminoácidos de serina o treonina a un residuo de cisteína, y/o por la adición de un residuo de cisteína en una unidad de ligando (un residuo de cisteína preparado por ingeniería). En algunas realizaciones, el residuo de cisteína es un residuo de cisteína interno, es decir, no localizado en el extremo N o extremo C del resto de ligando.

En una realización ejemplar, un residuo de cisteína puede prepararse por ingeniería en una región variable de cadena pesada o ligera de anticuerpo (por ejemplo, de un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento divalente) por sustitución de aminoácidos. La sustitución de aminoácidos se introduce típicamente en la región marco y está localizada distal de la cara de unión a epítopo de la región variable. Por ejemplo, la sustitución de aminoácidos puede estar al menos 10 angstroms, al menos 20 angstroms o al menos 25 angstroms desde la cara de unión a epítopo o las CDR. Las posiciones adecuadas para la sustitución de un residuo de cisteína pueden determinarse sobre la base de las estructuras tridimensionales conocidas o predichas de las regiones variables de anticuerpo. (Véase generalmente Holliger y Hudson, 2005, *Nature Biotechnology* 23(9): 1126-1136.) En realizaciones ejemplares, se introduce una sustitución de aminoácido serina a cisteína en la posición de aminoácido 84 de la región V<sub>H</sub> y/o la posición 14 de la región V<sub>L</sub> (según el sistema de numeración de Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a edición, (Bethesda, MD, NIH) 1991).

Para controlar el número de fármaco o unidad de conector-unidades de fármaco unidas a una unidad de ligando, pueden eliminarse uno o más residuos de cisteína por sustitución de aminoácidos. Por ejemplo, el número de residuos de cisteína accesibles para el disolvente en una región bisagra de inmunoglobulina puede reducirse por sustitución de aminoácido de residuos de cisteína a serina.

En algunas realizaciones, una unidad de ligando contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 residuos de cisteína accesibles para el disolvente. En algunas realizaciones, una unidad de ligando contiene 2 ó 4 residuos de cisteína accesibles para el disolvente.

#### **Composiciones y métodos de administración**

Los compuestos de conjugado ligando-fármaco pueden estar en cualquier forma que permita que el compuesto se administre a un paciente para el tratamiento de un trastorno asociado a CD19. Se conocen y pueden usarse varios sistemas de administración para administrar los compuestos de conjugado ligando-fármaco. Los métodos de introducción incluyen, pero no están limitados a, rutas intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, y subcutánea. La administración puede ser, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo. En determinadas realizaciones preferidas, la administración tanto del agente quimioterapéutico como del compuesto de conjugado anticuerpo-fármaco es por infusión. La administración parenteral es la ruta preferida de administración.

Los compuestos de conjugado ligando-fármaco pueden administrarse como composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más ingredientes farmacéuticamente compatibles. Por ejemplo, la composición farmacéutica incluye típicamente uno o más vehículos farmacéuticos (por ejemplo, líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo aquellos de origen en petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuate, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y semejantes). El agua es el vehículo más típico cuando la composición farmacéutica se administra intravenosamente. Las soluciones salinas y soluciones de dextrosa acuosa y glicerol también pueden emplearse como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados son conocidos en la técnica. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponadores del pH. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin. Las formulaciones corresponden al modo de administración.

En realizaciones típicas, la composición farmacéutica se formula según procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando es necesario, el producto farmacéutico también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lignocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran bien separadamente o mezclados entre sí en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo seco liofilizado o concentrado sin agua en un contenedor sellado herméticamente tal como una ampolla o sobre indicando la cantidad de agente activo. Cuando el producto farmacéutico es para administrarse por infusión, puede dispensarse, por ejemplo, con una botella de infusión que contiene agua o solución salina estéril de grado farmacéutico. Cuando el producto farmacéutico es para administrarse por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua o solución salina estéril para inyección, por ejemplo, de manera que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

La cantidad del compuesto que es efectiva en el tratamiento de un trastorno o afección particular dependerá de la naturaleza del trastorno o afección, y puede determinarse por técnicas clínicas estándar. Además, pueden emplearse opcionalmente ensayos *in vitro* o *in vivo* para ayudar a identificar los intervalos óptimos de dosificación. La dosis precisa que se va a emplear en las composiciones también dependerá de la ruta de administración, y la gravedad de la enfermedad o trastorno, y debería decidirse según el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente.

Las composiciones comprenden una cantidad efectiva de un compuesto de manera que se obtendrá una dosificación adecuada. Típicamente, esta cantidad es al menos aproximadamente 0,01% de un compuesto en peso de la composición.

Para la administración intravenosa, la composición puede comprender de aproximadamente 0,01 a aproximadamente

100 mg de un compuesto por kg del peso corporal del animal. En un aspecto, la composición puede incluir de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg de un compuesto por kg del peso corporal del animal. En otro aspecto, la cantidad administrada estará en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal de un compuesto.

- 5 Generalmente, la dosificación de un compuesto administrada a un paciente es típicamente aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg del peso corporal del sujeto. En algunas realizaciones, la dosificación administrada a un paciente está entre aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg del peso corporal del sujeto. En algunas realizaciones, la dosificación administrada a un paciente está entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 15 mg/kg del peso corporal del sujeto. En algunas realizaciones, la dosificación administrada a un paciente está entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg del peso corporal del sujeto. En algunas realizaciones, la dosificación administrada está entre aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg o aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg del peso corporal del sujeto. En algunas realizaciones, la dosificación administrada está entre aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg del peso corporal del sujeto. En algunas realizaciones, la dosificación administrada está entre aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg del peso corporal del sujeto. En algunas realizaciones, la dosificación administrada está entre aproximadamente 0,1 a 4 mg/kg, 0,1 a 3,2 mg/kg, ó 0,1 a 2,7 mg/kg del peso corporal del sujeto durante un ciclo de tratamiento. En algunas realizaciones, la dosificación administrada está entre aproximadamente 0,5 a 4 mg/kg, incluso más preferiblemente 0,5 a 3,2 mg/kg, o incluso más preferiblemente 0,5 a 2,7 mg/kg del peso corporal del sujeto durante un ciclo de tratamiento.
- 10
- 15
- 20 Las composiciones farmacéuticas se formulan generalmente como estériles, sustancialmente isotónicas y en pleno cumplimiento con las regulaciones de Buena Práctica de Fabricación (GMP) de la Administración de Alimentos y Fármacos de los EEUU.

#### **Enfermedad autoinmune**

- 25 Los compuestos de conjugado ligando-fármaco pueden ser útiles para tratar o prevenir un trastorno inmunológico. El tratamiento o prevención del trastorno inmunológico, según los métodos descritos en la presente memoria, puede conseguirse mediante la administración a un sujeto que necesita dicho tratamiento o prevención, de una cantidad efectiva del compuesto de conjugado ligando-fármaco. En algunas realizaciones preferidas, el conjugado ligando-fármaco (i) se unirá a células inmunes activadas que expresan CD19 y que están asociadas con el estado de enfermedad y (ii) ejercerá un efecto citotóxico, citostático, o inmunomodulador en las células inmunes activadas.
- 30 Las enfermedades inmunológicas que se caracterizan por la activación inapropiada de células inmunes y que pueden tratarse o prevenirse por los métodos descritos en la presente memoria pueden clasificarse, por ejemplo, por el tipo o tipos de reacción o reacciones de hipersensibilidad que subyacen al trastorno. Estas reacciones pueden clasificarse típicamente en cuatro tipos: reacciones anafilácticas, reacciones citotóxicas (citolíticas), reacciones del complejo inmune, o reacciones de inmunidad mediada por células (CMI) (también referidas como reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH)). (Véase, por ejemplo, *Fundamental Immunology*, William E. Paul ed., Raven Press, N.Y., 3a ed. 1993.)
- 35

- 40 Los ejemplos específicos de dichas enfermedades inmunológicas incluyen, pero no están limitados a, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, oftalmopatía endocrina, uveoretinitis, lupus eritematoso sistémico, miastenia grave, enfermedad de Grave, glomerulonefritis, trastorno hepatológico autoinmune, enfermedad inflamatoria del intestino autoinmune, anafilaxis, reacción alérgica, síndrome de Sjogren, diabetes mellitus de inicio juvenil (Tipo I), cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener, fibromialgia, enfermedad inflamatoria del intestino, polimiositis, dermatomiositis, fallo endocrino múltiple, síndrome de Schmidt, uveitis autoinmune, enfermedad de Addison, adenitis, tiroiditis, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad tiroidea autoinmune, anemia perniciosa, atrofia gástrica, hepatitis crónica, hepatitis lupoide, aterosclerosis, demencia presenil, enfermedades desmielinizantes, lupus eritematoso cutáneo subagudo, hipoparatiroidismo, síndrome de Dressler, trombocitopenia autoinmune, púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica, pénfigo vulgar, pénfigo, dermatitis herpetiforme, alopecia arcata, penfigoide, escleroderma, esclerosis sistémica progresiva, síndrome de CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud, dismobilidad esofágica, esclerodactilidad, y telangiectasia), diabetes mellitus de inicio adulto (diabetes Tipo II), infertilidad autoinmune masculina y femenina, espondolitis anquilosante, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedad de tejido conectivo mixto, poliarteritis nedosa, vasculitis necrotizante sistémica, artritis reumatoide de inicio juvenil, dermatitis atópica, rinitis atópica, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Chagas, sarcoidosis, fiebre reumática, asma, aborto recurrente, síndrome anti-fosfolípido, pulmón de granjero, eritema multiforme, síndrome de post cardiotomía, síndrome de Cushing, hepatitis activa crónica autoinmune, pulmón de cuidador de aves, encefalomielitis alérgica, necrolisis epidémica tóxica, síndrome de Alport, alveolitis, alveolitis alérgica, alveolitis fibrosante, enfermedad pulmonar intersticial, eritema nodoso, pioderma gangrenoso, reacción de transfusión, lepra, malaria, leishmaniasis, tripanosomiasis, arteritis de Takayasu, polimialgia reumática, arteritis temporal, esquistosomiasis, arteritis de células gigantes, ascariasis, aspergillosis, síndrome de Sampter, ecema, granulomatosis linfomatoides, enfermedad de Behcet, síndrome de Caplan, enfermedad de Kawasaki, dengue, encefalomielitis, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, endoftalmatitis, eritema elevatum et diutinum, psoriasis, eritroblastosis fetal, faciitis eosinofílica, síndrome de Shulman, síndrome de Felty, filariasis, ciclitis, ciclitis crónica, ciclitis heterocrónica, ciclitis de Fuch, nefropatía de IgA, púrpura de Henoch-Schonlein, enfermedad de injerto frente a
- 45
- 50
- 55
- 60

5 huésped, rechazo de trasplante, infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, infección por echovirus, cardiomielitis, enfermedad de Alzheimer, infección por parvovirus, infección por virus de la rubéola, síndromes post vacunación, infección por virus de la rubéola congénita, síndrome de Eaton-Lambert, policondritis recidivante, crioglobulinemia, macroglobulemia de Waldenstrom, infección por el virus de Epstein-Barr, paperas, síndrome de Evan, y fallo gonadal autoinmune.

10 De acuerdo con esto, los métodos descritos en la presente memoria engloban el tratamiento de trastornos de linfocitos B (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Goodpasture, artritis reumatoide, y diabetes tipo I), linfocitos Th<sub>1</sub> (por ejemplo, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis, síndrome de Sjögren, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Grave, cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener, tuberculosis, o enfermedad de injerto frente a huésped), o linfocitos Th<sub>2</sub> (por ejemplo, dermatitis atópica, lupus eritematoso sistémico, asma atópico, rinoconjuntivitis, rinitis alérgica, o enfermedad de injerto frente a huésped crónica). Generalmente, los trastornos que implican células dendríticas implican trastornos de linfocitos Th<sub>1</sub> o linfocitos Th<sub>2</sub>.

15 La presente descripción incluye el tratamiento de una enfermedad autoinmune, por ejemplo una enfermedad autoinmune que está mediada al menos en parte por células B. Los ejemplos de enfermedades autoinmunes incluyen leucoencefalitis hemorrágica necrotizante; enfermedad de Addison; agammaglobulinemia; asma alérgico; rinitis alérgica; alopecia areata; amiloidosis; espondilitis anquilosante; nefritis anti-GBM/Anti-TBM; síndrome antifosfolípido; anemia aplásica autoinmune; disautonomía autoinmune; hepatitis autoinmune; hiperlipidemia autoinmune; inmunodeficiencia autoinmune; enfermedad del oído interno autoinmune; miocarditis autoinmune; púrpura trombocitopénica autoinmune; neuropatías axonal y neuronal; enfermedad de Balo; enfermedad de Behcet; pénfigo ampolloso; cardiomiopatía; enfermedad de Castleman; celiaquía (no tropical); enfermedad de Chagas; síndrome de fatiga crónica; polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica; síndrome de Churg-Strauss; pénfigo cicatricial/pénfigoide mucosal benigno; enfermedad de Crohn; síndrome de Cogans; enfermedad de aglutinina cold; bloqueo cardíaco congénito; miocarditis Coxsackie; enfermedad de CREST; crioglobulinemia mixta esencial; neuropatías desmielinizantes; dermatomiositis; enfermedad de Devic; lupus discoide; síndrome de Dressler; endometriosis; fascitis eosinofílica; eritema nodoso; encefalomielitis alérgica experimental; síndrome de Evans; fibromialgia; alveolitis fibrosante; arteritis de células gigantes (arteritis temporal); síndrome de Goodpasture; enfermedad de Graves; síndrome de Guillain-Barre; enfermedad de Hashimoto; anemia hemolítica; púrpura de Henoch-Schonlein; herpes gestationis; hipogammaglobulinemia; púrpura trombocitopénica idiopática; nefropatía de IgA; lipoproteínas inmunoreguladoras; miositis por cuerpos de inclusión; diabetes dependiente de insulina (tipo I); cistitis intersticial; artritis juvenil; diabetes juvenil; síndrome de Kawasaki; síndrome de Lambert-Eaton; vasculitis leucocitoclástica; liquen plano; liquen escleroso; conjuntivitis lignosa; enfermedad de IgA lineal (LAD); lupus (SLE); enfermedad de Lyme; enfermedad de Meniere; poliangiitis microscópica; enfermedad de tejido conectivo mixto; úlcera de Mooren, enfermedad de Mucha-Habermann; esclerosis múltiple; miastenia grave; miositis; narcolepsia; neutropenia; pénfigo cicatricial ocular; osteoartritis; reumatismo palindrómico; degeneración cerebelar; 20 paraneoplásica; hemoglobinuria nocturna paroximal; síndrome de Parsonnage-Turner; Pars planitis (uveitis periférica); pénfigo; neuropatía periférica; encefalomielitis perivenosa; anemia perniciosa; síndrome de POEMS; poliarteritis nodosa; síndromes poliglandulares autoinmunes tipo I, II, y III; polimialgia reumática; polimiositis; síndrome de infarto postmiocárdico; síndrome postpericardiotomía; dermatitis por progesterona; cirrosis biliar primaria; psoriasis; artritis psoriásica; fibrosis pulmonar idiopática; pioderma gangrenoso; aplasia de células rojas pura; fenómeno de Raynauds; distrofia de reflejo simpático; síndrome de Reiter; policondritis recidivante; síndrome de las piernas inquietas; fiebre reumática; artritis reumatoide; sarcoidosis; síndrome de Schmidt; escleritis; escleroderma; síndrome de Sjögren; autoinmunidad de esperma y testicular; síndrome de la persona rígida; endocarditis bacteriana subaguda; oftalmia simpática; arteritis de Takayasu; artritis temporal/arteritis de células gigantes; púrpura trombocitopénica; enfermedad tiroidea autoinmune; síndrome de Tolosa-Hunt; mielitis transversal y mielopatía necrotizante; colitis ulcerosa; enfermedad de tejido conectivo no diferenciado; uveitis; vasculitis; dermatosis vesiculoampollosa; vitíligo; y granulomatosis de Wegener. Las enfermedades autoinmunes más comunes que son especialmente interesantes incluyen (a) enfermedades del tejido conectivo tales como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, esclerosis sistémica (escleroderma), síndrome de Sjögren, (b) enfermedades neuromusculares tales como esclerosis múltiple, miastenia grave, síndrome de Guillain-Barre, (c) enfermedades endocrinas tales como tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Grave, diabetes dependiente de insulina (tipo 1), y (d) enfermedades gastrointestinales tales como enfermedad inflamatoria del intestino (incluyendo enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), y (e) otras enfermedades tales como síndromes de vasculitis, enfermedades autoinmunes hematológicas, y enfermedades de la piel autoinmunes.

55 La enfermedad autoinmune por ejemplo incluye la presencia de autoanticuerpos. El autoanticuerpo puede unirse específicamente a dianas o antígenos del huésped, por ejemplo, factor reumatoide (por ejemplo, en artritis reumatoide); topoisomerasa (por ejemplo, en escleroderma); proteína básica de mielina (por ejemplo, en esclerosis múltiple); proteína del basamento de membrana colágeno tipo iv (por ejemplo, en el síndrome de Goodpasture); gangliósido (por ejemplo en el síndrome de Guillain-Barré); plaquetas (por ejemplo en trombocitopenia idiopática crónica); actina de músculo liso (por ejemplo en hepatitis autoinmune); antígeno 1 y 2 de pénfigo ampolloso; también denominados antígenos de hemidesmosoma (por ejemplo en pénfigo ampolloso); transglutaminasa (por ejemplo en la enfermedad celíaca); desmogleína 3 (por ejemplo en pénfigo vulgar); antígenos p62 o sp100 o mitocondriales (m2) (por ejemplo en cirrosis biliar primaria); c-ANCA citoplasmico de neutrófilos (por ejemplo en granulomatosis de Wegener); p-ANCA perinuclear de neutrófilos (por ejemplo poliarteritis nodosa, poliangitis microscópica, síndrome de

Churg-Strauss, vasculitis sistémicas (no específicas)); ADN de doble cadena (por ejemplo en lupus eritematoso sistémico); complejo de exosoma (por ejemplo en escleromiositis); antígeno Ro o La (por ejemplo en lupus eritematoso sistémico y bloqueo cardiaco neonatal, o síndrome de Sjogren primario); antígeno de Smith (por ejemplo en lupus eritematoso sistémico); antígeno de fosfolípido (por ejemplo en síndrome antifosfolípido); antígeno SSA o SSB (por ejemplo en síndrome de Sjogren); centrómero (por ejemplo en síndrome de CREST; mitocondrias (por ejemplo en cirrosis biliar primaria); receptor nicotínico de acetilcolina (por ejemplo en miastenia grave); canal de calcio regulado por voltaje (por ejemplo en síndrome de Lambert-Eaton); peroxidasa tiroidea (por ejemplo en tiroiditis de Hashimoto); receptor de TSH (por ejemplo en enfermedad de Graves); antígeno Hu (por ejemplo en síndrome cerebelar paraneoplásico); canal de potasio regulado por voltaje (por ejemplo en encefalitis límbica y receptor de N-metil-D-aspartato (por ejemplo en encefalitis). Más de un tipo de autoanticuerpo puede estar asociado con un trastorno inmunológico o viceversa, y esta lista no es exhaustiva. Por ejemplo, se han identificado autoantígenos en artritis reumatoide que incluyen proteínas asociadas a las articulaciones tales como colágeno tipo II, glicoproteína de condrocitos humanos 39, y proteoglicanos; así como proteínas de choque térmico, filgarina citrulinada, inmunoglobulina, glucosa-6-fosfato isomerasa, p205, y BiP.

El compuesto de conjugado ligando-fármaco de la invención puede administrarse en una cantidad efectiva para mitigar al menos un síntoma del trastorno autoinmune. La invención proporciona tratamiento de una enfermedad autoinmune, incluyendo enfermedades autoinmunes que son refractarias a terapia convencional con al menos un compuesto de conjugado ligando-fármaco de la presente invención. El compuesto de conjugado ligando-fármaco se administra opcionalmente en combinación con otra terapia, por ejemplo, cirugía, terapia con fármacos anti-inflamatorios, terapia de reemplazo con hormonas/enzimas, plasmaférésis y terapia inmunosupresora. Las terapias con fármacos anti-inflamatorios incluyen esteroides, por ejemplo, corticosteroides tales como prednisona; así como NSAID tales como salicilatos y otros inhibidores de COX. La terapia de reemplazo hormonal incluye reemplazo con hormona tiroidea (por ejemplo, en la tiroiditis de Hashimoto). Los fármacos inmunosupresores incluyen glucocorticoides, agentes alquilantes (por ejemplo, ciclofosfamida, efectiva frecuentemente en SLE), y antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, azatioprina y mercaptoperúna). Otras terapias incluyen terapia con fármacos antitiroides o eliminación de la glándula tiroidea quirúrgicamente o por radioyodo (por ejemplo, en la enfermedad de Grave).

En algunas realizaciones, el compuesto de conjugado ligando-fármaco de la invención deplecionará las células B.

### Cáncer

El compuesto de conjugado ligando-fármaco de la invención es útil para tratar o prevenir un cáncer que expresa CD19. El tratamiento o prevención de un cáncer que expresa CD19, según los métodos descritos en la presente memoria, puede conseguirse mediante la administración a un sujeto que necesita dicho tratamiento o prevención, de una cantidad efectiva del compuesto de conjugado ligando-fármaco de la invención. En algunas realizaciones exemplares, un conjugado ligando-fármaco de la presente invención (i) se unirá a células cancerosas que expresan CD19 y (ii) ejercerá un efecto citotóxico o citostático para, por ejemplo, inhibir la proliferación de las células cancerosas que expresan CD19, o matar las células cancerosas que expresan CD19.

Los cánceres que pueden tratarse o prevenirse por los métodos descritos en la presente memoria incluyen, por ejemplo, malignidades de las células B, incluyendo, por ejemplo, leucemias y linfomas, incluyendo, pero no limitado a, linfoma de no de Hodgkin de subtipo célula B (NHL) incluyendo NHL de grado bajo/folicular, NHL linfocítico pequeño (SL), NHL de grado intermedio/folicular, NHL difuso de grado intermedio, linfoma de células B grandes difuso, linfoma folicular, NHL inmunoblástico de grado alto, NHL inmunoblastico de grado alto, NHL de células no escindidas pequeñas de grado alto, linfoma de células del manto, y enfermedad voluminosa NHL; Linfoma de Burkitt; mieloma múltiple; leucemia linfoblástica aguda pre-B y otras malignidades que derivan de los precursores tempranos de las células B; leucemia linfoblástica aguda común; leucemia linfocítica crónica; leucemia de células pilosas; leucemia linfoblástica aguda null; macroglobulinemia de Waldenstrom; y leucemia pro-linfocítica; linfoma de células B grandes difuso, leucemia pro-linfocítica, enfermedad de cadena ligera; plasmacitoma; mieloma osteoesclerótico; leucemia de células plasmáticas; gammopatía monoclonal de significancia indeterminada (MGUS); mieloma múltiple quiescente (SMM); mieloma múltiple indolente (IMM); o linfoma de Hodgkin, siempre que los cánceres expresen el antígeno CD19.

En aplicaciones terapéuticas, al menos un conjugado ligando-fármaco puede administrarse a un paciente que se sospecha que padece, o ya se sabe que padece, un trastorno asociado a CD19, por ejemplo, un cáncer. El agente, por ejemplo, se administra en una cantidad efectiva para suprimir, o al menos disminuir, al menos un síntoma del trastorno.

En aplicaciones profilácticas de tratamiento, al menos un agente puede administrarse a un paciente en riesgo de desarrollar o padecer una recidiva de un trastorno asociado a CD19. El paciente es, por ejemplo, un paciente en remisión aparente de un trastorno asociado a CD19, para el que hay una posibilidad de recidiva, o un paciente que presenta un riesgo aumentado de un incremento en al menos un síntoma de un trastorno asociado a CD19 respecto a la población general. Los pacientes que se sabe que presentan un alto riesgo de un trastorno asociado a CD19 o su recidiva incluyen, por ejemplo, pacientes diagnosticados con una forma agresiva del trastorno, o con anomalías genéticas o histológicas asociadas con el trastorno o su estadaje (por ejemplo, malignidad), o con un factor de riesgo asociado (por ejemplo, historial familiar u otro trastorno asociado a CD19 o infección por EBV), o

pacientes que han experimentado un trasplante de células madre. En algunas realizaciones, un compuesto de conjugado ligando-fármaco de la presente invención se administrará como una terapia de mantenimiento a un paciente que ha experimentado un trasplante de células madre para el tratamiento de un cáncer que expresa CD19.

5 El agente puede administrarse antes de un inicio sospechado o incremento o exacerbación o recidiva del trastorno, en una cantidad efectiva para eliminar, o reducir, el riesgo de, o retardar el inicio o recidiva del trastorno.

Los compuestos de conjugado ligando-fármaco son útiles para tratar cáncer y otras enfermedades en las que se expresa o sobreexpresa CD19, respecto a normal (por ejemplo, tejido no canceroso). Los conjugados ligando-fármaco también pueden usarse para tratar trastornos asociados a CD19 en los que CD19 no se sobreexpresa respecto a normal. Por ejemplo, el trastorno puede incluir un recuento incrementado de células B positivas para CD19. En algunas realizaciones, los compuestos de conjugado ligando-fármaco se administran como una monoterapia. En otras realizaciones, los compuestos de conjugado ligando-fármaco se co-administran con otro agente terapéutico, o se administran secuencialmente con otro agente terapéutico. En algunas realizaciones, los compuestos de conjugado ligando-fármaco se co-administran con quimioterapéuticos, incluyendo quimioterapéuticos de cuidado estándar, o se administran secuencialmente.

15 La respuesta del paciente puede monitorizarse determinando el efecto del agente en un trastorno asociado a CD19.

#### **Terapia multi-fármaco para el cáncer**

Los métodos para tratar cáncer descritos en la presente memoria incluyen la administración a un paciente que lo necesita de una cantidad efectiva de un compuesto de conjugado ligando-fármaco de la invención.

20 En algunas realizaciones, el otro agente terapéutico será un agente que es cuidado estándar para la enfermedad específica que se va a tratar, o es parte de un régimen de rescate para la enfermedad específica que se va a tratar. Los agentes anti-cáncerosos y regímenes quimioterapéuticos incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-cáncer, incluyendo, por ejemplo anticuerpos anti-CD52 (por ejemplo, Alemtuzumab), anticuerpos anti-CD20 (por ejemplo, Rituximab), y anticuerpos anti-CD40 (por ejemplo, SGN40); regímenes quimioterapéuticos incluyendo, por ejemplo, CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisona); CVP (ciclofosfamida, vincristina, y prednisona); RCV (Rituximab + CVP); RCHOP (Rituximab + CHOP); RICE (Rituximab + ifosamida, carboplatino, etopósido); RDHAP, (Rituximab + dexametasona, citarabina, cisplatino); RESHAP (Rituximab + etopósido, metilprednisolona, citarabina, cisplatino); gemcitabina; tratamiento de combinación con vincristina, prednisona, y antraciclina, con o sin asparaginasa; tratamiento de combinación con daunorrubicina, vincristina, prednisona, y asparaginasa; tratamiento de combinación con tenipósido y Ara-C (citarabina); tratamiento de combinación con metotrexato y leucovorina; tratamiento de combinación con bleomicina, doxorubicina, etopósido, mecloretamina, prednisona, vinblastina, y vincristina; inhibidores que son moléculas pequeñas; e inhibidores de proteosoma incluyendo, por ejemplo, bortezomib.

35 En la presente memoria se describen métodos para tratar linfomas usando el conjugado ligando-fármaco descrito como una monoterapia o en terapia de combinación con, por ejemplo, anticuerpos anti-linfoma, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-CD20, es decir, Rituximab, y/o anticuerpos anti-CD40, es decir, SGN-40.

En la presente memoria se describen métodos para tratar linfomas usando el conjugado ligando-fármaco descrito como una monoterapia o en terapia de combinación con, por ejemplo, regímenes quimioterapéuticos para el tratamiento de linfomas incluyendo, por ejemplo, CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisona), CVP (ciclofosfamida, vincristina, y prednisona) y/o otros regímenes quimioterapéuticos de B con antraciclina.

40 En la presente memoria se describen métodos para tratar linfomas indolentes usando el conjugado ligando-fármaco descrito como una monoterapia o en terapia de combinación con, por ejemplo, RCV (Rituximab + CVP) y/o RCHOP (Rituximab + CHOP).

45 En la presente memoria se describen métodos para tratar sujetos que padecen linfoma recidivante o refractario usando el conjugado ligando-fármaco descrito como una monoterapia o en terapia de combinación con, por ejemplo, RICE (Rituximab + ifosamida, carboplatino, etopósido), RDHAP, (Rituximab + dexametasona, citarabina, cisplatino), RESHAP (Rituximab + etopósido, metilprednisolona, citarabina, cisplatino), gemcitabina y/o fármacos inmunomoduladores, es decir, lenalidomida.

50 En la presente memoria se describen métodos para tratar a un sujeto que tiene enfermedad recidivante o que es refractaria a tratamiento con Rituximab u otra terapia para el tratamiento de cáncer, por ejemplo, CHOP, CVP, CHOP, RICE, RDHAP, RCHOP, RCV, RESHAP. En un aspecto, los métodos incluyen, por ejemplo, administrar un conjugado ligando-fármaco de la presente invención al sujeto. En determinadas realizaciones, el conjugado ligando-fármaco comprende un anticuerpo conjugado con un compuesto auristatina.

55 En la presente memoria se describen métodos para tratar a un sujeto que tiene un cáncer caracterizado por el nivel de expresión de CD21. El cáncer puede no tener, tener bajos niveles, o altos niveles de expresión de CD21. En un aspecto, los métodos incluyen, por ejemplo, administrar un conjugado ligando-fármaco de la presente invención al sujeto. En determinadas realizaciones, el conjugado ligando-fármaco comprende un anticuerpo conjugado con un

compuesto auristatina.

En la presente memoria se describen métodos para tratar ALL usando el conjugado ligando-fármaco descrito como una monoterapia o en terapia de combinación con, por ejemplo, un régimen quimioterapéutico que incluye la combinación de vincristina, prednisona, y antraciclina, con o sin asparaginasa. Los regímenes quimioterapéuticos alternativos incluyen, por ejemplo, combinaciones de daunorubicina, vincristina, prednisona, y asparaginasa; combinaciones de tenipósido y ara-C (citarabina); combinaciones de metotrexato y leucovorina; combinaciones de bleomicina, doxorrubícina, etopósido, mecloretamina, prednisona, vinblastina y vincristina ("Régimen Stanford 5").

5 En algunas realizaciones, los métodos para tratar cáncer incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad efectiva de un compuesto de conjugado ligando-fármaco en combinación con tratamiento con radiación, y  
10 opcionalmente otro agente terapéutico

15 En algunas realizaciones, el compuesto de conjugado ligando-fármaco se administra concurrentemente o secuencialmente con un agente anti-cánceroso (por ejemplo, un agente quimioterapéutico) y/o con terapia con radiación. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico o terapia con radiación se administra al menos una hora, cinco horas, 12 horas, un día, una semana, un mes, varios meses (por ejemplo, hasta tres meses), antes o posteriormente a la administración de un compuesto de la presente invención.

20 Cuando un compuesto descrito en la presente memoria y el o los fármacos quimioterapéuticos se administran separadamente, el número de dosificaciones de cada compuesto proporcionadas al día, puede no ser necesariamente el mismo, por ejemplo, en el que un compuesto puede tener una duración mayor de la actividad, y por lo tanto, se administrará menos frecuentemente. El compuesto de la presente invención y el agente anti-cánceroso adicional, pueden administrarse a través de la misma ruta o de rutas diferentes de administración. Pueden administrarse según regímenes simultáneos o alternantes, al mismo o diferentes tiempos durante el curso de la terapia, concurrentemente en formas divididas o únicas. La administración de uno o ambos agentes puede ser en una base continua, por ejemplo, por infusión o mediante un reservorio implantado.

25 En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico que se va a administrar en combinación con los compuestos de la presente invención, es uno con cuyo tratamiento no se ha encontrado que el cáncer sea refractario. En otra realización, el agente quimioterapéutico es uno con cuyo tratamiento se ha encontrado que el cáncer es refractario.

30 En algunas realizaciones, los métodos de tratamiento de cáncer con un compuesto de la presente invención se proporcionan como una alternativa a la quimioterapia o terapia con radiación en el que la quimioterapia o terapia con radiación se ha demostrado o puede demostrarse que es demasiado tóxica, por ejemplo, resulta en efectos secundarios inaceptables o insoportables, para el sujeto que se está tratando.

Los compuestos descritos en la presente memoria también pueden usarse de una manera *in vitro* o *ex vivo*, tal como para el tratamiento de determinados cánceres.

35 En la presente memoria también se describen kits que comprenden un conjugado ligando-fármaco de la invención, e instrucciones de uso. El kit puede contener además al menos un reactivo adicional. Los kits incluyen típicamente una etiqueta que indica el uso pretendido de los contenidos del kit. El término etiqueta incluye cualquier material escrito, o grabado suministrado en o con el kit, o que acompaña de otra manera al kit.

La invención se describirá adicionalmente con referencia a los ejemplos siguientes; sin embargo, debe entenderse que la invención no está limitada a dichos ejemplos.

40 Los ejemplos siguientes de aspectos específicos para llevar a cabo la presente invención se ofrecen sólo para propósitos ilustrativos, y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención de ninguna manera.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

Diseño de la región variable de cadena pesada de BU12 humanizada:

45 BU12  $V_H$  se alineó con exones  $V_H$  de la línea germinal humana funcionales. La selección del exón  $V_H$  se hizo sobre la base de homología de marco y estructura canónica. Los exones  $V_H$  de línea germinal humana  $V_{H2}-70$  y  $V_{H4}-31$  se seleccionaron para proporcionar marcos para la humanización. El exón  $J_{H4}$  de línea germinal humana se seleccionó para proporcionar secuencia FR4 humanizada sobre la base de su identidad (85%) con FR4 de BU12  $V_H$ .

50 BU12  $V_H$  se alineó frente a las secuencias de línea germinal del exón  $V_H$  de ratón para identificar regiones de mutación somática que pueden tener implicaciones estructurales. Se encontró que BU12  $V_H$  tenía una alta homología con el exón  $V_H$  CB 17H-10 funcional con regiones marco potenciales de mutación somática en H75, H82A y H89.

BU12  $V_H$  se alineó frente al exón  $V_H$  de línea germinal humana seleccionado ( $V_{H2}-70$  o  $V_{H4}-31$ ) y se identificaron las diferencias entre BU12  $V_H$  y el marco humano en los residuos que están descritos en la bibliografía que afectan la estructura de CDR o interacciones  $V_H/V_L$ . Para el  $V_{H4}-31$  dichos cambios de residuos se encontraron en las

posiciones H24, H27, H29 y H71. Adicionalmente, se identificaron regiones marco no homólogas y la estructura de cristal del dominio V<sub>H</sub> homólogo (1ETZ) se usó para determinar las posiciones de los residuos no homólogos y para evaluar su impacto probable en la estructura de CDR.

Mutaciones humanizantes en variantes de cadena pesada:

Variante V <sub>H</sub>	Secuencia aceptora exón V <sub>H</sub>	Residuos marco donantes
<b>V<sub>H</sub>A</b>	<b>VH2-70</b>	<b>None</b>
<b>V<sub>H</sub>B</b>	<b>VH2-70</b>	<b>H75</b>
<b>V<sub>H</sub>C</b>	<b>VH2-70</b>	<b>H79</b>
<b>V<sub>H</sub>D</b>	<b>VH2-70</b>	<b>H81, H82, H82A, H82B, H82C</b>
<b>V<sub>H</sub>E</b>	<b>VH2-70</b>	<b>H89</b>
<b>V<sub>H</sub>F</b>	<b>VH4-31</b>	<b>Ninguno</b>
<b>V<sub>H</sub>G</b>	<b>VH4-31</b>	<b>H71</b>
<b>V<sub>H</sub>H</b>	<b>VH4-31</b>	<b>H24, H27, H29</b>
<b>V<sub>H</sub>I</b>	<b>VH4-31</b>	<b>H24, H27, H29, H71</b>
<b>V<sub>H</sub>J</b>	<b>VH4-31</b>	<b>H75</b>
<b>V<sub>H</sub>K</b>	<b>VH4-31</b>	<b>H78, H79</b>
<b>V<sub>H</sub>L</b>	<b>VH4-31</b>	<b>H89</b>

5

Residuos FR no homólogos BU12 V<sub>H</sub> frente a V<sub>H</sub>2-70

Posición	Cambio	Comentarios
H41	S → P	Región de bucle - excluir
H75	S → K	Possible mutación somática/ cambio de carga
H79	F → P	Aromático en el núcleo
H81	K → T	Núcleo (región continua)
H82	I → M	Núcleo (región continua)
H82A	A → T	Núcleo (región continua)
H82B	S → N	Núcleo (región continua)
H82C	V → M	Núcleo (región continua)
H84	T → P	Región de bucle - excluir
H89	A → T	Possible mutación somática

Mutaciones específicas en variantes de cadena pesada de BU12:

Variante	H75	H79	H81	H82	H82A	H82B	H82C	H89
<b>cBU12 VH</b>	<b>S*</b>	<b>F*</b>	<b>R*</b>	<b>I*</b>	<b>A*</b>	<b>S*</b>	<b>V*</b>	<b>A*</b>
<b>VH2-70</b>	<b>K</b>	<b>V</b>	<b>T</b>	<b>M</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>	<b>T</b>
<b>HA</b>	<b>K</b>	<b>V</b>	<b>T</b>	<b>M</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>	<b>T</b>
<b>HB</b>	<b>S*</b>	<b>V</b>	<b>T</b>	<b>M</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>	<b>T</b>
<b>HC</b>	<b>K</b>	<b>F*</b>	<b>T</b>	<b>M</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>	<b>T</b>
<b>HD</b>	<b>K</b>	<b>V</b>	<b>R*</b>	<b>I*</b>	<b>A*</b>	<b>S*</b>	<b>V*</b>	<b>T</b>
<b>HE</b>	<b>K</b>	<b>V</b>	<b>T</b>	<b>M</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>	<b>A*</b>

10 \*Residuos de ratón

Residuos FR no homólogos BU12 VH frente a VH4-31

Posición	Cambio	Comentarios
H3	T → Q	Superficie accesible distante de CDR - excluir
H24	F → V	Afecta la estructura de CDR1
H27	F → G	Afecta la estructura de CDR1
H29	L → I	Afecta la estructura de CDR1
H41	S → P	Región de bucle - excluir
H71	K → V	Afecta la estructura de CDR2
H75	S → K	Possible mutación somática/ cambio de carga
H78	V → F	Aromático en el núcleo
H79	F → P	Aromático en el núcleo
H83	D → T	Región de bucle - excluir
H89	A → V	Possible mutación somática

Mutaciones específicas en variantes de cadena pesada de BU12:

Variante	H24	H27	H29	H71	H75	H78	H79	H89
<b>CBU12 VH*</b>	<b>F*</b>	<b>F*</b>	<b>L*</b>	<b>K*</b>	<b>S*</b>	<b>V*</b>	<b>F*</b>	<b>A*</b>
<b>VH4-31</b>	<b>V</b>	<b>G</b>	<b>I</b>	<b>V</b>	<b>K</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>V</b>
<b>HF</b>	<b>V</b>	<b>G</b>	<b>I</b>	<b>V</b>	<b>K</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>V</b>
<b>HG</b>	<b>V</b>	<b>G</b>	<b>I</b>	<b>K*</b>	<b>K</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>V</b>
<b>HH</b>	<b>F*</b>	<b>F*</b>	<b>L*</b>	<b>V</b>	<b>K</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>V</b>
<b>HI</b>	<b>F*</b>	<b>F*</b>	<b>L*</b>	<b>K*</b>	<b>K</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>V</b>
<b>HJ</b>	<b>V</b>	<b>G</b>	<b>I</b>	<b>V</b>	<b>S*</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>V</b>
<b>HK</b>	<b>V</b>	<b>G</b>	<b>I</b>	<b>V</b>	<b>K</b>	<b>V*</b>	<b>F*</b>	<b>V</b>
<b>HL</b>	<b>V</b>	<b>G</b>	<b>I</b>	<b>V</b>	<b>K</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>A*</b>

5 \*Residuos de ratón

### Ejemplo 2

Diseño de la región variable de cadena ligera de BU12 humanizada:

BU12  $V_L$  se alineó con exones  $V_H$  de la línea germinal humana funcionales. El uso de L6 es alto (~11%) de manera que se eligió como el mejor marco para la humanización de BU12  $V_L$ . También se eligió A10, con la mejor homología con BU12  $V_L$ . El exón  $J_{k2}$  de línea germinal humana se seleccionó para proporcionar secuencia FR4 humanizada sobre la base de su identidad (77%) con FR4 de BU12  $V_L$ .

BU12  $V_L$  se alineó frente a las secuencias de línea germinal del exón  $V_L$  de ratón para identificar regiones de mutación somática que pueden tener implicaciones estructurales. Las concordancias más cercanas fueron ac4, kn4 y kk4. Los sitios potenciales de mutación somática se identificaron en las posiciones L40, L41, L42, L69, L71, L72 y L83.

BU12  $V_L$  se alineó frente a la línea germinal humana y exón  $V_L$  seleccionado (L6 o A10) y se identificaron las diferencias entre BU12  $V_L$  y el marco humano en los residuos que están descritos en la bibliografía que afectan la estructura de CDR o interacciones  $V_H/V_L$ . Dichas diferencias de residuos ocurren en las posiciones L2 y L71. Adicionalmente, se identificaron regiones marco no homólogas y la estructura de cristal del dominio  $V_L$  homólogo (1QOK) se usó para determinar las posiciones de los residuos no homólogos y para evaluar su impacto probable en la estructura de CDR.

Mutaciones humanizantes en variantes de cadena ligera:

Variante <b>V<sub>L</sub></b>	Secuencia aceptora exón <b>V<sub>H</sub></b>	Residuos marco donantes
<b>V<sub>L</sub>A</b>	<b>VL-L6</b>	Ninguno
<b>V<sub>L</sub>B</b>	<b>VL-L6</b>	<b>L2</b>
<b>V<sub>L</sub>C</b>	<b>VL-L6</b>	<b>L71</b>
<b>V<sub>L</sub>D</b>	<b>VL-L6</b>	<b>L2, L71</b>
<b>V<sub>L</sub>E</b>	<b>VL-L6</b>	<b>L40, L41, L42</b>
<b>V<sub>L</sub>F</b>	<b>VL-L6</b>	<b>L69, L70, L71, L72</b>
<b>V<sub>L</sub>G</b>	<b>VL-L6</b>	<b>L83</b>
<b>V<sub>L</sub>H</b>	<b>VL A10</b>	Ninguno
<b>V<sub>L</sub>I</b>	<b>VL A10</b>	<b>L2, L71</b>

Residuos FR no homólogos BU12 VL frente a L6 y A10

Posición	Cambio	Comentarios
L2	N → I	L2 se sabe que afecta la estructura de CDR1
L40	S → P	Possible mutación somática
L41	S → G	Possible mutación somática
L42	T → Q	Possible mutación somática
L69	N → T	Possible mutación somática
L70	S → D	Carga en el empaquetamiento de cadena frente a CDR1
L71	H → F	Mutación somática/L71 se sabe que afecta la estructura de CDR1
L72	F → T	Possible mutación somática
L83	V → F	Possible mutación somática

##### 5 Mutaciones específicas en variantes de cadena ligera de BU12:

Variante	<b>L2</b>	<b>L40</b>	<b>L41</b>	<b>L42</b>	<b>L69</b>	<b>L70</b>	<b>L71</b>	<b>L72</b>	<b>L83</b>
<b>CBU12 VL*</b>	<b>N*</b>	<b>S*</b>	<b>S*</b>	<b>T*</b>	<b>N*</b>	<b>S*</b>	<b>H*</b>	<b>F*</b>	<b>V*</b>
<b>L6</b>	<b>I</b>	<b>P</b>	<b>G</b>	<b>Q</b>	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>F</b>	<b>T</b>	<b>F</b>
<b>LA</b>	<b>I</b>	<b>P</b>	<b>G</b>	<b>Q</b>	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>F</b>	<b>T</b>	<b>F</b>
<b>LB</b>	<b>N*</b>	<b>P</b>	<b>G</b>	<b>Q</b>	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>F</b>	<b>T</b>	<b>F</b>
<b>LC</b>	<b>I</b>	<b>P</b>	<b>G</b>	<b>Q</b>	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>H*</b>	<b>T</b>	<b>F</b>
<b>LD</b>	<b>N*</b>	<b>P</b>	<b>G</b>	<b>Q</b>	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>H*</b>	<b>T</b>	<b>F</b>
<b>LE</b>	<b>I</b>	<b>S*</b>	<b>S*</b>	<b>T*</b>	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>F</b>	<b>T</b>	<b>F</b>
<b>LF</b>	<b>I</b>	<b>P</b>	<b>G</b>	<b>Q</b>	<b>N*</b>	<b>S*</b>	<b>H*</b>	<b>F*</b>	<b>F</b>
<b>LG</b>	<b>I</b>	<b>P</b>	<b>G</b>	<b>Q</b>	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>F</b>	<b>T</b>	<b>V*</b>

\*Residuos de ratón

Mutaciones específicas en variantes de cadena ligera de BU12:

Variante	L2	L71
cBU12*	N*	H*
A10	I	F
LH	I	F
LI	N*	H*

\*Residuos de ratón

#### Ejemplo 3

- 5 Se cribó un panel de anticuerpos anti-CD19 en un panel de líneas celulares NHL CD19<sup>+</sup> (Figura 13). Todos los anticuerpos evaluados fueron capaces de administrar fármaco aunque hubo diferencias entre las líneas celulares.

Línea celular	Tipo de enfermedad	Moléculas CD19/Célula	CI <sub>50</sub> (ng/mL) de varios anticuerpos anti-CD19 unidos con 2°-ADC				
			LT19	HIB19	cBU12	S125-C1	B-C3
CA46	Linfoma de Burkitt, EBV-	60.527	4	1	7	4	17
HS Sultan	Linfoma de Burkitt, EBV+	59.669	112	97	100	150	234
HT	Linfoma mixto difuso	35.813	111	~1.000	238	ND	ND
MC 116	Linfoma no diferenciado	29.210	192	188	186	~200	195
Ramos	Linfoma de Burkitt, EBV-	34.377	1	1	5	3	13
Toledo		28.657	584	~1.000	~1.000	512	359

- 10 Los anticuerpos anti-CD19 administran 2°-cabra-anti-ratón-vcMMAF a las líneas celulares CDR19<sup>+</sup>. Las líneas celulares se cultivaron con diferentes anticuerpos anti-CD19 entrecruzados con un exceso de 2 veces de ADC de cabra anti-ratón (187.1vcMMAF8). Los cultivos se incubaron durante 96 horas y se marcaron con 50 µM resazurina. No hubo efecto de 187.1-vcMMAF en el crecimiento de ninguna de las líneas celulares ensayadas. Los valores son la media ± SD de cuatro replicados en un único experimento.

#### Ejemplo 4

- 15 Se determinó la actividad antitumoral de los compuestos de conjugado anticuerpo anti-CD19-fármaco en el modelo de tumor Ramos en ratones SCID. Los resultados muestran generalmente que los conjugados de anticuerpo BU12 murino y quimérico fármaco tenían una baja actividad comparados con otros conjugados anticuerpo anti-CD19 quimérico fármaco y comparados con conjugados anticuerpo BU12 humanizado fármaco. Véanse las Figuras 3, 4, 5, 7 y 8.

#### Ejemplo 5

- 20 Las variantes de anticuerpo BU12 humanizado, en las que los residuos de aminoácidos en el dominio Fc de IgG1 que se sabe que son importantes para la unión a FcγR pueden mutarse para alterar la unión a uno o más FcγR, pueden generarse usando técnicas estándar de biología molecular.

Por ejemplo, IgG1v1 contiene las mutaciones siguientes: E233P:L234V:L235A, según el esquema de numeración Kabat. La secuencia de aminoácidos de IgG1V1 se muestra en SEQ ID NO:35.

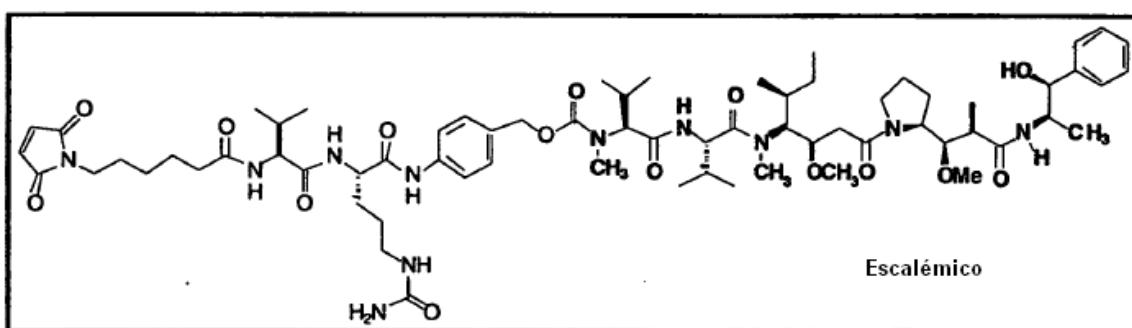
- 25 Las variantes adicionales de dominio Fc de anticuerpos anti-CD19 humanizados pueden generarse de forma similar, incluyendo, por ejemplo, variantes del dominio Fc con una o más sustituciones de aminoácidos no conservativas, introducción de uno o más residuos de cisteína, o introducción de uno o más sitios para glicosilación ligada a N, en o en la proximidad del dominio Fc implicado en la interacción de unión con uno o más receptores Fcγ.

**Ejemplo 6**

Preparación de un conjugado anticuerpo hBU12 fármaco

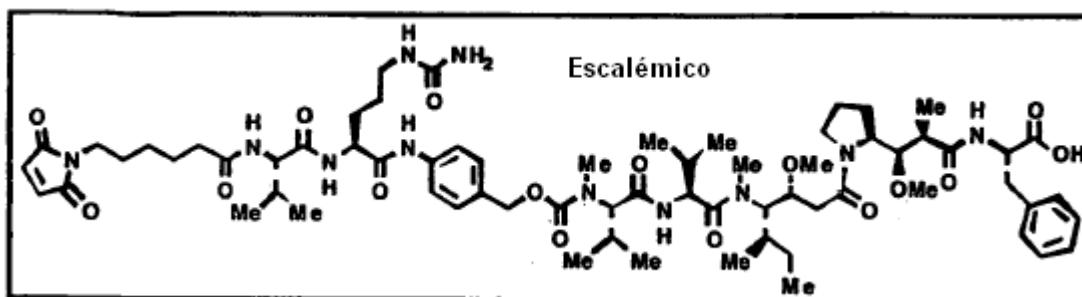
Ciento treinta miligramos del mAb hBU12 (Lotes nos PR208 (69 mg) y 1033154 (100 mg)) se combinaron y concentraron para proporcionar 141 mg a una concentración de 10,8 mg/mL, sobre la base de un peso molecular de 150 kD y un coeficiente de extinción de 1,47 AU·mL·mg<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

Las auristatinas MMAE y MMAF se conjugaron con el anticuerpo purificado como sigue. El anticuerpo (130 mg, 867 nmoles) se incubó 45 min a 37°C con 2,17 nmoles de TCEP (que representa un exceso del 25% de reductor para el nivel de reducción deseado de 4 tioles libres por anticuerpo) con 1 mM DTPA como secuestrador de cationes. El nivel de reducción se determinó realizando una conjugación de ensayo a microescala con el compuesto de ensayo siguiente:



La distribución de la carga de fármaco se caracterizó por chromatografía HIC. Este mAb presentó un patrón de reducción observado ocasionalmente con los anticuerpos murinos, en el que la distribución se pesa a 0 y 10 fármacos por anticuerpo, con 4 y 6 anticuerpo cargado estando representado a niveles menores. La carga media de fármaco fue mayor de lo deseado: 4,9 fármacos/Ab. Se añadieron cantidades crecientes de DTNB (217 nmoles, después 303,8 nmoles) para re-oxidar disulfuros del anticuerpo, reduciendo de esta manera el nivel de carga del fármaco hasta un nivel ensayado de 4,1 fármacos/Ab.

El mAb parcialmente reducido (97 mg, 647 nmoles) se conjugó con MMAF por la adición de 795 µL de DMSO a los aproximadamente 9,0 mL de disolución de mAb, seguido de 203,1 µL de una disolución 19,1 mM DMSO del compuesto siguiente, maleimidocaproil-Val-Cit-MMAF (3,88 µmoles).



La reacción de conjugación se dejó proceder durante 100 minutos a 0°C. La maleimidocaproil-Val-Cit-MMAF residual se inactivó por la adición de 194 µL de 100 mM N-acetil cisteína. La mezcla de reacción se dializó frente a 4L de PBS tres veces usando una membrana 25000 MWCO a 4°C para eliminar el DMSO, fármaco que no ha reaccionado o inactivado, y otros contaminantes como moléculas pequeñas que resultan del proceso de conjugación, y se concentró. El producto contenía 4,1 fármacos/Ab.

**Ejemplo 7**

Actividad del conjugado anticuerpo anti-CD19 auristatina fármaco hBU12-vcMMAE (también referido como hBU12-MC-vc-PAB-MMAE) frente a linfomas sensibles y resistentes a rituximab y en linfomas altos y bajos en CD21:

Materiales y métodos

Análisis por citometría de flujo para determinar los niveles de expresión de CD19 y CD21 en líneas celulares tumorales: Para evaluar los números de copias de CD19 y CD21 en líneas celulares tumorales, las células se incubaron durante 30 minutos en hielo con anticuerpos anti-CD19 y anti-CD21 murinos conjugados con PE (BD Pharmingen, San Diego, CA), se lavaron con medio de tinción frío y se evaluaron con un citómetro de flujo Becton

Dickson FACScan. La determinación cuantitativa de CD19 y CD21 en la superficie celular se determinó usando un ensayo de inmunofluorescencia indirecto citométrico de flujo DAKO QiFiKit y anticuerpos murinos como describe el fabricante (DAKO A/S, Glostrup, Dinamarca).

5 Estudios de unión de saturación para determinar la afinidad de unión: Las células se incubaron con 10 µg/ml hBU12 o hBU12-vcMMAE durante 0,5 h a 4C, y se lavaron. Un conjunto de células se transfirió a 37°C y se recogió a puntos de tiempo seleccionados. Para la detección, se usó un anticuerpo secundario conjugado con PE y se determinó la cantidad de anticuerpo unido a la superficie remanente por citometría de flujo. Alternativamente, las células se incubaron en hielo con anticuerpo hBU12 marcado con AlexaFluor488-o conjugados con fármaco durante 1 h, se lavaron con PBS frío, y la unión se evaluó con un citómetro de flujo Becton Dickson FACScan. Los valores de Kd aparente se determinaron usando el algoritmo de unión a un sitio de Prism (Software GraphPad, San Diego, CA).

10 15 Estudios de cinéticas de internalización de CD19: Para generar conjugados anticuerpo-fármaco radiomarcados, se usó [3H]-vcMMAE sintetizado a medida (24,7 Ci/mmol, Moravek Biochemicals, Brea, CA) para preparar el conjugado hBU12-vcMMAE radiomarcado. Se hicieron cálculos de radiactividad. La cantidad de fármaco libre encontrado en el interior de las células de 1 mL de cultivo se añadió a la cantidad de fármaco libre detectado en 1 mL de medio de cultivo y este valor se usó para determinar la concentración de fármaco total liberado en el cultivo celular. Se promediaron resultados en triplicado y la desviación estándar de estos valores se calculó usando la función STDEVPA en Microsoft Excel.

20 25 Estudios de co-localización lisosomal de hBU12 y hBU12-ADC: Se incubaron células Ramos con 1 ug/ml hBU12 o hBU12-ADC en hielo o durante 20 minutos ó 4 horas a 37°C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS frío para eliminar el anticuerpo o ADC no unido y se fijaron y permeabilizaron con BD CitoFix /Citoperm (BD Biosciences, San Jose, CA). El anticuerpo y ADC se detectaron con IgG de cabra anti-humana marcada con AlexaFluor-488 (Molecular Probes, Eugene, OR). Los compartimentos lisosomales se visualizaron por tinción con anticuerpo LAMP-1 marcado con AlexaFluor647 (CD107 de ratón, BD Biosciences). Los compartimentos nucleares se tiñeron con DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol, Roche, Basel, Suiza). Las imágenes de fluorescencia se adquirieron con un microscopio Carl Zeiss Axiovert 200M.

30 35 Ensayos de citotoxicidad y parada del crecimiento: Las células tumorales se incubaron con hBU12 y los conjugados de fármaco durante 96h. La viabilidad celular se midió por reducción de la tinción azul de Alamar (Biosource International, Camarillo, CA) como se ha reportado previamente (Doronina, 2003 #1834). Las células se incubaron durante 4 h con el agente de tinción y la reducción del agente de tinción se midió en un lector de placas fluorescente Fusion HT (Perkin Elmer, Waltham, MA). Los resultados se reportan como CI50, la concentración de compuesto necesaria para rendir un 50% de reducción en la viabilidad comparado con células tratadas con vehículo (control = 100%). Para los estudios de parada del crecimiento y apoptosis, las células se trataron en primer lugar con el anticuerpo y ADC y después se procesaron usando el kit de detección de apoptosis Anexina V-FITC (BD Pharmingen), según las directrices del fabricante. Para el análisis de la posición del ciclo celular después de la exposición a ADC, las células se marcaron durante 20 minutos con bromodesoxiuridina (BrdUrd, Sigma, St. Louis, MO). La síntesis de ADN naciente se detectó usando un anticuerpo anti-BrdUrd (BD Biosciences) y el contenido total de ADN se detectó con yoduro de propidio (PI). Las células se analizaron entonces por citometría de flujo.

40 45 Modelo in vivo de linfomas subcutáneos y leucemias humanas diseminadas: Se establecieron modelos localizados, subcutáneos y diseminados de linfomas de células B en ratones SCID. Para el modelo subcutáneo, se implantaron  $5 \times 10^6$  células de linfoma en el flanco derecho de ratones hembra. Se administraron hBU12 y -ADC o un compuesto control cuando los volúmenes tumorales alcanzaron  $100\text{mm}^3$ . El tamaño tumoral se monitorizó al menos dos veces semanalmente. Para establecer la enfermedad diseminada, se inyectaron  $1 \times 10^5$  células Nalm6 o RS4;11 en 0,2 ml de PBS en la vena de la cola lateral de ratones C.B.-17 SCID (Harlan, Indianápolis, IN). Los ratones se trataron con los compuestos de ensayo 7 días después de la inyección de las células y se monitorizaron al menos dos veces por semana. Los ratones se sacrificaron cuando presentaron signos de enfermedad incluyendo pérdida de peso de 15-20%, postura encorvada y ausencia de aseo, hinchazón craneal y parálisis de las extremidades traseras. Los esquemas de tratamiento son como se indica en las leyendas de las figuras.

50 55 60 Análisis estadístico: Los tiempos de cuadruplicado o triplicado de los tumores (según se indica) se eligieron como tiempo hasta punto final (TTE), que se determinó usando un análisis de regresión no lineal para crecimiento exponencial del conjunto de datos de crecimiento tumoral de cada individuo de cada animal experimental. El tiempo de cuadruplicado del tumor se calculó sobre la base del volumen tumoral al comienzo de tratamiento. A los animales que no alcanzaron el punto final se les asignó un valor TTE igual al último día del estudio. % TGD (retraso del crecimiento tumoral) refleja el retraso en alcanzar TTE respecto a tumores tratados control, que se determinó usando la fórmula: %TGD=  $[(T-C)/C] \times 100$ , en la que T y C son los tiempos medios en días para grupos tratado y control, para alcanzar TTE, usando el inicio de tratamiento como día 1. Los análisis estadísticos y las representaciones gráficas se realizaron usando el Software Graphpad Prism versión 4.01 (Graphpad, San Diego, CA). Las curvas de crecimiento tumoral medio muestran los volúmenes tumorales medios del grupo como una función del tiempo. Se usó el ensayo de rango logarítmico para analizar la significancia de las diferencias entre TTE de grupos de tumor tratados y control, considerándose significativas (\*) las diferencias a  $0.01 < P < 0.05$ , y altamente significativas (\*\*) a  $P < 0.01$ . En una respuesta CR, el volumen tumoral es menor de  $13,5 \text{ mm}^3$  para tres medidas consecutivas durante el curso del estudio. Una respuesta duradera (DR) se define como la ausencia completa de tumor palpable durante todo el

experimento. Se empleó el análisis de correlación estándar de Pearson (dos colas), usando un intervalo de confianza de 95%, para determinar correlaciones significativas entre niveles de expresión de CD19 y CD21 y citotoxicidad *in vitro*.

Desarrollo de tumores Ramos y Raji resistentes a rituxán: Se implantaron células parentales en 40 ratones SCID a una concentración de  $5 \times 10^6$  células por ratón. 2 días después del implante celular, los ratones se trataron con rituximab a 8mg/kg en días alternos durante un total de 9 dosis. De 40 ratones, aproximadamente 6 desarrollaron tumores, cuando los tumores tuvieron aproximadamente 300-400mm<sup>3</sup>, los ratones se sacrificaron por eutanasia y los tumores se recogieron asepticamente. Los tumores se convirtieron en suspensión de células únicas mediante disociación a través de un filtro de nilón. Mientras estaban en cultivo las células se expusieron continuamente a varios niveles de rituximab hasta 100ug/ml. La viabilidad celular se verificó varias veces a la semana. Después de una semana en cultivo las células se implantaron en 30 ratones SCID. Dos días después del implante los ratones se trataron con rituximab a 12mg/kg en el esquema como anteriormente. La selección *in vitro* e *in vivo* se repitió una vez más en 10 ratones SCID. Los tumores resultantes se procesaron en suspensión de célula única y se congelaron en nitrógeno líquido. Las líneas celulares Raji R2 y Raji H4 se generaron como se describe en Czuczamn et al., *Clin Cancer Res.* 2008; 14:1561-1570.

Características farmacocinéticas de conjugados hBU12- vcMMAE(4): Se administraron dosis únicas de hBU12-vcMMAE intra-peritonealmente a ratones SCID sin estimular. Las muestras de suero se recogieron en intervalos programados durante un periodo de 11 semanas para obtener perfiles farmacocinéticos compuestos. Las muestras se analizaron para concentraciones de conjugado anticuerpo fármaco por un ensayo de captura en lechos multiplex cualificado usando un anticuerpo anti-MMAE. El análisis farmacocinético se hizo usando métodos no compartimentales y compartimentales.

## Resultados

Ausencia de correlación entre la expresión de CD19 y CD21 y la potencia de hBU12-vcMMAE frente a líneas celulares tumorales de ALL, CLL y NHL crecidas en cultivo: Con el fin de determinar la potencia de hBU12-vcMMAE, se expusieron células de linfoma y leucemia positivas para CD19 que representan linfoma de Burkitt, linfoma de células B grandes difuso (DLBCL), linfomas foliculares (FL), y leucemia linfocítica aguda (ALL) a concentraciones crecientes de hBU12-vcMMAE. Además, se determinaron los números de copias en la superficie celular de CD19 y CD21 con el fin de estudiar una correlación potencial entre la expresión de estos genes con actividad anti-tumoral. La actividad citotóxica potente del conjugado hBU12-vcMMAE se observó en 15 de 17 líneas celulares de tumor positivas para CD19 ensayadas. La línea celular de linfoma de células T Jurkat se usó como línea celular control negativa para CD19. La ausencia de actividad de hBU12-vcMMAE en estas células control sugirió que la actividad anti-tumoral era dependiente de diana. Se observó una ausencia de correlaciones significativas entre la potencia de ADC y los niveles de expresión de CD19 ( $p=0,45$ ,  $R^2=0,038$ ) y CD21 ( $p=0,55$ ,  $R^2=0,028$ ) (datos no mostrados). Además, se encontraron efectos citotóxicos potentes similares de hBU12-vcMMAE frente a líneas celulares de ALL. En resumen, los datos demuestran que los niveles de expresión de CD19 y CD21 y los subtipos tumorales son insuficientes para predecir las sensibilidades de líneas celulares de linfoma y leucemia hacia ADC basadas en auristatina.

Cinéticas de internalización y tráfico intracelular de hBU12-vcMMAE en líneas celulares NHL: Un parámetro crítico mostrado previamente para determinar los efectos anti-tumorales de determinados ADC basados en auristatina es la capacidad del antígeno diana de internalizarse y translocarse al compartimento lisosomal después de la unión por el anticuerpo. Para estudiar estos procesos, líneas celulares tumorales con bajo CD21 (Ramos y SUDHL-4) y alto CD21 (Raji, Daudi) se incubaron con hBU12-vcMMAE y se determinaron las cinéticas de internalización por separación celular activada por fluorescencia (FACS). Como se muestra en la Figura 15, hBU12 y los conjugados hBU12-vcMMAE se internalizaron rápidamente en células Ramos con bajo CD21, y >50% de los compuestos se internalizaron en 60 minutos después de la incubación. Se encontraron cinéticas de internalización de alguna manera más lentas en hBU12-vcMMAE en células Raji y Daudi con alto CD21. Sin embargo, las pequeñas diferencias en las cinéticas de internalización no afectaron significativamente la potencia, y se encontraron valores de CI50 comparables entre las células Ramos con CD21 bajo y los linfomas con CD21 alto. Combinados, estos descubrimientos demuestran que las cinéticas de internalización de hBU12-vcMMAE en diferentes líneas celulares tumorales no se correlacionan con citotoxicidad *in vitro*. Se investigó el tráfico intracelular de hBU12 y los conjugados hBU12-vcMMAE en líneas celulares NHL. Para este propósito, se incubaron células Ramos y SUDHL4 con bajo CD21 bien con anticuerpo desnudo o hBU12-vcMMAE. Los estudios de co-ímmunofluorescencia revelaron que la mayoría de hBU12 internalizado se localizó en los lisosomas, empezando tan pronto como 15 minutos después de la incubación. Se observó una translocación subcelular comparable de hBU12 y los conjugados al compartimento lisosomal entre células Ramos o HT con bajo CD21 y células Daudi y Raji con alto CD21 (datos no mostrados). Combinados, los descubrimientos demuestran que las cinéticas de internalización solas son insuficientes para explicar las diferencias en las potencias de hBU12-vcMMAE frente a diferentes líneas celulares NHL.

Liberación de fármaco libre por hBU12-vcE en líneas celulares de linfoma con CD21 alto y bajo sensibles y resistentes a rituximab: MMAE interfiere con la estabilidad de los microtúbulos en el compartimento citoplasmico y así, las cantidades de fármaco MMAE libre activo liberado en células tumorales es crítica para los efectos anti-linfoma. Para investigar estos aspectos, se incubaron células Daudi con alto CD21 y Raji R2 y Raji 4H con alto CD21,

resistentes a rituximab con hBU12-vcMMAE y se compararon los niveles del fármaco libre liberado con células Ramos con bajo CD21. La liberación celular de fármaco activo, libre, se cuantificó combinando la radiactividad que se retuvo en el interior de las células y la que había escapado en el sobrenadante con el tiempo. No hubo una diferencia en la liberación de fármaco libre entre células con bajo CD21 (Ramos) y células con alto CD21 (Daudi). Por lo tanto, es improbable que las variaciones en la liberación del fármaco libre sean responsables de las diferencias de >50 veces en los valores CI<sub>50</sub> entre estas diferentes líneas celulares de linfoma. En conclusión, los niveles altos de CD21 pueden interferir sólo mínimamente con la liberación intracelular del fármaco libre de hBU12-vcMMAE internalizado.

Eficacia de los conjugados de hBU12 en modelos de NHL y ALL Se ensayó hBU12-vcMMAE en experimentos de dosis única y múltiples dosis usando diferentes líneas celulares NHL xenoinjertadas en ratones SCID (Figura 16A-E y datos no mostrados). Cuando se ensayó frente a linfoma de Burkitt, se observaron 7/8 respuestas duraderas a la dosis de 3mg/kg de hBU12-vcMMAE, administrada q4dx4 (Fig. 16A)). Cuando se ensayó frente a tumor DOHH2 (linfoma folicular), se observó una inhibición significativa de las velocidades de crecimiento tumoral como se ilustra por 2/10 DR al nivel de dosis de 3mg/kg (Fig. 16B). Cuando se ensayó frente a linfomas SUDHL4 (DLBCL), también hubo una inhibición significativa de las velocidades de crecimiento tumoral (Fig. 16C). En el modelo RS4;11 diseminado que representa ALL, se observó un incremento significativo en la supervivencia de ratones tratados con hBU12-vcMMAE, resultando en un retraso del inicio de la enfermedad desde ~ 45 días en animales control o no tratados hasta > 90 días en ratones tratados con 3 mg/kg de conjugados vcE (Fig. 16D). Se hicieron observaciones similares cuando se ensayó hHU 12-vcMMAE en un segundo modelo de ALL diseminada (Nalm6), en el que la administración de dosis única resultó en 30-60% respuestas duraderas Fig. 16E). Combinados, estos datos demuestran efectos anti-tumorales potentes de hBU12-vcMMAE en diferentes modelos de NHL y ALL, independientemente de su estado de expresión de CD21.

Actividad antitumoral de hBU12-vcE frente a linfomas resistentes a rituximab: Con el fin de desarrollar un modelo preclínico que mimetice la propiedad refractaria de los tumores NHL al tratamiento con rituximab, se generaron células tumorales Ramos que se volvieron refractarias por subcultivo repetido in vitro e in vivo de células tumorales en ratones, concurrente con tratamiento con rituximab como se describe en materiales y métodos. Para determinar los niveles de expresión de CD20 y CD19, se aislaron células de tumores R-Ramos y se encontraron niveles comparables de expresión de CD20 y CD19 en tumores Ramos resistentes a rituximab (Figura 17C). Comparado con altas dosis de rituximab (12mg/kg, q4dx4), el tratamiento con hBU12-vcMMAE resultó en una diferencia significativa en el % de retraso de crecimiento tumoral (TGD) entre los tumores parentales y resistentes a rituximab. De forma importante, se encontraron actividades antitumorales similares por hBU12-vcMMAE en líneas celulares sensibles y resistentes a rituximab, lo que sugiere que el mecanismo que vuelve a las células NHL resistentes a rituximab no interfiere con la potencia de hBU12-vcMMAE. Para validar adicionalmente estos descubrimientos, hBU12-vcMMAE se ensayó conjuntamente con dos líneas celulares NHL adicionales resistentes a rituximab descritas previamente (Raji 2R y 4RH 27; Fig. 17D y datos no mostrados), y se mostró que ambas líneas celulares expresaban niveles similares de CD19 y CD20 comparado con el clon parental. En apoyo de los descubrimientos previos que ensayan tumores Ramos resistentes a rituximab, el tratamiento con hBU12-vcMMAE indujo una respuesta duradera similar comparada con el clon Raji parental sensible a rituximab. En conclusión, se observaron actividades anti-tumorales potentes para CD19-ADC en líneas celulares resistentes a rituximab.

#### Ejemplo 8

Papel de células efectoras en la mediación de los efectos terapéuticos del anticuerpo anti-CD19 humanizado hBU12 en modelos preclínicos de NHL y ALL:

Se investigó la capacidad del anticuerpo anti-CD19 humanizado hBU12 para inducir CDC, ADCC y ADCP frente a líneas celulares de linfoma y leucemia humanas. Se encontró ADCC y ADCP potentes y ADCC se redujo ligeramente cuando hBU12 se conjugó con el conector fármaco vcMMAE. Cuando se ensayó en aislados de células B primarios humanos, activados, se observaron efectos antiproliferativos directos del hBU12 y de los conjugados. Se observó una ausencia de efectos anti-tumorales CDC para todos los compuestos de hBU12. Para determinar la relevancia de las actividades mediadas por células efectoras para la actividad terapéutica de hBU12, se implantaron células de linfoma y leucemia humanas bien subcutáneamente en ratones SCID o mediante inyecciones en la vena de la cola (modelo diseminado). Los efectos anti-tumorales más potentes se observaron en modelos diseminados, consistente con la noción de que el acceso de células efectoras a las células tumorales es menos limitante en el modelo diseminado (Figuras 18 y 19). Con el fin de identificar la naturaleza de las células que median los efectos anti-tumorales, se realizaron experimentos de ablación de células efectoras en un modelo diseminado de NHL (Ramos). Las células NK, neutrófilos o macrófagos se deplecionaron selectivamente y se midieron los efectos en la inhibición del crecimiento tumoral de hBU12 en ratones que portaban tumores. La ablación de macrófagos y neutrófilos suprimió casi completamente los efectos anti-tumorales de hBU12, mientras la deplección de células NK estuvo asociada con una disminución moderada de la actividad. En conclusión, los descubrimientos demuestran que hBU12 indujo efectos anti-tumorales a través de actividades ADCC y ADCC mediadas por células efectoras.

#### Materiales y métodos

Para los estudios de depleción in vivo, se obtuvo anticuerpo anti-asialo-GM-1 de conejo de Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Richmond, VA), se obtuvo anticuerpo anti-ratón-Gr-1 de rata de BD Biosciences (San Diego, CA). Se

5 preparó clodronato encapsulado en liposomas (CEL) como se ha descrito previamente (Van Rooijen y Sanders 1994). El clodronato fue un regalo de Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Alemania). Se deplecionaron ratones que portaban tumores de células efectoras usando el anticuerpo específico o CEL como se ha descrito previamente (Van Rooijen y Sanders 1994; van Rooijen y Sanders 1997; McEarchern, Oflazoglu et al. 2007). Las células asesinas naturales (NK) se deplecionaron por inyección i.p. de anti-asialo-GM 1 (1,25 mg/kg). Se administraron a los ratones un total de 3 dosis una vez cada 5 días, empezando el día del implante de las células tumorales. Los macrófagos se deplecionaron por inyección i.p. de CEL (100μl/10gr) en el día de la inyección del tumor y cada 3 días posteriormente para un total de 5 dosis. La depleción celular se confirmó por análisis de citometría de flujo de esplenocitos, nódulos linfáticos y sangre (datos no mostrados).

#### 10 Secuencias

SEQ ID NO:1:

**Met Gly Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr Val Leu Ser**

SEQ ID NO:2:

(las regiones CDR están subrayadas. Las posiciones Kabat 75, 79, 81, 82, 82A, 82B, 82C, y 89 están en negrita. Los residuos que determinan la estructura de CDR tiene un asterisco\* en su lado derecho)

15 **Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Cys  
Thr Phe\* Ser Gly\* Phe\* Ser Leu\* Ser Thr Ser Gly Met Gly Val\* Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly  
Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys  
Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys\* Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp  
Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg\* Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp  
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser**

SEQ ID NO:3:

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala  
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn  
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe  
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Pro Gly Lys

SEQ ID NO:4:

20 (las regiones CDR están subrayadas. Las posiciones Kabat 75, 79, 81, 82, 82A, 82B, 82C, y 89 están en negrita)

**Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Cys  
Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys  
Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser  
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro  
Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp  
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser**

SEQ ID NO:5:

(las regiones CDR están subrayadas. Las posiciones Kabat 75, 79, 81, 82, 82A, 82B, 82C, y 89 están en negrita)

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Cys  
 Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys  
 Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser  
 Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Phe Leu **Thr Met Thr Asn Met Asp Pro**  
 Val Asp Thr Ala **Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly**  
**Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser**

SEQ ID NO:6:

(las regiones CDR están subrayadas. Las posiciones Kabat 75, 79, 81, 82, 82A, 82B, 82C, y 89 están en negrita)

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Cys  
 Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys  
 Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser  
 Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu **Lys Ile Ala Ser Val Asp Pro**  
 Val Asp Thr Ala **Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly**  
**Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser**

5

SEQ ID NO:7:

(las regiones CDR están subrayadas. Las posiciones Kabat 75, 79, 81, 82, 82A, 82B, 82C, y 89 están en negrita)

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Cys  
 Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys  
 Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser  
 Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu **Thr Met Thr Asn Met Asp Pro**  
 Val Asp Thr Ala **Ala Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly**  
**Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser**

SEQ ID NO:8:

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser  
 Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly  
 Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg  
 Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp  
 Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

10

SEQ ID NO:9:

(las regiones CDR están subrayadas. Las posiciones Kabat 24, 27, 29, 71, 75, 78, 79, y 89 están en negrita. Los residuos que determinan la estructura de CDR tiene un asterisco\* en su lado derecho)

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys  
 Thr Val\* Ser Gly\* Gly\* Ser Ile\* Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln His Pro Gly  
Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys  
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val\* Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr  
Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg\* Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp  
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

15

SEQ ID NO:10:

(las regiones CDR están subrayadas. Las posiciones Kabat 24, 27, 29, 71, 75, 78, 79, y 89 están en negrita).

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys  
 Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys  
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser  
 Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala  
 Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly  
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

SEQ ID NO:11:

(las regiones CDR están subrayadas. Las posiciones Kabat 24, 27, 29, 71, 75, 78, 79, y 89 están en negrita).

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys  
 Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys  
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser  
 Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala  
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly  
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

5 SEQ ID NO:12:

(las regiones CDR están subrayadas. Las posiciones Kabat 24, 27, 29, 71, 75, 78, 79, y 89 están en negrita).

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys  
 Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys  
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser  
 Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala  
 Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly  
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

SEQ ID NO:13:

(las regiones CDR están subrayadas. Las posiciones Kabat 24, 27, 29, 71, 75, 78, 79, y 89 están en negrita).

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys  
 Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys  
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser  
 Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Ser Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala  
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly  
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

10

SEQ ID NO:14:

(las regiones CDR están subrayadas. Las posiciones Kabat 24, 27, 29, 71, 75, 78, 79, y 89 están en negrita)

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys  
 Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys  
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser  
 Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Phe Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala  
 Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly  
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

SEQ ID NO:15:

15 (las regiones CDR están subrayadas. Las posiciones Kabat 24, 27, 29, 71, 75, 78, 79, y 89 están en negrita).

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys  
 Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys  
Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser  
Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala  
Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

SEQ ID NO:16

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ser Ala Ser Val Ile Met Ser Arg Gly

SEQ ID NO:17

- 5 (las regiones CDR están subrayadas. Las posiciones Kabat 2, 40, 41, 42, 69, 70, 71, 72, y 83 están en negrita. Los residuos que determinan la estructura de CDR tiene un asterisco\* en su lado derecho)

Glu Ile\* Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser  
 Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg  
Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly  
Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln  
Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

SEQ ID NO:18

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser  
 Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala  
 Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu  
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr  
 His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

10 SEQ ID NO:19

(las regiones CDR están subrayadas. Las posiciones Kabat 2, 40, 41, 42, 69, 70, 71, 72, y 83 están en negrita)

Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser  
 Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg  
Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly  
Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln  
Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

SEQ ID NO:20

(las regiones CDR están subrayadas. Las posiciones Kabat 2, 40, 41, 42, 69, 70, 71, 72, y 83 están en negrita)

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys  
Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu  
Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr  
Asp His Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
Ser Val Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

15 SEQ ID NO:21

(las regiones CDR están subrayadas. Las posiciones Kabat 2, 40, 41, 42, 69, 70, 71, 72, y 83 están en negrita)

Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp His Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

SEQ ID NO:22

(las regiones CDR están subrayadas. Las posiciones Kabat 2,40,41,42,69,70,71,72, y 83 están en negrita)

**Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Thr Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg**

5 SEQ ID NO:23

(las regiones CDR están subrayadas. Las posiciones Kabat 2, 40, 41, 42, 69, 70, 71, 72, y 83 están en negrita)

**Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Asn Ser His Phe Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg**

SEQ ID NO:24

(las regiones CDR están subrayadas. Las posiciones Kabat 2, 40, 41, 42, 69, 70, 71, 72, y 83 están en negrita)

**Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg**

10

SEQ ID NO:25

**Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser Gly Asn Ser His Phe Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg**

SEQ ID NO:26

15

(las regiones CDR están subrayadas. Las posiciones Kabat 2, y 71 están en negrita. Los residuos que determinan la estructura de CDR tiene un asterisco\* en su lado derecho)

**Glu Ile\* Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Lys Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe\* Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg**

SEQ ID NO:27

(las regiones CDR están subrayadas. Las posiciones Kabat 2, y 71 están en negrita).

**Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Lys Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp His Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg**

SEQ ID NO:28

**Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Xa Asn Gln Val Xb Leu Xc Xd Xe Xf Xg Asp Pro Val Asp Thr Ala Xh Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser**

5

en la que Xa es Ser o Lys, Xb es Phe o Val, Xc es Lys o Thr, Xd es Ile o Met, Xe es Ala o Thr Xf es Ser o Asn, Xg es Val o Met, y Xh es Ala o Thr.

SEQ ID NO:29

**Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Xa Ser Gly Xb Ser Xc Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Xd Asp Thr Ser Xe Asn Gln Xf Xg Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Xh Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser**

10

en la que Xa es Phe o Val, Xb es Phe o Gly, Xc es Leu o Ile, Xd es Lys o Val, Xe es Ser o Lys, Xf es Val o Phe, Xg es Phe o Ser, y Xh es Ala o Val.

SEQ ID NO:30

**Glu Xa Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Xb Xc Xd Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Xe Xf Xg Xh Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Xi Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gin Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg**

15

en la que Xa es Asn o Ile, Xb es Ser o Pro, Xc es Ser o Gly, Xd es Thr o Gin, Xe es Asn o Thr, Xf es Ser o Asp, Xg es His o Phe, Xh es Phe o Thr, y Xi es Val o Phe.

SEQ ID NO:31

**Glu Xa Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Lys Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Xb Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg**

en la que Xa es Asn o Ile y Xb es His o Phe.

SEQ ID NO:32

**Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys  
Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys  
Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser  
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Xa Asn Gln Val Xb Leu Xc Xd Xe Xf Xg Asp Pro Val  
Asp Thr Ala Xh Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Xi  
Gly Thr Xj Val Thr Val Ser Ser**

en la que Xa es Ser o Lys, Xb es Phe o Val, Xc es Lys o Thr, Xd es Ile o Met, Xe es Ala o Thr Xf es Ser o Asn, Xg es Val o Met, Xh es Ala o Thr, Xi es Gln o Arg, y Xj es Leu, Thr, o Met.

SEQ ID NO:33

**Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys  
Thr Xa Ser Gly Xb Ser Xc Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys  
Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser  
Arg Val Thr Ile Ser Xd Asp Thr Ser Xe Asn Gln Xf Xg Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala  
Asp Thr Ala Xh Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Xi  
Gly Thr Xj Val Thr Val Ser Ser**

5

en la que Xa es Phe o Val, Xb es Phe o Gly, Xc es Leu o Ile, Xd es Lys o Val, Xe es Ser o Lys, Xf es Val o Phe, Xg es Phe o Ser, Xh es Ala o Val, Xi es Gln o Arg, y Xj es Leu, Thr, o Met.

SEQ ID NO:34

**Glu Xa Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys  
Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Xb Xc Xd Ala Pro Arg Leu Leu  
Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Xe Xf Xg  
Xh Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Xi Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr  
Pro Phe Thr Phe Gly Xj Gly Thr Xk XI Xm Ile Lys Arg**

10 en la que Xa es Asn o Ile, Xb es Ser o Pro, Xc es Ser o Gly, Xd es Thr o Gln, Xe es Asn o Thr, Xf es Ser o Asp, Xg es His o Phe, Xh es Phe o Thr, Xi es Val o Phe, Xj es Gln, Pro o Gly, Xk es Lys o Arg, XI es Leu o Val, y Xm es Glu o Asp.

SEQ ID NO:35

**Glu Xa Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys  
Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu  
Ile Lys Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
Xb Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val  
Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Xc Gly Thr Xd Xe Xf Ile Lys Arg**

15 en la que Xa es Asn o Ile, Xb es His o Phe, Xc es Gln, Pro o Gly, Xd es Lys o Arg, Xe es Leu o Val, y Xf es Glu o Asp.

SEQ ID NO:36

**ASTKGPSVFPPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGVHTFPAAVLQSSGLYSLSSVVT  
VPSSNFGTQTYTCNVVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFFFPKPKDTLMISRTPEVTC  
VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTPREEQFNSTFRVSVLTVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAP  
IEKTIISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLSD  
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**

SEQ ID NO:37

QMQGVNCTVSELKTPLGDTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCP  
RCPAPELLGGPSVFLFPPKPDKTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYDGVQVHNAAKTPREQQFN  
STFRVSVLTVLHQNWLDGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTC  
LVGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPMLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQNIIFSCSVMHEALHNRFT  
QKSLSLSPGK

SEQ ID NO:38

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFP A VLQSSGLYSLSSVVT  
VPSSSLGTKYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPDKTLMISRTPEV  
CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAAKTPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS  
SIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFP PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD  
DGSSFLYSLTV DKS RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:39

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFP A VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG  
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCPCPAPPVAGGSPVFLFPPKPDKTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP  
EVKFNWYVDGVEVHNAAKTPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPV  
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFP PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVFSC  
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5

SEQ ID NO:40

**atggcaggcttacttcttcattttgtgtctgattgtccctgcataatgtcctgtcc**

SEQ ID NO:41

caggttcagctgcaagagtctggccctgggttggttaagccctcccagaccctcagtcgtacttgtactgtctgg  
gggttcaatcagcacttctggtatgggttaggctggattaggcagcacccagggaaagggtctggagtggattggac  
acatttggggatgatgacaagagatataacccagccctgaagagcagagtgacaatctctgtggataacctccaag  
aaccagtttagcctaagctgtccagtgtgacagctgcagatactgtctactactgtctagaatggaaactttg  
gtcctactatggactactggggcaaggcaccctgtcacagtctcctca

10 SEQ ID NO:42

gttagcaccaaggcccattcggtttccccctggcacccctcccaagagcaccccttggggcacagcggccctgg  
ctgcctggcaaggactacttccccgaaccggtagggctgtcgactcaggccctgaccagcggcgtgcaca  
ccttccggctgtcctacagtccctcaggactctactccctcagcagcgtggtagccgtccctcagcagcttggc  
accagacccatctgcaacgtgaatcacaagcccaacaccaagggtggacaagaaaagttgagccaaatcttgc  
tgacaaaactcacatgtccacacatgtccacacatgtccatgtccatgtccatgtccatgtccatgtccatgt  
aacccaaaggacaccctcatgtatcccggaccctgaggtaggtcacatgcgtggtaggtgacgtgagccacgaagacc  
gaggtcaagttcaacttgcgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaagccgcggaggaggcagttaca  
cagcacgtaccgtgtggtagcgtccctcaccgtccctgcaccaggactggctgaatggcaaggagttacaagtgc  
tctccaacaaaggccatcccggccatcgagaaaaccatctccaaaggccagccggagaaaccacaggt  
tacaccctggccatcccggatgagctgaccaagaaccaggtagcgtccctgacctgctgtcaaggcttctatcc  
cagcgcacatcgccgtggagttggagagcaatggcagccggagaacaactacaagaccacgcctccgtgtggact  
ccgacggcttcttcttctacagcaagctaccgtggacaagagcaggtggcagcagggaaacgttctcatgc  
tccgtatgcatgaggctgtgcacaaccactacacgcagaagagcctccctgtctccggtaaatga

SEQ ID NO:43

**atggatttcaagtgcagatttcagttccctgtaatcagtgcctcagtcataatgtccagagga**

SEQ ID NO:44

gaaattgttctcacccagtctccagcaaccctgtctctccaggggaaagggtaccctgagctgcagtgccag  
ctcaagtgtaaaggtaatcatgcactggtagccaggcagaagccaggcaggctccagactctgtttagacacatcca  
aactggcttctggatccagcaaggttcagttgcgtggcagttggatggacagatttacactcacaatcagcagcctg  
gagccagaggatgttgcgttattactgtttcaggggagttgtataaccattcactttggccaaggaaagtt  
ggaaatcaaaaaga

15

SEQ ID NO:45

actgtggctgaccatctgtttcatcttccgcacatgtatggcagttgaaatctggaaactgcctctgttgtgt  
cctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggataacgcgcctccaatcggttaactcccc  
aggagagtgtcacagacaggacagcaaggacacgcacccatcagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagac  
tacgagaaacacaaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacag  
gggagagtgttag

SEQ ID NO:46

**Thr Ser Gly Met Gly Val Gly**

5 SEQ ID NO:47

**His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser**

SEQ ID NO:48

**Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr**

SEQ ID NO:49

10 **Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His**

SEQ ID NO:50

**Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser**

SEQ ID NO:51

**Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr**

15

## **LISTADO DE SECUENCIAS**

5 <110> McDonagh, Charlotte  
Cerveny, Charles G  
Benjamin, Dennis  
Carter, Paul

10 <120> AGENTES DE UNIÓN A CD19 Y USOS DE ÉSTOS

15 <130> 018891-004030US  
<150> US 60/981.206  
<151> 19-10-2007

20 <150> US 60/019.214  
<151> 04-01-2008  
<150> US 61/080.169  
<151> 11-07-2008

25 <160> 61  
<170> PatentIn versión 3.4

30 <210> 1  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Artificial

35 <220>  
<223> Secuencia líder de hBU12 sintética - región de cadena pesada  
<400> 1

40 Met Gly Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr  
35 1 5 10 15  
Val Leu Ser

45 <210> 2  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> Artificial

50 <220>  
<223> Región variable de cadena pesada de hBU12 sintética (línea germinal VH2-70/JH4) - Variante HA  
45 <400> 2

55 Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln  
50 1 5 10 15

60 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
55 20 25 30

ES 2 599 172 T3

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala  
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 3

<211> 330

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Dominio constante de cadena pesada de hBU12 sintética (IgG1)

10

<400> 3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
100 105 110

ES 2 599 172 T3

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325 330

<210> 4

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Región variable de cadena pesada de hBU12 sintética (línea germinal VH2-70/JH4) - Variante HB

ES 2 599 172 T3

<400> 4

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln  
1 5 10 15

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

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala  
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

5

<210> 5

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Región variable de cadena pesada de hBU12 sintética (línea germinal VH2-70/JH4) - Variante HC

<400> 5

15

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln  
1 5 10 15

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

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

ES 2 599 172 T3

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala  
50 55 60

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

Phe Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 6

<211> 120

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Región variable de cadena pesada de hBU12 sintética (línea germinal VH2-70/JH4) - Variante HD

10

<400> 6

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln  
1 5 10 15

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

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala  
50 55 60

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

Val Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

15 <210> 7

ES 2 599 172 T3

<211> 120  
<212> PRT  
<213> Artificial

5 <220>  
<223> Región variable de cadena pesada de hBU12 sintética (línea germinal VH2-70/JH4) - Variante HE

<400> 7

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln  
1 5 10 15

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

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala  
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr  
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

10

<210> 8  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Región variable de cadena pesada de hBU12 sintética (Murina)

20 <400> 8

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln  
1 5 10 15

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

ES 2 599 172 T3

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala  
50 55 60

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

Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr  
85 90 95

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

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 9

<211> 120

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Región variable de cadena pesada de hBU12 sintética (línea germinal VH4-31/JH4) - Variante HF

10

<400> 9

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

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

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

Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala  
50 55 60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
85 90 95

ES 2 599 172 T3

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

5 <210> 10  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Región variable de cadena pesada de hBU12 sintética (línea germinal VH4-31/JH4) - Variante HG  
<400> 10

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

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

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

Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala  
50 55 60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

15 <210> 11  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Región variable de cadena pesada de hBU12 sintética (línea germinal VH4-31/JH4) - Variante HH  
<400> 11

ES 2 599 172 T3

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

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

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

Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala  
50 55 60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 12

<211> 120

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Región variable de cadena pesada de hBU12 sintética (línea germinal VH4-31/JH4) - Variante HI

10 <400> 12

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

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

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

Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala  
50 55 60

ES 2 599 172 T3

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
85                   90                   95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115               120

<210> 13

<211> 120

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Región variable de cadena pesada de hBU12 sintética (línea germinal VH4-31/JH4) - Variante HJ

<400> 13

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

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

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

Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala  
50               55               60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
85               90               95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115               120

15 <210> 14

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 599 172 T3

<220>

<223> Región variable de cadena pesada de hBU12 sintética (línea germinal VH4-31/JH4) - Variante HK

5 <400> 14

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

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

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

Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala  
50 55 60

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

Phe Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 15

10 <211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Región variable de cadena pesada de hBU12 sintética (línea germinal VH4-31/JH4) - Variante HL

<400> 15

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

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

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

ES 2 599 172 T3

Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala  
50 55 60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr  
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 16

<211> 22

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Región de cadena ligera de hBU12 sintética - secuencia líder

10

<400> 16

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly  
20

15 <210> 17

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Región variable de cadena ligera de hBU12 sintética (línea germinal VL-L6/Jk2) - Variante LA

<400> 17

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr  
25 35 40 45

ES 2 599 172 T3

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

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 18

<211> 106

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Dominio constante de cadena ligera de hBU12 sintética (dominio Kappa)

10

<400> 18

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
1 5 10 15

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

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

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
100 105

15 <210> 19

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Región variable de cadena ligera de hBU12 sintética (línea germinal VL-L6/Jk2) - Variante LB

<400> 19

ES 2 599 172 T3

Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

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

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

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 20

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Región variable de cadena ligera de hBU12 sintética (línea germinal VL-L6/Jk2) - Variante LC

10 <400> 20

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Thr Asp His Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
65 70 75 80

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105

15 <210> 21

ES 2 599 172 T3

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

5 <220>  
<223> Región variable de cadena ligera de hBU12 sintética (línea germinal VL-L6/Jk2) - Variante LD

<400> 21

Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1                   5                   10                   15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20                   25                   30

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

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

Gly Ser Gly Thr Asp His Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
65                   70                   75                   80

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

10 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100               105

<210> 22  
<211> 107  
<212> PRT  
15 <213> Artificial

<220>  
<223> Región variable de cadena ligera de hBU12 sintética (línea germinal VL-L6/Jk2) - Variante LE

20 <400> 22

ES 2 599 172 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

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

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

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 23

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Región variable de cadena ligera de hBU12 sintética (línea germinal VL-L6/Jk2) - Variante LF

10

<400> 23

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Asn Ser His Phe Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
65 70 75 80

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105

ES 2 599 172 T3

5 <210> 24  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Región variable de cadena ligera de hBU12 sintética (línea germinal VL-L6/Jk2) - Variante LG

10 <400> 24

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

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

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

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105

15 <210> 25  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Región variable de cadena ligera de hBU12 sintética (Murina)

<400> 25

Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly  
1 5 10 15

ES 2 599 172 T3

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

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

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

Gly Ser Gly Asn Ser His Phe Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu  
65 70 75 80

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

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 26

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Región variable de cadena ligera de hBU12 sintética (línea germinal VL-A10/Jk2) - Variante LH

10

<400> 26

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys  
1 5 10 15

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Lys  
35 40 45

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

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105

15 <210> 27

# ES 2 599 172 T3

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

5 <220>  
<223> Región variable de cadena ligera de hBU12 sintética (línea germinal VL-A10/Jk2) - Variante LI

<400> 27

Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys  
1 5 10 15

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Lys  
35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Asp His Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu  
65 70 75 80

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

10 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 28  
<211> 120  
<212> PRT  
15 <213> Artificial

20 <220>  
<223> Secuencia consenso de hBU12 sintética para la región variable de cadena pesada (línea germinal VH2-70/JH4)

25 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (77)..(77)  
<223> Xaa es Ser o Lys

30 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (81) .. (81)  
<223> Xaa es Phe o Val

35 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (83)..(83)  
<223> Xaa es Lys o Thr

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (84) .. (84)

ES 2 599 172 T3

<223> Xaa es Ile o Met  
5           <220>  
          <221> MOD\_RES  
          <222> (85)..(85)  
          <223> Xaa es Ala o Thr  
10          <220>  
          <221> MOD\_RES  
          <222> (86)..(86)  
          <223> Xaa es Ser o Asn  
15          <220>  
          <221> MOD\_RES  
          <222> (87)..(87)  
          <223> Xaa es Val o Met  
20          <220>  
          <221> MOD\_RES  
          <222> (94) .. (94)  
          <223> Xaa es Ala o Thr  
      <400> 28  
  
Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln  
1                5                   10                   15  
  
Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
20              25                   30  
  
Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu  
35              40                   45  
  
Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala  
50              55                   60  
  
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Xaa Asn Gln Val  
65              70                   75                   80  
  
Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Pro Val Asp Thr Ala Xaa Tyr Tyr  
85              90                   95  
  
Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
100            105                   110  
  
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
25              115                   120  
  
<210> 29  
<211> 120  
<212> PRT  
30            <213> Artificial  
  
<220>

<223> Secuencia consenso de hBU12 sintética para la región variable de cadena pesada (línea germinal VH4-31/JH4)

```

5   <220>
    <221> MOD_RES
    <222> (24) .. (24)
    <223> Xaa es Phe o Val

10  <220>
    <221> MOD_RES
    <222> (27)..(27)
    <223> Xaa es Phe o Gly

15  <220>
    <221> MOD_RES
    <222> (29) .. (29)
    <223> Xaa es Leu o Ile

20  <220>
    <221> MOD_RES
    <222> (73) .. (73)
    <223> Xaa es Lys o Val

25  <220>
    <221> MOD_RES
    <222> (77)..(77)
    <223> Xaa es Ser o Lys

30  <220>
    <221> MOD_RES
    <222> (80)..(80)
    <223> Xaa es Val o Phe

35  <220>
    <221> MOD_RES
    <222> (81)..(81)
    <223> Xaa es Phe o Ser

40  <220>
    <221> MOD_RES
    <222> (94) .. (94)
    <223> Xaa es Ala o Val

45  <400> 29
    Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
    1           5           10          15

    Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Xaa Ser Gly Xaa Ser Xaa Ser Thr Ser
    20          25          30

```

ES 2 599 172 T3

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

Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala  
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Xaa Asp Thr Ser Xaa Asn Gln Xaa  
65 70 75 80

Xaa Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Xaa Tyr Tyr  
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 30

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia consenso de hBU12 sintética para la región variable de cadena ligera (línea germinal VL-L6/Jk2)

10

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es Asn o Ile

15

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (39)..(39)

<223> Xaa es Ser o Pro

20

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (40) .. (40)

<223> Xaa es Ser o Gly

25

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (41) .. (41)

<223> Xaa es Thr o Gln

30

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (68) .. (68)

<223> Xaa es Asn o Thr

35

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (69) .. (69)

<223> Xaa es Ser o Asp

40

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (70)..(70)

ES 2 599 172 T3

<223> Xaa es His o Phe  
 5      <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (71) .. (71)  
 <223> Xaa es Phe o Thr  
 10     <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (82)..(82)  
 <223> Xaa es Val o Phe  
 <400> 30

Glu	Xaa	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1					5					10					15

Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met
												20	25	30	

His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Xaa	Xaa	Xaa	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr
						35								45	

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

Gly	Ser	Gly	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu
							65					70	75	80	

Asp	Xaa	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly	Ser	Val	Tyr	Pro	Phe	Thr
							85					90		95	

Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg					
15							100				105				

<210> 31  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 20     <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia consenso de hBU12 sintética para la región variable de cadena ligera (línea germinal VL-A10/Jk2)

25     <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Asn o Ile

30     <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (70)..(70)  
 <223> Xaa es His o Phe

35     <400> 31

ES 2 599 172 T3

Glu Xaa Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys  
1                       5                                   10                       15

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Lys  
35                      40                                   45

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

Gly Ser Gly Thr Asp Xaa Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu  
65                      70                                   75                       80

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100                    105

<210> 32

<211> 120

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Secuencia consenso de hBU12 sintética para la región variable de cadena pesada (línea germinal VH2-  
70/JH1-6)

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (77)..(77)

15 <223> Xaa es Ser o Lys

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (81)..(81)

20 <223> Xaa es Phe o Val

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (83)..(83)

25 <223> Xaa es Lys o Thr

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (84)..(84)

30 <223> Xaa es Ile o Met

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (85)..(85)

35 <223> Xaa es Ala o Thr

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (86)..(86)

40 <223> Xaa es Ser o Asn

ES 2 599 172 T3

5 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (87)..(87)  
<223> Xaa es Val o Met

10 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (94)..(94)  
<223> Xaa es Ala o Thr

15 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (112)..(112)  
<223> Xaa es Gln o Arg

20 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (115)..(115)  
<223> Xaa es Leu, Thr, o Met

<400> 32

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln  
1 5 10 15

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

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala  
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Xaa Asn Gln Val  
65 70 75 80

Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Pro Val Asp Thr Ala Xaa Tyr Tyr  
85 90 95  
Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Xaa  
100 105 110

25 Gly Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser  
115 120

30 <210> 33  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> Artificial

35 <220>  
<223> Secuencia consenso de hBU12 sintética para la región variable de cadena pesada (línea germinal VH4-31/JH1-6)

<220>  
<221> MOD\_RES

<222> (24)..(24)  
 <223> Xaa es Phe o Val

5        <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Xaa es Phe o Gly

10      <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (29)..(29)  
 <223> Xaa es Leu o Ile

15      <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (73)..(73)  
 <223> Xaa es Lys o Val

20      <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (77)..(77)  
 <223> Xaa es Ser o Lys

25      <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (80)..(80)  
 <223> Xaa es Val o Phe

30      <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (81)..(81)  
 <223> Xaa es Phe o Ser

35      <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (94)..(94)  
 <223> Xaa es Ala o Val

40      <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (112)..(112)  
 <223> Xaa es Gln o Arg

45      <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (115)..(115)  
 <223> Xaa es Leu, Thr, o Met

50      <400> 33

# ES 2 599 172 T3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Xaa Ser Gly Xaa Ser Xaa Ser Thr Ser  
 20               25               30

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

Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala  
 50               55               60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Xaa Asp Thr Ser Xaa Asn Gln Xaa  
 65               70               75               80

Xaa Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Xaa Tyr Tyr  
 85               90               95

Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Xaa  
 100              105              110

Gly Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser  
 115              120              .

<210> 34

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Secuencia consenso de hBU12 sintética para la región variable de cadena ligera (línea germinal VL-L6/Jk1-5)

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)

15 <223> Xaa es Asn o Ile

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (39)..(39)

20 <223> Xaa es Ser o Pro

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (40)..(40)

25 <223> Xaa es Ser o Gly

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (41)..(41)

30 <223> Xaa es Thr o Gln

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (68)..(68)

35 <223> Xaa es Asn o Thr

5           <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (69)..(69)  
 <223> Xaa es Ser o Asp  
 10          <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (70)..(70)  
 <223> Xaa es His o Phe  
 15          <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (71)..(71)  
 <223> Xaa es Phe o Thr  
 20          <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (82)..(82)  
 <223> Xaa es Val o Phe  
 25          <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (99)..(99)  
 <223> Xaa es Gln, Pro o Gly  
 30          <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (102)..(102)  
 <223> Xaa es Lys o Arg  
 35          <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (104)..(104)  
 <223> Xaa es Glu o Asp  
 40          <400> 34

Glu	Xaa	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1		5		10				15							

ES 2 599 172 T3

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Xaa Xaa Xaa Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr  
35 40 45

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

Gly Ser Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
65 70 75 80

Asp Xaa Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr  
85 90 95

Phe Gly Xaa Gly Thr Xaa Xaa Xaa Ile Lys Arg  
100 105

<210> 35

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Secuencia consenso de hBU12 sintética para la región variable de cadena ligera (línea germinal VL-A10/Jk1-5)

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)

15 <223> Xaa es Asn o Ile

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (70)..(70)

20 <223> Xaa es His o Phe

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (99)..(99)

25 <223> Xaa es Gln, Pro o Gly

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (102)..(102)

30 <223> Xaa es Lys o Arg

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (103)..(103)

35 <223> Xaa es Leu o Val

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (104)..(104)

40 <223> Xaa es Glu o Asp

<400> 35

ES 2 599 172 T3

Glu Xaa Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys  
1 5 10 15

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Lys  
35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Asp Xaa Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu  
65 70 75 80

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

Phe Gly Xaa Gly Thr Xaa Xaa Xaa Ile Lys Arg  
100 105

<210> 36

<211> 326

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Dominio constante de cadena pesada de hBU12 sintética (IgG2)

10 <400> 36

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

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

## ES 2 599 172 T3

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr  
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn  
165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp  
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro  
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325

ES 2 599 172 T3

<210> 37  
<211> 290  
<212> PRT  
<213> Artificial

5

<220>  
<223> Dominio constante de cadena pesada de hBU12 sintética (IgG3)

10 <400> 37

Gln Met Gln Gly Val Asn Cys Thr Val Ser Ser Glu Leu Lys Thr Pro  
1 5 10 15

Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser  
20 25 30

Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys  
35 40 45

Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
50 55 60

Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
65 70 75 80

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
85 90 95

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
100 105 110

Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Gln Val His  
115 120 125

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Gln Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg  
130 135 140

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asn Trp Leu Asp Gly Lys  
145 150 155 160

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
165 170 175

ES 2 599 172 T3

Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
180 185 190

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
195 200 205

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
210 215 220

Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met  
225 230 235 240

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
245 250 255

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His  
260 265 270

Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
275 280 285

Gly Lys  
290

<210> 38

<211> 327

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Dominio constante de cadena pesada de hBU12 sintética (IgG4)

10 <400> 38

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
65 70 75 80

ES 2 599 172 T3

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
           85               90               95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro  
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
165 170 175

Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp
					180			185					190		

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
210 215 220

Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys
225					230					235					240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser  
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
325  
G10 G2

ES 2 599 172 T3

<211> 330  
<212> PRT  
<213> Artificial

5 <220>  
<223> Variante de dominio constante de cadena pesada de hBU12 sintética (IgG1V1)

<400> 39

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
100 105 110

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
180 185 190

ES 2 599 172 T3

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325 330

<210> 40

<211> 57

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Región de cadena pesada de hBU12 sintética - secuencia líder

10 <400> 40

atggcaggc ttacttcttc attcttgtt ctgattgtcc ctgcataatgt cctgtcc 57

15 <210> 41

<211> 360

<212> ADN

<213> Artificial

20 <220>

<223> Región variable de cadena pesada de hBU12 sintética (línea germinal (VH4-31/JH4) - Variante HF

<400> 41

25 caggttcagc tgcaagagtc tggccctggg ttggtaagc cctcccagac cctcagtctg 60

## ES 2 599 172 T3

	acttgtactg tgtctgggg ttcaatcagc acttctggta tgggttagg ctggattagg	120
	cagcacccag ggaagggtct ggagtggatt ggacacattt ggtggatga tgacaagaga	180
	tataaccagg ccctgaagag cagagtgaca atctctgtgg atacctccaa gaaccagttt	240
	agectcaagc tgtccagtgt gacagctgca gatactgctg tctactactg tgctagaatg	300
	gaacttttgtt cctactatTT tgactactgg ggccaaggca cccttgcac agtctcctca	360
	<210> 42	
	<211> 993	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
10	<223> Dominio constante de cadena pesada de hBU12 sintética (IgG1)	
	<400> 42	
	gctagcacca agggcccatc ggtttcccc ctggcacccct cctccaagag cacctctgg	60
	ggcacagcg ggctggctg cctggtaag gactactcc cgaaccgggt gacgggtgtcg	120
	tggaaactca ggcgcctgac cagcggcgtg cacacccctcc cggtgtctt acagtctca	180
	ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgcctcca gcagcttggg cacccagacc	240
	tacatctgca acgtgaatca caagcccago aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc	300
	aaatcttgtg acaaaaactca cacatgccca ccgtgccag caccgtact cctgggggga	360
	ccgtcagtct tcctttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgtatctc ccggaccct	420
	gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	480
	tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgccggagga gcagtacaac	540
	agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtccctgacc aggactggct gaatggcaag	600
	gagtacaagt gcaaggcttc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc	660
	aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccggatgag	720
	ctgaccaaga accaggttcag cctgacctgc ctggtaaag gcttctatcc cagcgacatc	780
	gccgtggagt gggagagcaa tggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctccgtg	840
	ctggactccg acggctcctt ctccctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg	900
	cagcagggga acgtttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg	960
	cagaagagcc tctccctgtc tccggtaaa tga	993
15	<210> 43	
	<211> 66	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> Región de cadena ligera de hBU12 sintética - secuencia líder	
	<400> 43	

## ES 2 599 172 T3

atggattttc aagtgcagat tttcagcttc ctgctaataca gtgcctcagt cataatgtcc 60  
 agagga 66

5 <210> 44  
 <211> 321  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Región variable de cadena ligera de hBU12 sintética (línea germinal VL-L6/Jk2) - Variante LG  
 <400> 44

gaaattgttc tcacccagtc tccagcaacc ctgtctctct ctccaggaga aaggctacc 60  
 ctgagctgca gtgccagtc aagtgttaat tacatgcact ggtaccagca gaagccaggg 120  
 caggctcca gactcctgtat ttatgacaca tccaaactgg cttctggtat tccagcaagg 180  
 ttcagtggca gtgggtctgg aacagatttt acactcacaa tcagcagcct ggagccagag 240  
 gatgttgctg tctattactg ttttcagggg agtgtataacc cattcacttt tggccaaggg 300  
 acaaagttgg aaatcaaaaag a 321

15 <210> 45  
 <211> 321  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Dominio constante de cadena ligera de hBU12 sintética (dominio Kappa)  
 <400> 45

actgtggctg caccatctgt cttcatcttc ccgcctatctg atgagcagtt gaaatctgga 60  
 actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg 120  
 aaggtggata acgcctcca atcggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc 180  
 aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa 240  
 cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggctga gctcgccctg cacaaagagc 300

25 ttcaacaggg gagagtgtta g 321

<210> 46  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> CDR1 de cadena pesada de hBU12 sintética

35 <400> 46

Thr Ser Gly Met Gly Val Gly  
 1 5

40 <210> 47  
 <211> 16  
 <212> PRT

ES 2 599 172 T3

<213> Artificial  
5 <220>  
<223> CDR2 de cadena pesada de hBU12 sintética  
<400> 47

His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser  
1 5 10 15

10 <210> 48  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> CDR3 de cadena pesada de hBU12 sintética  
<400> 48

Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
20 1 5 10

<210> 49  
<211> 10  
<212> PRT  
25 <213> Artificial

<220>  
<223> CDR1 de cadena ligera de hBU12 sintética

30 <400> 49

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His  
1 5 10

35 <210> 50  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
40 <223> CDR2 de cadena ligera de hBU12 sintética  
<400> 50

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser  
45 1 5

<210> 51  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

50 <220>  
<223> CDR3 de cadena ligera de hBU12 sintética  
<400> 51

Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr  
55 1 5

<210> 52  
<211> 4  
60 <212> PRT

ES 2 599 172 T3

5           <213> Artificial  
          <220>  
          <223> Conector sintético  
          <400> 52  
            Gly Phe Leu Gly  
            1  
10          <210> 53  
          <211> 1410  
          <212> ADN  
          <213> Artificial  
15          <220>  
          <223> Secuencia sintética alternativa para la cadena pesada de hBU12  
          <400> 53  
            atgggatgga gctggatctt tctttcctc ctgtcagggaa ctgcagggtgt ccattgtcag       60  
            gttcagctgc aagagtctgg ccctggggttgg gttaagccct cccagaccct cagtctgact     120  
            tgtactgtgt ctgggggttc aatcagcaact tctggatgg gtgtaggctg gattaggcag     180  
            cacccagggaa agggtctggaa gtggattggaa cacatttgggt gggatgtgaa caagagatat   240  
            aaccccagccc tgaagagcag agtgacaatac tctgtggata cctccaagaa ccagtttagc    300  
            ctcaagctgt ccagtgtgac agctgcagat actgctgtct actactgtgc tagaatggaa    360  
            ctttggtcct actatTTGA ctactggggc caaggcacccc ttgtcacagt ctccctcagct    420  
            agcaccaagg gcccatctgt ctccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc    480  
            acagctgccct tgggctgcct ggtcaaggac tactccctg aacctgtgac agtgcctgg    540  
            aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccggt ctgtcctaca gtcctcagga    600  
            ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac    660  
20

# ES 2 599 172 T3

	atctgcaacg tgaatcacaa gcccagcaac accaagggtgg acaagaaaagt tgagcccaa	720
	tcttgtaca aaactcacac atgcccaccc tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg	780
	tcagtctcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccttgag	840
	gtcacatgct tgggtgggttga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtag	900
	gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc	960
	acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag	1020
	tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa	1080
	gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg	1140
	accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatccag cgacatcgcc	1200
	gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg	1260
	gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcacccg tggacaagag caggtggcag	1320
	caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacacag	1380
	aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga	1410
	<210> 54	
	<211> 57	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
10	<223> Secuencia líder sintética alternativa para la cadena pesada de hBU12	
	<400> 54	
	atggatgga gctggatctt tctttccctc ctgtcaggaa ctgcagggtgt ccattgt	57
15	<210> 55	
	<211> 993	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> Secuencia sintética alternativa para la cadena pesada de hBU12 - dominio constante	
	<400> 55	
	gctagcacca agggcccatc tgtctcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg	60
	ggcacagctg ccctgggctg cctggtaag gactacttcc ctgaacctgt gacagtgtcc	120
	tggaaactcag ggcgcctgac cagcggcgtg cacacccctcc cggctgtcc acagtcctca	180
	ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgcctcca gcagcttggg cacccagacc	240
	tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc	300
25	aaatcttgcg acaaaaactca cacatgccca ccgtgccca cacctgaact cctgggggga	360

# ES 2 599 172 T3

ccgtcagtct tcctttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct 420  
 gaggtcacat gcgtgggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480  
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgccggagga gcagtacaac 540  
 agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 600  
 gagtacaagt gcaaggcttc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660  
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag 720  
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780  
 gccgtggagt gggagagcaa tggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctccgtg 840  
 ctggactccg acggctcctt ctccctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900  
 cagcagggga acgtttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca 960  
 cagaagagcc tctccctgtc tccggtaaa tga 993

<210> 56

<211> 469

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia sintética alternativa para la cadena pesada de hBU12

10 <400> 56

Met	Gly	Trp	Ser	Trp	Ile	Phe	Leu	Phe	Leu	Leu	Ser	Gly	Thr	Ala	Gly
1															

Val	His	Cys	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys

Pro	Ser	Gln	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile

Ser	Thr	Ser	Gly	Met	Gly	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	His	Pro	Gly	Lys

Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	His	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Arg	Tyr

Asn	Pro	Ala	Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys

Asn	Gln	Phe	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala

ES 2 599 172 T3

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
130 135 140

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro

## ES 2 599 172 T3

	355	360	365
	Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln		
	370	375	380
	Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
	385	390	395
	400		
	Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr		
	405	410	415
	Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
	420	425	430
	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
	435	440	445
	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		
	450	455	460
	Leu Ser Pro Gly Lys		
	465		
	<210> 57		
	<211> 19		
5	<212> PRT		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia líder sintética alternativa para la cadena pesada de hBU12		
10	<400> 57		
	Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly		
	1	5	10
	15	15	
	Val His Cys		
15	<210> 58		
	<211> 699		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
20	<220>		
	<223> Secuencia sintética alternativa para la cadena ligera de hBU12		
	<400> 58		
	atgaagttgc ctgttaggct gttggtgctg atgttctgga ttcctgcttc cagcagtgaa	60	
25	attgttctca cccagttctcc agcaaccctg tctctctctc caggggaaag ggctaccctg	120	

# ES 2 599 172 T3

	agctgcagtg ccagctcaag tgtaagttac atgcactgg accagcagaa gccagggcag	180
	gctcccagac tcctgattt tgacacatcc aaactggctt ctggtattcc agcaagggtc	240
	agtggcagtg ggtctggaac agattttaca ctcacaatca gcagcctgga gccagaggat	300
	gttgctgtct attactgttt tcaggggagt gtataccat tcactttgg ccaagggaca	360
	aagttggaaa tcaaaagaac tgtggctgca ccatctgtct tcatcttccc gccatctgat	420
	gagcagttga aatctggaac tgccctgtt gtgtgcctgc tgaataactt ctatcccaga	480
	gaggccaaag tacagtggaa ggtggataac gccctccaat cggtaactc ccaggagagt	540
	gtcacagagc aggacagcaa ggacagcacc tacagcctca gcagcaccct gacgctgagc	600
	aaagcagact acgagaaaaca caaagtctac gcctgcgaag tcacccatca gggcctgagc	660
	tcgccccgtca caaagagctt caacagggga gagtgttag	699
	<210> 59	
	<211> 57	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia líder sintética alternativa para la cadena ligera de hBU12	
10	<400> 59	
	atgaagtgc ctgttaggt gtgggtgcgt atgttctgga ttccctgcgtc cagcagt	57
15	<210> 60	
	<211> 232	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> Secuencia sintética alternativa para la cadena ligera de hBU12	
	<400> 60	
	Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala	
	1                       5                       10                       15	
	Ser Ser Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu	
	20                      25                      30	
	Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val	
	35                      40                      45	
	Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu	
	50                      55                      60	
	Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe	
25	65                      70                      75                      80	

ES 2 599 172 T3

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu  
85 90 95

Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr  
100 105 110

Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val  
115 120 125

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys  
130 135 140

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg  
145 150 155 160

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn  
165 170 175

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser  
180 185 190

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

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

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
225 230

<210> 61

<211> 19

5 <212> PRT.

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia líder sintética alternativa para la cadena ligera de hBU12

10

<400> 61

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala  
1 5 10 15

Ser Ser Ser

**REIVINDICACIONES**

1. Un compuesto de conjugado ligando-fármaco de la fórmula siguiente:

L - (LU-D)p (I)

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de éste;

5 en la que:

L es una unidad de ligando en la que la unidad de ligando es un anticuerpo que se une específicamente a CD19 humana, que comprende una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO:9; y una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO:24, en la que el anticuerpo se une a CD19 con una constante de disociación de menos de  $10^{-7}$  M; y

10 (LU-D) es un resto unidad de conector-unidad de fármaco, en la que:

LU- es una unidad de conector, y

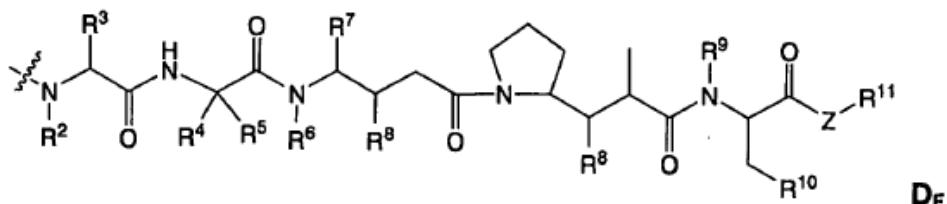
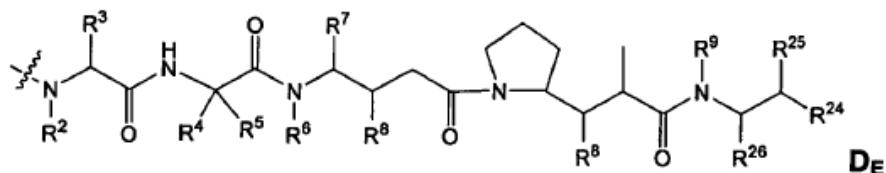
-D es una unidad de fármaco que tiene actividad citostática o citotóxica frente a las células diana; y

p es un número entero de 1 a aproximadamente 20,

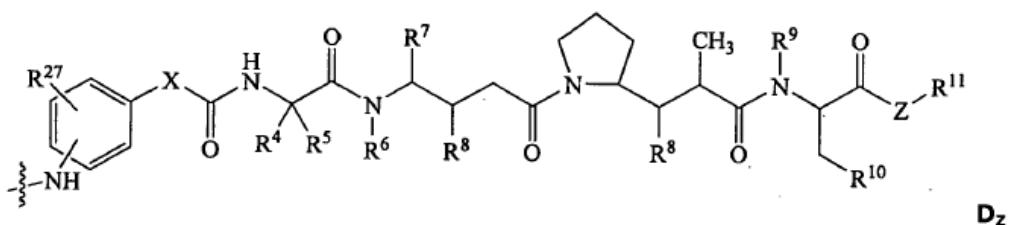
15 en la que el anticuerpo comprende una región constante de IgG humana, en el que el isotipo de la región constante de IgG es IgG1, IgG2, o IgG1V1.

2. El conjugado ligando-fármaco de la reivindicación 1, en el que el isotipo de la región constante de IgG es IgG1.

3. El compuesto de conjugado ligando-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 en el que la unidad de fármaco tiene la fórmula D<sub>E</sub>, D<sub>F</sub> o D<sub>Z</sub>:



20



o una forma de sal o solvato farmacéuticamente aceptable de éste;

en el que, independientemente en cada localización:

R<sup>2</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, o alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>;

25 R<sup>3</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, carbociclo, -alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo), arilo, -alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (arilo), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (arilo), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (arilo), heterociclo, -alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo), o -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo);

R<sup>4</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, carbociclo, -alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo), -alquenileno C<sub>2</sub>-

C<sub>20</sub> (carbociclo), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo), arilo, -alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (arilo), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (arilo), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (arilo), heterociclo, -alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo), o -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo);

R<sup>5</sup> es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;

o  $R^4$  y  $R^5$  forman conjuntamente un anillo carbocíclico y tiene la fórmula  $-(CR^aR^b)_s$  en la que  $R^a$  y  $R^b$  son independientemente H, alquilo  $C_1-C_{20}$ , alquenilo  $C_2-C_{20}$ , alquinilo  $C_2-C_{20}$ , o carbociclo y s es 2, 3, 4, 5 ó 6,

$R^6$  es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, o alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>;

R<sup>7</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, carbociclo, -alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo), arilo, -alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (arilo), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (arilo), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (arilo), heterociclo, -alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo), o -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo);

cada R<sup>8</sup> es independientemente H, OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>), -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), -O-(alquinilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>), o carbociclo;

R<sup>9</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, o alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>;

15 R<sup>24</sup> es arilo, heterociclo, o carbociclo;

$R^{25}$  es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, carbociclo, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>), -O(-alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), o OR<sup>18</sup> en el que R<sup>18</sup> es H, un grupo protector hidroxilo, o un enlace directo en el que OR<sup>18</sup> representa =O;

R<sup>26</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, o alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, arilo, heterociclo, o carbociclo;

20 R<sup>10</sup> es arilo o heterociclo;

Z es O, S, NH, o NR<sup>12</sup>, en el que R<sup>12</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, o alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>;

R<sup>11</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, carbociclo, -alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (carbociclo), arilo, -alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (arilo), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (arilo), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (arilo), heterociclo, -alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo), -alquenileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo), -alquinileno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (heterociclo);

$$-(R^{13}O)_m-R^{14}, \quad O-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2;$$

m es un número entero que varía de 1-1.000;

$R^{13}$  es alquíleno  $C_2-C_{20}$ , alquenileno  $C_2-C_{20}$ , o alquinileno  $C_2-C_{20}$ :

$R^{14}$  es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, o alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>;

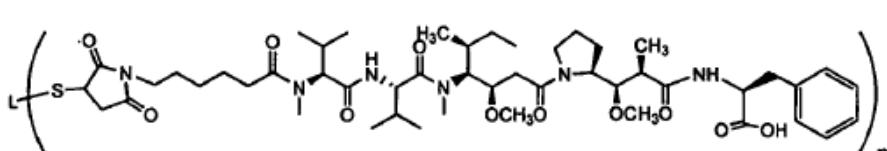
- $(CH_2)_nSO_3$ -alquenilo  $C_2-C_{20}$ , o - $(CH_2)_nSO_3$ -alquinilo  $C_2-C_{20}$ ;

cada aparición de  $R^{16}$  es independiente

n es un número entero que varía de 0 a 6;  
 35 R<sup>27</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>), -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), halógeno, -NO<sub>2</sub>, -COOH, o -C(O)OR<sup>28</sup> en el que R<sup>28</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, arilo heterociclo, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>H, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>CH<sub>3</sub>, o -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)OH; en el que r es un número entero que

X es  $-(CR^{29})_I$ , en el que  $R^{29}$  es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> y I es un número entero que varía de 0 a 10; en el que dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquieno, alquenieno, alquinieno, arilo, carbociclo,

<sup>4</sup> Elgar, *International Law and the United Nations Security Council*, 16 (1994).



- o una forma de sal o solvato farmacéuticamente aceptable de éste, en el que L es el anticuerpo y p es de 1 a 8.
5. El compuesto de conjugado ligando-fármaco de la reivindicación 1 en el que la unidad de fármaco es un agente citotóxico, y se selecciona de ligantes del surco menor del ADN, duocarmicinas, taxanos, puromicinas, alcaloides de vinca, CC-1065, SN-38, topotecán, morfolino-doxorrubicina, rizoxina, cianomorfolino-doxorrubicina, equinomicina, combretastatina, netropsina, epotilona A y B, estramustina, criptofisinas, cemadotina, maitansinoides, discodermolida, eleuterrobina, y mitoxantrona.
6. El conjugado ligando-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para uso como un medicamento.
7. El conjugado ligando-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para uso en el tratamiento de un trastorno asociado a CD19 en un sujeto mamífero, por ejemplo, un cáncer que expresa CD19, leucemia crónica, linfoma o mieloma múltiple; por ejemplo, leucemia linfoblástica aguda de tipo B, leucemia mielocítica crónica, leucemia linfocítica crónica, linfoma no de Hodgkin y linfoma de Hodgkin, linfoma de células B, o linfoma de células B grandes difuso; comprendiendo dicho tratamiento administrar una composición farmacéutica que comprende el conjugado ligando fármaco y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable en una cantidad efectiva para tratar el trastorno en el sujeto mamífero.
- 10 15 8. El conjugado ligando-fármaco para uso según la reivindicación 7, en el que el cáncer es un cáncer que es refractario a tratamiento con rituximab.

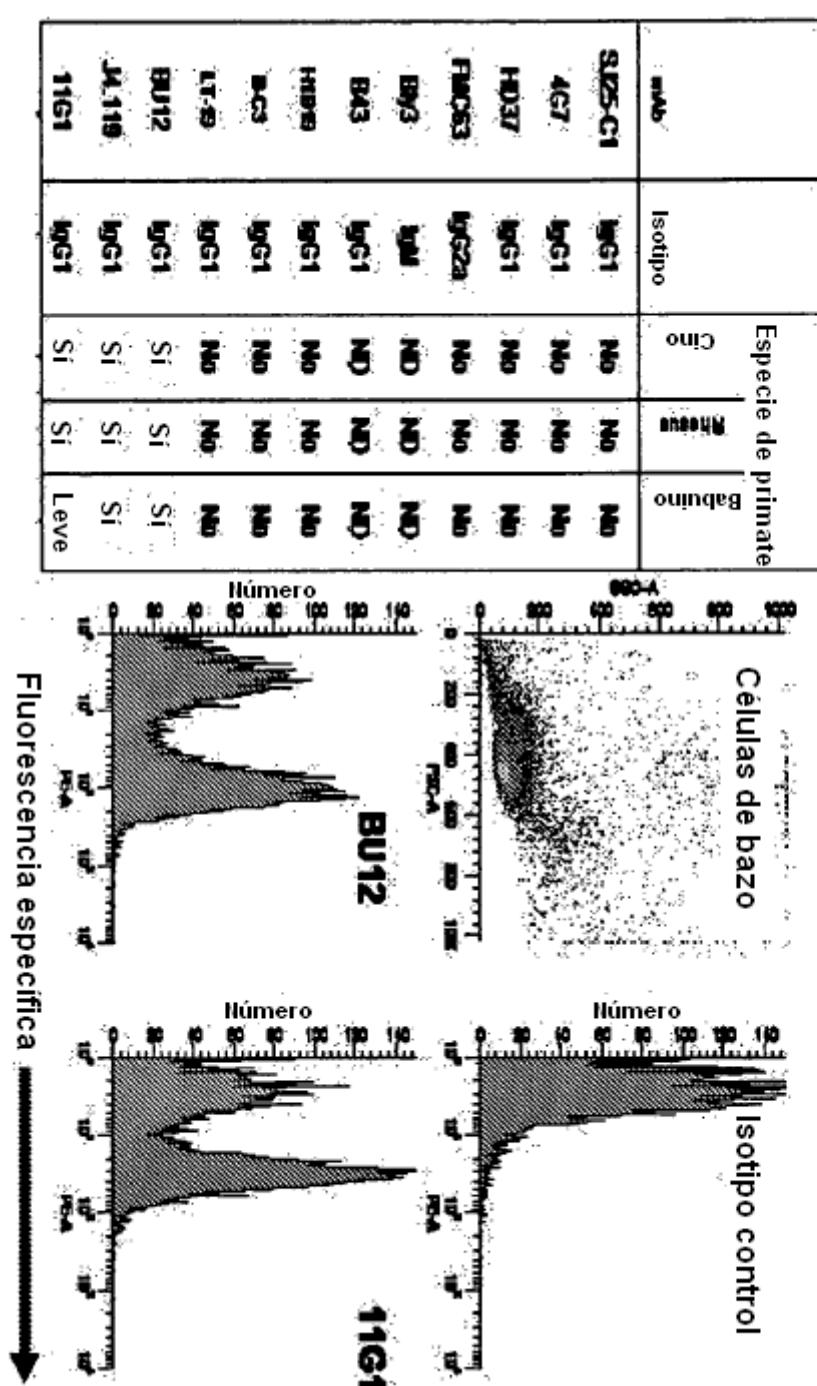


Figura 1

Figura 2

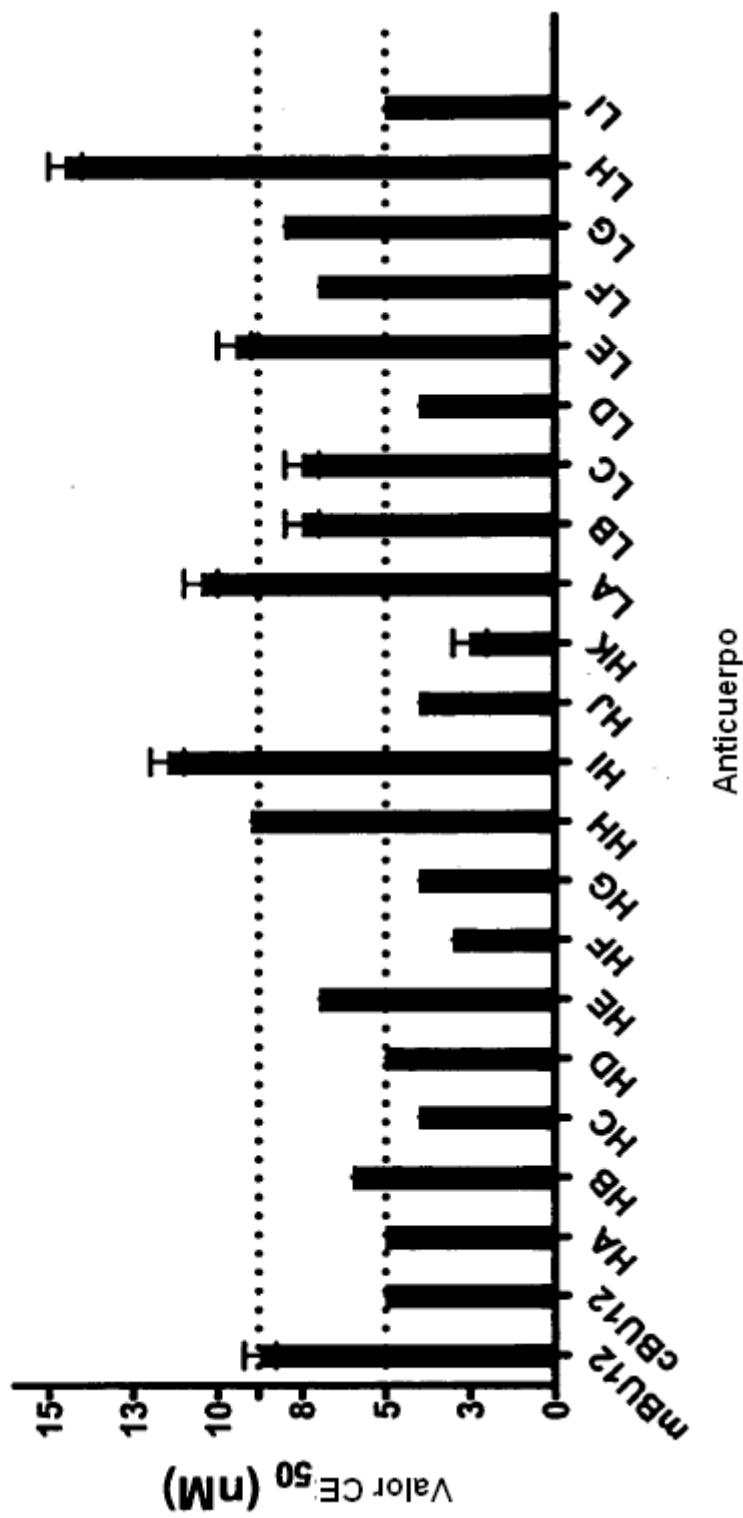


Figura 3

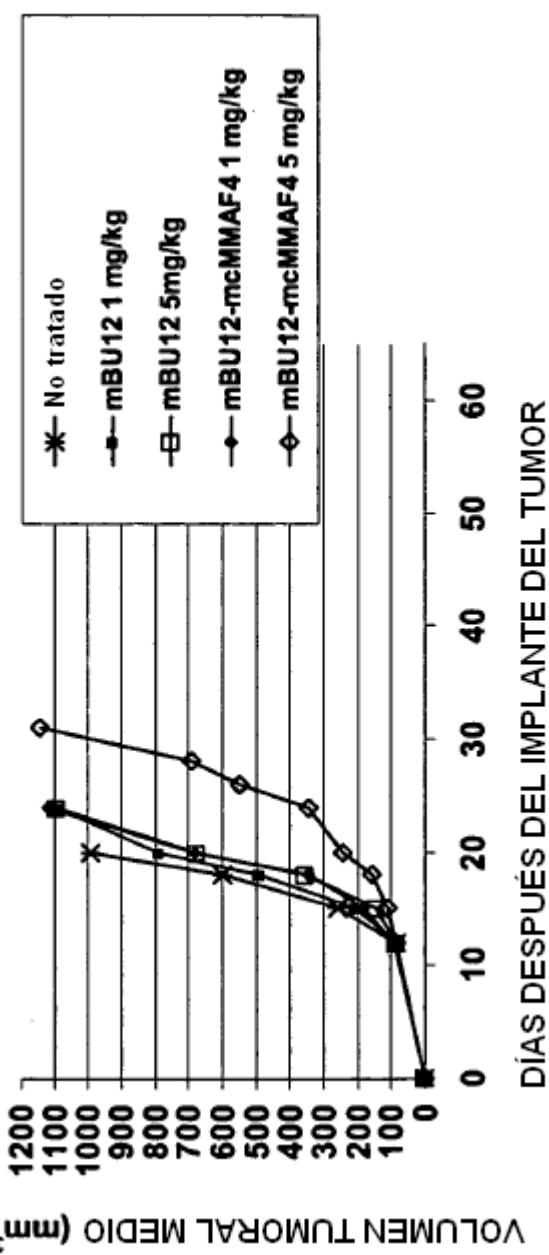


Figura 4

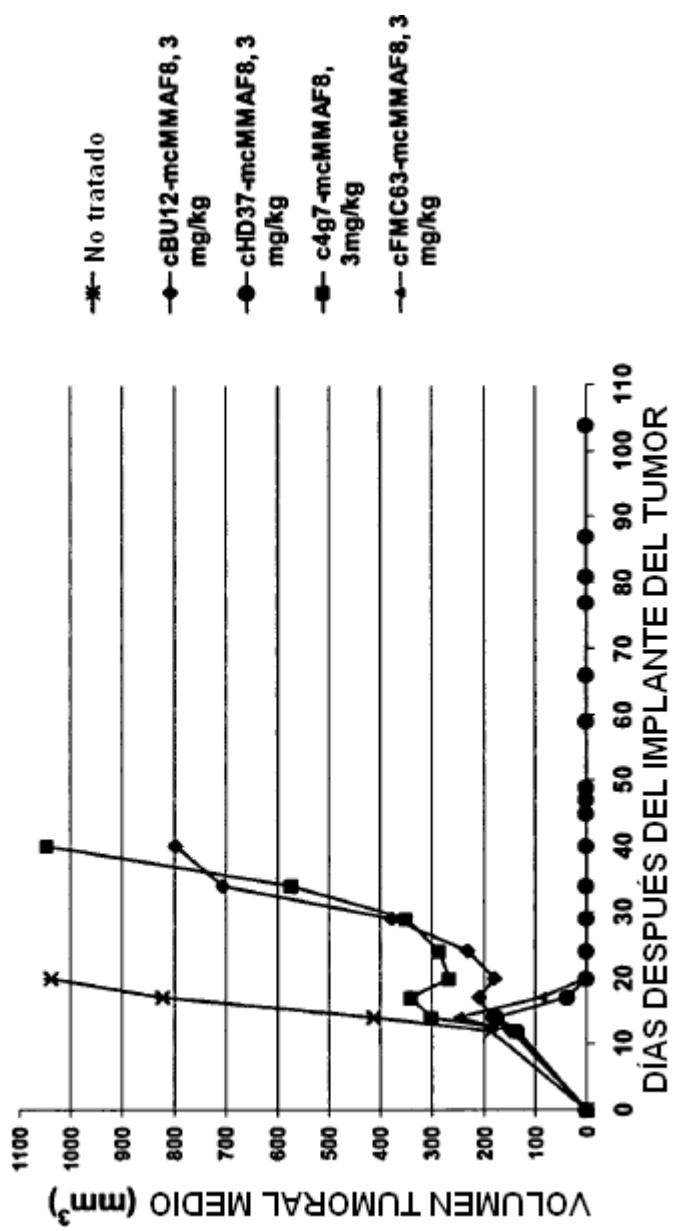


Figura 5

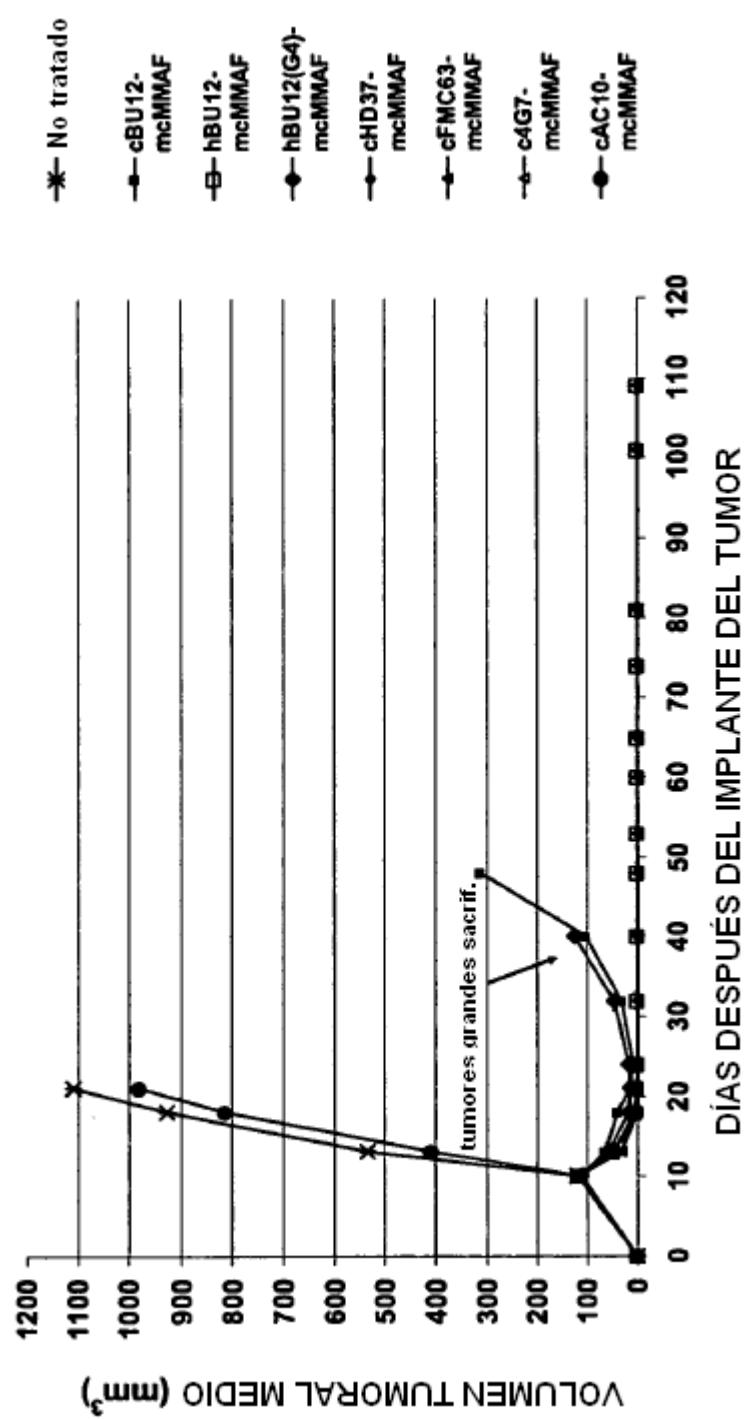


Figura 6

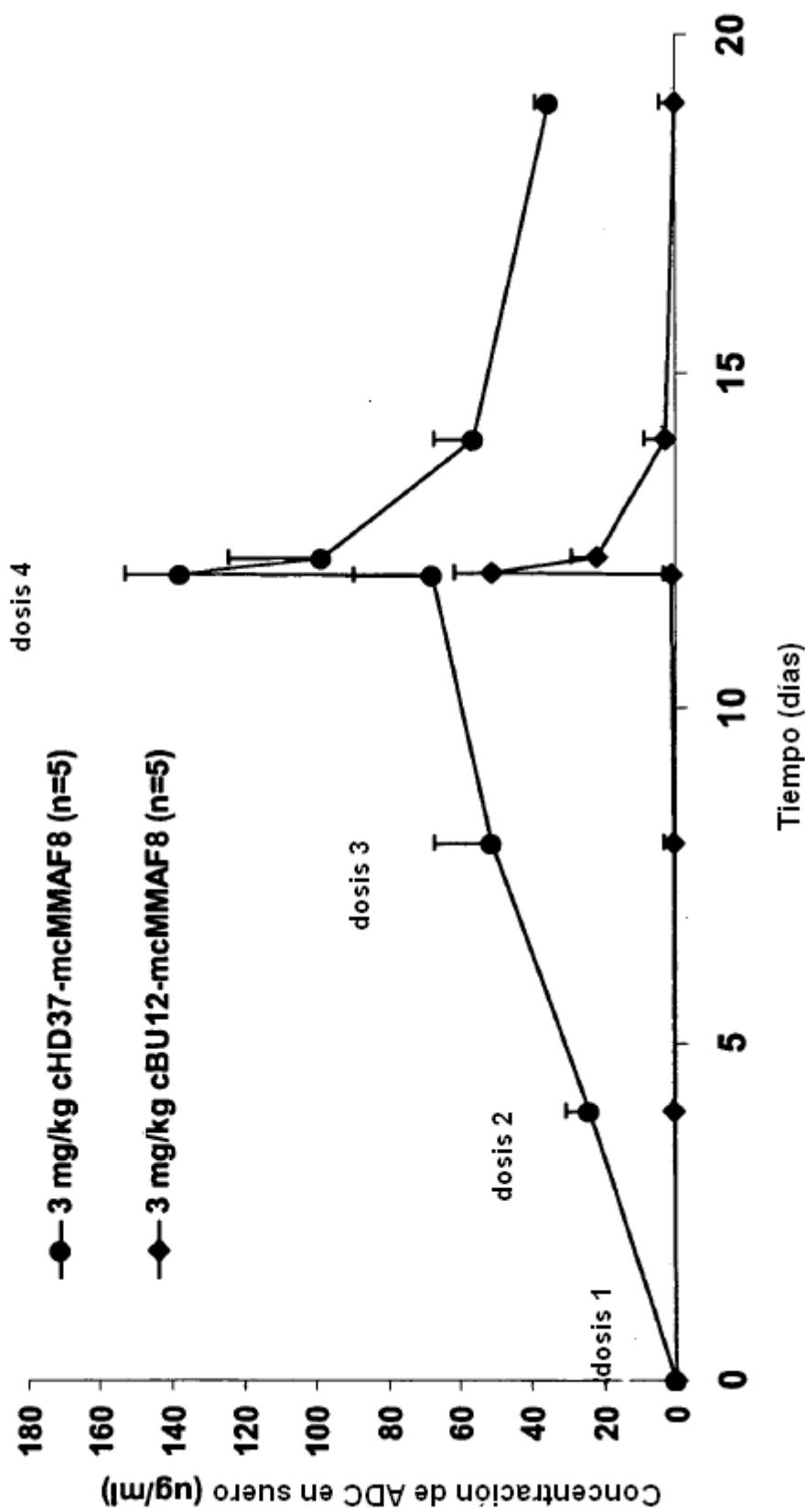


Figura 7

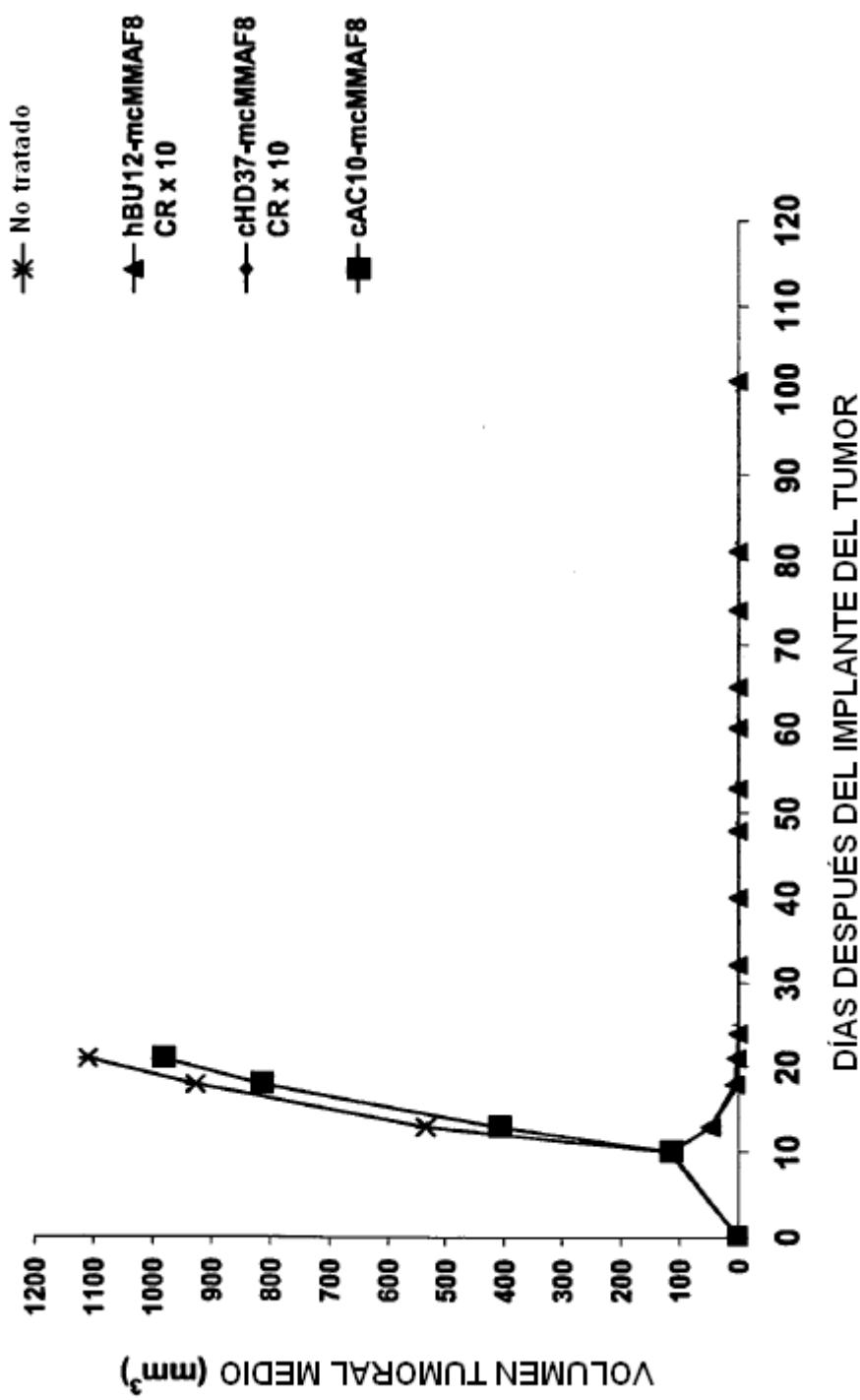
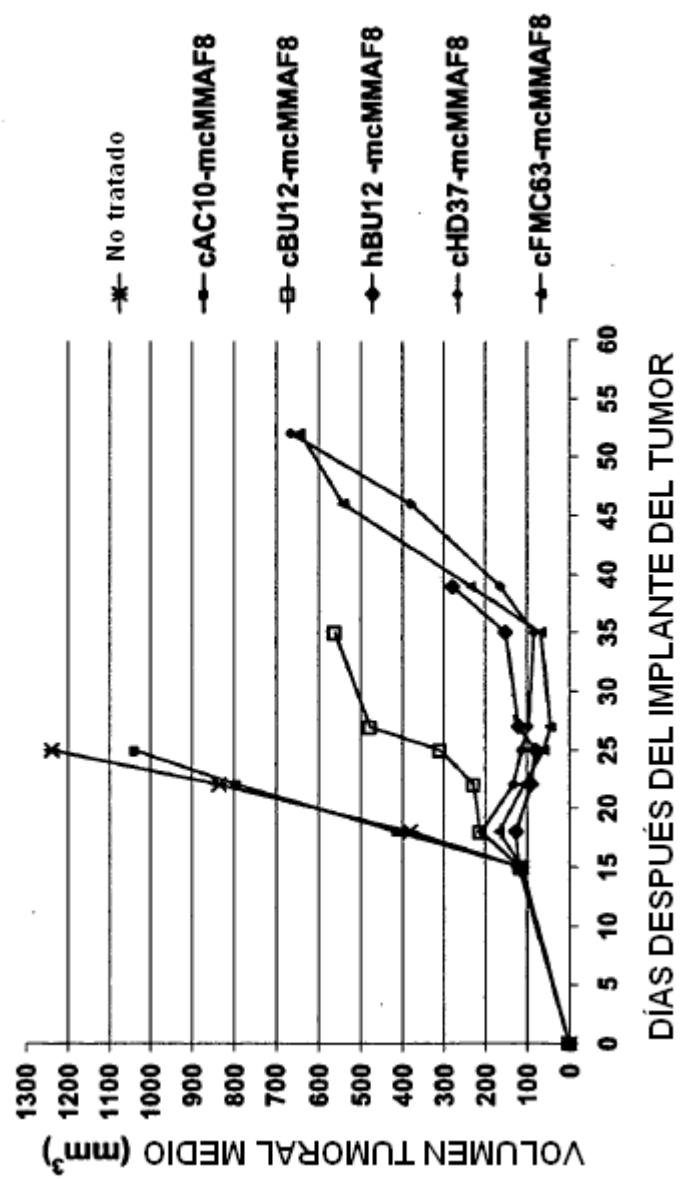


Figura 8



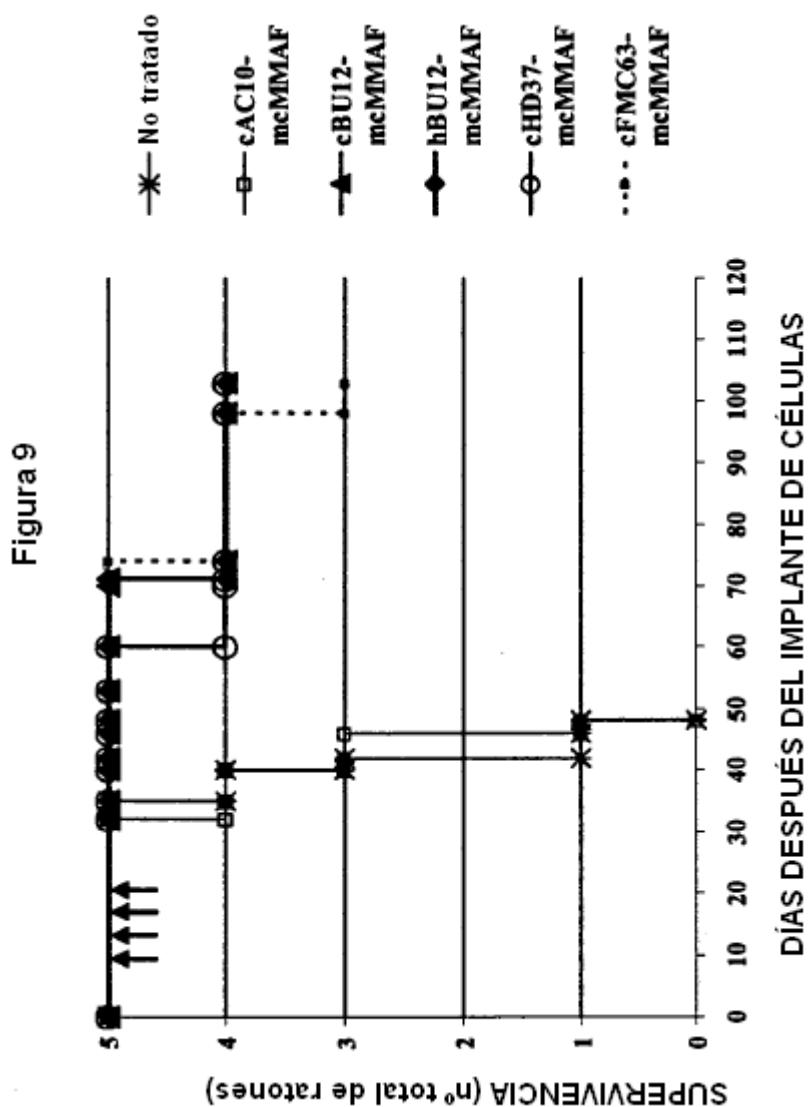


Figura 10

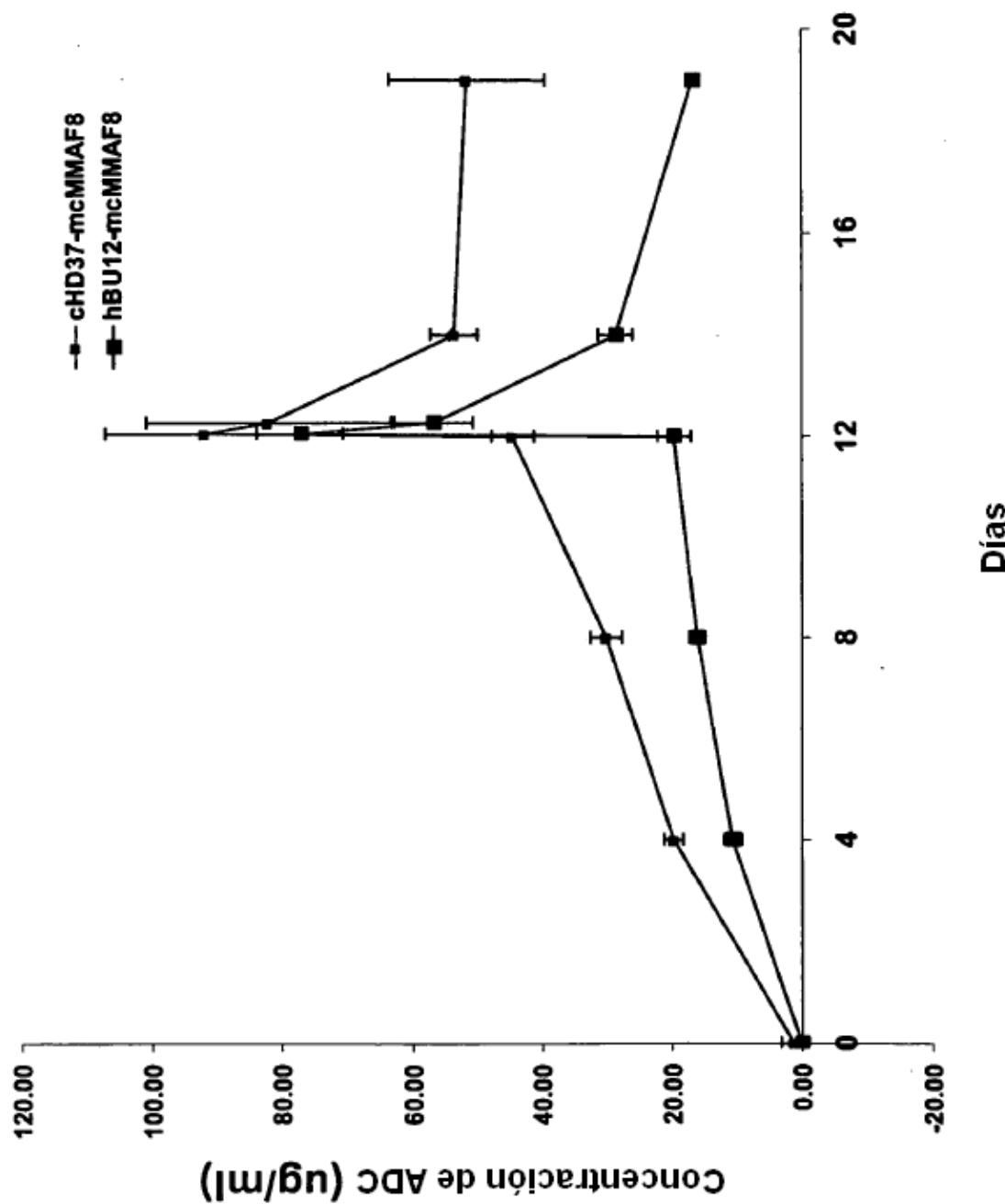


Figura 11

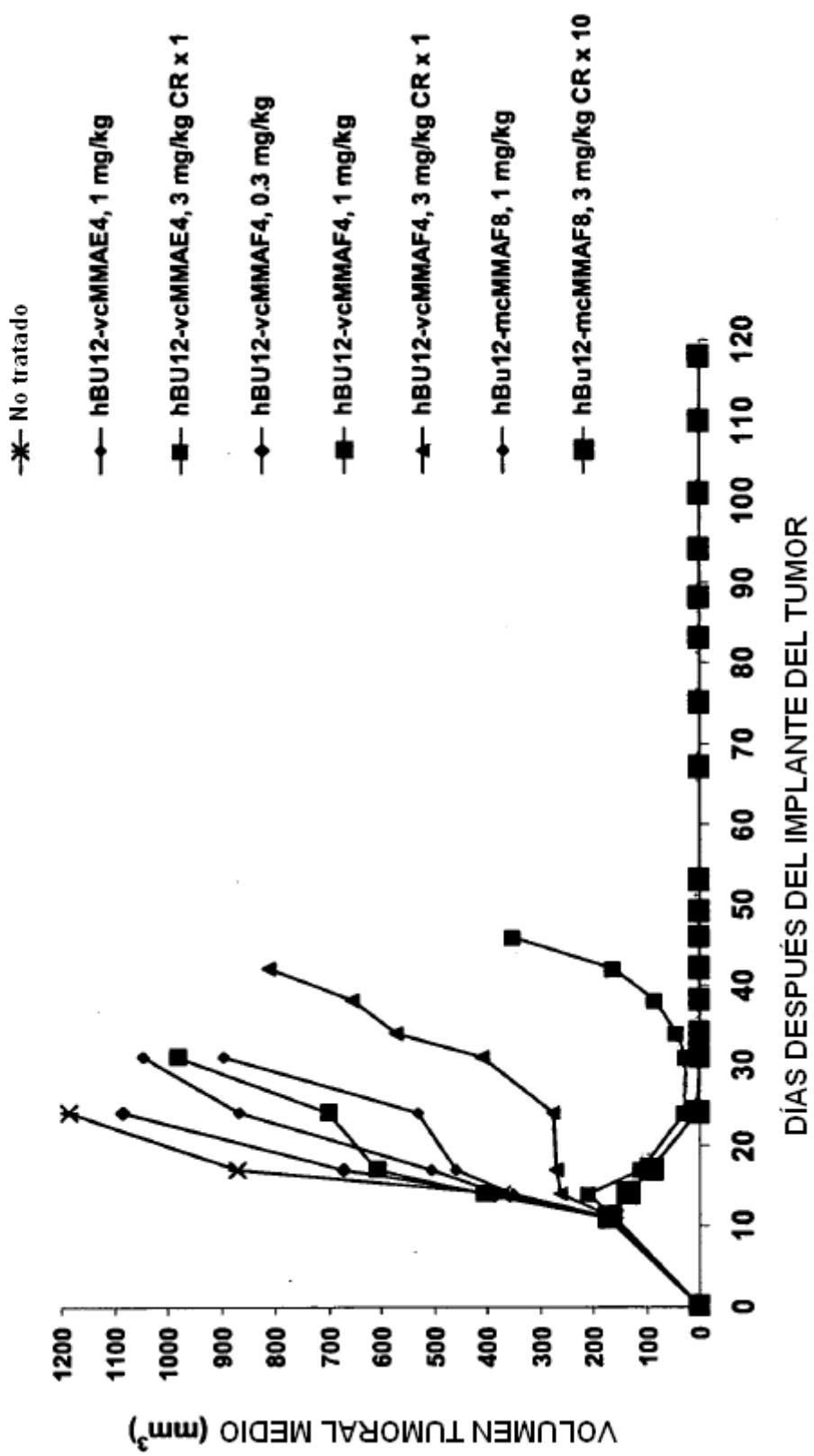


Figura 12

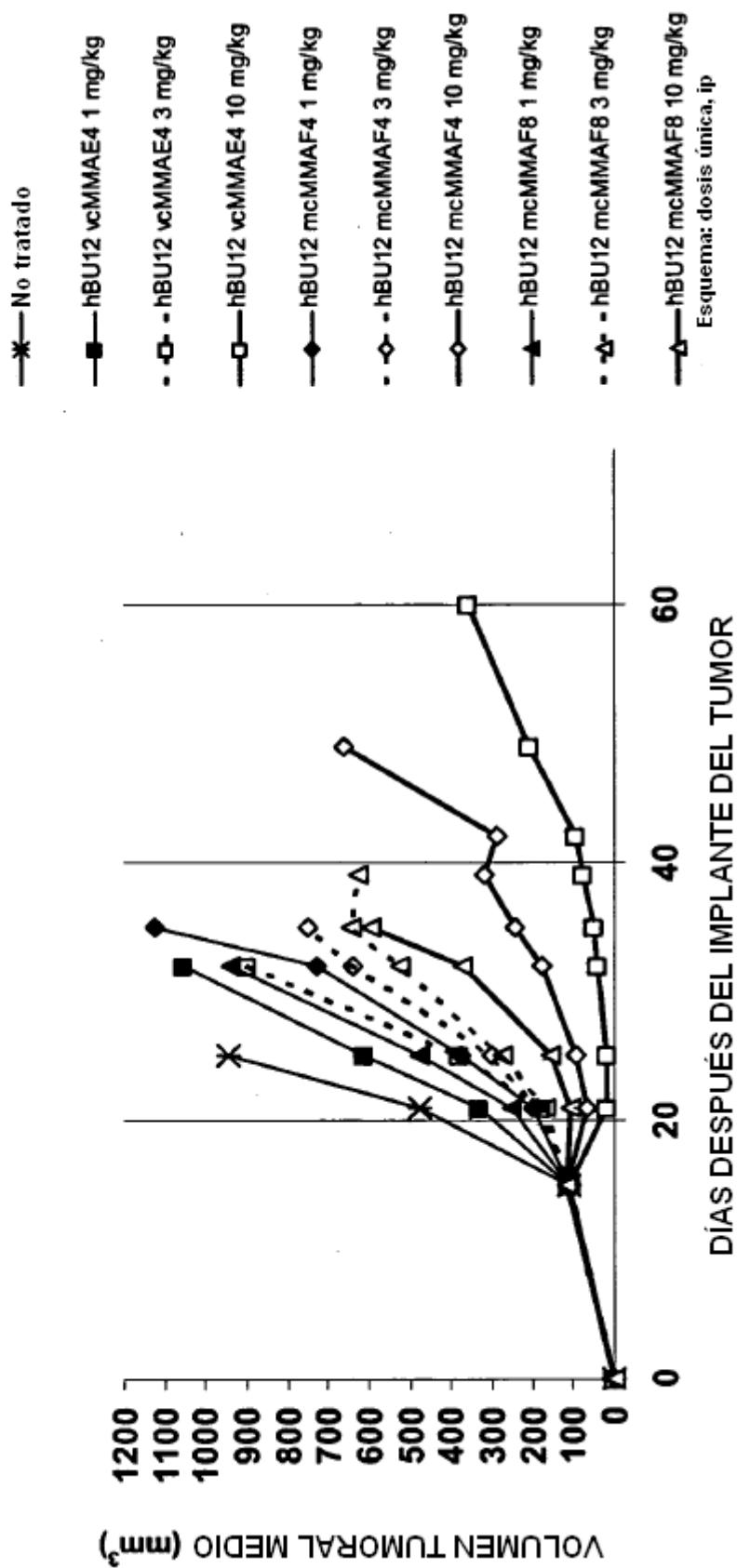


Figura 13

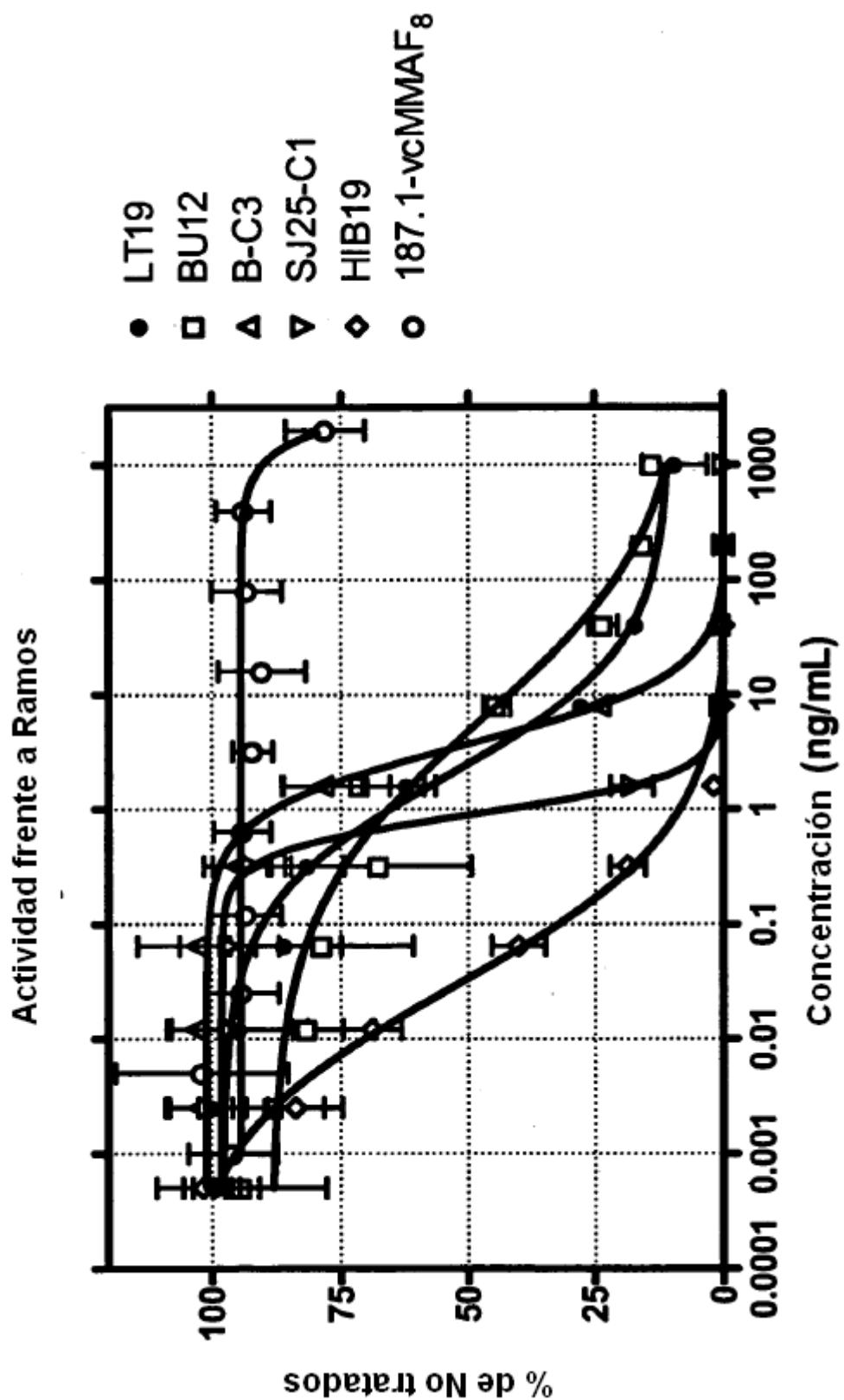
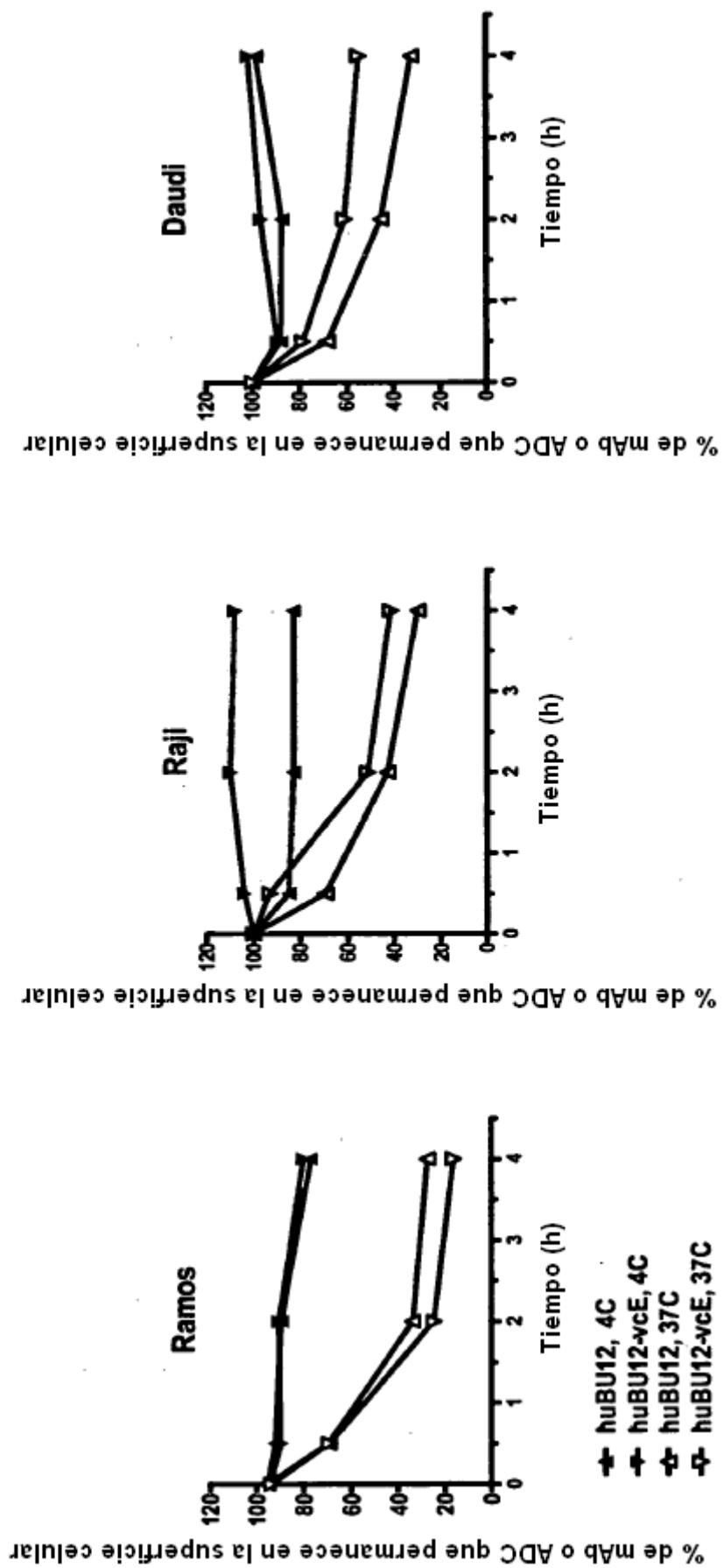


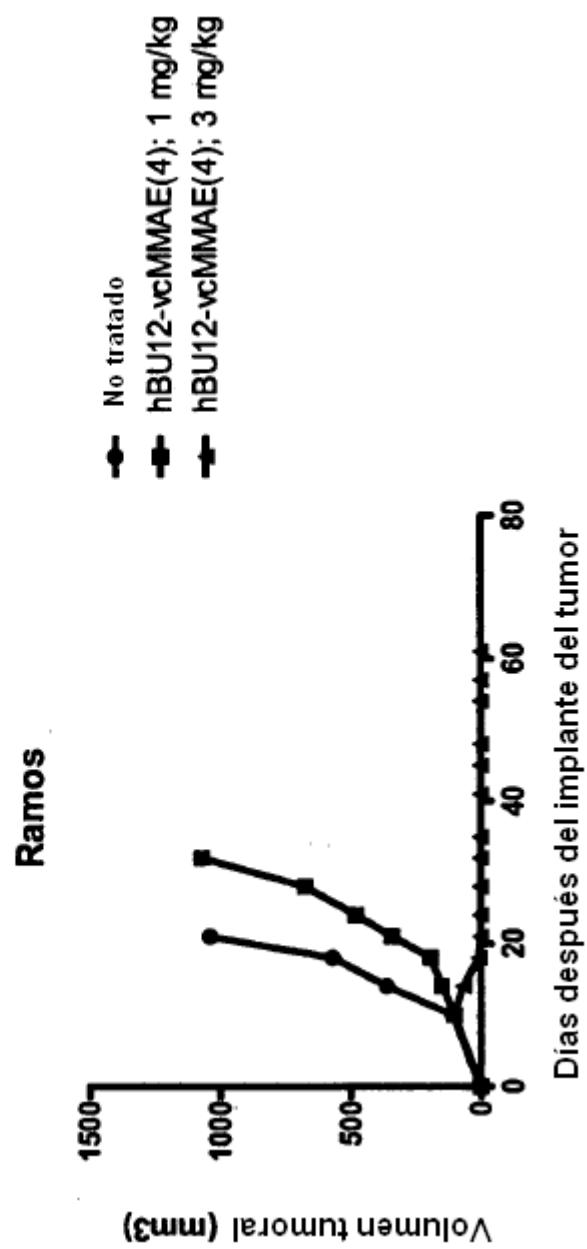
Figura 14

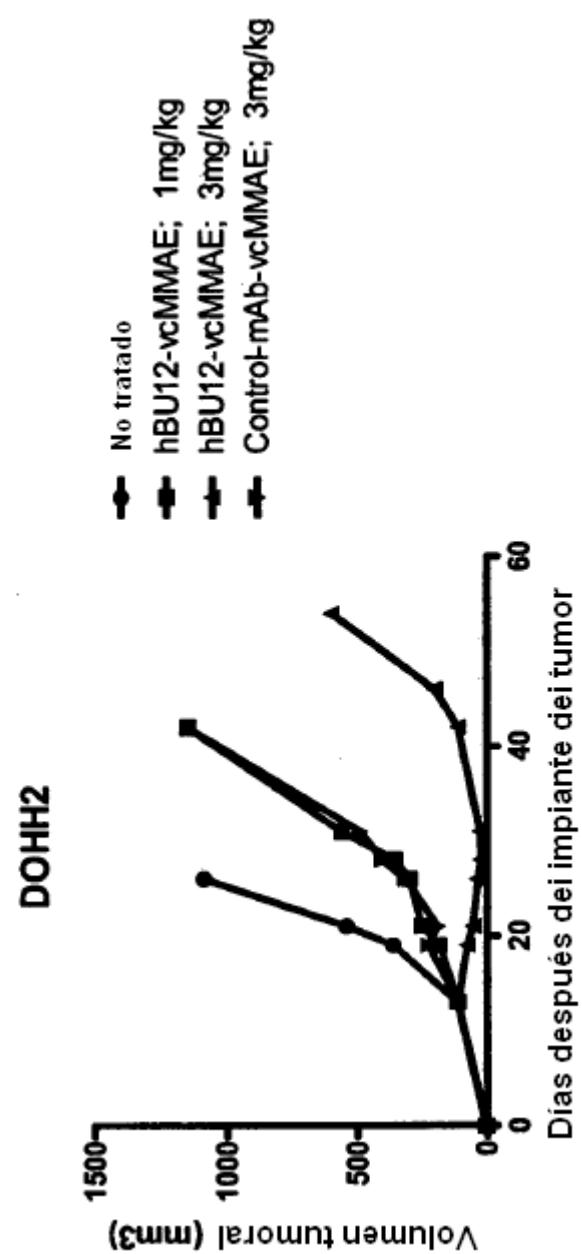
Indicación	Línea celular	CD21/ Célula	Cl <sub>50</sub> [nM] citotox	
			hBUI2- mcF(4)	hBUI2- vcE(4)
<b>ALL</b>	<b>Nalm-6</b>	0	53773	38
	<b>RS4;11</b>	0	38227	0.08
Linfoma Folicular	<b>DOHH2</b>	0	40056	5
	<b>WSU-NHL</b>	0	36242	0.06
<b>DLBCL</b>	<b>HT*</b>	952	36834	0.26
	<b>RL</b>	0	32542	208
	<b>WSU-DLCL2</b>	0	19924	209
	<b>CA46*</b>	2167	57240	0.5
de Burkitt	<b>Namalwa*</b>	374	28629	6
	<b>Ramos</b>	2369	41016	0.06
	<b>Daudi*</b>	25531	54074	>300
	<b>Raji</b>	56660	78798	>300
<b>CLL</b>	<b>MEC-2</b>	33246	67562	>300
	<b>JVM3</b>	17850	26321	67
Leucemia de células T	<b>Jurkat: CD19-</b>	0	>300	>300

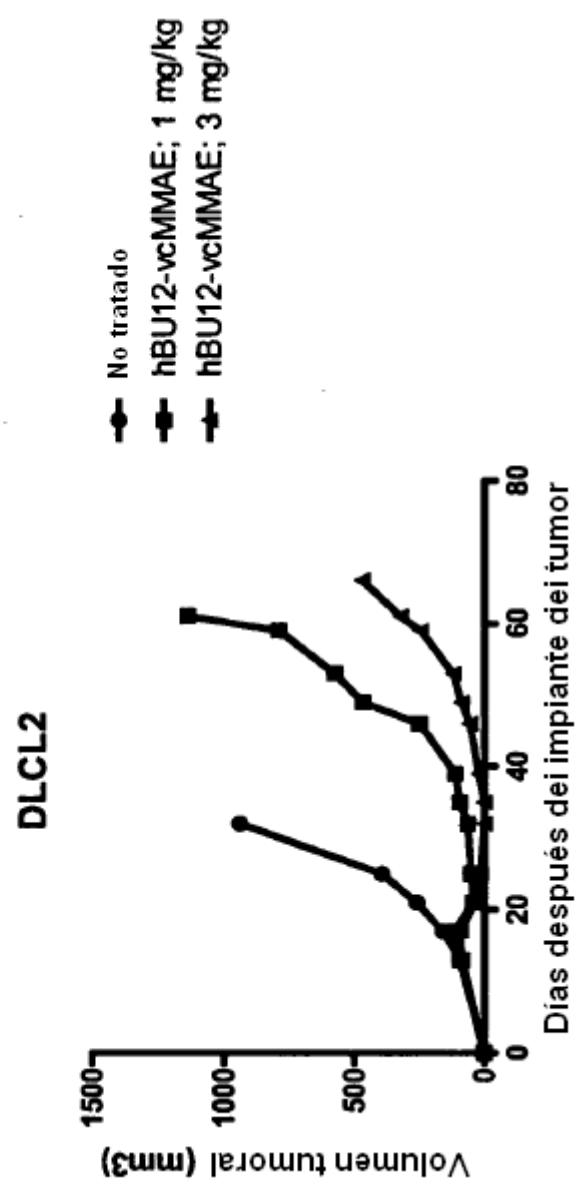
\* MHCII-mcMMAF(4) Cl50 = 0,5 nM;

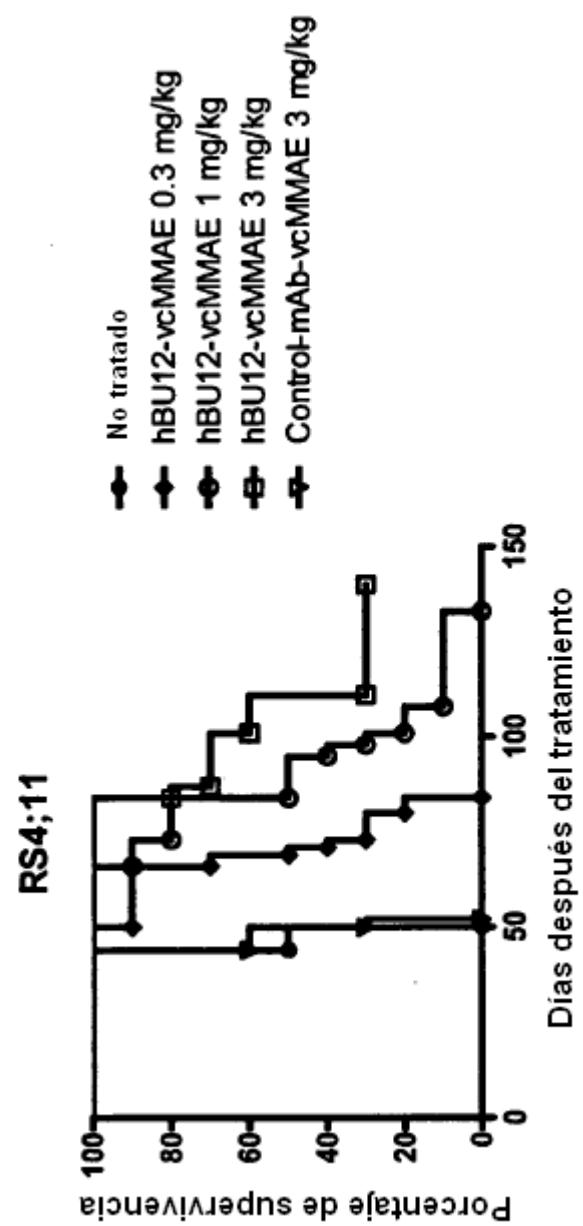
Figura 15



**Figura 16A**

**Figura 16B**

**Figura 16C**

**Figura 16D**

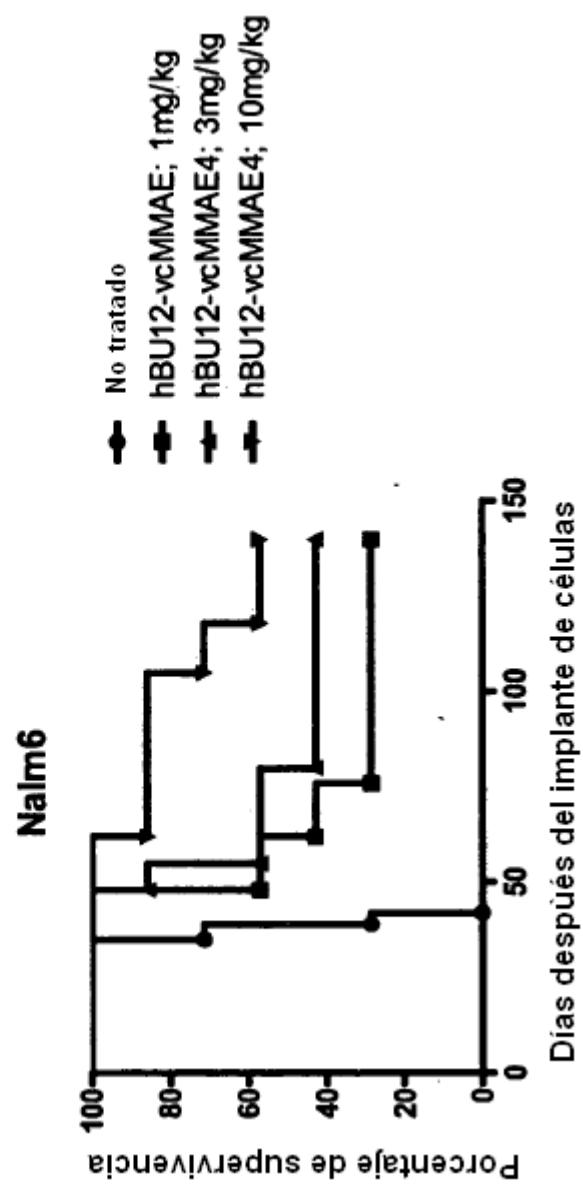
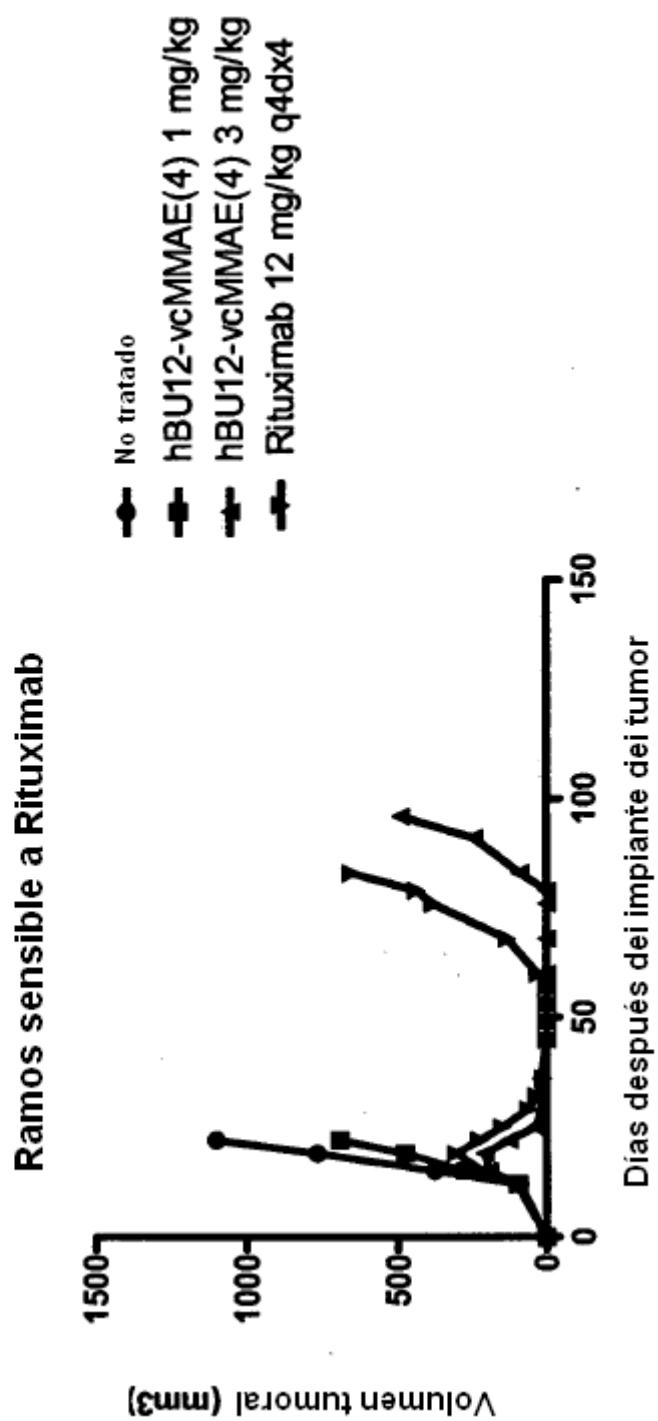
**Figura 16E**

Figura 17A



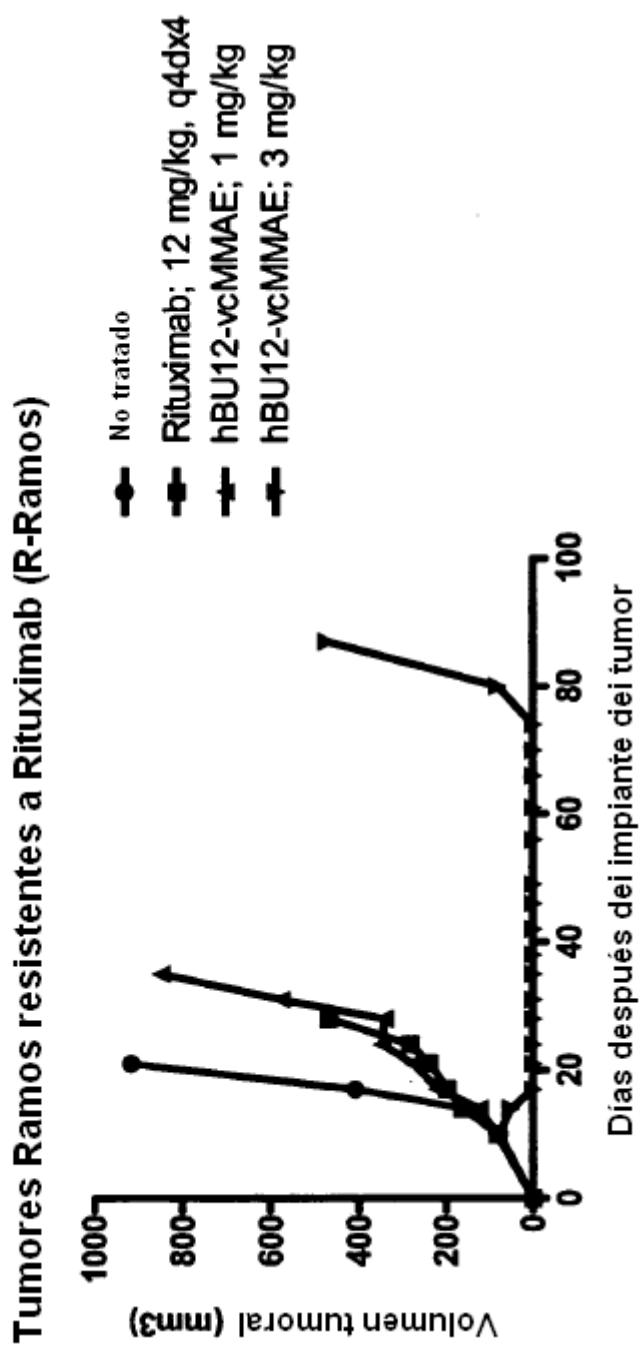
**Figura 17B**

Figura 17C

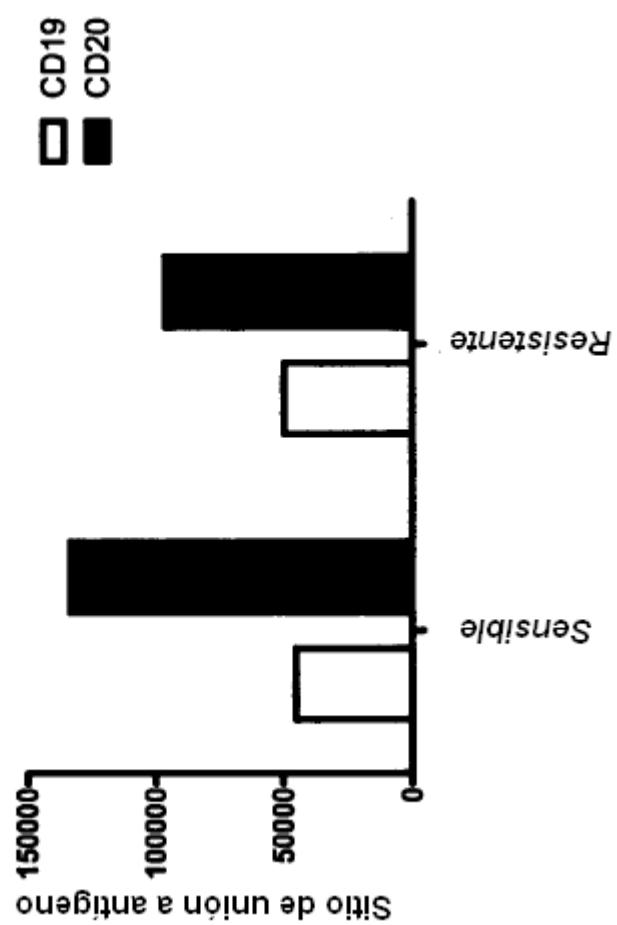


Figura 17D

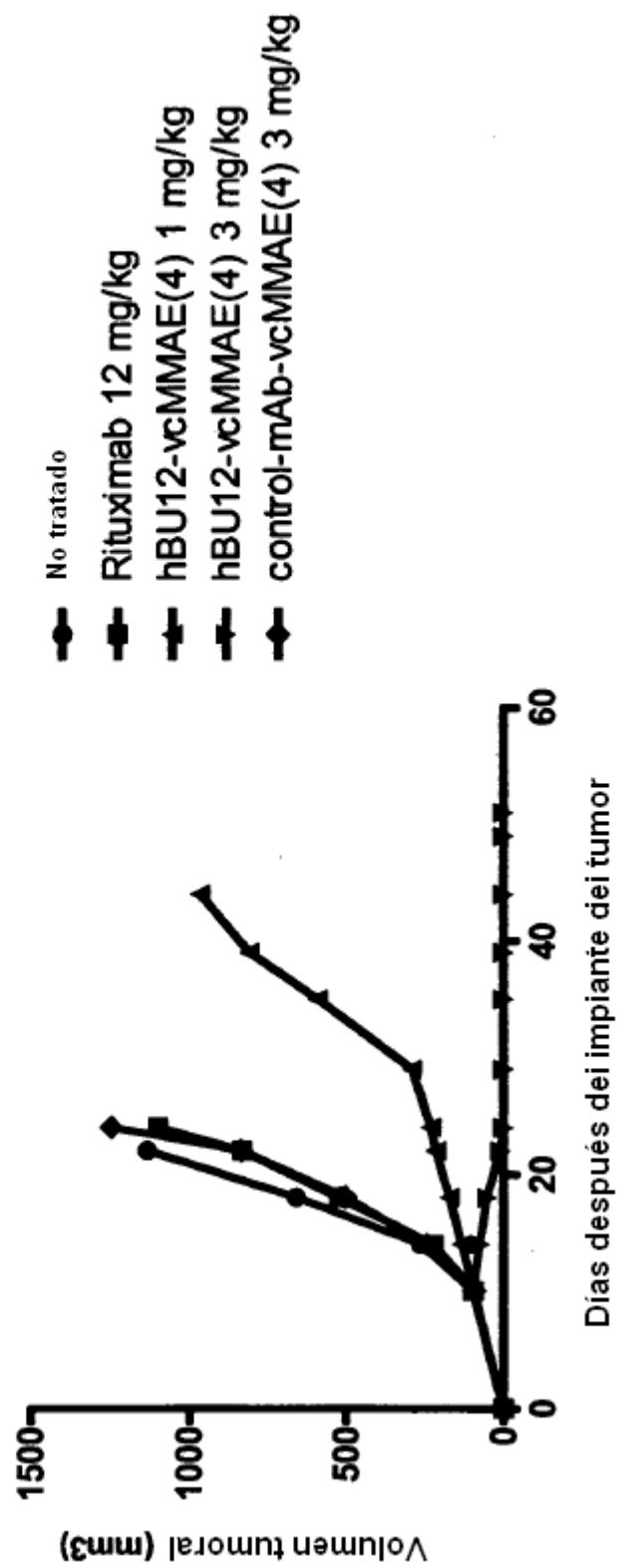


Figura 18

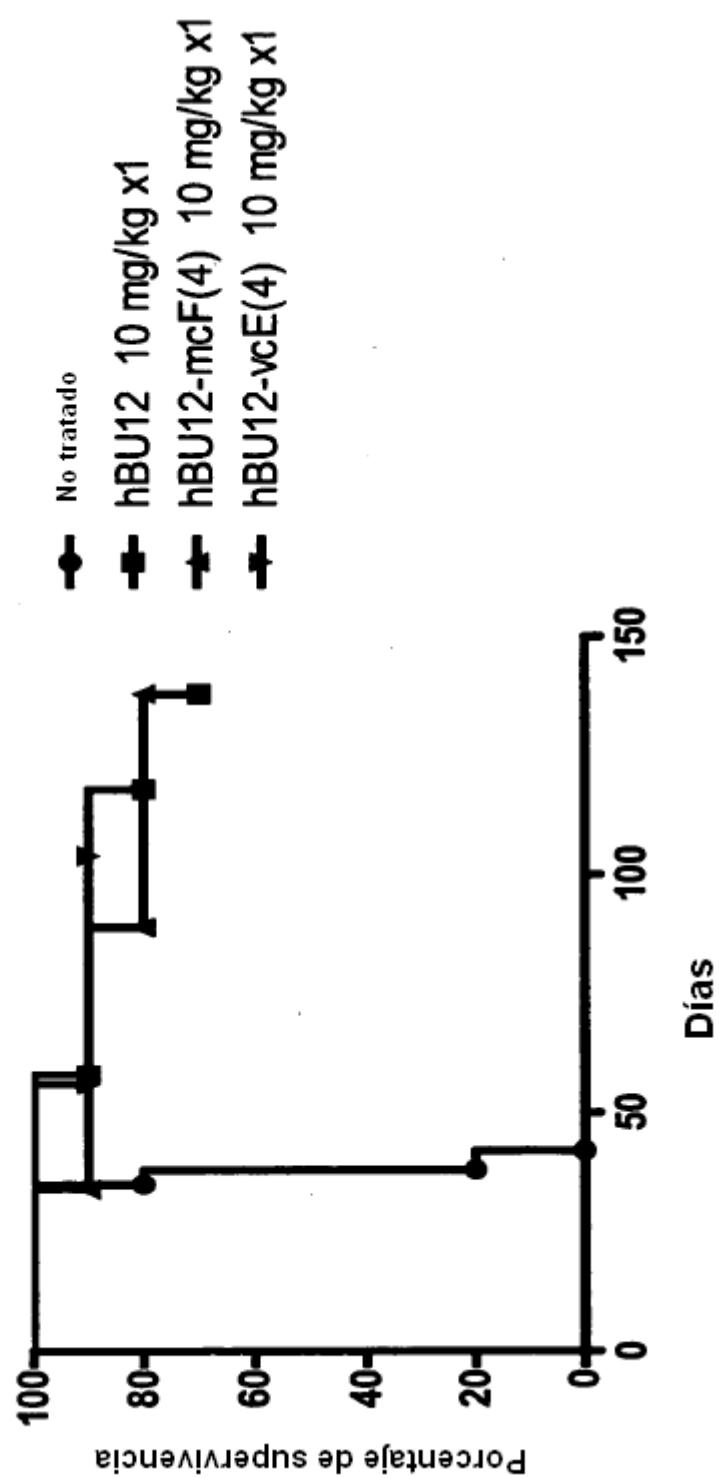


Figura 19

