

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 838 680**

51 Int. Cl.:

C07K 16/32 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2015 PCT/US2015/054651**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2016 WO16057769**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2015 E 15790321 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2020 EP 3204425**

54 Título: **Conjugados de anticuerpo-fármaco glucomodificados**

30 Prioridad:

09.10.2014 US 201462061989 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.07.2021

73 Titular/es:

**GENZYME CORPORATION (100.0%)
50 Binney Street
Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**AVILA, LUIS Z. y
ZHOU, QUN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 838 680 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

Conjugados de anticuerpo-fármaco glucomodificados

ANTECEDENTES

El uso de anticuerpos específicos para tratar personas y otros animales es una poderosa herramienta que ha sido muy eficaz en el tratamiento de muchas afecciones y trastornos. Sin embargo, existe una gran demanda de terapéuticos dirigidos más eficaces, especialmente terapias específicas de diana con mayor eficacia y mayor ventana terapéutica. Uno de estos tratamientos específicos de diana emplea conjugados de anticuerpo-resto efector en los que un resto de direccionamiento dirige un anticuerpo específico hacia un sitio de tratamiento deseado. Estas moléculas han mostrado índice terapéutico mejorado – mayores perfiles de eficacia y/o menor de toxicidad que el anticuerpo no dirigido en un ámbito clínico. Sin embargo, el desarrollo de dichos terapéuticos puede ser exigente ya que muchos factores, que incluyen el propio anticuerpo y la estabilidad del enlace, pueden tener un impacto significativo sobre la especificidad de la diana de la enfermedad (por ejemplo, tumor), reduciendo así la eficacia. Con alta unión no específica y baja estabilidad en circulación, el conjugado de anticuerpo-resto efector sería eliminado a través de los tejidos normales antes de llegar al sitio diana. Además, los conjugados de anticuerpo-resto efector con subpoblaciones significativas de alta carga de fármaco generarían agregados que se eliminarían por macrófagos, que conducen a una semivida más corta. Así, hay cada vez más necesidades del control y mejora de procesos críticos, así como la prevención de complicaciones tales como la agregación de productos y la toxicidad no específica de anticuerpos.

Aunque los conjugados de anticuerpo-resto efector generados según los actuales métodos son eficaces, el desarrollo de dichos terapéuticos puede ser exigente, ya que frecuentemente se usan mezclas heterogéneas a consecuencia de las químicas de conjugación. Por ejemplo, la conjugación de restos efectores con restos de lisina del anticuerpo se complica por el hecho de que existen muchos restos de lisina (~30) en un anticuerpo disponibles para la conjugación. Puesto que el número óptimo de la relación entre resto efector conjugado y anticuerpo (DAR) es mucho más bajo para minimizar la pérdida de función del anticuerpo (por ejemplo, alrededor de 4:1), la conjugación de lisina genera frecuentemente un perfil muy heterogéneo. Además, muchas lisinas se localizan en sitios críticos de unión al antígeno de la región CDR y la conjugación del fármaco puede conducir a una reducción en la afinidad por el anticuerpo. Por otra parte, mientras que la conjugación mediada por tiol se dirige principalmente a las ocho cisteínas que participan en los enlaces disulfuro bisagra, es aún difícil de predecir e identificar qué cuatro de las ocho cisteínas están coherentemente conjugadas entre las diferentes preparaciones. Más recientemente, la ingeniería genética de restos de cisteína libres ha permitido la conjugación específica de sitio con químicas basadas en tiol, pero dichos enlaces presentan frecuentemente estabilidad altamente variable, experimentando el conector reacciones de intercambio con albúmina y otras moléculas del suero que contienen tiol. Finalmente, los agentes de oxidación (tales como peryodato oxidasa y galactosa oxidasa) usados para tratar anticuerpos en los protocolos de conjugación previamente desarrollados pueden provocar la oxidación en exceso y la oxidación superflua del polipéptido de unión, reduciendo la eficiencia y la eficacia de la conjugación en sí.

Por tanto, una estrategia de conjugación específica de sitio que genera un conjugado de anticuerpo con un sitio de conjugación definido y enlace estable sin el uso de agentes de oxidación sería altamente útil en garantizar la conjugación de restos efectores mientras se minimizan los efectos adversos sobre la estructura o la función del anticuerpo.

El documento de patente US 2014/294867 y Qun Zhou et al. (2014) se refieren ambos a la conjugación de anticuerpo específico de sitio-fármaco mediante glucomanipulación.

SUMARIO

Basándose en la presente divulgación, un primer aspecto de la presente invención proporciona un método de preparación de un anticuerpo conjugado con resto efector, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende las etapas de:

(a) hacer reaccionar una citidina monofosfato-derivado de ácido siálico (CMP-ácido siálico) con un glucano de un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, para formar un anticuerpo conjugado con derivado de ácido siálico, o fragmento de unión al antígeno del mismo;

(b) hacer reaccionar el anticuerpo conjugado con derivado de ácido siálico, o fragmento de unión al antígeno del mismo, con un resto efector para formar el anticuerpo conjugado con resto efector, o fragmento de unión al antígeno del mismo, en donde se forma un enlace imina, y en donde ni el anticuerpo, ni el fragmento de unión al antígeno del mismo, ni el anticuerpo conjugado con derivado de ácido siálico, ni el fragmento de unión al antígeno del mismo, se tratan con un agente de oxidación.

Realizaciones adicionales de la presente invención se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

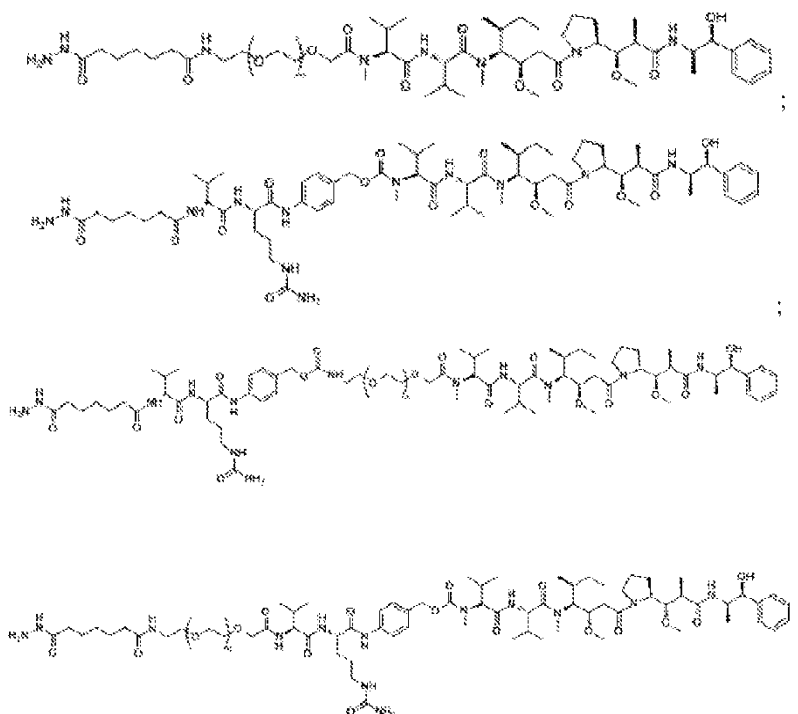
La presente divulgación proporciona métodos de preparación de conjugados de resto efector (por ejemplo, conjugados de resto de direccionamiento). Estos métodos implican la incorporación de derivados de ácido siálico en el glucano de un polipéptido de unión para formar un polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico, y una reacción

posterior en la que un resto efector se hace reaccionar con la proteína de unión conjugada con derivado de ácido siálico para crear un polipéptido de unión conjugado con resto efector.

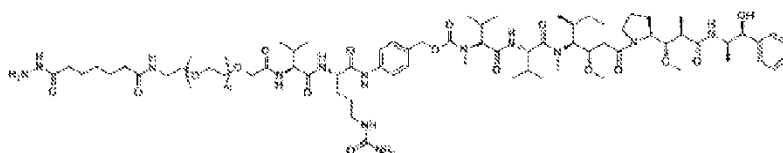
En un aspecto, la presente divulgación proporciona métodos de preparación de polipéptido de unión conjugado con resto efector que comprende las etapas de: (a) hacer reaccionar una citidina monofosfato-derivado de ácido siálico (CMP-ácido siálico) con un glucano de un polipéptido de unión para formar un polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico; y (b) hacer reaccionar el polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico con un resto efector para formar el polipéptido de unión conjugado con resto efector, en donde se forma un enlace imina, y en donde ni el polipéptido de unión ni el polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico se tratan con un agente de oxidación.

En un caso, el polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico comprende un resto ceto o aldehído terminal. En otro caso, el resto efector comprende un resto aminooxi terminal o está unido a un resto que comprende un derivado de aminooxi. En un caso adicional, el resto efector se selecciona de aquellos en las Figuras 45 y 46.

En un caso, la etapa (b) da como resultado la formación de un enlace oxima. En otro caso, el resto efector comprende una hidracina terminal. En un caso específico, la etapa (b) da como resultado la formación de un enlace hidrazona. En un caso adicional, el resto efector tiene una o más de las siguientes fórmulas estructurales:

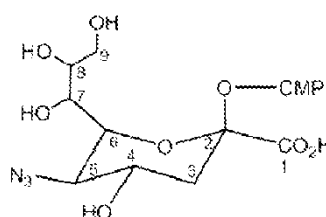


y

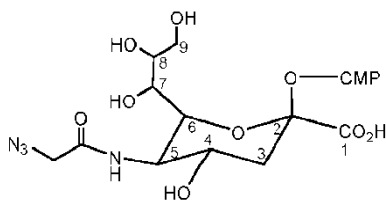


En un aspecto, la presente solicitud proporciona métodos de preparación de polipéptido de unión conjugado con resto efector que comprenden las etapas de: (a) hacer reaccionar un CMP-derivado de ácido siálico que comprende un resto reactivo terminal en la posición C5 con un glucano de un polipéptido de unión para formar un polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico; y (b) hacer reaccionar el polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico con un resto efector para formar el polipéptido de unión conjugado con resto efector usando química de click.

En un caso, el resto reactivo terminal es una azida, en donde el resto efector comprende un alquino o se une a un resto que comprende un alquino, y en donde la etapa (b) forma un anillo de triazol en o unido a la posición C5 del derivado de ácido siálico. En otro caso, ni el polipéptido de unión ni el polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico se tratan con un agente de oxidación. En otro caso, el CMP-derivado de ácido siálico tiene una fórmula estructural seleccionada de las siguientes:



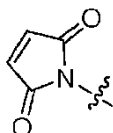
o



En otro caso, el resto efector comprende o está unida a un ciclooctino. En un caso específico, el ciclooctino es un azadibenzociclooctino. En otro caso, etapa (b) ocurre a temperatura ambiente. En otro caso, la etapa (b) se realiza en ausencia de cobre.

En un aspecto, la presente solicitud proporciona métodos de preparación de polipéptido de unión conjugado con resto efector que comprenden las etapas de: (a) hacer reaccionar un CMP-derivado de ácido siálico con un glucano de un polipéptido de unión para formar un polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico; y (b) hacer reaccionar el polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico con un resto efector para formar el polipéptido de unión conjugado con resto efector, en donde se forma un enlace tioéter.

En un caso, ni el polipéptido de unión ni el polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico se tratan con un agente de oxidación. En otro caso, el derivado de ácido siálico comprende un resto tiol terminal. En otro caso, el resto efector comprende un resto maleimida. En otro caso, el resto efector es bis-manosa-6-fosfato hexamanosa maleimida, lactosa maleimida, o cualquier otro componente que comprenda al menos un resto maleimida de la siguiente fórmula estructural:

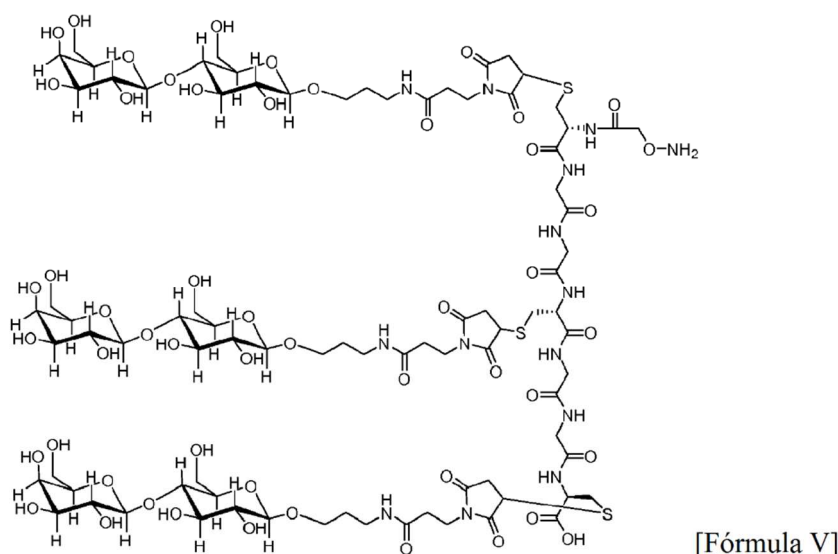


En un caso, el resto efector comprende una o más proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, hidratos de carbono, o combinaciones de los mismos. En otro caso, el resto efector comprende un glucano. En un caso específico, el resto efector comprende una o más glucoproteínas, glucopéptidos o glucolípidos.

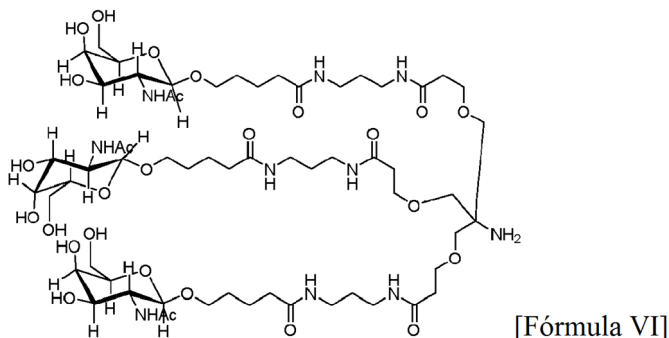
En otro caso, la proteína de unión tiene uno o más sitios de glucosilación nativos o manipulados. En un caso adicional, el método comprende lograr o modificar la glucosilación de la proteína de unión usando una o más glucosiltransferasas, una o más glucosidasas, o una combinación de las mismas. En otro caso, la etapa (a) ocurre en una reacción con sialiltransferasa. En un caso adicional, la sialiltransferasa es una sialiltransferasa de mamífero. En un caso específico, la sialiltransferasa es beta-galactósido alfa-2,6-sialiltransferasa 1. En un caso, el resto efector se une a una célula. En un caso adicional, la célula se selecciona de una célula inmunitaria, una célula de hígado, una célula tumoral, una célula vascular, una célula epitelial o una célula mesenquimatosa. En otro caso, la célula se selecciona de un linfocito B, un linfocito T, una célula dendrítica, un linfocito citolítico espontáneo (NK), un macrófago, un hepatocito, una célula endotelial sinusoidal del hígado o una célula de hepatoma.

En un caso, el resto efector se une a un receptor de manosa 6-fosfato sobre la célula. En un caso adicional, el resto efector comprende un resto de manosa 6-fosfato. En otro caso, el resto efector se une a un Siglec sobre la célula. En un caso adicional, el Siglec es sialoadhesina (Siglec-1), CD22 (Siglec-2), CD33 (Siglec-3), MAG (Siglec-4), Siglec-5, Siglec-6, Siglec-7, Siglec-8, Siglec-9, Siglec-10, Siglec-11, Siglec-12, Siglec-14 o Siglec-15. En otro caso, el resto efector se une a un receptor de lectina de tipo C, una galectina o un receptor de lectina de tipo L sobre la célula. En un caso adicional, el resto efector se une a TDEC-205, receptor de manosa de macrófagos (MMR), dectina-1, dectina-2, lectina de tipo C inducible por macrófagos (Mincle), ICAM3 no asociada a integrina específica de células dendríticas (DC-SIGN, CD209), receptor-1 del grupo de lectina DC NK (DNGR-1), langerina (CD207), CD169, un lecticano, un receptor de asialoglucoproteína (ASGPR), DCIR, MGL, un receptor de DC, una colectina, una selectina, un receptor de linfocitos NK, un receptor endocítico multi-CTLD, una lectina del grupo Reg (tipo VII), condrolectina, tetranectina, policistina, atractina (ATRN), proteína básica principal de eosinófilos (EMBP), DGCR2, trombomodulina, Bimlec, SEEC o CBCP/Frem1/QBRICK.

En un caso, el resto efector es un glucopéptido capaz de unir ASGPR sobre una célula. En un caso adicional, el resto efector es un glucopéptido que contiene el glucano GalNAc trivalente o una galactosa trivalente que contiene glucopéptido. En un caso específico, el resto efector se representa por la fórmula V:



En otro caso específico, el resto efector se representa por la fórmula VI:



En un caso, el polipéptido de unión comprende un dominio Fc. En otro caso, un glucano modificado se une en N al polipéptido de unión por un resto de asparagina en la posición de aminoácido 297 del dominio Fc, según la numeración EU. En otro caso, un glucano modificado se une en N al polipéptido de unión por un resto de asparagina en la posición de aminoácido 298 del dominio Fc, según la numeración EU. En un caso adicional, el dominio Fc es humano.

En otro caso, el polipéptido de unión comprende un dominio CH1. En un caso adicional, un glucano modificado se une en N al polipéptido de unión por un resto de asparagina en la posición de aminoácido 114 del dominio CH1, según la numeración de Kabat.

En un caso específico, el polipéptido de unión es un anticuerpo o inmunoadhesina.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1** es una ilustración esquemática de la formación de CMP-derivados de ácido siálico a modo de ejemplo a partir de azúcar o derivados de azúcar.

La **Figura 2** es una ilustración esquemática de CMP-derivados de ácido siálico a modo de ejemplo.

La **Figura 3** es una serie (A-E) de representaciones de diferentes reacciones químicas de la presente divulgación, que incluyen la presente invención, los círculos en combinación con los restos reactivos a los que se unen representan polipéptidos de unión conjugados con derivados de ácido siálico. Las estrellas representan restos de direccionamiento o efectores.

La **Figura 4** representa un ejemplo de un polipéptido de unión conjugado con resto efector según los métodos ilustrados en la Figura 3 (partes A-C) con un derivado de ácido siálico mostrado en la Figura 2.

La **Figura 5** representa un ejemplo de un polipéptido de unión conjugado con resto efector según los métodos ilustrados en la Figura 3D con un derivado de ácido siálico mostrado en la Figura 2.

La **Figura 6** es una ilustración esquemática de la síntesis de un anticuerpo fármaco conjugado donde un resto de toxina se une a un resto de ácido siálico oxidado del glucano de anticuerpo usando un enlace oxima.

La **Figura 7** es un gel teñido con azul de Coomassie que muestra la expresión y purificación de mutantes de glucosilación.

La **Figura 8** representa los resultados de experimentos de resonancia de plasmones superficiales usados para evaluar la unión de mutantes del anticuerpo IgG $\alpha\beta$ TCR HEBE1 con Fc γ RIIIa humano recombinante (V158 y F158).

- 5 La **Figura 9** representa los resultados de experimentos de resonancia de plasmones superficiales usados para evaluar la unión de mutantes del anticuerpo IgG $\alpha\beta$ TCR HEBE1 con Fc γ RI humano recombinante.

La **Figura 10** representa el perfil de liberación de citocinas de CMSP para TNFa, GM-CSF, IFNy e IL10 en presencia de anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR mutantes (día 2).

- 10 La **Figura 11** representa el perfil de liberación de citocinas de CMSP para IL6, IL4 e IL2 en presencia de anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR mutantes (día 2).

La **Figura 12** representa el perfil de liberación de citocinas de CMSP para TNFa, GM-CSF, IFNy e IL10 en presencia de anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR mutantes (día 4).

La **Figura 13** representa el perfil de liberación de citocinas de CMSP para IL6, IL4 e IL2 en presencia de anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR mutantes (día 4).

- 15 La **Figura 14** representa los resultados de experimentos que investigan el nivel de expresión de mutantes 2C3 por transferencia Western (A) y resonancia de plasmones superficiales (B).

La **Figura 15** representa los resultados de experimentos que investigan la glucosilación de mutantes 2C3 pre- y post-tratamiento con PNGasa F.

- 20 La **Figura 16** representa los resultados de experimentos de SDS-PAGE que investigan sitios de glucosilación sobre mutantes 2C3 aislados de cultivo celular.

La **Figura 17** representa los resultados de experimentos de resonancia de plasmones superficiales usados para evaluar la unión de anti-CD52 modificado a Fc γ RIIIa humano recombinante (V158). Se usaron anti-CD52 que comprenden las mutaciones S298N/Y300S en el dominio Fc para evaluar la función efectora de la molécula modificada, que se une al péptido CD52 (A), que se une a Fc γ RIIIa (V158, B) y control que se une a FcRn de ratón (C).

- 25 La **Figura 18** representa los resultados de experimentos de resonancia de plasmones superficiales que investigan las propiedades de unión de Fc de mutantes 2C3.

- 30 La **Figura 19** representa los resultados de experimentos de resonancia de plasmones superficiales que investigan la unión de anti-CD52 modificado a tanto Fc γ RIIIa (Va1158) (como antes) como a Fc γ RIIIa (Phe158). Se usaron anticuerpos anti-CD52 que comprenden mutaciones S298N/Y300S en el dominio Fc para evaluar la función efectora de la molécula modificada que se une a Fc γ RIIIa (Val158, A) y Fc γ RIIIa (Phe58, B).

La **Figura 20** representa el análisis de unión a C1q en el mutante S298N/Y300S y el control 2C3 WT (A) y los resultados de un análisis de ELISA que confirman el recubrimiento equivalente de los pocillos (B).

- 35 La **Figura 21** representa los resultados de experimentos de resonancia de plasmones que miden la unión cinética de mutantes 2C3 al péptido CD-52 741.

La **Figura 22** representa los resultados de experimentos de resonancia de plasmones que comparan la afinidad de unión al antígeno de anti-CD-52 2C3 WT y el mutante de hiperglucosilación A114N.

La **Figura 23** representa los resultados de los experimentos de caracterización de carga por isoelectroenfoque y espectrometría de masas (A-D) para determinar el contenido de glucano de los mutantes 2C3.

- 40 La **Figura 24** representa los resultados de concentración (A; Octet) y experimentos de resonancia de plasmones (B) que comparan la afinidad de unión al antígeno de anti-CD52 2C3 WT y mutantes.

La **Figura 25** representa los resultados de experimentos de SDS-PAGE para demostrar la glucosilación adicional del mutante anti-TEM1 A114N.

- 45 La **Figura 26** representa los resultados de SDS-PAGE y el análisis de cromatografía de interacción hidrófoba del mutante anti-Her2 A114N.

La **Figura 27** representa los resultados de experimentos de SDS-PAGE para demostrar la conjugación de PEG con el mutante 2C3 A114N mediante un enlace de aminooxi.

La **Figura 28** representa los resultados de experimentos de CL-EM para determinar los contenidos de glucano del mutante de hiperglucosilación anti-TEM1 A114N.

La **Figura 29** representa los resultados de experimentos de CL-EM para determinar los contenidos de glucano de un anticuerpo natural HER2 y un mutante de hiperglicosilación anti-Her2 A114N.

La **Figura 30** representa un método alternativo para realizar la conjugación específica de sitio de un anticuerpo que comprende el uso de agentes de oxidación (A-C).

- 5 La **Figura 31** representa una síntesis de restos efectores a modo de ejemplo: aminooxi-Cys-MC-VC-PABC-MMAE y aminooxi-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Dol10.

La **Figura 32** representa la información de caracterización (A-C) para un anticuerpo contra HER2 sialilado.

La **Figura 33** representa la información de caracterización (A-D) para el anticuerpo anti-HER2 sialilado oxidado.

- 10 La **Figura 34** representa cromatogramas de interacción hidrófoba de glucoconjugados preparados con tres anticuerpos sialilados diferentes con dos grupos aminooxi diferentes.

La **Figura 35** muestra un cromatograma de HIC de conjugado mutante de glucosilación anti-Her2 A114 con AO-MMAE preparado usando química de GAM(+).

La **Figura 36** representa una comparación de la potencia *in vitro* de un glucoconjugado anti-HER2 y conjugado de tiol (A-D).

- 15 La **Figura 37** representa una comparación de la potencia *in vitro* de un glucoconjugado anti-FAP B11 y conjugado de tiol.

La **Figura 38** representa una comparación de la eficacia *in vivo* de glucoconjugados anti-HER2 y conjugados de tiol en un modelo de xenoinjerto de células tumorales Her2+ (A-D).

- 20 La **Figura 39** representa los resultados de experimentos de CL-EM para determinar el contenido de glucano de un anticuerpo anti- $\alpha\beta$ TCR mutante que contiene la mutación S298N/Y300S.

La **Figura 40** representa los resultados de experimentos de dicróismo circular para determinar la estabilidad térmica relativa de un anticuerpo anti- $\alpha\beta$ TCR natural y anticuerpo anti- $\alpha\beta$ TCR mutante que contiene la mutación S298N/Y300S.

- 25 La **Figura 41** representa los resultados de un ensayo de proliferación celular para ADC preparadas con el anticuerpo anti-HER que lleva la mutación de hiperglicosilación A114N y AO-MMAE.

La **Figura 42** es una ilustración esquemática de una síntesis alternativa de un conjugado de anticuerpo-fármaco donde un resto de direccionamiento se une a un resto de ácido siálico oxidado del glucano de anticuerpo usando un enlace oxima. Esta síntesis alternativa hace uso de agentes de oxidación.

- 30 La **Figura 43** es una ilustración esquemática que representa un método alternativo para realizar la conjugación específica de sitio de un anticuerpo con un glucopéptido mediante un enlace aminooxi según los métodos desvelados. Esta síntesis alternativa hace uso de agentes de oxidación.

La **Figura 44** es una ilustración esquemática que representa un método alternativo de conjugación específica de sitio de neoglicanos con anticuerpo mediante ácido siálico en glucanos Fc nativos. Esta síntesis alternativa hace uso de agentes de oxidación.

- 35 La **Figura 45** es una serie de glucanos a modo de ejemplo que se pueden usar para la conjugación que incluyen aminooxi de lactosa y aminooxi de bis M6P hexamanosa (para la conjugación de aminooxi).

La **Figura 46** es una representación esquemática de la preparación de M-6-P hexamanosa maleimida.

La **Figura 47** representa la caracterización por SDS-PAGE y MALDI-TOF de conjugados de Man-6-P hexamanosa aminooxi preparados con anticuerpo policlonal de conejo.

- 40 La **Figura 48** representa los resultados de experimentos de resonancia de plasmones superficiales usados para evaluar la unión de anticuerpos de control e IgG de conejo conjugados con Man-6-P hexamanosa con el receptor de M6P.

La **Figura 49** representa la captación de anticuerpo IgG de conejo conjugado con Man-6-P en células HepG2 y RAW.

- 45 La **Figura 50** representa la caracterización de anticuerpos de control, conjugados con Man-6-P y conjugados con lactosa mediante SDS-PAGE y transferencia de lectina.

La **Figura 51** representa los resultados del análisis de proteínas intactas por MALDI-TOF para anticuerpos de control, conjugados con Man-6-P y conjugados con lactosa.

- La **Figura 52** representa la caracterización de anticuerpo policlonal conjugado con Man-6-P hexamano maleimida (conjugación de tior en las cisteínas bisagra) mediante SDS-PAGE (no reductora y reductora), transferencia de lectina (reductora) y cuantificación de M6P.
- 5 La **Figura 53** representa la caracterización de anticuerpo policlonal conjugado con lactosa maleimida (conjugación de tior en las cisteínas bisagra) mediante SDS-PAGE y cuantificación de galactosa.
- La **Figura 54** representa la caracterización de anticuerpo monoclonal conjugado con Man-6-P hexamano maleimida (conjugación de tior en las cisteínas bisagra) mediante SDS-PAGE (no reductora y reductora) y cuantificación de glucano (M6P).
- 10 La **Figura 55** representa los resultados del análisis de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) de un anticuerpo policlonal conjugado con cisteína bisagra.
- La **Figura 56** representa los resultados del análisis de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) de un anticuerpo monoclonal conjugado con cisteína bisagra.
- La **Figura 57** representa los resultados de la valoración con sialidasa para determinar la cantidad de liberación de ácido siálico de NNAS, NNAS sialilado y anticuerpos NNAS desialilados y galactosilados.
- 15 La **Figura 58** representa los resultados de experimentos de CL-EM para determinar los contenidos de glucano de un anticuerpo modificado con NNAS y un anticuerpo modificado con NNAS desialilado y galactosilado.
- La **Figura 59** representa los resultados de experimentos de CL-EM para determinar los contenidos de glucano de un anticuerpo modificado con NNAS y un anticuerpo modificado con NNAS sialilado.
- 20 La **Figura 60** representa la caracterización del receptor de M6P unido a anticuerpos policlonales y monoclonales conjugados con glucano bisM6P mediante glucano Fc nativo o disulfuros bisagra en disolución.
- La **Figura 61** representa la caracterización de anticuerpos NNAS modificados por enzima y conjugados por SDS-PAGE (4-12 % de NuPAGE; reductora y no reductora) y transferencia de lectina por ECL (reductora).
- La **Figura 62** representa los resultados de la cuantificación de galactosa terminal en un anticuerpo NNAS, un anticuerpo NNAS desialilado/galactosilado y un anticuerpo NNAS conjugado en moles de galactosa o moles de glucopéptido por moles de anticuerpo.
- 25 La **Figura 63** representa el examen de lactosa maleimida que se ha modificado con alfa-2,3-sialiltransferasa y se eluyó de columnas de purificación de QAE con NaCl 20 mM. El eluato resultante se caracterizó usando MALDI-TOF y HPLC Dionex.
- La **Figura 64** representa la caracterización de anticuerpo de conejo conjugado con sialil lactosa maleimida (reacción de tior) usando SDS-PAGE (A) y HPLC Dionex (B; cuantificación de ácido siálico).
- 30 La **Figura 65** representa la caracterización de lactosa maleimida sialilada con alfa-2,6-sialiltransferasa y purificada usando una columna de QAE-Sepharose. El análisis usando HPLC Dionex se muestra para (A) un patrón de lactosa; (B) un patrón de alfa-2,6-sialil-lactosa; (C) un patrón de lactosa maleimida; y (D) una fracción de alfa-2,6-sialil-lactosa maleimida eluida de una columna de QAE-Sepharose.
- 35 La **Figura 66** representa la caracterización de una fracción de alfa-2,6-sialil-lactosa maleimida eluida de una columna de QAE-Sepharose usando MALDI-TOF.
- La **Figura 67** representa la caracterización de un anticuerpo de control, un anticuerpo policlonal conjugado con glucano de alfa-2,3-sialil-lactosa y un anticuerpo policlonal conjugado con glucano de alfa-2,6-sialil-lactosa mediante SDS-PAGE (A) y HPLC Dionex (B; se muestra el gráfico de análisis de ácido siálico).
- 40 La **Figura 68** representa la caracterización de anticuerpos de control y mutantes NNAS modificados con enzima (disialilados/galactosilados) usando SDS-PAGE y transferencia de lectina.
- La **Figura 69** representa la caracterización mediante SDS-PAGE reductora de la PEGilación de un anticuerpo de control y Gal NNAS con diversas cantidades de galactosa oxidasa.
- 45 La **Figura 70** representa los resultados de un barrido de Protein Scan que caracteriza la PEGilación de una cadena pesada del anticuerpo.
- La **Figura 71** representa la caracterización mediante SDS-PAGE reductora de la PEGilación de un anticuerpo de control y Gal NNAS con diversos excesos molares de PEG con respecto al anticuerpo.
- La **Figura 72** representa los resultados de un barrido de Protein Scan que caracteriza la PEGilación de una cadena pesada del anticuerpo.

La **Figura 73** es un dibujo estructural de lactosa₃-Cys₃Gly₄.

La **Figura 74** representa la caracterización mediante SDS-PAGE reductora de la PEGilación de un anticuerpo de control y Gal NNAS con galactosa oxidasa en ausencia de acetato de cobre (A) y en presencia de cantidades variables de acetato de cobre (A y B).

5 La **Figura 75** la caracterización de anticuerpos modificados por enzima y naturales conjugados, A114N, NNAS y A114N/NNAS por SDS-PAGE (4-12 % de NuPAGE; reductora y no reductora) y transferencia de lectina por ECL (reductora) junto con los resultados de la cuantificación de galactosa terminal en moles de galactosa por moles de anticuerpo.

10 La **Figura 76** es un gráfico que representa el contenido de ácido siálico (en moles/moles) de anticuerpos naturales y mutantes como se mide usando HPLC Dionex.

La **Figura 77** representa la caracterización de la PEGilación de anticuerpos naturales y mutantes mediante SDS-PAGE reductora y no reductora.

La **Figura 78** es un gráfico que representa la PEGilación (en moles/moles) de anticuerpos naturales y mutantes.

15 La **Figura 79** es una serie de fotos que representa los resultados de la tinción por inmunofluorescencia de la incubación de control, anticuerpos modificados (con galactosiltransferasa) o conjugados (con lactosa aminooxi o lactosa maleimida) con células HepG2.

La **Figura 80** es una representación de un glucano GalNAc trivalente.

La **Figura 81** representa los resultados de experimentos de resonancia de plasmones superficiales usados para evaluar la unión de anticuerpos conjugados con glucano GalNAc trivalente con el receptor ASGPR subunidad H1.

20 La **Figura 82** es una representación de un glucopéptido que contiene GalNAc trivalente y un glucopéptido que contiene galactosa trivalente.

La **Figura 83** representa los resultados de experimentos de resonancia de plasmones superficiales usados para evaluar la unión de enzimas lisosómicas recombinantes conjugadas con GalNAc trivalente y conjugadas con galactosa trivalente al receptor ASGPR subunidad H1.

25 La **Figura 84** es un gráfico que representa la valoración de ácido siálico (0,2 μmoles) con diversas cantidades de CMP-ácido siálico sintetasa (*N. meningitidis*) a 37 °C como CMP-ácido siálico sintetizado frente a las cantidades de enzima usadas.

La **Figura 85** es un gráfico que representa el ácido siálico sintetizado (de ManNAc) frente a las cantidades de la enzima ácido siálico aldolasa (*E. coli* K-12) usada a 37 °C.

30 La **Figura 86** es un gráfico que representa el derivado de ácido siálico sintetizado (de ManLev) frente a las cantidades de la enzima ácido siálico aldolasa (*E. coli* K-12) usada a 37 °C.

La **Figura 87** es un gráfico que representa el derivado de ácido siálico liberado después de la digestión de CMP-derivado de ácido siálico (sintetizado de ManLev) con sialidasa a 37 °C en comparación con el tiempo de retención del patrón de ácido siálico monitorizado usando HPAEC-PAD.

35 La **Figura 88** es un gráfico que representa el perfil de HPAEC-PAD de CMP-ácido siálico sintetizado a partir de ManNAc y CMP-derivado de ácido siálico sintetizado a partir de ManLev en comparación con el patrón de CMP-ácido siálico.

La **Figura 89** es un gráfico que representa el perfil de HPAEC-PAD de CMP-derivados de ácido siálico (sintetizado a partir de ManLev, ManNAz y ManAz) en comparación con el patrón de CMP-ácido siálico.

40 La **Figura 90** es una representación esquemática que demuestra la sialilación de anticuerpo usando un CMP-derivado de ácido siálico preparado a partir de ManLev.

La **Figura 91** es un gráfico que muestra el análisis de CL-EM de fragmentos de CH₂CH₃ liberados por IdeS proteasa del anticuerpo Herceptin sialilado *in vitro* usando α2,6 sialiltransferasa y CMP-derivado de ácido siálico preparado a partir de ManLev.

45 La **Figura 92** es una representación esquemática que demuestra la PEGilación de anticuerpo sialilado con un derivado de ácido siálico preparado a partir de ManLev.

La **Figura 93** representa la caracterización de SDS-PAGE de Herceptin PEGilado pre-sialilado con un derivado de ácido siálico preparado a partir de ManLev. La PEGilación se realiza usando química de oxima.

La **Figura 94** es una representación esquemática que demuestra la sialilación de anticuerpo usando un CMP-derivado de ácido siálico preparado a partir de ManNAz.

La **Figura 95** representa la caracterización de SDS-PAGE de Herceptin PEGilado pre-sialilado con un derivado de ácido siálico preparado a partir de ManNAz. La PEGilación se realizó usando química de click.

5 DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente divulgación proporciona métodos de preparación de conjugados de resto efector (por ejemplo, conjugados de resto de direccionamiento). Estos métodos implican la incorporación de derivados de ácido siálico en el glucano de un polipéptido de unión para formar un polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico, y una reacción posterior en la que un resto efector se hace reaccionar con la proteína de unión conjugada con derivado de ácido siálico para crear un polipéptido de unión conjugado con resto efector.

I. Definiciones

Como se usa en el presente documento, el término "proteína de unión" o "polipéptido de unión" se debe referir a un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo) que contiene al menos un sitio de unión que es responsable de la unión selectiva a un antígeno diana de interés (por ejemplo, un antígeno humano). Los sitios de unión a modo de ejemplo incluyen un dominio variable de anticuerpo, un sitio de unión a ligando de un receptor, o un sitio de unión a receptor de un ligando. En ciertos aspectos, los polipéptidos de unión comprenden múltiples (por ejemplo, dos, tres, cuatro o más) sitios de unión. En ciertos aspectos, la proteína de unión no es una enzima terapéutica.

Como se usa en el presente documento, el término "resto nativo" se debe referir a un resto de aminoácido que ocurre naturalmente en una posición de aminoácido particular de un polipéptido de unión (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo) y que no ha sido modificado, introducido o alterado por la mano del hombre. Como se usa en el presente documento, el término "proteína de unión alterada" o "polipéptido de unión alterado" incluye polipéptidos de unión (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo) que comprenden al menos un resto de aminoácido mutado no nativo.

El término "se une específicamente a", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo para unirse a un antígeno con una constante de disociación (K_d) de como máximo aproximadamente 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, 1×10^{-12} M, o menos, y/o para unirse a un antígeno con una afinidad que es al menos dos veces superior a su afinidad por un antígeno no específico.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a dichos armazones (por ejemplo, moléculas de anticuerpo intacto, fragmentos de anticuerpos, o variantes de los mismos) que tienen actividad inmunorreactiva específica conocida significativa para un antígeno de interés (por ejemplo, un antígeno asociado a tumor). Los anticuerpos e inmunoglobulinas comprenden cadenas ligeras y pesadas, con o sin un enlace covalente intercatenario entre ellos. Las estructuras de inmunoglobulina básicas en sistemas vertebrados son relativamente bien entendidas.

Como se tratará más abajo en más detalle, el término genérico "anticuerpo" comprende cinco clases distintas de anticuerpos que se pueden distinguir bioquímicamente. Mientras que las cinco clases de anticuerpos están claramente dentro del alcance de la presente divulgación, la siguiente discusión, en general, se referirá a la clase IgG de moléculas de inmunoglobulina. Con respecto a la IgG, las inmunoglobulinas comprenden dos cadenas ligeras idénticas de peso molecular aproximadamente 23.000 dáltones y dos cadenas pesadas idénticas de peso molecular 53.000-70.000. Las cuatro cadenas se unen por enlaces disulfuro en una configuración en "Y" en donde las cadenas ligeras agrupan las cadenas pesadas empezando en la boca de la "Y" y continuando a través de la región variable.

Las cadenas ligeras de inmunoglobulina se clasifican como kappa o lambda (κ , λ). Cada clase de cadena pesada se puede unir con una cadena ligera kappa o lambda. En general, las cadenas ligeras y pesadas se unen covalentemente entre sí, y las porciones de "cola" de las dos cadenas pesadas se unen entre sí por enlaces disulfuro covalentes o enlaces no covalentes cuando las inmunoglobulinas se generan por hibridomas, linfocitos B o células hospedadoras genéticamente manipuladas. En la cadena pesada, las secuencias de aminoácidos transcurren desde el extremo N en los extremos de tenedor de la configuración en Y hasta el extremo C en la parte inferior de cada cadena. Los expertos en la técnica apreciarán que las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon (γ , μ , α , δ , ϵ) con algunas subclases entre ellas (por ejemplo, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). Es la naturaleza de esta cadena la que determina la "clase" del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgG o IgE, respectivamente. El isotipo de las subclases de inmunoglobulina (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, etc.) está bien caracterizado y se conoce que confiere especialización funcional. Versiones modificadas de cada una de estas clases e isotipos son fácilmente perceptibles para el experto en vista de la presente divulgación y, por consiguiente, están dentro del alcance de la presente divulgación.

Tanto las cadenas ligeras como las pesadas se dividen en regiones de homología estructural y funcional. El término "región" se refiere a una parte o porción de una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo e incluye región constante o regiones variables, así como partes o porciones más discretas de dichas regiones. Por ejemplo, las regiones variables de la cadena ligera incluyen "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR" intercaladas entre "regiones estructurales" o "FR", como se define en el presente documento.

Las regiones de una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina se pueden definir como región "constante" (C) o regiones "variables" (V), basándose en la ausencia relativa de variación de secuencia dentro de las regiones de diversos miembros de clase en el caso de una "región constante", o la significativa variación dentro de las regiones de diversos miembros de clase en el caso de una "región variable". Los términos "región constante" y "región variable" también se pueden usar funcionalmente. A este respecto, se apreciará que las regiones variables de una inmunoglobulina o anticuerpo determinan el reconocimiento del antígeno y especificidad. En cambio, las regiones constantes de una inmunoglobulina o anticuerpo confieren funciones efectoras importantes, tales como secreción, movilidad transplacentaria, unión al receptor de Fc, unión al complemento y similares. Se conocen bien las estructuras de subunidad y configuraciones tridimensionales de las regiones constantes de las diversas clases de inmunoglobulina.

Las regiones constantes y variables de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina se pliegan en dominios. El término "dominio" se refiere a una región globular de una cadena pesada o ligera que comprende bucles de péptidos (por ejemplo, que comprende 3 a 4 bucles de péptidos) estabilizados, por ejemplo, por hoja plegada β y/o enlace disulfuro intracatenario. Los dominios de la región constante en la cadena ligera de una inmunoglobulina se denominan indistintamente "dominios de la región constante de la cadena ligera", "regiones CL" o "dominios CL". Los dominios constantes en la cadena pesada (por ejemplo, dominios bisagra, CH1, CH2 o CH3) se denominan indistintamente "dominios de la región constante de la cadena pesada", dominios de la región "CH" o "dominios CH". Los dominios variables en la cadena ligera se denominan indistintamente "dominios de la región variable de la cadena ligera", "dominios de la región VL" o "dominios VL". Los dominios variables en la cadena pesada se denominan indistintamente "dominios de la región variable de la cadena pesada", "dominios de la región VH" o "dominios VH".

Por convención, la numeración de los dominios de la región constante variable aumenta a medida que están más distales del sitio de unión al antígeno o extremo amino de la inmunoglobulina o anticuerpo. El extremo N de cada cadena de inmunoglobulina pesada y ligera es una región variable y el extremo C es una región constante; los dominios CH3 y CL comprenden en realidad el extremo carboxi de la cadena pesada y ligera, respectivamente. Por consiguiente, los dominios de una inmunoglobulina de la cadena ligera están dispuestos en una orientación VL-CL, mientras que los dominios de la cadena pesada están dispuestos en la orientación VH-CH1-bisagra-CH2-CH3.

Las posiciones de aminoácidos en una región constante de la cadena pesada, que incluyen las posiciones de aminoácidos en los dominios CH1, bisagra, CH2, CH3, y CL, se pueden numerar según el sistema de numeración del índice de Kabat (véase Kabat et al., en "Sequences of Proteins of Immunological Interest", U.S. Dept. Health and Human Services, 5ª edición, 1991). Alternativamente, las posiciones de aminoácidos del anticuerpo se pueden numerar según el sistema de numeración del índice de EU (véase Kabat et al., arriba).

Como se usa en el presente documento, el término "dominio VH" incluye el dominio variable del extremo amino de una cadena pesada de la inmunoglobulina, y el término "dominio VL" incluye el dominio variable del extremo amino de una cadena ligera de la inmunoglobulina.

Como se usa en el presente documento, el término "dominio CH1" incluye el primer dominio (más amino extremo) de la región constante de una cadena pesada de la inmunoglobulina que se extiende, por ejemplo, desde aproximadamente las posiciones 114-223 en el sistema de numeración de Kabat (posiciones EU 118-215). El dominio CH1 es adyacente al dominio VH y el extremo amino a la región bisagra de una molécula de cadena pesada de la inmunoglobulina, y no forma una parte de la región Fc de una cadena pesada de la inmunoglobulina.

Como se usa en el presente documento, el término "región bisagra" incluye la porción de una molécula de cadena pesada que une el dominio CH1 con el dominio CH2. Esta región bisagra comprende aproximadamente 25 restos y es flexible, permitiendo así que las dos regiones de unión al antígeno del extremo N se muevan independientemente. Las regiones bisagra se pueden subdividir en tres dominios distintos: dominios bisagra superior, medio e inferior (Roux et al. J. Immunol. 1998, 161:4083).

Como se usa en el presente documento, el término "dominio CH2" incluye la porción de una molécula de inmunoglobulina de la cadena pesada que se extiende, por ejemplo, desde aproximadamente las posiciones 244-360 en el sistema de numeración de Kabat (posiciones EU 231-340). El dominio CH2 es único en que no se empareja estrechamente con otro dominio. Más bien, dos cadenas de hidrato de carbono ramificadas unidas en N están intercaladas entre los dos dominios CH2 de una molécula de IgG nativa intacta. En un caso, un polipéptido de unión de la presente divulgación comprende un dominio CH2 derivado de una molécula de IgG1 (por ejemplo, una molécula de IgG1 humana).

Como se usa en el presente documento, el término "dominio CH3" incluye la porción de una molécula de inmunoglobulina de la cadena pesada que se extiende aproximadamente 110 restos desde el extremo N del dominio CH2, por ejemplo, desde aproximadamente las posiciones 361-476 del sistema de numeración de Kabat (posiciones EU 341-445). El dominio CH3 normalmente forma la porción de extremo C del anticuerpo. En algunas inmunoglobulinas, sin embargo, dominios adicionales se pueden extender desde el dominio CH3 para formar la porción de extremo C de la molécula (por ejemplo, el dominio CH4 en la cadena μ de IgM y la cadena ϵ de IgE). En un caso, un polipéptido de unión de la presente divulgación comprende un dominio CH3 derivado de una molécula de IgG1 (por ejemplo, una molécula de IgG1 humana).

Como se usa en el presente documento, el término "dominio CL" incluye el dominio de la región constante de una cadena ligera de la inmunoglobulina que se extiende, por ejemplo, desde aproximadamente la posición de Kabat 107A-216. El dominio CL es adyacente al dominio VL. En un caso, un polipéptido de unión de la presente divulgación comprende un dominio CL derivado de una cadena ligera kappa (por ejemplo, una cadena ligera kappa humana).

5 Como se usa en el presente documento, el término "región Fc" se define como la porción de una región constante de la cadena pesada que empieza en la región bisagra justo en la dirección 5' del sitio de escisión con papaína (es decir, el resto 216 en IgG, considerando que el primer resto de la región constante de la cadena pesada es 114) y terminando en el extremo C del anticuerpo. Por consiguiente, una región Fc completa comprende al menos un dominio bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3.

10 El término "Fc nativo", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que comprende la secuencia de un fragmento que carece de unión al antígeno resultante de la digestión de un anticuerpo o producida por otros medios, tanto en forma monomérica como multimérica, y puede contener la región bisagra. La fuente de inmunoglobulina original de Fc nativo puede ser de origen humano y puede ser cualquiera de las inmunoglobulinas, tales como IgG1 o IgG2. Las moléculas de Fc nativo están constituidas por polipéptidos monoméricos que se pueden
15 unir en forma dimérica o multimérica por asociación covalente (es decir, enlaces disulfuro) y no covalente. El número de enlaces disulfuro intermoleculares entre subunidades monoméricas de moléculas de Fc nativo varía desde 1 hasta 4 dependiendo de la clase (por ejemplo, IgG, IgA e IgE) o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1 e IgA2). Un ejemplo de un Fc nativo es un dímero unido por disulfuro resultante de la digestión con papaína de una IgG. El término "Fc nativo", como se usa en el presente documento, es genérico para las formas monoméricas, diméricas y
20 multiméricas.

El término "variante de Fc", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula o secuencia que se modifica a partir de un Fc nativo, pero que todavía comprende un sitio de unión para el receptor de recuperación, FcRn (receptor de Fc neonatal). Se conocen en la técnica variantes de Fc a modo de ejemplo, y su interacción con el receptor de recuperación. Así, el término "variante de Fc" puede comprender una molécula o secuencia que se humaniza a
25 partir de un Fc nativo no humano. Además, un Fc nativo comprende regiones que se pueden retirar debido a que proporcionan características estructurales o actividad biológica que no se requiere para los polipéptidos de unión de tipo anticuerpo. Así, el término "variante de Fc" comprende una molécula o secuencia que carece de uno o más sitios o restos de Fc nativo, o en los que se ha modificado uno o más sitios o restos de Fc, que afectan o participan en: (1) la formación de enlaces disulfuro, (2) la incompatibilidad con una célula hospedadora seleccionada, (3) la
30 heterogeneidad del extremo N después de la expresión en una célula hospedadora seleccionada, (4) la glucosilación, (5) la interacción con el complemento, (6) la unión a un receptor de Fc distinto de un receptor de recuperación, o (7) la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

El término "dominio Fc", como se usa en el presente documento, engloba Fc nativo y variantes y secuencias de Fc como se ha definido anteriormente. En cuanto a las variantes de Fc y las moléculas de Fc nativo, el término "dominio Fc" incluye moléculas en forma monomérica o multimérica, tanto digeridas de anticuerpo completo como producidas por otros medios.

Como se indica anteriormente, las regiones variables de un anticuerpo permiten que sea selectivamente reconocido y una específicamente epítopes sobre antígenos. Es decir, se combinan el dominio VL y dominio VH de un anticuerpo para formar la región variable (Fv) que define un sitio de unión al antígeno tridimensional. Esta estructura de anticuerpo
40 cuaternario forma el sitio de unión al antígeno presente en el extremo de cada brazo de la Y. Más específicamente, el sitio de unión al antígeno se define por tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) en cada una de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras. Como se usa en el presente documento, el término "sitio de unión al antígeno" incluye un sitio que se une específicamente a (inmunorreacciona con) un antígeno (por ejemplo, una superficie celular o antígeno soluble). El sitio de unión al antígeno incluye una cadena pesada de la
45 inmunoglobulina y región variable de la cadena ligera y el sitio de unión formado por estas regiones variables determina la especificidad del anticuerpo. Un sitio de unión al antígeno se forma por regiones variables que varían de un anticuerpo a otro. Los anticuerpos alterados de la presente divulgación comprenden al menos un sitio de unión al antígeno.

En ciertos casos, los polipéptidos de unión de la presente divulgación comprenden al menos dos dominios de unión al antígeno que proporcionan la asociación del polipéptido de unión con el antígeno seleccionado. No se necesita que los dominios de unión al antígeno se obtengan de la misma molécula de inmunoglobulina. A este respecto, la región variable se puede obtener o se obtiene de cualquier tipo de animal que pueda ser inducido para que organice una
50 respuesta humoral y genere inmunoglobulinas contra el antígeno deseado. Como tal, la región variable de un polipéptido de unión puede ser, por ejemplo, de origen de mamífero, por ejemplo, puede ser humano, murino, de rata, cabra, oveja, primate no humano (tal como macacos cangrejeros, macacos, etc.), lupino o camélido (por ejemplo, de camellos, llamas y especies relacionadas).

En los anticuerpos que existen de forma natural, las seis CDR presentes en cada anticuerpo monomérico son secuencias de aminoácidos no contiguas cortas que se sitúan específicamente para formar el sitio de unión al antígeno a medida que el anticuerpo asume su configuración tridimensional en un entorno acuoso. El resto de los dominios
60 variables pesados y ligeros muestran menos variabilidad intermolecular en la secuencia de aminoácidos y se llaman

las regiones estructurales. Las regiones estructurales adoptan en gran medida una conformación de hoja β y las CDR forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de hoja β . Así, estas regiones estructurales actúan formando un armazón que proporciona el posicionamiento de las seis CDR en una orientación correcta por interacciones no covalentes intercatenarias. El dominio de unión al antígeno formado por las CDR situadas define una superficie complementaria al epítipo en el antígeno inmunorreactivo. Esta superficie complementaria promueve la unión no covalente del anticuerpo al epítipo de antígeno inmunorreactivo.

Los polipéptidos de unión a modo de ejemplo caracterizados en la divulgación incluyen variantes de anticuerpo. Como se usa en el presente documento, el término "variante de anticuerpo" incluye formas sintéticas y manipuladas de anticuerpos que se alteran de forma que no existan de forma natural, por ejemplo, anticuerpos que comprenden al menos dos porciones de la cadena pesada pero no dos cadenas pesadas completas (tales como anticuerpos o minicuerpos de dominio delecionado); formas multiespecíficas de anticuerpos (por ejemplo, biespecíficas, triespecíficas, etc.) alteradas para unirse a dos o más antígenos diferentes o a diferentes epítopes en un único antígeno); moléculas de la cadena pesada unidas a moléculas de scFv y similares. Además, el término "variante de anticuerpo" incluye la forma multivalente de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos trivalentes, tetravalentes, etc., que se unen a tres, cuatro o más copias del mismo antígeno).

Como se usa en el presente documento, el término "valencia" se refiere al número de posibles sitios de unión diana en un polipéptido. Cada sitio de unión diana se une específicamente a una molécula diana o sitio específico en una molécula diana. Cuando un polipéptido comprende más de un sitio de unión diana, cada sitio de unión diana se puede unir específicamente a las mismas moléculas o moléculas diferentes (por ejemplo, se puede unir a diferentes ligandos o diferentes antígenos, o a diferentes epítopes en el mismo antígeno). Los polipéptidos de unión diana normalmente tienen al menos un sitio de unión específico para una molécula de antígeno humana.

El término "especificidad" se refiere a la capacidad de unirse específicamente (por ejemplo, inmunorreaccionar con) al antígeno diana (por ejemplo, un antígeno humano diana). Un polipéptido de unión puede ser monoespecífico y contener uno o más sitios de unión que se unen específicamente a una diana o un polipéptido puede ser multiespecífico y contener dos o más sitios de unión que se unen específicamente a las mismas dianas o diferentes. En ciertos casos, un polipéptido de unión es específico para dos porciones diferentes (por ejemplo, que no se solapan) de la misma diana. En ciertos casos, el polipéptido de unión es específico para más de una diana. Se conocen en la técnica polipéptidos de unión a modo de ejemplo (por ejemplo, anticuerpos) que comprenden sitios de unión al antígeno que se unen a antígenos expresados en células tumorales y se pueden incluir una o más CDR de dichos anticuerpos en un anticuerpo como se describe en el presente documento.

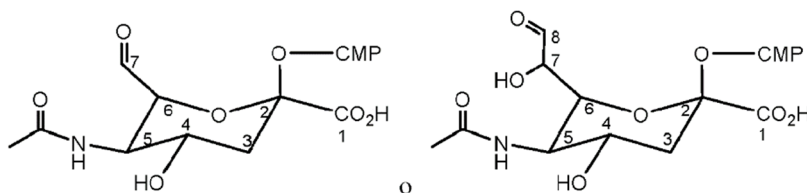
El término "resto de enlace" incluye restos que son capaces de enlazar el resto efector con los polipéptidos de unión desvelados en el presente documento. El resto de enlace se puede seleccionar de forma que sea escindible (por ejemplo, enzimáticamente escindible o sensible al pH) o no escindible.

Como se usa en el presente documento, el término "resto efector" comprende agentes (por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, hidratos de carbono, glucopéptidos y fragmentos de los mismos) con actividad biológica u otra funcional. Por ejemplo, un polipéptido de unión modificado que comprende un resto efector conjugado con un polipéptido de unión tiene al menos una función o propiedad adicional en comparación con el anticuerpo no conjugado. Por ejemplo, la conjugación de un fármaco citotóxico (por ejemplo, un resto efector) con el polipéptido de unión da como resultado la formación de un polipéptido de unión con citotoxicidad por el fármaco como segunda función (es decir, además de unión al antígeno). En otro ejemplo, la conjugación de un segundo polipéptido de unión con el polipéptido de unión puede conferir propiedades de unión adicionales. En ciertas realizaciones, donde el resto efector es una proteína o ácido nucleico terapéutico o de diagnóstico genéticamente codificado, el resto efector se puede sintetizar o expresar por síntesis de péptidos o métodos de ADN recombinante que se conocen bien en la técnica. En otro aspecto, donde el resto efector es un péptido no genéticamente codificado, o un resto de fármaco, el resto efector se puede sintetizar artificialmente o purificar de una fuente natural. Como se usa en el presente documento, el término "resto de fármaco" incluye agentes terapéuticos antiinflamatorios, antineoplásicos, antiinfecciosos (por ejemplo, antifúngicos, antibacterianos, antiparasitarios, antivirales, etc.) y anestésicos. En una realización adicional, el resto de fármaco es un agente antineoplásico o citotóxico. Los restos de fármaco compatibles también pueden comprender profármacos. Los restos efectores a modo de ejemplo se exponen en la Tabla 1 en el presente documento.

En ciertas realizaciones, un "resto efector" comprende un "resto de direccionamiento". Como se usa en el presente documento, el término "resto de direccionamiento" se refiere a un resto efector que se une a una molécula diana. Los restos de direccionamiento pueden comprender, sin limitación, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, hidratos de carbono (por ejemplo, glucanos) y combinaciones de los mismos (por ejemplo, glucoproteínas, glucopéptidos y glucolípidos).

Como se usa en el presente documento, el término "profármaco" se refiere a un precursor o forma derivada de un agente farmacéuticamente activo que es menos activa, reactiva o propensa a los efectos secundarios en comparación con el fármaco original y es capaz de ser enzimáticamente activado o de convertirse de otro modo en una forma más activa *in vivo*. Los profármacos compatibles con las composiciones de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen aminoácidos, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos que contienen β -

- lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que se pueden convertir en el fármaco libre citotóxico más activo. Un experto en la técnica puede hacer modificaciones químicas al resto de fármaco deseado o su profármaco para hacer las reacciones de ese compuesto más convenientes para los fines de preparación de polipéptidos de unión modificados de la presente divulgación. Los restos de fármaco también incluyen derivados, sales farmacéuticamente aceptables, ésteres, amidas y éteres de los restos de fármaco descritos en el presente documento. Los derivados incluyen modificaciones a los fármacos identificados en el presente documento que pueden mejorar o reducir no significativamente una actividad terapéutica deseada del fármaco particular.
- Como se usa en el presente documento, el término "agente antineoplásico" incluye agentes que son perjudiciales para el crecimiento y/o la proliferación de células neoplásicas o tumorales y pueden actuar para reducir, inhibir o destruir el tumor maligno. Los ejemplos de dichos agentes incluyen, pero no se limitan a, agentes citostáticos, agentes alquilantes, antibióticos, nucleósidos citotóxicos, aglutinantes de tubulina, hormonas, antagonistas de hormona, agentes citotóxicos y similares. Los agentes citotóxicos incluyen derivados de tomamicina, derivados de maitansina, derivados de criptoficina, derivados de antraciclina, derivados de bisfosfonato, derivados de leptomicina, derivados de estreptonigrina, derivados de auristatina y derivados de duocarmicina. Cualquier agente que actúa para retardar o ralentizar el crecimiento de células inmunorreactivas o células malignas está dentro del alcance de la presente divulgación.
- El término "antígeno" o "antígeno diana", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula o una porción de una molécula que es capaz de ser unida por el sitio de unión de un polipéptido de unión. Un antígeno diana puede tener uno o más epítopes.
- El término "polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico", como se usa en el presente documento, se refiere al polipéptido formado haciendo reaccionar un CMP-derivado de ácido siálico con un glucano de un péptido de unión. Por ejemplo, un polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico incluye, pero no se limita a, los polipéptidos de las **Figuras 3A-E** representados por círculos en combinación con los restos reactivos a los que están unidos.
- El término "glucopéptido trivalente", como se usa en el presente documento, se refiere a un resto de direccionamiento o efector que comprende tres glucopéptidos.
- El término "aminooxi trivalente", como se usa en el presente documento, se refiere a un resto aminooxi que comprende además tres hidratos de carbono o glucopéptidos. El aminooxi trivalente puede contener además grupos funcionales, por ejemplo, un conector.
- Como se usa en el presente documento, "química de click" se refiere a pares de resto reactivos terminales que reaccionan rápidamente y selectivamente ("click") entre sí para formar un polipéptido de unión conjugado con resto de direccionamiento o efector. La química de click se trata adicionalmente en el presente documento.
- Como se usa en el presente documento, el término "catalizador metálico" se refiere a catalizadores que comprenden un metal de transición que incluye, pero no se limitan a, rutenio, níquel, paladio, platino y hierro, y uno o más ligandos que incluyen, pero no se limitan a, derivados de bipyridina o derivados de terpiridina. Un catalizador metálico también se puede formar *in situ*. Por ejemplo, se puede añadir un compuesto de cobre (II) a la mezcla de reacción en presencia de un agente reductor que incluye, pero no se limita a, sulfato de cobre (CuSO₄) como el compuesto de cobre (II) y ascorbato de sodio como el agente reductor.
- Como se usa en el presente documento, el término "resto reactivo" se refiere a un resto que comprende una porción o un grupo funcional entero que son grupos específicos de uno o más átomos y uno o más enlaces que son responsables de reacciones químicas características. En los casos de ejemplo, un resto reactivo incluye, pero no se limita a, un resto de aldehído, un alquino, un resto aminooxi, una azida, una hidracina, un resto ceto y un tiol. En algunos casos, el resto reactivo es un resto reactivo terminal. En la tercera etapa de la reacción, un primer resto reactivo reacciona con un segundo resto reactivo para formar el polipéptido de unión conjugado con resto efector.
- Un resto "aldehído", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo funcional formilo y se representa por la siguiente fórmula estructural:
- $$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{---} \text{H} \end{array}$$
- Por ejemplo, un CMP-derivado de ácido siálico que comprende un resto aldehído terminal incluye, pero no se limita a, las siguientes fórmulas estructurales:

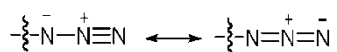


Un resto "alquino", como se usa en el presente documento, se refiere a un triple enlace carbono-carbono.

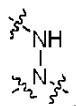
Un resto "aminooxi", como se usa en el presente documento, se refiere a un enlace sencillo nitrógeno-oxígeno y se representa por la siguiente fórmula estructural:



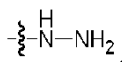
Un resto "azida", como se usa en el presente documento, se refiere a un resto RN_3 y se puede representar por la siguiente fórmula estructural:



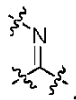
10 Un resto "hidracina", como se usa en el presente documento, se refiere a al menos un enlace sencillo nitrógeno-nitrógeno y se representa por la siguiente fórmula estructural:



Por ejemplo, una hidracina puede tener una fórmula estructural de:

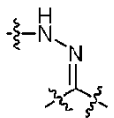


15 Como se usa en el presente documento, un resto "imina" se refiere a un doble enlace carbono-nitrógeno y se representa por la siguiente fórmula estructural:



En algunos casos, un polipéptido de unión conjugado con resto de direccionamiento o efector comprende una imina. Por ejemplo, un tipo de imina incluye, pero no se limita a, una aldimina, una hidroxilamina, una hidrazona, una ketamina o una oxima.

20 Un resto "hidrazona", como se usa en el presente documento, se refiere a un tipo de imina y se representa por la siguiente fórmula estructural:

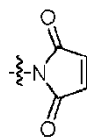


25 En algunos casos, la hidrazona puede ser una hidrazona terminal. En algunos casos, un enlace hidrazona comprende un resto hidrazona junto con grupos funcionales adicionales, por ejemplo, un conector o una porción de un resto de enlace.

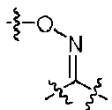
Un resto "ceto" o "cetona", como se usa en el presente documento, comprende un grupo funcional carbonilo y se representa por la siguiente fórmula estructural:



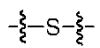
30 Un resto "maleimida", como se usa en el presente documento, comprende una imida insaturada y se representa por la siguiente fórmula estructural:



Un resto "oxima" es un tipo de imina y se representa por la siguiente fórmula estructural:



El término "tioéter" se representa por la siguiente fórmula estructural:



5

Un "tiol" se refiere a un resto que comprende un grupo funcional -SH, que también se denomina un grupo sulfhidrilo. En algunos casos, un tiol contiene un grupo sulfhidrilo unido a carbono.

El término "terminal", cuando se refiere a un resto reactivo, como se usa en el presente documento, describe un grupo unido a un extremo de un resto lineal o de cadena ramificada. En algunos casos, el resto reactivo terminal es un sustituyente de un grupo funcional.

10

El término "agente de oxidación" se refiere a un compuesto o un reactivo que acepta o gana electrones de otro compuesto o reactivo, experimentando así una reducción mientras que se oxida el otro compuesto o reactivo. Por ejemplo, los agentes de oxidación incluyen, pero no se limitan a, peryodato de sodio, peryodato oxidasa, galactosa oxidasa, peróxido de hidrógeno y compuestos de cobre (por ejemplo, sulfato de cobre (II)).

15

El término "temperatura ambiente", como se usa en el presente documento, es equivalente al término "temperatura ambiente" e indica el intervalo de temperaturas entre 20 °C y 26 °C (equivalente a 68 °F y 79 °F), con una temperatura promedio de aproximadamente de 23 °C (73 °F).

El término "polipéptido de unión conjugado con resto efector", como se usa en el presente documento, se refiere a una estructura que comprende una o más proteínas de unión enlazadas o unidas a un resto efector. Puede haber varios restos químicos y grupos funcionales que comprenden el enlace entre la(s) proteína(s) de unión y el (los) resto(s) efector(es) que incluye, pero no se limitan a, cualquier glucano o glucano modificado (por ejemplo, uno o más derivados de ácido siálico o CMP-derivados de ácido siálico).

20

II. Derivados de ácido siálico

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método de preparación de ácidos siálicos o derivados de ácido siálico a partir de azúcares o derivados de azúcar. El azúcar o derivado de azúcar usado puede ser, pero no se limita a, N-acetilmanosamina o sus derivados tales como N-acetil manosamina (ManNAc), N-levulinoil manosamina (ManLev), N-azidoacetilmanosamina (ManHAz), azidomanosamina y N-tioacetilmanosamina (ManHS).

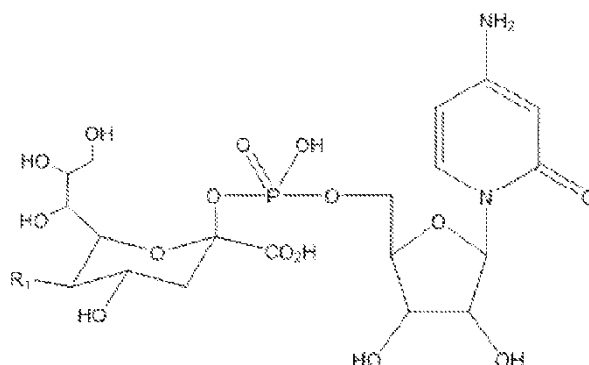
25

En los casos de ejemplo, el azúcar o derivado de azúcar tiene la siguiente fórmula estructural:



en donde R₁ es un resto reactivo que incluye, pero no se limita a, NII(C=O)CII₃, NH(C=O)CH₂CH₂(C=O)CH₃, NH(C=O)CH₂OH, NH(C=O)CH₂N₃, NH(C=O)SH, OH o N₃. En algunos casos, el CMP-derivado de ácido siálico tiene la siguiente fórmula estructural:

30



en donde R1 es un resto reactivo que incluye, pero no se limita a, los grupos enumerados anteriormente.

II. Polipéptidos de unión

En un aspecto, la presente divulgación proporciona polipéptidos de unión (por ejemplo, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, variantes de anticuerpo y proteínas de fusión) que comprenden un dominio glucosilado, por ejemplo, un dominio constante glucosilado. Los polipéptidos de unión desvelados en el presente documento engloban cualquier polipéptido de unión que comprende un dominio que tiene un sitio de glucosilación unido en N. En ciertos casos, el polipéptido de unión es un anticuerpo, o fragmento o derivado del mismo. Se puede emplear cualquier anticuerpo de cualquier fuente o especie en los polipéptidos de unión desvelados en el presente documento. Los anticuerpos adecuados incluyen, sin limitación, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados o anticuerpos quiméricos. En los métodos de la presente invención, el polipéptido de unión es un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo.

En ciertos casos, el dominio glucosilado es un dominio Fc. En ciertos casos, el dominio de glucosilación es un dominio de glucosilación nativo en N297.

En otros casos, el dominio de glucosilación es un dominio de glucosilación manipulado. Los dominios de glucosilación manipulados a modo de ejemplo en el dominio Fc comprenden un resto de asparagina en la posición de aminoácido 298, según la numeración EU; y un resto de serina o treonina en la posición de aminoácido 300, según la numeración EU.

Se pueden usar dominios Fc de cualquier clase de inmunoglobulina (por ejemplo, IgM, IgG, IgD, IgA e IgE) y especie en los polipéptidos de unión desvelados en el presente documento. También se pueden emplear dominios Fc quiméricos que comprenden porciones de dominios Fc de diferentes especies o clases de Ig. En ciertos casos, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG1 humana. En el caso de un dominio Fc de IgG1 humana, la mutación del aminoácido natural en la posición de Kabat 298 a una asparagina y la posición de Kabat 300 a una serina o treonina da como resultado la formación de un sitio consenso de glucosilación unido en N (es decir, el secuón N-X-T/S, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina). Sin embargo, en el caso de dominios Fc de otras especies y/o clases o isotipos de Ig, el experto apreciará que puede ser necesario mutar la posición de Kabat 299 del dominio Fc si está presente un resto de prolina para recrear un secuón N-X-T/S.

En otros casos, la presente divulgación proporciona polipéptidos de unión (por ejemplo, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, variantes de anticuerpo y proteínas de fusión) que comprenden al menos un dominio CH1 que tiene un sitio de glucosilación unido en N. Dichos polipéptidos de unión a modo de ejemplo incluyen pueden comprender, por ejemplo, y sitio de glucosilación manipulado en la posición 114, según la numeración de Kabat.

Se pueden usar dominios CH1 de cualquier clase de inmunoglobulina (por ejemplo, IgM, IgG, IgD, IgA e IgE) y especie en los polipéptidos de unión desvelados en el presente documento. También se pueden emplear dominios CH1 quiméricos que comprenden porciones de dominios CH1 de diferentes especies o clases de Ig. En ciertos casos, el dominio CH1 es un dominio CH1 de IgG1 humana. En el caso de un dominio IgG1 humano, la mutación del aminoácido natural en la posición 114 a una asparagina da como resultado la formación de un sitio consenso de glucosilación unido en N (es decir, el secuón N-X-T/S, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina). Sin embargo, en el caso de otros dominios CH1 de otras especies y/o clases o isotipos de Ig, el experto apreciará que puede ser necesario mutar las posiciones 115 y/o 116 del dominio CH1 para crear un secuón N-X-T/S.

En ciertos casos, el polipéptido de unión de la presente divulgación puede comprender un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo. El término "fragmento de unión al antígeno" se refiere a un fragmento de polipéptido de una inmunoglobulina o anticuerpo que se une a antígeno o compite con anticuerpo intacto (es decir, con el anticuerpo intacto del que se derivaron) para la unión al antígeno (es decir, unión específica). Los fragmentos de unión al antígeno se pueden producir por métodos recombinantes o bioquímicos que se conocen bien en la técnica. Los fragmentos de unión al antígeno a modo de ejemplo incluyen Fv, Fab, Fab' y (Fab')₂. En algunos casos, el fragmento de unión al antígeno de la presente divulgación es un fragmento de unión al antígeno alterado que comprende al menos un sitio

de glucosilación manipulado. En un caso a modo de ejemplo, un fragmento de unión al antígeno alterado de la presente divulgación comprende un dominio VH alterado descrito arriba. En otro caso a modo de ejemplo, un fragmento de unión al antígeno alterado de la presente divulgación comprende un dominio CH1 alterado descrito arriba.

En casos a modo de ejemplo, el polipéptido de unión comprende una secuencia de región variable monocatenaria (scFv). Las secuencias de la región variable monocatenaria comprenden un único polipéptido que tiene uno o más sitios de unión al antígeno, por ejemplo, un dominio VL unido por un conector flexible a un dominio VH. Las moléculas de scFv se pueden construir en una orientación VH-conector-VL u orientación VL-conector-VH. La bisagra flexible que une los dominios VL y VH que constituyen el sitio de unión al antígeno normalmente tiene desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 50 restos de aminoácidos. Se conocen en la técnica péptidos de conexión. Los polipéptidos de unión pueden comprender al menos un scFv y/o al menos una región constante. En un caso, un polipéptido de unión de la presente divulgación puede comprender al menos un scFv unido o fusionado con un anticuerpo o fragmento que comprende un dominio CH1 (por ejemplo, un dominio CH1 que comprende un resto de asparagina en la posición de Kabat 114) y/o un dominio CH2 (por ejemplo, un dominio CH2 que comprende un resto de asparagina en la posición de EU 298, y un resto de serina o treonina en la posición de EU 300).

En ciertos casos a modo de ejemplo, un polipéptido de unión de la presente divulgación es un anticuerpo multivalente (por ejemplo, tetravalente) que se produce fusionando una secuencia de ADN que codifica un anticuerpo con una molécula de scFv (por ejemplo, una molécula de scFv alterada). Por ejemplo, en un caso, estas secuencias se combinan de forma que la molécula de scFv (por ejemplo, una molécula de scFv alterada) se una en su extremo N o extremo C a un fragmento Fc de un anticuerpo por un conector flexible (por ejemplo, un conector gly/ser). En otro caso, se puede preparar un anticuerpo tetravalente de la presente divulgación fusionando una molécula de scFv con un péptido conector, que está fusionado con un dominio CH1 (por ejemplo, un dominio CH1 que comprende un resto de asparagina en la posición de Kabat 114) para construir una molécula tetravalente de scFv-Fab.

En otro caso, un polipéptido de unión de la presente divulgación es un minicuerpo alterado. Los minicuerpos alterados de la presente divulgación son moléculas dimericas constituidas de dos cadenas de polipéptidos que comprende cada una una molécula de scFv (por ejemplo, una molécula de scFv alterada que comprende un dominio VH alterado descrito arriba) que está fusionada con un dominio CH3 o porción del mismo por un péptido de conexión. Se pueden preparar minicuerpos construyendo un componente de scFv y componentes de péptido de conexión-CH3 usando métodos descritos en la técnica (véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. 5.837.821 o el documento de patente WO 94/09817A1). En otro caso, se puede construir un minicuerpo tetravalente. Los minicuerpos tetravalentes se pueden construir del mismo modo que los minicuerpos, excepto que se unan dos moléculas scFv usando un conector flexible. La construcción scFv-scFv unida se une entonces a un dominio CH3.

En otro caso, un polipéptido de unión de la presente divulgación comprende un diacuerpo. Los diacuerpos son moléculas tetravalentes dimericas que tienen cada una un polipéptido similar a moléculas de scFv, pero que normalmente tienen un conector de resto de aminoácido corto (inferior a 10, por ejemplo, 1-5) que conecta ambos dominios variables, de forma que no puedan interaccionar los dominios VL y VH en la misma cadena de polipéptidos. En su lugar, el dominio VL y VH de una cadena de polipéptidos interacciona con el dominio VH y VL (respectivamente) en una segunda cadena de polipéptidos (véase, por ejemplo, el documento de patente WO 02/02781). Los diacuerpos de la presente divulgación comprenden una molécula de scFv fusionada con un dominio CH3.

En otros casos, los polipéptidos de unión incluyen anticuerpos multiespecíficos o multivalentes que comprenden uno o más dominios variables en serie en la misma cadena de polipéptidos, por ejemplo, polipéptidos variables de dominio en tándem (TVD). Los polipéptidos TVD a modo de ejemplo incluyen la configuración de "cabeza doble" o "Fv doble" descrita en la patente de EE. UU. Nº 5.989.830. En la configuración Fv doble, los dominios variables de dos anticuerpos diferentes se expresan en una orientación en tándem en dos cadenas separadas (una cadena pesada y una cadena ligera), en donde una cadena de polipéptidos tiene dos dominios VH en serie separados por un conector peptídico (VH1-conector-VH2) y la otra cadena de polipéptidos consiste en dominios VL complementarios conectados en serie por un conector peptídico (VL1-conector-VL2). En la configuración de cabeza doble cruzada, los dominios variables de dos anticuerpos diferentes se expresan en una orientación en tándem en dos cadenas de polipéptidos separadas (una cadena pesada y una cadena ligera), en donde una cadena de polipéptidos tiene dos dominios VH en serie separados por un conector peptídico (VH1-conector-VH2) y la otra cadena de polipéptidos consiste en dominios VL complementarios conectados en serie por un conector peptídico en la orientación opuesta (VL2-conector-VL1). Las variantes de anticuerpo adicionales basadas en el formato de "Fv doble" incluyen el anticuerpo biespecífico de dominio variable doble IgG (DVD-IgG) (véase la patente de EE. UU. Nº 7.612.181 y el formato de TBTI (véase el documento de patente US 2010/0226923 A1). La adición de dominios constantes a cadenas respectivas del Fv doble (CH1-Fc a la cadena pesada y dominio constante kappa o lambda a la cadena ligera) conduce a anticuerpos biespecíficos funcionales sin necesidad de modificaciones adicionales (es decir, adición obvia de dominios constantes para potenciar la estabilidad).

En otro caso a modo de ejemplo, el polipéptido de unión comprende un anticuerpo biespecífico IgG de dominio variable doble cruzado (CODV-IgG) basado en una configuración de "cabeza doble" (véase el documento de US20120251541 A1). Las variantes de anticuerpo CODV-IgG tienen una cadena de polipéptidos con dominios VL conectados en serie a un dominio CL (VL1-L1-VL2-L2-CL) y una segunda cadena de polipéptidos con dominios VH complementarios conectados en serie en la orientación opuesta a un dominio CH1 (VH2-L3-VH1-L4-CH1), donde las cadenas de

polipéptidos forman un par cruzado cadena ligera-cadena pesada. En ciertos casos, el segundo polipéptido se puede conectar adicionalmente a un dominio Fc (VH2-L3-VH1-L4-CH1-Fc). En ciertos casos, el conector L3 es al menos dos veces la longitud del conector L1 y/o el conector L4 es al menos dos veces la longitud del conector L2. Por ejemplo, L1 y L2 pueden tener 1-3 restos de aminoácidos de longitud, L3 puede tener 2 a 6 restos de aminoácidos de longitud y L4 puede tener 4 a 7 restos de aminoácidos de longitud. Los ejemplos de conectores adecuados incluyen un único resto de glicina (Gly); un péptido de diglicina (Gly-Gly); un tripéptido (Gly-Gly-Gly); un péptido con cuatro restos de glicina (Gly-Gly-Gly-Gly); un péptido con cinco restos de glicina (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly); un péptido con seis restos de glicina (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly); un péptido con siete restos de glicina (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly); un péptido con ocho restos de glicina (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly). Se pueden usar otras combinaciones de restos de aminoácidos tales como el péptido Gly-Gly-Gly-Gly-Ser y el péptido Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser.

En ciertos casos, el polipéptido de unión comprende una molécula de inmunoadhesina que comprende una región de unión que no se une al anticuerpo (por ejemplo, un receptor, ligando o molécula de adhesión a célula) fusionada con una región constante de anticuerpo (véase, por ejemplo, Ashkenazi et al., *Methods*, 1995 8(2), 104-115)

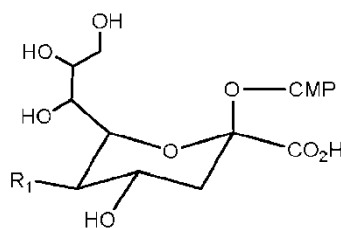
En ciertos casos, el polipéptido de unión comprende dominios de tipo inmunoglobulina. Los dominios de tipo inmunoglobulina adecuados incluyen, sin limitación, dominios de fibronectina (véase, por ejemplo, Koide et al. (2007), *Methods Mol. Biol.* 352: 95-109), DARPIn (véase, por ejemplo, Stumpp et al. (2008) *Drug Discov. Today* 13 (15-16): 695-701), dominios Z de proteína A (véase Nygren et al. (2008) *FEBS J.* 275 (11): 2668-76), lipocalinas (véase, por ejemplo, Skerra et al. (2008) *FEBS J.* 275 (11): 2677-83), afilinas (véase, por ejemplo, Ebersbach et al. (2007) *J. Mol. Biol.* 372 (1): 172-85), afitinas (véase, por ejemplo, Krehenbrink et al. (2008). *J. Mol. Biol.* 383 (5): 1058-68), avímeros (véase, por ejemplo, Silverman et al. (2005) *Nat. Biotechnol.* 23 (12): 1556-61), finómeros (véase, por ejemplo, Grabulovski et al. (2007) *J Biol Chem* 282 (5): 3196-3204) y péptidos del dominio de Kunitz (véase, por ejemplo, Nixon et al. (2006) *Curr Opin Drug Discov Devel* 9 (2): 261-8.

III. Glucanos unidos en N

En ciertos casos, los polipéptidos de unión emplean glucanos unidos en N que "se unen en N" por un resto de asparagina a un sitio de glucosilación en el esqueleto del polipéptido de unión. El sitio de glucosilación puede ser un sitio de glucosilación nativo o manipulado. Adicionalmente o alternativamente, el glucano puede ser un glucano nativo o un glucano manipulado que contiene enlaces no nativos.

En ciertos casos a modo de ejemplo, el polipéptido de unión incluye el sitio de glucosilación nativo de un dominio Fc de anticuerpo. Este sitio de glucosilación nativo comprende un resto de asparagina natural en la posición 297 del dominio Fc (N297), según la numeración EU. El glucano unido en N nativo que reside en esta posición, en general, se une mediante un enlace β -glucosilamídico al grupo de nitrógeno de la cadena lateral de N297. Sin embargo, también se pueden emplear otros enlaces adecuados reconocidos en la técnica. En otros casos a modo de ejemplo, los polipéptidos de unión comprenden uno o más sitios de glucosilación manipulados. Dichos sitios de glucosilación manipulados comprenden la sustitución de uno o más aminoácidos naturales en el esqueleto del polipéptido de unión con un resto de asparagina que es capaz de ser glucosilado en N por las enzimas de glucosilación de una célula. Los sitios de glucosilación manipulados a modo de ejemplo incluyen la introducción de la mutación de asparagina en la posición de aminoácido 298 del dominio Fc (298N) o la posición de aminoácido 114 de un dominio CH1 (114N).

Cualquier tipo de glucano unido en N que exista de forma natural o sintético (es decir, no natural) se puede unir a un sitio de glucosilación de un polipéptido de unión caracterizado en la divulgación. En ciertos casos, el glucano comprende un sacárido (por ejemplo, un resto de sacárido situado en extremos de un oligosacárido) que se puede oxidar (por ejemplo, por tratamiento con peryodato o galactosa oxidasa) para producir un grupo adecuado para la conjugación con un resto efector (por ejemplo, un grupo aldehído reactivo). Los sacáridos oxidables adecuados incluyeron, sin limitación, galactosa y ácido siálico (por ejemplo, ácido N-acetilneuramínico). En otros casos, el glucano comprende un ácido siálico o derivado de ácido siálico que no requiere oxidación adicional para producir un grupo adecuado para la conjugación con un resto efector (por ejemplo, un resto reactivo que incluye, pero no se limita a, un resto de aldehído, un alquino, un resto aminooxi, una azida, una hidracina, un resto ceto y un tiol). En casos específicos, el glucano comprende un derivado de ácido siálico. En un caso, el glucano que comprende un derivado de ácido siálico se forma por una reacción entre un polipéptido de unión que comprende un glucano y un CMP-derivado de ácido siálico. En un caso, el derivado de ácido siálico o CMP-derivado de ácido siálico puede comprender un resto de azida terminal. En un caso adicional, el CMP-derivado de ácido siálico puede ser una azida C5 de CMP-ácido siálico. En otro caso, el derivado de ácido siálico puede comprender una azida C5. En ciertos casos, el CMP-derivado de ácido siálico tiene la siguiente fórmula estructural:



en donde R_1 es un resto reactivo que incluye, pero no se limita a, $\text{NH}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$, $\text{NH}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$, $\text{NH}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2\text{OH}$, $\text{NH}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2\text{N}_3$, $\text{NH}(\text{C}=\text{O})\text{SH}$, OH o N_3 .

En ciertos casos, el glucano es un glucano biantenarico. En ciertos casos, el glucano es una glucoforma de mamífero que existe de forma natural.

La glucosilación se puede lograr mediante cualquier medio conocido en la técnica. En ciertos casos, la glucosilación se logra por expresión de los polipéptidos de unión en células capaces de glucosilación en N. Se puede emplear cualquier célula natural o manipulada (por ejemplo, procariota o eucariota). En general, las células de mamífero se emplean para efectuar la glucosilación. Los N-glucanos que se producen en células de mamífero se denominan comúnmente N-glucanos complejos de tipo híbrido de alta manosa (véase, por ejemplo, Drickamer K, Taylor ME (2006). Introduction to Glycobiology, 2ª ed., Estos N-glucanos complejos tienen una estructura que normalmente tiene dos a seis ramas externas con una secuencia de sialil-lactosamina unida a una estructura de núcleo interno $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. Un N-glucano complejo tiene al menos una ramificación, por ejemplo, al menos dos, de restos alternos de GlcNAc y galactosa (Gal) que terminan en oligosacáridos tales como, por ejemplo: NeuNAc-; NeuAc $\alpha 2,6$ GalNAc $\alpha 1$ -; NeuAc $\alpha 2,3$ Gal $\beta 1,3$ GalNAc $\alpha 1$ -; y NeuAc $\alpha 2,3/6$ Gal $\beta 1,4$ GlcNAc $\beta 1$. Además, los ésteres de sulfato pueden ocurrir en restos de galactosa, GalNAc y GlcNAc. NeuAc puede estar O-acetilado o sustituido por NeuGI (ácido N-glucolilneuramínico). Los N-glucanos complejos también pueden tener sustituciones intracatenarias de GlcNAc bisecante y fucosa central (Fuc).

Adicionalmente o alternativamente, la glucosilación se puede lograr o modificar mediante medios enzimáticos, *in vitro*. Por ejemplo, se pueden emplear una o más glucosiltransferasas para añadir restos de sacárido específicos al N-glucano nativo o manipulado de un polipéptido de unión, y se pueden emplear una o más glucosidasas para retirar sacáridos no deseados del glucano unido en N. Se conocen bien en la técnica dichos medios enzimáticos (véase, por ejemplo, el documento de patente WO2007/005786).

IV. Funciones efectoras inmunológicas y modificaciones de Fc

En ciertos casos, los polipéptidos de unión pueden incluir una región constante de anticuerpo (por ejemplo, una región constante de IgG, por ejemplo, una región constante de IgG humana, por ejemplo, una región constante de IgG1 o IgG4 humana) que media en una o más funciones efectoras. Por ejemplo, la unión del complejo C1 a una región constante de anticuerpo puede activar el sistema del complemento. La activación del sistema del complemento es importante en la opsonización y la lisis de patógenos de la célula. La activación del sistema del complemento también estimula la respuesta inflamatoria y también puede participar en la hipersensibilidad autoinmunitaria. Además, los anticuerpos se unen a receptores en diversas células por la región Fc (sitios de unión al receptor de Fc en la región Fc del anticuerpo se unen a receptores de Fc (FcR) en una célula). Existen varios receptores de Fc que son específicos para diferentes clases de anticuerpo, que incluyen IgG (receptores gamma), IgE (receptores épsilon), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). La unión del anticuerpo a receptores de Fc sobre superficies celulares desencadena varias respuestas biológicas importantes y diferentes que incluyen la engullición y la destrucción de partículas recubiertas de anticuerpo, la eliminación de inmunocomplejos, la lisis de células diana recubiertas de anticuerpo por linfocitos citolíticos (denominada citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, o ADCC), la liberación de mediadores inflamatorios, la transferencia placentaria y el control de la producción de inmunoglobulina. En algunos casos, los polipéptidos de unión (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos) característicos en la divulgación se unen a un receptor de Fc-gamma. En casos alternativos, los polipéptidos de unión pueden incluir una región constante que carece de una o más funciones efectoras (por ejemplo, actividad de ADCC) y/o es incapaz de unirse al receptor de Fc γ .

Ciertas realizaciones incluyen anticuerpos en los que al menos un aminoácido en uno o más de los dominios de la región constante se han deletado o alterado de otro modo de manera que se proporcionen las características bioquímicas deseadas, tales como funciones efectoras reducidas o potenciadas, capacidad para dimerizar no covalentemente, elevada capacidad para localizarse en el sitio de un tumor, reducida semivida en suero, o elevada semivida en suero cuando se compara con un anticuerpo inalterado completo de aproximadamente la misma inmunogenicidad. Por ejemplo, ciertos anticuerpos para su uso en los métodos de diagnóstico y de tratamiento descritos en el presente documento son anticuerpos de dominios deletados que comprenden una cadena de polipéptidos similar a una cadena pesada de la inmunoglobulina, pero que carecen de al menos una porción de uno o más dominios de la cadena pesada. Por ejemplo, en ciertos anticuerpos, se deletará un dominio entero de la región constante del anticuerpo modificado, por ejemplo, se deletará todo o parte del dominio CH2.

En ciertos otros casos, los polipéptidos de unión comprenden regiones constantes derivadas de diferentes isotipos de anticuerpo (por ejemplo, regiones constantes de dos o más de una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana). En otros casos, los polipéptidos de unión comprenden una bisagra quimérica (es decir, una bisagra que comprende porciones de bisagra derivadas de dominios bisagra de diferentes isotipos de anticuerpo, por ejemplo, un dominio bisagra superior de una molécula de IgG4 y un dominio bisagra central de IgG1). En un caso, los polipéptidos de unión comprenden una región Fc o porción de la misma de una molécula IgG4 humana y una mutación Ser228Pro (numeración EU) en la región bisagra central de la molécula.

En ciertos casos, la porción Fc se puede mutar para aumentar o disminuir la función efectora usando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, la delección o inactivación (mediante mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de la región constante puede reducir la unión al receptor de Fc del anticuerpo modificado circulante, aumentando así la localización del tumor. En otros casos, puede ser que modificaciones de la región constante de acuerdo con la presente divulgación moderen la unión al complemento y así reduzcan la semivida en suero y la asociación no específica de una citotoxina conjugada. Aún se pueden usar otras modificaciones de la región constante para modificar los enlaces disulfuro o restos de oligosacárido que permiten la localización potenciada debido a la elevada especificidad por antígenos o flexibilidad. Se pueden medir y cuantificar fácilmente el perfil fisiológico resultante, la biodisponibilidad y otros efectos bioquímicos de las modificaciones, tales como la localización tumoral, la biodistribución y la semivida en suero, usando técnicas inmunológicas bien conocidas sin excesiva experimentación.

En ciertos casos, un dominio Fc empleado en un anticuerpo caracterizado en la invención es una variante de Fc. Como se usa en el presente documento, el término "variante de Fc" se refiere a un dominio Fc que tiene al menos una sustitución de aminoácidos con respecto al dominio Fc natural del que se obtiene dicho dominio Fc. Por ejemplo, en donde el dominio Fc deriva de un anticuerpo IgG1 humano, la variante de Fc de dicho dominio Fc de IgG1 humana comprende al menos una sustitución de aminoácidos con respecto a dicho dominio Fc.

La(s) sustitución (sustituciones) de aminoácidos de una variante de Fc se pueden localizar en cualquier posición (es decir, cualquier posición de aminoácido por la convención EU) dentro del dominio Fc. En un caso, la variante de Fc comprende una sustitución en una posición de aminoácido situada en un dominio bisagra o porción del mismo. En otro caso, la variante de Fc comprende una sustitución en una posición de aminoácido localizada en un dominio CH2 o porción del mismo. En otro caso, la variante de Fc comprende una sustitución en una posición de aminoácido situada en un dominio CH3 o porción del mismo. En otro caso, la variante de Fc comprende una sustitución en una posición de aminoácido situada en un dominio CH4 o porción del mismo.

Los polipéptidos de unión pueden emplear cualquier variante de Fc reconocida en la técnica que se conoce por conferir una mejora (por ejemplo, reducción o potenciamiento) en la función efectora y/o unión a FcRn. Dichas variantes de Fc pueden incluir, por ejemplo, una cualquiera de las sustituciones de aminoácidos desveladas en las publicaciones internacionales PCT WO88/07089A1, WO96/14339A1, WO98/05787A1, WO98/23289A1, WO99/51642A1, WO99/58572A1, WO00/09560A2, WO00/32767A1, WO00/42072A2, WO02/44215A2, WO02/060919A2, WO03/074569A2, WO04/016750A2, WO04/029207A2, WO04/035752A2, WO04/063351A2, WO04/074455A2, WO04/099249A2, WO05/040217A2, WO05/070963A1, WO05/077981A2, WO05/092925A2, WO05/123780A2, WO06/019447A1, WO06/047350A2, y WO06/085967A2 o las patentes de EE. UU. N° 5.648.260; 5.739.277; 5.834.250; 5.869.046; 6.096.871; 6.121.022; 6.194.551; 6.242.195; 6.277.375; 6.528.624; 6.538.124; 6.737.056; 6.821.505; 6.998.253; y 7.083.784. En un caso a modo de ejemplo, un polipéptido de unión puede comprender una variante de Fc que comprende una sustitución de aminoácidos en la posición de EU 268 (por ejemplo, H268D o H268E). En otro caso a modo de ejemplo, un polipéptido de unión puede incluir una sustitución de aminoácidos en la posición de EU 239 (por ejemplo, S239D o S239E) y/o la posición de EU 332 (por ejemplo, I332D o I332Q).

En ciertos casos, un polipéptido de unión puede incluir una variante de Fc que comprende una sustitución de aminoácidos que altera las funciones efectoras del anticuerpo independientes de antígeno, en particular la semivida en circulación del polipéptido de unión. Dichos polipéptidos de unión presentan unión elevada o reducida a FcRn cuando se compara con polipéptidos de unión que carecen de estas sustituciones, por tanto, tienen un aumento o disminución de la semivida en suero, respectivamente. Se anticipa que las variantes de Fc con afinidad mejorada por FcRn tienen semividas en suero más largas, y dichas moléculas tienen aplicaciones útiles en métodos de tratamiento de mamíferos donde se desea una semivida larga del anticuerpo administrado, por ejemplo, para tratar una enfermedad crónica o trastorno. A diferencia, se espera que las variantes de Fc con afinidad de unión por FcRn reducida tengan semividas más cortas, y dichas moléculas también son útiles, por ejemplo, para administración a un mamífero donde un tiempo de circulación acortado puede ser ventajoso, por ejemplo, para la obtención de imágenes de diagnóstico *in vivo* o en situaciones donde el anticuerpo de partida tiene efectos secundarios tóxicos cuando está presente en la circulación durante periodos prolongados. También es menos probable que las variantes de Fc con afinidad de unión por FcRn reducida crucen la placenta y así también son útiles en el tratamiento de enfermedades o trastornos en mujeres embarazadas. Además, otras aplicaciones en las que se puede desear afinidad de unión por FcRn reducida incluyen aplicaciones situadas en el cerebro, riñón y/o hígado. En un caso a modo de caso de ejemplo, los polipéptidos de unión alterados (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos) presentan transporte reducido a través del epitelio de los glomérulos del riñón de la vasculatura. En otro caso, los polipéptidos de unión alterados (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos) presentan un transporte reducido a través de la barrera hematoencefálica (BBB) desde el cerebro en el espacio vascular. En un caso, un anticuerpo con unión a FcRn alterada comprende un dominio Fc que tiene una o más sustituciones de

aminoácidos dentro del "bucle de unión a FcRn" de un dominio Fc. El bucle de unión a FcRn comprende los restos de aminoácidos 280-299 (según la numeración de EU). Las sustituciones de aminoácidos a modo de ejemplo que alteran la actividad de unión a FcRn se desvelan en la publicación PCT internacional N° WO05/047327. En ciertos casos a modo de ejemplo, los polipéptidos de unión (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos) incluyen un dominio Fc que tiene una o más de las siguientes sustituciones: V284E, H285E, N286D, K290E y S304D (numeración de EU). En aún otros casos a modo de ejemplo, las moléculas de unión incluyen un dominio Fc humano con la mutación doble H433K/N434F (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. N° 8.163.881).

En otros casos, los polipéptidos de unión, para su uso en los métodos de diagnóstico y de tratamiento descritos en el presente documento, tienen una región constante, por ejemplo, una región constante IgG1 o IgG4 de la cadena pesada, que se altera para reducir o eliminar la glucosilación. Por ejemplo, los polipéptidos de unión (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos) también pueden incluir una variante de Fc que comprende una sustitución de aminoácidos que altera la glucosilación del anticuerpo Fc. Por ejemplo, dicha variante de Fc puede tener glucosilación reducida (por ejemplo, glucosilación unida en N u O). En casos a modo de ejemplo, la variante de Fc comprende glucosilación reducida del glucano unido en N encontrado normalmente en la posición de aminoácido 297 (numeración de EU). En otro caso, el anticuerpo tiene una sustitución de aminoácidos cerca o dentro de un motivo de glucosilación, por ejemplo, un motivo de glucosilación unido en N que contiene la secuencia de aminoácidos NXT o NXS. En un caso particular, el anticuerpo comprende una variante de Fc con una sustitución de aminoácidos en la posición de aminoácido 228 o 299 (numeración de EU). En casos más particulares, el anticuerpo comprende una región constante de IgG1 o IgG4 que comprende una mutación S228P y T299A (numeración de EU).

Las sustituciones de aminoácidos a modo de ejemplo que confieren glucosilación reducida o alterada se desvelan en la publicación internacional PCT N° WO05/018572. En algunos casos, los polipéptidos de unión se modifican para eliminar la glucosilación. Dichos polipéptidos de unión se pueden denominar polipéptidos de unión "aglu" (por ejemplo, anticuerpos "aglu"). Aunque no se desea quedar ligado a teoría, se cree que los polipéptidos de unión pueden tener un perfil de seguridad y estabilidad mejorado *in vivo*. Los polipéptidos de unión aglu pueden ser de cualquier isotipo "aglu" o subclase de los mismos, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En ciertos casos, los polipéptidos de unión aglu comprenden una región Fc aglucosilada de un anticuerpo IgG4 que carece de función efectora de Fc, eliminando así las posibilidades de toxicidad mediada por Fc a los órganos vitales normales que expresan IL-6. En aún otros casos, los polipéptidos de unión incluyen un glucano alterado. Por ejemplo, el anticuerpo puede tener un número reducido de restos de fucosa en un N-glucano en Asn297 de la región Fc, es decir, está afucosilado. La afucosilación aumenta la unión de FcγRIII en los linfocitos NK y aumenta potentemente ADCC. Se ha mostrado que un diacuerpo que comprende un scFv anti-IL-6 y un scFv anti-CD3 induce la destrucción de IL-6 que expresa células por ADCC. Por consiguiente, en un caso, se usa un anticuerpo anti-IL-6 afucosilado para el direccionamiento y la destrucción de células que expresan IL-6. En otro caso, el polipéptido de unión puede tener un número alterado de restos de ácido siálico en el N-glucano en la Asn297 de la región Fc. Están disponibles numerosos métodos reconocidos en la técnica para la preparación de anticuerpos "aglu" o anticuerpos con glucanos alterados. Por ejemplo, se pueden usar células hospedadoras genéticamente manipuladas (por ejemplo, levadura modificada, por ejemplo, *Pichia*, o células CHO) con vías de glucosilación modificadas (por ejemplo, delecciones de glucosil-transferasa) para producir dichos anticuerpos.

V. Restos efectores

En ciertos casos, los polipéptidos de unión de la presente divulgación comprenden restos efectores (por ejemplo, restos de direccionamiento). En general, estos restos efectores se conjugan (ya sea directamente o mediante un resto conector) con un glucano unido en N en el polipéptido de unión (por ejemplo, un glucano unido en N unido a N298 (numeración de EU) del dominio CH2 y/o N114 (numeración de Kabat) de un dominio CH1). En ciertos casos, el polipéptido de unión es un anticuerpo de longitud completa que comprende dos dominios CH1 con un glucano en la posición de Kabat 114, en donde ambos glucanos se conjugan con uno o más restos efectores.

Se puede añadir cualquier resto efector a los polipéptidos de unión desvelados en el presente documento. Los restos efectores añaden normalmente una función no natural a un anticuerpo alterado o fragmentos del mismo sin alterar significativamente la actividad intrínseca del polipéptido de unión. El resto efector puede ser, por ejemplo, pero no se limita a, un resto de direccionamiento (por ejemplo, un glucopéptido o neoglucano). Un polipéptido de unión modificado (por ejemplo, un anticuerpo) de la presente divulgación puede comprender uno o más restos efectores, que pueden ser los mismos o diferentes.

En un caso, el resto efector puede ser de la fórmula (I):



en donde:

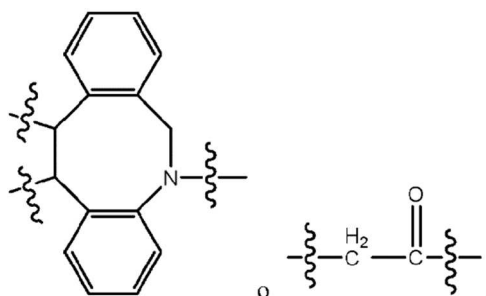
A) Q es NH u O; y

B) CON es un resto conector; y

C) X es un resto efector (por ejemplo, un resto de direccionamiento como se define en el presente documento).

El resto conector conecta el agente terapéutico con H₂N-Q-. El resto conector puede incluir al menos uno de cualquier componente adecuado conocido por los expertos en la técnica, que incluye, por ejemplo, un componente de alquilenilo, un componente de polietilenglicol, un componente de poli(glicina), un componente de poli(oxazolina), un componente de carbonilo, un componente derivado de cisteinamida, un componente derivado de valina acoplado con citrulina y un componente derivado de carbamato de 4-aminobencilo, o cualquier combinación de los mismos.

En algunos casos, el resto conector (CON) puede comprender porciones de las moléculas formadas en la etapa de reacción por la que se forma el polipéptido de unión conjugado con resto efector. Por ejemplo, el resto conector puede comprender una o más de las siguientes fórmulas estructurales:



En otro caso, el resto efector de fórmula (I) puede ser de la fórmula (Ia):



en donde:

A) Q es NH u o; y

B) Z es -Cys-(MC)_a-(VC)_b-(PABC)_c-(C₁₆H₃₂O₈C₂H₄)_f,

en donde

i. Cys es un componente derivado de cisteinamida;

ii. MC es un componente derivado de maleimida;

iii. VC es un componente derivado de valina acoplado con citrulina;

iv. PABC es un componente derivado de carbamato de 4-aminobencilo;

v. X es un resto efector (por ejemplo, un resto de direccionamiento como se define en el presente documento);

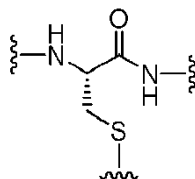
vi. a es 0 o 1;

vii. b es 0 o 1;

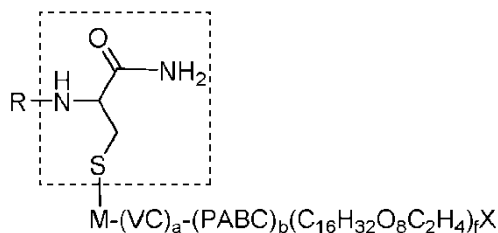
viii. c es 0 o 1; y

ix. f es 0 o 1

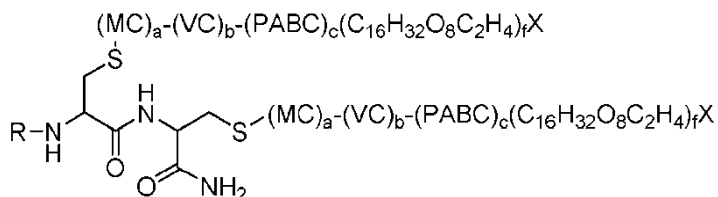
El "componente derivado de cisteinamida" es el punto de unión a H₂N-Q-CH₂-C(O)-. En un caso, el "componente derivado de cisteinamida" puede referirse a una o más porciones del resto efector que tienen la estructura:



En un caso, el componente de "Cys" de un resto efector puede incluir dicha porción. Por ejemplo, la siguiente estructura muestra un resto efector con dicha porción (en donde el componente de "Cys" se indica con el recuadro de línea de puntos):

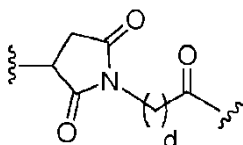


En otro caso, el componente de "Cys" de un resto efector puede incluir dos o más de dichas porciones. Por ejemplo, el siguiente resto contiene dos de dichas porciones:



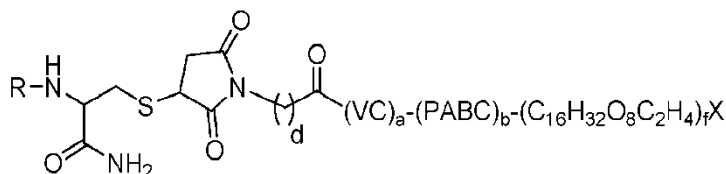
- 5 Como se puede apreciar de la estructura, cada componente de "Cys" posee un grupo $-(MC)_a-(VC)_b-(PABC)_c-(C_{16}H_{32}O_8C_2H_4)_f-X$.

En un caso, la expresión "componente derivado de maleimida" puede referirse a cualquier porción del resto efector que tiene la estructura:

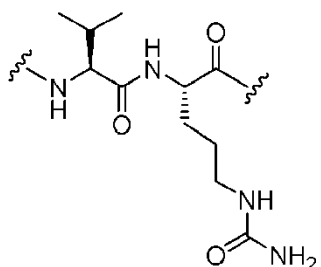


- 10 en donde d es un número entero desde 2 hasta 5. El número de componentes MC incluidos en cualquier grupo Cys- $(MC)_a-(VC)_b-(PABC)_c-(C_{16}H_{32}O_8C_2H_4)_f-X$ en el resto efector se indica por el subíndice "a," y puede ser 0 o 1. En un caso, a es 1. En otro caso, b es 0.

En un caso, el componente de "Cys" se puede conectar al componente "MC" por el átomo de azufre en el componente "Cys", como se indica con el recuadro de línea de puntos en la siguiente estructura:

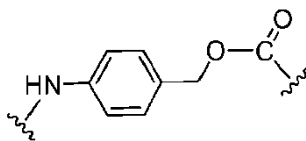


- 15 En un caso, la expresión "componente derivado de valina acoplado con citrulina" se puede referir a cualquier porción del resto efector con la siguiente estructura:



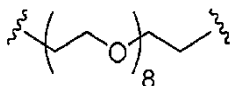
- 20 El número de componentes VC incluidos en cualquier grupo Cys- $(MC)_a-(VC)_b-(PABC)_c-(C_{16}H_{32}O_8C_2H_4)_f-X$ en el resto efector se indica por el subíndice "b," y puede ser 0 o 1. En un caso, b es 1. En otro caso, b es 0.

En un caso, la expresión "componente derivado de carbamato de 4-aminobencilo" se puede referir a cualquier porción del resto efector con la siguiente estructura:



El número de componentes PABC incluidos en cualquier grupo Cys-(MC)_a-(VC)_b-(PABC)_c-(C₁₆H₃₂O₈C₂H₄)_f-X en el resto efector se indica por el subíndice "c," y puede ser 0 o 1. En un caso, c es 1. En otro caso, c es 0.

En un caso, "C₁₆H₃₂O₈C₂H₄" se refiere a la siguiente estructura:



5

El número de unidades de C₁₆H₃₂O₈ incluidas en cualquier grupo Cys-(MC)_a-(VC)_b-(PABC)_c-(C₁₆H₃₂O₈C₂H₄)_f-X en el resto efector se indica por el subíndice "f". En un caso, f es 1. En otro caso, f es 0.

En un caso, a es 1, b es 1, c es 1, y f es 0.

a) Restos efectores terapéuticos

- 10 En ciertos casos, los polipéptidos de unión de la presente divulgación se conjugan con un resto efector que comprende un agente terapéutico, por ejemplo, un resto de fármaco (o profármaco del mismo) o compuesto radiomarcado. En un caso, el agente terapéutico es una citotoxina. Los agentes citotóxicos terapéuticos a modo de ejemplo se exponen en la Tabla 1 en el presente documento.

Tabla 1. Agentes citotóxicos terapéuticos a modo de ejemplo

ciclosporina-A, cloroquina, metopterina, mitramicina, porfiromicina, estreptonigrina, porfiromicina, antracenodionas y aziridinas). Otros agentes antineoplásicos citostáticos incluyen inhibidores de la síntesis de ADN (por ejemplo, metotrexato y diclorometotrexato, 1,4-dióxido de 3-amino-1,2,4-benzotriazina, aminopterina, citosina β -D-arabinofuranósido, 5-fluoro-5'-desoxiuridina, 5-fluorouracilo, ganciclovir, hidroxiurea, actinomicina-D y mitomicina C),
 5 intercalantes o reticulantes de ADN (por ejemplo, bleomicina, carboplatino, carmustina, clorambucilo, ciclofosfamida, dicloruro de cis-diaminoplatino (II) (cisplatino), melfalán, mitoxantrona y oxaliplatino) y reguladores de la transcripción de ADN-ARN (por ejemplo, actinomicina D, daunorubicina, doxorubicina, homoharringtonina e idarubicina). Otros agentes citostáticos a modo de ejemplo que son compatibles con la presente divulgación incluyen ansamicina, benzoquinonas, derivados de quinonoide (por ejemplo, quinolonas, genisteína, bactaciclina), busulfán, ifosfamida,
 10 mecloretamina, triaziquona, diaziquona, carbazilquinona, indoloquinona EO9, diaziridinil-benzoquinona metil DZQ, trietilenfosforamida y compuestos de nitrosourea (por ejemplo, carmustina, lomustina, semustina).

Los agentes antineoplásicos de nucleósido citotóxico a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a: arabinósido de adenosina, citarabina, arabinósido de citosina, 5-fluorouracilo, fludarabina, floxuridina, ftorafur y 6-mercaptopurina. Los agentes de unión de la tubulina antineoplásicos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a: taxoides (por
 15 ejemplo, paclitaxel, docetaxel, taxano), nocodazol, rizoxina, dolastatinas (por ejemplo, dolastatina-10, -11 o -15), colchicina y colchicinoides (por ejemplo, ZD6126), combretastatinas (por ejemplo, combretastatina A-4, AVE-6032) y alcaloides de la vinca (por ejemplo, vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina (navelbina)). Las hormonas antineoplásicas y antagonistas de hormonas a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a: corticosteroides (por ejemplo, prednisona), progestinas (por ejemplo, hidroxiprogesterona o medroprogesterona), estrógenos, (por ejemplo,
 20 dietilestilbestrol), antiestrógenos (por ejemplo, tamoxifeno), andrógenos (por ejemplo, testosterona), inhibidores de la aromatasa (por ejemplo, aminoglutetimida), 17-(alilamino)-17-demetoxigeldanamicina, 4-amino-1,8-naftalimida, apigenina, brefeldina A, cimetidina, ácido diclorometilendifosfónico, leuprolida (leuprorelina), hormona liberadora de la hormona luteinizante, pifitrina-a, rapamicina, globulina de unión a la hormona sexual y taspigargina. Los compuestos anti-angiogénesis antineoplásicos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a: angiostatina K1-3, DL-a-difluorometil-ornitina, endostatina, fumagilina, genisteína, minociclina, estaurosporina y (\pm)-talidomida.

Los inhibidores enzimáticos antineoplásicos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a: S(+)-camptotecina, curcumina, (-)-deguelina, 5,6-diclorobencimidazol 1- β -D-ribofuranósido, etopósido, formestano, fostriecina, hispidina, ácido 2-imino-1-imidazolidinacético (ciclocreatina), mevinolina, tricoestatina A, tricoestatina AG 34 y tricoestatina AG 879.

Los reguladores génicos antineoplásicos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a: 5-aza-2'-desoxicitidina, 5-azacitidina, colecalciferol (vitamina D3), 4-hidroxitamoxifeno, melatonina, mifepristona, raloxifeno, trans-retinal (aldehídos de vitamina A), ácido retinoico, ácido de vitamina A, ácido 9-cis-retinoico, ácido 13-cis-retinoico, retinol (vitamina A), tamoxifeno y troglitazona.

Otras clases de agentes antineoplásicos incluyen, pero no se limitan a: la familia de fármacos de pteridina, diinonas y las podofilotoxinas. Los miembros particularmente útiles de las clases incluyen, por ejemplo, metopterina,
 35 podofilotoxina o derivados de podofilotoxina tales como etopósido o fosfato de etopósido, leurosina, vindesina, leurosina y similares.

Aún otros agentes antineoplásicos que son compatibles con las enseñanzas en el presente documento incluyen auristatinas (por ejemplo, auristatina E y monometil auristán E), geldanamicina, caliqueamicina, gramicidina D, maitansinoides (por ejemplo, maitansina), neocarcinostatina, topotecán, taxanos, citocalasina B, bromuro de etidio, emetina, tenopósido, colchicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, puromicina, y análogos u homólogos de los mismos.

Aún otros agentes antineoplásicos que son compatibles con las enseñanzas en el presente documento incluyen derivados de tomamicina, derivados de maitansina, derivados de criptoficina, derivados de antraciclina, derivados de bisfosfonato, derivados de leptomicina, derivados de estreptonigrina, derivados de auristatina y derivados de
 45 duocarmicina.

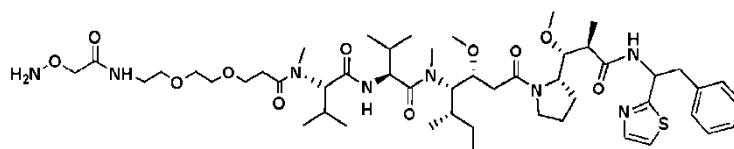
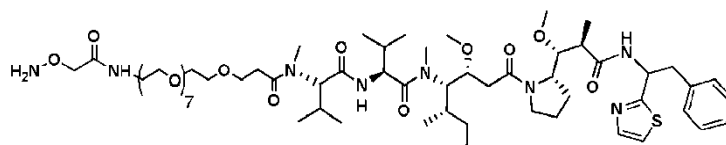
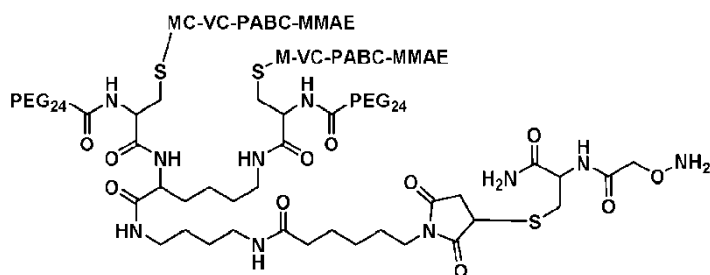
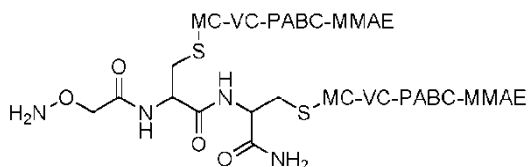
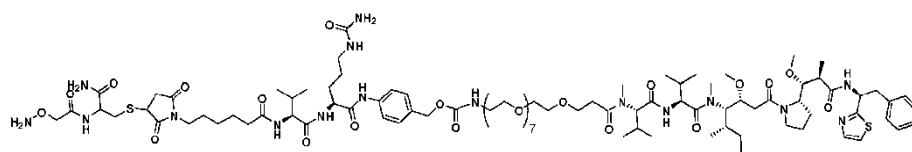
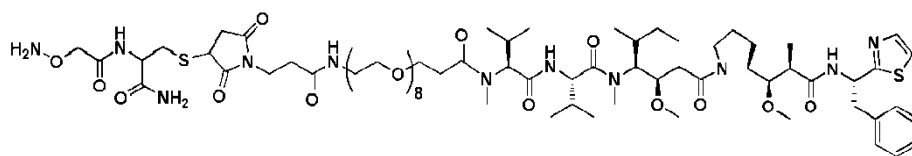
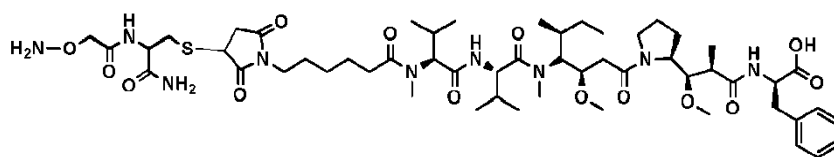
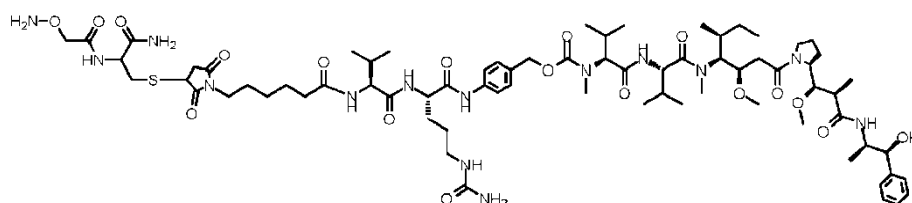
Otra clase de agentes antineoplásicos compatibles que se puede usar como resto de fármacos son fármacos radiosensibilizantes que se pueden dirigir eficazmente al tumor o células inmunorreactivas. Dichos restos de fármaco potencian la sensibilidad a radiación ionizante, aumentando así la eficacia de la radioterapia. Sin estar limitado por teoría, pero un anticuerpo modificado con un resto de fármaco radiosensibilizante e internalizado por la célula tumoral
 50 suministraría el radiosensibilizador más cerca del núcleo donde la radiosensibilización sería máxima. Los anticuerpos que pierden el resto radiosensibilizador serían eliminados rápidamente de la sangre, ubicándose el resto del agente de radiosensibilización en el tumor diana y proporcionando captación mínima en tejidos normales. Después de la eliminación de la sangre, se podría administrar radioterapia complementaria por radiación de haces externos dirigida específicamente al tumor, radiactividad directamente implantada en el tumor, o radioinmunoterapia sistémica con el
 55 mismo anticuerpo modificado.

En un caso, el agente terapéutico comprende radionúclidos o radiomarcas con radiación ionizante de alta energía que son capaces de causar múltiples roturas de las cadenas en el ADN nuclear, que conduce a muerte celular. Los radionúclidos de alta energía a modo de ejemplo incluyen: ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{123}I , ^{111}In , ^{105}Rh , ^{153}Sm , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re y ^{188}Re . Estos isótopos normalmente producen partículas α o β de alta energía que tienen una corta

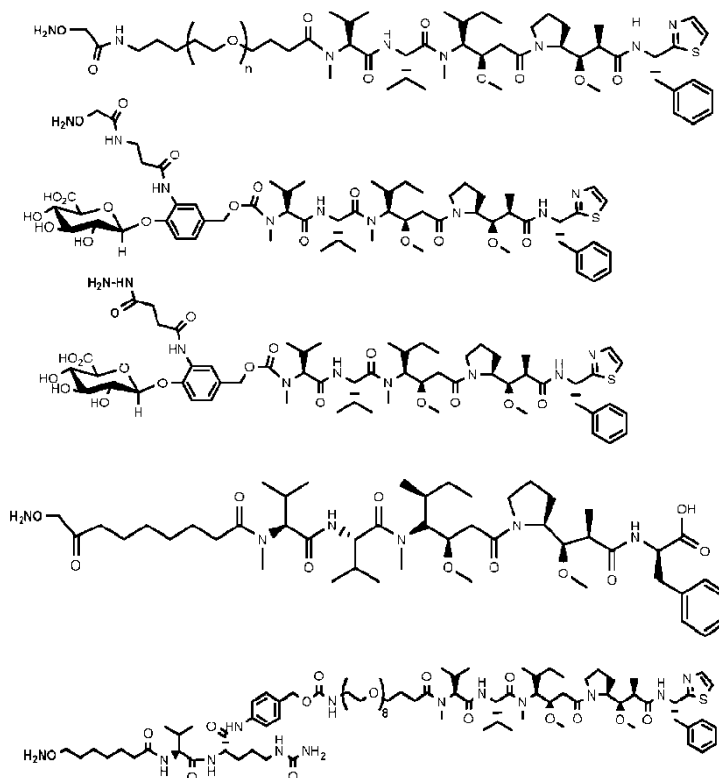
longitud de trayectoria. Dichos radionúclidos destruyen las células con las que están en estrecha proximidad, por ejemplo, células neoplásicas a las que se ha unido el conjugado o en las que ha entrado. Tienen poco o ningún efecto sobre las células no localizadas y son esencialmente no inmunogénicas. Alternativamente, se pueden generar isótopos de alta energía por irradiación térmica de un isótopo de otro modo estable, por ejemplo, como en la terapia de captura de neutrones de boro (Guan et al., PNAS, 95: 13206-10, 1998).

En un caso, el agente terapéutico se selecciona de MMAE, MMAF y PEG8-Do110.

Los restos efectores terapéuticos a modo de ejemplo incluyen las estructuras:



En un caso, el resto efector se selecciona de:



- 5 En ciertos casos, el resto efector contiene más de un agente terapéutico. Estos múltiples agentes terapéuticos pueden ser iguales o diferentes.

b) Restos efectores de diagnóstico

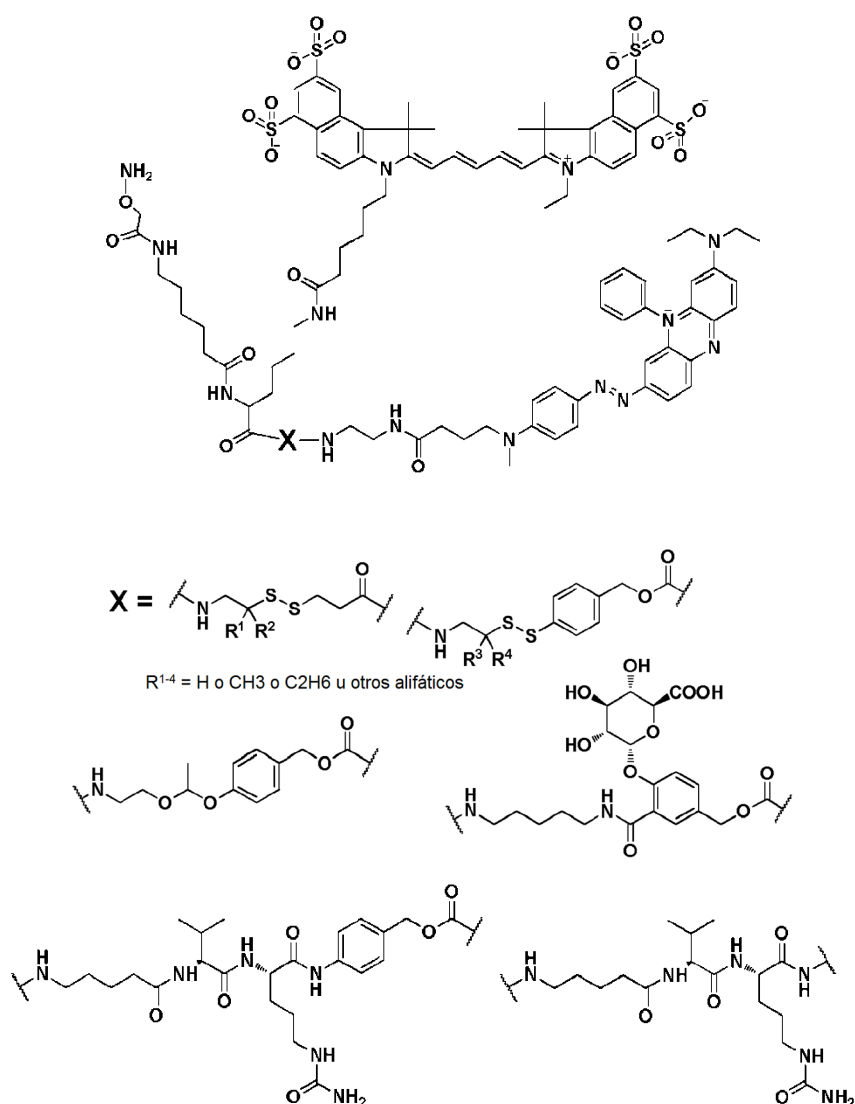
- En ciertos casos, los polipéptidos de unión de la presente divulgación se conjugan con un resto efector que comprende un agente de diagnóstico. En un caso, el agente de diagnóstico es una marca de molécula pequeña detectable, por ejemplo, biotina, fluoróforos, cromóforos, sondas de resonancia de espín, agentes de obtención de imágenes o radiomarcas. Los fluoróforos a modo de ejemplo incluyen colorantes fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, rodamina y similares) y otras moléculas luminiscentes (por ejemplo, luminal). Un fluoróforo puede ser medioambientalmente sensible de forma que cambie su fluorescencia si se localiza próximo a uno o más restos en el polipéptido de unión modificado que experimentan cambios estructurales tras la unión al sustrato (por ejemplo, sondas de dansilo). Las radiomarcas a modo de ejemplo incluyen moléculas pequeñas que contienen átomos con uno o más núcleos de baja sensibilidad (^{13}C , ^{15}N , ^2H , ^{125}I , ^{124}I , ^{123}I , ^{99}Tc , ^{43}K , ^{52}Fe , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{111}In y similares). El radionúclido puede ser, por ejemplo, un radionúclido emisor de gamma, fotones o positrones con una semivida adecuada para permitir la actividad o detección después del tiempo transcurrido entre la administración y la localización en el sitio de obtención de imágenes.
- 10 En un caso, el agente de diagnóstico es un polipéptido. Los polipéptidos de diagnóstico a modo de ejemplo incluyen enzimas con actividad fluorogénica o cromogénica, por ejemplo, la capacidad para escindir un sustrato que forma un fluoróforo o cromóforo como producto (es decir, proteínas indicadoras tales como luciferasa). Otras proteínas de diagnóstico pueden tener actividad fluorogénica o cromogénica intrínseca (por ejemplo, proteínas aequorinas bioluminiscentes fluorescentes verdes, rojas y amarillas de organismos marinos bioluminiscentes), o pueden comprender una proteína que contiene uno o más núcleos radiactivos de baja energía (^{13}C , ^{15}N , ^2H , ^{125}I , ^{124}I , ^{123}I , ^{99}Tc , ^{43}K , ^{52}Fe , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{111}In y similares).
- 15 20 25

- Con respecto al uso de conjugados radiomarcados junto con la presente divulgación, los polipéptidos de unión de la presente divulgación pueden estar directamente marcados (tal como por yodación) o se pueden marcar indirectamente mediante el uso de un agente quelante. Como se usa en el presente documento, las expresiones "marcado indirecto" y "enfoque de marcado indirecto" significan ambos que un agente quelante se une covalentemente a un polipéptido de unión y al menos un radionúclido se asocia con el agente quelante. Dichos agentes quelantes se denominan normalmente agentes quelantes bifuncionales ya que se unen tanto al polipéptido como al radioisótopo. Los agentes quelantes a modo de ejemplo comprenden derivados de ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietiltri-aminopentaacético ("MX-DTPA") y ácido ciclohexildietiltri-aminopentaacético ("CHX-DTPA"). Otros agentes quelantes comprenden derivados de P-DOTA y de EDTA. Particularmente los radionúclidos para el marcado indirecto incluyen ^{111}In y ^{90}Y . La mayoría de los estudios de obtención de imágenes utilizan 5 mCi de anticuerpo
- 30 35

marcado con ^{111}In , debido a que esta dosis es tanto segura como tiene elevada eficiencia de obtención de imágenes en comparación con dosis más bajas, con obtención de imágenes óptima que ocurre en tres a seis días después de la administración del anticuerpo. Véase, por ejemplo, Murray, (1985), J. Nuc. Med. 26: 3328 y Carraguillo et al., (1985), J. Nuc. Med. 26: 67. El radionúclido para el marcado directo puede ser, por ejemplo, ^{131}I . Los expertos en la técnica apreciarán que también se pueden ensamblar conjugados no radiactivos dependiendo del agente seleccionado a conjugar.

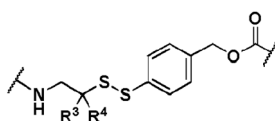
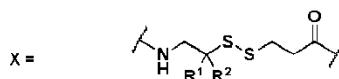
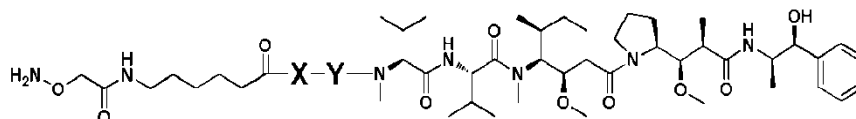
En ciertos casos, el resto efector de diagnóstico es una sonda FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia). Se ha usado FRET para una variedad de aplicaciones de diagnóstico que incluyen diagnósticos de cáncer. Una sonda FRET puede incluir un conector escindible (conector sensible a enzimas o de pH) que conecta los restos donantes y aceptores de la sonda de FRET, en donde la escisión da como resultado la potenciada fluorescencia (incluyendo infrarrojos cercano) (véase, por ejemplo, A. Cobos-Correa et. al. Membrane-bound FRET probe visualizes MMP12 activity in pulmonary inflammation, *Nature Chemical Biology* (2009), 5(9), 628-63; S. Gehrig et al. Spatially Resolved Monitoring of Neutrophil Elastase Activity with Ratiometric Fluorescent Reporters (2012) *Angew. Chem. Int. Ed.*, 51, 6258-6261).

En un caso, el resto efector se selecciona de:

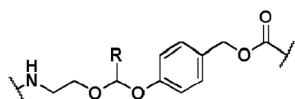


c) Restos efectores funcionalizados

En ciertos casos, los restos efectores se pueden funcionalizar para contener grupos adicionales, además del resto efector en sí. Por ejemplo, el resto efector puede contener conectores escindibles que liberan el resto efector del polipéptido de unión en condiciones particulares. En casos a modo de ejemplo, el resto efector puede incluir un conector que es escindible por enzimas celulares y/o es sensible al pH. Adicionalmente o alternativamente, el resto efector puede contener un enlace disulfuro que se escinde por glutatión intracelular tras la captación en la célula. Se proporcionan a continuación conectores sensibles a disulfuro y al pH a modo de ejemplo:

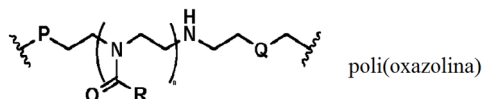
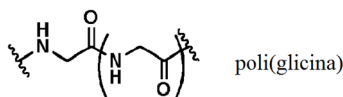
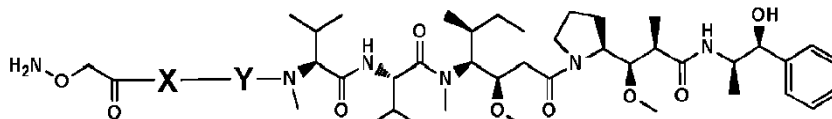


R¹⁻⁴ = H o CH₃ o C₂H₅ u otros alifáticos



R = H o grupos alquilo alquilarilo sustituido o sin sustituir

En aún otros casos, el resto efector puede incluir restos hidrófilos y biocompatibles tales como restos poli(glicina), poli(oxazolina) o PEG. Se proporcionan a continuación estructuras ("Y") a modo de ejemplo:



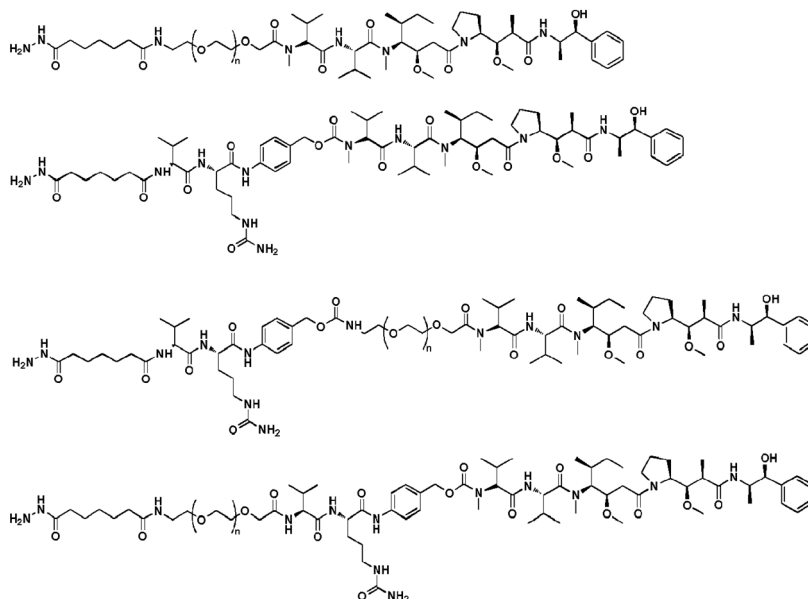
R = H, grupo sin sustituir o funcional que contiene grupos alquilo

P y Q = grupos funcionales iguales o diferentes para fármacos de enlace, moléculas indicadoras y proteína

En ciertos casos, el resto efector contiene un grupo aminooxi que facilita la conjugación con un polipéptido de unión por un enlace oxima estable.

En otros casos, el resto efector contiene un grupo hidracida y/o hidracina alquilado en N para facilitar la conjugación con un polipéptido de unión por una hidrazona de enlace estable. Los restos efectores a modo de ejemplo que contienen grupos aminooxi se exponen en la **Tabla 14** en el presente documento.

Tabla 14. Restos efectores de hidracina y/o hidracida a modo de ejemplo



d) Restos de direccionamiento

En ciertos casos, los restos efectores comprenden restos de direccionamiento que se unen específicamente a una o más moléculas diana. Se puede emplear cualquier tipo de resto de direccionamiento que incluye, sin limitación, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, hidratos de carbono (por ejemplo, glucanos) y combinaciones de los mismos (por ejemplo, glucoproteínas, glucopéptidos y glucolípidos). En ciertos casos, el resto de direccionamiento es un hidrato de carbono o glucopéptido. En un caso, el resto de direccionamiento es un glucopéptido trivalente (por ejemplo, un glucopéptido que comprende glucano GalNAc trivalente o un glucopéptido que contiene galactosa trivalente). En un caso específico, el polipéptido que contiene galactosa trivalente es lactosa3-Cys3Gly4. En ciertos casos, el resto de direccionamiento es un glucano. Los restos de direccionamiento pueden ser moléculas naturales o que no existen de forma natural. Los restos de direccionamiento adecuados para la conjugación pueden incluir los que contienen conectores aminooxi (véanse, por ejemplo, las Figuras 45 y 46).

Los restos de direccionamiento descritos en la presente divulgación pueden unirse a cualquier tipo de célula, que incluye células animales (por ejemplo, de mamífero), de planta o de insecto, ya sea *in vitro* o *in vivo*, sin limitación. Las células pueden ser de orígenes endodérmico, mesodérmico o ectodérmico, y pueden incluir cualquier tipo de célula. En ciertos casos, el resto de direccionamiento se une a una célula, por ejemplo, una célula de mamífero, para facilitar la administración de un polipéptido de unión a la célula diana, por ejemplo, para mejorar el direccionamiento y/o la captación de células. Las células diana a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, células inmunitarias (por ejemplo, linfocitos tales como linfocitos B, linfocitos T, linfocitos citolíticos espontáneos (NK), basófilos, macrófagos o células dendríticas), células del hígado (por ejemplo, hepatocitos o células no parenquimales tales como células endoteliales sinusoidales del hígado, células de Kupffer o células estrelladas hepáticas), células tumorales (por ejemplo, cualquier célula maligna o benigna que incluye células de hepatoma, células de cáncer de pulmón, células de sarcoma, células de leucemia o células de linfoma), células vasculares (por ejemplo, células endoteliales aórticas o células endoteliales de la arteria pulmonar), células epiteliales (por ejemplo, células epiteliales escamosas simples, células epiteliales columnares simples, células epiteliales columnares pseudoestratificadas o células epiteliales escamosas estratificadas) o células mesenquimatosas (por ejemplo, células de los aparatos linfático y circulatorio, células de hueso y de cartílago).

En un caso, el polipéptido de unión se internaliza por la célula. En otro caso, la cantidad del polipéptido de unión internalizado por la célula es mayor que la cantidad de un polipéptido de unión de referencia que carece de un resto de direccionamiento internalizado por la célula.

En un caso, el resto de direccionamiento se une a un receptor en la célula diana. Por ejemplo, el resto de direccionamiento puede comprender un resto de manosa 6-fosfato que se une a un receptor de manosa 6-fosfato en la célula. En otros casos a modo de ejemplo, el resto de direccionamiento se une a un Siglec en una célula diana. Los Siglec a modo de ejemplo incluyen sialoadhesina (Siglec-1), CD22 (Siglec-2), CD33 (Siglec-3), MAG (Siglec-4), Siglec-5, Siglec-6, Siglec-7, Siglec-8, Siglec-9, Siglec-10, Siglec-11, Siglec-12, Siglec-14 o Siglec-15. En aún otros casos, el resto de direccionamiento comprende un resto de ácido siálico unido en $\alpha 2,3$, $\alpha 2,6$ o $\alpha 2,8$. En un caso adicional, el resto de direccionamiento comprende un resto de $\alpha 2,3$ -sialilactosa o un resto de $\alpha 2,6$ -sialilactosa. Otros receptores a modo de ejemplo incluyen receptores de lectina, que incluyen, pero no se limitan a, receptores de lectina de tipo C,

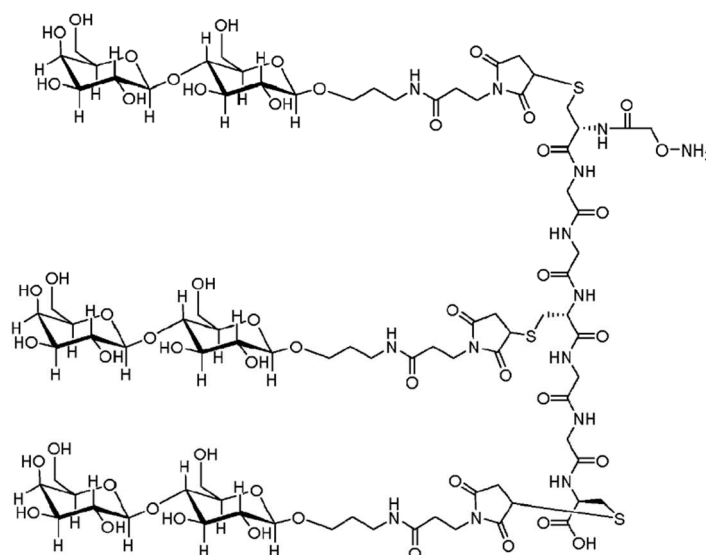
galectinas y receptores de lectina de tipo L. Los receptores de lectina a modo de ejemplo incluyen: TDEC-205, receptor de manosa de macrófagos (MMR), dectina-1, dectina-2, lectina de tipo C inducible por macrófagos (Mincle), ICAM3 no asociada a integrina específica de células dendríticas (DC-SIGN, CD209), receptor-1 del grupo de lectina DC NK (DNGR-1), langerina (CD207), CD169, un lecticano, un receptor de asialoglucoproteína, DCIR, MGL, un receptor de DC, una colectina, una selectina, un receptor de linfocitos NK, un receptor endocítico multi-CTLD, una lectina del grupo Reg (tipo VII), condrolectina, tetranectina, policistina, atractina (ATRN), proteína básica principal de eosinófilos (EMBP), DGCR2, trombomodulina, Bimlec, SEEC y CBCP/Frem1/QBRICK.

Los polipéptidos de unión de la presente divulgación se pueden usar para retirar compuestos tóxicos y sustancias perjudiciales en el hígado en múltiples enfermedades eligiendo como diana receptores de hidrato de carbono (por ejemplo, receptor de manosa 6-fosfato, receptor de manosa y receptor de asialoglucoproteína). Véase: Ganesan, L.P. et al.: Rapid and Efficient Clearance of Blood-borne Virus by Liver Sinusoidal Endothelium. PLoS Pathogens 2011, 9: 1; y Monnier, V.M. et al.: Glucosepane: a poorly understood advanced glycation end product of growing importance for diabetes and its complications. Clin Chem Lab Med 2014; 52: 21

Los polipéptidos de unión de la presente divulgación también se pueden usar para elegir como diana células tumorales mediante la elección como diana de diferentes receptores celulares que incluyen, pero no se limitan a: receptores de hidrato de carbono, receptor de asialoglucoproteína y Siglec. Véase: Chen, W.C. et al.: In vivo targeting of B-cell lymphoma with glycan ligands of CD22. Blood 2010, 115: 4778; Chen, W.C. et al.: Targeting B lymphoma with nanoparticles bearing glycan ligands of CD22. Leuk Lymphoma 2012, 53: 208; Hatakyama, S. et al.: Targeted drug delivery to tumor vasculature by a carbohydrate mimetic peptide. PNAS, 2011, 108: 19587; Hong, F. et al.: β -Glucan Functions as an Adjuvant for Monoclonal Antibody Immunotherapy by Recruiting Tumoricidal Granulocytes as Killer Cells. Cancer Res. 2003, 23: 9023; Kawasakia, N. et al.: Targeted delivery of lipid antigen to macrophages via the CD169/sialoadhesin endocytic pathway induces robust invariant natural killer T cell activation. PNAS 2013, 110: 7826; y Medina, S.H. et al.: N-acetylgalactosamine-functionalized dendrimers as hepatic cancer cell-targeted carriers. Biomaterials 2011, 32: 4118.

Los péptidos de unión de la presente divulgación también se pueden usar para regular la respuesta inmunitaria mediante diversos receptores que incluyen, pero no se limitan a, receptores de hidrato de carbono, DC-SIGN o Siglecs. Véase: Anthony, R.M. et al.: Recapitulation of IVIG Anti-Inflammatory Activity with a Recombinant IgG Fc. Science 2008, 320: 373; Anthony, R.M. et al.: Identification of a receptor required for the anti-inflammatory activity of IVIG. PNAS 2008, 105: 19571; Kaneko, Y. et al.: Anti-Inflammatory Activity of Immunoglobulin G Resulting from Fc Sialylation. Science 2006, 313: 670; y Mattner, J. et al.: Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. Nature 2005, 434: 525.

En un caso, el resto de direccionamiento es un glucopéptido. En un caso adicional, el resto de direccionamiento es un glucopéptido tri-galactosilado, por ejemplo, lactosa₃-Cys₃Gly₄ (mostrado en la fórmula V, a continuación):



[Fórmula V].

e) Restos de PEG

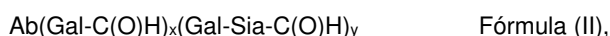
En otros aspectos, el resto efector es un resto que comprende poli(etilenglicol) (PEG, PEO o POE). El PEG es un oligómero o polímero de óxido de etileno y tiene la estructura química $H-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$ en donde se repite el elemento entre paréntesis. La PEGilación (o pegilación) es un proceso en el que cadenas de polímeros de PEG se unen a otra molécula (por ejemplo, un polipéptido de unión), que luego se describe como PEGilado (o pegilado). La PEGilación puede servir para reducir la inmunogenicidad y antigenicidad así como para aumentar el tamaño hidrodinámico (tamaño en disolución) de la molécula a la que está unida, reduciendo la depuración renal y prolongando

el tiempo en circulación. La PEGilación también puede hacer las moléculas más solubles en agua. En un caso de la presente divulgación, el resto de PEG puede comprender mono-PEG, bi-PEG o tri-PEG. En otro caso, el resto de PEG comprende 3 a 3,5 PEG.

VI. Conjugación de restos efectores con polipéptidos de unión

- 5 En ciertos casos, los restos efectores se conjugan (ya sea directamente o mediante un resto conector) con un glucano oxidado (por ejemplo, un glucano unido en N oxidado) de un polipéptido de unión alterado (por ejemplo, un glucano manipulado en N114 de un dominio CH1 de anticuerpo o un glucano nativo en N297 de un dominio F de anticuerpo). El término "glucano oxidado" significa que se ha oxidado un sustituyente de alcohol en el glucano, proporcionando un sustituyente carbonilo. El sustituyente carbonilo puede reaccionar con un nucleófilo de nitrógeno adecuado para formar un doble enlace carbono-nitrógeno. Por ejemplo, la reacción del grupo carbonilo con un grupo aminoóxi o grupo hidracina formaría una oxima o hidracina, respectivamente. En un caso, el sustituyente carbonilo es un aldehído. Los glucanos oxidados adecuados incluyen galactosa oxidada y ácido siálico oxidado.

En un caso, el polipéptido modificado de la fórmula (II) puede ser de la fórmula (II):



15 en donde

A) Ab es un anticuerpo u otro polipéptido de unión como se define en el presente documento;

B) Gal es un componente derivado de galactosa;

C) Sia es un componente derivado de ácido siálico;

D) x es 0 a 5; y

20 E) y es 0 a 5,

en donde al menos uno de x e y no es 0.

- Se puede emplear cualquier química reconocida en la técnica para conjugar un resto efector (por ejemplo, un resto efector que comprende un resto conector) con un glucano (véase, por ejemplo, Hermanson, G.T., Bioconjugate Techniques. Academic Press (1996). En ciertos casos, un resto de sacárido (por ejemplo, un resto de ácido siálico o galactosa) del glucano se oxida primero (por ejemplo, usando tratamiento con peryodato de sodio de ácido siálico o tratamiento con galactosa oxidasa de galactosa) para generar un grupo aldehído reactivo. Este grupo aldehído se hace reaccionar con el resto efector un grupo aminoóxi o grupo hidracina para formar un conector de oxima o hidrazona, respectivamente. Los métodos a modo de ejemplo que emplean este esquema de reacción general se exponen en los Ejemplos 10 a 15.

- 30 En ciertos casos, los glucanos nativos o manipulados de un polipéptido de unión se pretratan primero con enzimas glucosiltransferasa *in vitro* para proporcionar un resto de sacárido terminal que es adecuadamente reactivo. Por ejemplo, la sialilación se puede lograr usando primero una combinación de galactosiltransferasa (Gal T) y sialiltransferasa (Sial T). En ciertos casos, los glucanos biantenarios que carecen de galactosa (G0F o G0) o que solo contienen una galactosa (G1F o G1) se pueden convertir en estructuras galactosiladas o sialiladas de orden superior adecuadas para la conjugación (G1F, G1, G2F, G2, G1S1F, G1S1, G2S1F, G2S1, G2S2F o G2S2).

- Un esquema de conjugación a modo de ejemplo para producir glucoconjugados sialilados se muestra en la **Figura 30C**. Un esquema de conjugación a modo de ejemplo para producir glucoconjugados sialilados se muestra en la **Figura 30B**. Los restos de ácido siálico se introducen enzimáticamente y de manera específica en el glucano de un anticuerpo (por ejemplo, un glucano nativo en Asn-297) usando una combinación de galactosiltransferasa (Gal T) y sialiltransferasa (Sial T). Los restos de ácido siálico introducidos se oxidan posteriormente con una baja concentración de peryodato de sodio dando aldehídos de ácido siálico reactivos adecuadamente reactivos con conectores (por ejemplo, conectores de aminoóxi) para generar conjugados de anticuerpo-resto efector (por ejemplo, conjugados unidos a oxima de anticuerpo-resto efector). Controlando el número de glucanos y el número de restos siálico con remodelación *in vitro*, el experto puede tener un control preciso sobre la relación fármaco-anticuerpo (DAR) de los conjugados de anticuerpo-resto efector. Por ejemplo, si se añade ~1 ácido siálico a un único glucano biantenari (A1F) en cada una de la cadena pesada, se puede obtener homogéneamente un anticuerpo o polipéptido de unión con una DAR de 2.

Oxidación y agentes de oxidación

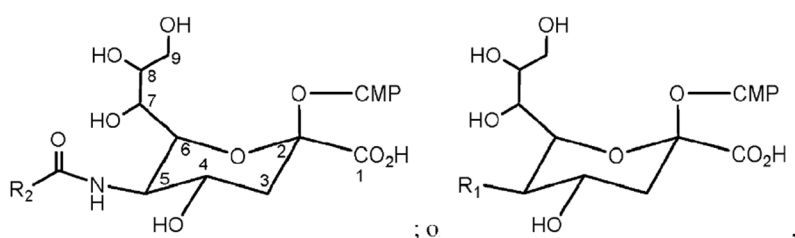
- La oxidación puede tener efectos adversos sobre la integridad de un anticuerpo, tanto mediante la oxidación de monosacáridos como mediante la oxidación de aminoácidos. Se conoce que la oxidación de restos de metionina, que incluye Met-252 y Met-428 (localizados en la región CH3 de Fc, proximal al sitio de unión a FcRn) afecta la unión de FcRn, que es crítica para prolongar la semivida del anticuerpo en suero (Wang, W., et al. (2011). Impact of methionine oxidation in human IgG1 Fc on serum half-life of monoclonal antibodies. Mol Immunol 48, 860-6). Por consiguiente,

previamente se han realizado intentos para reducir la cantidad de agentes de oxidación (por ejemplo, peryodato oxidasa o galactosa oxidasa) usados para tratar proteínas de unión que comprenden glucanos para crear grupos oxidados para la conjugación con restos efectores.

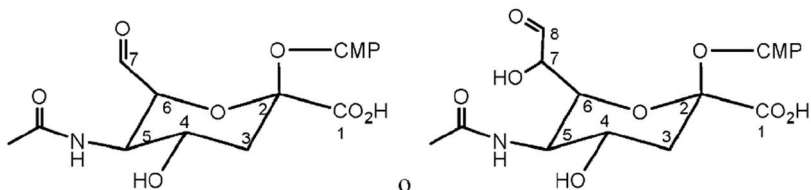
- 5 El método de la presente divulgación usa CMP-derivados de ácido siálico que comprenden restos reactivos (que incluyen, pero no se limitan a, un resto aldehído, un alquino, un resto aminooxi, una azida, una hidracina, un resto ceto o un tiol), que se pueden hacer reaccionar con un polipéptido de unión para formar una proteína de unión conjugada con derivado de ácido siálico. Estas proteínas de unión conjugadas con derivado de ácido siálico se pueden acoplar entonces a diferentes restos efectores sin tratamiento con un agente de oxidación.

Química de iminas

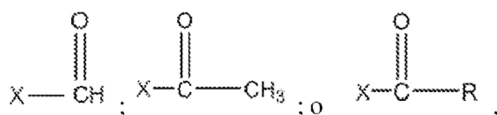
- 10 En algunos casos, el CMP-derivado de ácido siálico comprende un resto reactivo que incluye un aldehído, un ceto, una hidracina o un resto hidrazona. En algunos casos, el resto reactivo es un resto reactivo terminal que incluye, pero no se limita a, un aldehído terminal o un resto ceto terminal. En los casos de ejemplo, el CMP-derivado de ácido siálico tiene una de las siguientes fórmulas estructurales:



- 15 en donde R₂ incluye, pero no se limita a, CH₃, CH₂CH₂(C=O)CH₃, CH₂OH, OH o H. En algunos casos, el CMP-derivado de ácido siálico que comprende un resto aldehído terminal incluye, pero no se limita a, las siguientes fórmulas estructurales:

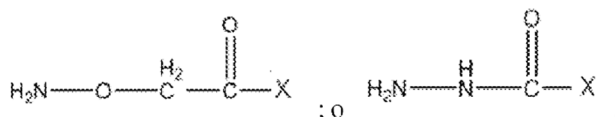


- 20 En algunos casos, el polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico comprende un resto reactivo que incluye un aldehído, un ceto, una hidracina o un resto hidrazona. En los casos de ejemplo, el polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico se puede representar por las siguientes:



en donde X representa el resto del polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico (es decir, distinto del resto reactivo).

- 25 En algunos casos, el resto efector o de direccionamiento comprende un resto reactivo que incluye un aldehído, un ceto, una hidracina o un resto hidrazona. En los casos de ejemplo, el resto efector o de direccionamiento se puede representar por las siguientes:



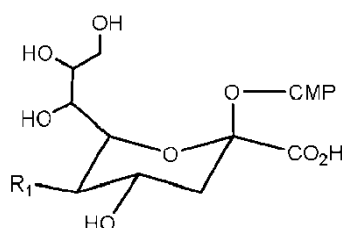
en donde X representa el resto del resto efector o de direccionamiento (es decir, distinto del resto reactivo).

- 30 En algunos casos, un polipéptido de unión conjugado con resto de direccionamiento o efector comprende una imina. En los casos de ejemplo, un tipo de imina incluye, pero no se limita a, una aldimina, una hidroxilamina, una hidrazona, una ketamina o una oxima. Por ejemplo, véase la **Figura 3** (A-C) para la formación de iminas. En los casos de ejemplo, la imina de un polipéptido de unión conjugado con resto de direccionamiento o efector se forma haciendo reaccionar un polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico que comprende un aldehído o un resto ceto con un resto efector o de direccionamiento que comprende un resto aminooxi o se une a un resto que comprende un derivado de aminooxi o un resto hidracina. En los casos de ejemplo, la imina del polipéptido de unión conjugado con resto de

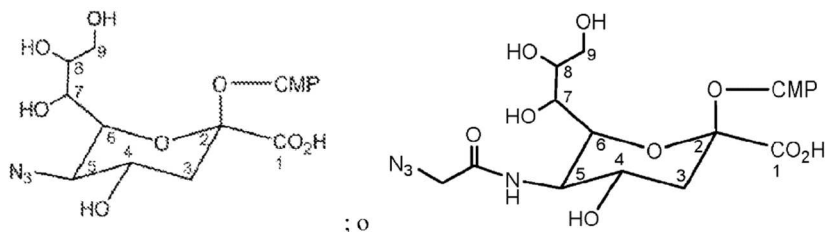
direccionamiento o efector se forma haciendo reaccionar un polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico que comprende un resto aminooxi o se une a un resto que comprende un derivado de aminooxi o un resto de hidracina con un resto efector o de direccionamiento que comprende un aldehído o un resto ceto.

Química de click

- 5 En algunos casos, el CMP-derivado de ácido siálico comprende un resto azida terminal. Por ejemplo, el CMP-derivado de ácido siálico puede ser un derivado de azida C5 de CMP-ácido siálico o una azida C5 de ácido siálico. En los casos de ejemplo, el CMP-derivado de ácido siálico tiene la siguiente fórmula estructural:

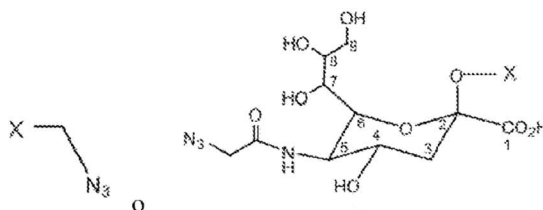


- 10 en donde R_1 es un resto reactivo que incluye, pero no se limita a, $\text{NH}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$, $\text{NH}(\text{C}=\text{O})\text{C}_4\text{H}_7\text{O}$, $\text{NH}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2\text{OH}$, $\text{NH}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2\text{N}_3$, $\text{NH}(\text{C}=\text{O})\text{SH}$, OH o N_3 . En algunos casos, el CMP-derivado de ácido siálico tiene una fórmula estructural seleccionada de las siguientes:



- 15 En algunos casos, el CMP-derivado de ácido siálico comprende un resto que comprende un alquino o está unido a un resto que comprende un alquino. En algunos casos, el CMP-derivado de ácido siálico comprende o está unido a un ciclooctino que incluye, pero no se limita a, un resto azadibenzociclooctino (DBCO, ADIBO, DIBAC), un ciclooctino monofluorado o un ciclooctino difluorado.

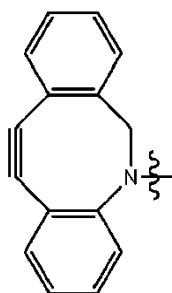
- 20 En algunos casos, el polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico comprende un resto azida terminal. Por ejemplo, el polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico puede ser un polipéptido de unión conjugado con derivado de azida C5 de ácido siálico. En un caso a modo de ejemplo, el polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico tiene las fórmulas estructurales representadas en la **Figura 95**. En otro caso de ejemplo, el polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico tiene una de las siguientes fórmulas estructurales



en donde X representa el resto del polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico (es decir, distinto del resto azida terminal).

- 25 En algunos casos, el polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico comprende un resto que comprende un alquino o está unido a un resto que comprende un alquino. En algunos casos, el polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico comprende o está unido a un ciclooctino que incluye, pero no se limita a, un resto azadibenzociclooctino (por ejemplo, DBCO, ADIBO, DIBAC), un ciclooctino monofluorado o un ciclooctino difluorado.

- 30 En algunos casos, el resto efector o de direccionamiento comprende un alquino o está unido a un resto que comprende un alquino. En algunos casos, el resto efector o de direccionamiento comprende o está unido a un ciclooctino que incluye, pero no se limita a, un resto azadibenzociclooctino (por ejemplo, DBCO, ADIBO, DIBAC), un ciclooctino monofluorado o un ciclooctino difluorado. En los casos de ejemplo, el resto efector o de direccionamiento está unido a un resto que comprende un alquino y se puede representar por la siguiente fórmula estructural:



En algunos casos, el resto efector o de direccionamiento comprende un resto azida terminal.

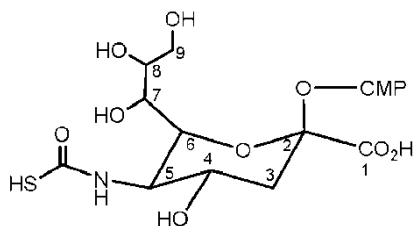
En algunos casos, un polipéptido de unión conjugado con resto de direccionamiento o efector comprende un anillo de triazol. En los casos de ejemplo, el anillo de triazol de un polipéptido de unión conjugado con resto de direccionamiento o efector se forma haciendo reaccionar un polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico que comprende un resto azida terminal con un resto efector o de direccionamiento que comprende un alquino o unido a un resto que comprende un alquino usando química de click. En los casos de ejemplo, el anillo de triazol del polipéptido de unión conjugado con resto de direccionamiento o efector se forma haciendo reaccionar un polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico que comprende un alquino o unido a un resto que comprende un alquino con un resto efector o de direccionamiento que comprende un resto azida terminal usando química de click.

En algunos casos, la reacción de química de click para formar el polipéptido de unión conjugado con resto de direccionamiento o efector ocurre a temperatura ambiente. En algunos casos, la reacción de química de click para formar un polipéptido de unión conjugado con resto de direccionamiento o efector ocurre en presencia de un catalizador metálico, por ejemplo, una cicloadición de azida-alquino catalizado con cobre (I). En algunos casos, la reacción de química de click para formar un polipéptido de unión conjugado con resto de direccionamiento o efector se realiza en ausencia de cobre.

En algunos casos, el mecanismo de una reacción de química de click para formar un polipéptido de unión conjugado con resto de direccionamiento o efector incluye, pero no se limita a, una cicloadición de azida-alquino [3+2] catalizada con cobre (I), una cicloadición de azida-alquino [3+2] promovida por esfuerzo, una cicloadición [3+2] de Huisgen entre un resto azida y un alquino activado, una cicloadición [3+2] entre un resto azida y un alquino deficiente en electrones, una cicloadición [3+2] entre una azida y un arino, una retro-[4+2] cicloadición de Diels-Alder entre una tetrazina y un alqueno, o una adición de radicales entre un tiol y un alqueno.

Química de tioéter

En algunos casos, el CMP-derivado de ácido siálico o derivado de ácido siálico comprende un resto reactivo que incluye un resto tiol o maleimida. En algunos casos, el CMP-derivado de ácido siálico o derivado de ácido siálico comprende un tiol terminal. En los casos de ejemplo, el CMP-derivado de ácido siálico que comprende un tiol terminal incluye, pero no se limita a, una fórmula estructural de:



En algunos casos, el polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico comprende un resto reactivo que incluye un resto tiol o maleimida. En algunos casos, el polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico comprende un resto tiol terminal. En los casos de ejemplo, el polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico se puede representar por, pero no se limita a, los siguientes:

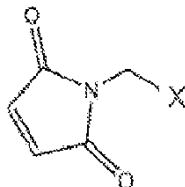


en donde X es el resto del polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico (es decir, distinto del resto tiol o maleimida).

En algunos casos, el resto efector o de direccionamiento comprende un resto reactivo que incluye un resto tiol o maleimida. En algunos casos, el resto efector o de direccionamiento comprende un resto tiol terminal. En algunos

casos, el resto efector o de direccionamiento comprende un resto maleimida terminal. Por ejemplo, el resto efector o de direccionamiento que comprende un resto maleimida incluye, pero no se limita a, bis-manosa-6-fosfato hexamanosa maleimida o lactosa maleimida.

5 En los casos de ejemplo, el resto efector o de direccionamiento se puede representar por, pero no se limita a, lo siguiente:



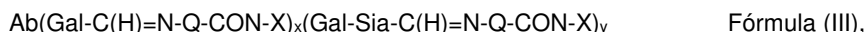
en donde X representa el resto del resto efector o de direccionamiento.

10 En algunos casos, un polipéptido de unión conjugado con resto de direccionamiento o efector comprende un tioéter. En los casos de ejemplo, el tioéter de un polipéptido de unión conjugado con resto de direccionamiento o efector se forma haciendo reaccionar un polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico que comprende un resto tiol con un resto efector o de direccionamiento que comprende un resto maleimida. En los casos de ejemplo, la imina del polipéptido de unión conjugado con resto de direccionamiento o efector se forma haciendo reaccionar un polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico que comprende un resto maleimida con un resto efector o de direccionamiento que comprende un resto tiol.

15 VII. Polipéptidos de unión modificados

En ciertos casos, la divulgación proporciona polipéptidos modificados que son el producto de los restos efectores de conjugación que están conjugados (ya sea directamente o mediante un resto conector) con un glucano oxidado (por ejemplo, un glucano unido en N oxidado) de un polipéptido de unión alterado (por ejemplo, un glucano manipulado en N114 de un dominio CH1 de anticuerpo o un glucano nativo en N297 de un dominio de anticuerpo F).

20 En un caso, el polipéptido de unión puede ser de la fórmula (III):

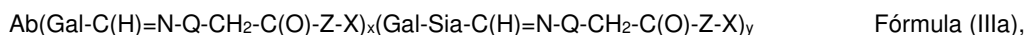


en donde:

- A) Ab es un anticuerpo como se define en el presente documento;
- B) Q es NH u O;
- 25 C) CON es un resto conector como se define en el presente documento; y
- D) X es un resto de direccionamiento como se define en el presente documento;
- E) Gal es un componente derivado de galactosa;
- F) Sia es un componente derivado de ácido siálico;
- G) x es 0 a 5; y
- 30 H) y es 0 a 5,

en donde al menos uno de x e y no es 0.

En un caso, el polipéptido de unión que puede ser de la fórmula (III) puede ser de la fórmula (IIIa):



en donde:

- 35 A) Ab es un anticuerpo;
- B) Q es NH u O;
- C) Z es Cys-(MC)_a-(VC)_b-(PABC)_c-(C₁₆H₃₂O₈ C₂H₄)_f-, en donde
 - i. Cys es un componente derivado de cisteinamida;
 - ii. MC es un componente derivado de maleimida;

- iii. VC es un componente derivado de valina acoplado con citrulina;
- iv. PABC es un componente derivado de carbamato de 4-aminobencilo;
- v. X es un resto efector (por ejemplo, un resto de direccionamiento como se define en el presente documento);
- vi. a es 0 o 1;
- vii. b es 0 o 1;
- viii. c es 0 o 1; y
- ix. f es 0 o 1;

D) X es un agente terapéutico como se define en el presente documento;

E) Gal es un componente derivado de galactosa;

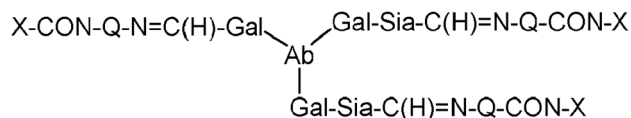
F) Sia es un componente derivado de ácido siálico;

G) x es 0 a 5; y

H) y es 0 a 5,

en donde al menos uno de x e y no es 0.

- 15 Se debe entender que la fórmula (III) no pretende implicar que el anticuerpo, el sustituyente Gal y el sustituyente Gal-Sia estén conectados en un modo tipo cadena. Más bien, cuando dichos sustituyentes están presentes, el anticuerpo está conectado directamente con cada sustituyente. Por ejemplo, un polipéptido de unión de la fórmula (III) en la que x es 1 y y es 2 podría tener la disposición mostrada a continuación:



Fórmula (III)

- 20 El sustituyente CON en la fórmula (III) y los componentes en ella son como se describen con respecto a la fórmula (I) para restos efectores.

En un caso, Q es NH . En otro caso, Q es O .

En un caso, x es 0.

- 25 El anticuerpo Ab de la fórmula (III) puede ser cualquier anticuerpo adecuado como se describe en el presente documento.

En un caso, se proporciona un método de preparación del polipéptido de unión de la fórmula (III), comprendiendo el método hacer reaccionar un resto efector de la fórmula (I):



en donde:

- 30 A) Q es NH u O;
B) CON es un resto conector; y
C) X es un resto efector (por ejemplo, un resto de direccionamiento como se define en el presente documento), con un anticuerpo modificado de la fórmula (II)



en donde

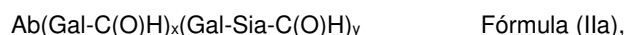
- A) OXG es un glucano oxidado; y
B) r se selecciona desde 0 hasta 4;

En un caso, se proporciona un método de preparación del polipéptido de unión de la fórmula (III), comprendiendo el método hacer reaccionar un resto efector de la fórmula (I):



en donde:

- 5 A) Q es NH u O;
 B) CON es un resto conector; y
 C) X es un resto efector (por ejemplo, un resto de direccionamiento como se define en el presente documento),
 con un anticuerpo modificado de la fórmula (IIa)



10 en donde

- A) Ab es un anticuerpo como se describe en el presente documento;
 B) Gal es un componente derivado de galactosa;
 C) Sia es un componente derivado de ácido siálico;
 D) x es 0 a 5; y
 15 E) y es 0 a 5,

en donde al menos uno de x e y no es 0.

VII. Métodos de tratamiento con anticuerpos modificados

20 En un aspecto, la divulgación proporciona métodos de tratamiento o diagnóstico de un paciente en necesidad del mismo que comprende administrar una cantidad eficaz de un polipéptido de unión desvelado en el presente documento. En algunos casos, la presente divulgación incluye kits y métodos para el diagnóstico y/o el tratamiento de trastornos, por ejemplo, trastornos neoplásicos en un sujeto mamífero en necesidad de dicho tratamiento. En algunos casos, el sujeto es un ser humano.

25 Los polipéptidos de unión de la presente divulgación son útiles en varias aplicaciones diferentes. Por ejemplo, en un caso, los polipéptidos de unión objeto son útiles para reducir o eliminar células que llevan un epítipo reconocido por el dominio de unión del polipéptido de unión. En otro caso, los polipéptidos de unión objeto son eficaces en reducir la concentración de o eliminar el antígeno soluble en la circulación. En un caso, los polipéptidos de unión pueden reducir el tamaño del tumor, inhibir el crecimiento tumoral y/o prolongar el tiempo de supervivencia de los animales portadores del tumor. Por consiguiente, la presente divulgación también se refiere a un método de tratamiento de tumores en un humano u otro animal administrando a dicho humano o animal una cantidad no tóxica eficaz de anticuerpo modificado.

30 Un experto en la técnica sería capaz de determinar, por experimentación rutinaria, cuál sería una cantidad no tóxica eficaz del polipéptido de unión modificado con el fin de tratar tumores malignos. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente activa de un anticuerpo modificado o fragmentos del mismo puede variar según factores tales como el estadio de enfermedad (por ejemplo, estadio I frente a estadio IV), edad, sexo, complicaciones médicas (por ejemplo, afecciones o enfermedades inmunosuprimidas) y peso del sujeto, y la capacidad del anticuerpo modificado para provocar una respuesta deseada en el sujeto. La pauta posológica se puede ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se pueden administrar diariamente varias dosis divididas, o la dosis se puede reducir proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación terapéutica.

35 En general, las composiciones proporcionadas en la presente divulgación se pueden usar para tratar profilácticamente o terapéuticamente cualquier neoplasia que comprende un marcador antigénico que permite el direccionamiento de las células cancerosas por el anticuerpo modificado.

40 En general, las composiciones proporcionadas en la presente divulgación se pueden usar para tratar profilácticamente o terapéuticamente cualquier neoplasia que comprende un marcador antigénico que permite el direccionamiento de las células cancerosas por el anticuerpo modificado.

VIII. Métodos de administración de anticuerpos modificados o fragmentos de los mismos

45 Se conocen bien los métodos de preparación y administración de los polipéptidos de unión de la presente divulgación a un sujeto o se determinan fácilmente por los expertos en la técnica. La vía de administración de los polipéptidos de unión de la presente divulgación puede ser oral, parenteral, por inhalación o tópica. El término parenteral como se usa en el presente documento incluye administración intravenosa, intrarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, rectal o vaginal. Mientras que todas estas formas de administración son contempladas claramente por estar dentro del alcance de la presente divulgación, una forma de administración sería una disolución para inyección, en particular para inyección intravenosa o intrarterial o goteo. Normalmente, una composición farmacéutica adecuada para inyección puede comprender un tampón (por ejemplo, tampón acetato, fosfato o citrato), un tensioactivo (por ejemplo, polisorbato), opcionalmente un agente estabilizador (por ejemplo, albúmina humana), etc. Sin embargo, en otros

50

métodos compatibles con las enseñanzas en el presente documento, los anticuerpos modificados se pueden administrar directamente al sitio de la población celular adversa, aumentando así la exposición del tejido enfermo al agente terapéutico.

En un caso, el polipéptido de unión que se administra es un polipéptido de unión de la fórmula (III):

5
$$\text{Ab}(\text{Gal-C(H)=N-Q-CON-X})_x(\text{Gal-Sia-C(H)=N-Q-CON-X})_y$$
 Fórmula (III),

en donde:

A) Ab es un anticuerpo como se define en el presente documento;

B) Q es NH u O;

C) CON es un resto conector como se define en el presente documento; y

10 D) X es un resto efector (por ejemplo, un resto de direccionamiento como se define en el presente documento);

E) Gal es un componente derivado de galactosa;

F) Sia es un componente derivado de ácido siálico;

G) x es 0 a 5; y

H) y es 0 a 5,

15 en donde al menos uno de x e y no es 0.

Las preparaciones para administración parenteral incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, disoluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, que incluyen solución salina y medios tamponados. En las composiciones y métodos de la presente divulgación, los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, tampón fosfato 0,01-0,1 M o 0,05 M, o solución salina al 0,8 %. Otros vehículos parenterales comunes incluyen disoluciones de fosfato de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, Ringer con lactato o aceites no volátiles. Los vehículos intravenosos incluyen reforzadores de fluidos y de nutrientes, reforzadores de electrolitos, tales como los basados en dextrosa de Ringer, y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares. Más particularmente, las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles (donde sean solubles en agua) y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En tales casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que exista fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y también se debe conservar contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, usando un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de dispersión y usando tensioactivos.

La prevención de la acción de microorganismos se puede lograr por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. También se pueden incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico, en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede provocar incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

En cualquier caso, se pueden preparar disoluciones inyectables estériles incorporando un compuesto activo (por ejemplo, un polipéptido de unión modificado por sí mismo o en combinación con otros agentes activos) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de componentes enumerados en el presente documento, según se requiera, seguido por esterilización por filtración. En general, se preparan dispersiones incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril, que contiene un medio de dispersión básico y los otros componentes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación normalmente incluyen secado a vacío y liofilización, que da un polvo de un principio activo más cualquier componente deseado adicional de una disolución previamente filtrada por esterilización del mismo. Las preparaciones para inyecciones se procesan, se envasan en recipientes tales como ampollas, bolsas, botellas, jeringas o viales, y se cierran en condiciones asépticas según métodos conocidos en la técnica. Además, las preparaciones se pueden envasar y comercializar en forma de un kit tal como el descrito en los documentos en tramitación junto con la presente U.S.S.N. 09/259.337 y U.S.S.N. 09/259.338. Dichos artículos de fabricación pueden incluir etiquetas o prospectos que indican que las composiciones asociadas son útiles para tratar un sujeto que padece, o predispuesto a, trastornos autoinmunitarios o neoplásicos.

Las dosis eficaces de las composiciones de la presente divulgación, para el tratamiento de las afecciones anteriormente descritas, varían dependiendo de muchos factores diferentes, que incluyen medios de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o un animal, otras medicaciones administradas y si tratamiento es profiláctico o terapéutico. Normalmente, el paciente es un humano pero también se pueden tratar mamíferos no humanos que incluyen mamíferos transgénicos. Las dosis de tratamiento se pueden valorar usando métodos rutinarios conocidos por los expertos en la técnica para optimizar la seguridad y la eficacia.

Para la inmunización pasiva con un polipéptido de unión, la dosis puede variar, por ejemplo, desde aproximadamente 0,0001 hasta 100 mg/kg, y más normalmente 0,01 hasta 5 mg/kg (por ejemplo, 0,02 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, etc.), del peso corporal del hospedador. Por ejemplo, las dosis pueden ser 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg, por ejemplo, al menos 1 mg/kg. También están previstas dosis intermedias en los intervalos anteriores dentro del alcance de la presente divulgación. Se puede administrar dichas dosis a los sujetos diariamente, en días alternos, semanalmente o según cualquiera otro programa determinado por análisis empírico. Un tratamiento a modo de ejemplo implica la administración en múltiples dosis durante un periodo prolongado, por ejemplo, de al menos seis meses. Las pautas de tratamiento adicionales a modo de ejemplo conllevan la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. Los programas de dosis a modo de ejemplo incluyen 1-10 mg/kg o 15 mg/kg en días consecutivos, 30 mg/kg en días alternos o 60 mg/kg a la semana. En algunos métodos, se administran simultáneamente dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión, en cuyo caso la dosis de cada anticuerpo administrado entra dentro de los intervalos indicados.

Los polipéptidos de unión de la presente divulgación se pueden administrar en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosis individuales pueden ser semanalmente, mensualmente o anualmente. Los intervalos también pueden ser irregulares, como se indica midiendo los niveles en sangre del polipéptido de unión modificado o antígeno en el paciente. En algunos métodos, la dosis se ajusta para lograr una concentración de polipéptido de unión modificado en plasma de 1-1000 µg/mL y en algunos métodos 25-300 µg/mL. Alternativamente, los polipéptidos de unión se pueden administrar como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere administración menos frecuente. Para anticuerpos, la dosis y frecuencia varían dependiendo de la semivida del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanizados muestran la semivida más larga, seguido por anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos.

La dosis y frecuencia de la administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen los presentes anticuerpos o una mezcla de los mismos se administran a un paciente que todavía no está en el estado de enfermedad para potenciar la resistencia del paciente. Se define que dicha cantidad es una "dosis eficaz profiláctica". En este uso, las cantidades precisas dependen nuevamente del estado de salud del paciente y la inmunidad general, pero, en general, varían desde 0,1 hasta 25 mg por dosis, especialmente 0,5 hasta 2,5 mg por dosis. Se administra una dosis relativamente baja a intervalos relativamente poco frecuentes durante un largo periodo de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento durante el resto de su vida. En aplicaciones terapéuticas, algunas veces se requiere una dosis relativamente alta (por ejemplo, desde aproximadamente 1 hasta 400 mg/kg de anticuerpo por dosis, siendo las dosis de desde 5 hasta 25 mg las más comúnmente usadas para radioinmunoconjugados y las dosis más altas para anticuerpos modificados de citotoxina-fármaco) en intervalos relativamente pequeños hasta que se reduce o termina la progresión de la enfermedad, o hasta que el paciente muestre mejoría parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. A partir de aquí, el paciente se puede administrar con un régimen profiláctico.

Los polipéptidos de unión de la presente divulgación se pueden administrar opcionalmente en combinación con otros agentes que son eficaces en el tratamiento del trastorno o la afección en necesidad de tratamiento (por ejemplo, profiláctico o terapéutico). Las dosis de tratamiento únicas eficaces (es decir, cantidades terapéuticamente eficaces) de anticuerpos modificados marcados con ⁹⁰Y de la presente divulgación varían desde entre aproximadamente 5 y aproximadamente 75 mCi, tal como entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40 mCi. Las dosis no ablativas de médula ósea eficaces para el tratamiento único de anticuerpos modificados con ¹³¹I varían desde entre aproximadamente 5 y aproximadamente 70 mCi, tal como entre aproximadamente 5 y aproximadamente 40 mCi. Las dosis ablativas eficaces para el tratamiento único (es decir, puede requerir trasplante de médula ósea autólogo) de anticuerpos marcados con ¹³¹I varían entre aproximadamente 30 y aproximadamente 600 mCi, tal como entre aproximadamente 50 y menos de aproximadamente 500 mCi. Junto con un anticuerpo quimérico, debido a la semivida circulante más larga frente a los anticuerpos murinos, una dosis no ablativa de la médula ósea eficaz para tratamiento único de anticuerpos quiméricos marcados con yodo-131 varía desde entre aproximadamente 5 y aproximadamente 40 mCi, por ejemplo, menos de aproximadamente 30 mCi. Los criterios para la obtención de imágenes para, por ejemplo, la marca de ¹¹¹In, son normalmente inferiores a aproximadamente 5 mCi.

Aunque los polipéptidos de unión se pueden administrar como se describe inmediatamente anteriormente, se debe enfatizar que en otros casos los polipéptidos de unión se pueden administrar a pacientes por lo demás sanos como una terapia de primera línea. En dichos casos, los polipéptidos de unión se pueden administrar a pacientes que tienen reservas normales o promedio de médula ósea roja y/o a pacientes que no tienen, y no están, recibiendo una o varias de otras terapias. Como se usa en el presente documento, la administración de anticuerpos modificados o fragmentos de los mismos conjuntamente o en combinación con una terapia auxiliar significa la administración secuencial, simultánea, coextensiva, concurrente, concomitante o contemporánea o la aplicación de la terapia y los anticuerpos

desvelados. Los expertos en la técnica apreciarán que se puede programar la administración o la aplicación de los diversos componentes de la pauta terapéutica combinada para potenciar la eficacia global del tratamiento. Por ejemplo, los agentes quimioterapéuticos se podrían administrar en ciclos de tratamiento convencionales bien conocidos, seguido en el plazo de algunas semanas por los radioinmunoconjugados de la presente divulgación. En cambio, los polipéptidos de unión asociados a la citotoxina se podrían administrar por vía intravenosa, seguido por radiación de haces externos localizada en el tumor. En aún otros casos, el polipéptido de unión modificado se puede administrar simultáneamente con uno o más agentes quimioterapéuticos seleccionados en una única visita al consultorio. Un experto (por ejemplo un oncólogo experimentado) sería fácilmente capaz de discernir entre pautas terapéuticas combinadas eficaces sin excesiva experimentación basándose en la terapia auxiliar seleccionada y las enseñanzas de la presente memoria descriptiva.

A este respecto se apreciará que la combinación de los polipéptidos de unión y el agente quimioterapéutico se puede administrar en cualquier orden y dentro de cualquier periodo de tiempo que proporcione un beneficio terapéutico al paciente. Es decir, el agente quimioterapéutico y los polipéptidos de unión se pueden administrar en cualquier orden o simultáneamente. En casos seleccionados, los polipéptidos de unión de la presente divulgación se administrarán a pacientes que han recibido previamente quimioterapia. En aún otros casos, los polipéptidos de unión y el tratamiento quimioterapéutico se administrarán sustancialmente simultáneamente o coincidentemente. Por ejemplo, al paciente se le pueden administrar los polipéptidos de unión mientras que recibe un ciclo de quimioterapia. En algunos casos, el anticuerpo modificado se administrará en el plazo de un año desde cualquier agente quimioterapéutico o tratamiento. En otros casos, los polipéptidos de unión se administrarán en el plazo de 10, 8, 6, 4 o 2 meses desde cualquier agente quimioterapéutico o tratamiento. En todavía otros casos, el polipéptido de unión se administrará en el plazo de 4, 3, 2 o 1 semana(s) desde cualquier agente quimioterapéutico o tratamiento. En aún otros casos, los polipéptidos de unión se administrarán en el plazo de 5, 4, 3, 2 o 1 día(s) desde el agente quimioterapéutico o el tratamiento seleccionado. Se apreciará además que los dos agentes o tratamientos se pueden administrar al paciente en cuestión de horas o minutos (es decir, sustancialmente simultáneamente).

Se apreciará adicionalmente que los polipéptidos de unión de la presente divulgación se pueden usar conjuntamente o en combinación con cualquier agente o agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, para proporcionar una pauta terapéutica combinada) que elimina, reduce, inhibe o controla el crecimiento de las células neoplásicas *in vivo*. Los agentes quimioterapéuticos a modo de ejemplo que son compatibles con la presente divulgación incluyen agentes alquilantes, alcaloides de la vinca (por ejemplo, vincristina y vinblastina), procarbazona, metotrexato y prednisona. La combinación de cuatro fármacos MOPP (mecetamina (mostaza nitrogenada), vincristina (Oncovin), procarbazona y prednisona) es muy eficaz en el tratamiento de diversos tipos de linfoma, y se puede usar en ciertos casos. En pacientes resistentes a MOPP, también se pueden usar combinaciones de ABVD (por ejemplo, adriamicina, bleomicina, vinblastina y dacarbazina), CHIVPP (clorambucilo, vinblastina, procarbazona y prednisona), CABS (lomustina, doxorubicina, bleomicina y estreptozotocina), MOPP más ABVD, MOPP más ABV (doxorubicina, bleomicina y vinblastina) o BCPVP (cardebeína, ciclofosfamida, vinblastina, procarbazona y prednisona). Arnold S. Freedman y Lee M. Nadler, *Malignant Lymphomas*, en HARRISON'S PRINCIPLES OF INTERNAL MEDICINE 1774-1788 (Kurt J. Isselbacher et al., eds., 13ª ed. 1994) y V. T. DeVita et al., (1997) y las referencias citadas en su interior para las dosis y programas habituales. Estas terapias se pueden usar invariablemente, o se alteran según se necesite para un paciente particular, en combinación con uno o más polipéptidos de unión de la presente divulgación como se describe en el presente documento.

Pautas adicionales que son útiles en el contexto de la presente divulgación incluyen el uso de agentes alquilantes individuales tales como ciclofosfamida o clorambucilo, o combinaciones tales como CVP (ciclofosfamida, vincristina y prednisona), CHOP (CVP y doxorubicina), C-MOPP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona y procarbazona), CAP-BOP (CHOP más procarbazona y bleomicina), m-BACOD (CHOP más metotrexato, bleomicina y leucovorina), ProMACE-MOPP (prednisona, metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido y leucovorina más MOPP habitual), ProMACE-CytaBOM (prednisona, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido, citarabina, bleomicina, vincristina, metotrexato y leucovorina) y MACOP-B (metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, prednisona de dosis fija, bleomicina y leucovorina). Los expertos en la técnica serán capaces de determinar fácilmente las dosis y los programas habituales para cada una de estas pautas. CHOP también se ha combinado con bleomicina, metotrexato, procarbazona, mostaza nitrogenada, arabinósido de citosina y etopósido. Otros agentes quimioterapéuticos compatibles incluyen, pero no se limitan a, 2-clordesoxiadenosina (2-CDA), 2'-desoxicoformicina y fludarabina.

Para pacientes con NHL de gran malignidad o malignidad intermedia, que no logran la remisión o recaen, se usa terapia de último recurso. Las terapias de último recurso emplean fármacos tales como arabinósido de citosina, carboplatino, cisplatino, etopósido e ifosfamida administrados solos o en combinación. En las formas recidivantes o agresivas de ciertos trastornos neoplásicos se usan frecuentemente los siguientes protocolos: IMVP-16 (ifosfamida, metotrexato y etopósido), MIME (metil-gag, ifosfamida, metotrexato y etopósido), DHAP (dexametasona, citarabina de alta dosis y cisplatino), ESHAP (etopósido, metilprednisolona, citarabina HD, cisplatino), CEPP(B) (ciclofosfamida, etopósido, procarbazona, prednisona y bleomicina) y CAMP (lomustina, mitoxantrona, citarabina y prednisona), cada uno con tasas y programas de administración bien conocidos.

La cantidad de agente quimioterapéutico que se va a usar en combinación con los anticuerpos modificados de la presente divulgación puede variar por sujeto o se puede administrar según lo que se conoce en la técnica. Véase, por

ejemplo, Bruce A Chabner et al., Antineoplastic Agents, in GOODMAN & GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS 1233-1287 (Joel G. Hardman et al., eds., 9ª ed. 1996).

Como se ha tratado previamente, los polipéptidos de unión de la presente divulgación, fragmentos inmunorreactivos o recombinantes de los mismos se pueden administrar en una cantidad farmacéuticamente eficaz para el tratamiento *in vivo* de trastornos de mamíferos. A este respecto, se apreciará que los polipéptidos de unión desvelados se formularán para facilitar la administración y promover la estabilidad del agente activo.

Las composiciones farmacéuticas según la presente divulgación normalmente incluyen un vehículo farmacéuticamente aceptable, no tóxico, estéril, tal como solución salina fisiológica, tampones no tóxicos, conservantes y similares. A efectos de la presente solicitud, se entenderá que una cantidad farmacéuticamente eficaz del polipéptido de unión modificado, fragmento inmunorreactivo o recombinante del mismo, conjugado o sin conjugar con un agente terapéutico, significa una cantidad suficiente para lograr la unión eficaz a un antígeno y para lograr un beneficio, por ejemplo, para mejorar los síntomas de una enfermedad o trastorno o para detectar una sustancia o una célula. En el caso de células tumorales, el polipéptido de unión modificado normalmente será capaz de interactuar con antígenos inmunorreactivos seleccionados en células neoplásicas o inmunorreactivas y proporcionar un aumento en la muerte de las células. Por supuesto, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden administrar en dosis únicas o dosis múltiples para proporcionar una cantidad farmacéuticamente eficaz del polipéptido de unión modificado.

De acuerdo con el alcance de la presente divulgación, los polipéptidos de unión de la divulgación se pueden administrar a un humano u otro animal según los métodos de tratamiento anteriormente mencionados en una cantidad suficiente para producir un efecto terapéutico o profiláctico. Los polipéptidos de unión de la divulgación se pueden administrar a dicho humano u otro animal en una forma farmacéutica convencional preparada combinando el anticuerpo de la divulgación con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable convencional según técnicas conocidas. Se reconocerá por un experto en la técnica que la forma y el carácter del vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable vienen dados por la cantidad de principio activo con el que se va a combinar, la vía de administración y otras variables bien conocidas. Los expertos en la técnica apreciarán además que puede demostrar ser particularmente eficaz una mezcla que comprende una o más especies de polipéptidos de unión descritos en la presente divulgación.

IX. Expresión de polipéptidos de unión

En un aspecto, la divulgación proporciona polinucleótidos que codifican los polipéptidos de unión desvelados en el presente documento. También se proporciona un método de preparación de un polipéptido de unión que comprende que expresa estos polinucleótidos.

Los polinucleótidos que codifican los polipéptidos de unión desvelados en el presente documento normalmente se insertan en un vector de expresión para su introducción en células hospedadoras que se pueden usar para producir la cantidad deseada de los anticuerpos reivindicados, o fragmentos de los mismos. Por consiguiente, en ciertos aspectos, la divulgación proporciona vectores de expresión que comprenden polinucleótidos desvelados en el presente documento y células hospedadoras que comprenden estos vectores y polinucleótidos.

El término "vector" o "vector de expresión" se usa en el presente documento a efectos de la memoria descriptiva y las reivindicaciones para significar vectores usados según la presente divulgación como un vehículo para introducir en y expresar un gen deseado en una célula. Como se conoce por los expertos en la técnica, dichos vectores se pueden seleccionar fácilmente del grupo que consiste en plásmidos, fagos, virus y retrovirus. En general, los vectores compatibles con la presente divulgación comprenderán un marcador de selección, sitios de restricción apropiados para facilitar la clonación del gen deseado y la capacidad para entrar y/o duplicarse en células eucariotas o procariotas.

Se pueden emplear numerosos sistemas de vector de expresión a efectos de la presente divulgación. Por ejemplo, una clase de vector utiliza elementos de ADN que se obtienen de virus animales, tales como virus del papiloma bovino, virus del polioma, adenovirus, virus de la variolovacuna, baculovirus, retrovirus (RSV, MMTV o MOMLV), o virus SV40. Otros implican el uso de sistemas policistrónicos con sitios internos de unión al ribosoma. Además, se pueden seleccionar células que han integrado el ADN en sus cromosomas introduciendo uno o más marcadores que permiten la selección de células hospedadoras transfectadas. El marcador puede proporcionar prototrofia a un hospedador auxotrófico, resistencia a biocidas (por ejemplo, antibióticos) o resistencia a metales pesados tales como cobre. El gen marcador de selección puede o estar directamente unido a las secuencias de ADN a expresar, o se introduce en la misma célula por cotransformación. También se pueden necesitar elementos adicionales para la síntesis óptima de ARNm. Estos elementos pueden incluir secuencias señal, señales de corte y empalme, así como promotores de la transcripción, potenciadores y señales de terminación. En algunos casos, los genes de la región variable clonada se insertan en un vector de expresión junto con los genes de la región constante de la cadena pesada y ligera (por ejemplo, genes de la región constante humana) sintetizados como se trata anteriormente.

En otros casos, los polipéptidos de unión se pueden expresar usando construcciones policistrónicas. En dichos sistemas de expresión, se pueden producir múltiples productos génicos de interés tales como cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos de una construcción policistrónica individual. Estos sistemas usan ventajosamente un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) para proporcionar niveles relativamente altos de polipéptidos en células

hospedadoras eucariotas. Se desvelan secuencias de IRES compatibles en la patente de EE. UU. Nº 6.193.980. Los expertos en la técnica apreciarán que se pueden usar dichos sistemas de expresión para producir eficazmente la variedad completa de polipéptidos desvelados en la presente solicitud.

Más en general, una vez se ha preparado un vector o secuencia de ADN que codifica un anticuerpo, o fragmento del mismo, el vector de expresión se puede introducir en una célula hospedadora apropiada. Es decir, las células hospedadoras se pueden transformar. La introducción del plásmido en la célula hospedadora se puede llevar a cabo por diversas técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Estas incluyen, pero no se limitan a, transfección (incluyendo electroforesis y electroporación), fusión de protoplastos, precipitación con fosfato de calcio, fusión de células con ADN envuelto, microinyección e infección con virus intactos. Véase Ridgway, A. A. G. "Mammalian Expression Vectors" Capítulo 24.2, pp. 470-472 Vectors, Rodriguez and Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, Mass. 1988). La introducción de plásmidos en el hospedador puede ser por electroporación. Las células transformadas se cultivan en condiciones apropiadas para la producción de las cadenas ligeras y las cadenas pesadas, y se ensayan para la síntesis de proteínas de la cadena pesada y/o ligera. Las técnicas de ensayo a modo de ejemplo incluyen enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) o citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS), inmunohistoquímica y similares.

Como se usa en el presente documento, el término "transformación" se debe usar en un amplio sentido para referirse a la introducción de ADN en una célula hospedadora de receptor que cambia el genotipo y, por consiguiente, da como resultado un cambio en la célula receptora.

En la misma línea, "células hospedadoras" se refiere a células que han sido transformadas con vectores construidos usando técnicas de ADN recombinante y que codifica al menos un gen heterólogo. En descripciones de los procesos para el aislamiento de polipéptidos a partir de hospedadores recombinantes, los términos "célula" y "cultivo celular" se usan indistintamente para indicar la fuente del anticuerpo, a menos que se especifique evidentemente de otro modo. En otras palabras, la recuperación del polipéptido de las "células" puede significar o de células completas centrifugadas o del cultivo celular que contiene tanto el medio como las células suspensas.

En una realización, la línea de células hospedadoras usada para la expresión de anticuerpos es de origen mamífero; los expertos en la técnica pueden determinar líneas particulares de células hospedadoras que son muy aptas para el producto génico deseado a expresar en ellas. Las líneas de células hospedadoras a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, DG44 y DUXB11 (líneas de ovario de hámster chino, DHFR menos), HELA (carcinoma cervical humano), CVI (línea de riñón de mono), COS (un derivado de CVI con antígeno T de SV40), R1610 (fibroblasto de hámster chino) BALBC/3T3 (fibroblasto de ratón), HAK (línea de riñón de hámster), SP2/O (mieloma de ratón), BFA-1c1BPT (células endoteliales bovinas), RAJI (linfocito humano), 293 (riñón humano). En una realización, la línea celular proporciona glucosilación alterada, por ejemplo, afucosilación, del anticuerpo expresado de ella (por ejemplo, PER.C6.RTM. (Crucell) o líneas celulares CHO inactivadas en FUT8 (Potelligent.RTM.) (Biowa, Princeton, N.J.)). En una realización, se pueden usar células NS0. Son particularmente útiles las células CHO. Normalmente están disponibles líneas de células hospedadoras de servicios comerciales, la Colección Americana de Cultivos de Tejido o de la bibliografía publicada.

La producción *in vitro* permite el aumento de escala para producir grandes cantidades de los polipéptidos deseados. Se conocen en la técnica técnicas para el cultivo de células de mamífero en condiciones de cultivo de tejido e incluyen cultivo homogéneo en suspensión, por ejemplo, en un reactor de columna aireada o en un reactor continuo con agitador, o cultivo celular inmovilizado o atrapado, por ejemplo, en fibras huecas, microcápsulas, sobre microperlas de agarosa o cartuchos cerámicos. Si fuera necesario y/o se deseara, las disoluciones de polipéptidos se pueden purificar por los métodos de cromatografía habituales, por ejemplo, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía sobre DEAE-celulosa y/o cromatografía de (inmuno)afinidad.

Los genes que codifican los polipéptidos de unión caracterizados en la divulgación también pueden expresar células de no mamífero tales como bacterias o células de levadura o vegetales. A este respecto se apreciará que también se pueden transformar diversos microorganismos unicelulares no de mamífero tales como bacterias; es decir, aquellos capaces de ser cultivados en cultivos o fermentación. Las bacterias, que son susceptibles a la transformación, incluyen miembros de las enterobacteriaceae, tales como cepas de *Escherichia coli* o *Salmonella*; *Bacillaceae*, tales como *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus* y *Haemophilus influenzae*. Se apreciará además que, cuando se expresan en bacterias, los polipéptidos pueden llegar a ser parte de cuerpos de inclusión. Los polipéptidos se deben aislar, purificar y ensamblar en moléculas funcionales.

Además de los procariotas, también se pueden usar microbios eucariotas. *Sacaromyces cerevisiae*, o levadura de panadero común, es el más comúnmente usado entre los microorganismos eucariotas, aunque están comúnmente disponibles varias otras cepas. Para la expresión en *Sacaromyces*, comúnmente se usa el plásmido YRp7, por ejemplo, (Stinchcomb et al., *Nature*, 282:39 (1979); Kingsman et al., *Gene*, 7:141 (1979); Tschemper et al., *Gene*, 10:157 (1980)). Este plásmido ya contiene el gen TRP1 que proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC Nº 44076 o PEP4-1 (Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)). La presencia de la lesión por *trp1* como característica del genoma de la célula hospedadora de levadura proporciona entonces un entorno eficaz para detectar la transformación por crecimiento en ausencia de triptófano.

EJEMPLOS

La presente invención se ilustra además por los siguientes ejemplos que no se deben interpretar como más limitantes.

Ejemplo 1. Síntesis por quimioenzimas de CMP-ácido siálico o CMP-derivados de ácido siálico en C5

Se puede tratar N-acetil manosamina o un derivado de la misma con ácido siálico aldolasa para formar ácido siálico o derivados de ácido siálico. El posterior tratamiento del ácido siálico o derivado de ácido siálico con CTP en presencia de CMP-ácido siálico sintetasa daría como resultado la creación de CMP-ácido siálico o CMP-derivado de ácido siálico (**Figura 1**).

Los CMP-derivados de ácido siálico que se podrían crear mediante la síntesis por quimioenzimas brevemente expuestas en la **Figura 1** incluyen, pero no se limitan a, CMP-derivados de ácido siálico en C5 de la **Figura 2**. La **Figura 2** también muestra CMP-derivados de ácido siálico en C7 y C8. Los CMP-derivados de ácido siálico se pueden usar como sustratos para transferir los derivados de ácido siálico a anticuerpos mediante la sialilación *in vitro* para la posterior conjugación.

Ejemplo 2. Diferentes químicas para la conjugación mediante derivados de ácido siálico

Las **Figuras 3A-E** son representaciones de diferentes reacciones químicas de la presente divulgación, que incluyen la presente invención, en donde los círculos en combinación con los restos reactivos a los que se unen representan los polipéptidos de unión conjugados con derivado de ácido siálico. Las estrellas representan los restos de direccionamiento o efectores. La **Figura 3A** es un esquema que muestra la reacción de un polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico que comprende un aldehído terminal con un resto efector aminooxi, por ejemplo, un fármaco o un glucano, para formar una imina. La **Figura 3B** es un esquema que muestra la reacción de un polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico que comprende un resto ceto terminal con un resto efector aminooxi, por ejemplo, un fármaco o un glucano, para formar una imina. La **Figura 3C** es un esquema que muestra la reacción de un polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico que comprende un aldehído terminal o ceto con un resto efector que comprende una hidracina para formar una hidrazona, que es un tipo de imina. La **Figura 3D** es un esquema que muestra la reacción de un polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico que comprende una azida terminal con un resto efector, por ejemplo, un fármaco o un glucano, que comprende un alquino o unido a un resto que comprende un alquino (aquí, DBCO) para formar un triazol. La **Figura 3E** es un esquema que muestra la reacción de un polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico que comprende un tiol terminal con un resto efector, por ejemplo, un fármaco o un glucano, que comprende una maleimida para formar un enlace tioéster.

La **Figura 4** representa el polipéptido de unión conjugado con resto efector según los métodos de la presente invención. El polipéptido de unión conjugado con resto efector se puede formar (a) haciendo reaccionar un derivado de ácido siálico con un glucano de un polipéptido de unión para formar un polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico; y (b) haciendo reaccionar el polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico con un resto efector para formar el polipéptido de unión conjugado con resto efector, en donde se forma un enlace imina, y en donde ni el polipéptido de unión ni el polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico se tratan con un agente de oxidación. La **Figura 4** representa la formación de una oxima, un tipo de imina.

La **Figura 5** representa el polipéptido de unión conjugado con resto efector según los métodos de la presente divulgación. El polipéptido de unión conjugado con resto efector se puede formar (a) haciendo reaccionar un derivado de ácido siálico que comprende un resto reactivo terminal en la posición C5 con un glucano de un polipéptido de unión para formar un polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico; y (b) haciendo reaccionar el polipéptido de unión conjugado con derivado de ácido siálico con un resto efector para formar el polipéptido de unión conjugado con resto efector usando química de click. La **Figura 5** representa la formación de un anillo de triazol.

Ejemplo 3. Diseño, preparación y caracterización de mutantes de hiperglucosilación de anticuerpos anti-CD-52 2C3

Se diseñaron múltiples mutaciones de hiperglucosilación en la cadena pesada del anticuerpo anti-CD-52, 2C3, con el fin de añadir un grupo voluminoso a una interfaz de interacción (por ejemplo, el sitio de unión a FcRn para modular la farmacocinética de anticuerpos) para modular la función efectora de anticuerpos cambiando su interacción con FcγR, o para introducir una novedosa modificación química de subsecuencia del sitio de reticulación para la conjugación de restos efectores, que incluye, pero no se limita a, fármacos, toxinas, agentes citotóxicos y radionucleótidos. Los mutantes hiperglucosilados 2C3 se exponen en la Tabla 3.

Tabla 3. Mutantes hiperglicosilados anti-CD-52 2C3

Mutación	Beneficio deseado	Aplicaciones
A114N	Glucosilación en Asn-Ser-Thr	1) Control 2) Conjugación con resto efector
Y436T	Glucosilación en Asn434 Inhibición de la unión a FcRn	1) Trasplante y otras indicaciones que necesitan semivida corta
Y436S	Glucosilación en Asn434 Inhibición de la unión a FcRn	1) Trasplante y otras indicaciones que necesitan semivida corta
S440N	Glucosilación en Asn-Leu-Ser	1) Control 2) Conjugación con resto efector
S442N	Glucosilación en Asn-Leu-Ser	1) Control 2) Conjugación con resto efector
Añadir NGT al extremo C	Glucosilación	1) Control 2) Conjugación con resto efector
S298N/Y300S	Glucosilación en Asn298 Reducida función efectora	1) Reducir la función efectora 2) Conjugación con resto efector

3A. Creación de mutantes de hiperglicosilación de anticuerpos anti-CD-52 2C3

Se introdujo la mutación A114N, designada basándose en el sistema de numeración de Kabat, en el dominio CH1 de 2C3 por PCR mutagénica. Para crear el anticuerpo de longitud completa, el dominio VH más el resto A114N mutado se insertó por clonación independiente de la ligación (LIC) en el vector pENTR-LIC-IgG1 que codifica los dominios CH 1-3 del anticuerpo. Todas las otras mutaciones se introdujeron en pENTR-LIC-IgG1 por mutagénesis dirigida al sitio con un kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, EE. UU.). Se clonó VH 2C3 WT en vectores mutados por LIC. Se clonaron mutantes de longitud completa en el vector de expresión pCEP4(-E+I)Dest por clonación Gateway. Se designaron mutaciones de Fc basándose en el sistema de numeración de EU. Se confirmaron las mutaciones por secuenciación de ADN. Se exponen en la Tabla 4 secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras de 2C3 WT y las cadenas pesadas de 2C3 mutadas. Los aminoácidos mutados están resaltados en gris y los sitios diana de glucosilación consenso creados por la mutación están subrayados.

Tabla 4. Secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD-52 2C3

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia de aminoácidos
1	Cadena ligera anti-CD-52 WT	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSI.L.YSNGKTY LNWLLQKPGQSPQRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFILKISRVEAEDVGVYYCVQGTILITFGQGTSL EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC

<u>SEQ ID NO</u>	<u>Nombre</u>	<u>Secuencia de aminoácidos</u>
2	Cadena pesada anti-CD-52 WT	VQI.VESGGGI.VQPGGSI.RI.SCAASGFTFNTYWMN WVRQAPGKGLEWVGQIRL.KSNYYATHYAESVKGR FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFW GQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVITFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNIHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTITICPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSHFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
3	Cadena pesada anti-CD-52 A114N	EVQI.VESGGGI.VQPGGSI.RI.SCAASGFTFNTYWMN WVRQAPGKGLEWVGQIRL.KSNYYATHYAESVKGR FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFW GQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVITFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNIHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTITICPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSHFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
4	Cadena pesada anti-CD-52 Y436S	EVQI.VESGGGI.VQPGGSI.RI.SCAASGFTFNTYWMN WVRQAPGKGLEWVGQIRL.KSNYYATHYAESVKGR FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFW GQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVITFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNIHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTITICPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSHFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia de aminoácidos
5	Cadena pesada anti-CD-52 S440N	EVQI.VESGGGI.VQPGGSI.RI.SCAASGFTFNTYWMN WVRQAPGKGLEWVGQIRL.KSNNYATHYAESVKGR FTISRDDSKNSI.YI.QMNSI.KTEDTAVYYCTPVDFW GQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNIKPSNTKVDKK VEPKSCDKTITCPPCPAPEL.I.GGPSVFL.FPPKPKDTL. MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFI.YSKI.TVDKSRWQQGNVFSC SVMHIEAL.IINITYTQK NLS .SPGK
6	Cadena pesada anti-CD-52 S442N	EVQI.VESGGGI.VQPGGSI.RI.SCAASGFTFNTYWMN WVRQAPGKGLEWVGQIRL.KSNNYATHYAESVKGR FTISRDDSKNSI.YI.QMNSI.KTEDTAVYYCTPVDFW GQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTITCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVII NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFI.YSKI.TVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSL NLS .SPGK
7	Cadena pesada anti-CD-52 NGT	EVQI.VESGGGI.VQPGGSI.RI.SCAASGFTFNTYWMN WVRQAPGKGLEWVGQIRL.KSNNYATHYAESVKGR FTISRDDSKNSI.YI.QMNSI.KTEDTAVYYCTPVDFW GQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPEL.I.GGPSVFL.FPPKPKDTL. MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVII NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFI.YSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK NGT

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia de aminoácidos
8	Cadena pesada anti-CD-52 S298N / Y300S	EVQIVESGGGLVQPGGSI.RI.SCAASGFTFNTYWMN WVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGR FTISRDDSKNSI.YI.QMNSI.KTEDTAVYYCTPVDFW GQGIVTVVSSASTKGPSVITPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGAL.TSGVITFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTITCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNLSRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFHYSLKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Se transfectaron los mutantes y el control WT en células HEK293-EBNA en un formato de placa de 6 pocillos. Como se muestra en la **Figura 14A y B**, se encontró que el nivel de expresión era ~0,1 µg/mL, como se analizó por SDS-PAGE y transferencia Western. También se midió la expresión de mutantes en medio acondicionado por captura de proteína A en Biacore. Se determinó la concentración usando la respuesta de disociación 6 minutos después de la inyección en proteína A inmovilizada. Se usó como curva patrón 2C3 WT diluido en serie producido por CHO en medio desde 90 µg/mL hasta 1,5 ng/mL. Las concentraciones se calcularon hasta ~0,2 µg/mL por una curva de calibración usando un ajuste de 4 parámetros. Como se muestra en la **Figura 14B**, los niveles de expresión relativa fueron bajos y, en general, se correspondieron con los resultados de transferencia Western.

3B. Verificación de la hiperglicosilación

Para determinar si se introdujeron por mutación sitios de glucosilación adicionales, se trataron el mutante 2C3 y proteínas naturales con la enzima desglucosilante universal PNGasa F y se analizaron muestras de proteína por SDS-PAGE y transferencia Western. Como se muestra en la **Figura 15**, solo el mutante A114N tuvo un aumento de peso molecular aparente, que indica la presencia de un hidrato de carbono unido en N adicional.

Se produjeron preparaciones de anticuerpo a pequeña escala para purificar los mutantes 2C3 para verificación adicional de la introducción de sitios de glucosilación. Como se muestra en la **Figura 16**, se confirmó por SDS-PAGE que solo el mutante A114N tenía sitios de glucosilación adicionales introducidos.

3C. Propiedades de unión de mutantes anti-CD-52 2C3

Se usó Biacore para comparar las propiedades de unión de las proteínas purificadas. Se inmovilizaron FcRn-HPC4 de ratón y humana purificada por SEC en un chip CM5 por acoplamiento con amina. Cada anticuerpo se diluyó hasta 200, 50 y 10 nM y se inyectó sobre los receptores de Fc inmovilizados. Se incluyeron Campath, 2C3 WT producido por CHO y Campath tratado con DEPC como controles positivos y negativos. Como se muestra en la **Figura 18**, el mutante Y436S presentó una disminución de aproximadamente 2 veces en la unión a FcRn humano. Es interesante señalar que no se afectó la unión de este mutante a FcRn de ratón. Ninguna de las otras mutaciones 2C3 tuvo efecto considerable sobre la unión a FcRn humano o de ratón.

Se usó Biacore para comparar las propiedades de unión al antígeno de las proteínas purificadas usando el ensayo de unión Biacore del péptido 741CD-52. Se inmovilizaron el péptido 741 CD-52 y el péptido de control 777 a un chip CM5. Los anticuerpos se diluyeron sucesivamente 2 veces desde 60 hasta 0,2 nM en HBS-EP y se inyectaron por duplicado durante 3 min seguido por una disociación de 5 min en tampón a un caudal de 50 µL/min. Se incluyó el lote de GLD52 17200-084 como control. La superficie se regeneró con 1 impulso de HCl 40 mM. Se usó un modelo de unión 1:1 para ajustar las curvas de 7,5 a 0,2 nM. Como se muestra en la **Figura 21**, el mutante A114N tuvo una afinidad de unión a CD-52 ligeramente más baja, mientras que el mutante NGT tuvo una afinidad ligeramente más alta que el resto de los mutantes en este ensayo. Se repitió el ensayo de unión Biacore del péptido 741 CD-52 con proteína purificada de una preparación a gran escala.

Como se muestra en la **Figura 22**, el mutante A114N presentó unión al péptido CD-52 que era comparable a 2C3 WT.

3D. Caracterización de carga del mutante A114N

Se realizó isoelectroenfoque (IEF) para caracterizar la carga de los mutantes 2C3. La proteína purificada se desplazó sobre geles de acrilamida (IPG) inmovilizados de gradiente de pH (pH3-10). Como se muestra en la **Figura 23A**, se encontró que A114N tenía más cargas negativas, probablemente debido a los restos de ácido siálico. Los datos de EM intactos confirmaron la estructura compleja con ácidos siálicos en el mutante A114N. A diferencia, se mostró que 2C3 WT tenía G0F y G1F como especies de glucosilación dominantes (**Figuras 23C y 23D**, respectivamente).

Ejemplo 4. Preparación de mutantes de hiperglucosilación en varios esqueletos de anticuerpo

Además del anticuerpo anti-CD-52 2C3, se manipuló la mutación A114N en varios otros esqueletos de anticuerpo para confirmar que el sitio de hiperglucosilación único se podía introducir en secuencias no relacionadas del dominio variable de la cadena pesada. Los mutantes anti-TEM1, anti-FAP y anti-Her2 hiperglucosilados se exponen en la Tabla 5.

Tabla 5. Mutantes A114N y/o S298N diseñados en varios esqueletos de anticuerpo no relacionados

Mutación	Anticuerpo	Beneficios deseados	Aplicaciones
A114N	anti-TEM1 anti-FAP anti-Her2	Sitio de glucosilación adicional en la bisagra codo de la cadena pesada para la conjugación mediada por hidratos de carbono específicos de sitio	1) Control 2) Conjugación de toxina aminooxi por grupo ácido siálico o galactosa expuesto (SAM o GAM)
S298N / T299A / Y300S (NNAS)	anti-Her2	Cambio de la glucosilación de Asn297 a una Asn298 manipulada. Disolvente esperado expuesto e hidratos de carbono complejos en S298N, que ofrecen sitio de conjugación y medios para retirar la función efectora	1) Conjugación de toxina aminooxi por grupo ácido siálico o galactosa expuesto (SAM o GAM) 2) Reducción de la función efectora
A114N / NNAS	anti-Her2	Posibilidades de elevado rendimiento de conjugación con dos sitios de conjugación	1) Control 2) Conjugación de toxina aminooxi por grupo ácido siálico o galactosa expuesto (SAM o GAM)

4A. Creación de mutantes de hiperglucosilación de anticuerpos anti-TEM1 y anti-FAP

Se introdujo la mutación A114N, designada basándose en el sistema de numeración de Kabat, en el dominio CH1 de anti-TEM1 y anti-FAP por PCR mutagénica. Para crear el anticuerpo de longitud completa, se insertó VH mutada más el resto 114 por clonación independiente de la ligación (LIC) en el vector pENTR-LIC-IgG1 que codifica los dominios CH 1-3 del anticuerpo. Entonces se clonaron mutantes de longitud completa en el vector de expresión pCEP4(-E+I)Dest por clonación Gateway. Se confirmaron las mutaciones por secuenciación de ADN. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras naturales y mutadas anti-TEM1 se exponen en la Tabla 6. Los aminoácidos mutados están resaltados en gris y los sitios diana de glucosilación consenso creados por la mutación están subrayados.

Tabla 6. Secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-TEM1 y anti-FAP

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia de aminoácidos
9	Cadena ligera anti-TEM1 WT (clon N° 187)	EIVLTQSPGTL ^{SI} SPGERATL ^{SCR} ASQSVSSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRI ^{LE} PEDFAVVY ^C QQY ^G SSPWTFGQGT ^K VEIKRT VAAPSVTIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS ^T YSLSS ^T LT ^T LSKADY ^E LKH ^K VYACEVTHQGLSSPV ^T KS ^F NRG ^L EC

<u>SEQ ID NO</u>	<u>Nombre</u>	<u>Secuencia de aminoácidos</u>
10	Cadena pesada anti-TEM1 WT (clon N° 187)	QVQLQESAPGIVKPSSETLSLTCTVSGGSIRSYYSWSW IRQPPGKGLLEYIGYIYYTGSALYNPSLQSRVTISVDTS KNQFSI.KI.NSVTAADTAVYYCAREGVRGASGYYY YGMDEVWGQGTTVTVSSASTKGPSVPLAPSSKSTIS GGTAAI.GCI.VKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVITFEP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTITCPPCPAPPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPPVLDSDGSHFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
11	A114N anti-TEM1	QVQLQESAPGIVKPSSETLSLTCTVSGGSIRSYYSWSW IRQPPGKGLLEYIGYIYYTGSALYNPSLQSRVTISVDTS KNQFSI.KI.NSVTAADTAVYYCAREGVRGASGYYY YGMDEVWGQGTTVTVSS AST KGPSVPLAPSSKSTIS GGTAAI.GCI.VKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVITFEP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSHFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFCSCVMHEALINHYTQKSLSLSPGK*

Se transfectaron los mutantes y el control natural en células HEK293-EBNA en un formato de matraz triple y se purificaron en columnas de proteína A HiTrap (GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA, EE. UU.). Como se analizó por A280 en un espectrofotómetro NanoDrop, la expresión de A114N anti-FAP y A114C anti-FAP fue aproximadamente 3 µg/mL y aproximadamente 1 µg/mL, respectivamente. La expresión de A114N anti-TEM1 fue aproximadamente 0,04 µg/mL.

4B. Verificación de la hiperglicosilación

Para confirmar que el sitio de glucosilación adicional se introdujo en los mutantes A114N, se analizó proteína purificada de los mutantes A114N en SDS-PAGE reductora, junto con proteína de control natural. Un sitio de glucosilación adicional añadiría 2000-3000 dáltones al peso molecular de la cadena pesada. Como se muestra en la **Figura 25**, la SDS-PAGE indicó que las bandas de las cadenas pesadas de los mutantes A114N anti-FAP y anti-TEM1 tuvieron un elevado peso molecular aparente, de acuerdo con la introducción satisfactoria de un sitio de glucosilación adicional en ambos anticuerpos.

4C. Creación de mutantes de hiperglicosilación de anticuerpos anti-Her2

Se crearon los anticuerpos Her-2 A114N, Her-2 A114N/NNAS y Her-2 WT por clonación independiente de la ligación. Se sintetizó el dominio VH de Herceptin y se amplificó por PCR con dos conjuntos de cebadores compatibles con LIC, o WT o portando la mutación A114N. Para obtener un anticuerpo de longitud completa, se clonaron insertos de VH amplificados (WT o A114N) en dos vectores pENTR que codificaban los dominios CH 1-3, pENTR-LIC-IgG1 WT y pENTR-LIC-IgG1 NNAS, dando como resultado tres mutantes de longitud completa (A114N, NNAS, A114N/NNAS) y control WT como clones de entrada en pENTR. Estos mutantes se clonaron en el vector de expresión pCEP4(-

E+I)Dest, por clonación Gateway. Las mutaciones se confirmaron por secuenciación de ADN. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras naturales y mutadas anti-Her-2 se exponen en la **Tabla 7**. Los aminoácidos mutados están resaltados en gris y los sitios diana de glucosilación consenso creados por la mutación están subrayados.

5

Tabla 7. Secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-Her-2

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia de aminoácidos
12	Cadena ligera anti-Her-2 WT	DIQMTQSPSSI.SASVGDRTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFT LTISSIQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSITLT LSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
13	Cadena pesada anti-Her-2 WT	EVQLVESGGGLVQPGGSLRI.SCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPINGYTRYADSVKGRFTIS ADTSKNTAYIQMNSIRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVITFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTITCPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPISRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VITCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
14	Cadena pesada anti-Her-2 A114N	EVQLVESGGGLVQPGGSLRI.SCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPINGYTRYADSVKGRFTIS ADTSKNTAYIQMNSIRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSS <u>NS</u> TKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVITFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPISRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VITCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia de aminoácidos
15	Cadena pesada anti-Her2 NNAS	EVQI.VESGGGI.VQPGGSI.RI.SCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTIS ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTILVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAI.TSGVITFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTITCPCPAPELGGPSVFI.FPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPRELQYN NAS SRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKC'KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYK'TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VI'SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
16	Cadena pesada anti-Her2 A114N / NNAS	EVQI.VESGGGI.VQPGGSI.RI.SCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTIS ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTILVTVSS AST KGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNIHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTITCPCPAPELLGGPSVFI.FPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPRELQYN NAS SRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKC'KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYK'TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VI'SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

4D. Expresión del mutante de hiperglicosilación de anticuerpos anti-Her2 A114N

Se transfectaron construcciones A114N anti-Her2 y naturales con Lipofectamine-2000 (relación 2,5:1 entre reactivo y ADN) y XtremeGene HP (relación 3:1 entre reactivo y ADN) en células HEK293-EBNA en 12 matraces triples. La medición por Octet de alícuotas de medio acondicionado (CM) del día 3 mostró que la expresión de proteínas era coherente en los 6 matraces para tanto Lipofectamine-2000 como XtremeGene HP. Como se muestra en la Tabla 8, la eficiencia de transfección global fue aproximadamente 30 % más alta con XtremeGene HP. Se reunió junto el medio acondicionado recogido en el día 3 para ambas condiciones de transfección y se purificó por columna de proteína A. La medición por Octet mostró 1,8 ug/mL de anticuerpo en los medios de control que contenía suero frente a 0 ug/mL en los medios simulados sin suero.

Tabla 8. Expresión de mutantes de hiperglicosilación anti-Her2 A114N

		Lipofectamine-2000	XtremeGene HP
Proteína purificada de la columna de proteína A	Concentración (mg/mL)	1,72	3,18
	Volumen (mL)	3,5	3,5
	Proteína total (mg)	6,02	11,13
	Concentración (mg/mL)	15,59	16,86

		Lipofectamine-2000	XtremeGene HP
Proteína de tampón intercambiado	Volumen (mL)	0,2	0,36
	Proteína total (mg)	3,1	6,07
	% de recuperación	51,8	54,5

Se recogió medio acondicionado del día 6 y se purificó por separado para cada condición de transfección. Ambos eluatos se sometieron a intercambio de tampón por separado en PBS, pH 7,2, y se concentraron ~15 veces usando columnas Amicon-4 (50 kD de corte). El CM del día 6 mostró nivel de expresión más alto en comparación con el CM del día 3. Como se muestra en la Tabla 8, se produjo un total de 3 mg de Herceptin A114N 15,59 mg/mL (de la transfección de Lipofectamine) y 6 mg de Herceptin A114N 16,86 mg/mL (de la transfección de XtremeGene HP) del medio acondicionado del día 6 para aplicaciones aguas abajo adicionales, tales como la conjugación de anticuerpo-fármaco.

4E. Análisis por SDS-PAGE y HIC del mutante anti-Her2 A114N

Antes de la conjugación, se caracterizó Herceptin A114N purificado por SDS-PAGE y HIC (cromatografía de interacción hidrófoba). Como se muestra en la **Figura 26**, se determinó que la calidad de Herceptin A114N purificado era adecuada para la aplicación aguas abajo adicional.

4F. Conjugación con glucosilación manipulada

Se demostró que: a) se introdujo un sitio de glucosilación en el sitio 114 de la posición de Kabat en anti-TEM1; b) el mutante A114N tenía hiperglucosilación en la cadena pesada por SDS-PAGE reductora; y c) el mutante hiperglucosilado A114N tenía estructura de hidrato de carbono complejo por EM/CL intacta, que incluye ácidos siálicos terminales y galactosa, que son ideales para la conjugación de SAM y GAM. Para confirmar que el sitio de glucosilación manipulado fue adecuado para la conjugación, se conjugó anti-TEM1 A114N con una PEG de 5 kDa por química de aminooxi. Como se muestra en la **Figura 27**, el PEG se conjugó satisfactoriamente con anti-TEM1 A114N mediante un enlace aminooxi. Este mutante también se preparó satisfactoriamente en los esqueletos anti-FAP y anti-CD-52 2C3 (no mostrados). Estos datos demuestran que el sitio de glucosilación en N114 es útil para la conjugación de restos efectoros.

Ejemplo 5: Generación de mutantes de Fc S298N/Y300S

Se diseñaron y generaron variantes de Fc manipuladas en las que un nuevo sitio de glucosilación se introdujo en la posición de EU Ser 298, a continuación del sitio Asn297 que existe de forma natural. Se mantuvo la glucosilación en Asn297 o se suprimió por mutación. Las mutaciones y los resultados de glucosilación deseados se exponen en la Tabla 9.

Tabla 9: Estados de glucosilación de diversas variantes de anticuerpo

Nº	Mutación	Estado de glucosilación deseado	Aplicaciones
17	N297Q	Sin glucosilación (aglu)	Control de aglu
18	T299A	Sin glucosilación (aglu)	Control de aglu, función efectora desconocida
19	N297Q/S298N/Y300S (NSY)	Sin glucosilación en 297, pero sitio de glucosilación manipulado en 298	Función efectora reducida; conjugación por grupos ácido siálico o galactosa expuestos.
20	S298N/T299 A/Y300S (STY)	Sin glucosilación en 297, pero sitio de glucosilación manipulado en 298	Función efectora reducida; conjugación por grupos ácido siálico o galactosa expuestos.
21	S298N/Y300S (SY)	Dos posibles sitios de glucosilación en 297 y 298; alteraciones en el patrón de glucosilación.	Función efectora reducida; conjugación por grupos ácido siálico o galactosa expuestos.
22	Natural	297	control

5A. Creación de variantes de glucosilación alteradas de anticuerpos H66 $\alpha\beta$ -TCR

Se hicieron mutaciones en la cadena pesada del clon N° 66 del anticuerpo contra receptores $\alpha\beta$ de linfocitos T por Quikchange usando un molde pENTR_LIC_IgG1. Se amplificó el dominio VH de HEBE1 Δ ab IgG1 N° 66 con cebadores de LIC antes de clonarse en pENTR_LIC_IgG1 mutado o natural por LIC para crear anticuerpos mutantes o naturales de longitud completa. La subclonación se verificó con el digesto doble DraIII/XhoI, produciendo un inserto de aproximadamente 1250 pb de tamaño en los clones satisfactorios. Entonces se clonaron los mutantes de longitud completa en un vector de expresión, pCEP4(-E+I)Dest, por clonación Gateway. Las mutaciones se confirmaron por secuenciación de ADN. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras anti- $\alpha\beta$ TCR H66 WT y las cadenas pesadas de H66 mutadas se exponen en la Tabla 10. Los aminoácidos mutados están resaltados en gris y los sitios diana de glucosilación consenso creados por la mutación están subrayados.

Tabla 10: Secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR H66

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia de aminoácidos
23	Cadena ligera anti- $\alpha\beta$ TCR clon H66	EIVL.TQSPATL.SLSPGERATL.SCSATSSVS YMIHWYQQ KPGQAPRRLLIYDTSKLA SGVPARFSGSGSGTSYTLTIS SLEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIKRTVAAP SVFIPTPSDEQLKSGTASVVCILNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSPVTKSLNRGEC*
24	Cadena pesada anti- $\alpha\beta$ TCR clon H66	EVQLTQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKFTSYVMHW VRQAPGKGLEWVG YINPYNDVTKYNEKFKGRFTLSR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYDYDGF VYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLLPCKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVL DSDGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMIEALHN HYTQKSLSLSPGK*
25	Cadena pesada anti- $\alpha\beta$ TCR clon H66 S298N/Y300S	EVQLTQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKFTSYVMHW VRQAPGKGLEWVG YINPYNDVTKYNEKFKGRFTLSR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYDYDGF VYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLLPCKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVL DSDGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMIEALHN HYTQKSLSLSPGK*

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia de aminoácidos
26	Cadena pesada anti- α TCR clon H66 S298N/ T299A/ Y300S	EVQLTQSGGGI.VQPGGSI.RI.SCAASGYKFTSYVMHW VRQAPGKGLEWVGYNPNVDVTKYNEKFKGRFTLSR DNSKNTLYIQMNSI.RAEDTAVYYCARGSYDYDGF VYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVIINAK TKPREEQYN NAS RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSHFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK*
27	Cadena pesada anti- α TCR clon H66 N297Q/ S298N/ Y300S	EVQLTQSGGGI.VQPGGSI.RI.SCAASGYKFTSYVMHW VRQAPGKGLEWVGYNPNVDVTKYNEKFKGRFTLSR DNSKNTLYIQMNSI.RAEDTAVYYCARGSYDYDGF VYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQY QNTS RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSHFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK*

Se transfectaron construcciones mutantes, naturales y dos controles aglucosilados (HEBE1 Agly IgG4 y HEBE1 Δ ab IgG1 en pCEP4) en células HEK293-EBNA en matraces triples para la expresión. Las proteínas se purificaron a partir de 160 mL de medio acondicionado (CM) con columnas de proteína A HiTrap de 1 mL (GE) usando una bomba peristáltica multicanal. Se analizaron cinco microgramos de cada sobrenadante resultante en geles de SDS-PAGE al 4-20 % de Tris-glicina reductora y no reductora (véase la **Figura 7**). Las cadenas pesadas de los mutantes aglucosilados (N297Q, T299A y controles aglu) han migrado más (punta de flecha), de acuerdo con la pérdida de los glucanos en estos anticuerpos. Las cadenas pesadas de los anticuerpos glucosilados manipulados (NSY, STY, SY, Δ ab y control wt, flechas), sin embargo, migran similarmente al control natural. Este resultado está de acuerdo con la existencia de un sitio de glucosilación manipulado en la posición EU 298. El análisis de SEC-HPLC indicó que todos los mutantes se expresan como monómeros.

5B. Análisis de glucosilación por CL-EM

Las variantes de Fc de IgG1 H66 manipulada se redujeron parcialmente con DTT 20 mM a 37 °C durante 30 min. Entonces se analizaron las muestras por EM/CL capilar en un sistema de HPLC capilar Agilent 1100 acoplado con un sistema híbrido QSTAR qq TOF (Applied Biosystems). Se usó una reconstrucción bayesiana de proteínas con corrección del nivel inicial y modelado informático en Analyst QS 1.1 (Applied Biosystem) para el análisis de datos. En el anticuerpo mutante H66S298N/T299A/Y300S, se observó un sitio de glucosilación en el aminoácido 298 con glucanos de tipo complejo biantenar y triantenar detectado como la principal especie junto con G0F, G1F y G2F (véase la **Figura 39**). Este perfil de glucosilación alterado es coherente con la glucosilación desplazada en N298 en lugar del sitio de glucosilación natural en N297.

5C. Propiedades de unión de mutantes del anticuerpo contra α TCR a Fc γ RIIIa y Fc γ RI humano usando Biacore

Se usó Biacore para evaluar la unión con Fc γ RIIIa (V158 y F158) y Fc γ RI humano recombinante. Se inmovilizaron las cuatro celdas de flujo de un chip CM5 con anticuerpo anti-HPC4 por el procedimiento de acoplamiento de aminas estándar proporcionado por Biacore. El anticuerpo anti-HPC4 se diluyó hasta 50 μ g/mL en acetato sódico 10 mM a pH 5,0 para la reacción de acoplamiento y se inyectó durante 25 min a 5 μ L/min. Se inmovilizaron aproximadamente 12.000 UR de anticuerpo en la superficie del chip. Se diluyeron Fc γ RIIIa-V158 y Fc γ RIIIa-F158 humano recombinante hasta 0,6 μ g/mL en tampón de unión (HBS-P con CaCl_2 1 mM) y se inyectaron a las celdas de flujo 2 y 4, respectivamente, durante 3 min a 5 μ L/min para capturar 300 - 400 UR de receptor sobre el chip anti-HPC4. Para distinguir entre los bajos aglutinantes, se capturó tres veces más rhFc γ RIIIa sobre la superficie anti-HPC4 que lo normalmente usado en este ensayo. Se usaron las celdas de flujo 1 y 3 como controles de referencia. Cada anticuerpo se diluyó hasta 200 nM en tampón de unión y se inyectó sobre las cuatro celdas de flujo durante 4 min, seguido por 5 min de disociación en tampón. Las superficies se regeneraron con EDTA 10 mM en tampón HBS-EP durante 3 min a 20 μ L/min. Los resultados de estos experimentos se muestran en la **Figura 8**.

También se usó Biacore para comparar la unión a Fc γ RI. Se intercambié el tampón del anticuerpo anti-Tetra His en acetato sódico 10 mM a pH 4,0 usando una columna Zeba Desalting y se diluyó hasta 25 μ g/mL en el tampón acetato para el acoplamiento de amina. Se inmovilizaron dos celdas de flujo de un chip CM5 con ~9000 UR del anticuerpo anti-Tetra-His después de 20 min de inyección a 5 μ L/min. Como en el experimento previo, se capturó diez veces más Fc γ RI en la superficie de anti-Tetra His para comparar muestras con una unión débil. Se diluyó Fc γ RI humano recombinante 10 μ g/mL en tampón de unión HBS-EP y se inyectó a la celda de flujo 2 durante 1 min a 5 μ L/min para capturar ~1000 UR de receptor en el chip anti-tetra-His. Se inyectó una única concentración de anticuerpo, 100 nM, durante 3 min a 30 μ L/min sobre el receptor capturado y la superficie de control. Posteriormente, se monitorizó la disociación durante tres minutos. Entonces se regeneró la superficie con dos inyecciones de 30 segundos de glicina 10 mM a pH 2,5 a 20 μ L/min. Los resultados de estos experimentos se muestran en la **Figura 9**.

Estos resultados demuestran una notable disminución en la unión de los mutantes glucomanipulados a Fc γ RIIIa o Fc γ RI. H66 S298N/T299A/Y300S en particular ha suprimido casi completamente la unión a ambos receptores. Este mutante se eligió para un análisis más detallado.

5D. Caracterización de la estabilidad usando dicroísmo circular (DC)

Se monitorizó la estabilidad del mutante de anticuerpo S298N/T299A/Y300S por un experimento de termofusión por DC de UV lejano en el que se monitorizó la señal del DC a 216 nm y 222 nm, ya que la temperatura creciente conduce al desplegamiento del anticuerpo (desnaturalización).

Se controló la temperatura por un peltier termoeléctrico (modelo Jasco AWC100) y aumentó a una tasa de 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ desde 25-89 $^{\circ}\text{C}$. Se recogieron los espectros de DC en un espectrofotómetro Jasco 815 a una concentración de proteína de aproximadamente 0,5 mg/mL en tampón PBS en una cubeta de cuarzo (Hellma, Inc) con una longitud de trayectoria de 10 mm. La velocidad de barrido fue 50 nm/min y un paso de datos de 0,5 nm. Se usó un ancho de banda de 2,5 nm con un ajuste de sensibilidad del medio. Se recogieron la señal de DC y la tensión HT de 210-260 nm con intervalos de datos de 0,5 nm y a intervalos de temperatura de 1 $^{\circ}\text{C}$ y se realizaron cuatro barridos duplicados para cada muestra. Los resultados demuestran que tanto delta AB H66 como el mutante H66 S298N/T299A/Y300S presentan comportamientos térmicos similares y tienen aproximadamente la misma temperatura de aparición para la degradación (alrededor 63 $^{\circ}\text{C}$) (**Figura 40**), sugiriendo además que tienen estabilidad comparable.

Ejemplo 6: Análisis funcional de mutantes manipulados en Fc

Se evaluaron mutantes manipulados en Fc mediante un ensayo de proliferación de CMSP y un ensayo de liberación de citocinas. En el ensayo de proliferación de CMSP, se cultivaron CMSP humanas con concentraciones crecientes de anticuerpo terapéutico durante 72 horas, se añadió ^3H -timidina y se recogieron las células 18 horas después. Para el ensayo de reducción de linfocitos T/liberación de citocinas, se cultivaron CMSP humanas con concentraciones crecientes de anticuerpo terapéutico y se analizaron diariamente las cifras de células y la viabilidad (Vi-Cell, Beckman Coulter) en el día 7. También se recogieron sobrenadantes de células, se guardaron a -20 $^{\circ}\text{C}$ y se analizaron en un panel de citocinas 8-plex (Bio-Rad).

Se descongelaron CMSP de donantes normales y se trataron en las siguientes condiciones (todas en medios que contenían complemento): Sin tratar; BMA031, molG2b 10 μ g/mL; OKT3, molG2a 10 μ g/mL; H66, hulG1 deltaAB 10 μ g/mL, 1 μ g/mL y 0,1 μ g/mL; H66, hulG1 S298N/T299A/Y300S 10 μ g/mL, 1 μ g/mL y 0,1 μ g/mL.

Las citocinas se recogieron en el día 2 (D2) y día 4 (D4) para el análisis Bioplex (IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, GM-CSF, IFN γ , TNF α). Las células se tiñeron en el D4 para la expresión de CD4, CD8, CD25 y α TCR.

Los resultados, mostrados en las **Figuras 10-13**, demuestran que H66 S298N/T299A/Y300S se comportó similarmente a H66 deltaAB en todos los ensayos basados en células realizados, que muestra activación mínima de linfocitos T por expresión de CD25, unión a α TCR (con cinética ligeramente diferente a deltaAB) y liberación de citocinas mínima en ambos puntos de tiempo D2 y D4. El mutante S298N/T299A/Y300S eliminó así la función efectora tan eficazmente como la mutación deltaAB.

Ejemplo 7: Preparación y caracterización de una variante de Fc manipulada en el esqueleto de anticuerpo anti-CD52.

Además del anticuerpo anti- α TCR H66, la mutación S298N/Y300S también se manipuló en un esqueleto de anticuerpo anti-CD52 (clon 2C3). Este mutante se examinó entonces para determinar si la modulación de la función efectora observada en el anticuerpo anti- α TCR S298N/Y300S H66 era coherente en otro esqueleto de anticuerpo.

5 **7A. Creación de variantes de glucosilación alterada del anticuerpo anti-CD52 2C3**

En primer lugar, se preparó el ADN de variante de S298N/Y300S 2C3 por mutagénesis QuikChange usando pENTR_LIC_IgG1, y se clonó VH 2C3 WT en el vector mutado por LIC. Se clonaron mutantes de longitud completa en el vector de expresión pCEP4 (-E+I)Dest usando la tecnología Gateway. Las mutaciones se confirmaron posteriormente por secuenciación de ADN y las secuencias se exponen en la Tabla 11. Entonces se transfectaron los

10 mutantes en células HEK293-EBNA en un formato de placa de 6 pocillos y la proteína se purificó de medio acondicionado. Se produjo anticuerpo natural anti-CD52 2C3 en paralelo como control. Se encontró que el nivel de expresión era 0,1 μ g/mL usando SD-PAGE y análisis de transferencia Western (**Figura 15A**). También se midió la expresión de mutantes en medio acondicionado puro por captura de proteína A en Biacore. Se determinó la concentración usando la respuesta de disociación después de una inyección de seis minutos para proteína A

15 inmovilizada. Se usó 2C3 WT producido por CHO diluido en serie en medio de 90 μ g/mL hasta 1,5 ng/mL como una curva patrón. Las concentraciones se calcularon dentro de aproximadamente 0,2 μ g/mL por una curva de calibración usando un ajuste de 4 parámetros. Los niveles de expresión relativa fueron bajos y, en general, están de acuerdo con los datos de transferencia Western (**Figura 15B**).

Tabla 11: Secuencias de anticuerpos del clon anti-CD52 2C3

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia de aminoácidos
28	Cadena ligera anti-CD-52 2C3 WT	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLIYSNGKTYI.NWL LQKPGQSPQRIIYLVSKLDSGVPDRHPSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVVYYCVQGTIILITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCILNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC*
29	Cadena pesada anti-CD-52 2C3 WT	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYWMNWVR QAPGKGLEWVGQIRI.KSNYYATHYAESVKGRFTISRDDS KNSLYIQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFWGQGTITVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVITFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC NVNIIKPSNTKVDKKVEPKSCDKTITCPPCPAPPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSIIEDPEVKFNWYVD GVLEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVTLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVSLTCLVKGIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTITPPVLD SDGSITFLYSKLTVDKSRWQQGNVITCSVMHIALHNHYTQ KSLSLSPGK*

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia de aminoácidos
30	Cadena pesada anti-CD-52 2C3 S298N/Y300S	EVQLVESGGGLVQPGGSI.RI.SCAASGFTFTNTYWMNWVR QAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRITISRDDS KNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFWQGTTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSI.SSVVTVPSSTI.GTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHITCPPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVIINAKTKPREEQYNNTSRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFTSCSVMEALHNHYTQ KSLSLSPGK*

7B. Análisis de glucosilación usando PNGasa F

- 5 Para evaluar los sitios de glucosilación adicionales introducidos por la mutación, se desglucosiló el mutante S298N/Y300S enriquecido con PNGasa F. No demostró cambio aparente en el peso molecular, que indica que no estaba presente hidrato de carbono adicional (**Figura 15**). Se realizaron preparaciones a pequeña escala para purificar estos mutantes para la caracterización adicional y los resultados reconfirmaron que no hubo hidrato de carbono adicional presente en el mutante S298N/Y300S (**Figura 16**).

7C. Propiedades de unión de mutantes del anticuerpo anti-CD52 2C3 a FcγRIIIa humano usando Biacore

- 10 También se usó Biacore para caracterizar la unión al antígeno, FcγRIII, y propiedades de unión de los anticuerpos purificados (véanse las **Figuras 17A-C, 18, y 19A y B**). La variante 2C3 S298N/Y300S se unió fuertemente al péptido CD52 y el sensograma de unión fue indistinguible del control natural, que demuestra que esta mutación no afecta su unión al antígeno (**Figura 17A**).

- 15 Para ensayar la función efectora de Fc, se usó el receptor FcγRIII (Val158) en estudios de unión. Se diluyeron el anticuerpo mutante y de control natural hasta 200 nM y se inyectó en FcγRIIIa capturado con marca HPC4. La unión a FcγRIII fue casi indetectable para el mutante S298N/Y300S, que indicó una pérdida de función efectora por esta variante (**Figura 17B y Figura 19A**). Para ensayar adicionalmente la función efectora de Fc, también se usó el receptor FcγRIII (Phe158) en estudios de unión. Los anticuerpos de control mutantes y naturales se diluyeron hasta 200 nM y se inyectaron en FcγRIIIa capturado con marca HPC4. La unión a FcγRIII fue casi indetectable para el mutante S298N/Y300S, que indica una pérdida de función efectora con la variante Phe158 (**Figura 19B**). Finalmente, se usó Biacore para comparar las propiedades de unión de FcRn de las proteínas purificadas. Se inmovilizaron FcRn-HPC4 de ratón y humano purificado por SEC a un chip CM5 por acoplamiento de amina. Cada anticuerpo se diluyó hasta 200, 50 y 10 nM y se inyectó en los receptores. Se incluyeron Campath, 2C3 WT producido por CHO y Campath tratado con DEPC como controles positivos y negativos. Estos datos muestran que el mutante se une a tanto el receptor FcRn humano como murino con la misma afinidad que el control de anticuerpo natural y que probablemente no tiene alteraciones en su semivida en circulación u otras propiedades farmacocinéticas (véase la **Figura 17C, Figura 18**). Por consiguiente, la mutación S298N/Y300S es aplicable a anticuerpos en general, para reducir o eliminar la función efectora de Fc no deseada, por ejemplo, mediante acoplamiento de receptores Fcγ humanos.

Ejemplo 8: Detección de inmunocomplejos en circulación en el mutante S298N/Y300S.

- 30 También se investigó la detección del inmunocomplejo en circulación usando un ensayo de unión a C1q para el mutante S298N/Y300S y control WT. Se recubrieron placas Costar de alta unión de 96 pocillos durante la noche a 4 °C con 100 µL de Abs 2C3 diluido en serie 2 veces a concentraciones que varían desde 10 - 0,001 µg/mL en tampón de recubrimiento (NaCHO₃ 0,1 M pH 9,2). El análisis de ELISA mostró que la unión a C1q se reduce para el mutante S298N/Y300S en comparación con WT (**Figura 20A**). La unión del Ab anti-Fab a los Abs 2C3 recubiertos confirmó el recubrimiento equivalente de los pocillos (**Figura 20B**).

- 35 **Ejemplo 9: Separación y análisis del mutante S298N/Y300S usando isoelectroenfoque.**

Migró un gel de isoelectroenfoque (IEF) de pH 3-10 para caracterizar los mutantes S298N/Y300S. Se encontró que S298N/Y300S tenía más cargas negativas, y por tanto, probablemente más moléculas de ácido siálico (**Figura 23A**).

Tanto el mutante S298N/Y300S como 2C3 WT mostraron por EM intacta que tenían G0F y G1F como especies de glucosilación dominante (**Figura 23B y D**, respectivamente).

Ejemplo 10: Afinidad de unión al antígeno de S298N/Y300S.

Se usó Biacore para comparar la afinidad de unión al antígeno del Ab anti-CD52 2C3 WT y el mutante S298N/Y300S que se había preparado y se purificó a partir de expresiones de escala más pequeña (**Figura 21**) y más grande (**Figura 22**). Se obtuvieron chips de CM5 inmovilizados con el péptido CD52 741 y el péptido de control 777. Los anticuerpos se diluyeron sucesivamente 2 veces desde 60 hasta 0,2 nM en HBS-EP y luego se inyectaron sobre la superficie del chip durante 3 min seguido por una disociación de 5 min en tampón a un caudal de 50 µL/min. Entonces se regeneró la superficie con un pulso de HCl 40 mM. Estos análisis se realizaron por duplicado y demuestran que el mutante S298N/Y300S y los anticuerpos 2C3 WT muestran unión al péptido CD52 comparable.

Se diseñó una plataforma de cribado de medios para probar las propiedades de unión funcional antes de la purificación para cribar anticuerpos creados durante transfecciones a pequeña escala. Estas pruebas se realizaron usando Octet (**Figura 24A**) para determinar la concentración y usaron biosensores de proteína A y una curva patrón GLD52. Se diluyeron las muestras hasta 7,5 y 2 nM en HBS-Ep para una comparación de unión a CD52 usando Biacore (**Figura 24B**). Los resultados del ensayo de unión a péptidos mostró que tanto el mutante S298N/Y300S como los anticuerpos 2C3 WT tienen unión comparable al péptido CD52. Además, estos análisis demuestran que Octet y Biacore funcionan bien para predecir la unión al antígeno por anticuerpos de transfecciones a pequeña escala.

Ejemplo 11: Preparación de mutantes de glucosilación alterada S298N/Y300S, S298N/T299A/Y300S y N297Q/S298N/Y300S en esqueletos de anticuerpo adicionales.

Además del anticuerpo anti-αβ-TCR y el anticuerpo anti-CD-52 2C3, las mutaciones S298N/Y300S, S298N/T299A/Y300S y N297Q/S298N/Y300S se manipularon en otros esqueletos de anticuerpo para confirmar que el sitio de glucosilación en tándem adicional se podría introducir en secuencias sin relacionar del dominio variable de la cadena pesada. Los mutantes anti-CD-52 12G6 y anti-Her2 alternativamente glucosilados se exponen en las Tablas 12 y 13.

Tabla 12: Secuencias de anticuerpos anti-CD52 clon 12G6

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia de aminoácidos
31	Cadena ligera anti-CD-52 12G6 WT	DIVMTQTPLSLSVTPGPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWV LQKPGQSPQRLIYLVS KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR V EAEDVGVVYYCVQGSHFHTFGQGTKLEIKRTVAAPSVEFPP SDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSITYSLSSITLTLKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
32	Cadena pesada anti-CD-52 12G6 WT	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSNYWMNWVRQ APGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYALSVKGRFTISRDDSKN SLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPIDYWGQGTITVTVSSASTKG PSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHITCPPCPAPPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHIEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFTSCSVMEALHNHYTQKSLSLSP GK*

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia de aminoácidos
33	Cadena pesada anti-CD-52 12G6 S298N/Y300S	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSNYWMNWVRQ APGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKN SLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPIDYWGQGTTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSI.SSVVTVPSSSI.GTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVLEV IINAKTKPREEQYN NTSR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSP GK*
34	Cadena pesada anti-CD-52 12G6 S298N/ T299A/ Y300S	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSNYWMNWVRQ APGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKN SLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPIDYWGQGTTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSI.SSVVTVPSSSI.GTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVLEV IINAKTKPREEQYN NASR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSP GK*
35	Cadena pesada anti-CD-52 12G6 N297Q/ S298N/ Y300S	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSNYWMNWVRQ APGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKN SLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPIDYWGQGTTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVLEV IINAKTKPREEQYN NTSR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSP GK*

Tabla 13: Secuencias de anticuerpos anti-Her2

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia de aminoácidos
36	Cadena ligera anti-Her2 WT	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASFYSGVPSRFSGRSGTDFLTISLQPEDF ATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIIHPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQIDSKDSITYSLSSITLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC*
37	Cadena pesada anti-Her2 WT	EVQLVESGGGLVQPGGSLRI.SCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSI.SI.SPGK*
38	Cadena pesada anti-Her2 S298N/T299A/ Y300S	EVQLVESGGGLVQPGGSLRI.SCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSI.SI.SPGK*

Ejemplo 12. Generación de anticuerpos alterados que contienen restos de glucano reactivos

Para generar anticuerpos que contienen restos de glucano capaces de reaccionar con restos efectores derivatizados, se glucosiló en primer lugar *in vitro* un anticuerpo anti-HER usando glucosiltransferasa y donantes de nucleótidos de azúcar relevantes. Por ejemplo, para introducir los restos de ácido siálico, en primer lugar se galactosilaron anticuerpos donantes con β -galactosiltransferasa, seguido con sialilación con α 2,6-sialiltransferasa según los métodos de Kaneko et al. (Kaneko, Y., Nimmerjahn, F. y Ravetch, J. V. (2006) Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. Science 313, 670-3). La reacción se realizó en una etapa de síntesis de una sola etapa usando β -galactosiltransferasa (50 mU/mg, Sigma) y α 2,6-sialiltransferasa (5 ug/mg, R&D System) con sustratos de nucleótido de azúcar donante, UDP-galactosa (10 mM) y CMP-ácido siálico (10 mM) en tampón MES 50 mM (pH 6,5) que contenía MnCl₂ 5 mM. Se incubó la mezcla de reacción que contenía 5 mg/mL de anticuerpo anti-HER2 durante 48 horas a 37 °C. La sialilación se verificó usando análisis de EM MALDI-TOF de glucanos permetilados liberados del anticuerpo con PNGasa F, análisis del contenido de ácido siálico usando HPLC Dionex y transferencia de lectina con SNA, una lectina específica para ácido α 2,6-siálico.

El análisis de MALDI-TOF de glucanos liberados por tratamiento con PNGasa F del anticuerpo anti-HER2 sialilado indicó que los glucanos nativos se habían remodelado completamente con una estructura biantenaria principalmente monosialilada, A1F (**Figura 32A**) junto con una pequeña cantidad de especies disialiladas. El tratamiento del anticuerpo con cantidades más altas de α 2,6-sialiltransferasa produjo poblaciones más homogéneas de la glucoforma A1F, sugiriendo que la actividad enzimática o la localización de glucanos puede prevenir la sialilación completa. Se determinó que el contenido de ácido siálico era \sim 2 moles por mol de anticuerpo, que está de acuerdo con el glucano A1F como la principal especie de glucoforma (**Figura 32B**). La transferencia de lectina con una lectina SAN, *aglutinina de Sambucus nigra* específica para ácido siálico enlazado en α 2,6, confirmó que el ácido siálico estaba presente en una configuración de enlace α 2,6 (**Figura 32C**).

En conclusión, aunque los glucanos de proteína nativa son algo heterogéneos, la remodelación mediante galactosilo y sialiltransferasas da un anticuerpo casi homogéneo con glucanos biantenarios monosialilados, pero completamente galactosilados (A1F). La introducción de solo \sim 1 ácido siálico en los dos aceptores de galactosa en cada glucano ramificado puede ser debida a la accesibilidad limitada de una de las galactosas de glucanos que se entierran frecuentemente en el anticuerpo o las interacciones no covalentes de los glucanos con la superficie de proteína.

Ejemplo 13. Método alternativo: Oxidación de anticuerpos alterados que contienen restos de glucano reactivos

Se investigó la oxidación de anticuerpo anti-HER2 sialilado con diversas concentraciones de peryodato (0,25 a 2 mM). El anticuerpo sialilado se intercambió en primer lugar de tampón en Tris-HCl 25 mM (pH 7,5) que contenía EDTA 5 mM, seguido por intercambio de tampón con tampón PBS. Entonces se aplicó la mezcla de anticuerpo tamponada a la columna de proteína A Sepharose pre-equilibrada con tampón PBS. Después de que la columna se lavara con 15 volúmenes de columna de PBS, 15 volúmenes de columna de PBS que contenían EDTA 5 mM y 30 volúmenes de columna de PBS, entonces se eluyó con tampón citrato-fosfato 25 mM (pH 2,9). Los eluatos se neutralizaron inmediatamente con tampón fosfato dibásico y el anticuerpo se concentró usando Amicon ultra de Millipore. Tras la purificación, entonces se oxidó el anticuerpo anti-HER2 sialilado con peryodato de sodio (Sigma) en tampón acetato sódico 100 mM (pH 5,6) sobre hielo en la oscuridad durante 30 minutos, y la reacción se extinguió con 3 % de glicerol sobre hielo durante 15 minutos. Se desaló el producto y se intercambió en acetato sódico 100 mM (pH 5,6) por 5 rondas de ultrafiltración sobre Amicons de 50 kDa. La **Figura 33A** muestra el análisis del contenido de ácido siálico de anticuerpo sialilado valorado con diversas cantidades de peryodato. Se logró la oxidación completa de los restos de ácido siálico a una concentración de peryodato por encima de 0,5 mM. Una concentración de peryodato de tan solo 0,5 mM fue suficiente para oxidar completamente el ácido siálico introducido. Por consiguiente, se eligió una concentración 1 mM de peryodato para la oxidación de anticuerpo sialilado para la conjugación con fármaco.

La oxidación puede tener efectos adversos sobre la integridad de un anticuerpo. Por ejemplo, se conoce que la oxidación de restos de metionina, que incluyen Met-252 y Met-428, situados en la región CH3 de Fc, próxima al sitio de unión a FcRn, afecta la unión a FcRn, que es crítica para prolongar la semivida del anticuerpo en suero (Wang, W., et al. (2011) Impact of methionine oxidation in human IgG1 Fc on serum half-life of monoclonal antibodies. Mol Immunol 48, 860-6). Por consiguiente, para examinar los posibles efectos secundarios de la oxidación por peryodato en restos de metionina (por ejemplo, Met-252) críticos para la interacción de FcRn, se determinó el estado de oxidación del anticuerpo sialilado por análisis de EM/CL de un digesto de péptido de tripsina. Este análisis reveló \sim 30 % de oxidación de Met-252 y < 10 % de oxidación de Met-428 después del tratamiento de trastuzumab sialilado con peryodato 1 mM. Para determinar el impacto de este grado de oxidación de la metionina sobre la unión a FcRn, se evaluó la cinética de unión a FcRn para cada anticuerpo usando resonancia de plasmones superficiales (BIACORE). Este análisis reveló que el estado de oxidación se correlacionó con una minipérdida en la unión a FcRn (12 % y 26 % de reducción con respecto FcRn de ratón y humano, véanse las **Figuras 33B y 33C**, respectivamente). En particular, se ha informado que una reducción de ~ 25 % en K_a para FcRn humano no tiene efecto sobre la semivida en suero en un ratón transgénico para FcRn humano, puesto que un único sitio FcRn intacto en cada anticuerpo es suficiente para proporcionar funcionalidad y la ventaja FC (Wang et al., ídem).

En resumen, estos datos indican que la introducción de restos de ácido siálico sensibles al peryodato por tratamiento con sialiltransferasa permite el uso de concentraciones mucho más bajas de peryodato, dando como resultado efectos secundarios reducidos sobre las interacciones anticuerpo-FcRn y la integridad del anticuerpo como se evaluó por agregación (≤ 1 %).

También se puede oxidar específicamente la galactosa en un mutante de anticuerpo hiperglucosilado usando galactosa oxidasa para generar un grupo aldehído para la conjugación. Para confirmar este enfoque, se concentró un anticuerpo anti-TEM1 A114N hasta 13-20 mg/mL y luego se trató con 20 mU/mg de sialidasa en PBS durante 6 horas a 37 °C. Entonces se oxidó el producto desialado con galactosa oxidasa ("GAO"), primero con 5 ug de GAO/mg de proteína durante la noche a 37 °C, seguido por la adición de 2 ug de GAO/mg de proteína e incubación durante 5 horas adicionales. Se añadió acetato sódico para ajustar el pH hasta 5,6 (0,1 v/v, pH 5,6), y se añadió DMSO para lograr una concentración de reacción final de 16 %, se añadieron antes de la conjugación. El anticuerpo anti-HER A114N mutante de hiperglucosilación (15 mg/mL) fue similarmente desialilado con sialidasa (20 mU/mg) y se oxidó con 5 ug de GAO por mg de proteína en una única reacción durante la noche a 37 °C.

Ejemplo 14. Síntesis de restos efectores reactivos

Para facilitar la conjugación con las glucoformas de anticuerpo derivatizadas con aldehído, se derivatizaron restos efectores de fármaco candidato (por ejemplo, monometil auristatina E (MMAE) y dolastatina 10 (Dol10)) con aminooxi-cistamida para contener grupos funcionales (por ejemplo, aminooxi-cis) específicamente reactivos con el aldehído.

- 5 Brevemente, para generar aminooxi-cistamida como material de partida, se añadió S-tritil-L-cisteinamida (362 mg, 1 mmol) a 3 mL de una disolución de DMF de éster de *N*-hidroxisuccinimida de ácido t-BOC-aminooxiacético (289 mg, 1 mmol). La reacción se completó después de 3 h como fue evidente a partir del análisis de HPLC. La mezcla de reacción se diluyó posteriormente con 30 mL de diclorometano y se lavó con disolución 0,1 M de bicarbonato sódico (2 × 20 mL), agua (2 × 20 mL) y salmuera (2 × 20 mL). La disolución se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró a sequedad. A este residuo seco se añadió 3 mL de TFA seguido por 150 µL de trietilsilano. La disolución resultante se precipitó en t-butil metil éter y el proceso se repitió tres veces. Después de la filtración, el residuo se secó a presión reducida dando 205 mg de un sólido blanquecino (67 % de rendimiento). El compuesto se usó para la siguiente etapa sin más purificación.

- 15 Para generar MMAE derivatizado con aminooxi (aminooxi-Cys-MC-VC-PABC-MMAE), se combinó 30,1 mg de aminooxi-cistamida (0,098 mmoles, 2 eq.) con 64,6 mg de MC-VC-PABC-MMAE (0,049 mmoles) y 100 µL de trietilamina en 3 mL de DMF. La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos, tiempo por el cual la reacción estaba completa según el análisis de HPLC. El compuesto se purificó por HPLC preparativa dando 45 mg (62 %) del producto deseado como un sólido blanquecino. El análisis de HPLC de fase inversa sugirió que la pureza del compuesto era >96 %. ESI calculada para C73H116N14O18S (MH)⁺ 1509,8501; hallada, m/z 1509,8469.

- 20 Para generar Dol10 derivatizado con aminooxi (aminooxi-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Dol10), se combinaron 7,4 mg (0,024 mmoles, 3 eq.) de aminooxi-cistamida, 12 mg (0,008 mmoles) de MC-VC-PABC-PEG8-Dol10 y 30 µL de trietilamina en 3 mL de DMF. La reacción se completó en el plazo de 15 minutos según el análisis de HPLC. La purificación por HPLC preparativa resultó en 6,2 mg (46 %) del producto deseado como un sólido blanquecino. El análisis de HPLC de fase inversa sugiere que la pureza del compuesto es >96 %. ESI calculada para C80H124N16O19S2 (MH)⁺ 1678,0664; hallada, m/z 1678,0613.

Ejemplo 15. Conjugación mediada por ácido siálico (SAM) de restos efectores reactivos

- 30 Tras la desalación, se combinaron los conectores de fármaco del Ejemplo 13 con los anticuerpos sialilados oxidados del Ejemplo 12 con 75 % de DMSO (0,167 v/v) a una concentración de 25 mM para lograr una relación molar 24:1 entre conector de fármaco y anticuerpo y una concentración final de anticuerpo de 5 mg/mL. La mezcla se incubó durante la noche a temperatura ambiente. Se secuestraron los conectores de fármaco no incorporados y cualquier fármaco libre usando BioBeads. El producto se sometió a intercambio de tampón en tampón de histidina-Tween usando columnas PD-10 y se esterilizó por filtración. Se determinaron los niveles de endotoxina y se logró menos de 0,1 UE/mg de ADC para el estudio *in vivo*.

- 35 La **Figura 34A-C** muestra una cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) de diferentes anticuerpos sialilados (anti-FAP B11 y G11 y el anticuerpo anti-HER2 del Ejemplo 13) glucoconjugados con AO-MMAE. También se conjugó el anticuerpo contra HER2 sialilado con el conector de fármaco, AO-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Dol10 (**Figura 34D**). Este análisis revela que existen principalmente uno o dos conjugados de fármaco por anticuerpo con una relación entre fármaco y anticuerpo (DAR) que varía desde 1,3-1,9. Es probable que el aumento de tiempo de retención del glucoconjugado de Dol10 (**Figura 34D**) en comparación con el glucoconjugado de MMAE (**Figura 34C**) sea debido a la mayor hidrofobia de Dol10.

- 40 También se realizó análisis de CL-EM con un anticuerpo anti-HER conjugado con dos conectores de fármaco diferentes (AO-MMAE o AO-PEG8-Dol10) a una escala de 30 mg. Este análisis mostró valores de DAR similares de 1,7 y 1,5 tras la conjugación, que es comparable al análisis de HIC. La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) mostró niveles muy bajos (1 %) de agregados en estos conjugados.

Ejemplo 16. Conjugación mediada por galactosa (GAM) de restos efectores reactivos

- Se conjugó el aldehído de galactosa generado con galactosa oxidasa en el anticuerpo mutante de hiperglicosilación anti-TEM1 A114N como se describe en el Ejemplo 13 con un exceso molar de 24 veces del conector de fármaco aminooxi-MC-VC-PABC-MMAE con respecto al anticuerpo por incubación durante la noche a 25 °C, dando un conjugado de ADC con una DAR de 1,72.

- 55 Al anticuerpo anti-HER tratado con galactosa oxidasa preparado como se describe en el Ejemplo 13 se añadió un décimo de volumen de reacción de acetato sódico 1 M, pH 5,6, para ajustar el pH a 5,6 y se añadió DMSO para hacer la concentración final del 14 % antes de añadir 24 eq. del conector de fármaco de aminooxi MC-VC-PABC-MMAE. Las reacciones se incubaron durante la noche a temperatura ambiente. Se secuestraron el fármaco libre y el conector de fármaco con BioBeads y se intercambió el tampón del producto por SEC (65 % de rendimiento). El conjugado de producto se analizó por HIC. Como se muestra en la **Figura 35**, se conjugó AO-MMAE con ~60 % de las moléculas.

Ejemplo 17. Ensayos de proliferación de células ADC *in vitro*

También se comparó la actividad *in vitro* de las moléculas glucoconjugadas anti-HER y anti-FAP con conjugados de tiol correspondientes que contenían el mismo resto de fármaco unido por enlaces tiol con las cisteínas de la región bisagra del mismo anticuerpo donante. Los conjugados de tiol contuvieron aproximadamente dos veces el número de fármacos por anticuerpo (DAR) que los glucoconjugados. Se realizó conjugación basada en tiol como se describe por Stefano et al. (Methods in Molecular Biology 2013, en prensa). Entonces se emplearon las líneas celulares Her2+ SK-BR-3 y Her2- MDA-MB-231 para evaluar la eficacia relativa de cada ADC. Los resultados de este análisis se presentan en la Tabla 15 a continuación.

Tabla 15. Comparación de CE₅₀ de glucoconjugados y conjugados de tiol

	DAR	CE ₅₀ (ng/mL)
Anti-HER-MC- VC-P ABC-MMAE (Tiol MMAE)	3,8*	2,3
Anti-HER-AO-Cys-MC- VC-PABC-MMAE (Gluco MMAE)	1,7*	4,7
Anti-HER-MC-VC-PABC-PEG8-Dol10 (Tiol Dol10)	3,9*	0,45
Anti-HER-AO-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Dol10 (Gluco Dol10)	1,5*	0,97
Anti-FAP B11-MC-VC-PABC-MMAE (Tiol MMAE), CHO+FAP	3,3**	382,4
Anti-FAP B11-AO-Cys-MC-VC-PABC-MMAE (Gluco MMAE), CHO+FAP	1,5**	682,4
Nota: * DAR determinada por CL-EM; ** DAR determinada por HIC		

La **Figura 36A-D** muestra una comparación de la potencia *in vitro* del glucoconjugado anti-HER y su conjugado de tiol homólogo. Se determinó la viabilidad celular después de 72 horas de exposición de los conjugados a las células que expresan el antígeno Her2 (SK-BR-3) (**Figura 36A y C**) o células que no expresan (MDA-MB-231) (**Figura 36B y D**). Los ADC contuvieron MMAE o PEG8-Dol10 unido a los glucanos ("gluco") o por química convencional a las cisteínas de la región bisagra ("tiol"). Como se muestra en la **Figura 36A y C**, se observó CE₅₀ ~2 veces menor para los conjugados de tiol en comparación con los glucoconjugados, que está de acuerdo con DAR 2 veces más alta en los primeros que en los últimos. No se observó toxicidad con la línea celular Her2- con ningún anticuerpo hasta 100 ug/mL.

También se observaron tendencias similares en la proliferación celular para el ADC preparado con anticuerpos contra un antígeno de tumor (FAP) que se expresa altamente por fibroblastos del estroma reactivos en cánceres epiteliales que incluyen cáncer de colon, pancreático y de mama (Teicher, B. A. (2009) Antibody-drug conjugate targets. Curr Cancer Drug Targets 9, 982-1004). Estos conjugados se prepararon nuevamente conjugando conector de fármaco de aminooxi MMAE o conector de fármaco de maleimido MMAE con glucanos o un grupo tiol. Los ensayos de proliferación celular de estos conjugados mostraron que la CE₅₀ del conjugado de tiol tenía una potencia ~100 veces mayor en las células CHO transfectadas con FAP humano que en las mismas células que carecen de expresión de FAP como se representa en la **Figura 37**, que muestra una comparación de la potencia *in vitro* del glucoconjugado anti-FAP B11 y el conjugado de tiol. Se determinó la viabilidad celular tras la exposición de los conjugados a células CHO transfectadas con o sin antígeno FAP. Los ADC contuvieron MMAE unido a los glucanos ("gluco") o por química convencional a las cisteínas de la región bisagra ("tiol"). Obsérvese que la CE₅₀ ~2 veces menor para el tiol en comparación con los glucoconjugados está de acuerdo con las cantidades relativas de fármaco administradas por anticuerpo que supone eficiencias similares para la unión a diana e internalización en células CHO que expresan antígeno. En paralelo, se ensayó un glucoconjugado de ADC anti-FAP (B11) con una DAR de 1,5 como se describe previamente y mostró una de CE₅₀ ~2 veces mayor que el conjugado de tiol comparador (DAR 3,3).

Como se muestra en la **Figura 41**, se observaron tendencias similares en el ensayo de proliferación celular para el ADC preparado con el anticuerpo anti-HER que lleva la mutación de hiperglicosilación A114N y AO-MMAE como se describe en el Ejemplo 16, cuando se ensayó en células que expresan SK-BR-3 o células MDA-MB-231. El glucoconjugado A114N muestra claramente toxicidad celular potenciada contra la línea celular que expresa Her2 con respecto a la línea que no expresa. La toxicidad relativa comparada con el glucoconjugado SialT preparado con el mismo anticuerpo está de acuerdo con la carga de fármaco más baja de esta preparación.

También se realizó un ensayo de proliferación celular para ADC preparado con el anticuerpo anti-TEM1 que lleva la mutación de hiperglicosilación A114N y AO-MMAE preparado como se describe en el Ejemplo 16. Se observó mayor toxicidad con las líneas celulares SJS-1 y A673 que expresan TEM1 en comparación con la línea MDA-MB-231 que no expresa. El nivel de toxicidad comparado con un conjugado de tiol convencional con el mismo anticuerpo estuvo en consonancia con la carga de fármaco (DAR) de esta preparación.

	SJSA-1	A673-RPMI	A673-DMEM-RPMI	MDA-MB-231
	CI50	CI50	CI50	CI50
Anti-TEM1 A114N-AO-MC-VC-PABC-MMAE	3 µg/mL	3,2 µg/mL	2,2 µg/mL	40 µg/mL
Anti-TEM1-MC-VC-PABC-MMAE	4 µg/mL	1 µg/mL	0,9 µg/mL	20 µg/mL

En resumen, la conjugación específica de sitio de los fármacos mediante los glucanos con conectores escindibles produce ADC con toxicidades y eficacia *in vitro* que son equivalentes a los conjugados convencionales basados en tiol, como se demuestra usando diferentes anticuerpos y diferentes conectores de fármaco. Además, por debajo de peryodato 2 mM, el nivel de conjugación del fármaco se correlaciona con la reducción de ácido siálico. El aumentar la concentración de peryodato por encima de 2 mM produce poco beneficio, como es de esperar de la conversión completa del ácido siálico en la forma oxidada. Sin embargo, en todas las condiciones, el número de fármacos por anticuerpo fue ligeramente inferior al contenido de ácido siálico, que indica que algunos de los ácidos siálicos oxidados puede no estar similarmente disponible para el acoplamiento, ya sea debido a que está enterrado o de otro modo debido al impedimento estérico que surge de la mayor parte del conector de fármaco.

Ejemplo 18. Caracterización *in vivo* de conjugados de anticuerpo-fármaco

También se evaluó la eficacia de glucoconjugados anti-HER en un modo de xenoinjerto de células tumorales Her2+ y se comparó con los comparadores de conjugados de tiol que tienen DAR ~2 veces mayor. Se implantaron ratones beis/SCID con células tumorales SK-OV-3 Her2+ que se dejó que establecieran tumores de ~150 mm³ antes del inicio del tratamiento. Se inyectaron ADC a 3 o 10 mg/kg de dosis través de la vena de cola en los días 38, 45, 52 y 59. Hubo ~10 ratones por grupo. Se midió el volumen del tumor de ratones en diferentes grupos y se registró su supervivencia. La curva de supervivencia se representó basándose en el método de Kaplan-Meier.

La **Figura 38A-D** muestra una comparación de la eficacia *in vivo* de los glucoconjugados anti-HER y conjugados de tiol en un modelo de xenoinjerto de célula tumoral Her2+. Se administraron ratones beis/SCID implantados con células tumorales SK-OV-3 Her2+ con glucoconjugados que contenían MMAE (**Figura 38A y B**) y PEG8-Dol10 (**Figura 38C y D**) o comparadores de conjugados de tiol con un DAR ~2 veces mayor. La cinética del crecimiento tumoral de los conjugados de MMAE se muestra en la **Figura 38A**. En este caso, el glucoconjugado mostró una eficacia significativamente más alta que el anticuerpo desnudo solo (negro), pero inferior a un comparador de conjugado de tiol que tiene una DAR ~2 veces más alta (verde). El glucoconjugado de MMAE mostró una regresión tumoral significativa y un retraso de ~20 días en el crecimiento tumoral (**Figura 38A**) y un aumento de ~2 veces en el tiempo de supervivencia de la primera dosis (**Figura 38B**). El conjugado de tiol-MMAE mostró supresión tumoral casi completa a la misma dosis de ADC (10 mg/kg).

También se determinó la eficacia *in vivo* de un glucoconjugado de PEG8-Dol10 ("Gluco Dol10") y un comparador de conjugados de tiol con una DAR ~2 veces más alta ("Tiol Dol10") en el mismo modelo de xenoinjerto de células tumorales Her2+. Ambos conjugados mostraron eficacia más baja que los conjugados de MMAE como se describió previamente. Sin embargo, el glucoconjugado de aminooxi-PEG8-Dol10 ("Gluco Dol10") a 10 mg/kg mostró un retraso de 15 días en el crecimiento tumoral (**Figura 38C**) y un aumento de ~20 días (1,7 veces) en el tiempo de supervivencia tras la primera administración (**Figura 38D**). El conjugado de tiol fue más eficaz a la misma dosis, que muestra un aumento de 2 veces en la supervivencia. A una dosis más baja (3 mg/kg), el conjugado de tiol mostró una menor eficacia que el glucoconjugado a 10 mg/kg. Esta dosis corresponde a 80 umoles del fármaco PEG8-Dol10 por kg de dosis, en comparación con 110 umoles del fármaco PEG8-Dol10 por kg de dosis para el glucoconjugado.

Estos datos demuestran que la conjugación de fármacos específica del sitio sobre ácido siálico de glucanos de anticuerpo da moléculas con potencia comparable a la de los ADC generados por la química basada en tiol. La eficacia *in vivo* algo más baja procede probablemente del menor número de fármacos que son llevados por cada anticuerpo a las células tumorales por la internalización de cada antígeno unido a anticuerpo. Aunque los presentes inventores no han comparado estos glucoconjugados con conjugados de tiol de la misma DAR, la eficacia observada a diferentes dosis de los dos ADC que representan niveles comparables de fármaco administrado muestra que los glucoconjugados tienen eficacia intrínseca comparable a sus homólogos de tiol, que no indica efecto perjudicial de la conjugación en este sitio. Además, una dosis de 10 mg/kg del glucoconjugado Dol10 que introdujo solo 28 % más de fármaco proporcionó un aumento de 2 veces en la supervivencia con respecto al conjugado de tiol (a 3 mg/kg), que sugiere que estos conjugados pueden incluso proporcionar eficacias superiores a la misma DAR. Dada la aparente limitación en la incorporación de ácido siálico en glucanos nativos, se podría lograr mayor carga de fármaco por varias estrategias diferentes que incluyen el uso de conectores de fármaco ramificados o la introducción de sitios de glucosilación adicionales y el uso del mismo método.

Ejemplo 19. Conjugación de restos de direccionamiento

La **Figura 42** demuestra el esquema global para la conjugación de restos de direccionamiento con hidratos de carbono existentes o sitios de glucosilación manipulados. Esta conjugación se puede realizar mediante la unión de

neoglucanos, glucopéptidos u otros restos de direccionamiento a anticuerpos sialilados oxidados (**Figuras 43 y 44**). Restos adecuados para la conjugación pueden incluir los que contienen conectores de aminooxi (**Figura 45 y 46**).

Ejemplo 20. Conjugación mediante ácido siálico en glucanos de Fc nativos

Se conjugó manosa-6-P hexamanosa aminooxi con un anticuerpo policlonal o anticuerpo monoclonal específicamente dirigido al receptor de Man-6-P. Los análisis de SDS-PAGE y MALDI-TOF de la conjugación del anticuerpo policlonal de conejo anti-receptor de Man-6-P con Man-6-P hexamanosa aminooxi se muestran en la **Figura 47**. La **Figura 48** representa los resultados de los experimentos de resonancia de plasmones superficiales usados para evaluar la unión de los anticuerpos IgG policlonales de conejo de control y anti-receptor de Man-6-P conjugados con Man-6-P hexamanosa con el receptor de M6P. Los análisis *in vitro* de este anticuerpo conjugado demuestran la elevada captación en tanto líneas celulares HepG2 (carcinoma hepatocelular de hígado de *Homo sapiens*) como RAW (leucemia murina de *Mus musculus*) (**Figura 49**). Los cultivos se tiñeron con anticuerpo anti-conejo-Alexa 488 contrateñido con DAPI.

Los anticuerpos conjugados con restos M6P o lactosa aminooxi se probaron adicionalmente mediante SDS-PAGE y transferencia de lectina y se compararon con anticuerpos sin conjugar (**Figura 50**). Los análisis de proteína intacta por MALDI-TOF de los anticuerpos de control y conjugados demuestran que los conjugados tienen aproximadamente dos restos glucano por anticuerpo, mientras que los anticuerpos de control no tienen ninguno (**Figura 51**).

Ejemplo 21. Conjugación mediante ácido siálico con restos de cisteína de bisagra en anticuerpo

Se conjugó manosa-6-P hexamanosa maleimida con un anticuerpo policlonal o anticuerpo monoclonal que se dirige específicamente al receptor de Man-6-P.

Se examinó la conjugación de un anticuerpo policlonal con Man-6-P hexamanosa maleimida mediante cisteínas bisagra mediante SDS-PAGE, transferencia de lectina y cuantificación de M6P (para determinar el número de glucanos conjugados por anticuerpo) (**Figura 52**). También se examinó la conjugación de un anticuerpo policlonal con lactosa maleimida mediante el uso de SDS-PAGE y la cuantificación de galactosa del anticuerpo de control, anticuerpo conjugado y filtrado se muestran en la **Figura 53**. Se observó poco aumento de la agregación en anticuerpos policlonales conjugados con cisteína bisagra por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) (**Figura 55**).

También se examinó la conjugación de un anticuerpo monoclonal con Man-6-P hexamanosa maleimida mediante cisteínas bisagra mediante SDS-PAGE y la cuantificación de glucanos (para determinar el número de glucanos conjugados por anticuerpo) (**Figura 54**). Se observó poco aumento de la agregación en anticuerpos policlonales conjugados con cisteína bisagra por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) (**Figura 56**).

También se examinó la conjugación de bisM6P hexasacárido con anticuerpos policlonales y monoclonales mediante glucanos nativos de Fc o disulfuros bisagra mediante PAGE nativa (**Figura 60**).

Ejemplo 22. Preparación de anticuerpo monoclonal sialilado y conjugación con un glucopéptido o glucopéptido trigalactosilado

Se modificó con sialidasa y galactosiltransferasa un anticuerpo monoclonal de ratón mutante con una mutación STY (NNAS) para la preparación de glucanos trigalactosilados principalmente nativos (2 glucanos por anticuerpo). También se sialiló el mismo mutante con sialiltransferasa y se conjugó con un glucopéptido usando el enfoque de SAM. Se examinó el contenido de ácido siálico de los anticuerpos modificados con enzima (**Figura 57**). Además, se examinó el análisis de MALDI-TOF de los glucanos liberados de NNAS de control y desialilado/galactosilado (**Figura 58**), así como los glucanos liberados de NNAS de control y sialilado (**Figura 59**). Se muestran SDS-PAGE (4-12 % de NuPAGE) y transferencia de lectina de NNAS modificado con enzima y conjugado en la **Figura 61**. También se midió la cuantificación terminal de galactosa para el anticuerpo NNAS de control, anticuerpo NNAS desialilado/galactosilado y anticuerpo NNAS conjugado (**Figura 62**).

Ejemplo 23. Preparación de lactosa maleimida α 2,3 sialilada usando un enfoque de quimioenzimas y posterior conjugación con IgG de conejo no inmune mediante disulfuros bisagra.

Como las proteínas de unión a hidrato de carbono (incluyendo proteínas Siglec) prefieren la unión multivalente para una fuerte interacción, los glucanos monosialilados en un anticuerpo dado no pueden proporcionar densidad de ácido siálico suficiente para otras proteínas Siglec. Por tanto, se investigó un enfoque de conjugación de disulfuro bisagra para introducir múltiples copias de glucanos sialilados. Para producir glucanos sialilados para la conjugación, se sialiló lactosa maleimida (5 mg) *in vitro* con α 2,3 sialiltransferasa de *Photobacterium damsela* en tampón Tris (pH 7,5), durante 2 horas a 37 °C. Se incubó un glucano de control sin sialiltransferasa y se comparó con los glucanos originales. El análisis de MALDI-TOF mostró que la incubación de lactosa maleimida sin enzima en tampón Tris (pH 7,5) durante 2 horas a 37 °C no cambió el peso molecular esperado de la molécula, que sugiere que la condición examinada no dio como resultado la hidrólisis de maleimida. El análisis de MALDI-TOF y HPLC Dionex de glucanos modificados con α 2,3 sialiltransferasa indica la presencia de sialil-lactosa, aunque no como pico principal (datos no mostrados). Por tanto, la sialil-lactosa maleimida se purificó adicionalmente usando columnas QAE-Sepharose y cada fracción se analizó posteriormente usando MALDI-TOF y HPLC Dionex. Estos análisis indicaron que la sialil-lactosa maleimida

existió como especie principal en el eluato de NaCl 20 mM de la columna QAE (**Figura 63**). Se estimó la cantidad de glucanos sialilados purificados usando análisis de cuantificación de ácido siálico de las muestras, que indica una recuperación de ~1,8 mg de sialil-lactosa maleimida.

Se probó la posterior conjugación de un anticuerpo policlonal de conejo con esta sialil-lactosa maleimida usando química de tiol. Se redujo un anticuerpo IgG de conejo (1 mg) con TCEP a un exceso molar de 4 (con respecto al anticuerpo) durante 2 horas a 37 °C antes de conjugarse con un exceso molar de 24 de sialil-lactosa durante 1 hora a temperatura ambiente. Entonces se intercambió el tampón del conjugado en PBS para el análisis en SDS-PAGE (**Figura 64, A**). También se realizó la cuantificación de ácido siálico usando HPLC Dionex (**Figura 64, B**). Se trataron las alícuotas de conjugado de control y de tiol con o sin sialidasa (1 U por mg) durante la noche a 37 °C antes de que los sobrenadantes se recuperaran por filtración (10 kDa de MWCO). Se midió el contenido de ácido siálico de los sobrenadantes y se comparó con muestras tratadas sin sialidasa. Existen aproximadamente 4 restos de α 2,3 sialil-lactosa acoplados por anticuerpo.

Ejemplo 24. Preparación de α 2,6 sialil-lactosa maleimida por sialilación de lactosa maleimida y conjugación con disulfuros bisagra de un anticuerpo policlonal de conejo mediante enlaces α 2,3 o α 2,6 dando como resultado alta sialilación

Se investigó la conjugación de múltiples copias de glucanos α 2,3- o α 2,6-sialilados con los disulfuros bisagra de un anticuerpo policlonal de conejo. Puesto que la α 2,3 sialil-lactosa maleimida se produjo satisfactoriamente usando un enfoque de quimioenzimas (véase anteriormente, Ejemplo 23), se usó un método similar para producir α 2,6 sialil-lactosa maleimida (minimodificaciones del protocolo incluyeron el uso de una sialiltransferasa diferente). Para producir glucano α 2,6 sialilado para la conjugación, se sialiló lactosa maleimida (~5 mg) *in vitro* con 0,5 U de una α 2,6 sialiltransferasa bacteriana de *Photobacterium damsela* en tampón Tris (pH 8) durante 1 hora a 37 °C. Después de la reacción enzimática, el producto se aplicó a una columna de QAE-Sepharose. La columna se lavó con 10 fracciones de 1 mL de Tris 2 mM (pH 8), 5 fracciones de 1 mL de tampón Tris que contenía NaCl 20 mM y 5 fracciones de 1 mL de tampón Tris que contenía NaCl 70 mM. Se analizaron las alícuotas de cada fracción usando HPLC Dionex junto con patrones de lactosa y α 2,6 sialil-lactosa. Los perfiles de oligosacáridos de los patrones y una de las fracciones eluidas se muestran en la **Figura 65 (A-D)**. También se analizaron las fracciones que contenían α 2,6 sialil-lactosa maleimida y se confirmaron por MALDI-TOF. El glucano en una de las fracciones se puede observar en la **Figura 66**.

Entonces se estimó la cantidad de α 2,6 sialil-lactosa maleimida purificada usando el análisis de cuantificación de ácido siálico que indicó una recuperación de ~1,5 mg de sialil-lactosa maleimida.

Una vez se preparó el glucano, se probó la conjugación de anticuerpo con α 2,6 sialil-lactosa maleimida o α 2,3 sialil-lactosa maleimida usando química de tiol. Se intercambió de tampón un anticuerpo IgG policlonal de conejo (1 mg) y se redujo con TCEP en un exceso molar de 4 (con respecto al anticuerpo) durante 2 horas a 37 °C. Entonces se redujo a la mitad el anticuerpo reducido: una porción se conjugó con exceso molar de 24 de α 2,6 sialil-lactosa maleimida y la otra con α 2,3 sialil-lactosa maleimida durante 1 hora a temperatura ambiente. Se intercambiaron de tampón los dos conjugados en PBS antes del análisis de SDS-PAGE (**Figura 67A**) y la cuantificación de ácido siálico usando HPLC Dionex (**Figura 67B**). Se usó cuantificación de ácido siálico para estimar el número de glucanos conjugados. Se trataron alícuotas de anticuerpo de control y anticuerpo conjugado con tiol con o sin sialidasa (1 U por mg) durante la noche a 37 °C antes de que se recuperaran los sobrenadantes mediante filtración (MWCO de 10 kDa). Se midió el contenido de ácido siálico de los sobrenadantes y se comparó con muestras tratadas sin sialidasa (control). El análisis demuestra que por este método se conjugaron aproximadamente 7 glucanos (o glucanos α 2,3- o α 2,6-sialil-lactosa) con el anticuerpo policlonal.

Ejemplo 25. PEGilación de NNAS usando química de GAM

Se galactosiló y desialiló un anticuerpo monoclonal mutante NNAS de ratón (S298N/T299A/Y300S), generando un anticuerpo monoclonal NNAS de Gal sin degradación de proteasa. Este anticuerpo se modificó con galactosa oxidasa (GAO) para generar galactosa aldehído. Entonces se conjugó la galactosa aldehído con 2 o 5 kDa de aminooxi polietilenglicol (PEG). La **Figura 68** representa la caracterización de anticuerpos mutantes NNAS de control y modificados con enzima (desialilados/galactosilados) usando SDS-PAGE y transferencia de lectina. La **Figura 69** representa la caracterización mediante SDS-PAGE reductora de la PEGilación de un anticuerpo de control y NNAS de Gal con diversas cantidades de galactosa oxidasa. Estos resultados demuestran que NNAS de Gal se puede PEGilar eficientemente con cantidades significativas de mono-, bi- y tri-PEG conjugado por cadena pesada. La **Figura 71** representa la caracterización mediante SDS-PAGE reductora de la PEGilación de un anticuerpo de control y NNAS de Gal con diverso exceso molar de PEG con respecto al anticuerpo. Los barridos de Protein Simple que caracterizan la PEGilación de los anticuerpos demuestran que se conjugan aproximadamente 1,5-1,7 restos de PEG por cadena pesada (o aproximadamente 3-3,4 PEG por anticuerpo) (**Figuras 70 y 72**).

Ejemplo 26. PEGilación de NNAS usando química de GAM

Se galactosiló un anticuerpo NNAS con 50 mU/mg de galactosiltransferasa y posteriormente se desialiló con 1 U/mg de sialidasa en tampón MES 50 mM (pH 6,5). Entonces se trataron fetuina desialilada y NNAS, así como NNAS galactosilado, con galactosa oxidasa (57 mU/mg)/catalasa en presencia o ausencia de acetato de cobre 0,5 mM antes

de la conjugación con un exceso molar de 25 de 5 kDa de aminooxi PEG (**Figura 74, A**). En otro experimento, se trató NNAS galactosilado con galactosa oxidasa (57 mU/mg)/catalasa en presencia de acetato de cobre 0, 0,02, 0,1 y 0,5 mM antes de la conjugación con un exceso molar de 25 de 5 kDa de aminooxi PEG (**Figura 74, B**). El anticuerpo oxidado con galactosa oxidasa en presencia de acetato de cobre mostró un mayor grado de PEGilación que el mismo anticuerpo que reaccionó con galactosa oxidasa en ausencia de acetato de cobre. Se observaron niveles de PEGilación significativamente más altos cuando la conjugación se realizó en una reacción que contenía sulfato de cobre en concentraciones superiores a 0,1 mM.

Ejemplo 27. Modificación de Herceptin natural y mutante usando sialidasa/galactosiltransferasa

Se modificaron enzimáticamente anticuerpos Herceptin naturales y mutantes (A114N, NNAS y A114N/NNAS) con 50 mU/mg de galactosiltransferasa y posteriormente se desialilaron con 1 U/mg de sialidasa en tampón MES 50 mM (pH 6,5). Los anticuerpos modificados se analizaron usando SDS-PAGE (reductora y no reductora), transferencia de lectina con ECL (una lectina de planta específica para galactosa terminal) y cuantificación de galactosa terminal usando análisis de HPLC Dionex de galactosa liberada por galactosidasa (**Figura 75**). Se obtuvieron anticuerpos modificados con enzima que contenían aproximadamente tres a nueve galactosas terminales con los mutantes dobles NNAS y NNAS/A114N que demuestran un mayor nivel de galactosa terminal que el natural y mutante A114N.

Ejemplo 28. PEGilación de anticuerpos naturales y mutantes usando el método de conjugación de SAM

Se PEGilaron anticuerpos Herceptin naturales y (A114N, NNAS y A114N/NNAS) usando conjugación mediada por ácido siálico (SAM). Los anticuerpos se oxidaron posteriormente con peryodato 2 mM. Después del intercambio de tampón, los anticuerpos oxidados se PEGilaron con un exceso molar de 25 de 5 kDa de aminooxi PEG. Se midió el contenido de ácido siálico de los anticuerpos naturales y mutantes usando HPLC Dionex (**Figura 76**). Entonces se analizaron los anticuerpos PEGilados usando SDS-PAGE reductora y no reductora (**Figura 77**). Además, se estimó la PEGilación (PAR, número de PEG por anticuerpo) analizando los geles barridos usando Protein Simple (**Figura 78**). Los mutantes NNAS, A114N y A114N/NNAS mostraron todos PAR más alta (2,7-4,6) que los anticuerpos Herceptin naturales (1,4).

Ejemplo 29. Investigación de la captación de anticuerpos glucomanipulados con ligandos de glucano que contiene galactosa

Se modificó enzimáticamente un anticuerpo policlonal con galactosiltransferasa (Gal Transferasa), conjugado con lactosa aminooxi (Gal-Glc a 297: conjugado con ácido siálico en los glucanos de Asn-297 del anticuerpo sialilado), o conjugado con lactosa maleimida (Gal-Glc a bisagra: conjugado con cisteínas en disulfuros bisagra). Los anticuerpos de control, modificados o conjugados se incubaron entonces con células HepG2 (una línea celular de hepatocitos que expresa ASGPR) durante 1-2 horas a 37 °C antes de medir los anticuerpos captados usando tinción por inmunofluorescencia (**Figura 79**). Los resultados mostraron un aumento de la captación de células HepG2 de anticuerpos con modificación enzimática o conjugados con lactosa.

Ejemplo 30. Conjugación de un glucano de GalNAc trivalente con Herceptin

Se sialiló y conjugó Herceptin (anti-Her2) con un glucano de GalNAc trivalente (**Figura 80**) para el direccionamiento de ASGPR usando el enfoque de SAM. Posteriormente, se usaron experimentos de resonancia de plasmones superficiales (Biacore) para evaluar la unión de estos anticuerpos conjugados con glucano de GalNAc trivalente a la subunidad H1 del receptor de ASGPR (**Figura 81**).

Ejemplo 31. Conjugación de GalNAc trivalente y galactosa trivalente con una enzima lisosómica recombinante

Se conjugó una enzima lisosómica recombinante con glucano de GalNAc trivalente o galactosa trivalente que contenía glucopéptidos (**Figura 82**) para el direccionamiento de ASGPR usando el método de conjugación de SAM. Posteriormente, se usaron experimentos de resonancia de plasmones superficiales (Biacore) para evaluar la unión de estas enzimas conjugadas con glucano de GalNAc trivalente y conjugadas con galactosa trivalente a la subunidad H1 del receptor de ASGPR (**Figura 83**). Los resultados mostraron una fuerte unión a ASGPR de enzima lisosómica recombinante conjugada con glucano de GalNAc trivalente.

Ejemplo 32. Uso de derivados de manosamina, que incluyen ManLev, para la sialilación y conjugación de anticuerpos *in vitro*

Se usaron derivados de manosamina, que incluyen ManLev, ManNAz, y ManAz, para preparar derivados de ácido siálico y luego CMP-derivados de ácido siálico para la sialilación de anticuerpos, seguido por conjugación específica de sitio. Los CMP-derivados de ácido siálico preparados se caracterizaron usando HPAEC-PAD y se usaron para la sialilación de anticuerpos *in vitro*. Finalmente, los anticuerpos sialilados se PEGilaron sin oxidación de peryodato usando el enfoque de SAM.

Se valoró ácido siálico (0,2 μ moles) con diversas cantidades de CMP-ácido siálico sintetasa (*N. meningitidis*) a 37 °C. La generación de CMP-ácido siálico se monitorizó usando HPAEC-PAD en comparación con el tiempo de retención del patrón de CMP-ácido siálico. Se representó CMP-ácido siálico sintetizado frente a las cantidades de enzima usadas y demuestra que la generación de CMP-ácido siálico se satura por CMP-ácido siálico sintetasa a 5 mU por 0,2 μ moles (**Figura 84**).

Se valoró ManNAc o ManLev (0,2 μ moles) con diversas cantidades de ácido siálico aldolasa (*E. coli* K-12) a 37 °C. Se monitorizó la generación de ácido siálico (a partir de ManNAc) o derivado de ácido siálico (de ManLev) usando HPAEC-PAD en comparación con el tiempo de retención del patrón de ácido siálico. Se muestra el ácido siálico sintetizado o derivado de ácido siálico frente a las cantidades de enzima usadas en la **Figura 85** (ManNAc) y la **Figura 86** (ManLev).

Para caracterizar los derivados de ácido siálico usando HPAEC-PAD, se digirió en primer lugar el CMP-ácido siálico (de ManNAc) o CMP-derivado de ácido siálico (de ManLev) con sialidasa a 37 °C. Se monitorizó el ácido siálico o derivado de ácido siálico liberado usando HPAEC-PAD en comparación con el tiempo de retención del patrón de ácido siálico y también se confirmó la identidad del ácido siálico por desaparición del pico de ácido siálico después del tratamiento con peryodato (**Figura 87**). Se eluyó el derivado de ácido siálico (de ManLev) después del ácido siálico.

También se analizaron CMP-ácido siálico (de ManNAc) y CMP-derivados de ácido siálico (de ManLev, ManNAz, ManAz) directamente en HPAEC-PAD sin pretratamiento con sialidasa. Se comparó la generación de CMP-ácido siálico con el tiempo de retención del patrón de CMP-ácido siálico. Los CMP-derivados de ácido siálico, producidos a partir de ManLev, ManNAz y ManAz, mostraron diferentes tiempos de retención en comparación con el patrón de CMP-ácido siálico (**Figuras 88 y 89**).

Además, se sialiló Herceptin *in vitro* usando α 2,6 sialiltransferasa y CMP-derivados de ácido siálico. La **Figura 90** es una representación esquemática que demuestra la sialilación de Herceptin usando un derivado de ácido siálico preparado a partir de ManLev. La sialilación se analizó usando CL-EM de fragmentos de CH_2CH_3 liberados por IdeS proteasa. La **Figura 91** demuestra la sialilación de Herceptin con el derivado de ácido siálico preparado a partir de ManLev (con masa correcta).

Finalmente, se PEGiló Herceptin sialilado con derivados de ácido siálico preparado a partir de ManLev y ManNAz. La **Figura 92** es una representación esquemática que demuestra la PEGilación de Herceptin sialilado con un derivado de ácido siálico preparado a partir de ManLev. En primer lugar, Herceptin se sialiló *in vitro* usando α 2,6 sialiltransferasa y CMP-derivados de ácido siálico preparados a partir de ManLev. Posteriormente, se mezclaron los anticuerpos sialilados con 5 kDa de aminooxi PEG. Entonces se analizaron los anticuerpos sialilados y PEGilados usando SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras. Se observa un análisis de SDS-PAGE de Herceptin sialilado PEGilado con un derivado de ácido siálico preparado a partir de ManLev en la **Figura 93**. La **Figura 94** es una representación esquemática que demuestra la sialilación de anticuerpo con un derivado de ácido siálico preparado a partir de ManNAz. Se muestra un análisis de SDS-PAGE de Herceptin PEGilado pre-sialilado con un derivado de ácido siálico preparado a partir de ManNAz en la **Figura 95**.

5 un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, para formar un anticuerpo conjugado con derivado de ácido siálico, o fragmento de unión al antígeno del mismo;

10 antígeno del mismo, ni el anticuerpo conjugado con derivado de ácido siálico, ni fragmento de unión al antígeno del mismo, se tratan con un agente de oxidación.

15 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el resto efector se selecciona de una o más de las siguientes fórmulas estructurales:

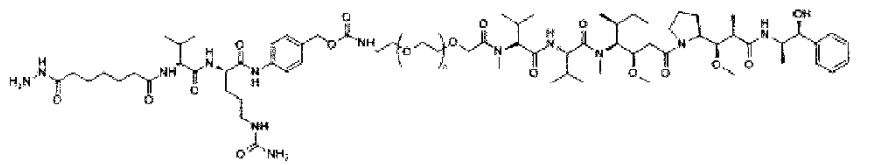
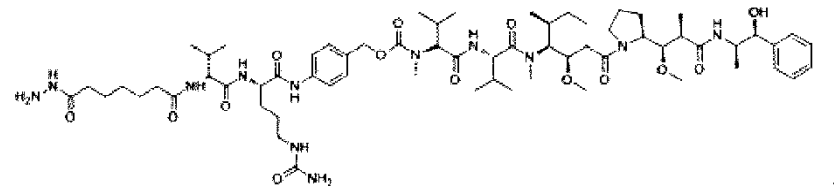
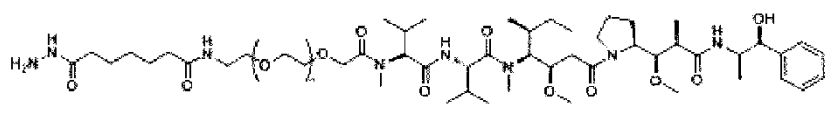


The diagram shows a branched oligosaccharide structure. It consists of several glucose units linked by glycosidic bonds. One branch terminates in a maleimide derivative, which is a five-membered ring containing two nitrogen atoms and a carbonyl group, attached to a terminal amino group. The structure is drawn in a perspective view, showing the chair conformations of the sugar rings.

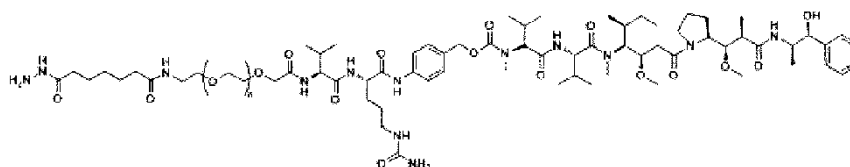
(i) la etapa (b) da como resultado la formación de un enlace oxima; o

25 hidrazona.

72



y



5

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además lograr o modificar la glucosilación del anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, usando una o más glucosiltransferasas, una o más glucosidasas, o una combinación de las mismas.

10 7. El método de la reivindicación 6, en donde la etapa (a) ocurre en una reacción con sialiltransferasa, opcionalmente en donde la sialiltransferasa es una sialiltransferasa de mamífero, opcionalmente en donde la sialiltransferasa es beta-galactósido alfa-2,6-sialiltransferasa 1.

Figura 1

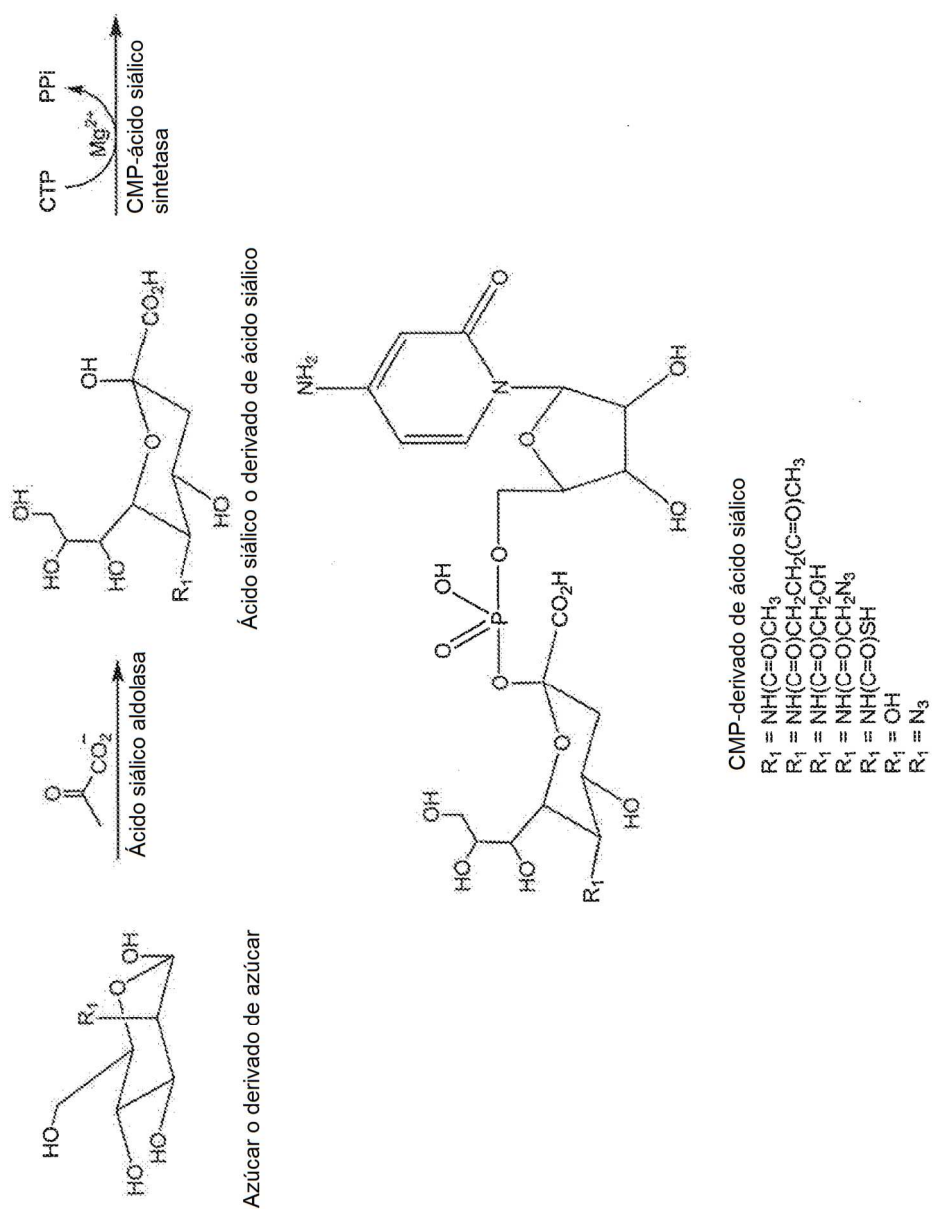
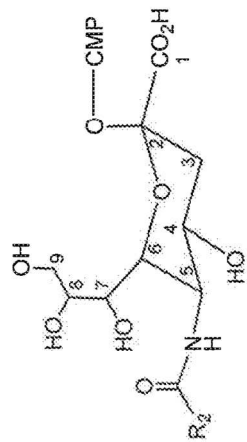
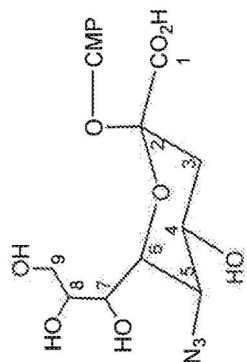


Figura 2

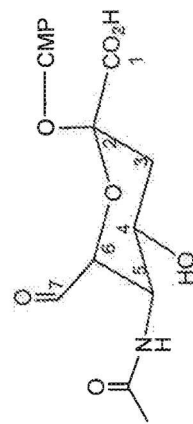


CMP-derivado de ácido siálico C5 N-acetilo

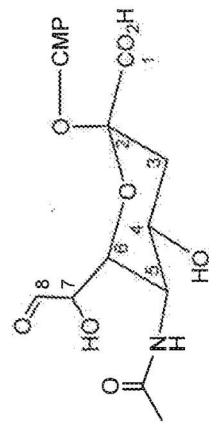
$R_2 = \text{CH}_3$
 $R_2 = \text{CH}_2\text{CH}_2(\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$
 $R_2 = \text{CH}_2\text{OH}$
 $R_2 = \text{CH}_2\text{N}_3$
 $R_2 = \text{SH}$



CMP-derivado de ácido siálico C5 azida



CMP-derivado de ácido siálico C7 aldehído



CMP-derivado de ácido siálico C8 aldehído

Figura 3

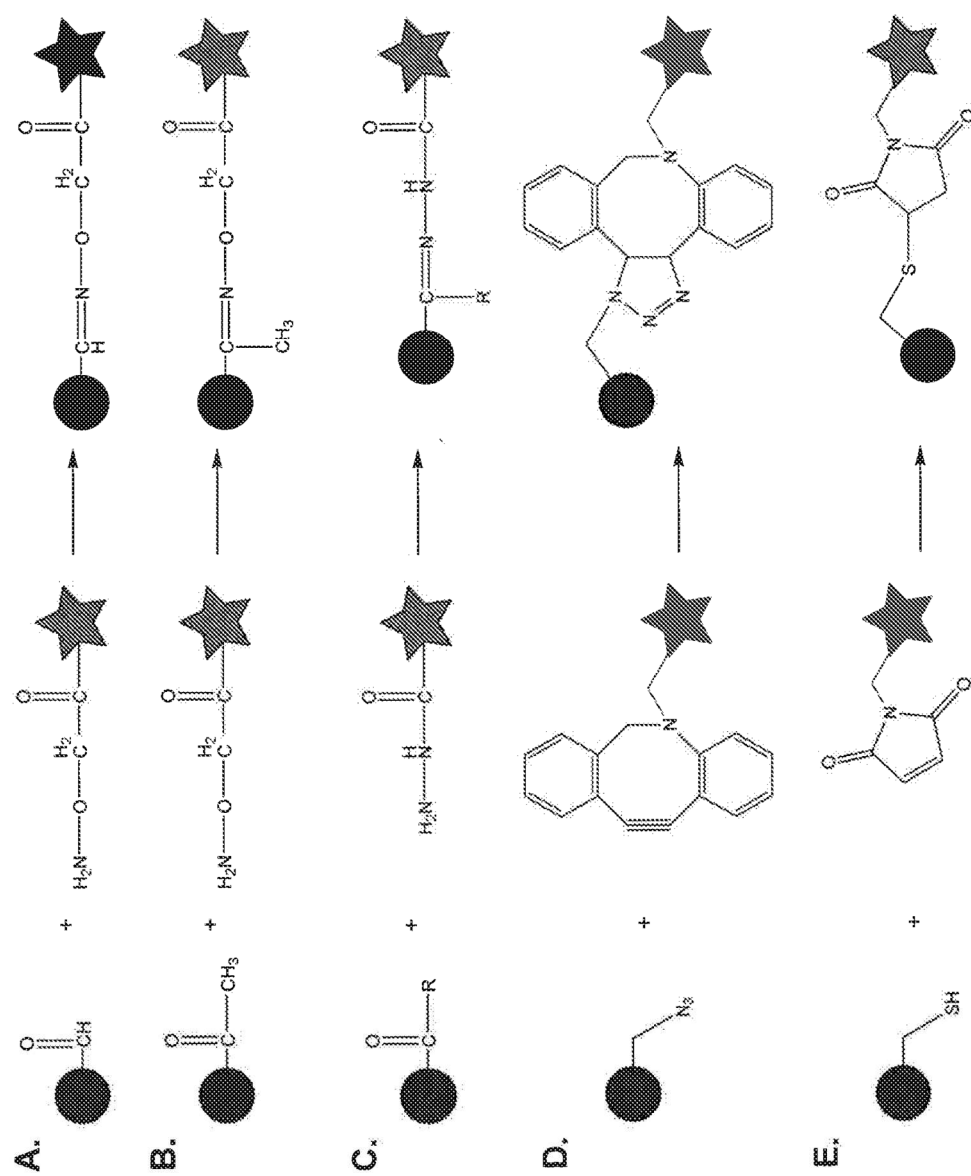


Figura 4

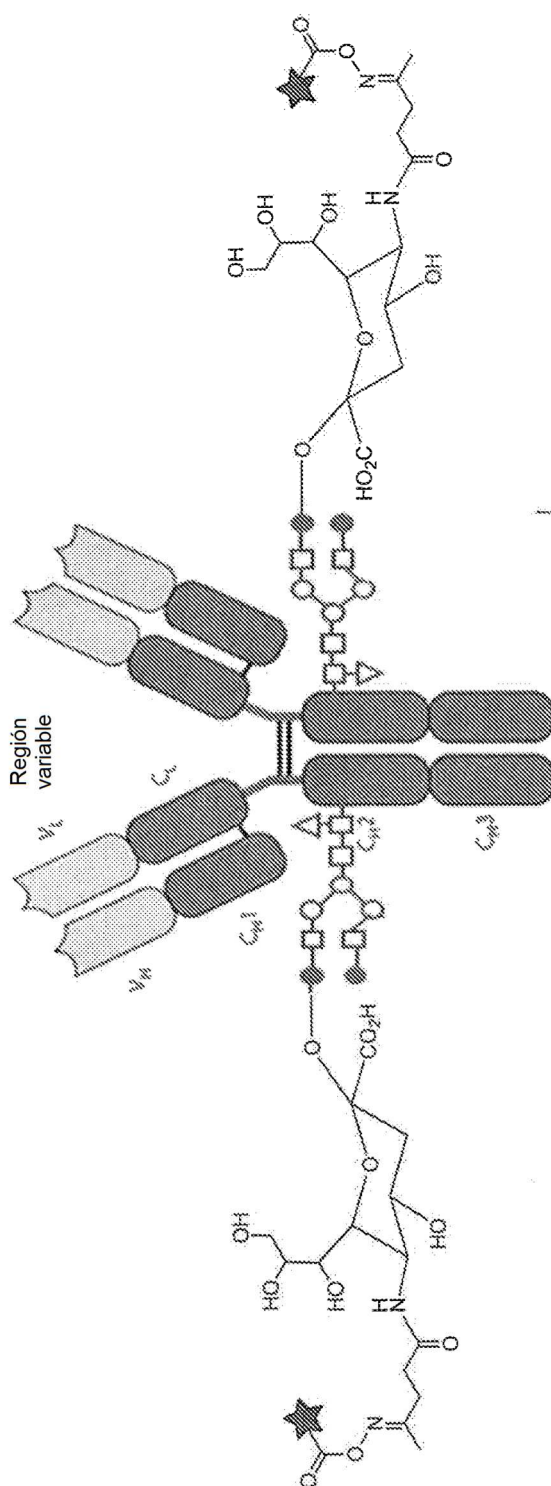


Figura 5

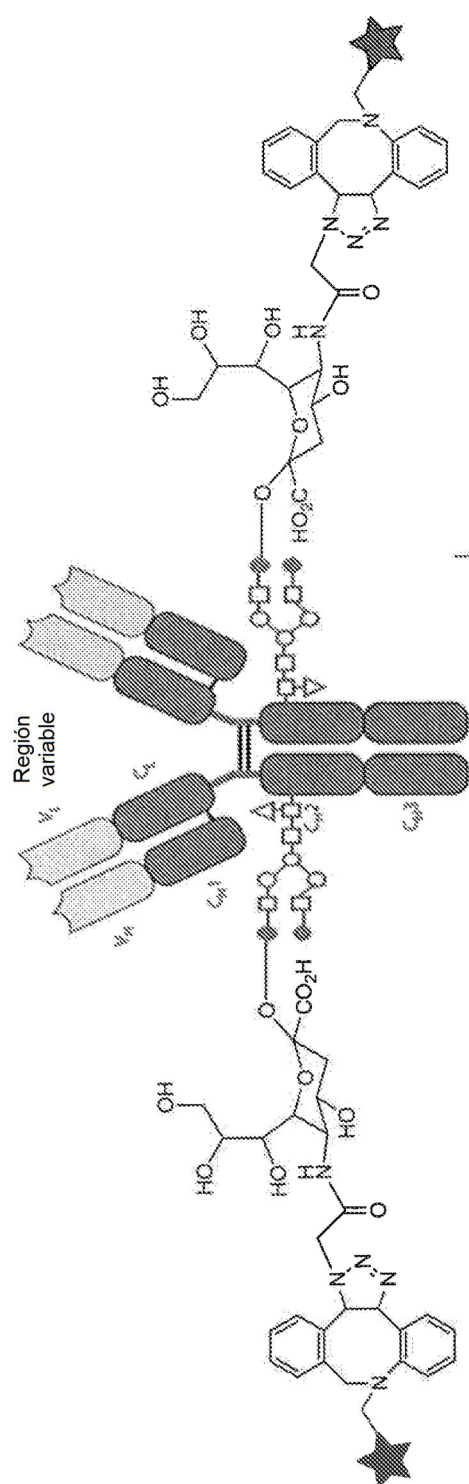


Figura 6

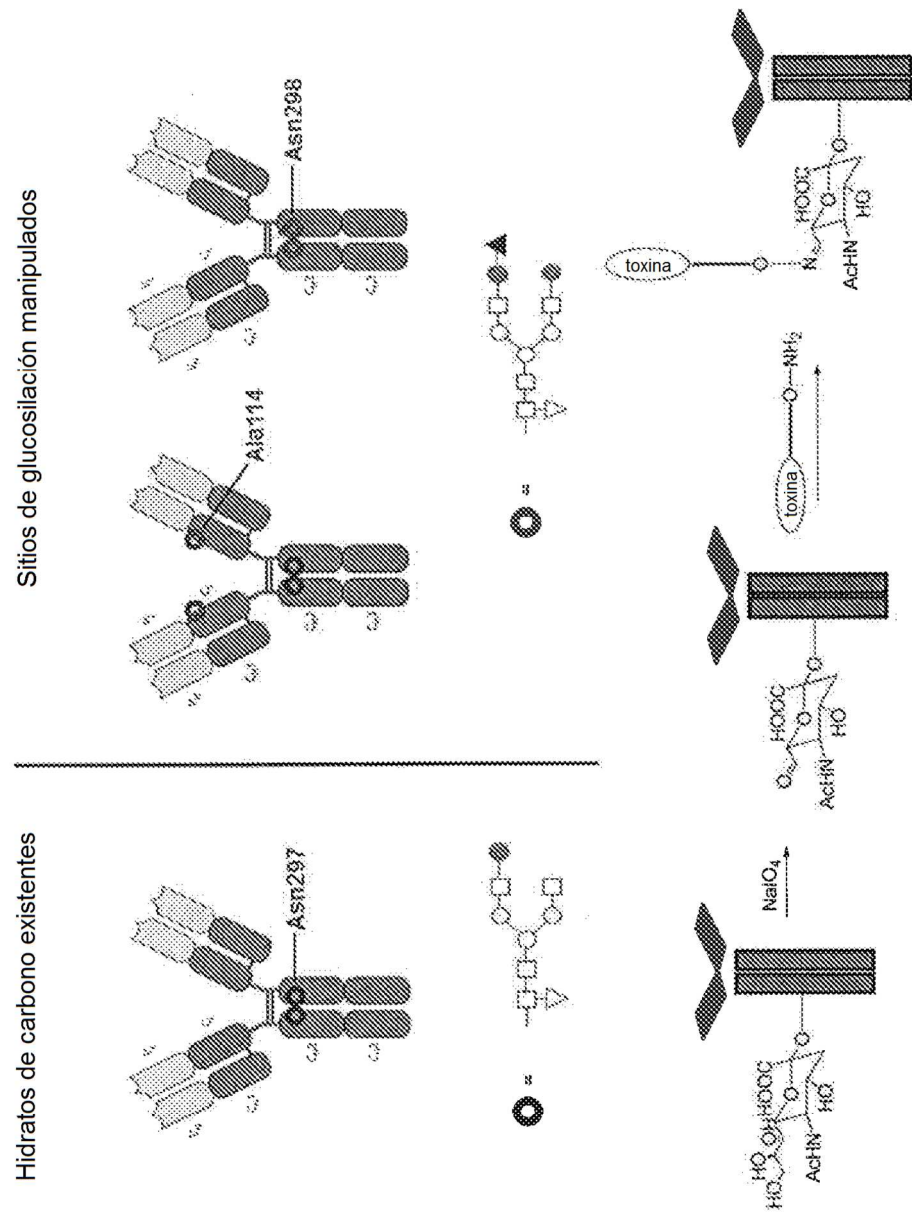


Figura 7

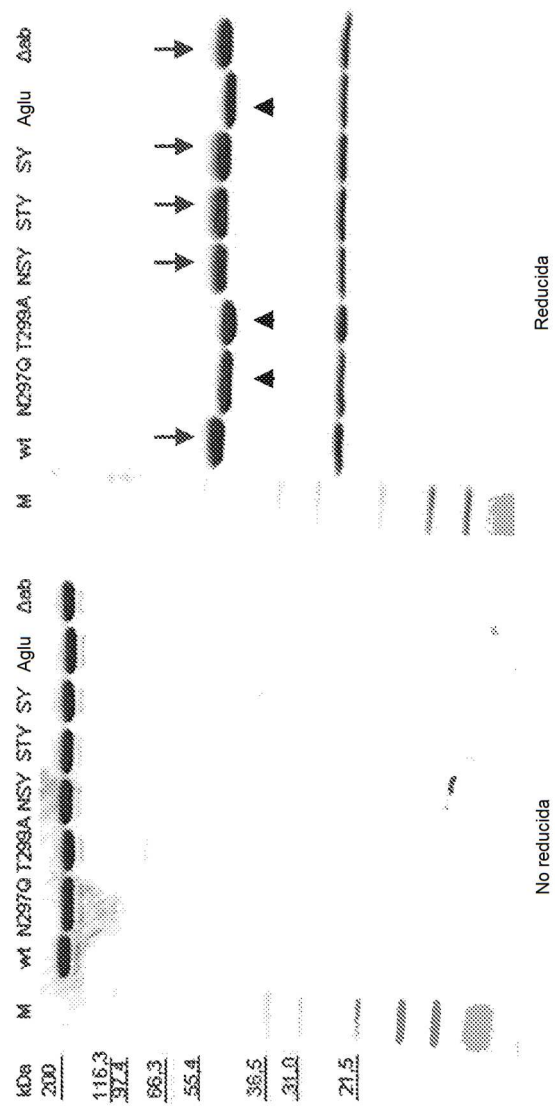
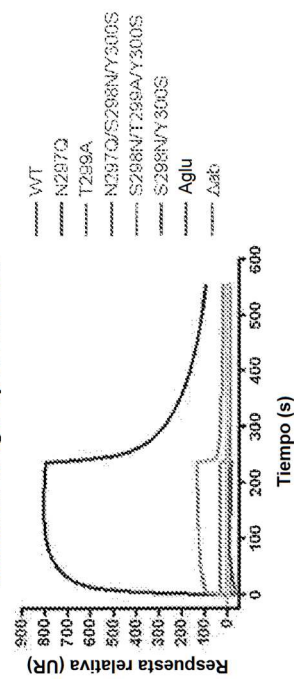


Figura 8

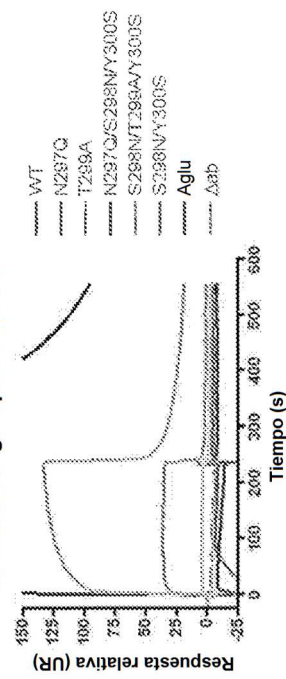
Escala real: CD16a-Val158

Unión a FcγR11a-Val158 humano de
mutantes de IgG αβTCR HEBE1



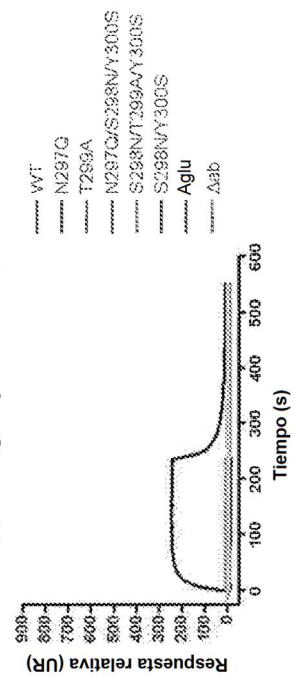
con aumento:

Unión a FcγR11a-Val158 humano de
mutantes de IgG αβTCR HEBE1



Escala real: CD16a-Phe158

Unión a FcγR11a-Phe158 humano de
mutantes de IgG αβTCR HEBE1



con aumento:

Unión a FcγR11a-Phe158 humano de
mutantes de IgG αβTCR HEBE1

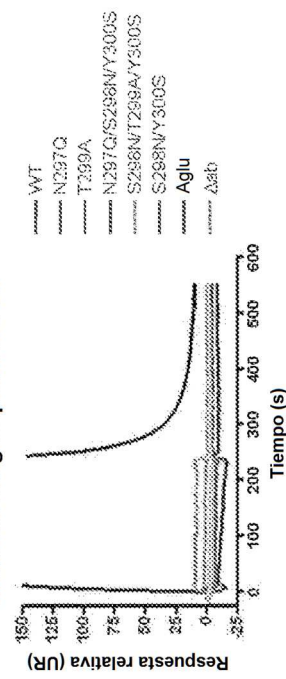
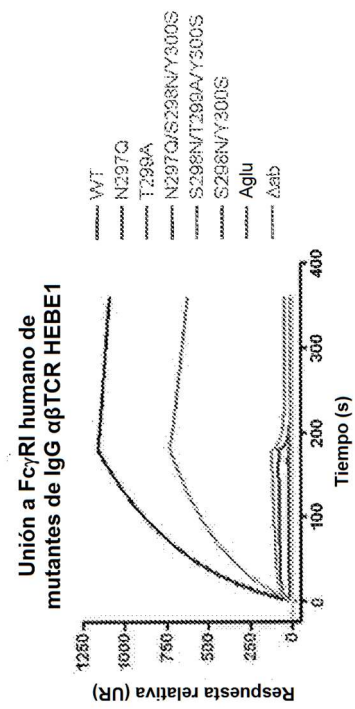


Figura 9

Escala real:



con aumento:

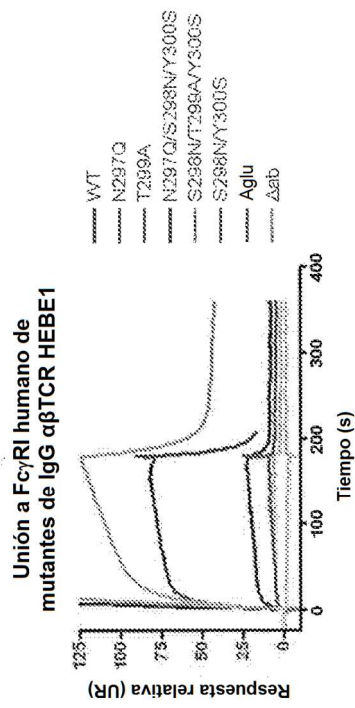


Figura 10

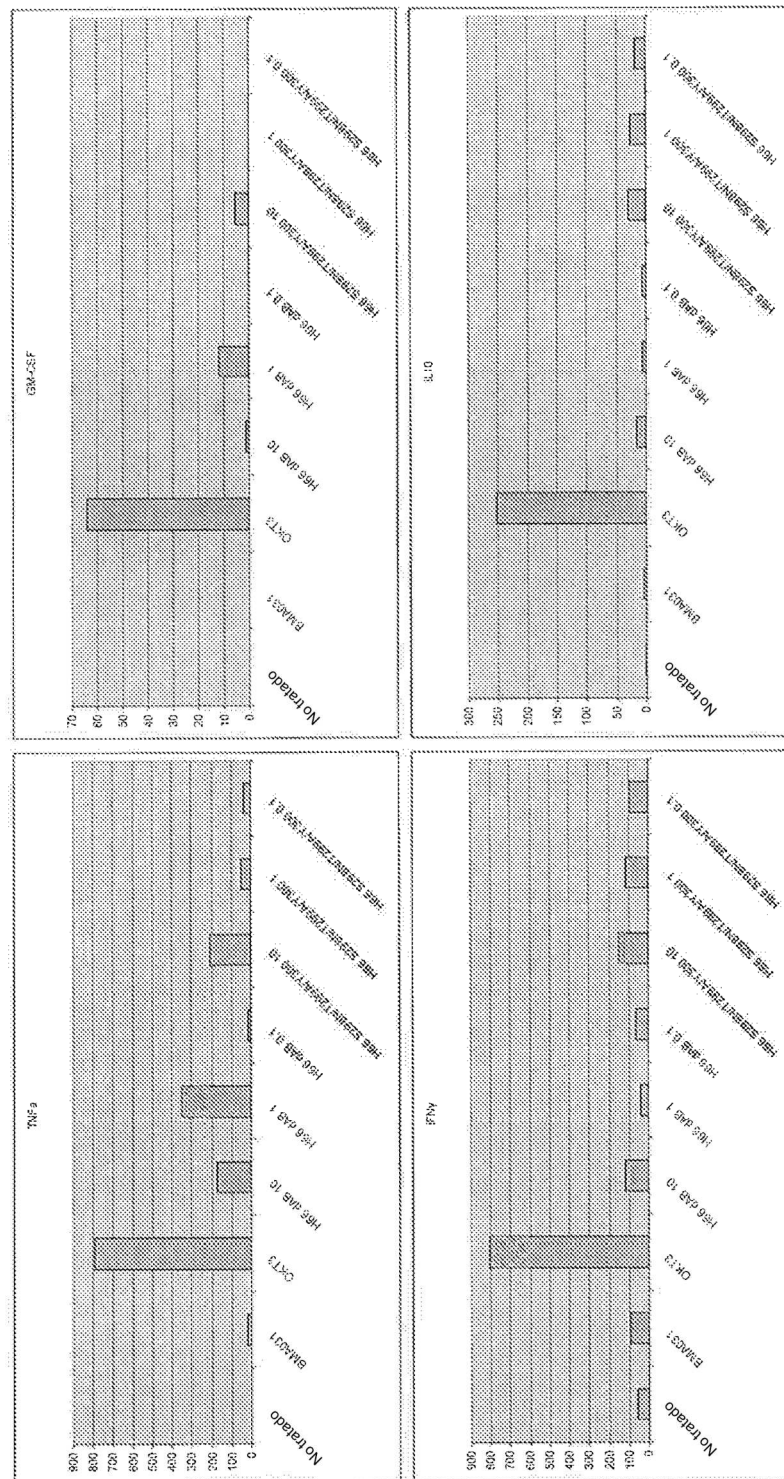


Figura 11

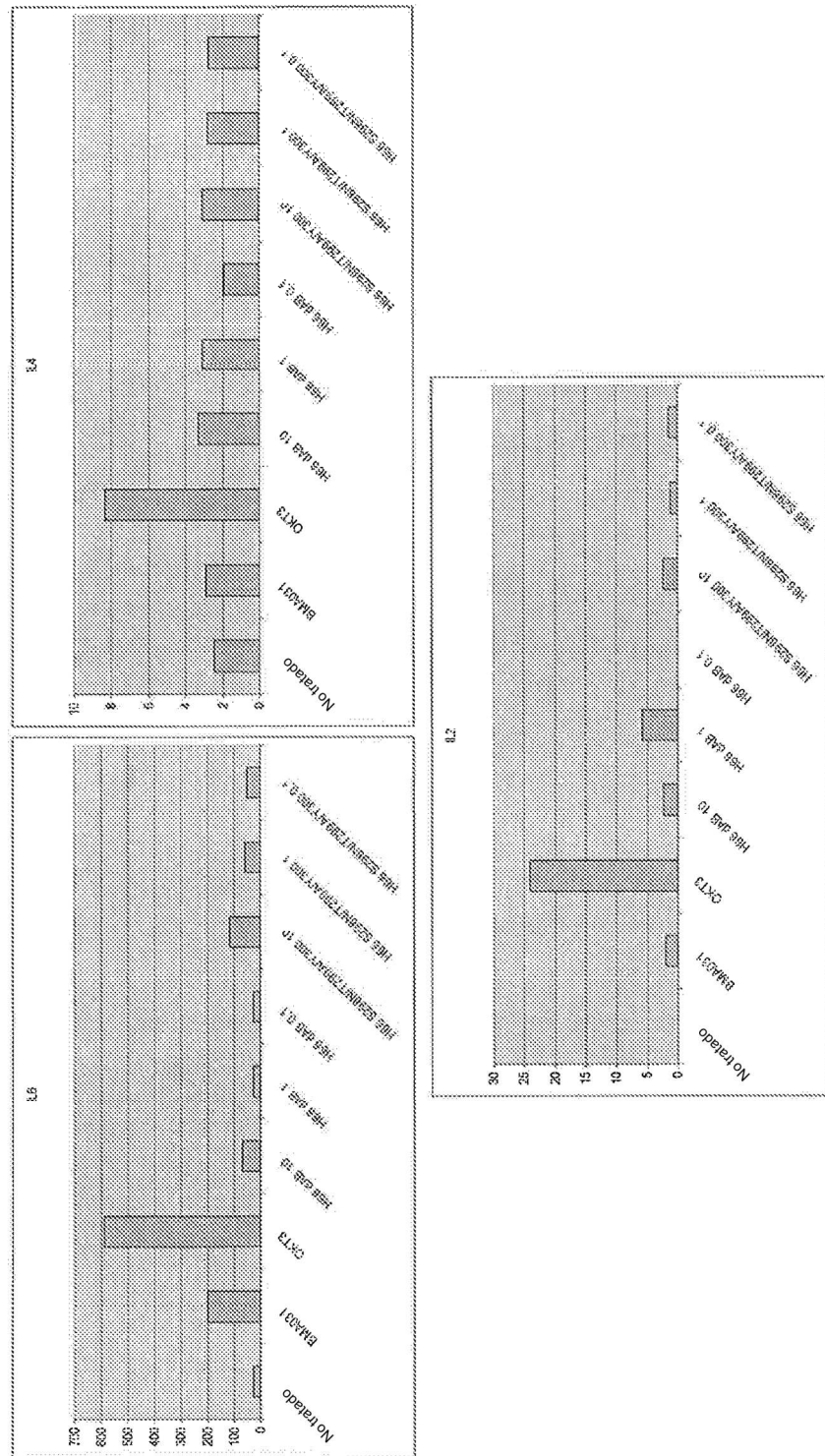


Figura 12

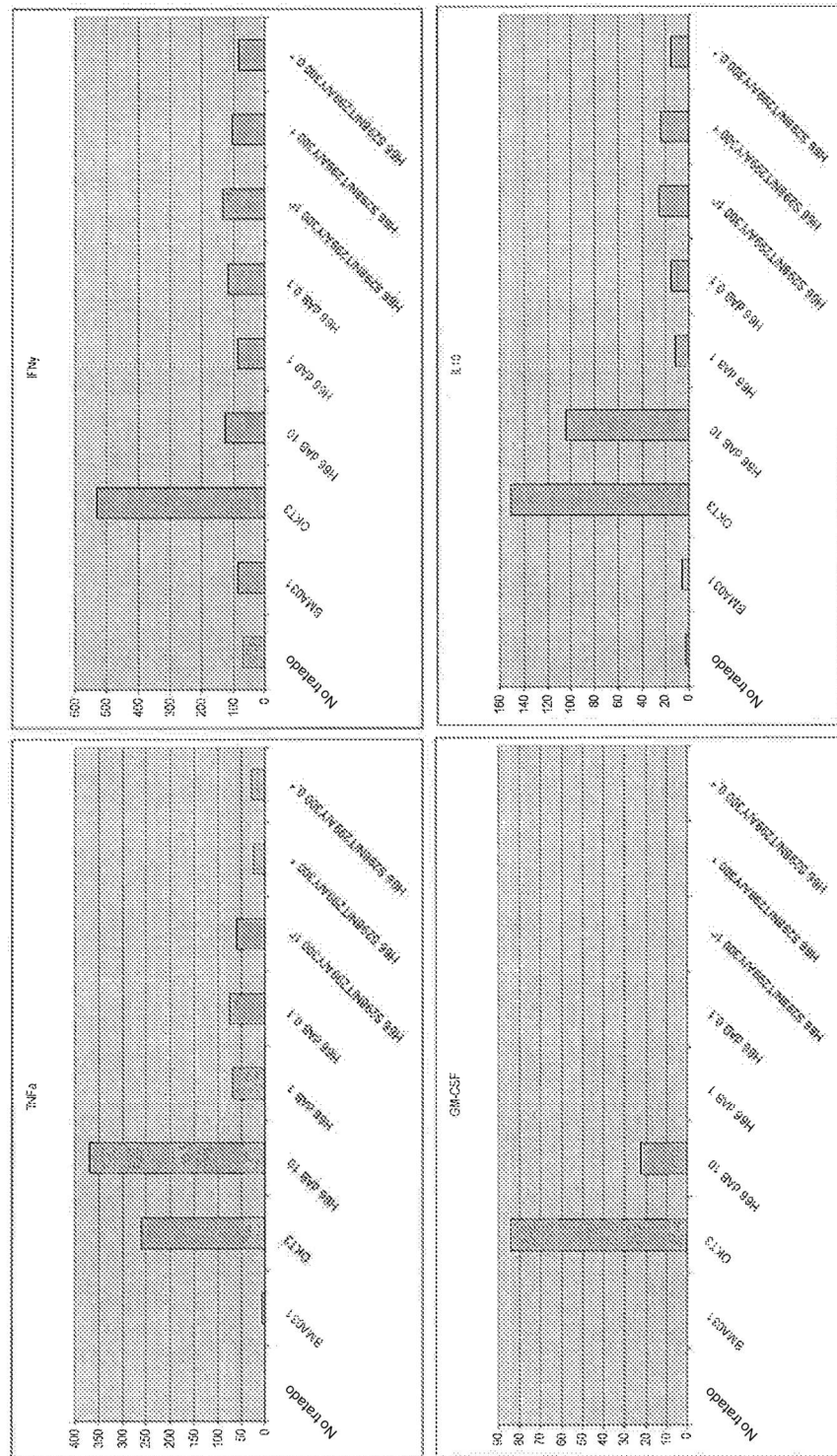


Figura 13

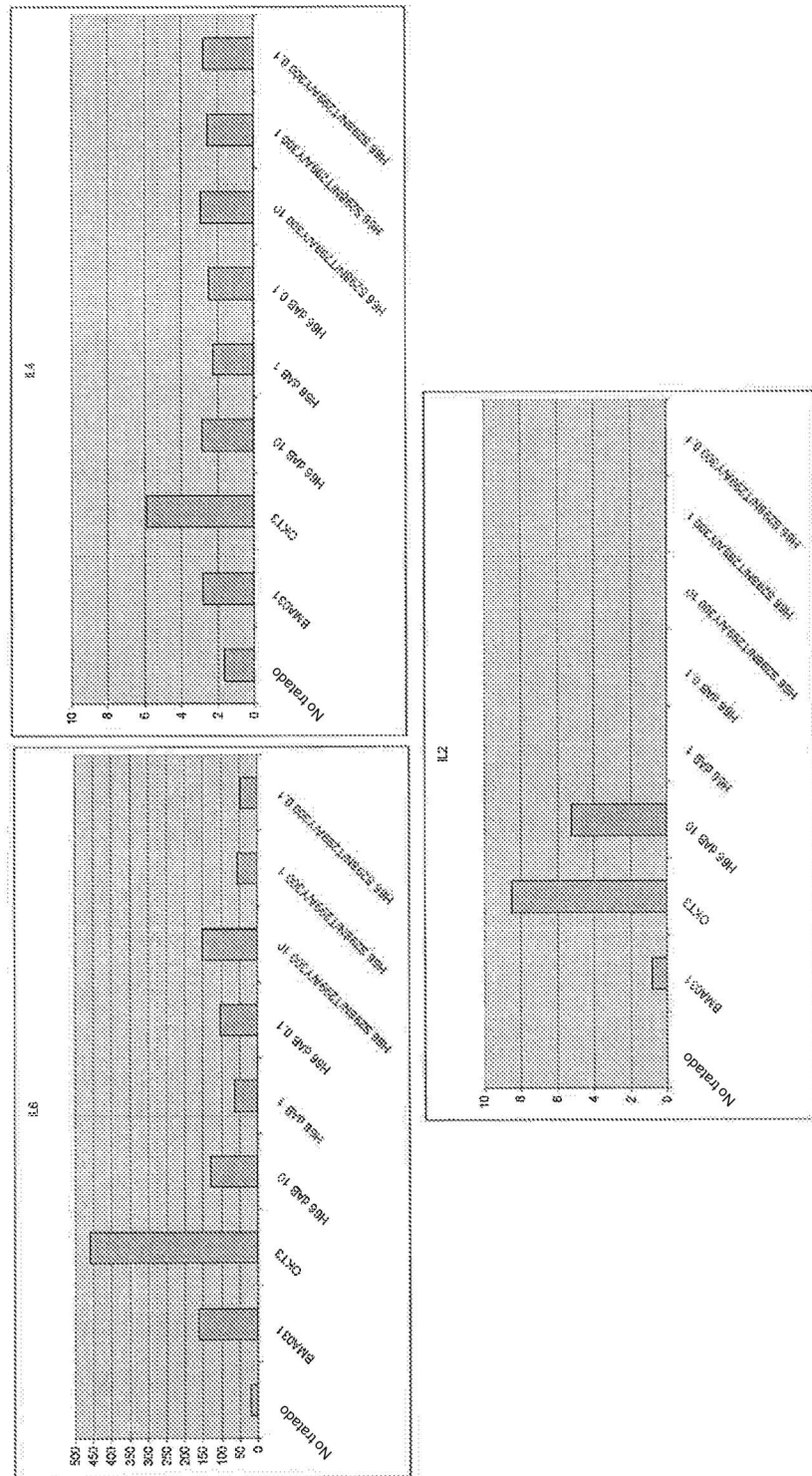
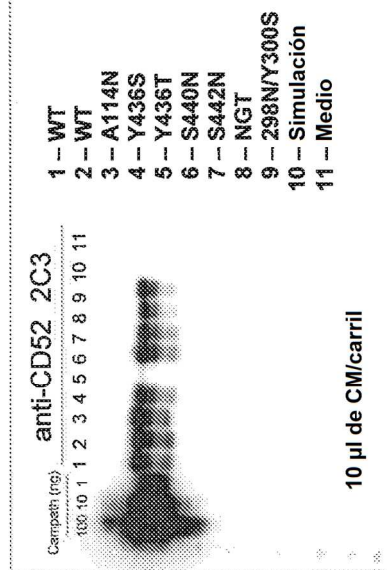


Figura 14

A.

Transferencia Western



B.

Biacore

Desconocido	Conc. (µg/mL)	Respuesta relativa (UR)	Conc. calculada (M)	Conc. calculada (µg/mL)
2C3 en medio	3 [0]	555.75	2.45E-08	3.689
2C3 en medio	3 [0]	560.96	2.47E-08	3.710
2C3 en medio	3 [0]	555.69	2.51E-08	3.758
A114N		146.5	1.50E-09	0.240
Simulación		97.84	8.57E-10	0.129
NGT		124.52	1.30E-09	0.196
S298N/Y300S		112.14	1.13E-09	0.172
S440N		146.36	1.60E-09	0.240
S442N		121.21	1.26E-09	0.189
WT (Katva)		148.41	1.63E-09	0.244
WT (Tim)		148.08	1.62E-09	0.244
Y436S		158.72	1.70E-09	0.267
Y436T		84.27	8.23E-10	0.123
Medio incubado		87.36	8.57E-10	0.129

wt	A114N	Y436S	Y436T	S440N	inc	Carpath, ng
PNGasa F	-	+	+	-	+	- 2 1 0,5

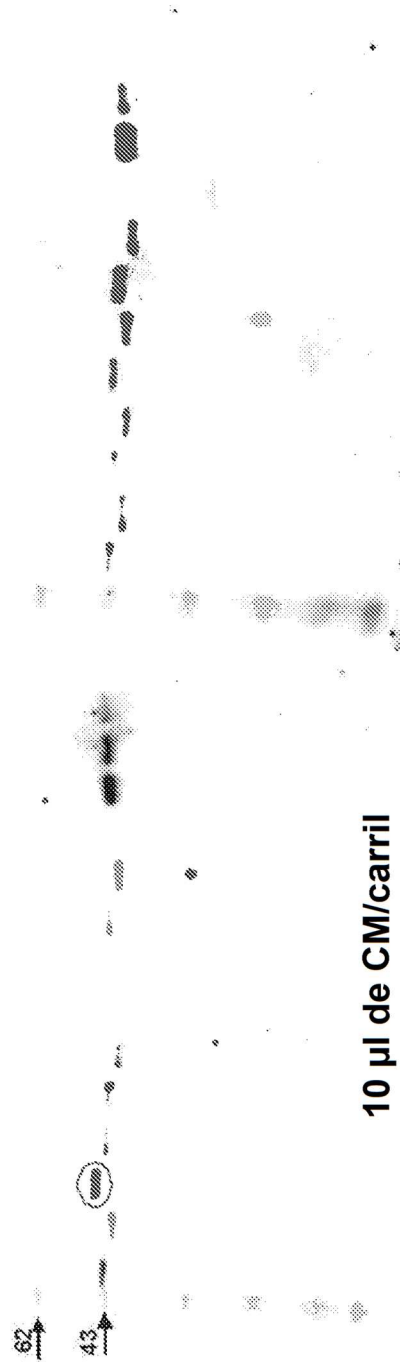


Figura 16

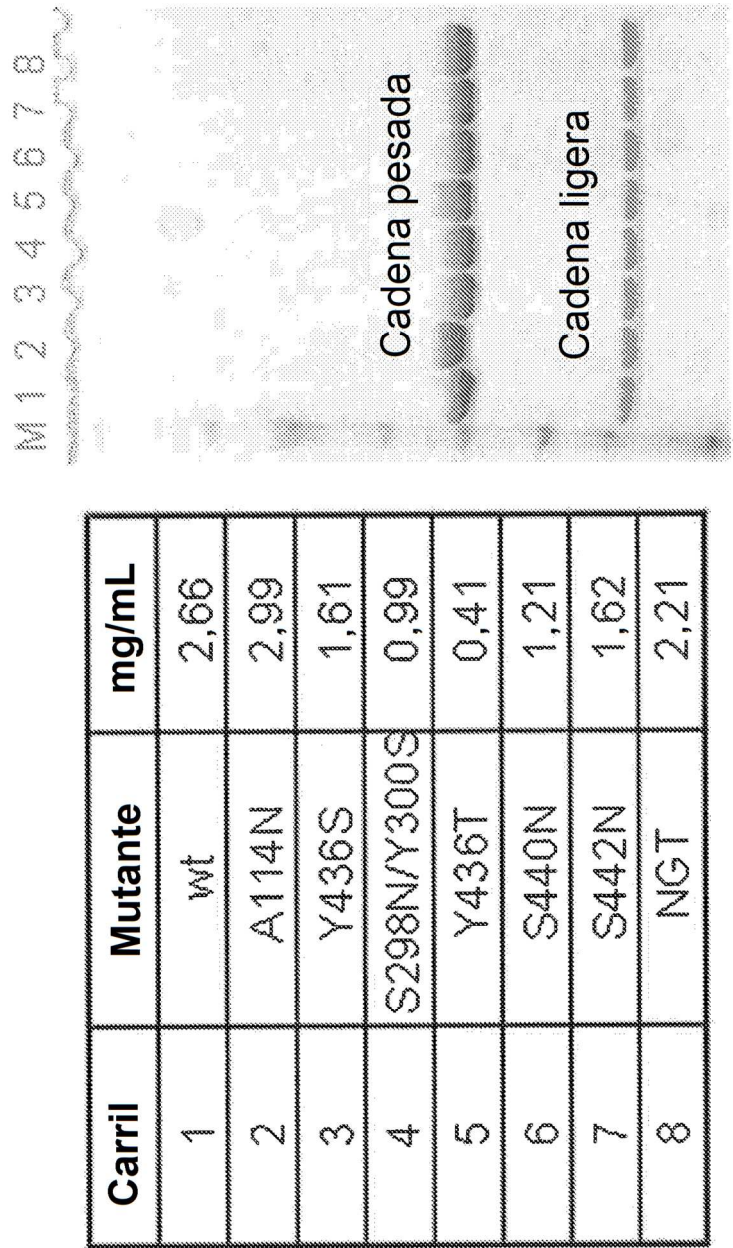
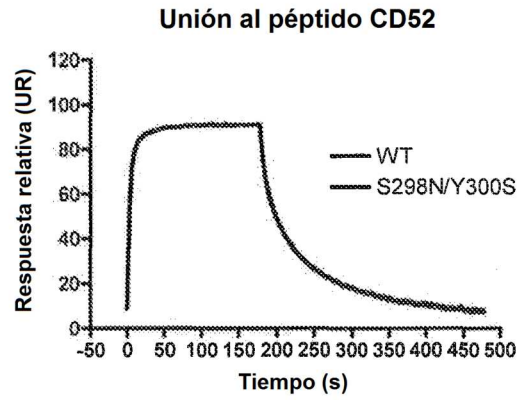
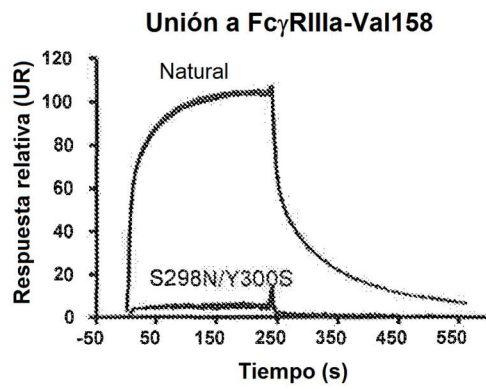


Figura 17

A.



B.



C.

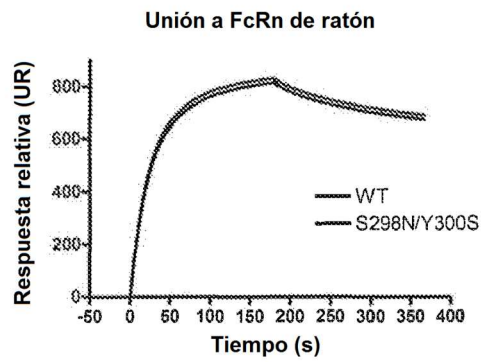


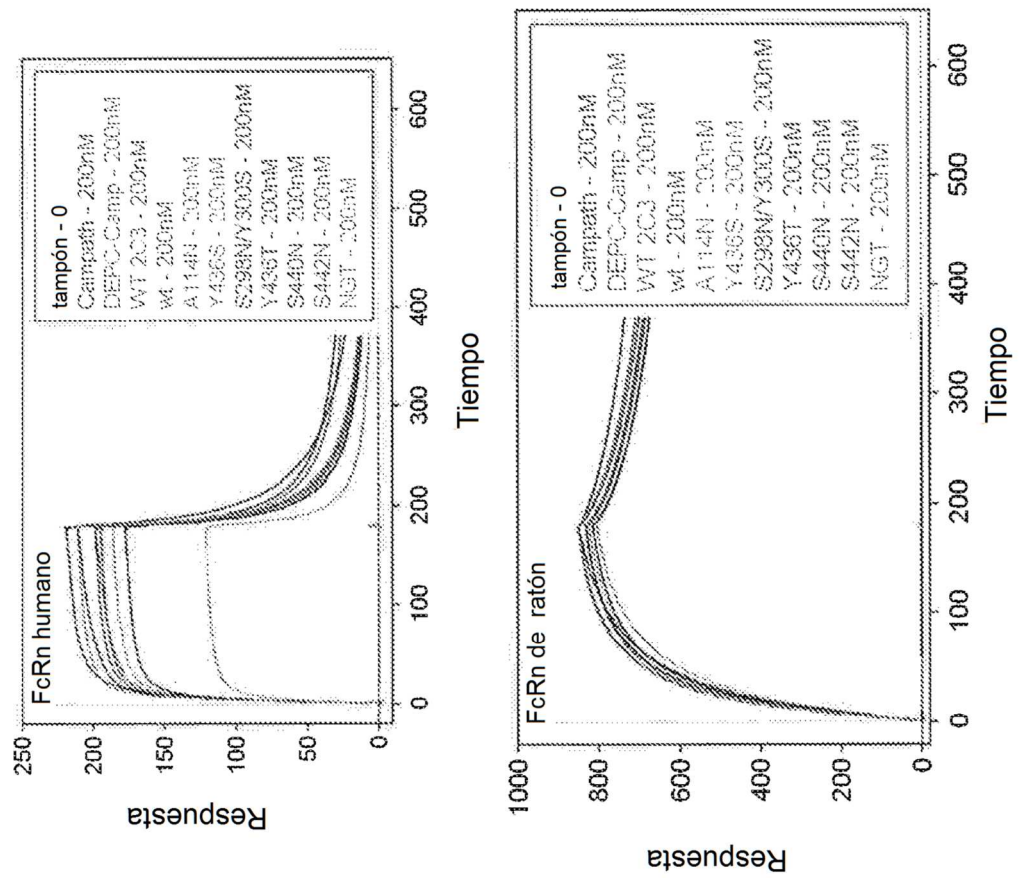
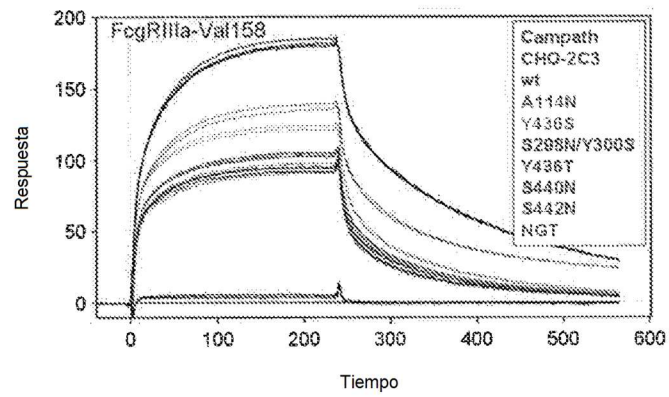
Figura 18

Figura 19

A.



B.

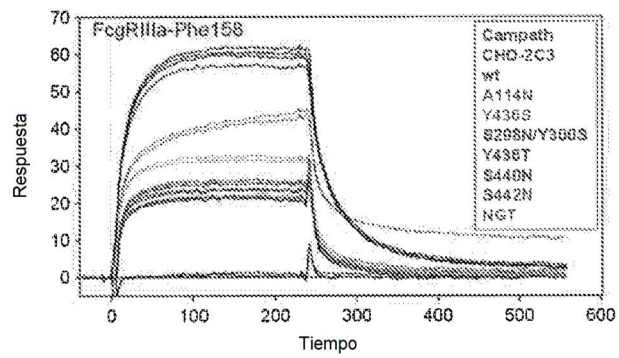
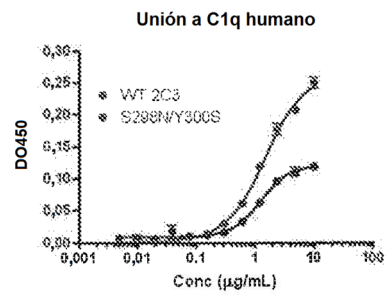


Figura 20

A.



B.

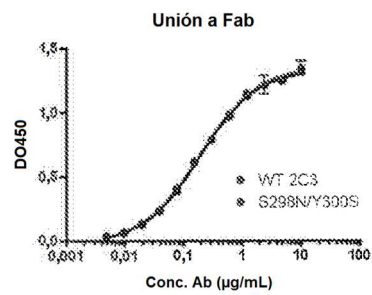


Figura 21

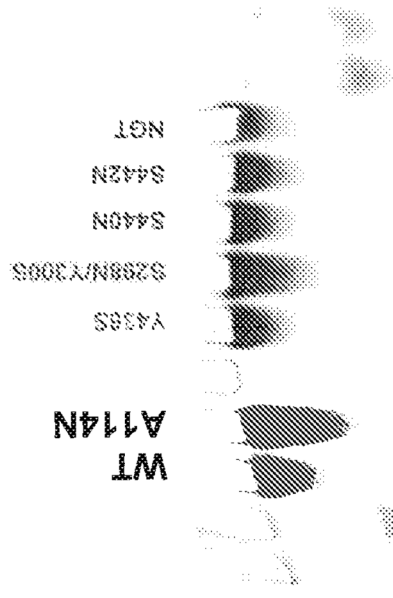
Muestra	k_a ($\times 10^6/\text{Ms}$)	k_d ($\times 10^{-2}/s$)	R_{max} (UR)	K_D (nM)
GLD52	7,0	1,7	67,0	2,44
WT 2C3	6,0	1,1	64,2	1,75
A114N	4,7	1,1	59,5	2,45
Y436S	5,9	1,0	66,9	1,73
S298N/Y300S	5,7	1,0	63,3	1,80
Y436T	4,8	0,9	65,7	1,95
S440N	5,8	1,1	66,8	1,84
S442N	5,7	1,1	66,2	1,85
NGT	7,9	1,1	70,2	1,35

Figura 22

Muestra	Kas ($\times 10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	Kdis ($\times 10^{-2} \text{s}^{-1}$)	KD (nM)
WT 2C3	5,2	1,1	2,1
A114N	5,3	1,3	2,4

Figura 23

A.



B.

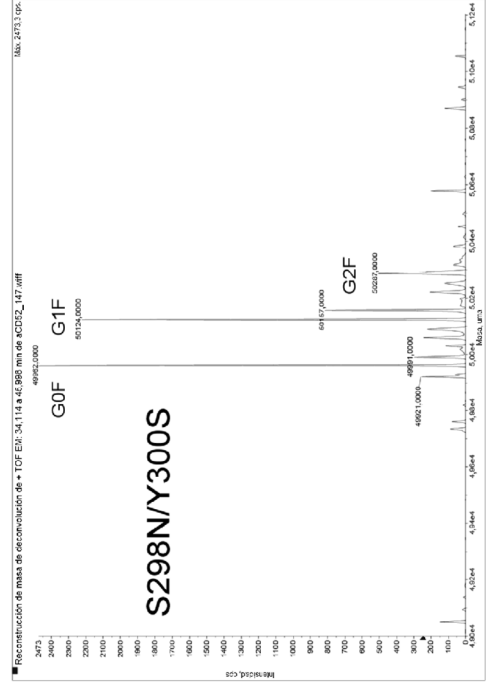




Figura 24**A.**

Muestra	Lote N°	Conc. Octel (ug/mL)
Medio simulado	11/23/2009	demasiado baja
wt 2C3	11/23/2009	2,54
A114N	11/23/2009	2,83
S298N/Y300S	11/23/2009	1,36
S440N	11/23/2009	1,32
S442N	11/23/2009	1,21
Y436S	11/23/2009	1,92
Y436T	11/23/2009	0,34
NGT	11/23/2009	1,90

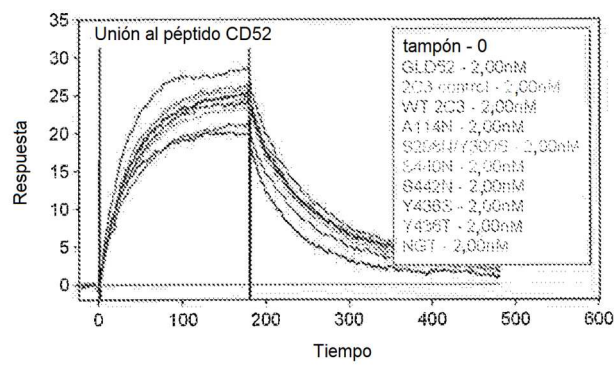
B.

Figura 25

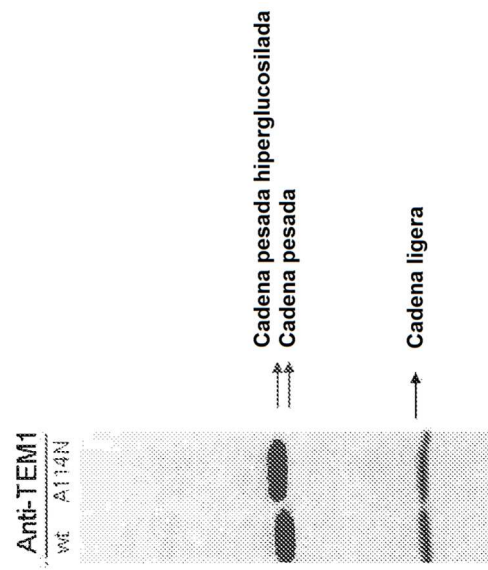


Figura 26

SDS-PAGE al 10 % de Tris-glicina

Análisis HIC de Herceptin A114N purificado

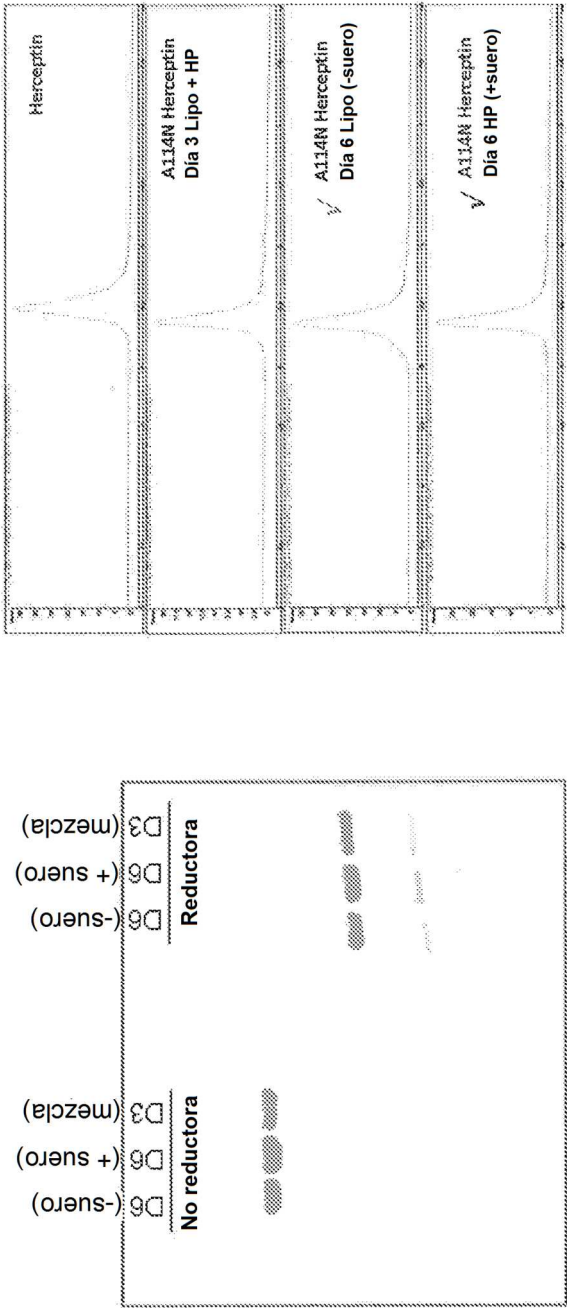
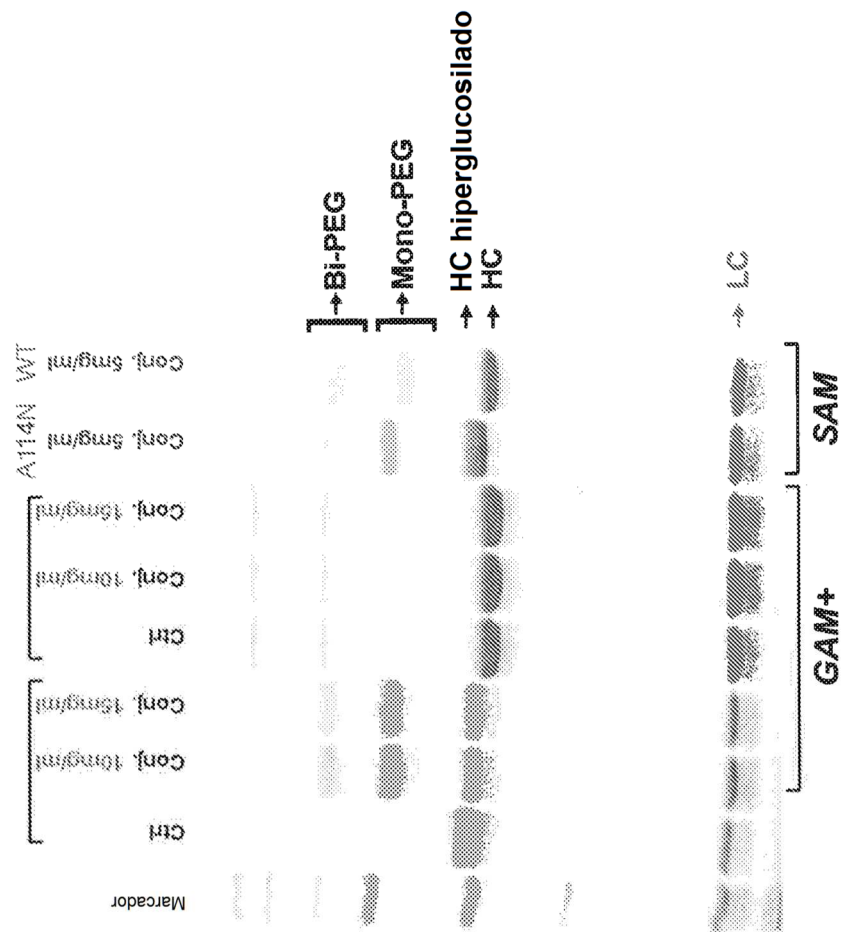


Figura 27



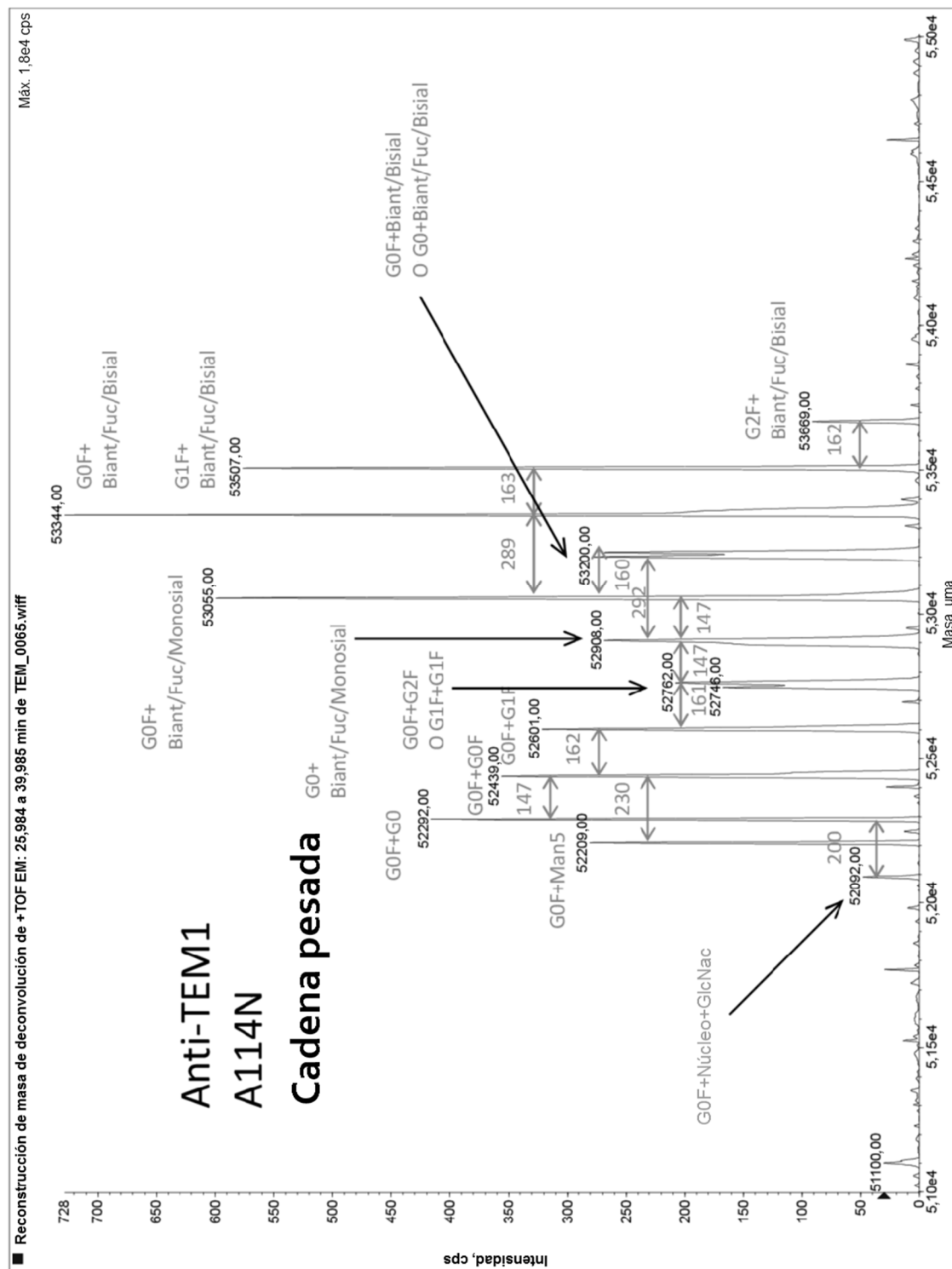


Figura 28

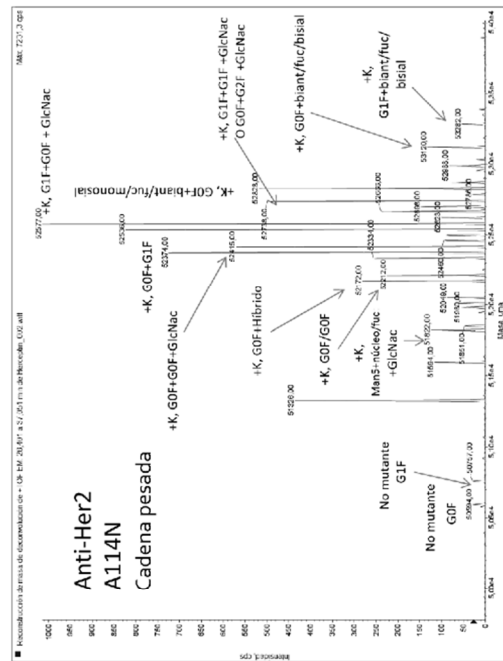
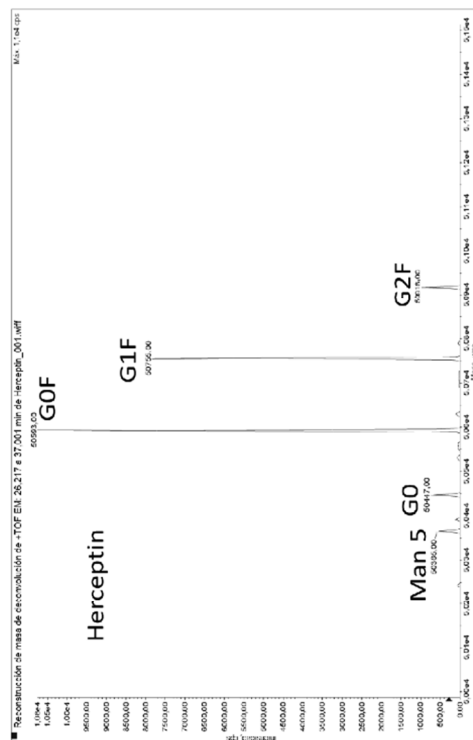


Figura 31

Síntesis de aminooxi-Cys-MC-VC-PABC-MMAE y aminooxi-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Dol10

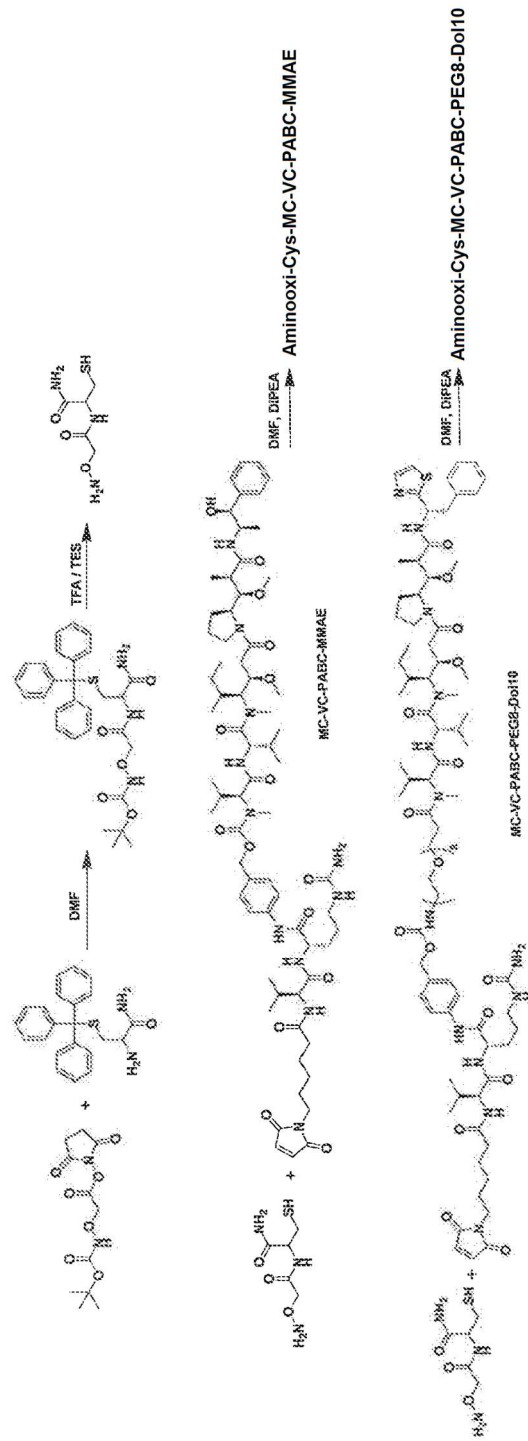


Figura 32

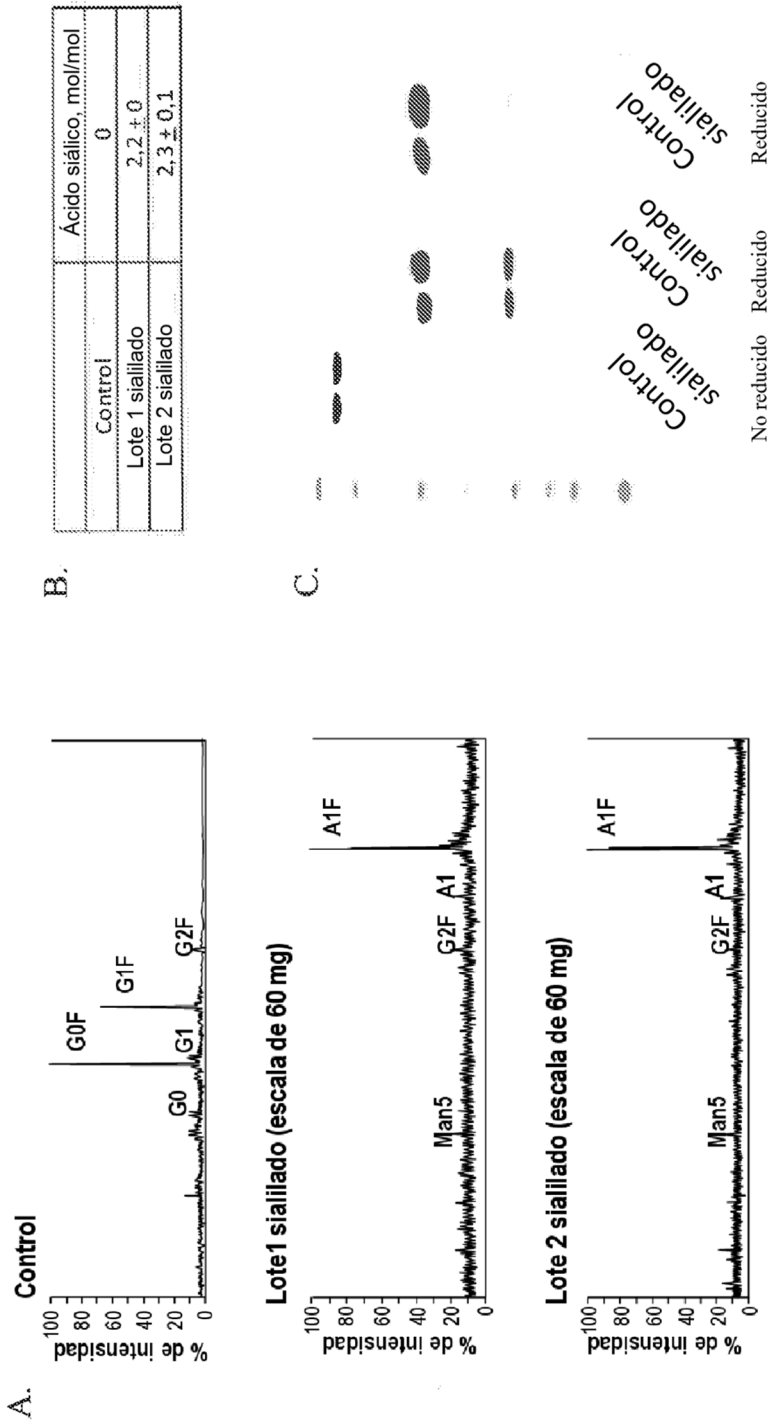


Figura 33

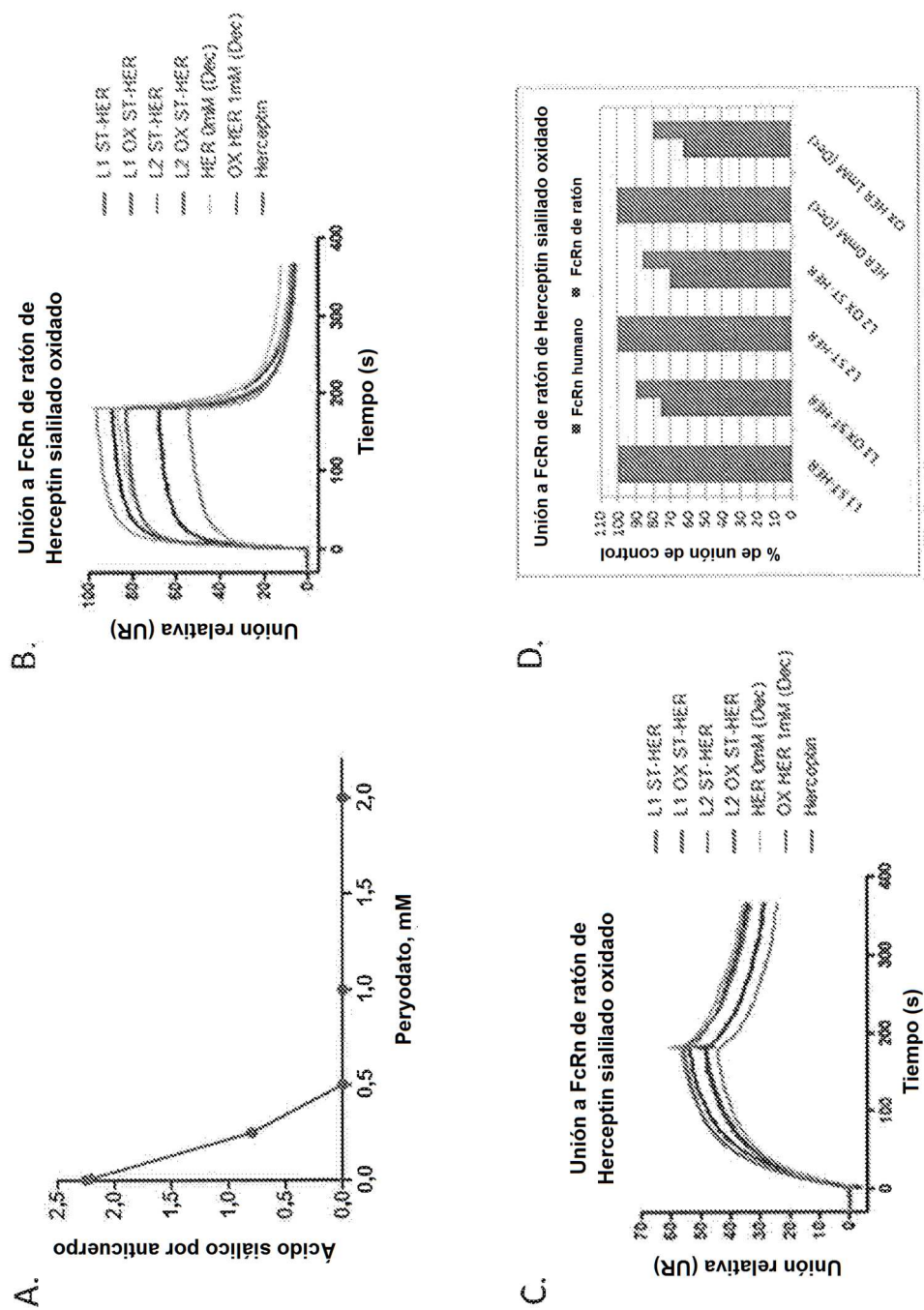


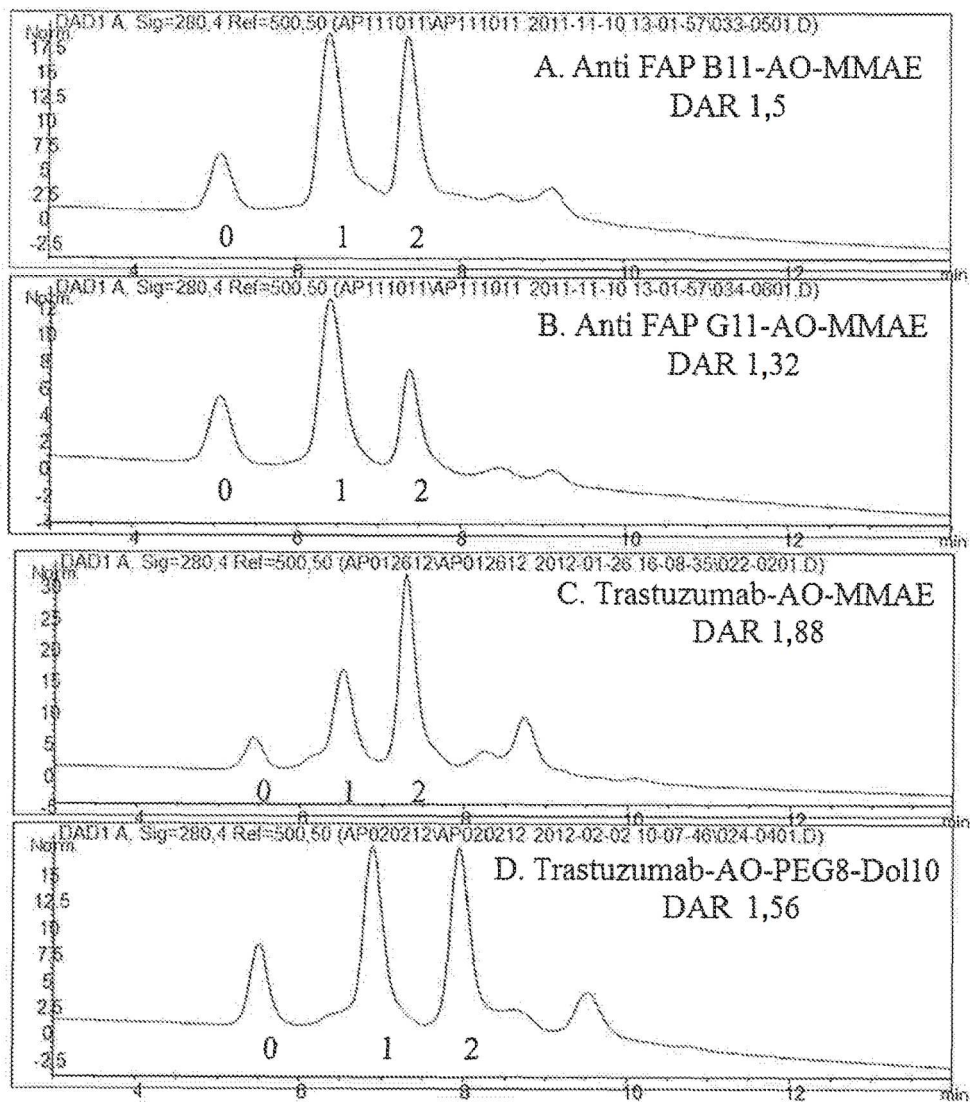
Figura 34

Figura 35

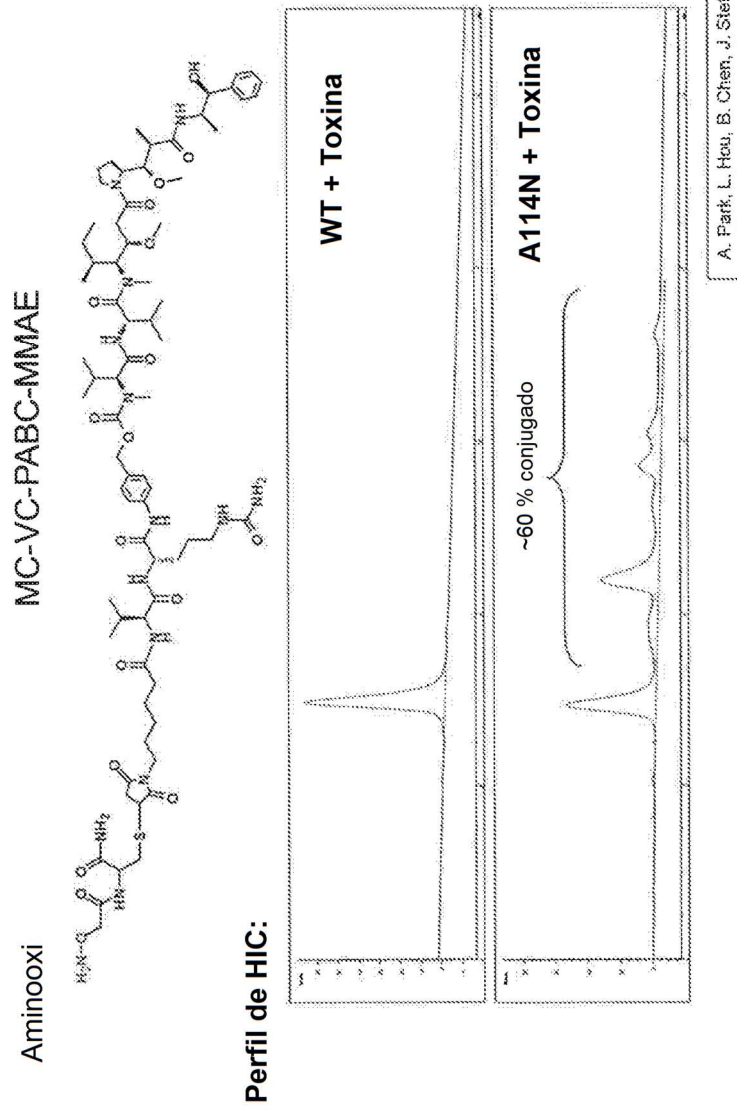


Figura 36

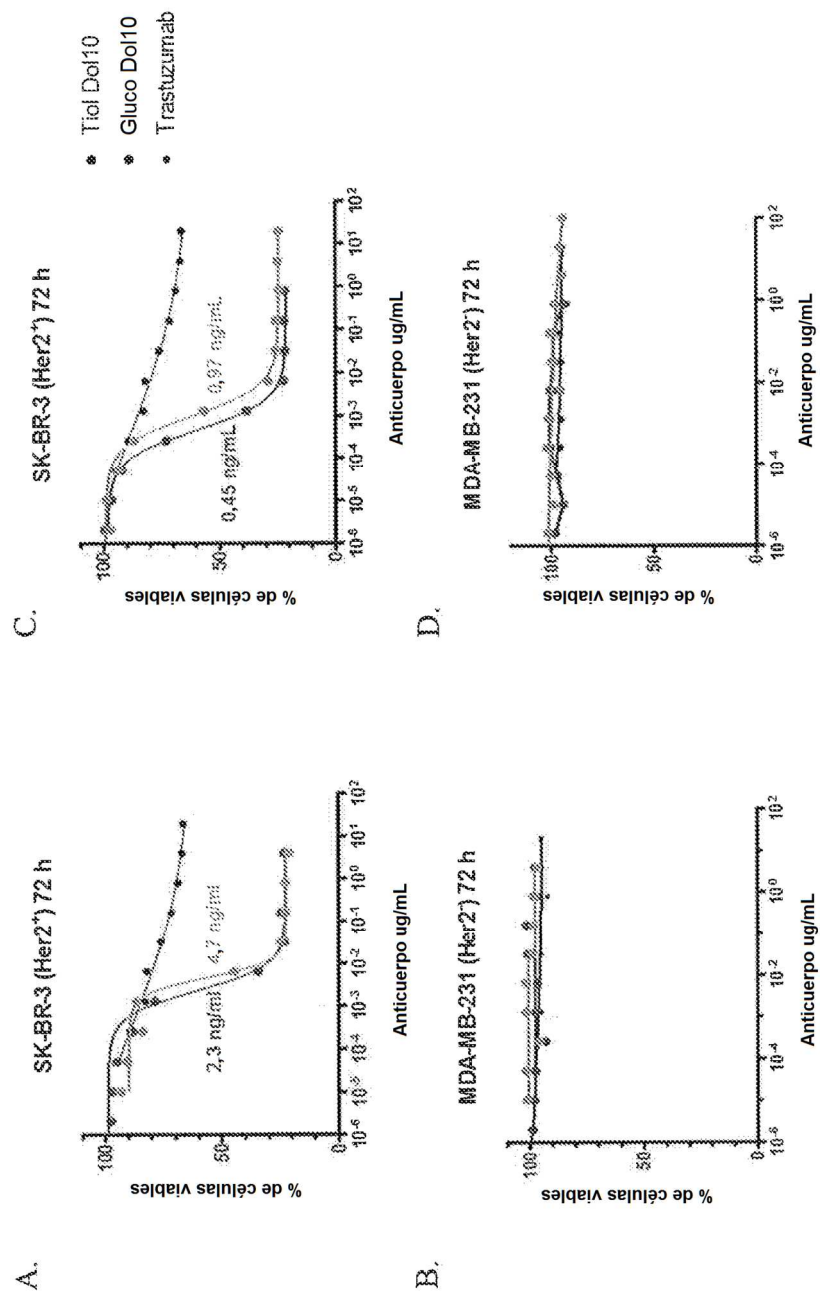


Figura 37

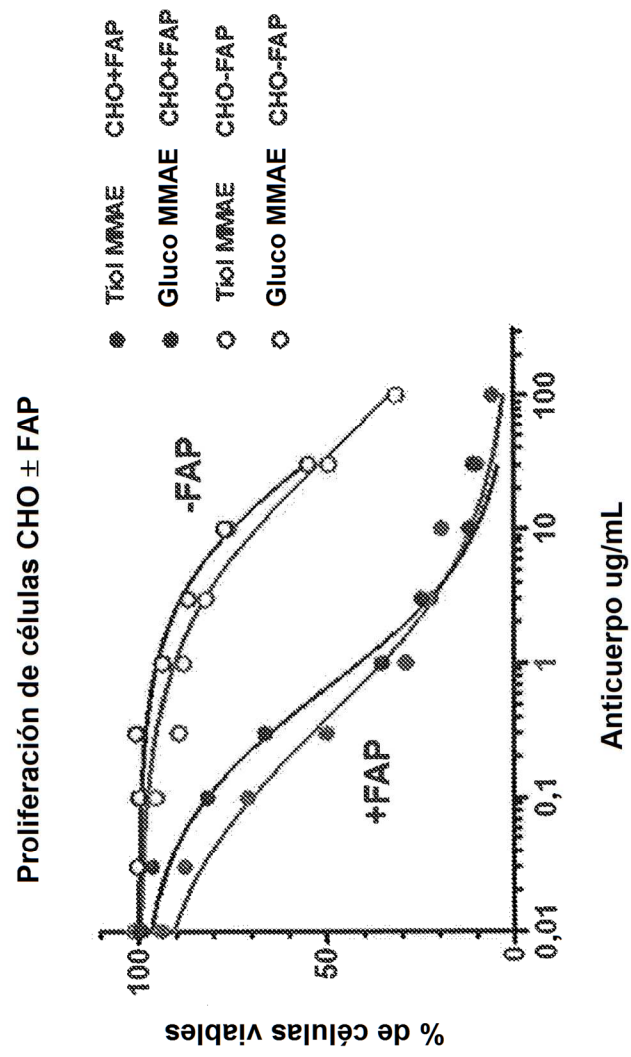


Figura 38

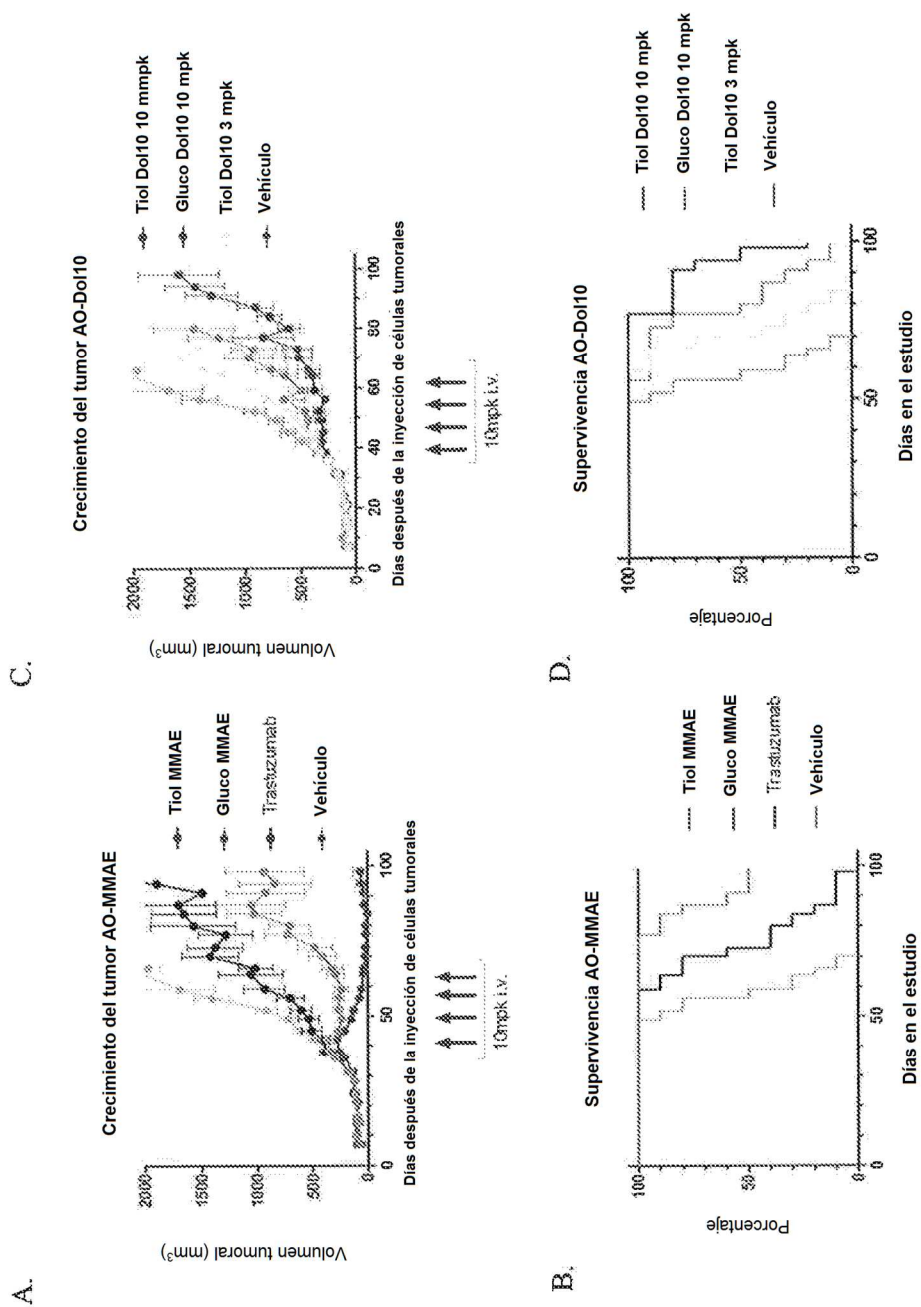


Figura 39

CL/EM de la cadena pesada de S298N/T299A/Y300S (NNAS)

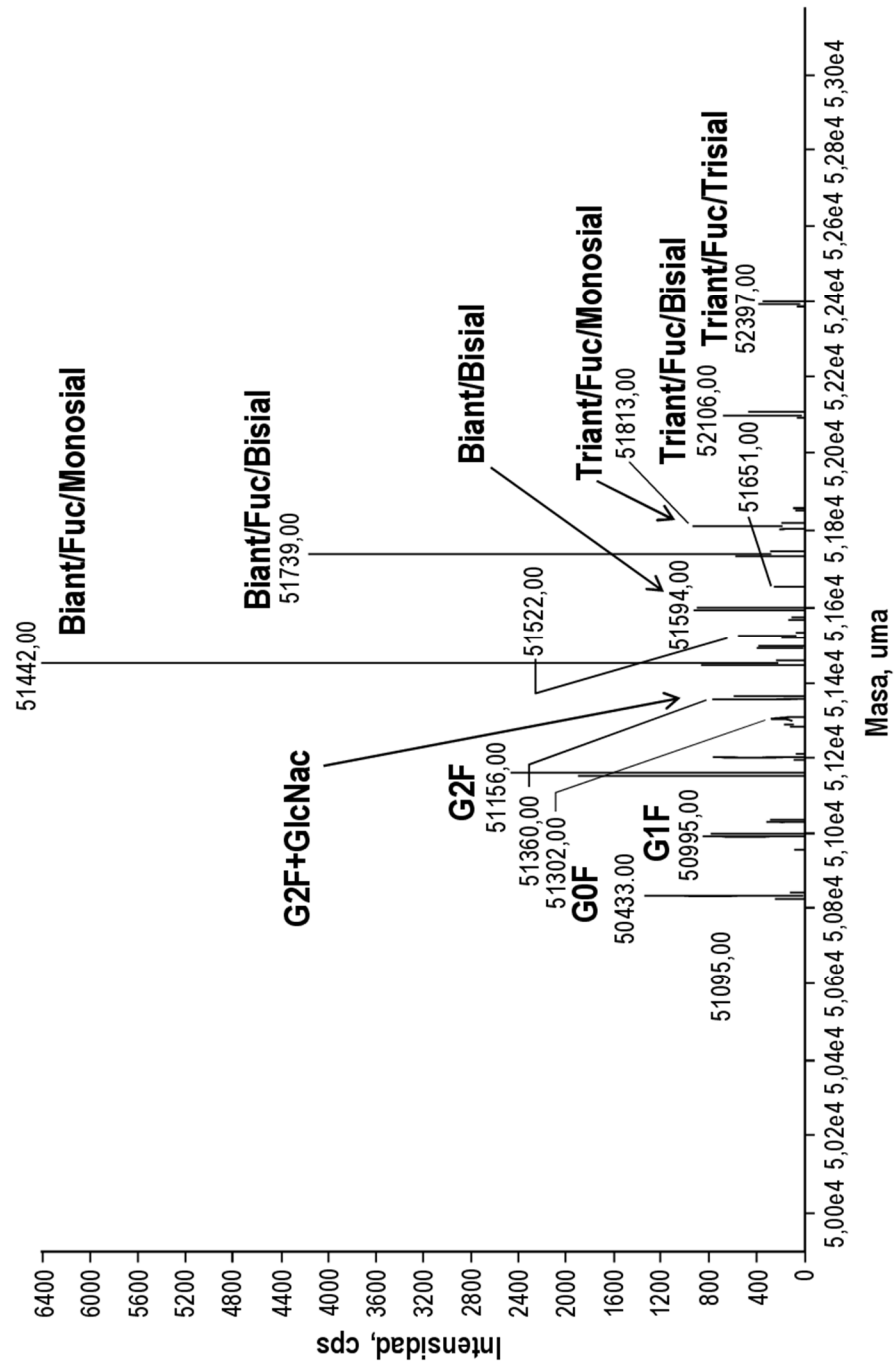


Figura 40

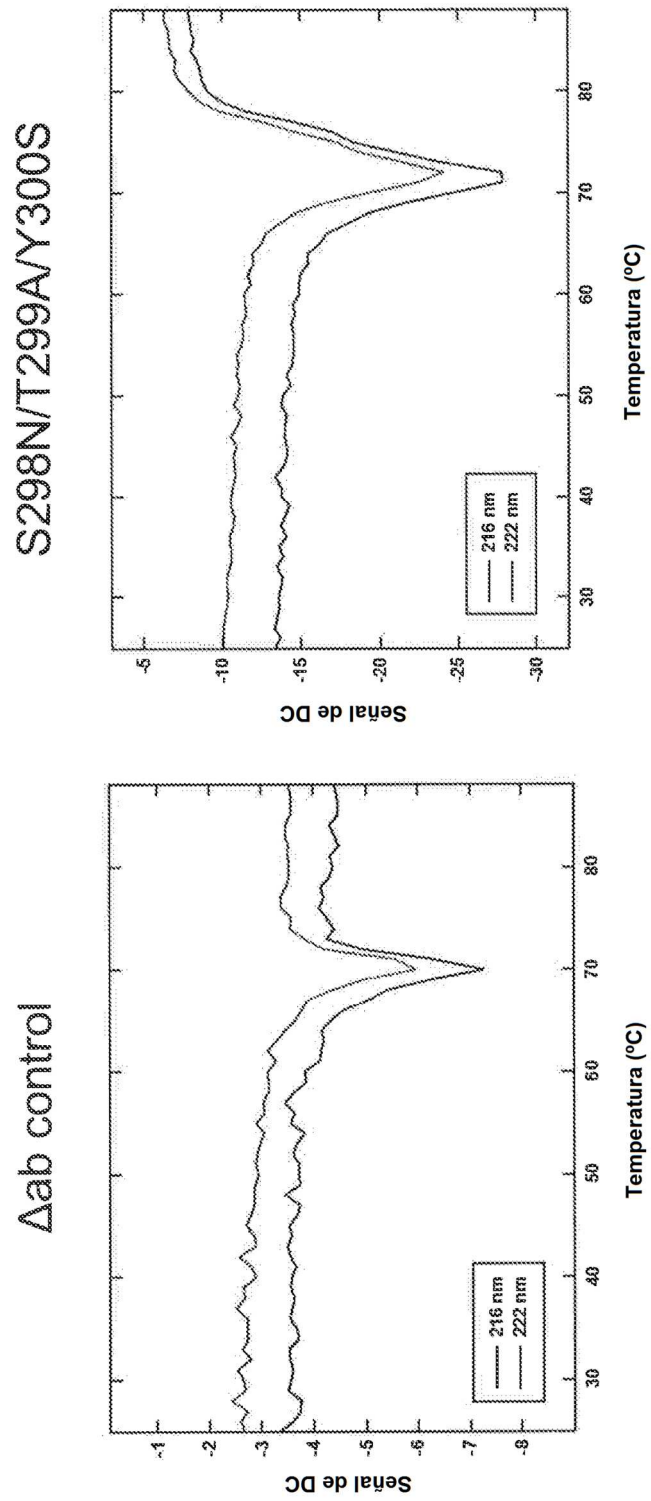


Figura 41

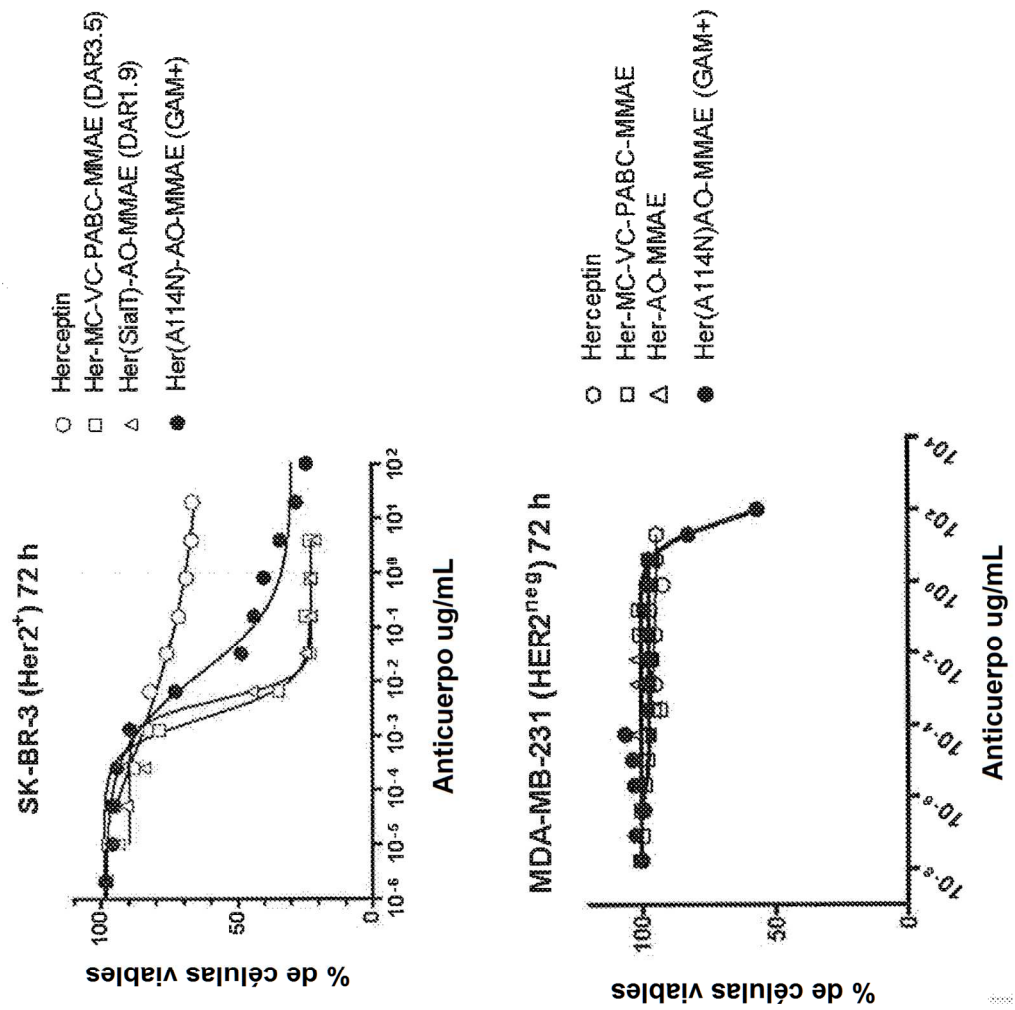


Figura 42

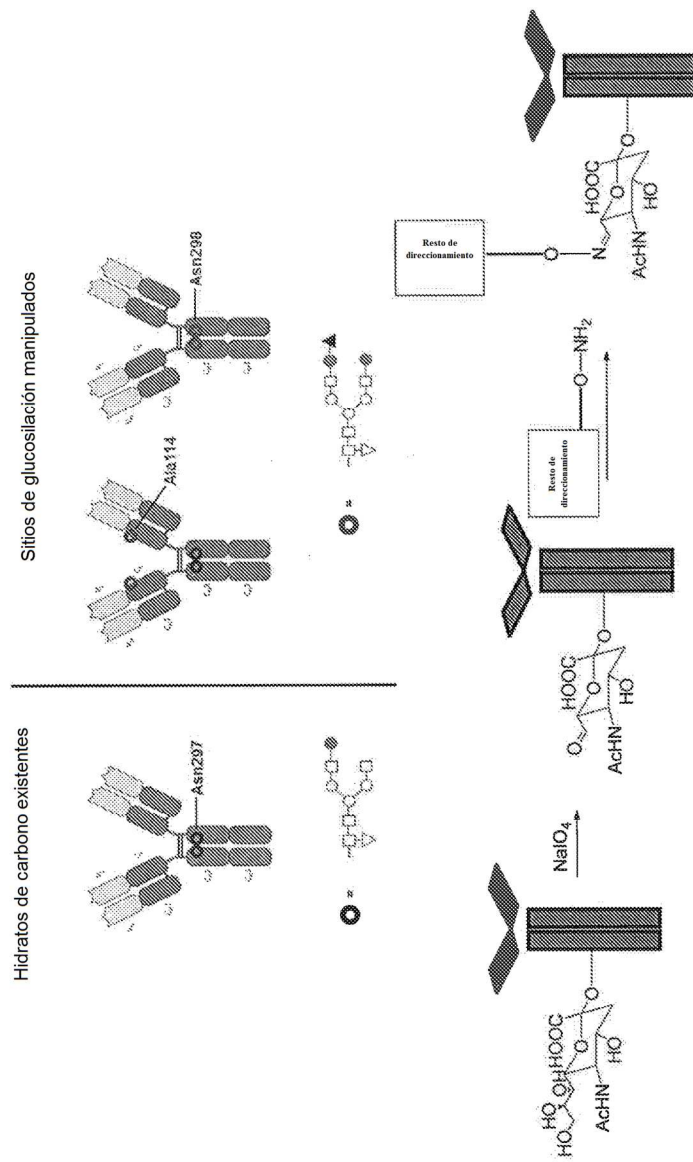


Figura 44

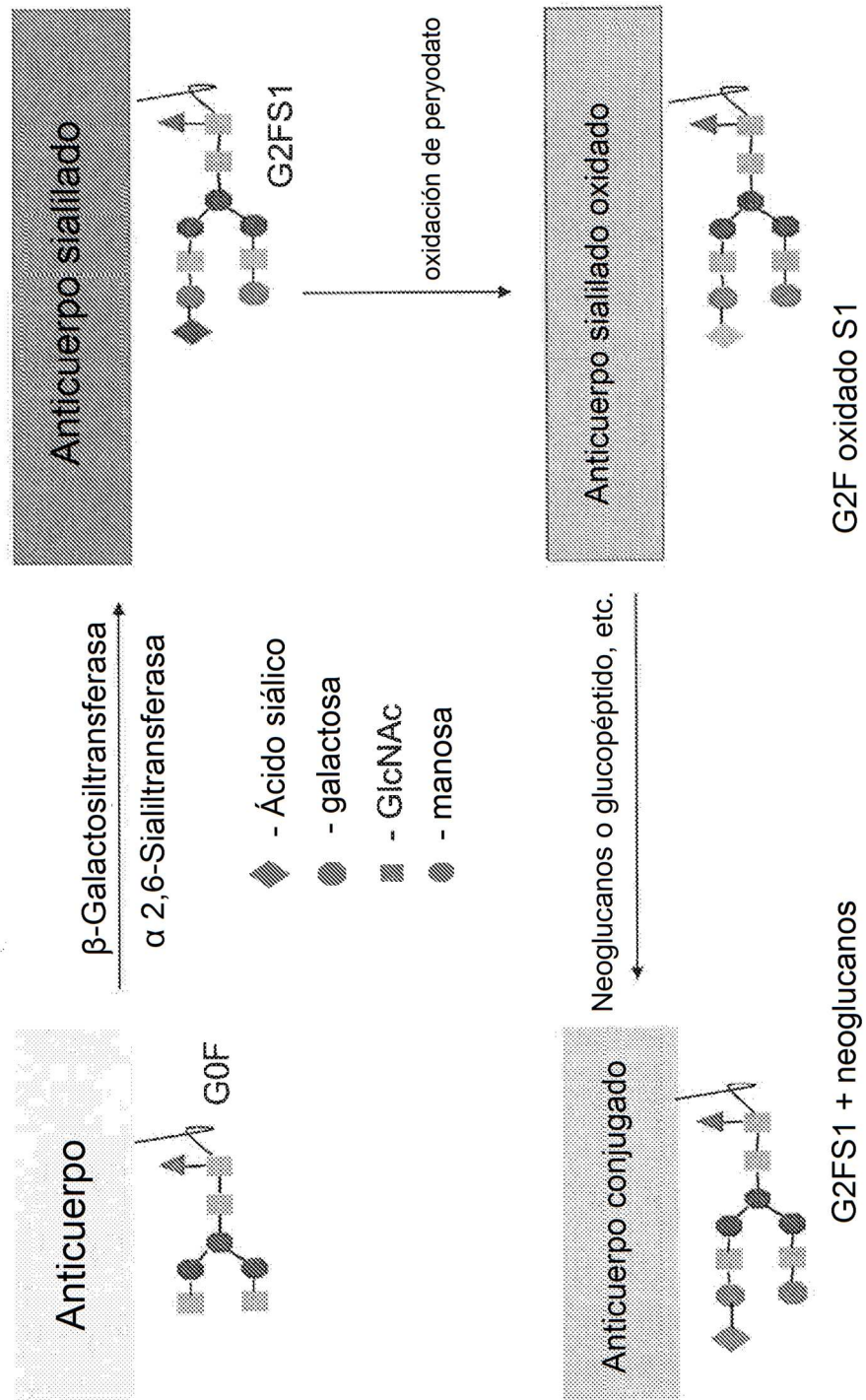
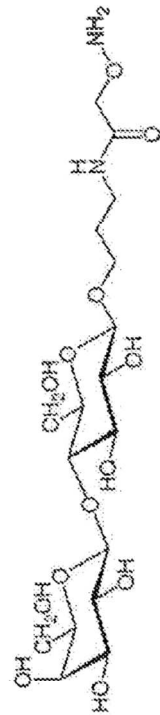


Figura 45

Lactosa aminooxi para glucanos nativos (SAM o GAM):



Masa exacta: 472,19
Peso molecular: 472,44

bisM6P hexamanosa aminooxi
(SAM o GAM):

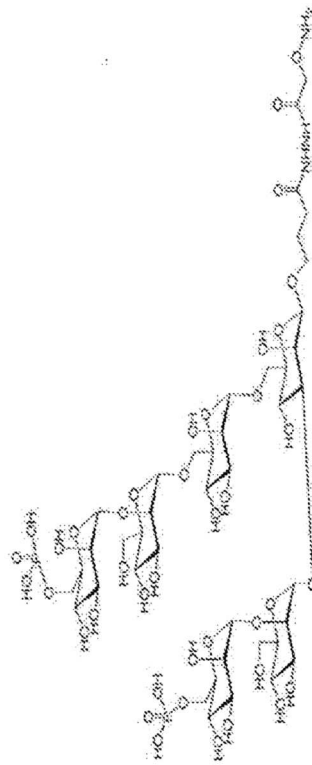


Figura 46

bisM6P hexamanosa aminooxi
(SAM en glucans Fc):

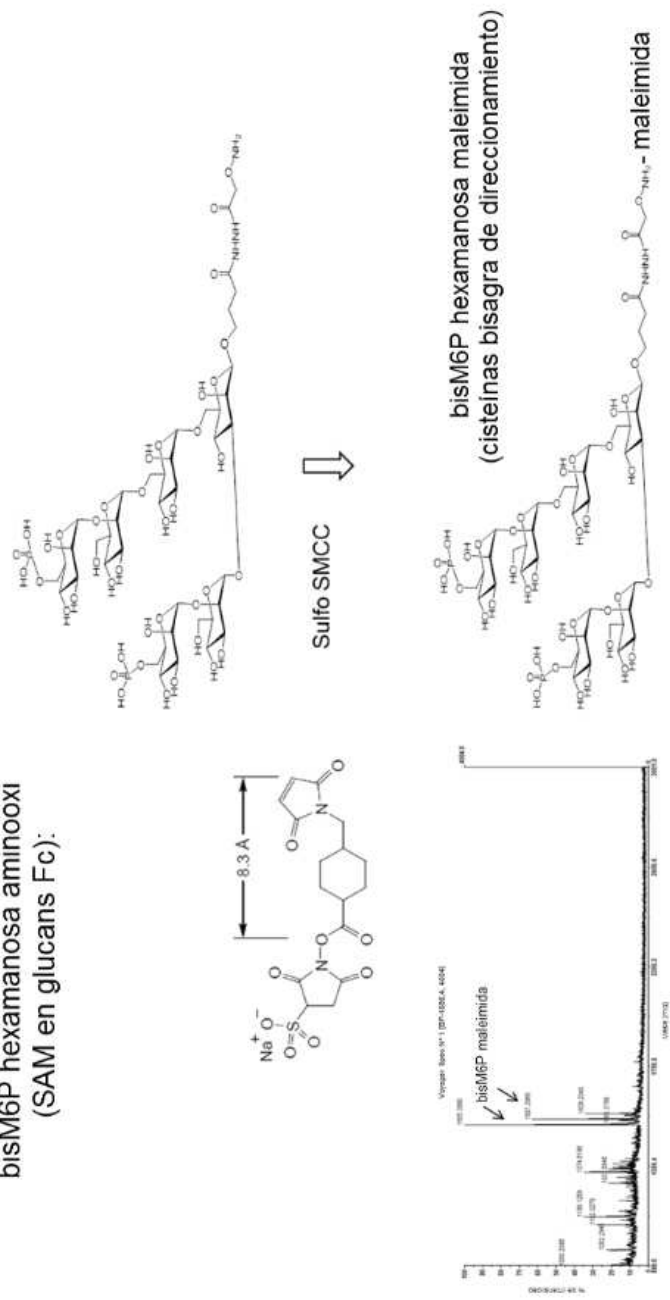


Figura 47

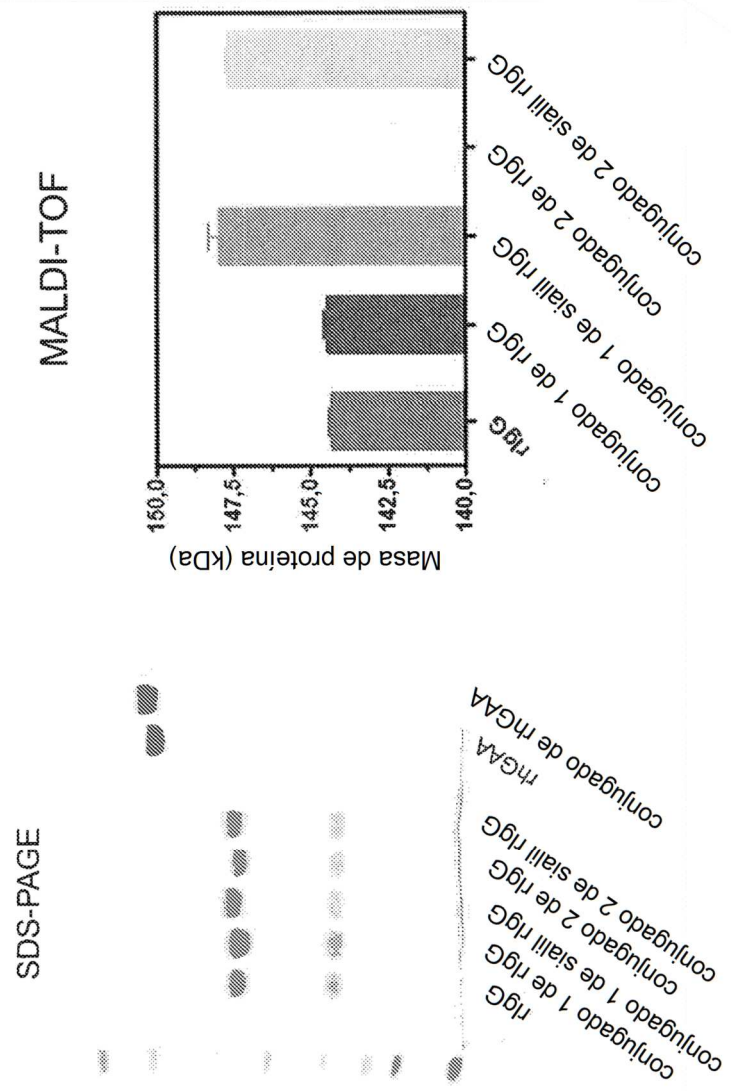


Figura 48

Unión al receptor de M6P

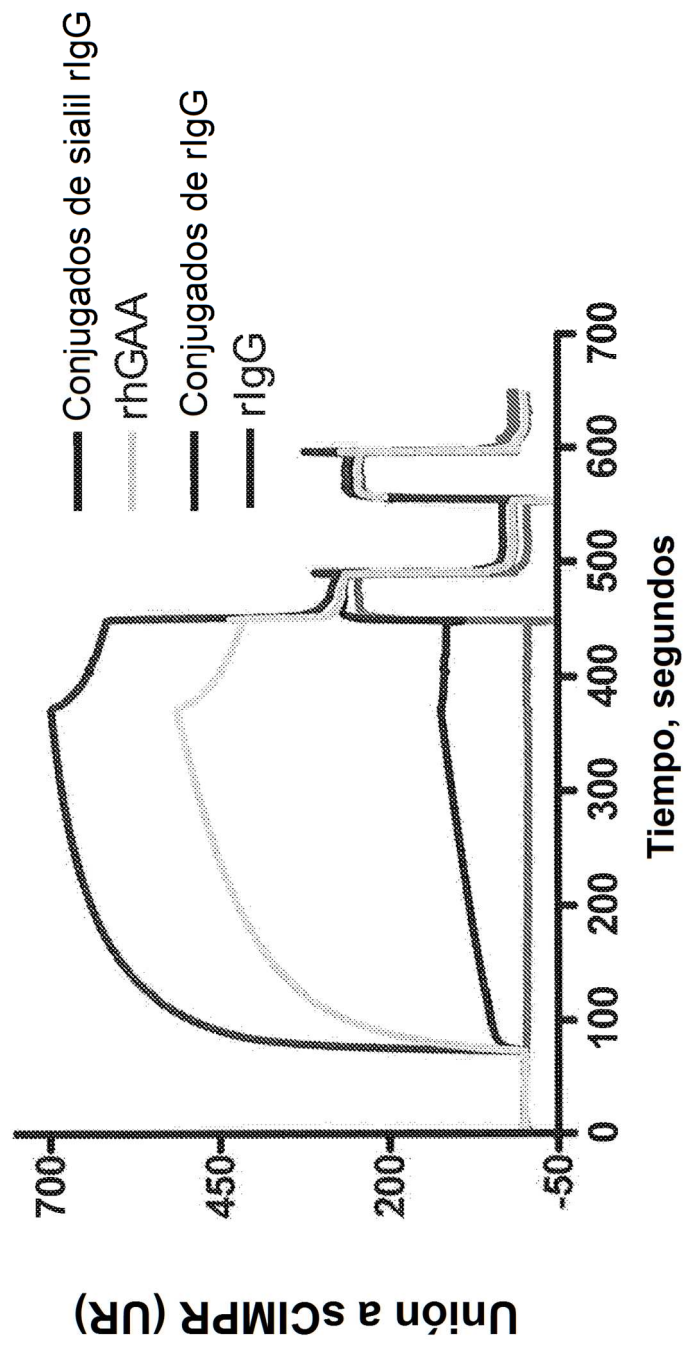
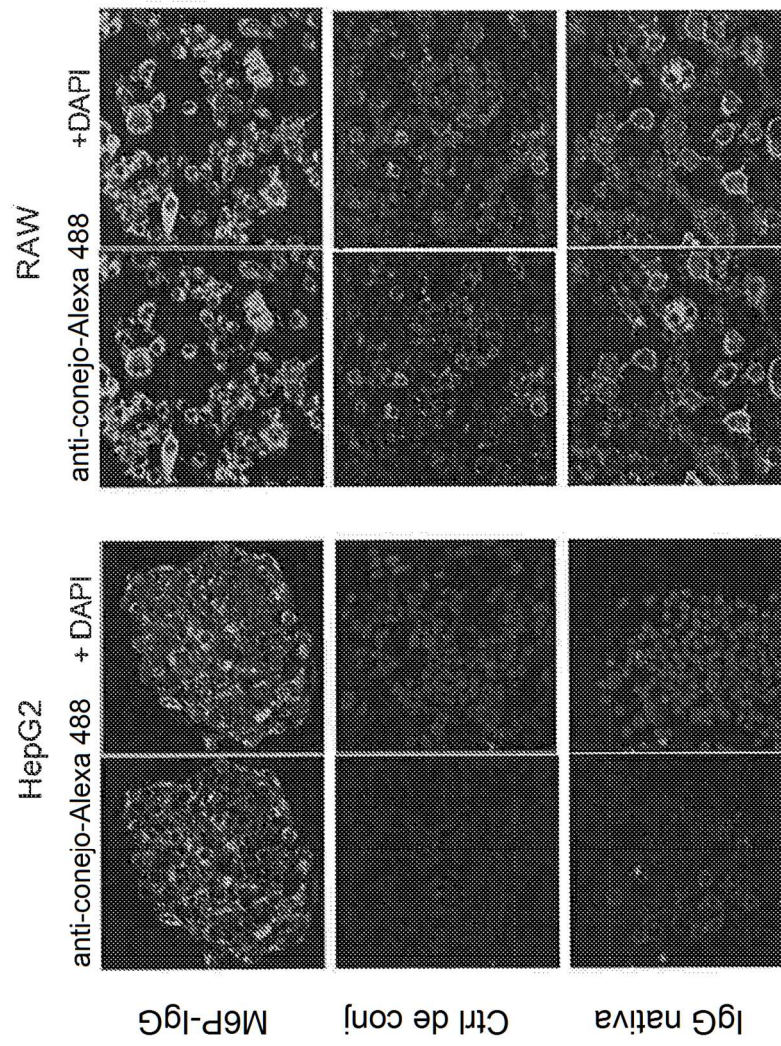


Figura 49



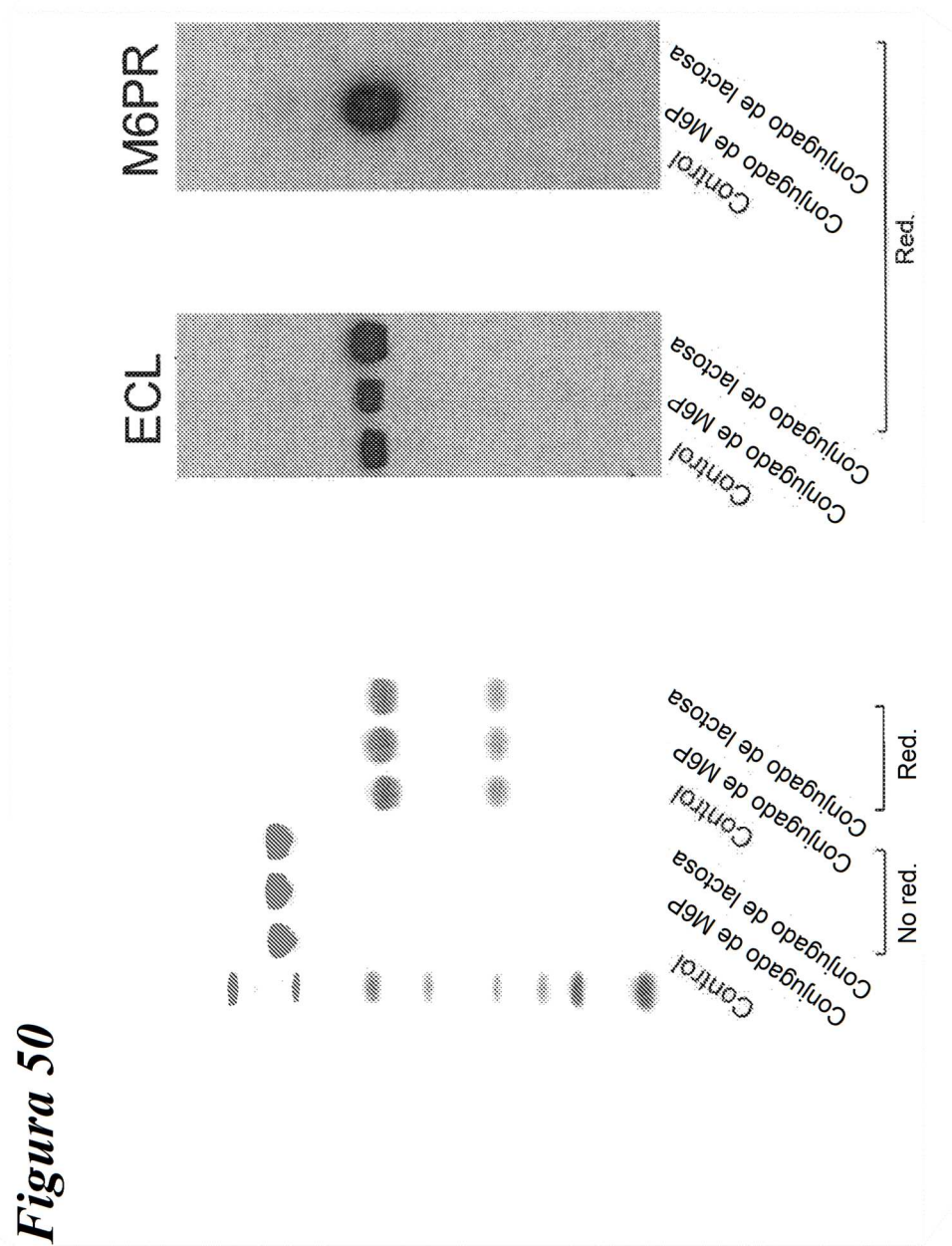


Figura 51

Muestras	MW (kDa)	Nº de glucano
Control	145,42 ± 0,24	0,00
Conjugado de M6P	147,95 ± 0,09	1,92
Conjugado de lactosa	146,35 ± 0,36	1,96

Figura 52

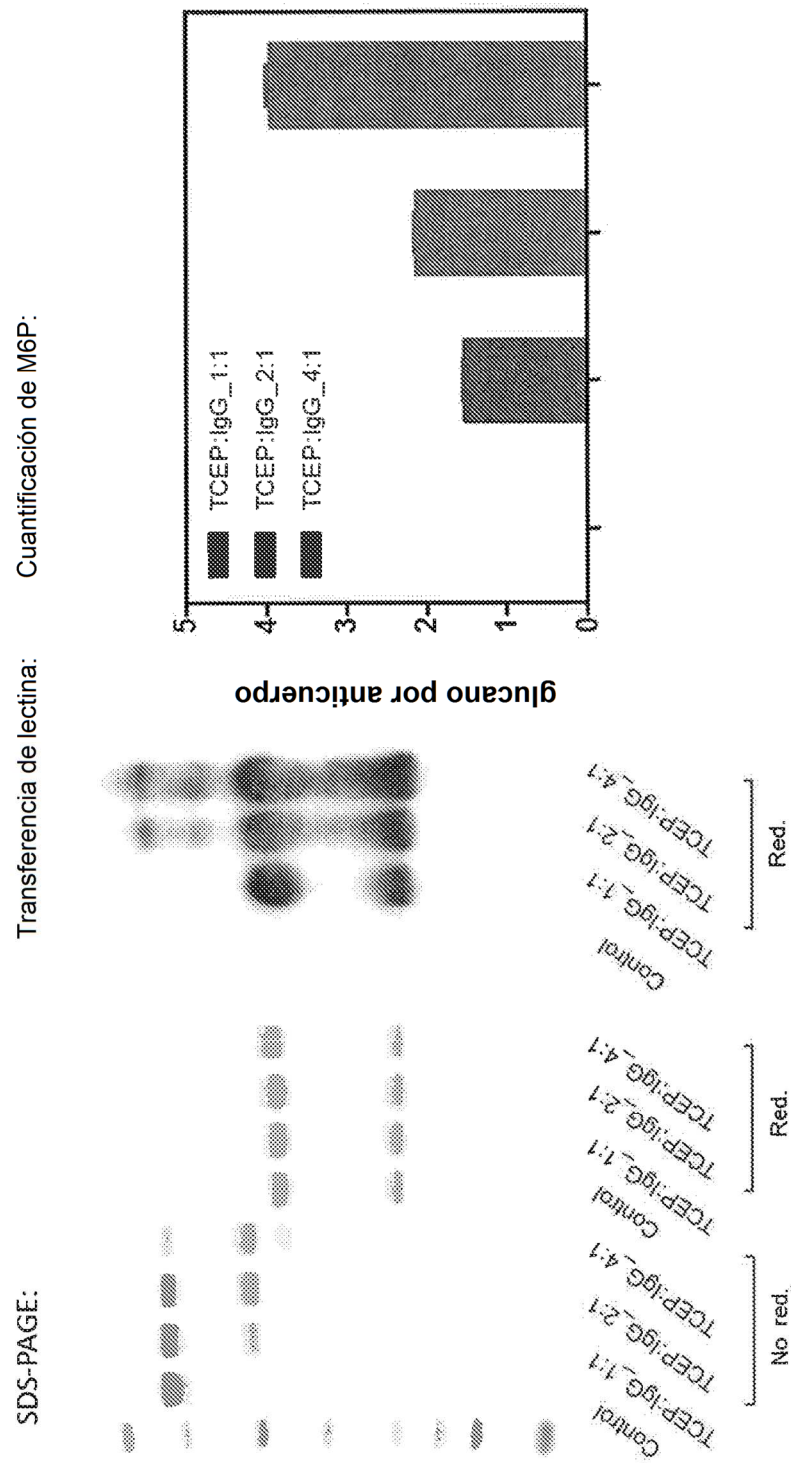
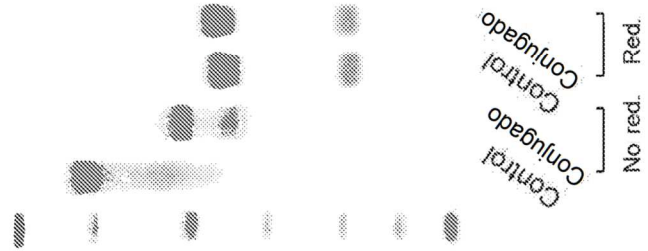


Figura 53

SDS-PAGE:



Cuantificación de galactosa:

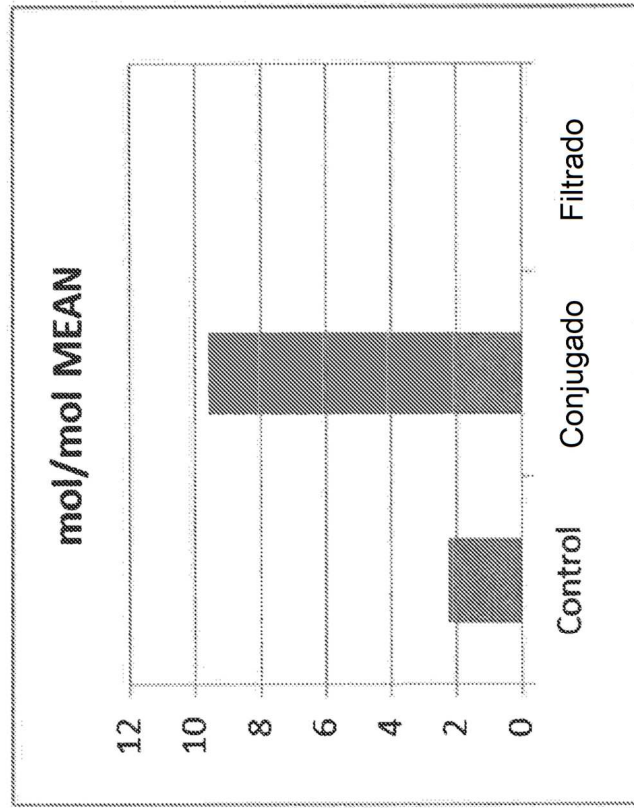


Figura 54

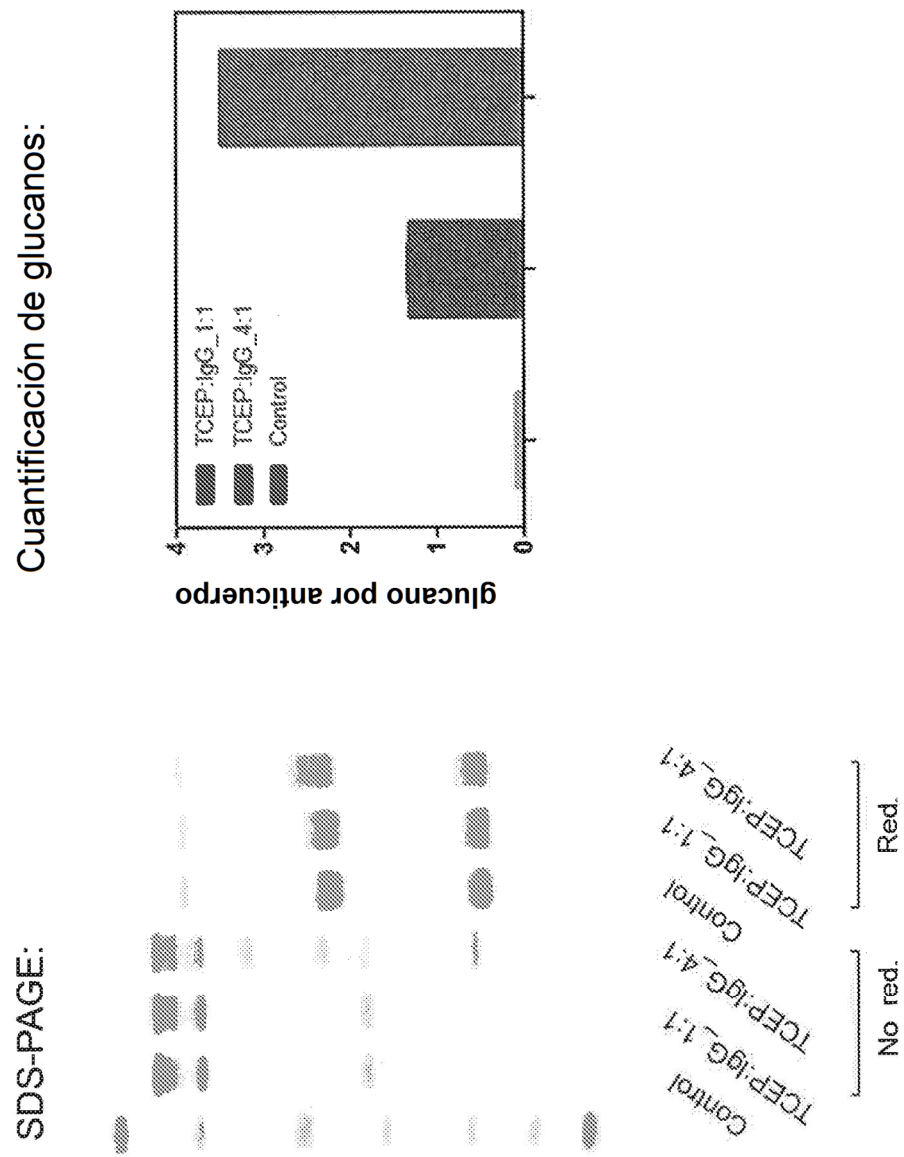


Figura 55

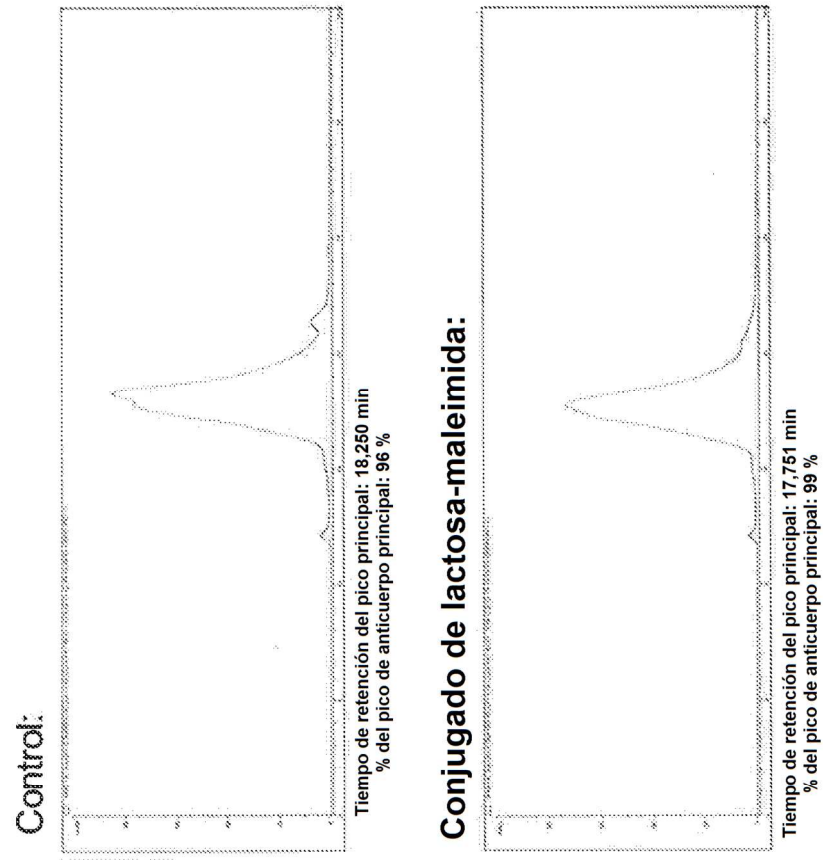


Figura 56

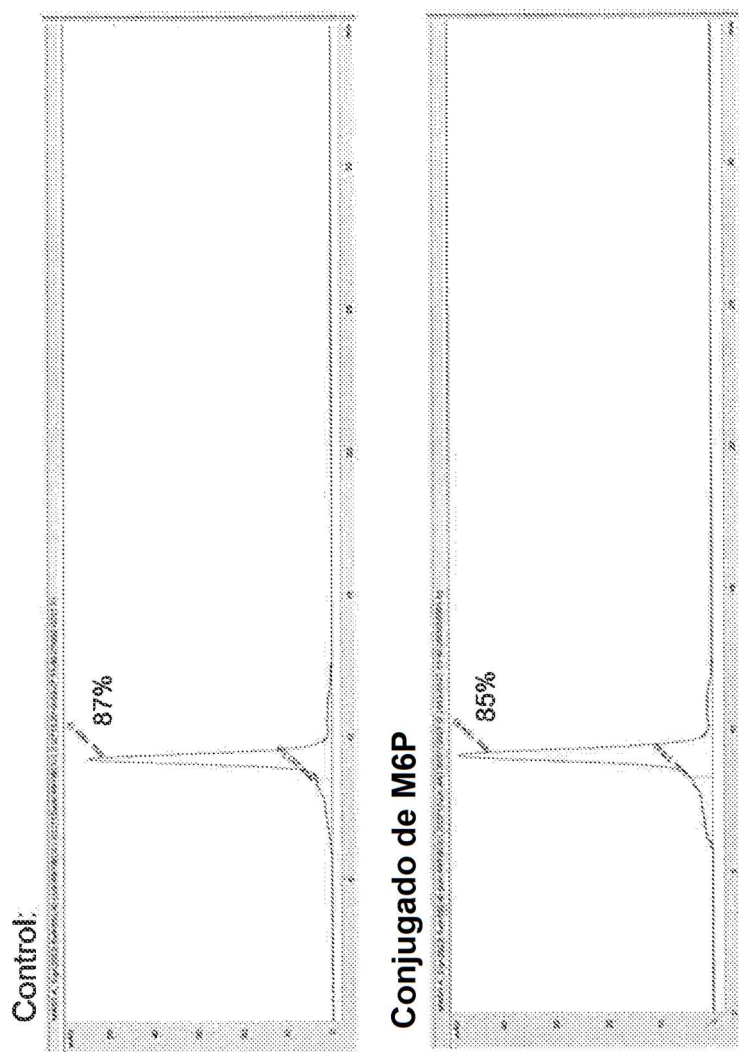


Figura 57

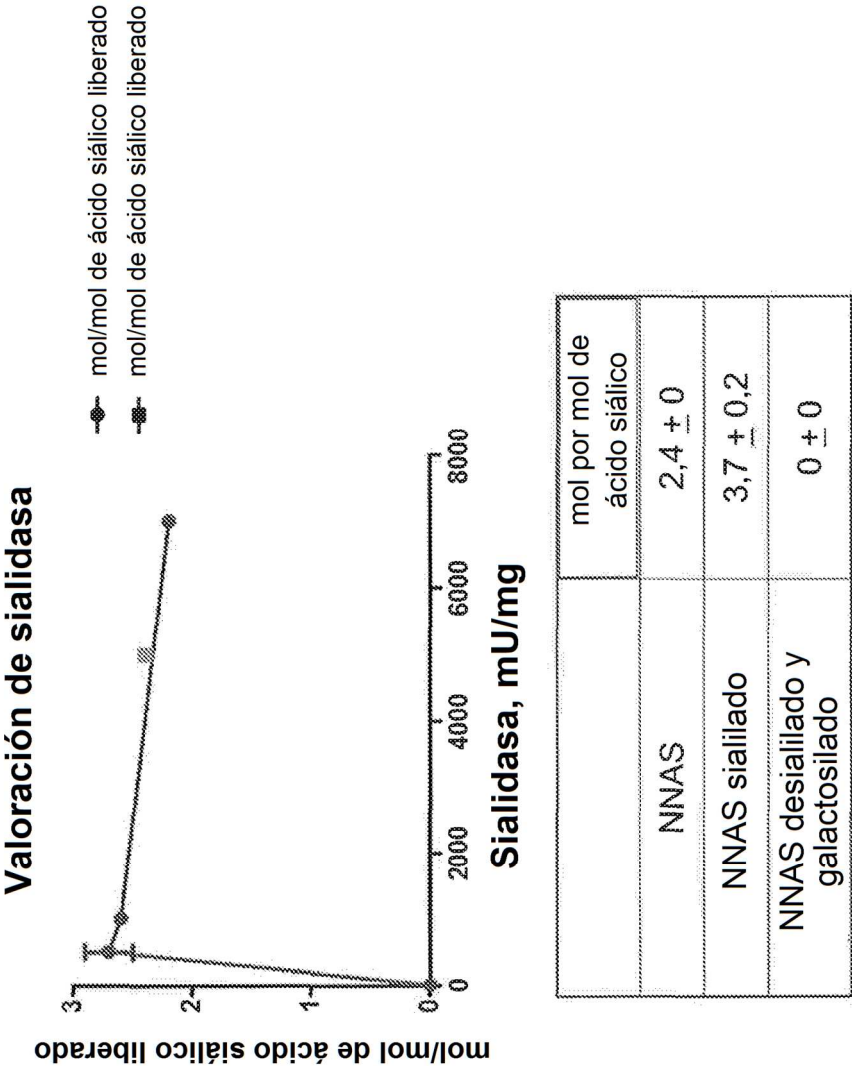


Figura 58

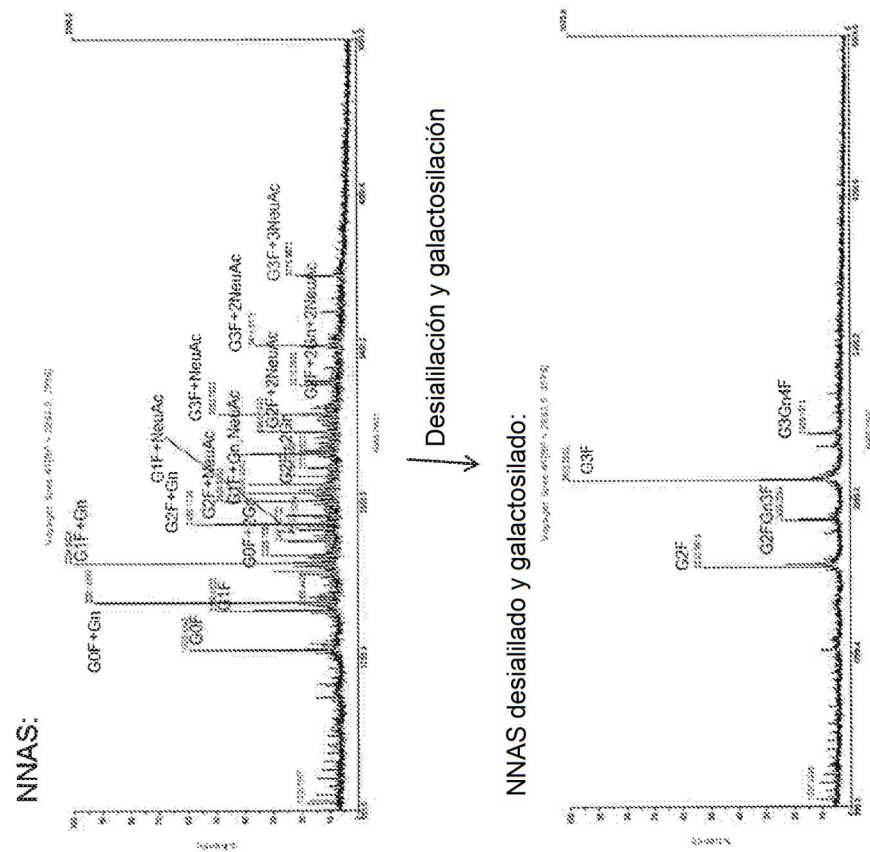


Figura 59

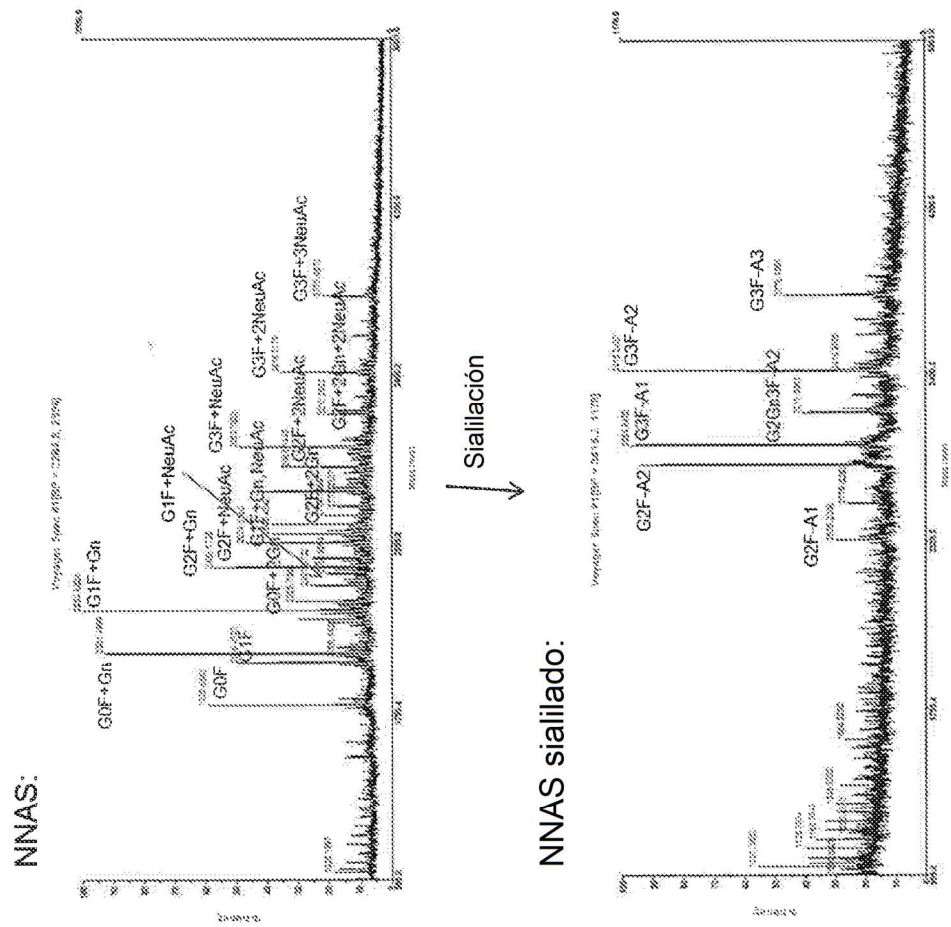


Figura 60

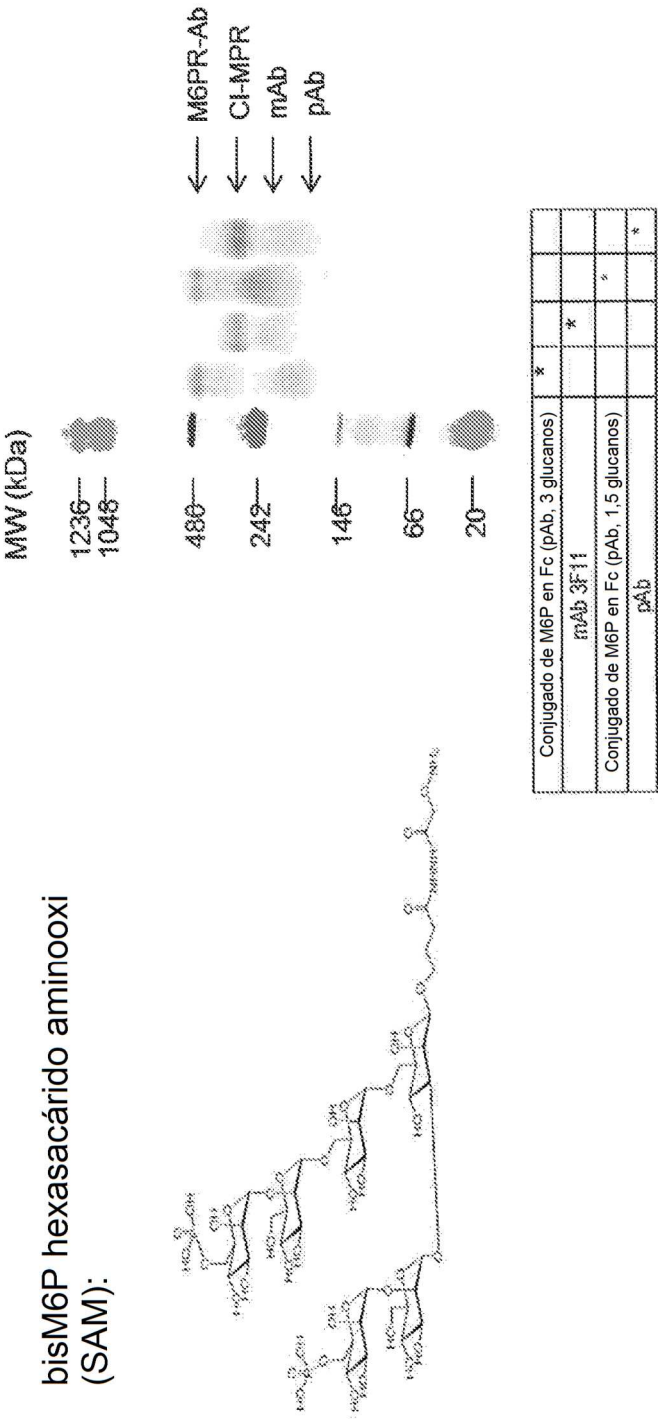


Figura 61

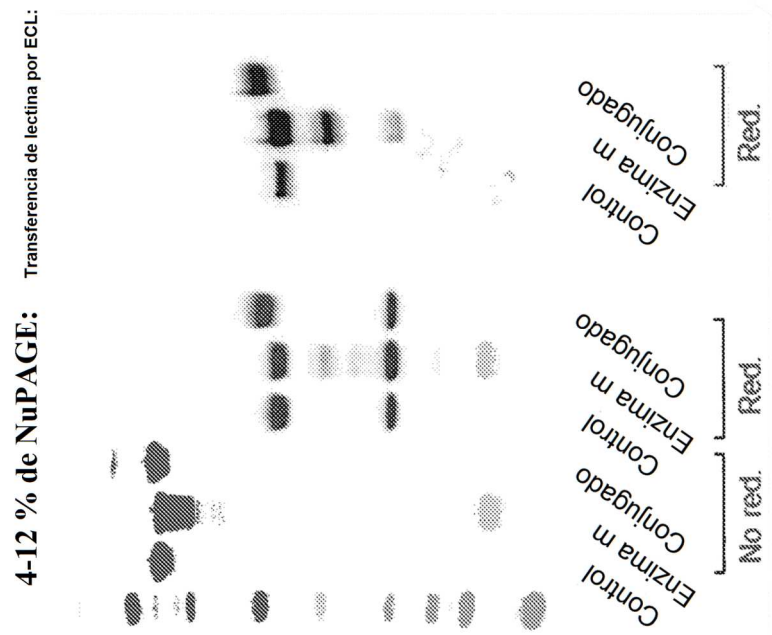


Figura 62

	mol de galactosa por mol de Ab	mol de glucopéptido por mol de Ab
NNAS	1,4 + 0	0
NNAS desialilado/galactosilado	7,4 + 0,3	0
Conjugado de NNAS	9,4 + 0	3,1

Figura 63

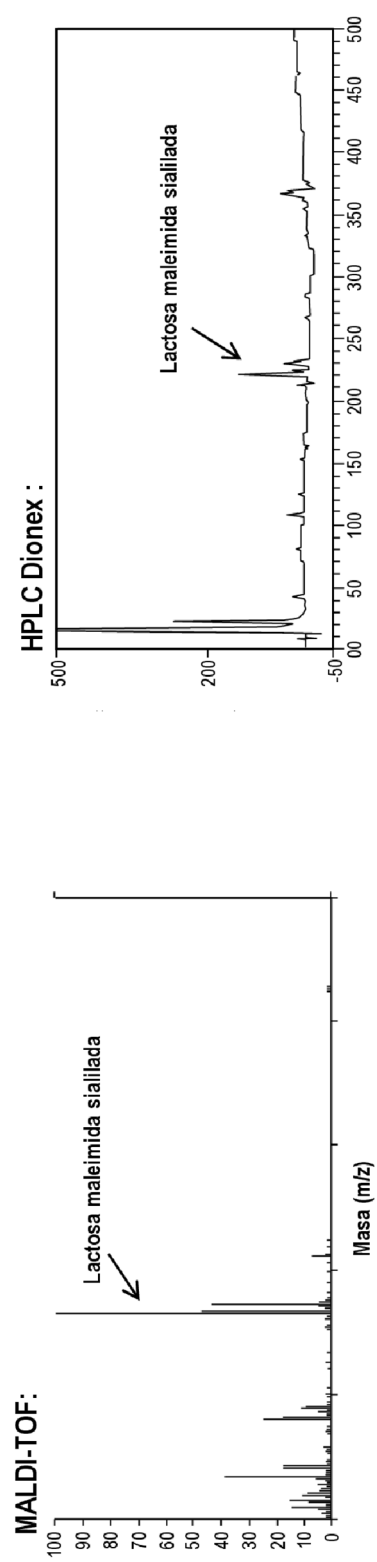


Figura 64

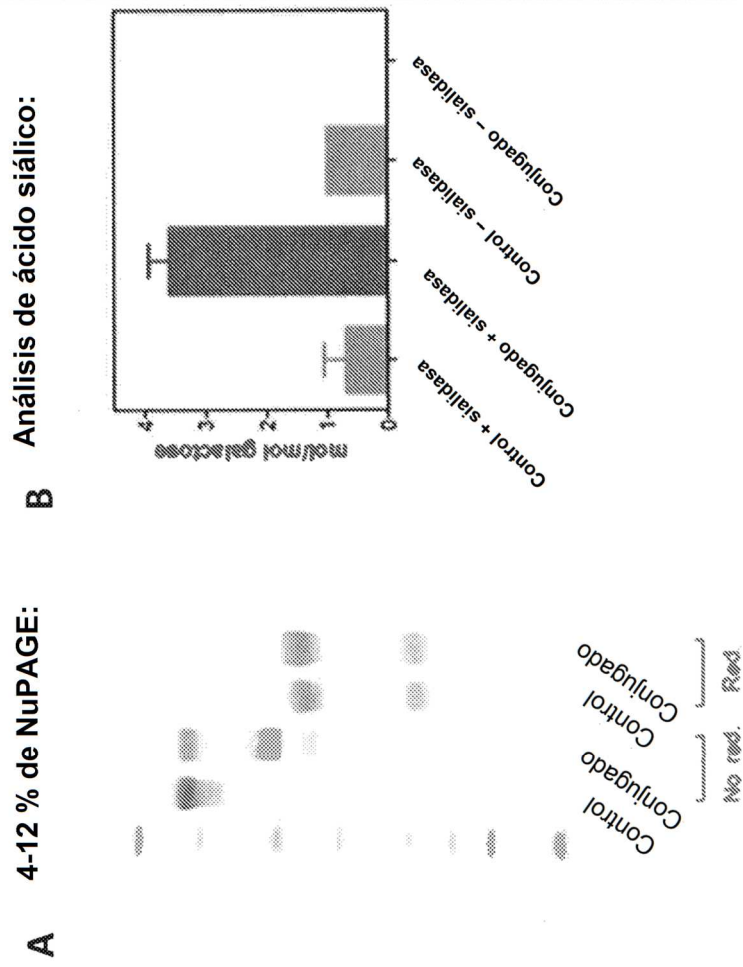


Figura 65

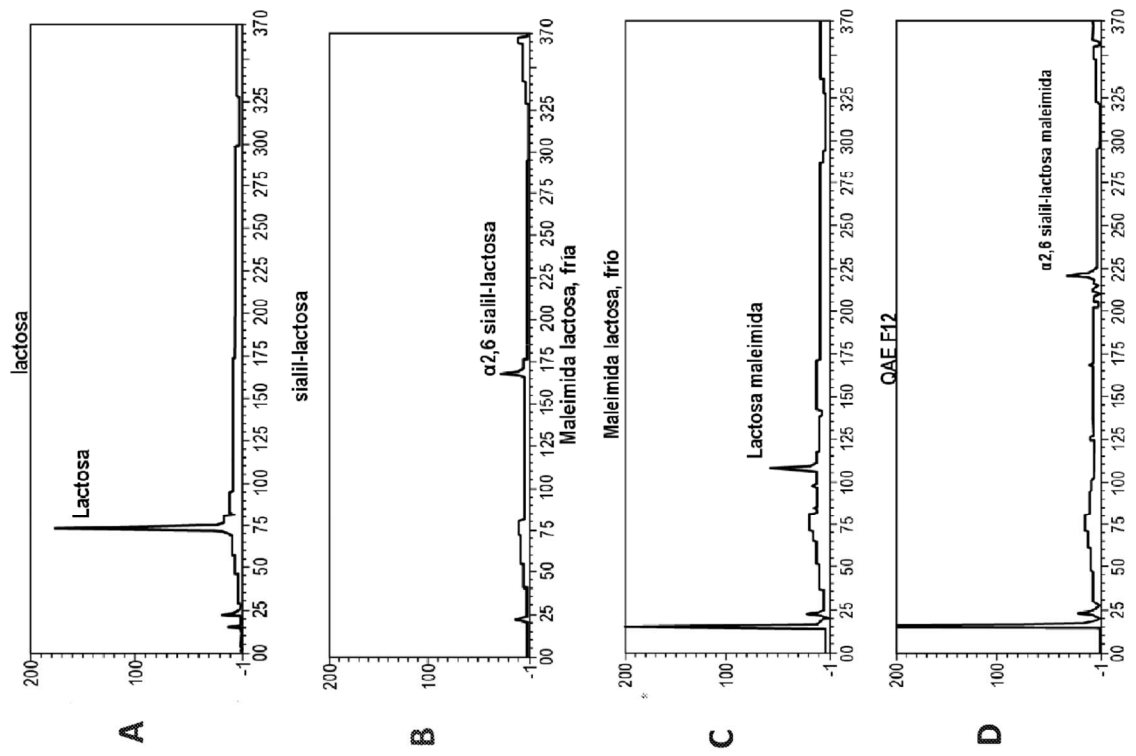


Figura 66

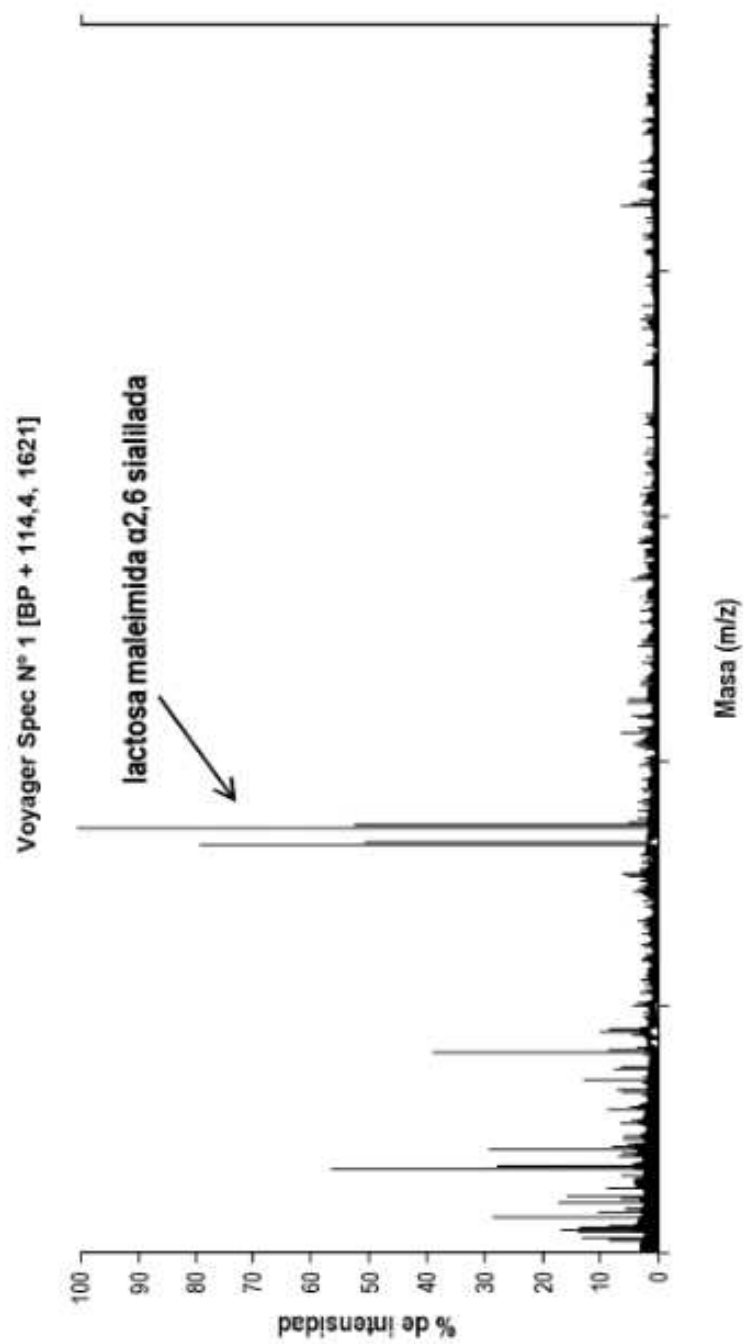


Figura 67

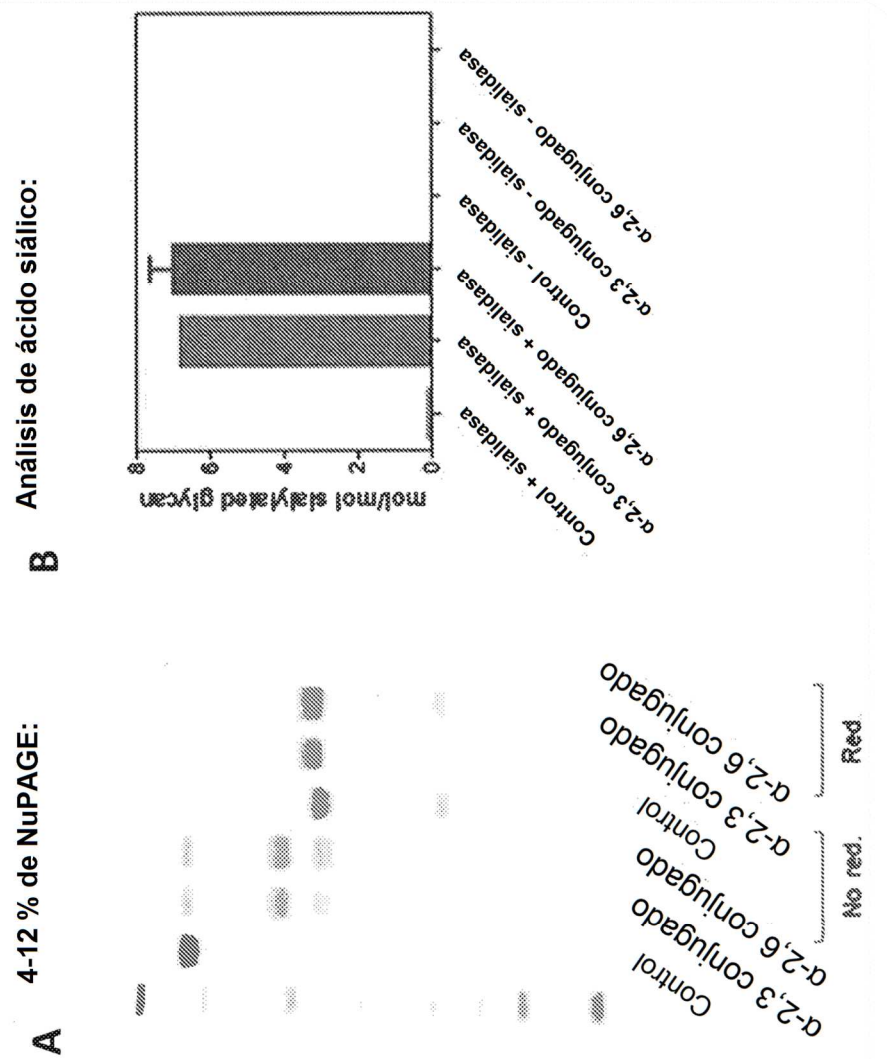


Figura 68

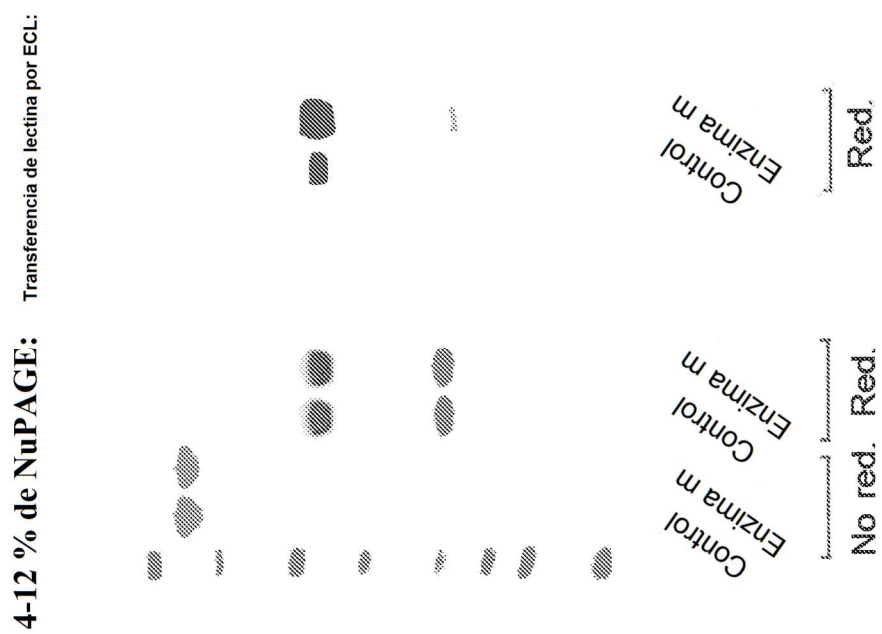


Figura 69

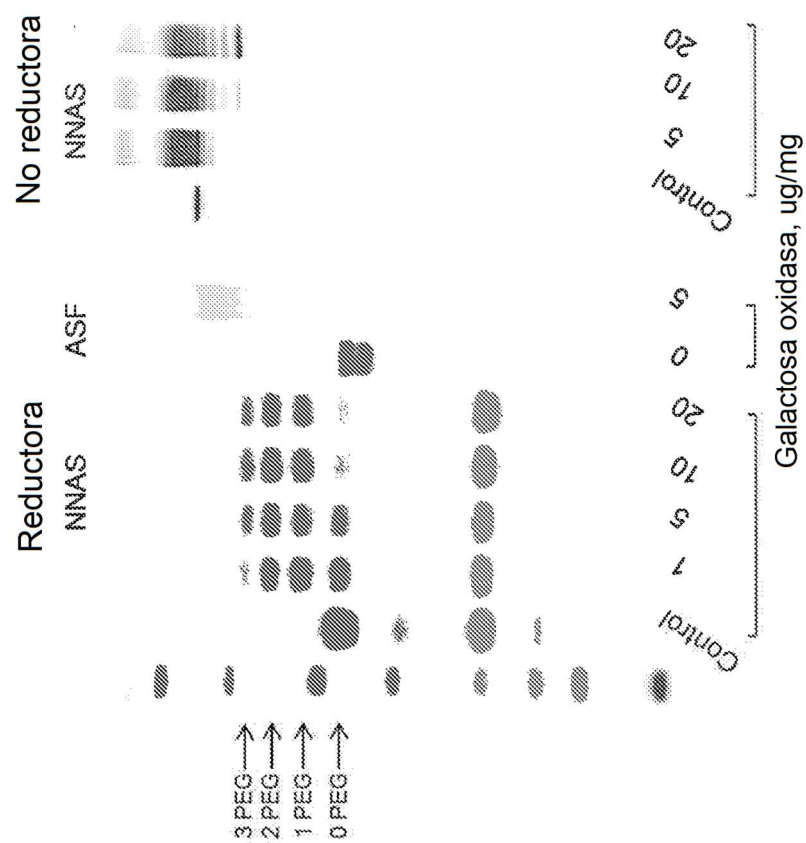


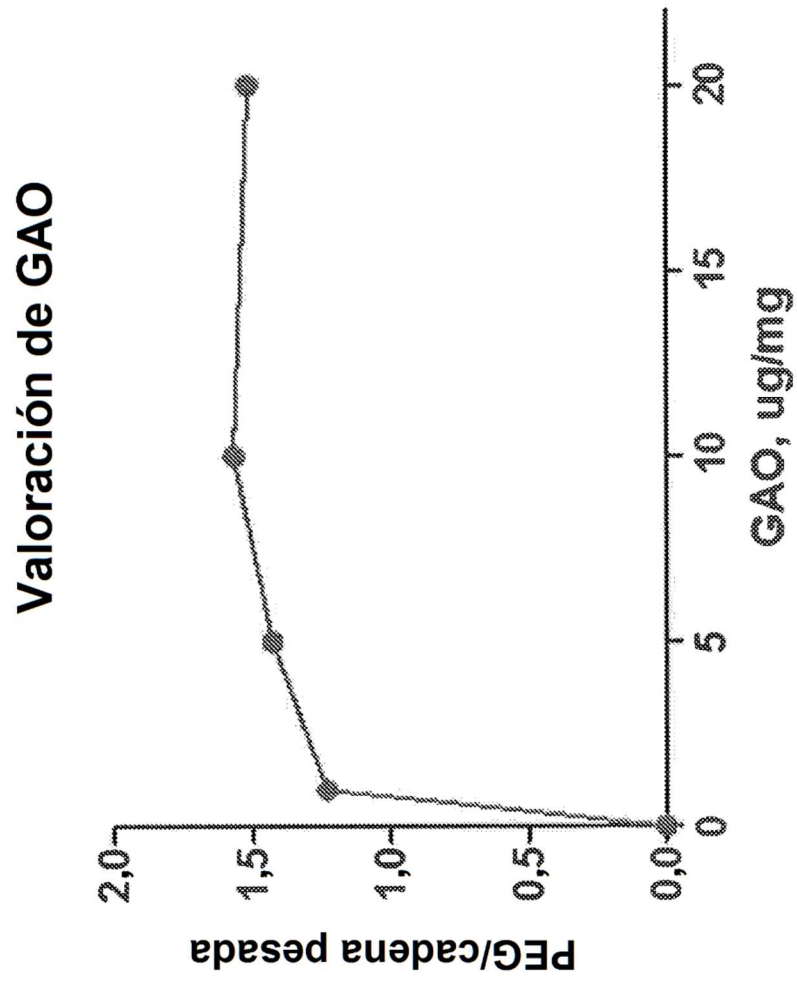
Figura 70

Figura 71

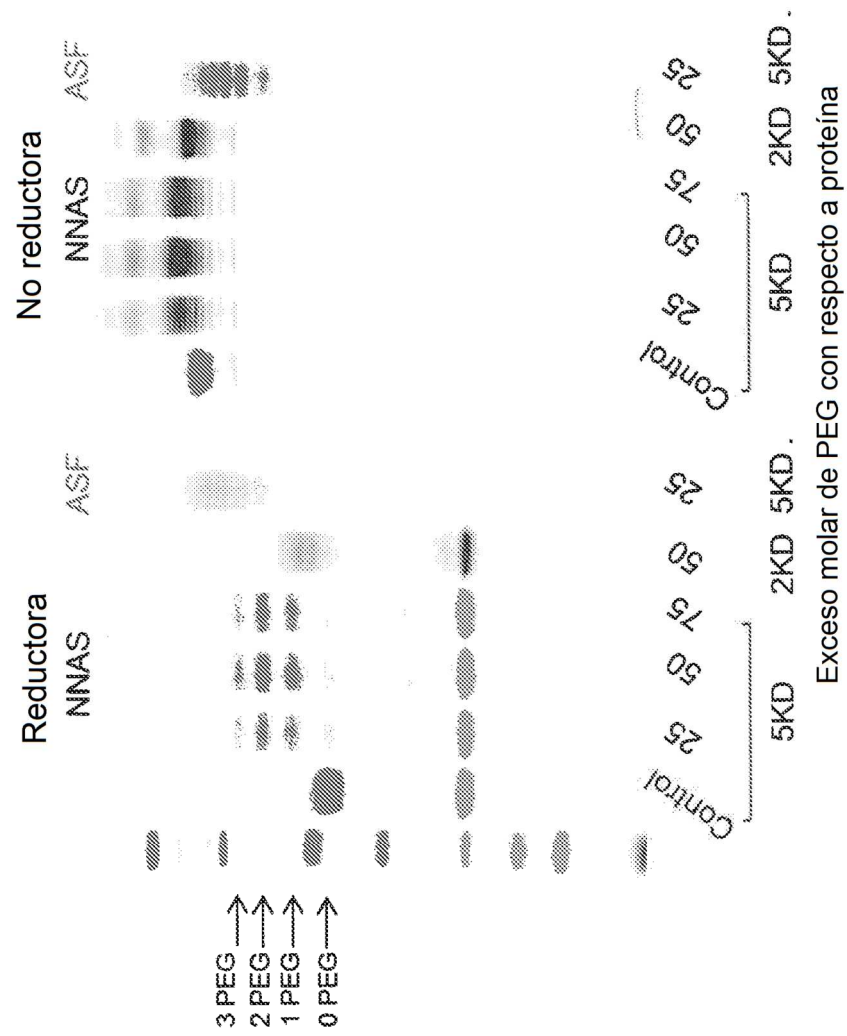


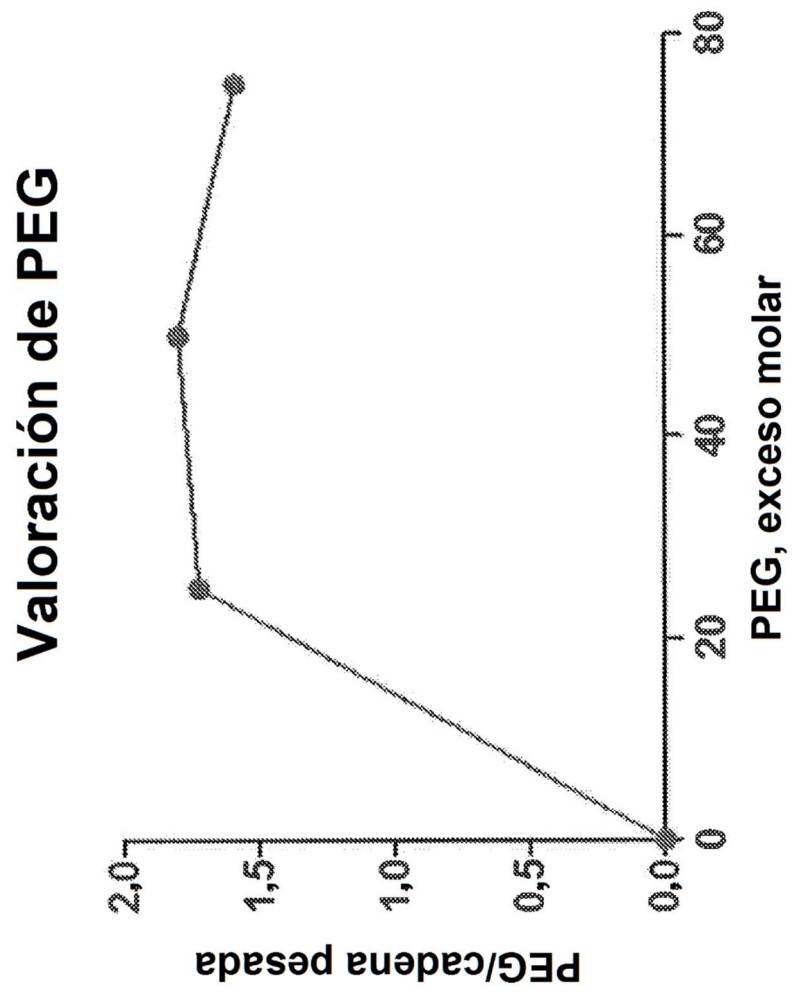
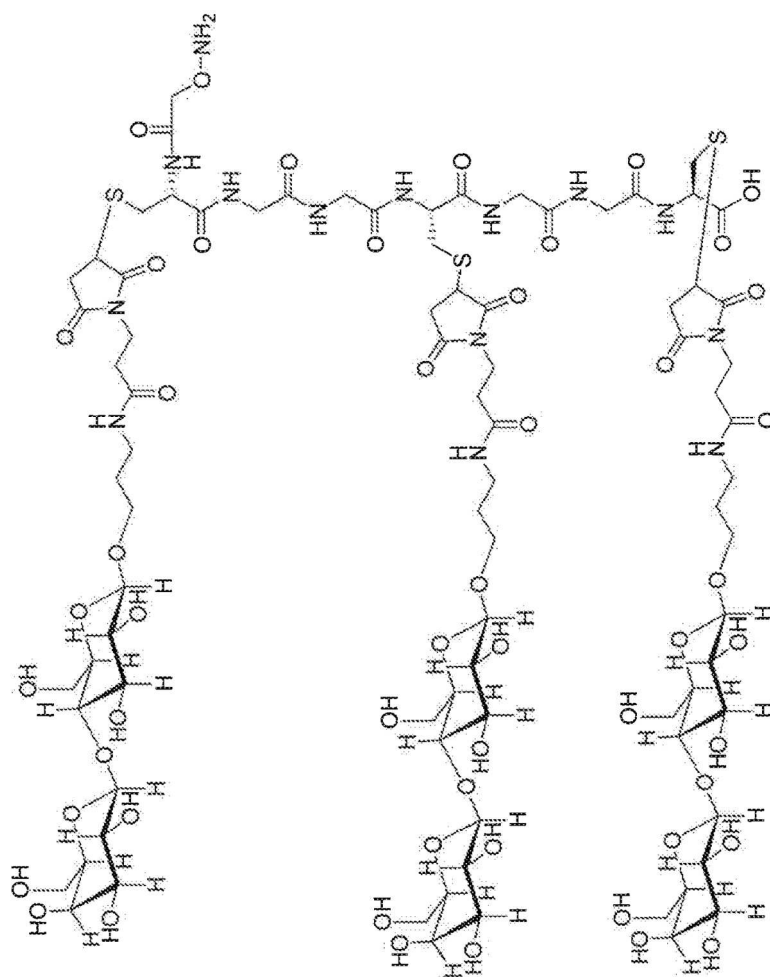
Figura 72

Figura 73



Glucopéptido aminooxi: lactosa₃-Cys₃-Gly₄

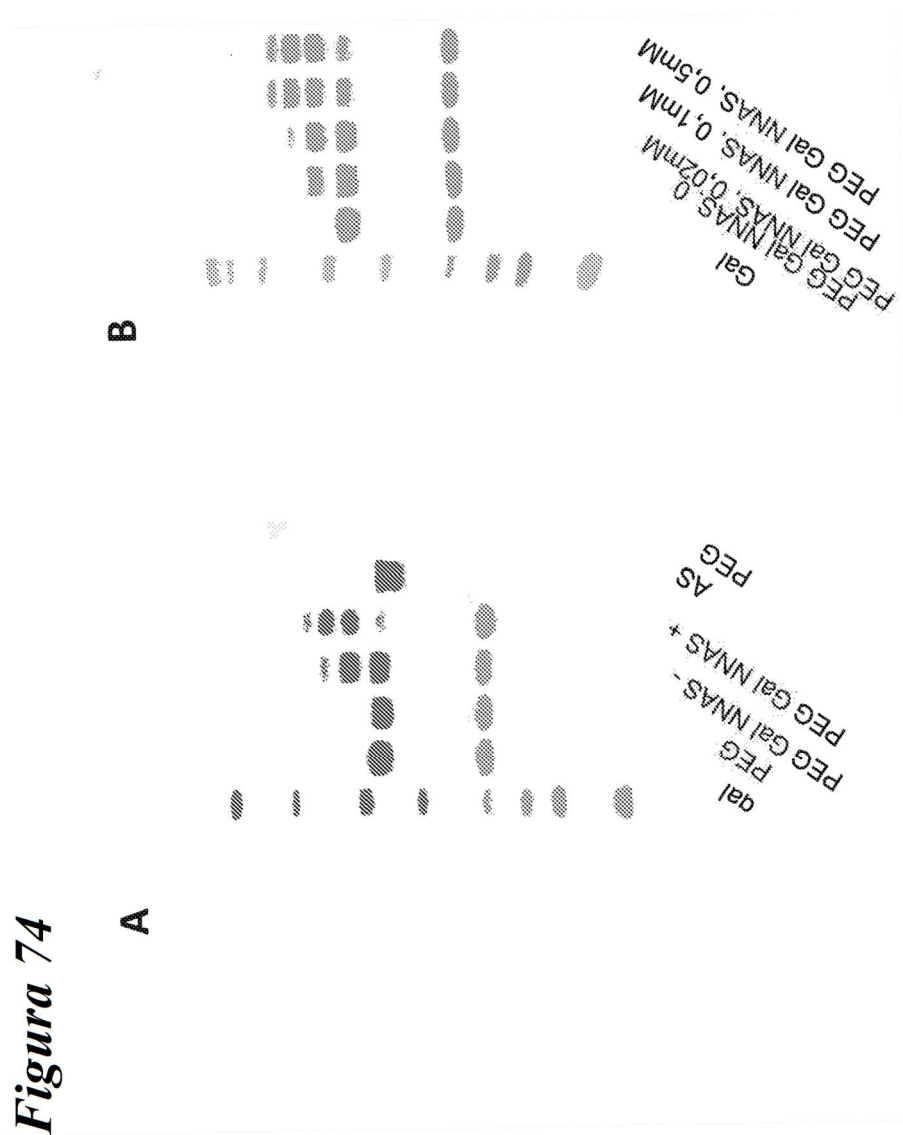


Figura 75

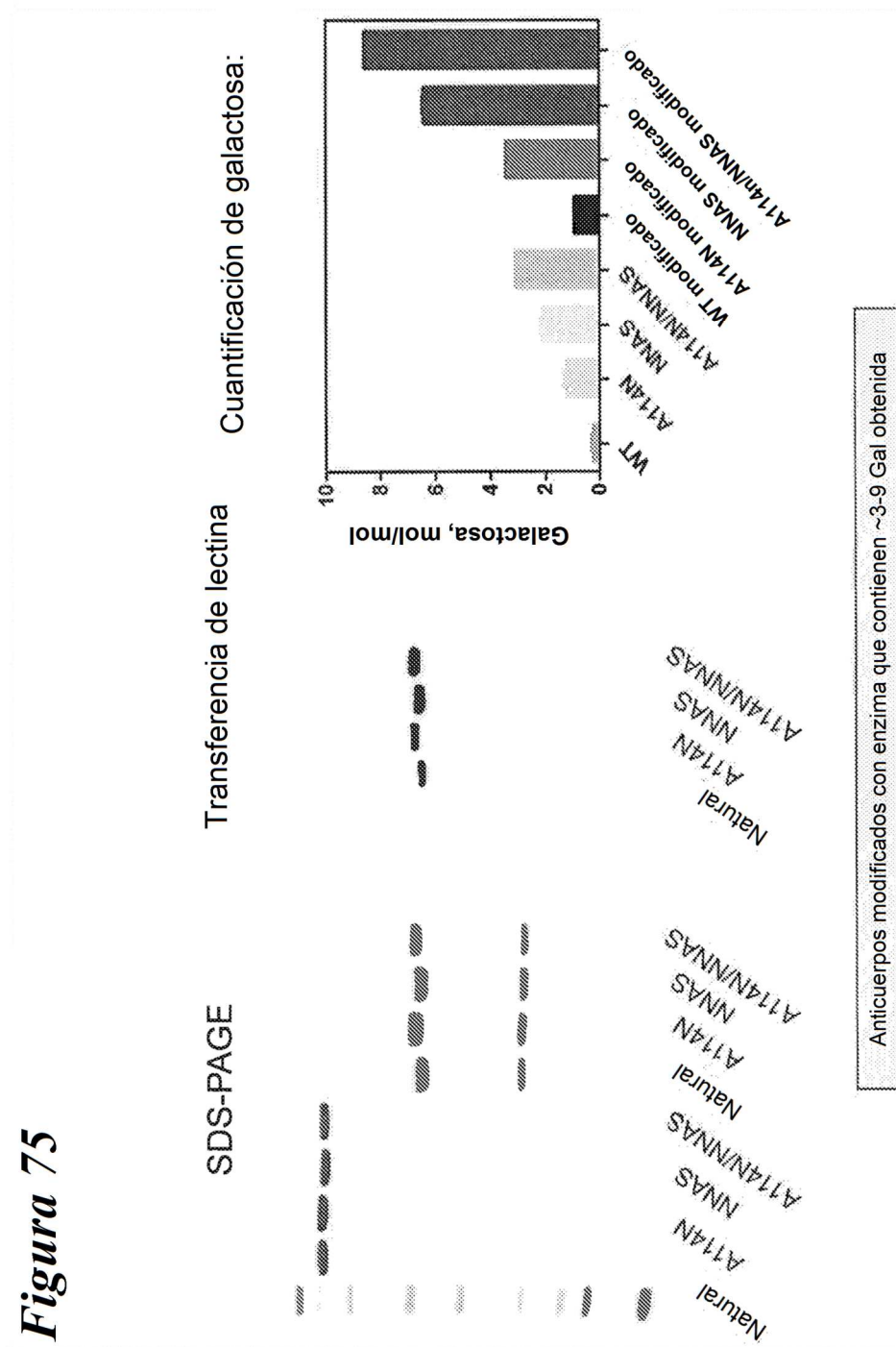


Figura 76

	Mol por mol, media \pm DE
Natural	0,1 \pm 0
A114N	0,5 \pm 0
NNAS	2,3 \pm 0
A114N/NNAS	2,7 \pm 0

Figura 77

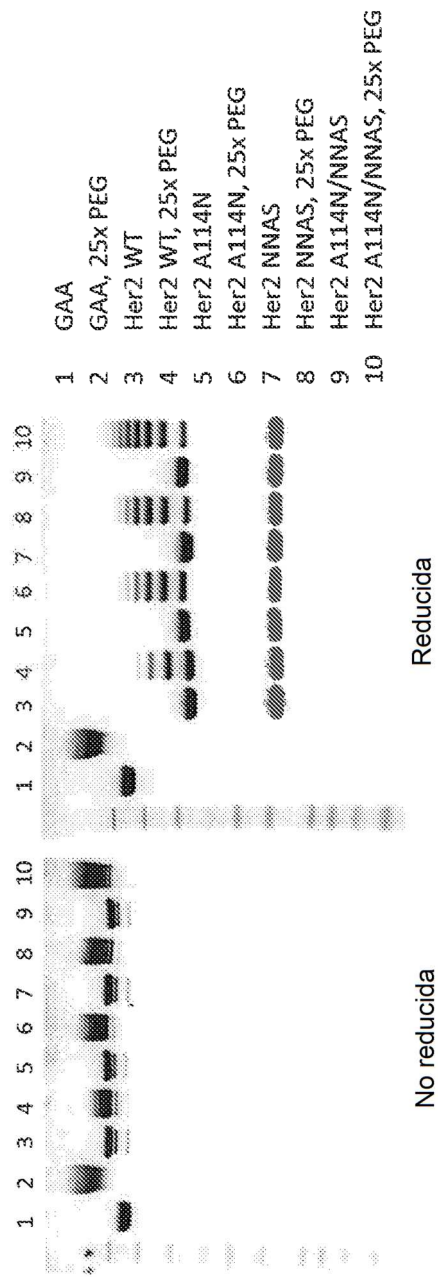
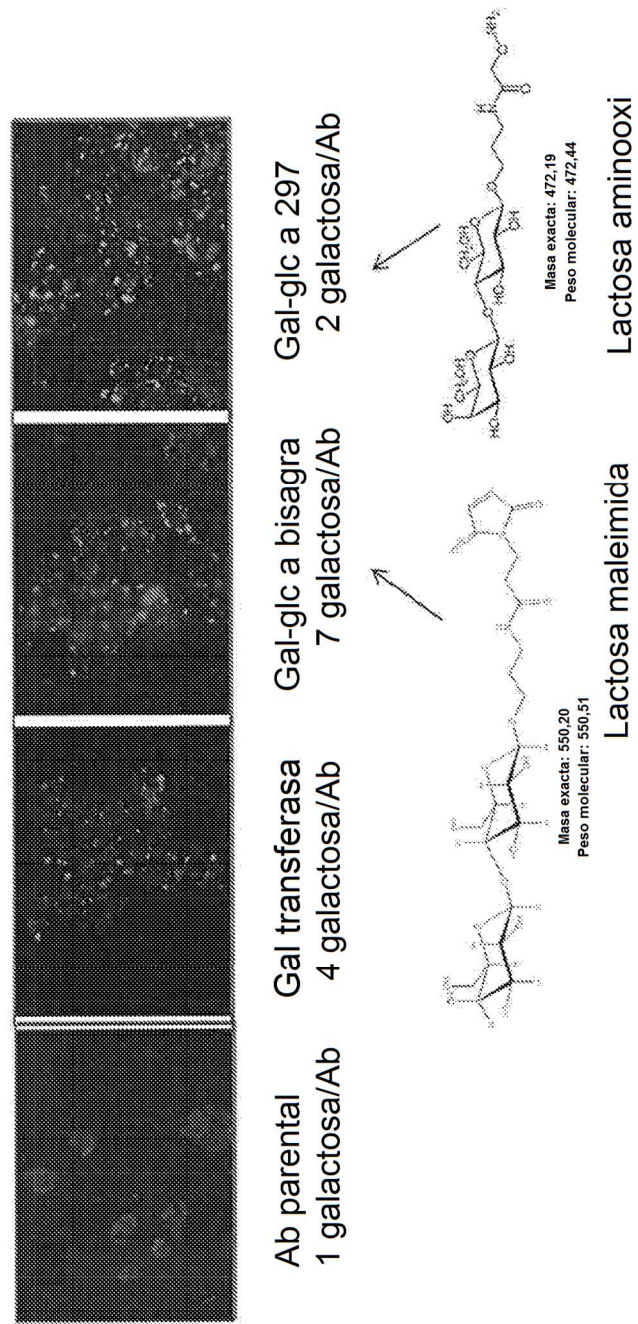


Figura 78

	Mol por mol, media \pm DE
Natural	1,4
A114N	2,7
NNAS	3,4
A114N/NNAS	4,6

Figura 79

Captación de anticuerpos policlonales en células HepG2



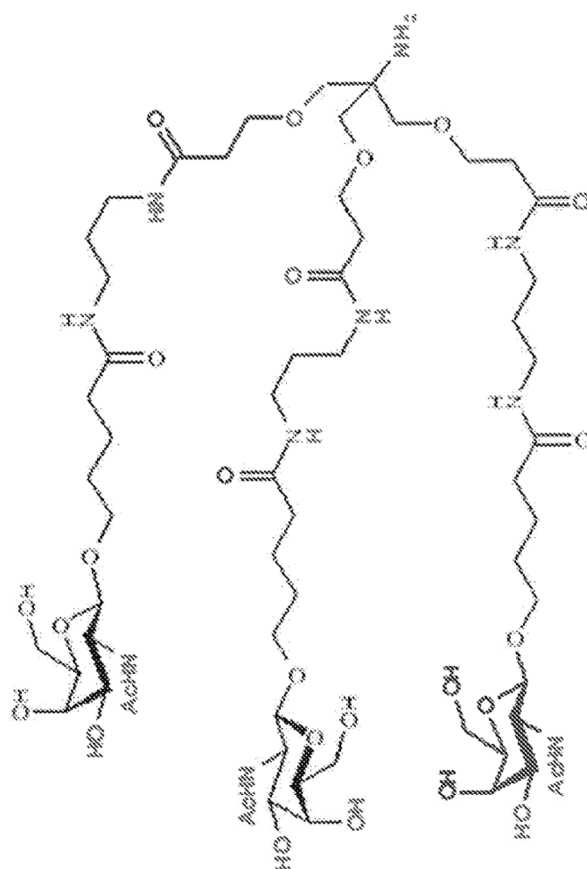


Figura 80

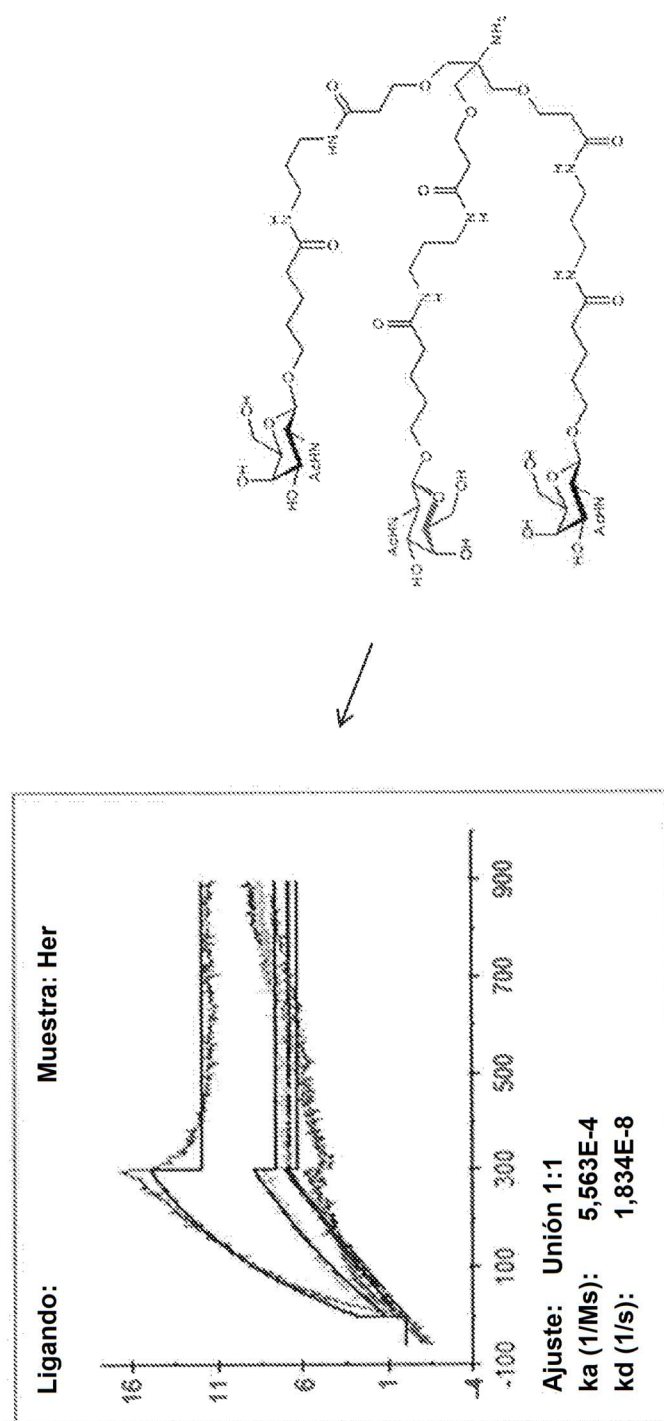
Figura 81

Figura 82

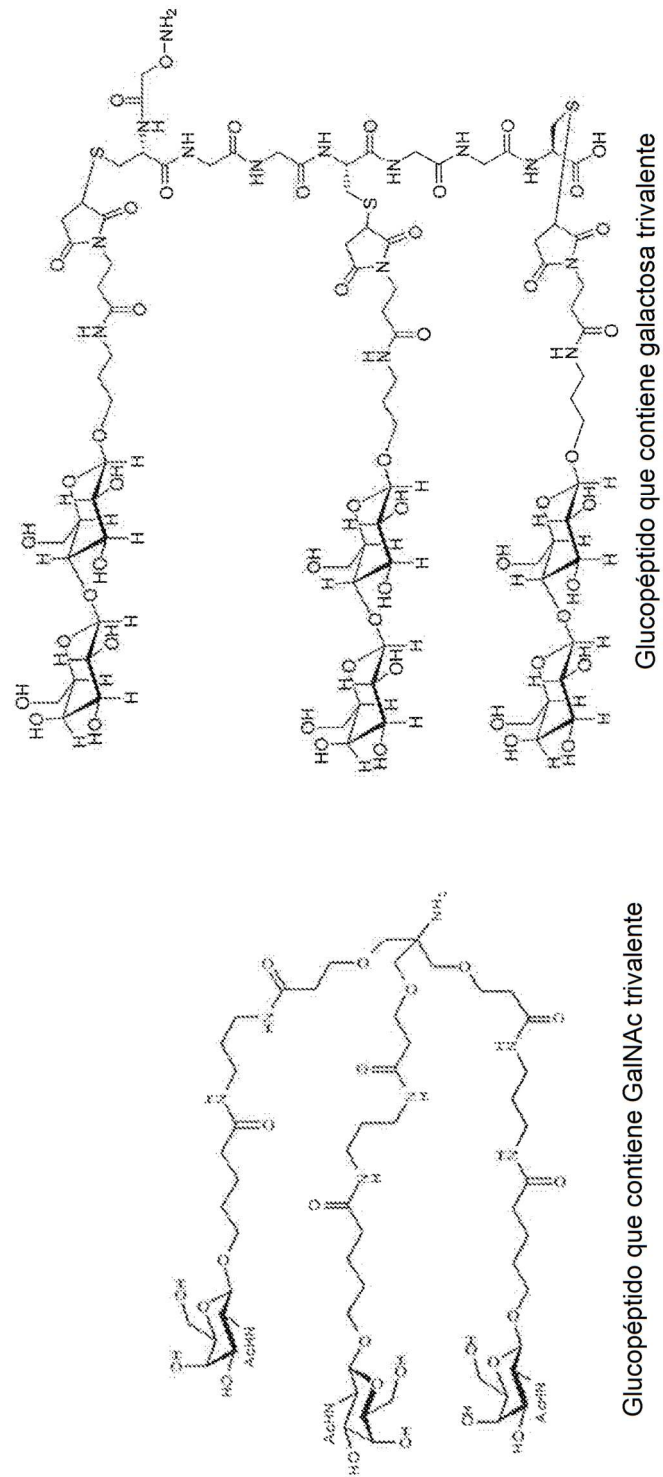
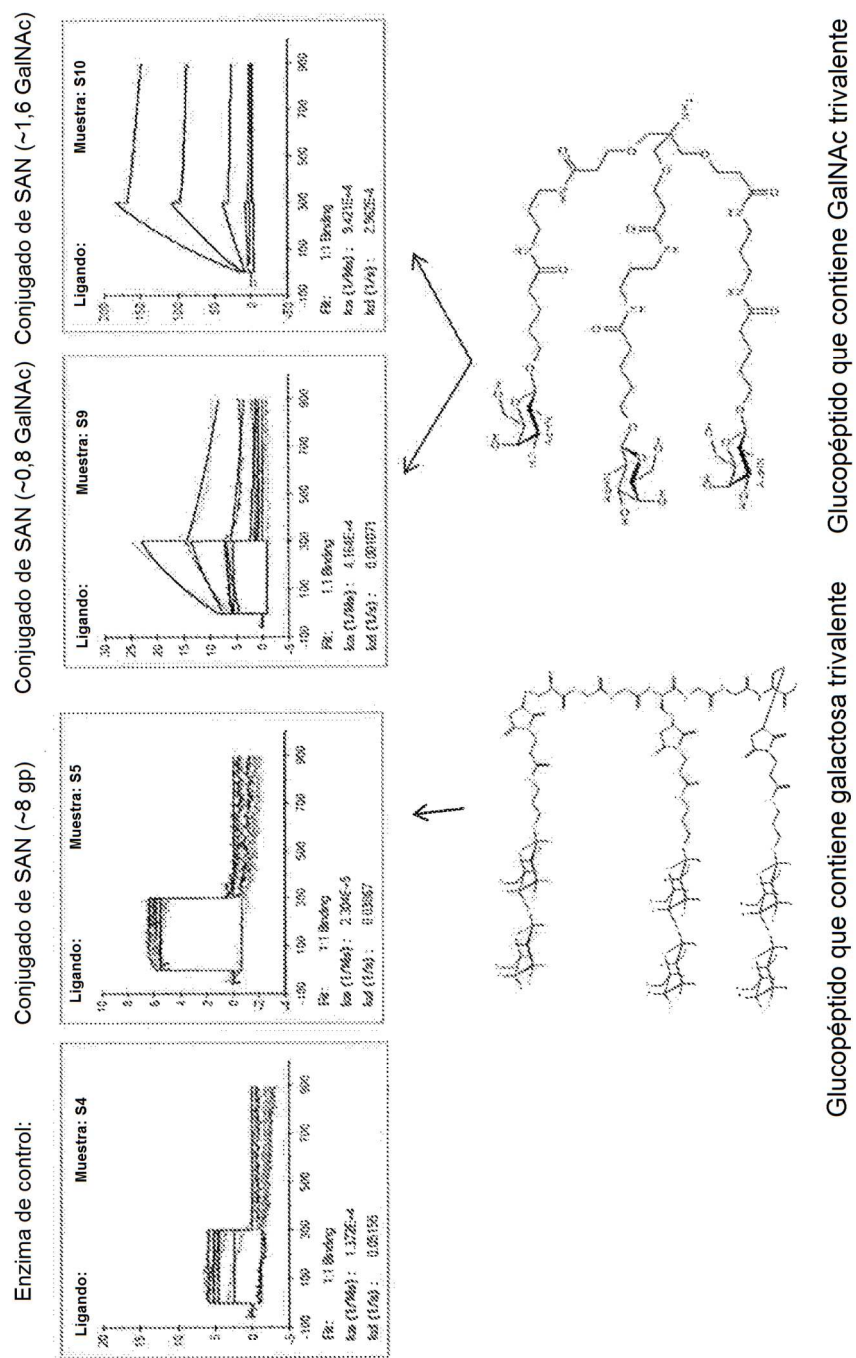


Figura 83



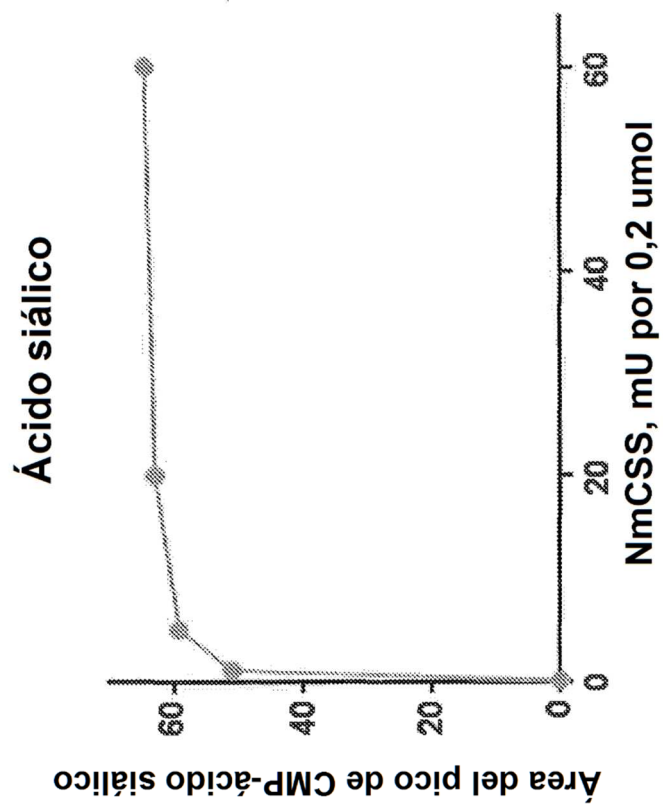


Figura 84

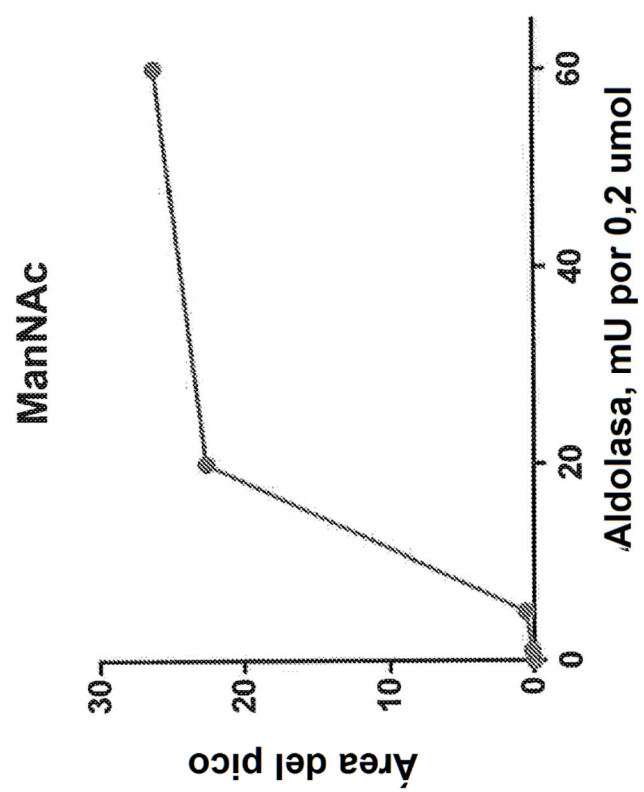
Figura 85

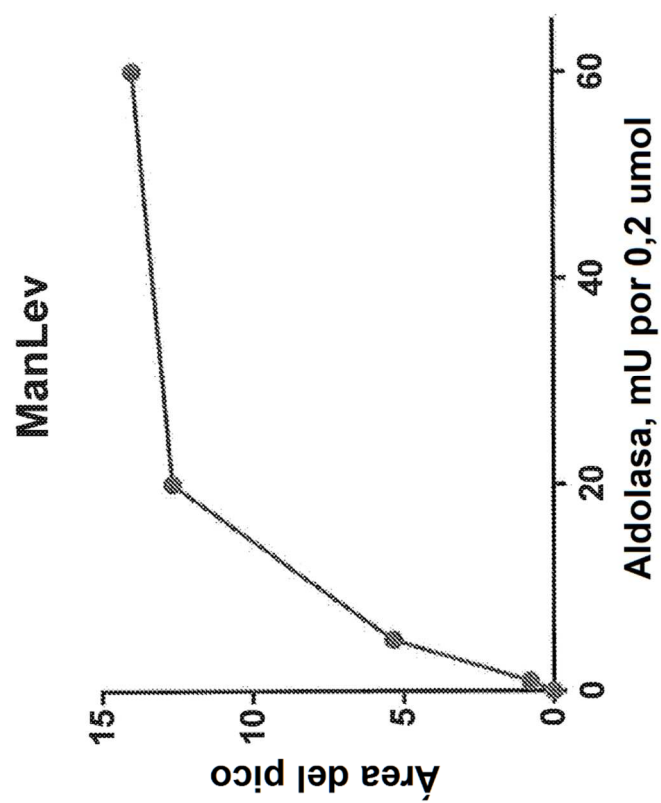
Figura 86

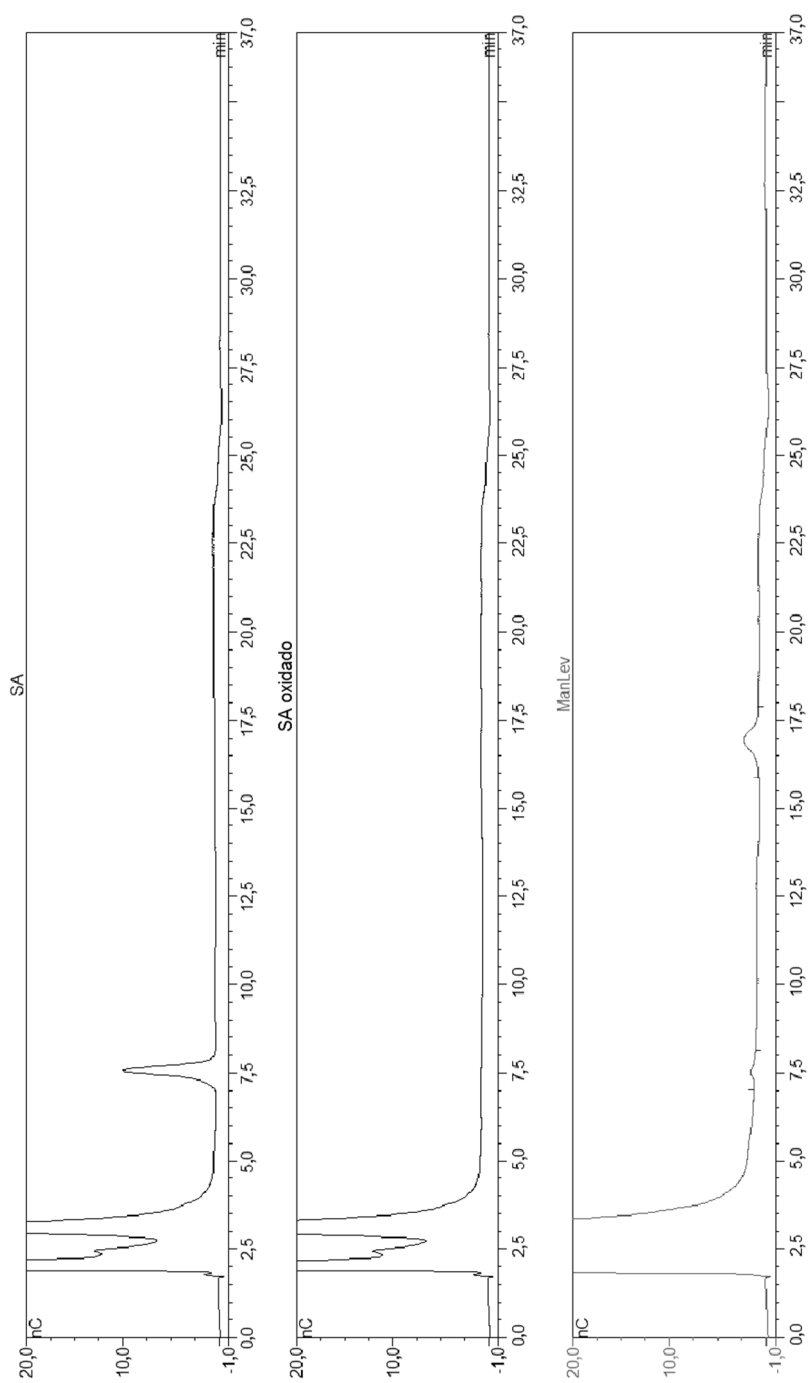
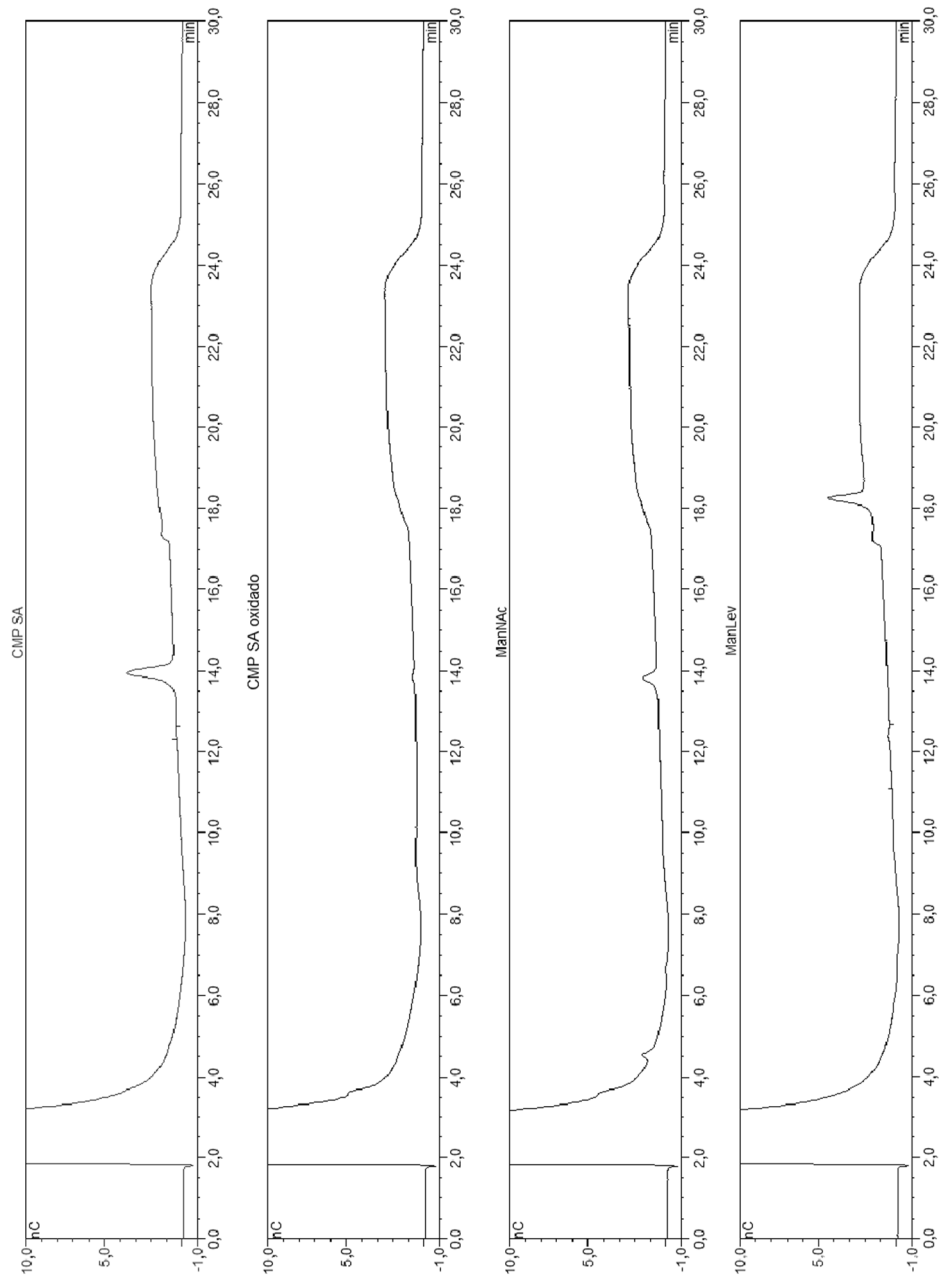
Figura 87

Figura 88



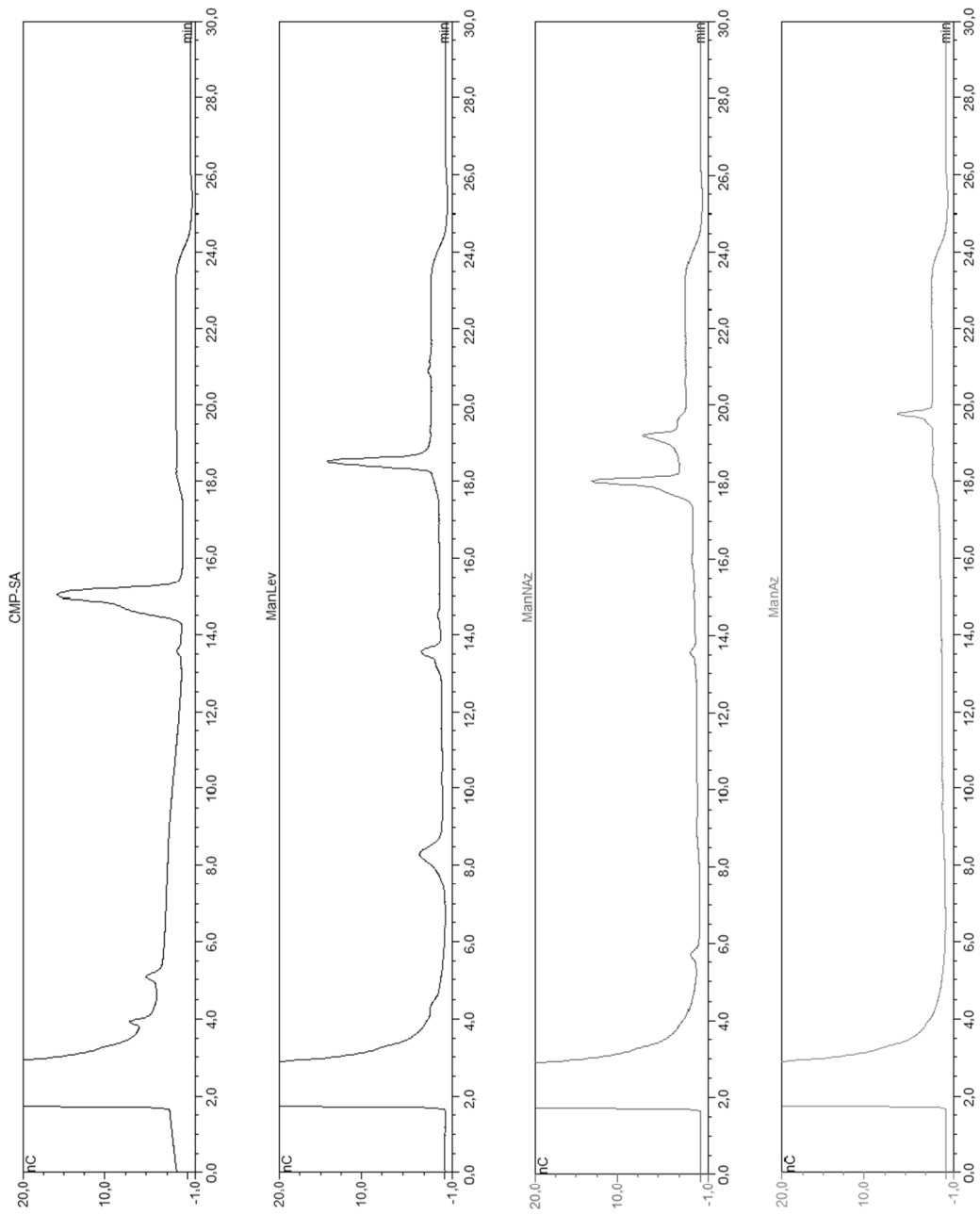


Figura 89

Figura 90

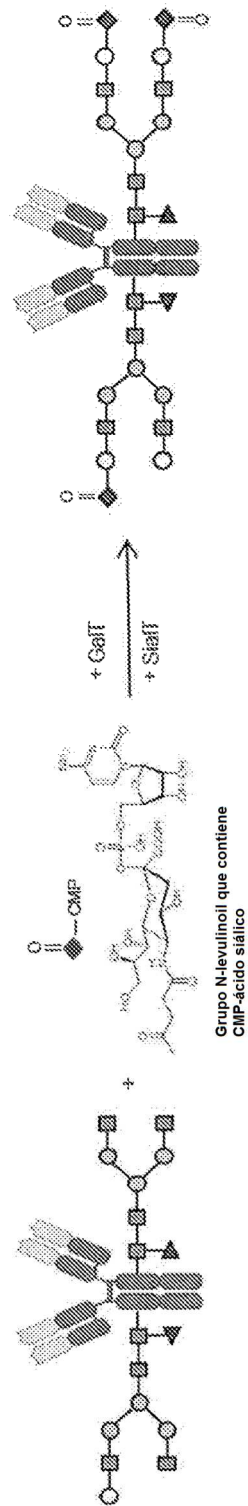


Figura 91

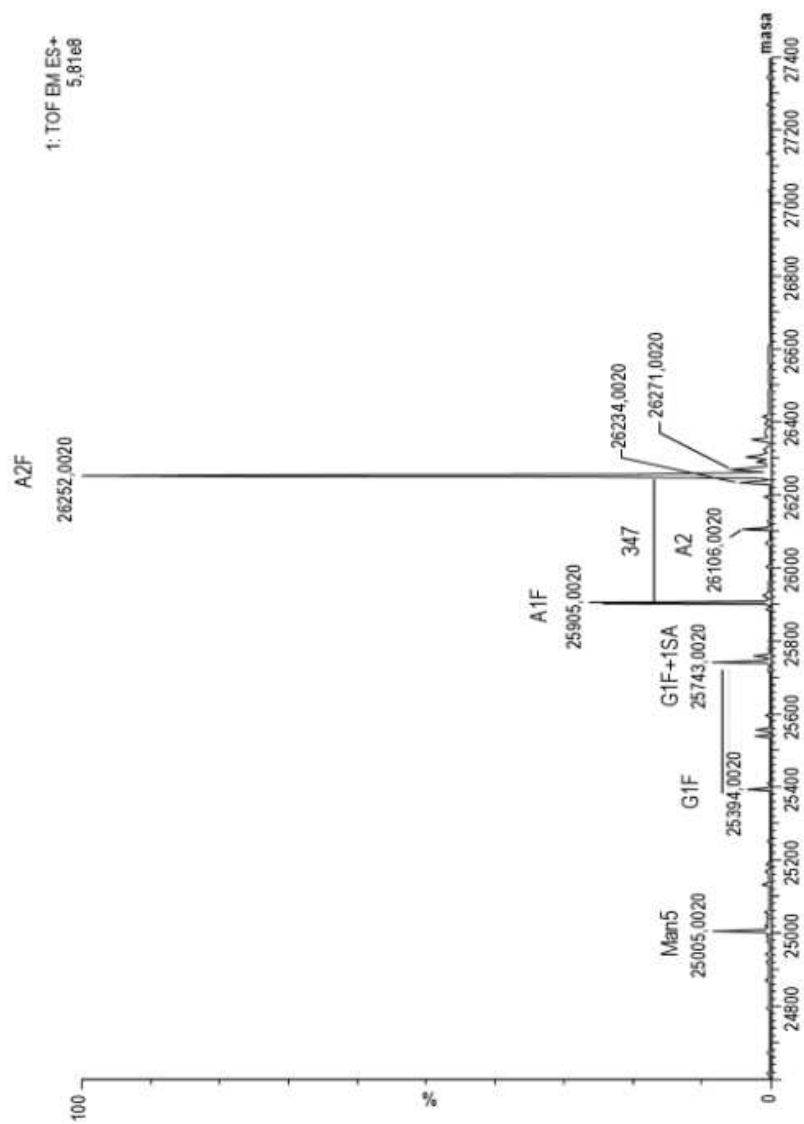


Figura 92

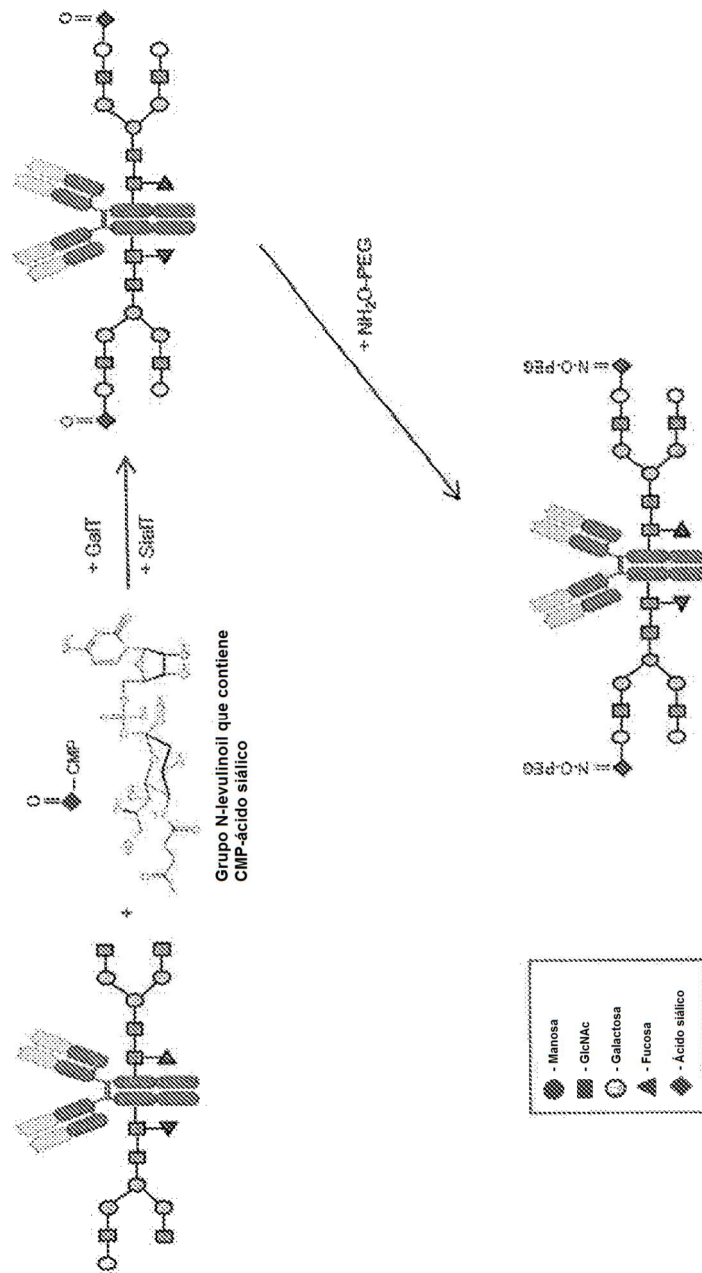


Figura 93

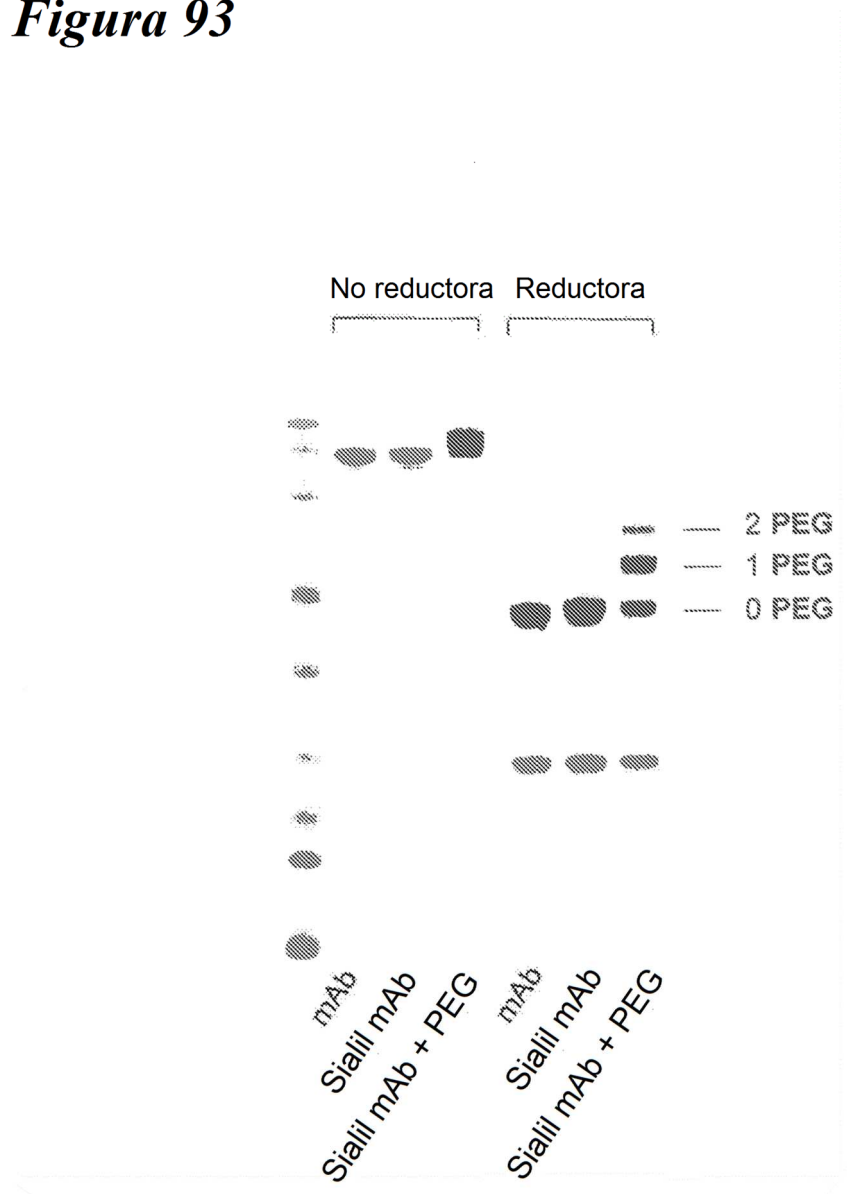


Figura 94

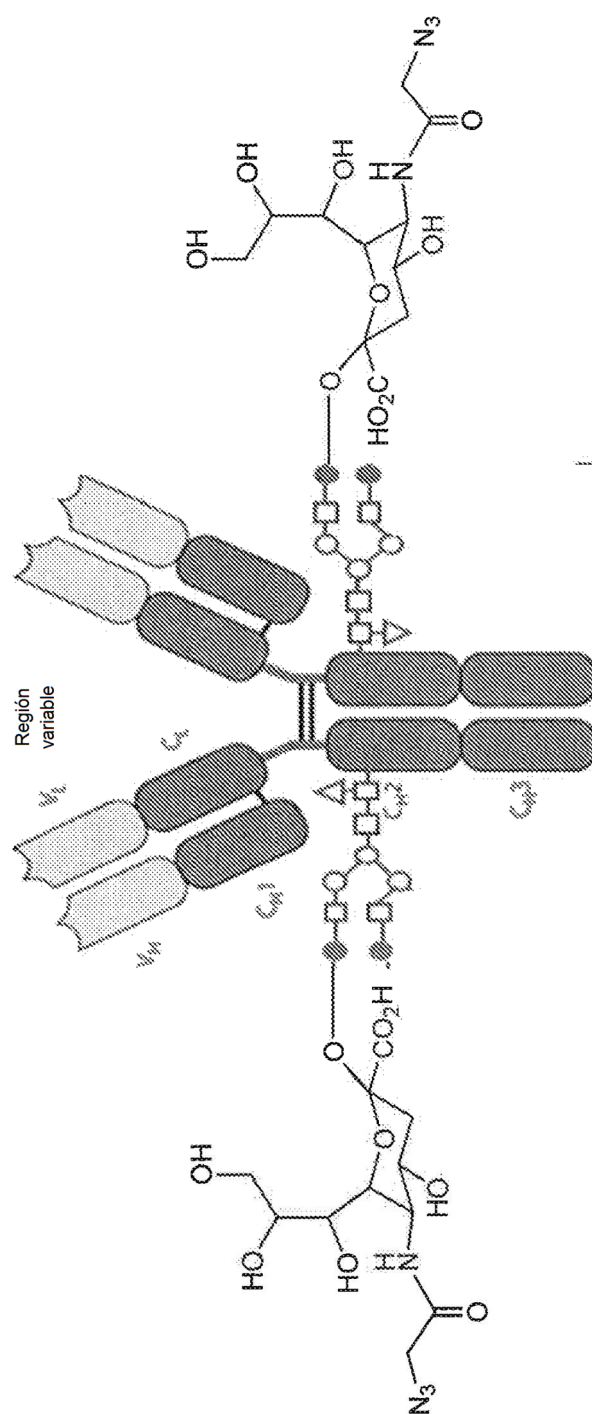


Figura 95

