(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 990 113**

(51) Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)
A61K 47/55 (2007.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/44 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.07.2017 PCT/US2017/041268**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **11.01.2018 WO18009916**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2017 E 17825059 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2024 EP 3484518**

(54) Título: **Conjugados de adyuvantes de anticuerpos**

(30) Prioridad:

07.07.2016 US 201662359626 P
07.07.2016 US 201662359627 P
09.12.2016 US 201662432530 P
13.12.2016 US 201662433742 P
20.06.2017 US 201762522623 P
28.06.2017 US 201762526306 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.11.2024

(73) Titular/es:

THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORDJUNIOR UNIVERSITY (50.0%)
Office of the General Counsel, Building 170, Third Floor, Main Quad, P.O. Box 20386
Stanford, CA 94305-2038, US y
BOLT BIOTHERAPEUTICS, INC. (50.0%)

(72) Inventor/es:

ALONSO, MICHAEL NATHANIEL;
ENGLEMAN, EDGAR GEORGE;
ACKERMAN, SHELLEY ERIN;
KENKEL, JUSTIN;
LEE, ARTHUR y
JACKSON, DAVID Y.

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones:

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

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 adyuvantes de anticuerpos

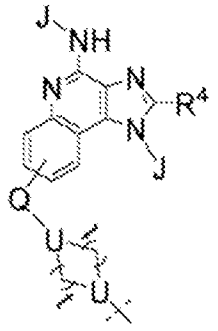
Antecedentes de la invención

Actualmente es bien sabido que el crecimiento tumoral requiere la adquisición de mutaciones que faciliten la evasión inmunitaria. Aun así, la oncogénesis da como resultado la acumulación de antígenos mutados, o neoantígenos, que el sistema inmunitario del huésped reconoce fácilmente después de la estimulación ex vivo. Se está empezando a dilucidar por qué y cómo el sistema inmunitario no reconoce los neoantígenos. Estudios innovadores de Carmi et al. (*Nature*, 521: 99-104 (2015)) han indicado que la ignorancia inmunitaria se puede superar administrando neoantígenos a las células dendríticas activadas por medio de complejos inmunitarios anticuerpo-tumor. En estos estudios, la administración simultánea de anticuerpos de unión a tumores y adyuvantes de células dendríticas mediante inyecciones intratumorales dio como resultado una sólida inmunidad antitumoral. Se necesitan nuevas composiciones y métodos para la administración de anticuerpos y adyuvantes de células dendríticas para llegar a tumores inaccesibles y ampliar las opciones de tratamiento para pacientes con cáncer y otros sujetos.

El documento WO 2015/103989 A1 describe compuestos de inmunoterapia dirigida. Se describe que los compuestos son útiles en el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer. Robert Schwenk et al, PLOS ONE, vol. 9, núm. 10, páginas e111020-e111020, se refiere a "IgG2 Antibodies against a Clinical Grade Plasmodium falciparum CSP Vaccine Antigen Associate with Protection against Transgenic Sporozoite Challenge in Mice".

Breve compendio de la invención

En un primer aspecto, la invención proporciona un inmunoconjugado que comprende (a) un constructo de anticuerpo que comprende (i) un dominio de unión al antígeno y (ii) un dominio Fc, (b) un adyuvante de fórmula:



Ady 4c

en el que cada J independientemente es hidrógeno, OR^4, o R^4; cada R^4 independientemente es hidrógeno, o un grupo alquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, arilalquilo o heteroarilalquilo que comprende de 1 a 8 unidades de carbono; cada U es independientemente CH o N en el que por lo menos una U es N; cada subíndice t independientemente es un número entero de 1 a 3; y Q está ausente, y la línea discontinua (“ - - - ”) del adyuvante representa el punto de unión del adyuvante, y (c) un enlazador, en el que cada adyuvante está unido de forma covalente al constructo de anticuerpo por medio del enlazador.

Se definen otros aspectos y realizaciones de la invención en las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

La invención se entenderá mejor a partir de la siguiente descripción detallada cuando se lea junto con los dibujos adjuntos. Según la práctica habitual, las diversas características de los dibujos no están a escala. Por el contrario, las dimensiones de las diversas características se amplían o reducen arbitrariamente para una mayor claridad.

La figura 1 muestra que el adyuvante funcionalizado es un potente inductor de la activación de las células mieloides. Se estimularon células presentadoras de antígenos (APC) de sangre periférica con diluciones seriadas 10 veces de R848, el compuesto 2 o un agonista de TLR de control a 37 ºC. Después de 18 horas, las células se analizaron mediante citometría de flujo. Los datos se presentan como la intensidad de fluorescencia media de cada marcador indicado; n=3.

La figura 2 muestra que los adyuvantes funcionalizados mantienen la actividad agonista de TLR. Las células HEK293 se cotransfectaron con TLR7 o TLR8 humano (dos paneles superiores) o TLR7 murino (panel inferior) y un gen indicador de fosfatasa alcalina embrionaria secretada inducible bajo el control del promotor mínimo de IFN-

β fusionado a NF-κB y los sitios de unión de AP-1. Posteriormente, las células se incubaron con diluciones seriadas al doble del adyuvante indicado durante 12 horas a 37 °C. La actividad se midió mediante espectrofotometría (DO 650 nm) después de la adición de sustrato de fosfatasa alcalina.

La figura 3 muestra el análisis de compuestos enlazadores adyuvantes por medio de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (LC-MS).

La figura 4 muestra que los conjugados de anticuerpo y adyuvante son superiores a la hora de provocar la activación de APC, en comparación con el anticuerpo y el adyuvante no conjugados, como se indica con la expresión de CD40, CD86 y HLA-DR. Las APC humanas se estimularon con rituximab-SATA-SMCC-compuesto 1 (conjugado), rituximab solo (Ab), el compuesto 1 solo o rituximab + compuesto 1 (mezcla) en presencia de células tumorales CD19+ marcadas con CFSE. Después de 18 horas, se analizaron las APC humanas CD19- mediante citometría de flujo; n=3. Valores de $p \leq 0.05$ representado por *, valores de $p \leq 0.01$ representado por **, valores de $p \leq 0.001$ representado por ***, valores de $p \leq 0.0001$ representado por ****.

La figura 5 muestra que los conjugados de anticuerpo y adyuvante inducen niveles más bajos de expresión de PD-L1 en APC humanas, en comparación con el anticuerpo y el adyuvante no conjugados. Las APC humanas se estimularon con rituximab-SATA-SMCC-compuesto 1 (conjugado), rituximab solo (Ab), el compuesto 1 solo o rituximab + compuesto 1 (mezcla) en presencia de células tumorales $CD19^+$ marcadas con CFSE. Después de 18 horas, se analizaron las APC humanas $CD19^-$ mediante citometría de flujo; n=3. Valores de $p \leq 0.05$ representado por *, valores de $p \leq 0.01$ representado por **, valores de $p \leq 0.001$ representado por ***, valores de $p \leq 0.0001$ representado por ****.

La figura 6 muestra que los conjugados de anticuerpo y adyuvante provocan la diferenciación de DC. Las APC humanas que eran aproximadamente el ~95 % de monocitos se estimularon con diluciones seriadas al doble de rituximab-SATA-SMCC-compuesto 1 (conjugado), rituximab solo (Ab), el compuesto 1 solo o rituximab + compuesto 1 (mezcla) en presencia de células tumorales marcadas con CFSE. Después de 18 horas, se analizaron las APC humanas $CD19^-$ mediante citometría de flujo; n=3. Valores de $p \leq 0.05$ representado por *, valores de $p \leq 0.01$ representado por **, valores de $p \leq 0.001$ representado por ***, valores de $p \leq 0.0001$ representado por ****.

La figura 7 muestra que los conjugados de anticuerpo y adyuvante son superiores a las mezclas de anticuerpo no conjugado y adyuvante a la hora de provocar la secreción de citocinas proinflamatorias de las APC humanas. Las APC humanas se estimularon con diluciones seriadas al doble de rituximab-SATA-SMCC-compuesto 1 (conjugado), rituximab solo (Ab), el compuesto 1 solo o rituximab + compuesto 1 (mezcla) en presencia de células tumorales fijadas marcadas con CFSE. Después de 18 horas, se analizó la secreción de citocinas en los sobrenadantes libres de células mediante matrices de perlas de citocinas; n=3. Valores de $p \leq 0.05$ representado por *, valores de $p \leq 0.01$ representado por **, valores de $p \leq 0.001$ representado por ***, valores de $p \leq 0.0001$ representado por ****.

La figura 8A muestra que los inmunoconjugados con enlazadores escindibles provocan la activación de APC y la diferenciación de DC. Las APC humanas que eran aproximadamente el ~95 % de monocitos se estimularon con diluciones seriadas al doble de rituximab-SATA-SPDP-compuesto 1 (conjugado, escindible), rituximab solo (Ab), el compuesto 1 solo o rituximab + compuesto 1 (mezcla) en presencia de células tumorales marcadas con CFSE. El inmunoconjugado (AAC - escindible) tenía una relación entre el fármaco y el anticuerpo (DAR) de 1.4, según se confirmó por MALDI-TOF. Después de 18 horas, se analizaron las APC humanas CD19- (CD14 y CD123) mediante citometría de flujo; n=3.

La figura 8B muestra que los inmunoconjugados (AAC) con enlazadores escindibles provocan la activación de APC y la diferenciación de DC. Las APC humanas que eran aproximadamente el ~95 % de monocitos se estimularon con diluciones seriadas al doble de rituximab-SATA-SPDP-compuesto 1 (conjugado, escindible), rituximab solo (Ab), el compuesto 1 solo o rituximab + compuesto 1 (mezcla) en presencia de células tumorales marcadas con CFSE. Los inmunoconjugados (AAC - escindible) tenían una relación entre el fármaco y el anticuerpo (DAR) de 1.4, según se confirmó por MALDI-TOF. Después de 18 horas, se analizaron las APC humanas CD19- (CD16 y CD163) mediante citometría de flujo; n=3.

La figura 8C muestra que los inmunoconjugados con enlazadores escindibles provocan la activación de APC y la diferenciación de DC. Las APC humanas que eran aproximadamente el ~95 % de monocitos se estimularon con diluciones seriadas al doble de rituximab-SATA-SPDP-compuesto 1 (conjugado, escindible), rituximab solo (Ab), el compuesto 1 solo o rituximab + compuesto 1 (mezcla) en presencia de células tumorales marcadas con CFSE. Los inmunoconjugados (AAC - escindible) tenían una relación entre el fármaco y el anticuerpo (DAR) de 1.4, según se confirmó por MALDI-TOF. Después de 18 horas, se analizaron las APC humanas CD19- (CD40 y PDL1) mediante citometría de flujo; n=3.

La figura 9A muestra que los conjugados de anticuerpo y adyuvante reducen los tumores *in vivo*. A ratones C57BL/6 con tumores B16F10 en el flanco derecho se les inyectó intratumoralmente PBS (sin tratar), αGP75 + compuesto 1 (mezcla) o αGP75-SATA-SMCC-compuesto 1 (αGP75 inmunoconjugado).

La figura 9B muestra que el αGP75 inmunoconjugado reduce los tumores *in vivo* cuando se administra mediante

inyección intratumoral (IT) o intravenosa (IV).

La figura 10A muestra el análisis de ipilimumab mediante LC-MS.

La figura 10B muestra que los conjugados de ipilimumab-adyuvante (Ipilimumab Boltbody) son superiores a la hora de provocar la activación de APC, en comparación con ipilimumab no conjugado, como se indica con la expresión de HLA-DR.

La figura 10C muestra que los conjugados de ipilimumab-adyuvante (Ipilimumab Boltbody) son superiores a la hora de provocar la activación de APC, en comparación con ipilimumab no conjugado, como se indica con la expresión de CD14.

La figura 10D muestra que los conjugados de ipilimumab-adyuvante (Ipilimumab Boltbody) son superiores a la hora de provocar la activación de APC, en comparación con ipilimumab no conjugado, como se indica con la expresión de CD40.

La figura 10E muestra que los conjugados de ipilimumab-adyuvante (Ipilimumab Boltbody) son superiores a la hora de provocar la activación de APC, en comparación con ipilimumab no conjugado, como se indica con la expresión de CD86.

La figura 11A muestra el análisis de pembrolizumab mediante LC-MS.

La figura 11B muestra que los conjugados de pembrolizumab-adyuvante (Pembrolizumab Boltbody) son superiores a la hora de provocar la activación de APC, en comparación con pembrolizumab no conjugado, como se indica con la expresión de HLA-DR.

La figura 11C muestra que los conjugados de pembrolizumab-adyuvante (Pembrolizumab Boltbody) son superiores a la hora de provocar la activación de APC, en comparación con pembrolizumab no conjugado, como se indica con la expresión de CD14.

La figura 11D muestra que los conjugados de pembrolizumab-adyuvante (Pembrolizumab Boltbody) son superiores a la hora de provocar la activación de APC, en comparación con pembrolizumab no conjugado, como se indica con la expresión de CD40.

La figura 11E muestra que los conjugados de pembrolizumab-adyuvante (Pembrolizumab Boltbody) son superiores a la hora de provocar la activación de APC, en comparación con pembrolizumab no conjugado, como se indica con la expresión de CD86.

La figura 12A muestra el análisis de nivolumab mediante LC-MS.

La figura 12B muestra que los conjugados de nivolumab-adyuvante (Nivolumab Boltbody) son superiores a la hora de provocar la activación de APC, en comparación con nivolumab no conjugado, como se indica con la expresión de HLA-DR.

La figura 12C muestra que los conjugados de nivolumab-adyuvante (Nivolumab Boltbody) son superiores a la hora de provocar la activación de APC, en comparación con nivolumab no conjugado, como se indica con la expresión de CD14.

La figura 12D muestra que los conjugados de nivolumab-adyuvante (Nivolumab Boltbody) son superiores a la hora de provocar la activación de APC, en comparación con nivolumab no conjugado, como se indica con la expresión de CD40.

La figura 12E muestra que los conjugados de nivolumab-adyuvante (Nivolumab Boltbody) son superiores a la hora de provocar la activación de APC, en comparación con nivolumab no conjugado, como se indica con la expresión de CD86.

La figura 13A muestra el análisis de atezolizumab mediante LC-MS.

La figura 13B muestra que los conjugados de atezolizumab-adyuvante (Atezolizumab Boltbody) son superiores a la hora de provocar la activación de APC, en comparación con el atezolizumab no conjugado, como se indica con la expresión de HLA-DR.

La figura 13C muestra que los conjugados de atezolizumab-adyuvante (Atezolizumab Boltbody) son superiores a la hora de provocar la activación de APC, en comparación con el atezolizumab no conjugado, como se indica con la expresión de CD14.

La figura 13D muestra que los conjugados de atezolizumab-adyuvante (Atezolizumab Boltbody) son superiores a la hora de provocar la activación de APC, en comparación con el atezolizumab no conjugado, como se indica con la expresión de CD40.

La figura 13E muestra el nivel de activación de los conjugados de atezolizumab-adyuvante (Atezolizumab

Boltbody), como se indica con la expresión de CD86.

La figura 14A muestra que las células diferenciadas con inmunoconjugado de atezolizumab (Atezolizumab IgG1 NQ Boltbody) secretan mayores cantidades de TNFα que las células diferenciadas con atezolizumab.

La figura 14B muestra que las células diferenciadas con inmunoconjugado de atezolizumab (Atezolizumab IgG1 NQ Boltbody) secretan mayores cantidades de IL-1β que las células diferenciadas con atezolizumab.

La figura 15A muestra que las células diferenciadas con inmunoconjugado de nivolumab (Nivolumab IgG4 Boltbody) secretan mayores cantidades de TNFα que las células diferenciadas con nivolumab.

La figura 15B muestra que las células diferenciadas con inmunoconjugado de nivolumab (Nivolumab IgG4 Boltbody) secretan mayores cantidades de IL-1β que las células diferenciadas con nivolumab.

La figura 16A muestra que las células diferenciadas con inmunoconjugado de pembrolizumab (Pembrolizumab Boltbody) secretan mayores cantidades de TNFα que las células diferenciadas con pembrolizumab.

La figura 16B muestra que las células diferenciadas con inmunoconjugado de pembrolizumab (Pembrolizumab Boltbody) secretan mayores cantidades de IL-1β que las células diferenciadas con pembrolizumab.

La figura 17 muestra el análisis de conjugados de pembrolizumab-adyuvante mediante LC-MS.

La figura 18 muestra el análisis de conjugados de nivolumab-adyuvante mediante LC-MS.

La figura 19 muestra el análisis de conjugados de atezolizumab-adyuvante mediante LC-MS.

La figura 20 muestra que las células diferenciadas con inmunoconjugado de ipilimumab (Ipilimumab Boltbody) secretan mayores cantidades de TNFα que las células diferenciadas con ipilimumab.

La figura 21 muestra que las células diferenciadas con dectina 2 inmunoconjugado secretan mayores cantidades de TNFα, IL-6 e IL-12p70 que las células expuestas a cantidades equivalentes de los componentes no conjugados. La línea que está significativamente más alta que el eje x para cada citocina es el anti-dectina 2 inmunoconjugado (antidectina 2-comp1 (anticuerpo conjugado con el compuesto 1 adyuvante)). Existen tres líneas a lo largo del eje x, que no son visibles, que muestran que el anticuerpo antidectina 2 solo, y el compuesto 1 adyuvante solo, y la mezcla del anticuerpo antidectina 2 y el compuesto 1 adyuvante (mezcla de antidectina 2 + comp1, no conjugado), no logró producir ninguna respuesta de las citocinass. La línea que está apenas por encima del eje x para IL-6 representa un anticuerpo de control, un ACC con el compuesto 1 como adyuvante y un anticuerpo de control de isotipo IgG2a de ratón (etiquetado como "Iso-Comp 1" en la figura 21). En los gráficos de TNFα e IL-12p70, la línea Iso-Comp 1 no es visible ya que está a lo largo del eje x.

La figura 22A muestra la estructura del adyuvante CL264 y el círculo indica una posición en el adyuvante donde podría conjugarse con el enlazador, específicamente, el ácido carboxílico terminal del adyuvante.

La figura 22B muestra la estructura del adyuvante CL401 y el círculo indica una posición en el adyuvante donde podría conjugarse con el enlazador, específicamente, la amina primaria del adyuvante.

La figura 22C muestra la estructura del adyuvante CL413 y el círculo indica una posición en el adyuvante donde podría conjugarse con el enlazador, específicamente, el primer residuo de lisina del adyuvante.

La figura 22D muestra la estructura del adyuvante CL413 y el círculo indica una posición en el adyuvante donde podría conjugarse con el enlazador, específicamente, el segundo residuo de lisina del adyuvante.

La figura 22E muestra la estructura del adyuvante CL413 y el círculo indica una posición en el adyuvante donde podría conjugarse con el enlazador, específicamente, el tercer residuo de lisina del adyuvante.

La figura 22F muestra la estructura del adyuvante CL413 y el círculo indica una posición en el adyuvante donde podría conjugarse con el enlazador, específicamente, el cuarto residuo de lisina del adyuvante.

La figura 22G muestra la estructura del adyuvante CL413 y el círculo indica una posición en el adyuvante donde podría conjugarse con el enlazador, específicamente, la amina primaria del adyuvante.

La figura 22H muestra la estructura del adyuvante CL419 y los círculos indican posiciones en el adyuvante donde podría conjugarse con el enlazador, específicamente, las aminas del adyuvante (amina terminal en la parte superior de la figura 22H y amina secundaria en la parte inferior de la figura 22H).

La figura 22I muestra la estructura del adyuvante CL553 y el círculo indica una posición en el adyuvante donde podría conjugarse con el enlazador, específicamente, una amina secundaria del adyuvante.

La figura 22J muestra la estructura del adyuvante CL553 y el círculo indica una posición en el adyuvante donde podría conjugarse con el enlazador, específicamente, otra amina secundaria del adyuvante.

La figura 22K muestra la estructura del adyuvante CL553 y el círculo indica una posición en el adyuvante donde podría conjugarse con el enlazador, específicamente, una amina primaria del adyuvante.

La figura 22L muestra la estructura del adyuvante CL553 y el círculo indica una posición en el adyuvante donde podría conjugarse con el enlazador, específicamente, otra amina secundaria del adyuvante.

La figura 22M muestra la estructura del adyuvante CL553 y el círculo indica una posición en el adyuvante donde podría conjugarse con el enlazador, específicamente, otra amina secundaria del adyuvante.

La figura 22N muestra la estructura del adyuvante CL553 y el círculo indica una posición en el adyuvante donde podría conjugarse con el enlazador, específicamente, otra amina secundaria del adyuvante.

La figura 22O muestra la estructura del adyuvante CL572 y los círculos indican posiciones en el adyuvante donde podría conjugarse con el enlazador, específicamente, la amina primaria (parte superior de la figura 22O) y el carbonilo (parte inferior de la figura 22O).

La figura 22P muestra la estructura del adyuvante Pam2CSK4 y el círculo indica una posición en el adyuvante donde podría conjugarse con el enlazador, específicamente, el ácido carboxílico terminal del adyuvante.

La figura 22Q muestra la estructura del adyuvante Pam2CSK4 y el círculo indica una posición en el adyuvante donde podría conjugarse con el enlazador, específicamente, el tiol terminal del adyuvante.

La figura 22R muestra la estructura del adyuvante Pam2CSK4 y el círculo indica una posición en el adyuvante donde podría conjugarse con el enlazador, específicamente, el segundo residuo de lisina del adyuvante.

La figura 22S muestra la estructura del adyuvante Pam2CSK4 y el círculo indica una posición en el adyuvante donde podría conjugarse con el enlazador, específicamente, el tercer residuo de lisina del adyuvante.

La figura 22T muestra la estructura del adyuvante Pam2CSK4 y el círculo indica una posición en el adyuvante donde podría conjugarse con el enlazador, específicamente, el residuo de lisina terminal del adyuvante.

La figura 22U muestra la estructura del adyuvante Pam3CSK4 y el círculo indica una posición en el adyuvante donde podría conjugarse con el enlazador, específicamente, el ácido carboxílico terminal del adyuvante.

La figura 22V muestra la estructura del adyuvante Pam3CSK4 y el círculo indica una posición en el adyuvante donde podría conjugarse con el enlazador, específicamente, el tiol terminal del adyuvante.

La figura 22W muestra la estructura del adyuvante Pam3CSK4 y el círculo indica una posición en el adyuvante donde podría conjugarse con el enlazador, específicamente, el segundo residuo de lisina del adyuvante.

La figura 22X muestra la estructura del adyuvante Pam3CSK4 y el círculo indica una posición en el adyuvante donde podría conjugarse con el enlazador, específicamente, el tercer residuo de lisina del adyuvante.

La figura 23A muestra que las células diferenciadas con αCLEC5A inmunoconjugado secretan mayores cantidades de IL-6 que las células expuestas a cantidades equivalentes de los componentes no conjugados. La línea que es significativamente más alta que el eje x para cada citocina es el αCLEC5A inmunoconjugado (anticuerpo αCLEC5A conjugado con el compuesto 1 adyuvante). La línea que está a lo largo del eje x muestra que una mezcla del anticuerpo αCLEC5A y el compuesto 1 adyuvante (no conjugado) no logró producir ninguna respuesta de las citocinas. La línea entre el eje x y la línea del αCLEC5A inmunoconjugado representa un conjugado de control, isotipo IgG2a de ratón conjugado con el compuesto 1.

La figura 23B muestra que las células diferenciadas con αCLEC5A inmunoconjugado secretan mayores cantidades de IL-1β2p40 que las células expuestas a cantidades equivalentes de los componentes no conjugados. La línea que es significativamente más alta que el eje x para cada citocina es el αCLEC5A inmunoconjugado (αCLEC5A-comp1 AAC). La línea que está a lo largo del eje x muestra que una mezcla del anticuerpo αCLEC5A y el compuesto 1 adyuvante (no conjugado; mezcla αCLEC5A-comp1) no logró producir ninguna respuesta de las citocinas. La línea entre el eje x y la línea del αCLEC5A inmunoconjugado representa un conjugado de control, isotipo IgG2a de ratón conjugado con el compuesto 1.

La figura 23C muestra que las células diferenciadas con αCLEC5A inmunoconjugado secretan mayores cantidades de IL-1β2p70 que las células expuestas a cantidades equivalentes de los componentes no conjugados. La línea que es significativamente más alta que el eje x para cada citocina es el αCLEC5A inmunoconjugado (anticuerpo αCLEC5A conjugado con el compuesto 1 adyuvante). La línea que está a lo largo del eje x muestra que una mezcla del anticuerpo αCLEC5A y el compuesto 1 adyuvante (no conjugado) no logró producir ninguna respuesta de las citocinas. La línea entre el eje x y la línea del αCLEC5A inmunoconjugado representa un conjugado de control, isotipo IgG2a de ratón conjugado con el compuesto 1.

La figura 23D muestra que las células diferenciadas con αCLEC5A inmunoconjugado secretan mayores cantidades de TNFα que las células expuestas a cantidades equivalentes de los componentes no conjugados. La línea que es significativamente más alta que el eje x para cada citocina es el αCLEC5A inmunoconjugado (anticuerpo αCLEC5A conjugado con el compuesto 1 adyuvante). La línea que está a lo largo del eje x muestra que una mezcla

del anticuerpo αCLEC5A y el compuesto 1 adyuvante (no conjugado) no logró producir ninguna respuesta de las citocinas. La línea entre el eje x y la línea del αCLEC5A inmunoconjugado representa un conjugado de control, isotipo IgG2a de ratón conjugado con el compuesto 1.

La figura 23E muestra el análisis del αCLEC5A inmunoconjugado mediante LC-MS.

La figura 24 muestra una mayor diferenciación de células dendríticas con un conjugado adyuvante de anticuerpo anti-Her2 (αHer2 inmunoconjugado, círculos cerrados) unido al compuesto 1 agonista de TLR 7/8 en comparación con cuando se administran los mismos componentes de anticuerpo y adyuvante (αHer2 y compuesto 1, cuadrados cerrados) como una mezcla no ligada.

La figura 25 muestra una mayor diferenciación de células dendríticas con un conjugado adyuvante de anticuerpo anti-EGFR (inmunoconjugado de αEGFR, círculos cerrados) unido al compuesto 1 agonista de TLR 7/8 en comparación con cuando se administran los mismos componentes (αEGFR y compuesto 1, cuadrados cerrados) como una mezcla no ligada.

La figura 26 muestra que un anticuerpo anti-CD20 conjugado con un agonista de TLR 7/8 presenta una fuerte activación de células dendríticas, mientras que la activación se reduce significativamente en el conjugado desglicosilado.

La figura 27 compara los anticuerpos de rituximab y obinutuzumab conjugados con el compuesto 1. El obinutuzumab tiene un contenido reducido de fucosa en comparación con rituximab y muestra una mayor regulación por incremento de CD40.

La figura 28 ilustra la activación de células NK usando un inmunoconjugado de αEGFR unido al compuesto 1 agonista de TLR 7/8. El inmunoconjugado presenta una activación de células NK significativamente mayor en comparación con la mezcla no conjugada de αEGFR y compuesto 1.

La figura 29 ilustra la activación robusta de poblaciones de células dendríticas a partir de células mononucleares de sangre periférica aisladas de sujetos humanos con un inmunoconjugado de αEGFR.

La figura 30A muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado BB-01 sintetizado usando el método SATA.

La figura 30B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado BB-01 sintetizado usando el método del éster.

La figura 31A muestra un análisis de cromatografía de exclusión por tamaño del inmunoconjugado BB01 sintetizado usando el método SATA.

La figura 31B muestra un análisis de cromatografía de exclusión por tamaño del inmunoconjugado BB-01 sintetizado usando el método del éster.

La figura 32 muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado BB-14 sintetizado usando el método del éster.

La figura 33 muestra un análisis de cromatografía de exclusión por tamaño del inmunoconjugado BB-14 sintetizado usando el método del éster.

La figura 34 muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado BB-15 sintetizado usando el método del éster.

La figura 35 muestra un análisis de cromatografía de exclusión por tamaño del inmunoconjugado BB-15 sintetizado usando el método del éster.

La figura 36 muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado sintetizado usando el método del éster.

La figura 37 muestra un análisis por cromatografía de exclusión por tamaño del inmunoconjugado sintetizado usando el método del éster.

La figura 38A muestra que el BB-01 y BB-17 sintetizados usando el método del éster provoca la activación mieloide como se indica con la regulación por disminución de CD14 mientras que el control no lo hace. El CD20 es el anticuerpo monoclonal no conjugado utilizado como control.

La figura 38B muestra que el BB-01 y BB-17 sintetizados usando el método del éster provoca la activación mieloide como se indica con la regulación por disminución de CD16 mientras que el control no lo hace. El CD20 es el anticuerpo monoclonal no conjugado utilizado como control.

La figura 38C muestra que el BB-01 y BB-17 sintetizados usando el método del éster provoca la activación mieloide como se indica con la regulación por incremento de CD40 mientras que el control no lo hace. El CD20 es el

anticuerpo monoclonal no conjugado utilizado como control.

La figura 38D muestra que el BB-01 y BB-17 sintetizados usando el método del éster provoca la activación mieloide como se indica con la regulación por incremento de CD86 mientras que el control no lo hace. El CD20 es el anticuerpo monoclonal no conjugado utilizado como control.

La figura 38E muestra que el BB-01 y BB-17 sintetizados usando el método del éster provoca la activación mieloide como se indica con la regulación por incremento de CD123 mientras que el control no lo hace. El CD20 es el anticuerpo monoclonal no conjugado utilizado como control.

La figura 38F muestra que el BB-01 y BB-17 sintetizados usando el método del éster provoca la activación mieloide como se indica con el antígeno leucocitario humano-antígeno D relacionado o "HLA-DR", mientras que el control no lo hace. El CD20 es el anticuerpo monoclonal no conjugado utilizado como control.

La figura 39A muestra que el BB-01 provoca la activación mieloide como se indica con la regulación por disminución de CD14, mientras que los inmunoconjugados comparativos IRM1 e IRM2 no lo hacen. El CD20 es el anticuerpo monoclonal no conjugado utilizado como control.

La figura 39B muestra que el BB-01 provoca la activación mieloide como se indica con la regulación por disminución de CD16, mientras que los inmunoconjugados comparativos IRM1 e IRM2 no lo hacen. El CD20 es el anticuerpo monoclonal no conjugado utilizado como control.

La figura 39C muestra que el BB-01 provoca la activación mieloide como se indica con la regulación por incremento de CD40, mientras que los inmunoconjugados comparativos IRM1 e IRM2 no lo hacen. El CD20 es el anticuerpo monoclonal no conjugado utilizado como control.

La figura 39D muestra que el BB-01 provoca la activación mieloide como se indica con la regulación por incremento de CD86, mientras que los inmunoconjugados comparativos IRM1 e IRM2 no lo hacen. El CD20 es el anticuerpo monoclonal no conjugado utilizado como control.

La figura 39E muestra que el BB-01 provoca la activación mieloide como se indica con la regulación por incremento de CD123, mientras que los inmunoconjugados comparativos IRM1 e IRM2 no lo hacen. El CD20 es el anticuerpo monoclonal no conjugado utilizado como control.

La figura 39F muestra que el BB-01 provoca la activación mieloide como se indica con la regulación por incremento de HLA-DR mientras que los inmunoconjugados comparativos IRM1 e IRM2 no lo hacen. El CD20 es el anticuerpo monoclonal no conjugado utilizado como control.

La figura 40A muestra que el BB-01 provoca la secreción de citocinas (IL-1β) mientras que los inmunoconjugados comparativos IRM1 e IRM2 no lo hacen. El CD20 es el anticuerpo monoclonal no conjugado utilizado como control.

La figura 40B muestra que el BB-01 provoca la secreción de citocinas (IL-6) mientras que los inmunoconjugados comparativos IRM1 e IRM2 no lo hacen. El CD20 es el anticuerpo monoclonal no conjugado utilizado como control.

La figura 40C muestra que el BB-01 provoca la secreción de citocinas (TNFα) mientras que los inmunoconjugados comparativos IRM1 e IRM2 no lo hacen. El CD20 es el anticuerpo monoclonal no conjugado utilizado como control.

La figura 41A muestra un análisis de cromatografía de exclusión por tamaño del inmunoconjugado BB-26 sintetizado usando el método del éster.

La figura 41B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado BB-26 sintetizado usando el método del éster.

La figura 42A muestra un análisis de cromatografía de exclusión por tamaño del inmunoconjugado BB-27 sintetizado usando el método del éster.

La figura 42B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado BB-27 sintetizado usando el método del éster.

La figura 43A muestra un análisis de cromatografía de exclusión por tamaño del inmunoconjugado BB-36 sintetizado usando el método del éster.

La figura 43B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado BB-36 sintetizado usando el método del éster.

La figura 44A muestra un análisis de cromatografía de exclusión por tamaño del conjugado comparativo IRM1.

La figura 44B muestra un análisis de cromatografía de exclusión por tamaño del conjugado comparativo IRM2.

La figura 44C muestra un análisis de cromatografía de exclusión por tamaño del BB-01.

La figura 45A muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del conjugado IRM1 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 45B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del conjugado BB-01 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 46A muestra un análisis de cromatografía de exclusión por tamaño del inmunoconjugado BB-45 sintetizado usando el método del éster.

La figura 46B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado BB-45 sintetizado usando el método del éster.

La figura 47A muestra un análisis de cromatografía de exclusión por tamaño del inmunoconjugado BB-24 sintetizado usando el método del éster.

La figura 47B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado BB-24 sintetizado usando el método del éster.

La figura 48A muestra un análisis de cromatografía de exclusión por tamaño del inmunoconjugado BB-37 sintetizado usando el método del éster.

La figura 48B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado BB-37 sintetizado usando el método del éster.

La figura 49A muestra un análisis de cromatografía de exclusión por tamaño del inmunoconjugado BB-42 sintetizado usando el método del éster.

La figura 49B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado BB-42 sintetizado usando el método del éster.

La figura 50 muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado BB-43 sintetizado usando el método del éster.

La figura 51 muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado BB-44 sintetizado usando el método del éster.

La figura 52A muestra que el BB-14 provoca la activación mieloide como se indica con la regulación por disminución de CD14, mientras que el control no lo hace. El CD20 es el anticuerpo monoclonal no conjugado utilizado como control.

La figura 52B muestra que el BB-14 provoca la activación mieloide como se indica con la regulación por incremento de CD40 mientras que el control no lo hace. El CD20 es el anticuerpo monoclonal no conjugado utilizado como control.

La figura 52C muestra que el BB-14 provoca la activación mieloide como se indica con la regulación por incremento de CD86, mientras que el control no lo hace. El CD20 es el anticuerpo monoclonal no conjugado utilizado como control.

La figura 52D muestra que el BB-14 provoca la activación mieloide como se indica con la regulación por incremento de HLA-DR mientras que el control no lo hace. El CD20 es el anticuerpo monoclonal no conjugado utilizado como control.

La figura 53A muestra que el BB-15 provoca la activación mieloide como se indica con la regulación por disminución de CD14, mientras que el control no lo hace. El CD20 es el anticuerpo monoclonal no conjugado utilizado como control.

La figura 53B muestra que el BB-15 provoca la activación mieloide como se indica con la regulación por incremento de CD40 mientras que el control no lo hace. El CD20 es el anticuerpo monoclonal no conjugado utilizado como control.

La figura 53C muestra que el BB-15 provoca la activación mieloide como se indica con la regulación por incremento de CD86, mientras que el control no lo hace. El CD20 es el anticuerpo monoclonal no conjugado utilizado como control.

La figura 53D muestra que el BB-27 provoca la activación mieloide como se indica con la regulación por incremento de HLA-DR mientras que el control no lo hace. El CD20 es el anticuerpo monoclonal no conjugado utilizado como control.

La figura 54A muestra que el BB-27 provoca la activación mieloide como se indica con la regulación por disminución de CD14, mientras que el control no lo hace. El CD20 es el anticuerpo monoclonal no conjugado utilizado como control.

La figura 54B muestra que el BB-27 provoca la activación mieloide como se indica con la regulación por incremento de CD40 mientras que el control no lo hace. El CD20 es el anticuerpo monoclonal no conjugado utilizado como control.

La figura 54C muestra que el BB-27 provoca la activación mieloide como se indica con la regulación por incremento de CD86, mientras que el control no lo hace. El CD20 es el anticuerpo monoclonal no conjugado utilizado como control.

La figura 54D muestra que el BB-27 provoca la activación mieloide como se indica con la regulación por incremento de HLA-DR mientras que el control no lo hace. El CD20 es el anticuerpo monoclonal no conjugado utilizado como control.

La figura 55A muestra que el BB-45 provoca la activación mieloide como se indica con la regulación por disminución de CD14, mientras que el control no lo hace. El CD20 es el anticuerpo monoclonal no conjugado utilizado como control.

La figura 55B muestra que el BB-45 provoca la activación mieloide como se indica con la regulación por incremento de CD40 mientras que el control no lo hace. El CD20 es el anticuerpo monoclonal no conjugado utilizado como control.

La figura 55C muestra que el BB-45 provoca la activación mieloide como se indica con la regulación por incremento de CD86, mientras que el control no lo hace. El CD20 es el anticuerpo monoclonal no conjugado utilizado como control.

La figura 55D muestra que el BB-45 provoca la activación mieloide como se indica con la regulación por incremento de HLA-DR mientras que el control no lo hace. El CD20 es el anticuerpo monoclonal no conjugado utilizado como control.

La figura 56A muestra que el BB-24 provoca la activación mieloide como se indica con la regulación por disminución de CD14, mientras que el control no lo hace. El CD20 es el anticuerpo monoclonal no conjugado utilizado como control.

La figura 56B muestra que el BB-24 provoca la activación mieloide como se indica con la regulación por incremento de CD40 mientras que el control no lo hace. El CD20 es el anticuerpo monoclonal no conjugado utilizado como control.

La figura 56C muestra que el BB-24 provoca la activación mieloide como se indica con la regulación por incremento de CD86, mientras que el control no lo hace. El CD20 es el anticuerpo monoclonal no conjugado utilizado como control.

La figura 56D muestra que el BB-24 provoca la activación mieloide como se indica con la regulación por incremento de HLA-DR mientras que el control no lo hace. El CD20 es el anticuerpo monoclonal no conjugado utilizado como control.

La figura 57 muestra la unión de BB-01 a células CD20 Toledo, que son una línea celular utilizada como sistema modelo para estudiar linfomas no hodgkinianos. El BB-01 tenía una unión más fuerte que los anticuerpos rituximab o cetuximab.

La figura 58 muestra que el inmunoconjugado de αEGFR con el compuesto 1 (αEGFR Boltbody) fue más eficaz que la mezcla de anticuerpo y adyuvante para activar las células NK. Las PBMC se activaron con el inmunoconjugado o la mezcla durante 18 horas. Las células NK se clasificaron según el linaje negativo (CD3, CD19, CD14 negativo) y CD56 positivo.

La figura 59 muestra el análisis de un inmunoconjugado comparativo mediante LC-MS (DG). Este conjugado comparativo se preparó con trastuzumab y un enlazador no escindible de maleimida PEG4 que contiene un grupo pentafluorofenilo con gardiquimod (véase el documento US 2017/015772, párrafo 0275, descripción del inmunoconjugado ATAC3).

La figura 60 muestra el análisis de un inmunoconjugado comparativo mediante LC-MS (cadena pesada). Este conjugado comparativo se preparó con trastuzumab y un enlazador no escindible de maleimida-PEG4 que contiene un grupo pentafluorofenilo con gardiquimod (véase el documento US 2017/015772, párrafo 0275, descripción del inmunoconjugado ATAC3).

La figura 61 muestra el análisis de un inmunoconjugado comparativo mediante LC-MS. Este conjugado comparativo se preparó con trastuzumab y un enlazador no escindible de maleimida-PEG4 que contiene un grupo pentafluorofenilo con gardiquimod (véase el documento US 2017/015772, párrafo 0275, descripción del inmunoconjugado ATAC3).

La figura 62 muestra el análisis de un inmunoconjugado comparativo mediante LC-MS (cadena ligera). Este conjugado comparativo se preparó con trastuzumab y un enlazador no escindible de maleimida-PEG4 que contiene

un grupo pentafluorofenilo con gardiquimod (véase el documento US 2017/015772, párrafo 0275, descripción del inmunoconjugado ATAC3).

La figura 63 muestra el análisis de un inmunoconjugado comparativo mediante LC-MS (DG, cadena pesada). Este conjugado comparativo se preparó con trastuzumab y un enlazador no escindible de maleimida-PEG4 que contiene un grupo pentafluorofenilo con gardiquimod (véase el documento US 2017/015772, párrafo 0275, descripción del inmunoconjugado ATAC3).

La figura 64 muestra el análisis de un inmunoconjugado comparativo mediante LC-MS (DG, cadena ligera). Este conjugado comparativo se preparó con trastuzumab y un enlazador no escindible de maleimida-PEG4 que contiene un grupo pentafluorofenilo con gardiquimod (véase el documento US 2017/015772, párrafo 0275, descripción del inmunoconjugado ATAC3).

La figura 65 muestra el análisis de un inmunoconjugado comparativo mediante LC-MS (DG). Este conjugado comparativo se preparó con trastuzumab y un enlazador escindible de valina-citrulina que contiene un grupo PABA con succinamida (véase el documento US 2017/015772, párrafo 0275, descripción del inmunoconjugado ATAC2).

La figura 66 muestra el análisis de un inmunoconjugado comparativo mediante LC-MS. Este conjugado comparativo se preparó con trastuzumab y un enlazador escindible de valina-citrulina que contiene un grupo PABA con succinamida (véase el documento US 2017/015772, párrafo 0275, descripción del inmunoconjugado ATAC2).

La figura 67A muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de BB-01 SATA (rituximab Boltbody) provoca una secreción superior de IL-1β en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (Roche), así como concentraciones equimolares de conjugados comparativos preparados con rituximab y ya sea un enlazador de valina-citrulina-PABC o un enlazador de maleimida-PEG4, ambos que contienen un grupo pentafluorofenilo con gardiquimod (rituximab-ATAC2, rituximab-ATAC3 respectivamente; US 2017/015772) después de 18 horas de estimulación.

La figura 67B muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de BB-01 SATA (rituximab Boltbody) provoca una secreción superior de TNFα en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (Roche), así como concentraciones equimolares de conjugados comparativos preparados con rituximab y ya sea un enlazador de valina-citrulina-PABC o un enlazador de maleimida-PEG4, ambos que contienen un grupo pentafluorofenilo con gardiquimod (rituximab-ATAC2, rituximab-ATAC3 respectivamente; US 2017/015772) después de 18 horas de estimulación.

La figura 67C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de rituximab no conjugado (Roche) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-01 o los inmunoconjugados de rituximab según los métodos descritos en el documento US 2017/015772 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 67D muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de rituximab no conjugado (Roche) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-01 o los inmunoconjugados de rituximab según los métodos descritos en el documento US 2017/015772.

La figura 67E muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de la cadena pesada-ligera ipsilateral del inmunoconjugado de rituximab producido usando un enlazador de valina-citrulina-PABC como se describe en el documento US 2017/015772 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 67F muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de la cadena ligera del inmunoconjugado de rituximab producido usando un enlazador de valina-citrulina-PABC como se describe en el documento US 2017/015772 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 67G muestra que el inmunoconjugado de rituximab con enlazador de valina-citrulina-PABC producido según los métodos descritos en el documento US 2017/015772 (Ritux-ATAC2) no logra provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación. La figura 67G también muestra que el inmunoconjugado BB-01 producido según el método SATA [rituximab Boltbody (BB-01)] es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en comparación con Ritux-ATAC2 y concentraciones equimolares de rituximab no conjugado (Roche).

La figura 67H muestra que el inmunoconjugado de rituximab con enlazador de valina-citrulina-PABC producido según los métodos descritos en el documento US 2017/015772 (Ritux-ATAC2) no logra provocar la regulación por disminución de CD14 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación. La figura 67H también muestra que el inmunoconjugado BB-01 producido según el método SATA [rituximab Boltbody (BB-01)] es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD14 en comparación con Ritux-ATAC2 y concentraciones equimolares de rituximab no conjugado (Roche).

La figura 67I muestra que el inmunoconjugado BB-01 producido según el método SATA [rituximab Boltbody (BB-01)] es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD16 en las células mieloides en comparación con el inmunoconjugado de rituximab con enlazador de valina-citrulina-PABC producido según los métodos descritos en el documento US 2017/015772 (Ritux-ATAC2) y concentraciones equimolares de rituximab

no conjugado (Roche).

La figura 67J muestra que el inmunoconjugado de rituximab con enlazador de valina-citrulina-PABC producido según los métodos descritos en el documento US 2017/015772 (Ritux-ATAC2) no logra provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación. La figura 67J también muestra que el inmunoconjugado BB-01 producido según el método SATA [rituximab Boltbody (BB-01)] es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en comparación con Ritux-ATAC2 y concentraciones equimolares de rituximab no conjugado (Roche).

La figura 67K muestra que el inmunoconjugado BB-01 producido según el método SATA [rituximab Boltbody (BB-01)] es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides en comparación con el inmunoconjugado de rituximab con enlazador de valina-citrulina-PABC producido según los métodos descritos en el documento US 2017/015772 (RituxATAC2) y concentraciones equimolares de rituximab no conjugado (Roche).

La figura 67L muestra la expresión de CD123 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de rituximab con enlazador de valina-citrulina-PABC producido según los métodos descritos en el documento US 2017/015772 (Ritux-ATAC2) en comparación con el rituximab no conjugado (Roche).

La figura 67M muestra la expresión de CD14 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de rituximab con enlazador de valina-citrulina-PABC producido según los métodos descritos en el documento US 2017/015772 (Ritux-ATAC2) en comparación con el rituximab no conjugado (Roche).

La figura 67N muestra la expresión de CD16 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de rituximab con enlazador de valina-citrulina-PABC producido según los métodos descritos en el documento US 2017/015772 (Ritux-ATAC2) en comparación con el rituximab no conjugado (Roche).

La figura 67O muestra la expresión de CD40 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de rituximab con enlazador de valina-citrulina-PABC producido según los métodos descritos en el documento US 2017/015772 (Ritux-ATAC2) en comparación con el rituximab no conjugado (Roche).

La figura 67P muestra la expresión de CD86 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de rituximab con enlazador de valina-citrulina-PABC producido según los métodos descritos en el documento US 2017/015772 (Ritux-ATAC2) en comparación con el rituximab no conjugado (Roche).

La figura 68A muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de BB-01 SATA (rituximab Boltbody) provoca una secreción superior de IL-1β en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (Roche), así como concentraciones equimolares de conjugados comparativos preparados con rituximab y ya sea un enlazador de valina-citrulina-PABC o un enlazador de maleimida-PEG4, ambos que contienen un grupo pentafluorofenilo con gardiquimod (rituximab-ATAC2, rituximab-ATAC3 respectivamente; US 2017/015772) después de 18 horas de estimulación.

La figura 68B muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de BB-01 SATA (rituximab Boltbody) provoca una secreción superior de TNFα en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (Roche), así como concentraciones equimolares de conjugados comparativos preparados con rituximab y ya sea un enlazador de valina-citrulina-PABC o un enlazador de maleimida-PEG4, ambos que contienen un grupo pentafluorofenilo con gardiquimod (rituximab-ATAC2, rituximab-ATAC3 respectivamente; US 2017/015772) después de 18 horas de estimulación.

La figura 68C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de rituximab no conjugado (Roche) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-01 o los inmunoconjugados de rituximab según los métodos descritos en el documento US 2017/015772 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 68D muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de rituximab no conjugado (Roche) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-01 o los inmunoconjugados de rituximab según los métodos descritos en el documento US 2017/015772.

La figura 68E muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de la cadena pesada-ligera ipsilateral del inmunoconjugado de rituximab producido usando un enlazador de maleimida PEG4 como se describe en el documento US 2017/015772 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 68F muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de la cadena ligera del inmunoconjugado de rituximab producido usando un enlazador de maleimida-PEG4 como se describe en el documento US 2017/015772 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 68G muestra que el inmunoconjugado de rituximab con enlazador de maleimida-PEG4 producido según los métodos descritos en el documento US 2017/015772 (Ritux-ATAC3) no logra provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación. La figura 68G también muestra que el inmunoconjugado BB-01 producido según el método SATA [rituximab Boltbody (BB-01)] es superior

a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en comparación con Ritux-ATAC3 y concentraciones equimolares de rituximab no conjugado (Roche).

La figura 68H muestra que el inmunoconjugado BB-01 producido según el método SATA [rituximab Boltbody (BB-01)] es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD14 en las células mieloides en comparación con el inmunoconjugado de rituximab con enlazador de maleimida-PEG4 producido según los métodos descritos en US 2017/015772 (Ritux-ATAC3) y concentraciones equimolares de rituximab no conjugado (Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 68I muestra que el inmunoconjugado de rituximab con enlazador de maleimida-PEG4 producido según los métodos descritos en el documento US 2017/015772 (Ritux-ATAC3) no logra provocar una regulación por disminución de CD16 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación. La figura 68I también muestra que el inmunoconjugado BB-01 producido según el método SATA [rituximab Boltbody (BB-01)] es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en comparación con Ritux-ATAC2 y concentraciones equimolares de rituximab no conjugado (Roche).

La figura 68J muestra que el inmunoconjugado de rituximab con enlazador de maleimida-PEG4 producido según los métodos descritos en el documento US 2017/015772 (Ritux-ATAC3) no logra provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación. La figura 68J también muestra que el inmunoconjugado BB-01 producido según el método SATA [rituximab Boltbody (BB-01)] es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en comparación con Ritux-ATAC2 y concentraciones equimolares de rituximab no conjugado (Roche).

La figura 68K muestra que el inmunoconjugado de rituximab con enlazador de maleimida-PEG4 producido según los métodos descritos en el documento US 2017/015772 (Ritux-ATAC3) no logra provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación. La figura 68J también muestra que el inmunoconjugado BB-01 producido según el método SATA [rituximab Boltbody (BB-01)] es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en comparación con Ritux-ATAC2 y concentraciones equimolares de rituximab no conjugado (Roche).

La figura 68L muestra la expresión de CD123 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de rituximab con enlazador de maleimida-PEG4 producido según los métodos descritos en el documento US 2017/015772 (Ritux-ATAC3) en comparación con el rituximab no conjugado (Roche).

La figura 68M muestra la expresión de HLA-DR en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de rituximab con enlazador de maleimida-PEG4 producido según los métodos descritos en el documento US 2017/015772 (Ritux-ATAC3) en comparación con el rituximab no conjugado (Roche).

La figura 68N muestra la expresión de CD14 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de rituximab con enlazador de maleimida-PEG4 producido según los métodos descritos en el documento US 2017/015772 (Ritux-ATAC3) en comparación con el rituximab no conjugado (Roche).

La figura 68O muestra la expresión de CD16 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de rituximab con enlazador de maleimida-PEG4 producido según los métodos descritos en el documento US 2017/015772 (Ritux-ATAC3) en comparación con el rituximab no conjugado (Roche).

La figura 68P muestra la expresión de CD40 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de rituximab con enlazador de maleimida-PEG4 producido según los métodos descritos en el documento US 2017/015772 (Ritux-ATAC3) en comparación con el rituximab no conjugado (Roche).

La figura 68Q muestra la expresión de CD86 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de rituximab con enlazador de maleimida-PEG4 producido según los métodos descritos en el documento US 2017/015772 (Ritux-ATAC3) en comparación con el rituximab no conjugado (Roche).

La figura 69A muestra que el inmunoconjugado de atezolizumab producido según el método de BB-01 (Atezolizumab IgG1 NQ Boltbody) provoca una secreción superior de IL-1β en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de atezolizumab no conjugado (Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 69B muestra que el inmunoconjugado de atezolizumab producido según el método de BB-01 (Atezolizumab IgG1 NQ Boltbody) provoca una secreción superior de TNFα en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de atezolizumab no conjugado (Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 69C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de atezolizumab producido según el método de conjugación de BB-01 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 69D muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de atezolizumab no conjugado (Roche) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de atezolizumab según el método de

conjugación de BB-01 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 69E muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de atezolizumab no conjugado (Roche) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de atezolizumab según el método de BB-01.

La figura 69F muestra la expresión de CD123 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de atezolizumab producido según el método de BB-01 (Atezolizumab Boltbody) en comparación con el atezolizumab no conjugado (Roche).

La figura 69G muestra la expresión de HLA-DR en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de atezolizumab producido según el método de BB-01 (Atezolizumab Boltbody) en comparación con el atezolizumab no conjugado (Roche).

La figura 69H muestra que el inmunoconjugado de atezolizumab producido según el método de BB-01 (Atezolizumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD14 en las células mieloides en comparación con el atezolizumab no conjugado (Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 69I muestra que el inmunoconjugado de atezolizumab producido según el método de BB-01 (Atezolizumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD16 en las células mieloides en comparación con el atezolizumab no conjugado (Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 69J muestra que el inmunoconjugado de atezolizumab producido según el método de BB-01 (Atezolizumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides en comparación con el atezolizumab no conjugado (Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 69K muestra la expresión de CD86 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de atezolizumab producido según el método de BB-01 (Atezolizumab Boltbody) en comparación con el atezolizumab no conjugado (Roche).

La figura 70A muestra que el inmunoconjugado de bevacizumab producido según el método de BB-01 (Bevacizumab Boltbody) provoca una secreción superior de IL-1β en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de bevacizumab no conjugado (Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 70B muestra que el inmunoconjugado de bevacizumab producido según el método de BB-01 (Bevacizumab Boltbody) provoca una secreción superior de TNFα en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de bevacizumab no conjugado (Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 70C muestra que el inmunoconjugado de bevacizumab producido según el método de BB-01 (Bevacizumab Boltbody) provoca una secreción superior de IL-1β en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de bevacizumab no conjugado (Roche) después de 36 horas de estimulación.

La figura 70D muestra que el inmunoconjugado de bevacizumab producido según el método de BB-01 (Bevacizumab Boltbody) provoca una secreción superior de TNFα en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de bevacizumab no conjugado (Roche) después de 36 horas de estimulación.

La figura 70E muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de bevacizumab producido según el método de conjugación de BB-01 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 70F muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de bevacizumab no conjugado (Roche) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de bevacizumab según el método de conjugación de BB-01 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 70G muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de bevacizumab no conjugado (Roche) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de bevacizumab según el método de BB-01.

La figura 70H muestra que el inmunoconjugado de bevacizumab producido según el método de BB-01 (Bevacizumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides en comparación con el bevacizumab no conjugado (Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 70I muestra la expresión de HLA-DR en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de bevacizumab producido según el método de BB-01 (Bevacizumab Boltbody) en comparación con el bevacizumab no conjugado (Roche).

La figura 70J muestra que el inmunoconjugado de bevacizumab producido según el método de BB-01 (Bevacizumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD14 en las células mieloides en comparación con el bevacizumab no conjugado (Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 70K muestra que el inmunoconjugado de bevacizumab producido según el método de BB-01 (Bevacizumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD16 en las células mieloides en comparación con el bevacizumab no conjugado (Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 70L muestra que el inmunoconjugado de bevacizumab producido según el método de BB-01 (Bevacizumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides en comparación con el bevacizumab no conjugado (Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 70M muestra que el inmunoconjugado de bevacizumab producido según el método de BB-01 (Bevacizumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides en comparación con el bevacizumab no conjugado (Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 71A muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de cetuximab producido según el método de conjugación de BB-01 a partir del biosimilar de cetuximab (Alphamab) después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 71B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de cetuximab producido según el método de conjugación de BB-01.

La figura 71C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del biosimilar de cetuximab no conjugado (Alphamab) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de cetuximab según el método de BB-01 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 71D muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del biosimilar de cetuximab no conjugado (Alphamab) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de cetuximab según el método de conjugación de BB-01.

La figura 71E muestra que los inmunoconjugados de rituximab producidos según el método de BB-01 a partir de biosimilares de rituximab (AmAb, Alphamab; JHL, JHL Biotech; LGM, LGM Pharma) provocan una regulación por incremento de CD123 comparable en las células mieloides después de 18 horas de estimulación. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 71F muestra que los inmunoconjugados de rituximab producidos según el método de BB-01 a partir de biosimilares de rituximab (AmAb, Alphamab; JHL, JHL Biotech; LGM, LGM Pharma) provocan una expresión de HLA-DR comparable en las células mieloides después de 18 horas de estimulación. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 71G muestra que los inmunoconjugados de rituximab producidos según el método de BB-01 a partir de biosimilares de rituximab (biosimilar 1, Alphamab; biosimilar 2, JHL Biotech; biosimilar 3, LGM Pharma) provocan una regulación por disminución comparable de CD14 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 71H muestra que los inmunoconjugados de rituximab producidos según el método de BB-01 a partir de biosimilares de rituximab (AmAb, Alphamab; JHL, JHL Biotech; LGM, LGM Pharma) provocan una regulación por disminución de CD16 comparable en las células mieloides después de 18 horas de estimulación. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 71I muestra que los inmunoconjugados de rituximab producidos según el método de BB-01 a partir de biosimilares de rituximab (AmAb, Alphamab; JHL, JHL Biotech; LGM, LGM Pharma) provocan una regulación por incremento de CD40 comparable en las células mieloides después de 18 horas de estimulación. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 71J muestra que los inmunoconjugados de rituximab producidos según el método de BB-01 a partir de biosimilares de rituximab (AmAb, Alphamab; JHL, JHL Biotech; LGM, LGM Pharma) provocan una regulación por incremento de CD86 comparable en las células mieloides después de 18 horas de estimulación. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 71K muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-01 a partir del biosimilar de rituximab (Alphamab) después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 71L muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-01 a partir del biosimilar de rituximab (Alphamab).

La figura 71M muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de un biosimilar de rituximab no conjugado (Alphamab) que se utilizó para producir el inmunoconjugado del biosimilar de rituximab según el método de BB-01 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 71N muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de un biosimilar de rituximab no conjugado (Alphamab) que se utilizó para producir el inmunoconjugado del biosimilar de rituximab según el método de BB-01.

La figura 71O muestra que el inmunoconjugado del biosimilar de rituximab producido según el método de BB-01 a

partir de un biosimilar de rituximab [BB-01 (biosimilar 1)] es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides en comparación con el biosimilar de rituximab no conjugado correspondiente [(CD20 (biosimilar 1), Alphamab] después de 18 horas de estimulación.

La figura 71P muestra que el inmunoconjugado del biosimilar de rituximab producido según el método de BB-01 a partir de un biosimilar de rituximab [BB-01 (biosimilar 1)] es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de HLA-DR en las células mieloides en comparación con el biosimilar de rituximab no conjugado correspondiente [(CD20 (biosimilar 1), Alphamab] después de 18 horas de estimulación.

La figura 71Q muestra que el inmunoconjugado del biosimilar de rituximab producido según el método de BB-01 a partir de un biosimilar de rituximab [BB-01 (biosimilar 1)] es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD14 en las células mieloides en comparación con el biosimilar de rituximab no conjugado correspondiente [(CD20 (biosimilar 1), Alphamab] después de 18 horas de estimulación.

La figura 71R muestra que el inmunoconjugado del biosimilar de rituximab producido según el método de BB-01 a partir de un biosimilar de rituximab [BB-01 (biosimilar 1)] es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD16 en las células mieloides en comparación con el biosimilar de rituximab no conjugado correspondiente [(CD20 (biosimilar 1), Alphamab] después de 18 horas de estimulación.

La figura 71S muestra que el inmunoconjugado del biosimilar de rituximab producido según el método de BB-01 a partir de un biosimilar de rituximab [BB-01 (biosimilar 1)] es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides en comparación con el biosimilar de rituximab no conjugado correspondiente [(CD20 (biosimilar 1), Alphamab] después de 18 horas de estimulación.

La figura 71T muestra que el inmunoconjugado del biosimilar de rituximab producido según el método de BB-01 a partir de un biosimilar de rituximab [BB-01 (biosimilar 1)] es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides en comparación con el biosimilar de rituximab no conjugado correspondiente [(CD20 (biosimilar 1), Alphamab] después de 18 horas de estimulación.

La figura 71U muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-01 a partir del biosimilar de rituximab (LGM Pharma) después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 71V muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-01 a partir del biosimilar de rituximab (LGM Pharma).

La figura 71W muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de un biosimilar de rituximab no conjugado (LGM Pharma) que se utilizó para producir el inmunoconjugado del biosimilar de rituximab según el método de BB-01 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 71X muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de un biosimilar de rituximab no conjugado (LGM Pharma) que se utilizó para producir el inmunoconjugado del biosimilar de rituximab según el método de BB-01.

La figura 71Y muestra que el inmunoconjugado del biosimilar de rituximab producido según el método de BB-01 a partir de un biosimilar de rituximab (BB-01) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides en comparación con el biosimilar de rituximab no conjugado correspondiente (CD20, LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 71Z muestra que el inmunoconjugado del biosimilar de rituximab producido según el método de BB-01 a partir de un biosimilar de rituximab (BB-01) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de HLA-DR en las células mieloides en comparación con el biosimilar de rituximab no conjugado correspondiente (CD20, LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 71AA muestra que el inmunoconjugado del biosimilar de rituximab producido según el método de BB-01 a partir de un biosimilar de rituximab (BB-01) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD14 en las células mieloides en comparación con el biosimilar de rituximab no conjugado correspondiente (CD20, LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 71AB muestra que el inmunoconjugado del biosimilar de rituximab producido según el método de BB-01 a partir de un biosimilar de rituximab (BB-01) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD16 en las células mieloides en comparación con el biosimilar de rituximab no conjugado correspondiente (CD20, LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 71AC muestra que el inmunoconjugado del biosimilar de rituximab producido según el método de BB-01 a partir de un biosimilar de rituximab (BB-01) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides en comparación con el biosimilar de rituximab no conjugado correspondiente (CD20, LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 71AD muestra que el inmunoconjugado del biosimilar de rituximab producido según el método de BB-01 a partir de un biosimilar de rituximab (BB-01) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides en comparación con el biosimilar de rituximab no conjugado correspondiente (CD20, LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 71AE muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-01 a partir del biosimilar de rituximab (JHL Biotech) después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 71AF muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-01 a partir del biosimilar de rituximab (JHL Biotech).

La figura 71AG muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de un biosimilar de rituximab no conjugado (JHL Biotech) que se utilizó para producir el inmunoconjugado del biosimilar de rituximab según el método de BB-01 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 71AH muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de un biosimilar de rituximab no conjugado (JHL Biotech) que se utilizó para producir el inmunoconjugado del biosimilar de rituximab según el método de BB-01.

La figura 71AI muestra que el inmunoconjugado del biosimilar de rituximab producido según el método de BB-01 a partir de un biosimilar de rituximab [BB-01 (biosimilar 2)] es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides en comparación con el biosimilar de rituximab no conjugado correspondiente [(CD20 (biosimilar 2), JHL Biotech] después de 18 horas de estimulación.

La figura 71AJ muestra que el inmunoconjugado del biosimilar de rituximab producido según el método de BB-01 a partir de un biosimilar de rituximab [BB-01 (biosimilar 2)] es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de HLA-DR en las células mieloides en comparación con el biosimilar de rituximab no conjugado correspondiente [(CD20 (biosimilar 2), JHL Biotech] después de 18 horas de estimulación.

La figura 71AK muestra que el inmunoconjugado del biosimilar de rituximab producido según el método de BB-01 a partir de un biosimilar de rituximab [BB-01 (biosimilar 2)] es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides en comparación con el biosimilar de rituximab no conjugado correspondiente [(CD20 (biosimilar 2), JHL Biotech] después de 18 horas de estimulación.

La figura 71AL muestra que el inmunoconjugado del biosimilar de rituximab producido según el método de BB-01 a partir de un biosimilar de rituximab [BB-01 (biosimilar 2)] es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides en comparación con el biosimilar de rituximab no conjugado correspondiente [(CD20 (biosimilar 2), JHL Biotech] después de 18 horas de estimulación.

La figura 71AM muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de rituximab no conjugado (Roche).

La figura 71AN muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de trastuzumab producido según el método de conjugación de BB-01 a partir del biosimilar de trastuzumab (JHL Biotech) después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 71AO muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de trastuzumab producido según el método de conjugación de BB-01 a partir del biosimilar de trastuzumab (JHL Biotech).

La figura 71AP muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de un biosimilar de trastuzumab no conjugado (JHL Biotech) que se utilizó para producir el inmunoconjugado del biosimilar de trastuzumab según el método de BB-01 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 71AQ muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de un biosimilar de trastuzumab no conjugado (JHL Biotech) que se utilizó para producir el inmunoconjugado del biosimilar de trastuzumab según el método de BB-01.

La figura 71AR muestra que el inmunoconjugado del biosimilar de trastuzumab producido según el método de BB-01 a partir de un biosimilar de trastuzumab (BB-40) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides en comparación con el biosimilar de trastuzumab no conjugado correspondiente [Trastuzumab (JHL), JHL Biotech) después de 18 horas de estimulación.

La figura 71AS muestra que el inmunoconjugado del biosimilar de trastuzumab producido según el método de BB-01 a partir de un biosimilar de trastuzumab (BB-40) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de HLA-DR en las células mieloides en comparación con el biosimilar de trastuzumab no conjugado correspondiente [Trastuzumab (JHL) , JHL Biotech) después de 18 horas de estimulación.

La figura 71AT muestra que el inmunoconjugado del biosimilar de trastuzumab producido según el método de BB-

01 a partir de un biosimilar de trastuzumab (BB-40) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD14 en las células mieloides en comparación con el biosimilar de trastuzumab no conjugado correspondiente [Trastuzumab (JHL), JHL Biotech) después de 18 horas de estimulación.

La figura 71AU muestra que el inmunoconjugado del biosimilar de trastuzumab producido según el método de BB-01 a partir de un biosimilar de trastuzumab (BB-40) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD16 en las células mieloides en comparación con el biosimilar de trastuzumab no conjugado correspondiente [Trastuzumab (JHL), JHL Biotech) después de 18 horas de estimulación.

La figura 71AV muestra que el inmunoconjugado del biosimilar de trastuzumab producido según el método de BB-01 a partir de un biosimilar de trastuzumab (BB-40) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides en comparación con el biosimilar de trastuzumab no conjugado correspondiente [Trastuzumab (JHL), JHL Biotech) después de 18 horas de estimulación.

La figura 71AW muestra que el inmunoconjugado del biosimilar de trastuzumab producido según el método de BB-01 a partir de un biosimilar de trastuzumab (BB-40) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides en comparación con el biosimilar de trastuzumab no conjugado correspondiente [Trastuzumab (JHL), JHL Biotech) después de 18 horas de estimulación.

La figura 72A muestra que el inmunoconjugado de cetuximab producido según el método de BB-01 (Cetuximab Boltbody) provoca una secreción superior de IL-1β en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de cetuximab no conjugado (Imclone/Lilly) después de 18 horas de estimulación.

La figura 72B muestra que el inmunoconjugado de cetuximab producido según el método de BB-01 (Cetuximab Boltbody) provoca una secreción superior de TNFα en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de cetuximab no conjugado (Imclone/Lilly) después de 18 horas de estimulación.

La figura 72C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de cetuximab no conjugado (Imclone/Lilly) que se utilizó para producir inmunoconjugado de cetuximab según el método de conjugación de BB-01 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 72D muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de cetuximab no conjugado (Imclone/Lilly) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de cetuximab según el método de conjugación de BB-01.

La figura 72E muestra que el inmunoconjugado de cetuximab producido según el método de BB-01 (círculos cerrados, rojo) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides en comparación con el cetuximab no conjugado (cuadrados cerrados, negro; Imclone/Lilly) después de 18 horas de estimulación.

La figura 72F muestra que el inmunoconjugado de cetuximab producido según el método de BB-01 (círculos cerrados, rojo) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de HLA-DR en las células mieloides en comparación con el cetuximab no conjugado (cuadrados cerrados, negro; Imclone/Lilly) después de 18 horas de estimulación.

La figura 72G muestra que el inmunoconjugado de cetuximab producido según el método de BB-01 (círculos cerrados, rojo) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD14 en las células mieloides en comparación con el cetuximab no conjugado (cuadrados cerrados, negro; Imclone/Lilly) después de 18 horas de estimulación.

La figura 72H muestra que el inmunoconjugado de cetuximab producido según el método de BB-01 (círculos cerrados, rojo) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD16 en las células mieloides en comparación con el cetuximab no conjugado (cuadrados cerrados, negro; Imclone/Lilly) después de 18 horas de estimulación.

La figura 72I muestra que el inmunoconjugado de cetuximab producido según el método de BB-01 (círculos cerrados, rojo) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides en comparación con el cetuximab no conjugado (cuadrados cerrados, negro; Imclone/Lilly) después de 18 horas de estimulación.

La figura 72J muestra que el inmunoconjugado de cetuximab producido según el método de BB-01 (círculos cerrados, rojo) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides en comparación con el cetuximab no conjugado (cuadrados cerrados, negro; Imclone/Lilly) después de 18 horas de estimulación.

La figura 73A muestra que el inmunoconjugado de daratumumab producido según el método de BB-01 (Daratumumab Boltbody) provoca una secreción superior de IL-1β en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de daratumumab no conjugado (Genmab/Janssen Biotech) después de 18 horas de estimulación.

La figura 73B muestra que el inmunoconjugado de daratumumab producido según el método de BB-01 (Daratumumab Boltbody) provoca una secreción superior de TNFα en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de daratumumab no conjugado (Genmab/Janssen Biotech) después de 18 horas de estimulación.

La figura 73C muestra que el inmunoconjugado de daratumumab producido según el método de BB-01 (Daratuzumab [sic] Boltbody) provoca una secreción superior de TNFα en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de daratumumab no conjugado (Daratuzumab [sic], Genmab/Janssen Biotech) después de 36 horas de estimulación.

La figura 73D muestra que el inmunoconjugado de daratumumab producido según el método de BB-01 (Daratuzumab [sic] Boltbody) provoca una secreción superior de IL-1β en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de daratumumab no conjugado (Daratuzumab [sic], Genmab/Janssen Biotech) después de 36 horas de estimulación.

La figura 73E muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de daratumumab no conjugado (Genmab/Janssen Biotech) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de daratumumab según el método de BB-01 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 73F muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de daratumumab producido según el método de BB-01 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 73G muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de daratumumab no conjugado (Genmab/Janssen Biotech) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de daratumumab según el método de BB-01.

La figura 73H muestra que el inmunoconjugado de daratumumab producido según el método de BB-01 (Daratuzumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides en comparación con el daratumumab no conjugado (Daratuzumab |, Genmab/Janssen Biotech) después de 18 horas de estimulación.

La figura 73I muestra la expresión de HLA-DR en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de daratumumab producido según el método de BB-01 (Daratumumab Boltbody) en comparación con el daratumumab no conjugado (Genmab/Janssen Biotech).

La figura 73J muestra que el inmunoconjugado de daratumumab producido según el método de BB-01 (Daratuzumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD14 en las células mieloides en comparación con el daratumumab no conjugado (Daratuzumab |, Genmab/Janssen Biotech) después de 18 horas de estimulación.

La figura 73K muestra que el inmunoconjugado de daratumumab producido según el método de BB-01 (Daratuzumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD16 en las células mieloides en comparación con el daratumumab no conjugado (Daratuzumab, Genmab/Janssen Biotech) después de 18 horas de estimulación.

La figura 73L muestra que el inmunoconjugado de daratumumab producido según el método de BB-01 (Daratuzumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides en comparación con el daratumumab no conjugado (Daratuzumab |, Genmab/Janssen Biotech) después de 18 horas de estimulación.

La figura 73M muestra que el inmunoconjugado de daratumumab producido según el método de BB-01 (Daratuzumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides en comparación con el daratumumab no conjugado (Daratuzumab |, Genmab/Janssen Biotech) después de 18 horas de estimulación.

La figura 74A muestra que el inmunoconjugado de elotuzumab producido según el método de BB-01 (Elotuzumab Boltbody) provoca una secreción superior de IL-1β en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de elotuzumab no conjugado (BMS) después de 36 horas de estimulación.

La figura 74B muestra que el inmunoconjugado de elotuzumab producido según el método de BB-01 (Elotuzumab Boltbody) provoca una secreción superior de TNFα en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de elotuzumab no conjugado (BMS) después de 36 horas de estimulación.

La figura 74C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de elotuzumab producido según el método de conjugación de BB-01 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 74D muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de elotuzumab no conjugado (BMS) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de elotuzumab según el método de conjugación

de BB-01 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 74E muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de elotuzumab no conjugado (BMS) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de elotuzumab según el método de BB-01.

La figura 74F muestra que el inmunoconjugado de elotuzumab producido según el método de BB-01 (Elotuzumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides en comparación con el elotuzumab no conjugado (BMS) después de 18 horas de estimulación.

La figura 74G muestra que el inmunoconjugado de elotuzumab producido según el método de BB-01 (Elotuzumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de HLA-DR en las células mieloides en comparación con el elotuzumab no conjugado (BMS) después de 18 horas de estimulación.

La figura 74H muestra que el inmunoconjugado de elotuzumab producido según el método de BB-01 (Elotuzumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD14 en las células mieloides en comparación con el elotuzumab no conjugado (BMS) después de 18 horas de estimulación.

La figura 74I muestra que el inmunoconjugado de elotuzumab producido según el método de BB-01 (Elotuzumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD16 en las células mieloides en comparación con el elotuzumab no conjugado (BMS) después de 18 horas de estimulación.

La figura 74J muestra que el inmunoconjugado de elotuzumab producido según el método de BB-01 (Elotuzumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides en comparación con el elotuzumab no conjugado (BMS) después de 18 horas de estimulación.

La figura 74K muestra que el inmunoconjugado de elotuzumab producido según el método de BB-01 (Elotuzumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides en comparación con el elotuzumab no conjugado (BMS) después de 18 horas de estimulación.

La figura 75A muestra que el inmunoconjugado de ipilimumab producido según el método de BB-01 (Ipilimumab Boltbody) provoca una secreción superior de TNFα en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de ipilimumab no conjugado (BMS) después de 36 horas de estimulación.

La figura 75B muestra que el inmunoconjugado de ipilimumab producido según el método de BB-01 (Ipilimumab Boltbody) provoca una secreción superior de IL-1β en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de ipilimumab no conjugado (BMS) después de 18 horas de estimulación.

La figura 75C muestra que el inmunoconjugado de ipilimumab producido según el método de BB-01 (Ipilimumab Boltbody) provoca una secreción superior de TNFα en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de ipilimumab no conjugado (BMS) después de 18 horas de estimulación.

La figura 75D muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de ipilimumab no conjugado (BMS) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de ipilimumab según el método de conjugación de BB-01 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 75E muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de ipilimumab no conjugado (BMS) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de ipilimumab según el método de BB-01.

La figura 75F muestra que el inmunoconjugado de ipilimumab producido según el método de BB-01 (Ipilimumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides en comparación con el ipilimumab no conjugado (BMS) después de 18 horas de estimulación.

La figura 75G muestra que el inmunoconjugado de ipilimumab producido según el método de BB-01 (Ipilimumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de HLA-DR en las células mieloides en comparación con el ipilimumab no conjugado (BMS) después de 18 horas de estimulación.

La figura 75H muestra que el inmunoconjugado de ipilimumab producido según el método de BB-01 (Ipilimumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD14 en las células mieloides en comparación con el ipilimumab no conjugado (BMS) después de 18 horas de estimulación.

La figura 75I muestra que el inmunoconjugado de ipilimumab producido según el método de BB-01 (Ipilimumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD16 en las células mieloides en comparación con el ipilimumab no conjugado (BMS) después de 18 horas de estimulación.

La figura 75J muestra que el inmunoconjugado de ipilimumab producido según el método de BB-01 (Ipilimumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides en comparación con el ipilimumab no conjugado (BMS) después de 18 horas de estimulación.

La figura 75K muestra que el inmunoconjugado de ipilimumab producido según el método de BB-01 (Ipilimumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides en comparación con el ipilimumab no conjugado (BMS) después de 18 horas de estimulación.

La figura 76A muestra que el inmunoconjugado de nivolumab producido según el método de BB-01 (Nivolumab IgG4 Boltbody) provoca una secreción superior de IL-1β en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de nivolumab no conjugado (Nivolumab IgG4, BMS) después de 18 horas de estimulación.

La figura 76B muestra que el inmunoconjugado de nivolumab producido según el método de BB-01 (Nivolumab IgG4 Boltbody) provoca una secreción superior de TNFα en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de nivolumab no conjugado (Nivolumab IgG4, BMS) después de 18 horas de estimulación.

La figura 76C muestra que el inmunoconjugado de nivolumab producido según el método de BB-01 (Nivolumab IgG4 Boltbody) provoca una secreción superior de IL-1β en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de nivolumab no conjugado (Nivolumab IgG4, BMS) después de 36 horas de estimulación.

La figura 76D muestra que el inmunoconjugado de nivolumab producido según el método de BB-01 (Nivolumab IgG4 Boltbody) provoca una secreción superior de TNFα en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de nivolumab no conjugado (Nivolumab IgG4, BMS) después de 36 horas de estimulación.

La figura 76E muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de nivolumab producido según el método de conjugación de BB-01 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 76F muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de nivolumab no conjugado (BMS) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de nivolumab según el método de conjugación de BB-01 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 76G muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de nivolumab no conjugado (BMS) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de nivolumab según el método de BB-01.

La figura 76H muestra que el inmunoconjugado de nivolumab producido según el método de BB-01 (Nivolumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides en comparación con el nivolumab no conjugado (BMS) después de 18 horas de estimulación.

La figura 76I muestra la expresión de HLA-DR en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de nivolumab producido según el método de BB-01 (Nivolumab Boltbody) en comparación con nivolumab no conjugado (BMS).

La figura 76J muestra que el inmunoconjugado de nivolumab producido según el método de BB-01 (Nivolumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD14 en las células mieloides en comparación con el nivolumab no conjugado (BMS) después de 18 horas de estimulación.

La figura 76K muestra que el inmunoconjugado de nivolumab producido según el método de BB-01 (Nivolumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD16 en las células mieloides en comparación con el nivolumab no conjugado (BMS) después de 18 horas de estimulación.

La figura 76L muestra que el inmunoconjugado de nivolumab producido según el método de BB-01 (Nivolumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides en comparación con el nivolumab no conjugado (BMS) después de 18 horas de estimulación.

La figura 76M muestra que el inmunoconjugado de nivolumab producido según el método de BB-01 (Nivolumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides en comparación con el nivolumab no conjugado (BMS) después de 18 horas de estimulación.

La figura 77A muestra que el inmunoconjugado de obinutuzumab producido según el método de BB-01 (Obinutuzumab Boltbody) provoca una secreción superior de IL-1β en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de obinutuzumab no conjugado (Roche) después de 36 horas de estimulación.

La figura 77B muestra que el inmunoconjugado de obinutuzumab producido según el método de BB-01 (Obinutuzumab Boltbody) provoca una secreción superior de TNFα en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de obinutuzumab no conjugado (Roche) después de 36 horas de estimulación.

La figura 77C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de obinutuzumab no conjugado (Roche) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de obinutuzumab según el método de conjugación de BB-01 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 77D muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de obinutuzumab no conjugado (Roche) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de obinutuzumab según el método de conjugación de BB-01.

La figura 77E muestra que el inmunoconjugado de obinutuzumab producido según el método de BB-01 (Obinutuzumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides en comparación con el mAb CD20 no conjugado (Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 77F muestra la expresión de HLA-DR en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de obinutuzumab producido según el método de BB-01 (Obinutuzumab Boltbody) en comparación con el mAb CD20 no conjugado (Roche).

La figura 77G muestra que el inmunoconjugado de obinutuzumab producido según el método de BB-01 (Obinutuzumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD14 en las células mieloides en comparación con el mAb CD20 no conjugado (Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 77H muestra que el inmunoconjugado de obinutuzumab producido según el método de BB-01 (Obinutuzumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD16 en las células mieloides en comparación con el mAb CD20 no conjugado (Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 77I muestra que el inmunoconjugado de obinutuzumab producido según el método de BB-01 (Obinutuzumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides en comparación con el mAb CD20 no conjugado (Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 77J muestra que el inmunoconjugado de obinutuzumab producido según el método de BB-01 (Obinutuzumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides en comparación con el mAb CD20 no conjugado (Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 78A muestra que el inmunoconjugado de olaratumab producido según el método de BB-01 (Olaratumab Boltbody) provoca una secreción superior de IL-1β en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de olaratumab no conjugado (Lilly) después de 36 horas de estimulación.

La figura 78B muestra que el inmunoconjugado de olaratumab producido según el método de BB-01 (Olaratumab Boltbody) provoca una secreción superior de TNFα en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de olaratumab no conjugado (Lilly) después de 36 horas de estimulación.

La figura 78C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de olaratumab producido según el método de conjugación de BB-0 1 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 78D muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de olaratumab no conjugado (Lilly) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de olaratumab según el método de conjugación de BB-01 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 78E muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de olaratumab no conjugado (Lilly) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de olaratumab según el método de conjugación de BB-01.

La figura 78F muestra que el inmunoconjugado de olaratumab producido según el método de BB-01 (Olaratumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides en comparación con el olaratumab no conjugado (Lilly) después de 18 horas de estimulación.

La figura 78G muestra que el inmunoconjugado de olaratumab producido según el método de BB-01 (Olaratumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de HLA-DR en las células mieloides en comparación con el olaratumab no conjugado (Lilly) después de 18 horas de estimulación.

La figura 78H muestra que el inmunoconjugado de olaratumab producido según el método de BB-01 (Olaratumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD14 en las células mieloides en comparación con el olaratumab no conjugado (Lilly) después de 18 horas de estimulación.

La figura 78I muestra que el inmunoconjugado de olaratumab producido según el método de BB-01 (Olaratumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD16 en las células mieloides en comparación con el olaratumab no conjugado (Lilly) después de 18 horas de estimulación.

La figura 78J muestra que el inmunoconjugado de olaratumab producido según el método de BB-01 (Olaratumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides en comparación con el olaratumab no conjugado (Lilly) después de 18 horas de estimulación.

La figura 78K muestra que el inmunoconjugado de olaratumab producido según el método de BB-01 (Olaratumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides en comparación con el olaratumab no conjugado (Lilly) después de 18 horas de estimulación.

La figura 79A muestra que el inmunoconjugado de pembrolizumab producido según el método de BB-01 (Pembrolizumab Boltbody) provoca una secreción superior de IL-1β en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de pembrolizumab no conjugado (Merck) después de 36 horas de estimulación.

La figura 79B muestra que el inmunoconjugado de pembrolizumab producido según el método de BB-01 (Pembrolizumab Boltbody) provoca una secreción superior de TNFα en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de pembrolizumab no conjugado (Merck) después de 36 horas de estimulación.

La figura 79C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de pembrolizumab producido según el método de conjugación de BB-01 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 79D muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de pembrolizumab no conjugado (Merck) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de pembrolizumab según el método de conjugación de BB-01 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 79E muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de pembrolizumab no conjugado (Merck) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de pembrolizumab según el método de conjugación de BB-01.

La figura 79F muestra que el inmunoconjugado de pembrolizumab producido según el método de BB-01 (Pembrolizumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides en comparación con el pembrolizumab no conjugado (Merck) después de 18 horas de estimulación.

La figura 79G muestra que el inmunoconjugado de pembrolizumab producido según el método de BB-01 (Pembrolizumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de HLA-DR en las células mieloides en comparación con el pembrolizumab no conjugado (Merck) después de 18 horas de estimulación.

La figura 79H muestra que el inmunoconjugado de pembrolizumab producido según el método de BB-01 (Pembrolizumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD14 en las células mieloides en comparación con el pembrolizumab no conjugado (Merck) después de 18 horas de estimulación.

La figura 79I muestra que el inmunoconjugado de pembrolizumab producido según el método de BB-01 (Pembrolizumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD16 en las células mieloides en comparación con el pembrolizumab no conjugado (Merck) después de 18 horas de estimulación.

La figura 79J muestra que el inmunoconjugado de pembrolizumab producido según el método de BB-01 (Pembrolizumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides en comparación con el pembrolizumab no conjugado (Merck) después de 18 horas de estimulación.

La figura 79K muestra que el inmunoconjugado de pembrolizumab producido según el método de BB-01 (Pembrolizumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides en comparación con el pembrolizumab no conjugado (Merck) después de 18 horas de estimulación.

La figura 80A muestra que el inmunoconjugado de pertuzumab producido según el método de BB-01 (Pertuzumab Boltbody) provoca una secreción superior de IL-1β en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de pertuzumab no conjugado (Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 80B muestra que el inmunoconjugado de pertuzumab producido según el método de BB-01 (Pertuzumab Boltbody) provoca una secreción superior de TNFα en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de pertuzumab no conjugado (Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 80C muestra que el inmunoconjugado de pertuzumab producido según el método de BB-01 (Pertuzumab Boltbody) provoca una secreción superior de IL-1β en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de pertuzumab no conjugado (Roche) después de 36 horas de estimulación.

La figura 80D muestra que el inmunoconjugado de pertuzumab producido según el método de BB-01 (Pertuzumab Boltbody) provoca una secreción superior de TNFα en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de pertuzumab no conjugado (Roche) después de 36 horas de estimulación.

La figura 80E muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de pertuzumab producido según el método de conjugación de BB-01 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 80F muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de pertuzumab no conjugado (Roche) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de pertuzumab según el método de conjugación de BB-01 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 80G muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de pertuzumab no conjugado (Roche) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de pertuzumab según el método de conjugación de BB-01.

La figura 80H muestra que el inmunoconjugado de pertuzumab producido según el método de BB-01 (Pertuzumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides en comparación con el pertuzumab no conjugado (Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 80I muestra que el inmunoconjugado de pertuzumab producido según el método de BB-01 (Pertuzumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de HLA-DR en las células mieloides en comparación con el pertuzumab no conjugado (Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 80J muestra que el inmunoconjugado de pertuzumab producido según el método de BB-01 (Pertuzumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD14 en las células mieloides en comparación con el pertuzumab no conjugado (Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 80K muestra que el inmunoconjugado de pertuzumab producido según el método de BB-01 (Pertuzumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD16 en las células mieloides en comparación con el pertuzumab no conjugado (Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 80L muestra que el inmunoconjugado de pertuzumab producido según el método de BB-01 (Pertuzumab Boltbody) es superior a la hora de provocar una regulación por incremento de CD40 en las células mieloides en comparación con el pertuzumab no conjugado (Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 80M muestra que el inmunoconjugado de pertuzumab producido según el método de BB-01 (Pertuzumab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides en comparación con el pertuzumab no conjugado (Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 81A muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de BB-01 (rituximab Boltbody) provoca una secreción superior de IL-1β en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de rituximab no conjugado (Roche) después de 36 horas de estimulación.

La figura 81B muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de BB-01 (rituximab Boltbody) provoca una secreción superior de TNFα en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de rituximab no conjugado (Roche) después de 36 horas de estimulación.

La figura 81C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-01 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 81D muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-01 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 81E muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-01.

La figura 81F muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de rituximab no conjugado (Roche) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-01 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 81G muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de rituximab no conjugado (Roche) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-01.

La figura 81H muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de BB-01 (BB-01) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 81I muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de BB-01 (BB-01) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de HLA-DR en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 81J muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de BB-01 (BB-01) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD14 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 81K muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de BB-01 (BB-01) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD16 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 81L muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de BB-01 (BB-01) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 81M muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de BB-01 (BB-01) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 82A muestra que el inmunoconjugado de trastuzumab producido según el método de BB-01 (Trastuzumab Boltbody) provoca una secreción superior de IL-1β en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de trastuzumab no conjugado (Roche) después de 36 horas de estimulación.

La figura 82B muestra que el inmunoconjugado de trastuzumab producido según el método de BB-01 (Trastuzumab Boltbody) provoca una secreción superior de TNFα en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de trastuzumab no conjugado (Roche) después de 36 horas de estimulación.

La figura 82C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de trastuzumab producido según el método de conjugación de BB-01 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 82D muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de trastuzumab no conjugado (Roche) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de trastuzumab según el método de conjugación de BB-01 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 82E muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de trastuzumab no conjugado (Roche) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de trastuzumab según el método de conjugación de BB-01.

La figura 82F muestra que el inmunoconjugado de trastuzumab producido según el método de BB-01 (círculos cerrados, rojo) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides en comparación con el trastuzumab no conjugado (cuadrados cerrados, negro; Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 82G muestra que el inmunoconjugado de trastuzumab producido según el método de BB-01 (círculos cerrados, rojo) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de HLA-DR en las células mieloides en comparación con el trastuzumab no conjugado (cuadrados cerrados, negro; Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 82H muestra que el inmunoconjugado de trastuzumab producido según el método de BB-01 (círculos cerrados, rojo) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD14 en las células mieloides en comparación con el trastuzumab no conjugado (cuadrados cerrados, negro; Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 82I muestra que el inmunoconjugado de trastuzumab producido según el método de BB-01 (círculos cerrados, rojo es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD16 en las células mieloides en comparación con el trastuzumab no conjugado (cuadrados cerrados, negro; Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 82J muestra que el inmunoconjugado de trastuzumab producido según el método de BB-01 (círculos cerrados, rojo) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides en comparación con el trastuzumab no conjugado (cuadrados cerrados, negro; Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 82K muestra que el inmunoconjugado de trastuzumab producido según el método de BB-01 (círculos cerrados, rojo) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides en comparación con el trastuzumab no conjugado (cuadrados cerrados, negro; Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 83A muestra que el inmunoconjugado de etanercept producido según el método de BB-01 (Etanercept Boltbody) provoca una secreción superior de IL-1β en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de etanercept no conjugado (Amgen) después de 36 horas de estimulación.

La figura 83B muestra que el inmunoconjugado de etanercept producido según el método de BB-01 (Etanercept Boltbody) provoca una secreción superior de TNFα en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de etanercept no conjugado (Amgen) después de 36 horas de estimulación.

La figura 83C muestra que el inmunoconjugado de etanercept producido según el método de BB-01 (Etanercept Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD14 en las células mieloides en comparación con el etanercept no conjugado (Amgen) después de 18 horas de estimulación.

La figura 83D muestra que el inmunoconjugado de etanercept producido según el método de BB-01 (Etanercept Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD16 en las células mieloides en comparación con el etanercept no conjugado (Amgen) después de 18 horas de estimulación.

La figura 83E muestra que el inmunoconjugado de etanercept producido según el método de BB-01 (Etanercept Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides en comparación con el etanercept no conjugado (Amgen) después de 18 horas de estimulación.

La figura 83F muestra que el inmunoconjugado de etanercept producido según el método de BB-01 (Etanercept Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides en comparación con el etanercept no conjugado (Amgen) después de 18 horas de estimulación.

La figura 83G muestra que el inmunoconjugado de etanercept producido según el método de BB-01 (Etanercept Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides en comparación con el etanercept no conjugado (Amgen) después de 18 horas de estimulación.

La figura 83H muestra que el inmunoconjugado de etanercept producido según el método de BB-01 (Etanercept Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de HLA-DR en las células mieloides en comparación con el etanercept no conjugado (Amgen) después de 18 horas de estimulación.

La figura 84A muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-01 a partir del biosimilar de rituximab (LGM Pharma). El DAR calculado es 0.7.

La figura 84B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del biosimilar de rituximab no conjugado (LGM Pharma) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-01 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 84C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de rituximab no conjugado (LGM Pharma) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-01.

La figura 84D muestra la expresión de CD14 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de BB-01 [BB-01 (DAR 0.7)]. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 84E muestra la expresión de CD16 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de BB-01 [BB-01 (DAR 0.7)]. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 84F muestra la expresión de CD40 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de BB-01 [BB-01 (DAR 0.7)]. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 84G muestra la expresión de CD86 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de BB-01 [BB-01 (DAR 0.7)]. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 84H muestra la expresión de CD123 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de BB-01 [BB-01 (DAR 0.7)]. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 84I muestra la expresión de HLA-DR en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de BB-01 [BB-01 (DAR 0.7)]. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 85A muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-01 a partir del biosimilar de rituximab (LGM Pharma). El DAR calculado es 1.6.

La figura 85B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del biosimilar de rituximab no conjugado (LGM Pharma) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-01 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 85C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de rituximab no conjugado (LGM Pharma) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-01.

La figura 85D muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de rituximab no conjugado (LGM Pharma) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-01.

La figura 85E muestra la expresión de CD14 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de BB-01 [BB-01 (DAR 1.6)]. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 85F muestra la expresión de CD16 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de BB-01 [BB-01 (DAR 1.6)]. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 85G muestra la expresión de CD40 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de BB-01 [BB-01 (DAR 1.6)]. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 85H muestra la expresión de CD86 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de BB-01 [BB-01 (DAR 1.6)]. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 85I muestra la expresión de CD123 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de BB-01 [BB-01 (DAR 1.6)]. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 85J muestra la expresión de HLA-DR en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de BB-01 [BB-01 (DAR 1.6)]. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 86A muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-01 a partir del biosimilar de rituximab (LGM Pharma). El DAR calculado es 2.5.

La figura 86B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del biosimilar de rituximab no conjugado (LGM Pharma) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-01 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 86C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de rituximab no conjugado (LGM Pharma) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-01.

La figura 86D muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-01 a partir del biosimilar de rituximab (LGM Pharma). El DAR calculado es 2.5.

La figura 86E muestra la expresión de CD14 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de BB-01 [BB-01 (DAR 2.5)]. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 86F muestra la expresión de CD16 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de BB-01 [BB-01 (DAR 2.5)]. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 86G muestra la expresión de CD40 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de BB-01 [BB-01 (DAR 2.5)]. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 86H muestra la expresión de CD86 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de BB-01 [BB-01 (DAR 2.5)]. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 86I muestra la expresión de CD123 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de BB-01 [BB-01 (DAR 1.6)]. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 86J muestra la expresión de HLA-DR en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de BB-01 [BB-01 (DAR 1.6)]. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 87A muestra que los inmunoconjugados de rituximab de DAR variable, todos producidos según el método de BB-01 a partir del biosimilar de rituximab (LGM Pharma), provocan una regulación por disminución de CD14 comparable en las células mieloides después de 18 horas de estimulación. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 87B muestra que los inmunoconjugados de rituximab de DAR variable, todos producidos según el método de BB-01 a partir del biosimilar de rituximab (LGM Pharma) provocan la regulación por disminución comparable de CD16 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 87C muestra que los inmunoconjugados de rituximab de DAR variable, todos producidos según el método de BB-01 a partir del biosimilar de rituximab (LGM Pharma), provocan una regulación por incremento de CD40 comparable en las células mieloides después de 18 horas de estimulación. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 87D muestra que los inmunoconjugados de rituximab de DAR variable, todos producidos según el método de BB-01 a partir del biosimilar de rituximab (LGM Pharma), provocan una regulación por incremento de CD86 comparable en las células mieloides después de 18 horas de estimulación. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 87E muestra que los inmunoconjugados de rituximab de DAR variable, todos producidos según el método de BB-01 a partir del biosimilar de rituximab (LGM Pharma), provocan una regulación por incremento de CD123 comparable en las células mieloides después de 18 horas de estimulación. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 87F muestra que los inmunoconjugados de rituximab de DAR variable, todos producidos según el método de BB-01 a partir del biosimilar de rituximab (LGM Pharma), provocan una regulación por incremento de HLA-DR comparable en las células mieloides después de 18 horas de estimulación. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 88A muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del rituximab IgA2 no conjugado (Invivogen, hcd20-mab7) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-01 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 88B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de rituximab IgA2 producido según el método de conjugación de BB-01 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 88C muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgA2 producido según el método de BB-01 (CD20 IgA2 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD14 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20 IgA2; Invivogen, hcd20-mac7) después de 18 horas de estimulación.

La figura 88D muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgA2 producido según el método de BB-01 (CD20 IgA2 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD16 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20 IgA2; Invivogen, hcd20-mac7) después de 18 horas de estimulación.

La figura 88E muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgA2 producido según el método de BB-01 (CD20 IgA2 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20 IgA2; Invivogen, hcd20-mac7) después de 18 horas de estimulación.

La figura 88F muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgA2 producido según el método de BB-01 (CD20 IgA2 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20 IgA2; Invivogen, hcd20-mac7) después de 18 horas de estimulación.

La figura 88G muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgA2 producido según el método de BB-01 (CD20 IgA2 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20 IgA2; Invivogen, hcd20-mac7) después de 18 horas de estimulación.

La figura 88H muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgA2 producido según el método de BB-01 (CD20 IgA2 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de HLA-DR en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20 IgA2; Invivogen, hcd20-mac7) después de 18 horas de estimulación.

La figura 89A muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgG1 producido según el método de BB-01 (IgG1 Boltbody) provoca una secreción superior de TNFα en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares (0.2 µM) de rituximab no conjugado (IgG1; Invivogen, hcd20-mab1) después de 36 horas de estimulación.

La figura 89B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del rituximab IgG1 no conjugado (Invivogen, hcd20-mab1) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-01.

La figura 89C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de rituximab IgG1 producido según el método de conjugación de BB-01.

La figura 89D muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgG1 producido según el método de BB-01 (CD20 IgG1 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD14 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20 IgG1; Invivogen, hcd20-mab1) después de 18 horas de estimulación.

La figura 89E muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgG1 producido según el método de BB-01 (CD20 IgG1 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD16 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20 IgG1; Invivogen, hcd20-mab1) después de 18 horas de estimulación.

La figura 89F muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgG1 producido según el método de BB-01 (CD20 IgG1 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20 IgG1; Invivogen, hcd20-mab1) después de 18 horas de estimulación.

La figura 89G muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgG1 producido según el método de BB-01 (CD20 IgG1 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20 IgG1; Invivogen, hcd20-mab1) después de 18 horas de estimulación.

La figura 89H muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgG1 producido según el método de BB-01 (CD20 IgG1 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20 IgG1; Invivogen, hcd20-mab1) después de 18 horas de estimulación.

La figura 89I muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgG1 producido según el método de BB-01 (CD20 IgG1 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de HLA-DR en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20 IgG1; Invivogen, hcd20-mab1) después de 18 horas de estimulación.

La figura 90A muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgG1 afucosilado producido según el método de BB-01 (IgG1 AF Boltbody) provoca una secreción superior de TNFα en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares (0.2 µM) de rituximab no conjugado (IgG1 AF; Invivogen, hcd20-mab13) después de 18 horas de estimulación.

La figura 90B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del rituximab IgG1 no conjugado (Invivogen, hcd20-mab13) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-01.

La figura 90C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de rituximab IgG1 producido según el método de conjugación de BB-01.

La figura 90D muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgG1 AF producido según el método de BB-01 (IgG1 AF Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD14 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (IgG1 AF; Invivogen, hcd20-mab13) después de 18 horas de estimulación.

La figura 90E muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgG1 AF producido según el método de BB-01 (IgG1 AF Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD16 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (IgG1 AF; Invivogen, hcd20-mab13) después de 18 Horas de estimulación.

La figura 90F muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgG1 producido según el método de BB-01 (IgG1 AF Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (IgG1 AF; Invivogen, hcd20-mab13) después de 18 horas de estimulación.

La figura 90G muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgG1 producido según el método de BB-01 (IgG1 AF Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (IgG1 AF; Invivogen, hcd20-mab13) después de 18 horas de estimulación.

La figura 90H muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgG1 producido según el método de BB-01 (IgG1 AF Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (IgG1 AF; Invivogen, hcd20-mab13) después de 18 horas de estimulación.

La figura 90I muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgG1 producido según el método de BB-01 (IgG1 AF Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de HLA-DR en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (IgG1 AF; Invivogen, hcd20-mab13) después de 18 horas de estimulación.

La figura 91A muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgG1 N297Q mutante producido según el método de BB-01 (IgG1 NQ Boltbody) provoca una secreción superior de TNFα en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares (0.2 µM) de rituximab no conjugado (IgG1 NQ; Invivogen, hcd20-mab12) después

de 36 horas de estimulación.

La figura 91B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del rituximab IgG1 no conjugado (Invivogen, hcd20-mab12) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-01.

La figura 91C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de rituximab IgG1 producido según el método de conjugación de BB-01.

La figura 91D muestra la expresión de CD14 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de rituximab IgG1 N297Q mutante producido según el método de BB-01 (IgG1 NQ Boltbody) en comparación con el rituximab IgG1 no conjugado (Invivogen, hcd20-mab12).

La figura 91E muestra la expresión de CD16 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de rituximab IgG1 N297Q mutante producido según el método de BB-01 (IgG1 NQ Boltbody) en comparación con el rituximab IgG1 no conjugado (Invivogen, hcd20-mab12).

La figura 91F muestra la expresión de CD40 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de rituximab IgG1 N297Q mutante producido según el método de BB-01 (IgG1 NQ Boltbody) en comparación con el rituximab IgG1 no conjugado (Invivogen, hcd20-mab12).

La figura 91G muestra la expresión de CD86 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de rituximab IgG1 N297Q mutante producido según el método de BB-01 (IgG1 NQ Boltbody) en comparación con el rituximab IgG1 no conjugado (Invivogen, hcd20-mab12).

La figura 91H muestra la expresión de CD123 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de rituximab IgG1 N297Q mutante producido según el método de BB-01 (IgG1 NQ Boltbody) en comparación con el rituximab IgG1 no conjugado (Invivogen, hcd20-mab12).

La figura 91I muestra la expresión de HLA-DR en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de rituximab IgG1 N297Q mutante producido según el método de BB-01 (IgG1 NQ Boltbody) en comparación con el rituximab IgG1 no conjugado (Invivogen, hcd20-mab12).

La figura 92A muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgG2 producido según el método de BB-01 (IgG2 Boltbody) provoca una secreción superior de TNFα en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares (0.2 µM) de rituximab no conjugado (IgG2; Invivogen, hcd20-mab2) después de 18 horas de estimulación.

La figura 92B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del rituximab IgG2 no conjugado (Invivogen, hcd20-mab2) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-01.

La figura 92C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de rituximab IgG2 producido según el método de conjugación de BB-01.

La figura 92D muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgG2 producido según el método de BB-01 (IgG2 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD14 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (IgG2; Invivogen, hcd20-mab2) después de 18 horas de estimulación.

La figura 92E muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgG2 producido según el método de BB-01 (IgG2 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD16 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (IgG2; Invivogen, hcd20-mab2) después de 18 horas de estimulación.

La figura 92F muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgG2 producido según el método de BB-01 (IgG2 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (IgG2; Invivogen, hcd20-mab2) después de 18 horas de estimulación.

La figura 92G muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgG2 producido según el método de BB-01 (IgG2 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (IgG2; Invivogen, hcd20-mab2) después de 18 horas de estimulación.

La figura 92H muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgG2 producido según el método de BB-01 (IgG2 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (IgG2; Invivogen, hcd20-mab2) después de 18 horas de estimulación.

La figura 92I muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgG2 producido según el método de BB-01 (IgG2 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de HLA-DR en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (IgG2; Invivogen, hcd20-mab2) después de 18 horas de estimulación.

La figura 93A muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgG3 producido según el método de BB-01 (IgG3 Boltbody) provoca una secreción superior de TNFα en las células mieloides en comparación con concentraciones

equimolares (0.2 µM) de rituximab no conjugado (IgG3; Invivogen, hcd20-mab3) después de 18 horas de estimulación.

La figura 93B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del rituximab IgG3 no conjugado (Invivogen, hcd20-mab3) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-01.

La figura 93C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de rituximab IgG3 producido según el método de conjugación de BB-01.

La figura 93D muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgG3 producido según el método de BB-01 (IgG3 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD14 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (IgG3; Invivogen, hcd20-mab3) después de 18 horas de estimulación.

La figura 93E muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgG3 producido según el método de BB-01 (IgG3 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD16 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (IgG3; Invivogen, hcd20-mab3) después de 18 horas de estimulación.

La figura 93F muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgG3 producido según el método de BB-01 (IgG3 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (IgG3; Invivogen, hcd20-mab3) después de 18 horas de estimulación.

La figura 93G muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgG3 producido según el método de BB-01 (IgG3 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (IgG3; Invivogen, hcd20-mab3) después de 18 horas de estimulación.

La figura 93H muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgG3 producido según el método de BB-01 (IgG3 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (IgG3; Invivogen, hcd20-mab3) después de 18 horas de estimulación.

La figura 93I muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgG3 producido según el método de BB-01 (IgG3 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de HLA-DR en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (IgG3; Invivogen, hcd20-mab3) después de 18 horas de estimulación.

La figura 94A muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgG4 producido según el método de BB-01 (IgG4 Boltbody) provoca una secreción superior de TNFα en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares (0.2 µM) de rituximab no conjugado (IgG4; Invivogen, hcd20-mab4) después de 18 horas de estimulación.

La figura 94B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del rituximab IgG4 no conjugado (Invivogen, hcd20-mab4) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-01.

La figura 94C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de rituximab IgG4 producido según el método de conjugación de BB-01.

La figura 94D muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgG4 producido según el método de BB-01 (IgG4 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD14 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (IgG4; Invivogen, hcd20-mab4) después de 18 horas de estimulación.

La figura 94E muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgG4 producido según el método de BB-01 (IgG4 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD16 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (IgG4; Invivogen, hcd20-mab4) después de 18 horas de estimulación.

La figura 94F muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgG4 producido según el método de BB-01 (IgG4 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (IgG4; Invivogen, hcd20-mab4) después de 18 horas de estimulación.

La figura 94G muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgG4 producido según el método de BB-01 (IgG4 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (IgG4; Invivogen, hcd20-mab4) después de 18 horas de estimulación.

La figura 94H muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgG4 producido según el método de BB-01 (IgG4 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (IgG4; Invivogen, hcd20-mab4) después de 18 horas de estimulación.

La figura 94I muestra que el inmunoconjugado de rituximab IgG4 producido según el método de BB-01 (IgG4 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de HLA-DR en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (IgG4; Invivogen, hcd20-mab4) después de 18 horas de estimulación.

La figura 95 es una tabla que enumera los valores de EC50 y los cambios en veces de expresión de CD14, CD40

y CD86 para IgG1 Boltbody (BB-IgG1), IgG1 AF Boltbody (BB-IgG1 AF), IgG2 Boltbody (BB-IgG2), IgG3 Boltbody (BB-IgG3) y IgG4 Boltbody (BB-IgG4) a los que se hace referencia en las figuras 89, 90, 92, 93 y 94 respectivamente. Los valores de CE50 se calcularon en base a las curvas de dosis-respuesta generadas a partir de diluciones seriadas 5 veces. Todos los cambios en veces se calcularon en relación con el anticuerpo desnudo respectivo a la concentración indicada.

La figura 96A muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de la variante del isotipo IgG1 de atezolizumab no conjugado (Invivogen, hpdl1-mab1) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de atezolizumab según el método de conjugación de BB-01.

La figura 96B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de la variante del isotipo IgG1 de atezolizumab producido según el método de conjugación de BB-01.

La figura 96C muestra la expresión de CD14 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de la variante del isotipo IgG1 de atezolizumab producido según el método de BB-01 (Atezolizumab - IgG1 Boltbody) en comparación con el atezolizumab no conjugado (Atezolizumab - IgG1; Invivogen, hpdl1-mab1).

La figura 96D muestra la expresión de CD16 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de la variante del isotipo IgG1 de atezolizumab producido según el método de BB-01 (Atezolizumab - IgG1 Boltbody) en comparación con el atezolizumab no conjugado (Atezolizumab - IgG1; Invivogen, hpdl1-mab1).

La figura 96E muestra la expresión de CD40 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de la variante del isotipo IgG1 de atezolizumab producido según el método de BB-01 (Atezolizumab - IgG1 Boltbody) en comparación con el atezolizumab no conjugado (Atezolizumab - IgG1; Invivogen, hpdl1-mab1).

La figura 96F muestra la expresión de CD86 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de la variante del isotipo IgG1 de atezolizumab producido según el método de BB-01 (Atezolizumab - IgG1 Boltbody) en comparación con el atezolizumab no conjugado (Atezolizumab - IgG1; Invivogen, hpdl1-mab1).

La figura 96G muestra la expresión de CD123 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de la variante del isotipo IgG1 de atezolizumab producido según el método de BB-01 (Atezolizumab - IgG1 Boltbody) en comparación con el atezolizumab no conjugado (Atezolizumab - IgG1; Invivogen, hpdl1-mab1).

La figura 96H muestra la expresión de HLA-DR en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de la variante del isotipo IgG1 de atezolizumab producido según el método de BB-01 (Atezolizumab - IgG1 Boltbody) en comparación con el atezolizumab no conjugado (Atezolizumab - IgG1; Invivogen, hpdl1-mab1).

La figura 97A muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de la variante del isotipo IgG1 de nivolumab no conjugado (Invivogen, hpd1ni-mab1) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de nivolumab según el método de conjugación de BB-01.

La figura 97B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de la variante del isotipo IgG1 de nivolumab producido según el método de conjugación de BB-01.

La figura 97C muestra la expresión de CD14 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de la variante del isotipo IgG1 de nivolumab producido según el método de BB-01 (Nivolumab - IgG1 Boltbody) en comparación con nivolumab no conjugado (Nivolumab - IgG1; Invivogen, hpd1ni-mab1).

La figura 97D muestra la expresión de CD16 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de la variante del isotipo IgG1 de nivolumab producido según el método de BB-01 (Nivolumab - IgG1 Boltbody) en comparación con nivolumab no conjugado (Nivolumab - IgG1; Invivogen, hpd1ni-mab1).

La figura 97E muestra la expresión de CD40 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de la variante del isotipo IgG1 de nivolumab producido según el método de BB-01 (Nivolumab - IgG1 Boltbody) en comparación con nivolumab no conjugado (Nivolumab - IgG1; Invivogen, hpd1ni-mab1).

La figura 97F muestra la expresión de CD86 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de la variante del isotipo IgG1 de nivolumab producido según el método de BB-01 (Nivolumab - IgG1 Boltbody) en comparación con nivolumab no conjugado (Nivolumab - IgG1; Invivogen, hpd1ni-mab1).

La figura 97G muestra la expresión de CD123 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de la variante del isotipo IgG1 de nivolumab producido según el método de BB-01 (Nivolumab - IgG1 Boltbody) en comparación con nivolumab no conjugado (Nivolumab - IgG1; Invivogen, hpd1ni-mab1).

La figura 97H muestra la expresión de HLA-DR en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de la variante del isotipo IgG1 de nivolumab producido según el método de BB-01 (Nivolumab - IgG1 Boltbody) en comparación con nivolumab no conjugado (Nivolumab - IgG1; Invivogen, hpd1ni-mab1).

La figura 98A muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de mAb anti-gp75 no conjugado (BioXcell, TA99-BE0151) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de mAb anti-gp75 según el método de conjugación de BB-01 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 98B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de mAb anti-gp75 producido según el método de conjugación de BB-01 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 98C muestra la expresión de CD14 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de mAb anti-gp75 producido según el método de BB-01 (GP75 Boltbody).

La figura 98D muestra la expresión de CD16 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de mAb anti-gp75 producido según el método de BB-01 (GP75 Boltbody).

La figura 98E muestra la expresión de CD40 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de mAb anti-gp75 producido según el método de BB-01 (GP75 Boltbody).

La figura 98F muestra la expresión de CD86 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de mAb anti-gp75 producido según el método de BB-01 (GP75 Boltbody).

La figura 98G muestra la expresión de HLA-DR en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado de mAb anti-gp75 producido según el método de BB-01 (GP75 Boltbody).

La figura 99A muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del biosimilar de rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-03 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 99B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del biosimilar de rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-03.

La figura 99C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado BB-03 producido según el método de conjugación de BB-03.

La figura 99D muestra que el inmunoconjugado BB-03 producido según el método BB-03 (BB-03) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides en comparación con el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 99E muestra que el inmunoconjugado BB-03 producido según el método BB-03 (BB-03) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de HLA-DR en las células mieloides en comparación con el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 99F muestra que el inmunoconjugado BB-03 producido según el método BB-03 (BB-03) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD14 en las células mieloides en comparación con el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 99G muestra que el inmunoconjugado BB-03 producido según el método BB-03 (BB-03) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD16 en las células mieloides en comparación con el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 99H muestra que el inmunoconjugado BB-03 producido según el método BB-03 (BB-03) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides en comparación con el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 99I muestra que el inmunoconjugado BB-03 producido según el método BB-03 (BB-03) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides en comparación con el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 100A muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del biosimilar de rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-05 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 100B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado BB-05 producido según el método de conjugación de BB-05 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 100C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del biosimilar de

rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-05.

La figura 100D muestra la expresión de CD123 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-05 producido según el método BB-05 (BB-05). La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 100E muestra la expresión de HLA-DR en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-05 producido según el método BB-05 (BB-05). La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 100F muestra la expresión de CD14 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-05 producido según el método BB-05 (BB-05). La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 100G muestra la expresión de CD16 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-05 producido según el método BB-05 (BB-05). La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 100H muestra la expresión de CD40 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-05 producido según el método BB-05 (BB-05). La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 100I muestra la expresión de CD86 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-05 producido según el método BB-05 (BB-05). La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 101A muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del biosimilar de rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-06 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 101B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del biosimilar de rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-06.

La figura 101C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado BB-06 producido según el método de conjugación de BB-06.

La figura 102A muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado BB-07 producido según el método de conjugación de BB-07 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 102B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del biosimilar de rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-07 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 102C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del biosimilar de rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-07.

La figura 102D muestra la expresión de CD123 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-07 producido según el método BB-07 (BB-07). La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas. La figura 102D también compara el BB-07 con el inmunoconjugado BB-01 producido según el método de conjugación de BB-01 (BB-01).

La figura 102E muestra la expresión de HLA-DR en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-07 producido según el método BB-07 (BB-07). La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas. La figura 102E también compara el BB-07 con el inmunoconjugado BB-01 producido según el método de conjugación de BB-01 (BB-01).

La figura 102F muestra la expresión de CD14 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-07 producido según el método BB-07 (BB-07). La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas. La figura 102F también compara el BB-07 con el inmunoconjugado BB-01 producido según el método de conjugación de BB-01 (BB-01).

La figura 102G muestra la expresión de CD16 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-07 producido según el método BB-07 (BB-07). La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas. La figura 102G también compara el BB-07 con el inmunoconjugado BB-01 producido según el método de conjugación de BB-01 (BB-01).

La figura 102H muestra la expresión de CD40 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con

el inmunoconjugado BB-07 producido según el método BB-07 (BB-07). La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas. La figura 102H también compara el BB-07 con el inmunoconjugado BB-01 producido según el método de conjugación de BB-01 (BB-01).

La figura 102I muestra la expresión de CD86 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-07 producido según el método BB-07 (BB-07). La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas. La figura 102I también compara el BB-07 con el inmunoconjugado BB-01 producido según el método de conjugación de BB-01 (BB-01).

La figura 102J muestra la expresión de CD123 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-07 producido según el método BB-07 (BB-07). La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 102K muestra la expresión de CD14 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-07 producido según el método BB-07 (BB-07). La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 102L muestra la expresión de CD16 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-07 producido según el método BB-07 (BB-07). La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 102M muestra la expresión de CD40 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-07 producido según el método BB-07 (BB-07). La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas. La figura 102M también compara el BB-07 con el inmunoconjugado BB-01 producido según el método de conjugación de BB-01 (BB-01).

La figura 102N muestra la expresión de CD86 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-07 producido según el método BB-07 (BB-07). La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 103A muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del biosimilar de rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-11 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 103B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del biosimilar de rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-11.

La figura 103C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado BB-11 producido según el método de conjugación de BB-11 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 103D muestra la expresión de CD123 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-11 producido según el método BB-11 (BB-11). La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 103E muestra la expresión de HLA-DR en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-11 producido según el método BB-11 (BB-11). La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 103F muestra la expresión de CD14 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-11 producido según el método BB-11 (BB-11). La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 103G muestra la expresión de CD16 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-11 producido según el método BB-11 (BB-11). La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 103H muestra la expresión de CD40 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-11 producido según el método BB-11 (BB-11). La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 103I muestra la expresión de CD86 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-11 producido según el método BB-11 (BB-11). La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 104A muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del biosimilar de rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-14 PFP.

La figura 104B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del biosimilar de

rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-14 PFP después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 104C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado BB-14 producido según el método de conjugación de BB-14 PFP.

La figura 104D muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-14 PFP (BB-14) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 104E muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-14 PFP (BB-14) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de HLA-DR en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 104F muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-14 PFP (BB-14) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD14 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 104G muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-14 PFP (BB-14) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD16 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 104H muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-14 PFP (BB-14) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 104I muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-14 PFP (BB-14) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 105A muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del biosimilar de rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-15 NHS después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 105B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del biosimilar de rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-15 NHS.

La figura 105C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado BB-15 producido según el método de conjugación de BB-15 NHS.

La figura 105D muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-15 NHS (BB-15) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 105E muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-15 NHS (BB-15) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de HLA-DR en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 105F muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-15 NHS (BB-15) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD14 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 105G muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-15 NHS (BB-15) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD16 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 105H muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-15 NHS (BB-15) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 105I muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-15 NHS (BB-15) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 106A muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado BB-17 producido según el método de conjugación de BB-17 TFP después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 106B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del biosimilar de rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según

el método de conjugación de BB-17 TFP después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 106C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del biosimilar de rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-17 TFP.

La figura 106D muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-17 TFP (BB-17) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 106E muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-17 TFP (BB-17) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de HLA-DR en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 106F muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-17 TFP (BB-17) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD14 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 106G muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-17 TFP (BB-17) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD16 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 106H muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-17 TFP (BB-17) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 106I muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-17 TFP (BB-17) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 107A muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del biosimilar de rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-22 SATA después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 107B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del biosimilar de rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-22 SATA.

La figura 107C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado BB-22 producido según el método de conjugación de BB-22 SATA.

La figura 108A muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado BB-24 producido según el método de conjugación de BB-24 TFP.

La figura 108B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del biosimilar de rituximab no conjugado (CD20, Alphamab) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-24 TFP.

La figura 108C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del biosimilar de rituximab no conjugado (CD20, Alphamab) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-24 TFP después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 108D muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-24 TFP (BB-24) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, Alphamab) después de 18 horas de estimulación.

La figura 108E muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-24 TFP (BB-24) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de HLA-DR en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, Alphamab) después de 18 horas de estimulación.

La figura 108F muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-24 TFP (BB-24) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD14 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, Alphamab) después de 18 horas de estimulación.

La figura 108G muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-24 TFP (BB-24) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD16 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, Alphamab) después de 18 horas de estimulación.

La figura 108H muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-24 TFP (BB-24) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, Alphamab) después de 18 horas de estimulación.

La figura 108I muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-24 TFP (BB-24) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, Alphamab) después de 18 horas de estimulación.

La figura 109A muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado BB-26 producido según el método de conjugación de BB-26 TFP después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 109B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del biosimilar de rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-26 TFP después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 109C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del biosimilar de rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-26 TFP.

La figura 109D muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-26 TFP (BB-26) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 109E muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-26 TFP (BB-26) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de HLA-DR en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 109F muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-26 TFP (BB-26) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 109G muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-26 TFP (BB-26) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 110A muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-27 TFP (BB-27) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 110B muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-27 TFP (BB-27) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de HLA-DR en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 110C muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-27 TFP (BB-27) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD14 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 110D muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-27 TFP (BB-27) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD16 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 110E muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-27 TFP (BB-27) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 110F muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-27 TFP (BB-27) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 110G muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado BB-27 producido según el método de conjugación de BB-27 TFP después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 110H muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del biosimilar de rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-27 TFP después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 110I muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del biosimilar de rituximab no conjugado (CD20, LGM Pharma) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-27 TFP.

La figura 111A muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado BB-36 producido según el método de conjugación de BB-36 TFP después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 111B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del biosimilar de rituximab no conjugado (CD20, Alphamab) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-36 TFP.

La figura 111C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del biosimilar de rituximab no conjugado (CD20, Alphamab) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-36 TFP después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 111D muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-36 TFP (BB-36) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, Alphamab) después de 18 horas de estimulación.

La figura 111E muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-36 TFP (BB-36) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de HLA-DR en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, Alphamab) después de 18 horas de estimulación.

La figura 111F muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-36 TFP (BB-36) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD14 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, Alphamab) después de 18 horas de estimulación.

La figura 111G muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-36 TFP (BB-36) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD16 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, Alphamab) después de 18 horas de estimulación.

La figura 111H muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-36 TFP (BB-36) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, Alphamab) después de 18 horas de estimulación.

La figura 111I muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-36 TFP (BB-36) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, Alphamab) después de 18 horas de estimulación.

La figura 112A muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado BB-37 producido según el método de conjugación de BB-37 TFP.

La figura 112B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del biosimilar de rituximab no conjugado (CD20, Alphamab) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-37 TFP.

La figura 112C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del biosimilar de rituximab no conjugado (CD20, Alphamab) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-37 TFP después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 112D muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-37 TFP (BB-37) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, Alphamab) después de 18 horas de estimulación.

La figura 112E muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-37 TFP (BB-37) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de HLA-DR en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, Alphamab) después de 18 horas de estimulación.

La figura 112F muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-37 TFP (BB-37) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD14 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, Alphamab) después de 18 horas de estimulación.

La figura 112G muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-37 TFP (BB-37) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD16 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, Alphamab) después de 18 horas de estimulación.

La figura 112H muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-37 TFP (BB-37) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, Alphamab) después de 18 horas de estimulación.

La figura 112I muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-37 TFP (BB-37) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, Alphamab) después de 18 horas de estimulación.

La figura 113A muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado BB-45 producido según el método de conjugación de BB-45 TFP.

La figura 113B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del biosimilar de

rituximab no conjugado (CD20, Alphamab) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-45 TFP.

La figura 113C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del biosimilar de rituximab no conjugado (CD20, Alphamab) que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab según el método de conjugación de BB-45 TFP después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 113D muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-45 TFP (BB-45) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, Alphamab) después de 18 horas de estimulación.

La figura 113E muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-45 TFP (BB-45) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de HLA-DR en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, Alphamab) después de 18 horas de estimulación.

La figura 113F muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-45 TFP (BB-45) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD14 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, Alphamab) después de 18 horas de estimulación.

La figura 113G muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-45 TFP (BB-45) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD16 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, Alphamab) después de 18 horas de estimulación.

La figura 113H muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-45 TFP (BB-45) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, Alphamab) después de 18 horas de estimulación.

La figura 113I muestra que el inmunoconjugado de rituximab producido según el método de conjugación de BB-45 TFP (BB-45) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20, Alphamab) después de 18 horas de estimulación.

La figura 114A muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de la cadena pesada de un anticuerpo monoclonal de CD40 no conjugado (Bioxcell, BE0016-2).

La figura 114B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de la cadena ligera de un anticuerpo monoclonal de CD40 no conjugado (Bioxcell, BE0016-2).

La figura 114C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de la cadena pesada de un inmunoconjugado de CD40 producido según el documento US 2017/0158772.

La figura 114D muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de la cadena ligera de un inmunoconjugado de CD40 producido según el documento US 2017/0158772.

La figura 115A muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de un anticuerpo monoclonal de CD40 no conjugado (Bioxcell, BE0016-2).

La figura 115B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de un inmunoconjugado de CD40 producido según el método de conjugación de BB-01.

La figura 116A muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de un anticuerpo monoclonal de CLEC5a no conjugado (R&D Systems, mabl639).

La figura 116B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de un inmunoconjugado de CLEC5a producido según el método de conjugación de BB-01.

La figura 117A muestra un esquema de un inmunoconjugado de CL264 producido según el método de conjugación de BB-01.

La figura 117B muestra un esquema de un inmunoconjugado de CL264 producido según el método de síntesis de éster.

La figura 118A muestra que el inmunoconjugado de rituximab-CL307 producido según el método de conjugación de BB-01 regula por incremento el CD123 en las células mieloides de una manera dependiente de la dosis después de 18 horas de estimulación. La línea discontinua indica el nivel de expresión en células no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 118B muestra que el inmunoconjugado de rituximab-CL307 producido según el método de conjugación de BB-01 regula por incremento el HLA-DR en las células mieloides de una manera dependiente de la dosis después de 18 horas de estimulación. La línea discontinua indica el nivel de expresión en células no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 118C muestra que el inmunoconjugado de rituximab-CL307 producido según el método de conjugación de BB-01 regula por disminución el CD14 en las células mieloides de una manera dependiente de la dosis después de 18 horas de estimulación. La línea discontinua indica el nivel de expresión en células no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 118D muestra que el inmunoconjugado de rituximab-CL307 producido según el método de conjugación de BB-01 regula por disminución el CD16 en las células mieloides de una manera dependiente de la dosis después de 18 horas de estimulación. La línea discontinua indica el nivel de expresión en células no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 118E muestra que el inmunoconjugado de rituximab-CL307 producido según el método de conjugación de BB-01 regula por incremento el CD40 en las células mieloides de una manera dependiente de la dosis después de 18 horas de estimulación. La línea discontinua indica el nivel de expresión en células no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 118F muestra que el inmunoconjugado de rituximab-CL307 producido según el método de conjugación de BB-01 regula por incremento el CD86 en las células mieloides de una manera dependiente de la dosis después de 18 horas de estimulación. La línea discontinua indica el nivel de expresión en células no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 118G muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de rituximab no conjugado (Roche) que se utilizó para producir rituximab-CL307.

La figura 118H muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de rituximab no conjugado (Roche) que se utilizó para producir rituximab-CL307 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 118I muestra que el inmunoconjugado de rituximab-CL307 producido según el método de conjugación de BB-01 provoca la secreción de TNFα de una manera dependiente de la dosis después de 18 horas de estimulación.

La figura 118J muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de rituximab-CL307 producido según el método de conjugación de BB-01.

La figura 119A muestra que el inmunoconjugado de rituximab-CL419 producido según el método de BB-01 (rituximab-CL419 Boltbody) es superior a la hora de provocar la secreción de IL-1β en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (Roche) después de 36 horas de estimulación.

La figura 119B muestra que el inmunoconjugado de rituximab-CL419 producido según el método de BB-01 (rituximab-CL419 Boltbody) es superior a la hora de provocar la secreción de TNFα en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (Roche) después de 36 horas de estimulación.

La figura 119C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de rituximab no conjugado (Roche) que se utilizó para producir rituximab-CL419 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 119D muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de rituximab no conjugado (Roche) que se utilizó para producir rituximab-CL419.

La figura 119E muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de rituximab-CL419 producido según el método de conjugación de BB-01 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 119F muestra que el inmunoconjugado de rituximab-CL419 producido según el método de BB-01 (CL419 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD16 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20; Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 119G muestra que el inmunoconjugado de rituximab-CL419 producido según el método de BB-01 (CL419 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20; Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 119H muestra que el inmunoconjugado de rituximab-CL419 producido según el método de BB-01 (CL419 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20; Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 119I muestra que el inmunoconjugado de rituximab-CL419 producido según el método de BB-01 (CL419 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20; Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 120A muestra que el inmunoconjugado de rituximab-CL572 producido según el método de BB-01 (rituximab-CL572 Boltbody) es superior a la hora de provocar la secreción de IL-1β en las células mieloides en

comparación con el rituximab no conjugado (Roche) después de 36 horas de estimulación.

La figura 120B muestra que el inmunoconjugado de rituximab-CL572 producido según el método de BB-01 (rituximab-CL572 Boltbody) es superior a la hora de provocar la secreción de TNFα en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (Roche) después de 36 horas de estimulación.

La figura 120C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de rituximab no conjugado (Roche) que se utilizó para producir rituximab-CL572 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 120D muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de rituximab no conjugado (Roche) que se utilizó para producir rituximab-CL572.

La figura 120E muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de rituximab-CL572 producido según el método de conjugación de BB-01 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 120F muestra que el inmunoconjugado de rituximab-CL572 producido según el método de BB-01 (CL572 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20; Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 120G muestra que el inmunoconjugado de rituximab-CL572 producido según el método de BB-01 (CL572 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de HLA-DR en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20; Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 120H muestra que el inmunoconjugado de rituximab-CL572 producido según el método de BB-01 (CL572 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD16 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20; Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 120I muestra que el inmunoconjugado de rituximab-CL572 producido según el método de BB-01 (CL572 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20; Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 121A muestra que el inmunoconjugado de rituximab-Pam2CSK4 producido según el método de BB-01 (rituximab-Pam2CSK4 Boltbody) es superior a la hora de provocar la secreción de IL-1β de células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (Roche) después de 36 horas de estimulación.

La figura 121B muestra que el inmunoconjugado de rituximab-Pam2CSK4 producido según el método de BB-01 (rituximab-Pam2CSK4 Boltbody) es superior a la hora de provocar la secreción de TNFα en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (Roche) después de 36 horas de estimulación.

La figura 121C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de rituximab no conjugado (Roche) que se utilizó para producir rituximab-Pam2CSK4 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 121D muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de rituximab no conjugado (Roche) que se utilizó para producir rituximab-Pam2CSK4.

La figura 121E muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de rituximab-Pam2CSK4 producido según el método de conjugación de BB-01 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 121F muestra que el inmunoconjugado de rituximab-Pam2CSK4 producido según el método de BB-01 (Pam2CSK4 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD16 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20; Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 121G muestra que el inmunoconjugado de rituximab-Pam2CSK4 producido según el método de BB-01 (Pam2CSK4 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20; Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 121H muestra que el inmunoconjugado de rituximab-Pam2CSK4 producido según el método de BB-01 (Pam2CSK4 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20; Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 122A muestra que el inmunoconjugado de rituximab-Pam3CSK4 producido según el método de BB-01 (rituximab-Pam3CSK4 Boltbody) es superior a la hora de provocar la secreción de IL-1β en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (Roche) después de 36 horas de estimulación.

La figura 122B muestra que el inmunoconjugado de rituximab-Pam3CSK4 producido según el método de BB-01 (rituximab-Pam3CSK4 Boltbody) es superior a la hora de provocar la secreción de TNFα en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (Roche) después de 36 horas de estimulación.

La figura 122C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de rituximab no conjugado (Roche) que se utilizó para producir rituximab-Pam3CSK4 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 122D muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de rituximab no conjugado (Roche) que se utilizó para producir rituximab-Pam3CSK4.

La figura 122E muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de rituximab-Pam3CSK4 producido según el método de conjugación de BB-01 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 122F muestra que el inmunoconjugado de rituximab-Pam3CSK4 producido según el método de BB-01 (Pam3CSK4 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD16 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20; Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 122G muestra que el inmunoconjugado de rituximab-Pam3CSK4 producido según el método de BB-01 (Pam3CSK4 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20; Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 122H muestra que el inmunoconjugado de rituximab-Pam3CSK4 producido según el método de BB-01 (Pam3CSK4 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20; Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 122I muestra que el inmunoconjugado de rituximab-Pam3CSK4 producido según el método de BB-01 (Pam3CSK4 Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides en comparación con el rituximab no conjugado (CD20; Roche) después de 18 horas de estimulación.

La figura 123A muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado BB-43 producido según el método de conjugación de TFP.

La figura 123B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de un biosimilar de rituximab no conjugado (LGM Pharma) que se utilizó para producir BB-43 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 123C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de un biosimilar de rituximab no conjugado (LGM Pharma) que se utilizó para producir BB-43.

La figura 123D muestra que el inmunoconjugado BB-43 producido según el método TFP es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides en comparación con un biosimilar de rituximab no conjugado (LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 123E muestra que el inmunoconjugado BB-43 producido según el método TFP es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de HLA-DR en las células mieloides en comparación con un biosimilar de rituximab no conjugado (LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 123F muestra que el inmunoconjugado BB-43 producido según el método TFP es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD14 en las células mieloides en comparación con un biosimilar de rituximab no conjugado (LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 123G muestra que el inmunoconjugado BB-43 producido según el método TFP es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD16 en las células mieloides en comparación con un biosimilar de rituximab no conjugado (LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 123H muestra que el inmunoconjugado BB-43 producido según el método TFP es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides en comparación con un biosimilar de rituximab no conjugado (LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 123I muestra que el inmunoconjugado BB-43 producido según el método TFP es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides en comparación con un biosimilar de rituximab no conjugado (LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 124A muestra que el inmunoconjugado de rituximab-SATA-T782 producido según el método de BB-01 (rituximab-SATA-T782 Boltbody) provoca la secreción de TNFα en las células mieloides de una manera dependiente de la dosis después de 18 horas de estimulación.

La figura 124B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de rituximab no conjugado (Roche) que se utilizó para producir rituximab-SATA-T782 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 124C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de rituximab no conjugado (Roche) que se utilizó para producir rituximab-SATA-T782.

La figura 124D muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del rituximab-SATA-T782 producido según el método de BB-01.

La figura 124E muestra que el inmunoconjugado de rituximab-SATA-T782 producido según el método de conjugación de BB-01 (rituximab-SATA-T782) regula por incremento el CD123 en las células mieloides de una manera dependiente de la dosis después de 18 horas de estimulación. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 124F muestra que el inmunoconjugado de rituximab-SATA-T782 producido según el método de conjugación de BB-01 (rituximab-SATA-T782) regula por incremento el HLA-DR en las células mieloides de una manera dependiente de la dosis después de 18 horas de estimulación. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 124G muestra que el inmunoconjugado de rituximab-SATA-T782 producido según el método de conjugación de BB-01 (rituximab-SATA-T782) regula por disminución el CD14 en las células mieloides de una manera dependiente de la dosis después de 18 horas de estimulación. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 124H muestra que el inmunoconjugado de rituximab-SATA-T782 producido según el método de conjugación de BB-01 (rituximab-SATA-T782) regula por disminución el CD16 en las células mieloides de una manera dependiente de la dosis después de 18 horas de estimulación. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 124I muestra que el inmunoconjugado de rituximab-SATA-T782 producido según el método de conjugación de BB-01 (rituximab-SATA-T782) regula por incremento el CD40 en las células mieloides de una manera dependiente de la dosis después de 18 horas de estimulación. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 124J muestra que el inmunoconjugado de rituximab-SATA-T782 producido según el método de conjugación de BB-01 (rituximab-SATA-T782) regula por incremento el CD86 en las células mieloides de una manera dependiente de la dosis después de 18 horas de estimulación. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 125A muestra que el inmunoconjugado de rituximab-SATP-T782 producido según el método de BB-01 (rituximab-SATP-T782 Boltbody) provoca la secreción de TNFα en las células mieloides de una manera dependiente de la dosis después de 18 horas de estimulación.

La figura 125B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de rituximab no conjugado (Roche) que se utilizó para producir rituximab-SATP-T782 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 125C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de rituximab no conjugado (Roche) que se utilizó para producir rituximab-SATP-T782.

La figura 125D muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del rituximab-SATP-T782 producido según el método de BB-01.

La figura 125E muestra que el inmunoconjugado de rituximab-SATP-T782 producido según el método de conjugación de BB-01 (rituximab-SATP-T782) regula por incremento el CD123 en las células mieloides de una manera dependiente de la dosis después de 18 horas de estimulación. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 125F muestra que el inmunoconjugado de rituximab-SATP-T782 producido según el método de conjugación de BB-01 (rituximab-SATP-T782) regula por incremento el HLA-DR en las células mieloides de una manera dependiente de la dosis después de 18 horas de estimulación. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 125G muestra que el inmunoconjugado de rituximab-SATP-T782 producido según el método de conjugación de BB-01 (rituximab-SATP-T782) regula por disminución el CD14 en las células mieloides de una manera dependiente de la dosis después de 18 horas de estimulación. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 125H muestra que el inmunoconjugado de rituximab-SATP-T782 producido según el método de conjugación de BB-01 (rituximab-SATP-T782) regula por disminución el CD16 en las células mieloides de una manera dependiente de la dosis después de 18 horas de estimulación. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 125I muestra que el inmunoconjugado de rituximab-SATP-T782 producido según el método de conjugación de BB-01 (rituximab-SATP-T782) regula por incremento el CD40 en las células mieloides de una manera dependiente de la dosis después de 18 horas de estimulación. La línea discontinua indica el nivel de

expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 125J muestra que el inmunoconjugado de rituximab-SATP-T782 producido según el método de conjugación de BB-01 (rituximab-SATP-T782) regula por incremento el CD86 en las células mieloides de una manera dependiente de la dosis después de 18 horas de estimulación. La línea discontinua indica el nivel de expresión en las células mieloides no estimuladas cultivadas durante 18 horas.

La figura 126A muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado BB-12 producido según el método de conjugación de SATA después de la conjugación durante la noche con PNGasa F.

La figura 126B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de un biosimilar de rituximab no conjugado (LGM Pharma) que se utilizó para producir BB-12 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 126C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de un biosimilar de rituximab no conjugado (LGM Pharma) que se utilizó para producir BB-12.

La figura 126D muestra que el inmunoconjugado BB-12 producido según el método SATA no logra provocar la regulación por incremento de CD123 después de 18 horas de estimulación. La figura 126D también muestra que el inmunoconjugado BB-11 producido según el método SATA es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en comparación con el BB-12 y concentraciones equimolares de la mezcla (CD20 + IRM1). Cabe destacar que el BB-11 y el BB-12 se construyen con enlazadores idénticos, pero tienen adyuvantes distintos.

La figura 126E muestra que el inmunoconjugado BB-12 producido según el método SATA no logra provocar la regulación por incremento de HLA-DR después de 18 horas de estimulación. La figura 126E también muestra que el inmunoconjugado BB-11 producido según el método SATA es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de HLA-DR en comparación con el BB-12 y concentraciones equimolares de la mezcla (CD20 + IRM1). Cabe destacar que el BB-11 y el BB-12 se construyen con enlazadores idénticos, pero tienen adyuvantes distintos.

La figura 126F muestra que el inmunoconjugado BB-12 producido según el método SATA no logra provocar la regulación por disminución de CD14 después de 18 horas de estimulación en comparación con concentraciones equimolares de la mezcla (CD20 + IRM1). La figura 126F también muestra que el inmunoconjugado BB-11 producido según el método SATA es superior a la hora de provocar una regulación por disminución de CD14 en comparación con el BB-12 y concentraciones equimolares de la mezcla (CD20 + IRM1). Cabe destacar que el BB-11 y el BB-12 se construyen con enlazadores idénticos, pero tienen adyuvantes distintos.

La figura 126G también muestra que el inmunoconjugado BB-11 producido según el método SATA es superior a la hora de provocar una regulación por disminución de CD16 en comparación con el BB-12 y concentraciones equimolares de la mezcla (CD20 + IRM1). Cabe destacar que el BB-11 y el BB-12 se construyen con enlazadores idénticos, pero tienen adyuvantes distintos.

La figura 126H muestra que el inmunoconjugado BB-12 producido según el método SATA no logra provocar la regulación por incremento de CD40 después de 18 horas de estimulación en comparación con concentraciones equimolares de la mezcla (CD20 + IRM1). La figura 126H también muestra que el inmunoconjugado BB-11 producido según el método SATA es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en comparación con el BB-12 y concentraciones equimolares de la mezcla (CD20 + IRM1). Cabe destacar que el BB-11 y el BB-12 se construyen con enlazadores idénticos, pero tienen adyuvantes distintos.

La figura 126I muestra que el inmunoconjugado BB-12 producido según el método SATA no logra provocar la regulación por incremento de CD86 después de 18 horas de estimulación en comparación con concentraciones equimolares de la mezcla (CD20 + IRM1). La figura 126I también muestra que el inmunoconjugado BB-11 producido según el método SATA es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en comparación con el BB-12 y concentraciones equimolares de la mezcla (CD20 + IRM1). Cabe destacar que el BB-11 y el BB-12 se construyen con enlazadores idénticos, pero tienen adyuvantes distintos.

La figura 126J muestra la expresión de CD123 después de 18 horas de estimulación con el BB-12. La línea discontinua indica el nivel de expresión de CD123 en células no estimuladas después de 18 horas de incubación.

La figura 126K muestra la expresión de HLA-DR después de 18 horas de estimulación con el BB-12. La línea discontinua indica el nivel de expresión de HLA-DR en células no estimuladas después de 18 horas de incubación.

La figura 126L muestra la expresión de CD14 después de 18 horas de estimulación con el BB-12. La línea discontinua indica el nivel de expresión de CD14 en células no estimuladas después de 18 horas de incubación.

La figura 126M muestra la expresión de CD16 después de 18 horas de estimulación con el BB-12. La línea discontinua indica el nivel de expresión de CD16 en células no estimuladas después de 18 horas de incubación.

La figura 126N muestra la expresión de CD40 después de 18 horas de estimulación con el BB-12. La línea discontinua indica el nivel de expresión de CD40 en células no estimuladas después de 18 horas de incubación.

La figura 126O muestra la expresión de CD86 después de 18 horas de estimulación con el BB-12. La línea discontinua indica el nivel de expresión de CD86 en células no estimuladas después de 18 horas de incubación.

La figura 127A muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado BB-10 producido según el método de conjugación de SATA después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa.

La figura 127B muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de un biosimilar de rituximab no conjugado (LGM Pharma) que se utilizó para producir BB-10.

La figura 127C muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de un biosimilar de rituximab no conjugado (LGM Pharma) que se utilizó para producir BB-10 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa F.

La figura 127D muestra que el inmunoconjugado BB-10 producido según el método SATA no logra provocar la regulación por incremento de CD123 después de 18 horas de estimulación. La figura 127D también muestra que el inmunoconjugado BB-05 producido según el método SATA es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en comparación con el BB-10 y concentraciones equimolares de la mezcla (CD20 + IRM1). Cabe destacar que el BB-05 y el BB-10 se construyen con enlazadores idénticos, pero tienen adyuvantes distintos.

La figura 127E muestra que el inmunoconjugado BB-10 producido según el método SATA no logra provocar la regulación por incremento de HLA-DR después de 18 horas de estimulación. La figura 127E también muestra que el inmunoconjugado BB-05 producido según el método SATA es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de HLA-DR en comparación con el BB-10 y concentraciones equimolares de la mezcla (CD20 + IRM1). Cabe destacar que el BB-05 y el BB-10 se construyen con enlazadores idénticos, pero tienen adyuvantes distintos.

La figura 127F muestra que el inmunoconjugado BB-10 producido según el método SATA no logra provocar la regulación por disminución de CD14 después de 18 horas de estimulación en comparación con concentraciones equimolares de la mezcla (CD20 + IRM1). La figura 127F también muestra que el inmunoconjugado BB-05 producido según el método SATA es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD14 en comparación con el BB-10 y concentraciones equimolares de la mezcla (CD20 + IRM1). Cabe destacar que el BB-05 y el BB-10 se construyen con enlazadores idénticos, pero tienen adyuvantes distintos.

La figura 127G muestra que el inmunoconjugado BB-05 producido según el método SATA es superior a la hora de provocar una regulación por disminución de CD16 en comparación con el BB-10 y concentraciones equimolares de la mezcla (CD20 + IRM1). Cabe destacar que el BB-05 y el BB-10 se construyen con enlazadores idénticos, pero tienen adyuvantes distintos.

La figura 127H muestra que el inmunoconjugado BB-10 producido según el método SATA no logra provocar la regulación por incremento de CD40 después de 18 horas de estimulación en comparación con concentraciones equimolares de la mezcla (CD20 + IRM1). La figura 127H también muestra que el inmunoconjugado BB-05 producido según el método SATA es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en comparación con el BB-10 y concentraciones equimolares de la mezcla (CD20 + IRM1). Cabe destacar que el BB-05 y el BB-10 se construyen con enlazadores idénticos, pero tienen adyuvantes distintos.

La figura 127I muestra que el inmunoconjugado BB-10 producido según el método SATA no logra provocar la regulación por incremento de CD86 después de 18 horas de estimulación en comparación con concentraciones equimolares de la mezcla (CD20 + IRM1). La figura 127I también muestra que el inmunoconjugado BB-05 producido según el método SATA es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en comparación con el BB-10 y concentraciones equimolares de la mezcla (CD20 + IRM1). Cabe destacar que el BB-05 y el BB-10 se construyen con enlazadores idénticos, pero tienen adyuvantes distintos.

La figura 127J muestra la expresión de CD123 después de 18 horas de estimulación con el BB-10. La línea discontinua indica el nivel de expresión de CD123 en células no estimuladas después de 18 horas de incubación.

La figura 127K muestra la expresión de HLA-DR después de 18 horas de estimulación con el BB-10. La línea discontinua indica el nivel de expresión de HLA-DR en células no estimuladas después de 18 horas de incubación.

La figura 127L muestra la expresión de CD14 después de 18 horas de estimulación con el BB-10. La línea discontinua indica el nivel de expresión de CD14 en células no estimuladas después de 18 horas de incubación.

La figura 127M muestra la expresión de CD16 después de 18 horas de estimulación con el BB-10. La línea discontinua indica el nivel de expresión de CD16 en células no estimuladas después de 18 horas de incubación.

La figura 127N muestra la expresión de CD40 después de 18 horas de estimulación con el BB-10. La línea discontinua indica el nivel de expresión de CD40 en células no estimuladas después de 18 horas de incubación.

La figura 127O muestra la expresión de CD86 después de 18 horas de estimulación con el BB-10. La línea discontinua indica el nivel de expresión de CD40 en células no estimuladas después de 18 horas de incubación.

La figura 128A muestra que el inmunoconjugado BB-01 producido según el método de BB-01 provoca una secreción superior de IL-1β en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de BB-19 producidas según los métodos descritos en la patente estadounidense 8.951.528 y el biosimilar de rituximab no conjugado (LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 128B muestra que el inmunoconjugado BB-01 producido según el método de BB-01 provoca una secreción superior de TNFα en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de BB-19 producidas según los métodos descritos en la patente estadounidense 8.951.528 y el biosimilar de rituximab no conjugado (LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 128C muestra la secreción de IL-1β de células mieloides después de una incubación de 18 horas con concentraciones equimolares de biosimilar de rituximab no conjugado (LGM Pharma) o BB-19 producido según métodos descritos en la patente estadounidense 8.951.528.

La figura 128D muestra la secreción de TNFα de células mieloides después de una incubación de 18 horas con concentraciones equimolares de biosimilar de rituximab no conjugado (LGM Pharma) o BB-19 producido según métodos descritos en la patente estadounidense 8.951.528.

La figura 128E muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del BB-19 producido según los métodos descritos en la patente estadounidense 8.951.528 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa.

La figura 128F muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de un biosimilar de rituximab no conjugado (LGM Pharma) que se utilizó para producir BB-19 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa.

La figura 128G muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de un biosimilar de rituximab no conjugado (LGM Pharma) que se utilizó para producir BB-19.

La figura 128H muestra que el BB-01 producido según el método de BB-01 es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides en comparación con el inmunoconjugado BB-19 producido según los métodos descritos en la patente estadounidense 8.951.528 y el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 128I muestra que el BB-01 producido según el método de BB-01 es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de HLA-DR en las células mieloides en comparación con el inmunoconjugado BB-19 producido según los métodos descritos en la patente estadounidense 8.951.528 y el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 128J muestra que el BB-01 producido según el método de BB-01 es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD14 en las células mieloides en comparación con el inmunoconjugado BB-19 producido según los métodos descritos en la patente estadounidense 8.951.528 y el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 128K muestra que el BB-01 producido según el método de BB-01 es superior a la hora de provocar una regulación por disminución de CD16 en las células mieloides en comparación con el inmunoconjugado BB-19 producido según los métodos descritos en la patente estadounidense 8.951.528 y el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 128L muestra que el inmunoconjugado BB-19 producido según los métodos descritos en la patente estadounidense 8.951.528 no logra provocar la regulación por incremento de CD40 después de 18 horas de estimulación. La figura 128L también muestra que el inmunoconjugado BB-01 producido según el método de BB-01 es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en comparación con el BB-19 y el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; LGM Pharma).

La figura 128M muestra que el BB-01 producido según el método de BB-01 es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides en comparación con el inmunoconjugado BB-19 producido según los métodos descritos en la patente estadounidense 8.951.528 y el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 128N muestra la expresión de CD123 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-19 producido según los métodos descritos en la patente estadounidense 8.951.528 o el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; LGM Pharma).

La figura 128O muestra la expresión de HLA-DR en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-19 producido según los métodos descritos en la patente estadounidense 8.951.528 o el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; LGM Pharma).

La figura 128P muestra la expresión de CD14 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-19 producido según los métodos descritos en la patente estadounidense 8.951.528 o el

biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; LGM Pharma).

La figura 128Q muestra la expresión de CD16 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-19 producido según los métodos descritos en la patente estadounidense 8.951.528 o el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; LGM Pharma).

La figura 128R muestra la expresión de CD40 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-19 producido según los métodos descritos en la patente estadounidense 8.951.528 o el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; LGM Pharma).

La figura 128S muestra la expresión de CD86 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-19 producido según los métodos descritos en la patente estadounidense 8.951.528 o el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; LGM Pharma).

La figura 129A muestra que el inmunoconjugado BB-01 producido según el método de BB-01 provoca una secreción superior de IL-1β en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de BB-20 producidas según los métodos descritos en la patente estadounidense 8.951.528 y el biosimilar de rituximab no conjugado (LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 129B muestra que el inmunoconjugado BB-01 producido según el método de BB-01 provoca una secreción superior de TNFα en las células mieloides en comparación con concentraciones equimolares de BB-20 producidas según los métodos descritos en la patente estadounidense 8.951.528 y el biosimilar de rituximab no conjugado (LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 129C muestra la secreción de IL-1β de células mieloides después de una incubación de 18 horas con concentraciones equimolares de biosimilar de rituximab no conjugado (LGM Pharma) o BB-20 producido según los métodos descritos en la patente estadounidense 8.951.528.

La figura 129D muestra la secreción de TNFα de células mieloides después de una incubación de 18 horas con concentraciones equimolares de biosimilar de rituximab no conjugado (LGM Pharma) o BB-20 producido según los métodos descritos en la patente estadounidense 8.951.528.

La figura 129E muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del BB-20 producido según los métodos descritos en la patente estadounidense 8.951.528 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa.

La figura 129F muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de un biosimilar de rituximab no conjugado (LGM Pharma) que se utilizó para producir BB-20 después de la desglicosilación durante la noche con PNGasa.

La figura 129G muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de un biosimilar de rituximab no conjugado (LGM Pharma) que se utilizó para producir BB-20.

La figura 129H muestra que el BB-01 producido según el método de BB-01 es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides en comparación con el inmunoconjugado BB-20 producido según los métodos descritos en la patente estadounidense 8.951.528 y el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 129I muestra que el BB-01 producido según el método de BB-01 es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de HLA-DR en las células mieloides en comparación con el inmunoconjugado BB-20 producido según los métodos descritos en la patente estadounidense 8.951.528 y el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 129J muestra que el BB-01 producido según el método de BB-01 es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD14 en las células mieloides en comparación con el inmunoconjugado BB-20 producido según los métodos descritos en la patente estadounidense 8.951.528 y el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 129K muestra que el BB-01 producido según el método de BB-01 es superior a la hora de provocar una regulación por disminución de CD16 en las células mieloides en comparación con el inmunoconjugado BB-20 producido según los métodos descritos en la patente estadounidense 8.951.528 y el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; LGM Pharma) después de 18 horas de estimulación.

La figura 129L muestra que el inmunoconjugado BB-20 producido según los métodos descritos en la patente estadounidense 8.951.528 no logra provocar la regulación por incremento de CD40 después de 18 horas de estimulación. La figura 129L también muestra que el inmunoconjugado BB-01 producido según el método de BB-01 es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en comparación con el BB-20 y el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; LGM Pharma).

La figura 129M muestra que el inmunoconjugado BB-20 producido según los métodos descritos en la patente

estadounidense 8.951.528 no logra provocar la regulación por incremento de CD86 después de 18 horas de estimulación. La figura 129M también muestra que el inmunoconjugado BB-01 producido según el método de BB-01 es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en comparación con el BB-20 y el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; LGM Pharma).

La figura 129N muestra la expresión de CD123 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-20 producido según los métodos descritos en la patente estadounidense 8.951.528 o el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; LGM Pharma).

La figura 129O muestra la expresión de HLA-DR en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-20 producido según los métodos descritos en la patente estadounidense 8.951.528 o el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; LGM Pharma).

La figura 129P muestra la expresión de CD14 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-20 producido según los métodos descritos en la patente estadounidense 8.951.528 o el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; LGM Pharma).

La figura 129Q muestra la expresión de CD16 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-20 producido según los métodos descritos en la patente estadounidense 8.951.528 o el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; LGM Pharma).

La figura 129R muestra la expresión de CD40 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-20 producido según los métodos descritos en la patente estadounidense 8.951.528 o el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; LGM Pharma).

La figura 129S muestra la expresión de CD86 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-20 producido según los métodos descritos en la patente estadounidense 8.951.528 o el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; LGM Pharma).

La figura 130A muestra la expresión de CD14 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con concentraciones equimolares de albúmina de suero bovino (BSA) o el inmunoconjugado de BSA (BSA-compuesto 1) producido según el método de BB-37 TFP.

La figura 130B muestra la expresión de CD16 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con concentraciones equimolares de albúmina de suero bovino (BSA) o el inmunoconjugado de BSA (BSA-compuesto 1) producido según el método de BB-37 TFP.

La figura 130C muestra la expresión de CD123 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con concentraciones equimolares de albúmina de suero bovino (BSA) o el inmunoconjugado de BSA (BSA-compuesto 1) producido según el método de BB-37 TFP.

La figura 130D muestra la expresión de CD40 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con concentraciones equimolares de albúmina de suero bovino (BSA) o el inmunoconjugado de BSA (BSA-compuesto 1) producido según el método de BB-37 TFP.

La figura 130E muestra la expresión de CD86 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con concentraciones equimolares de albúmina de suero bovino (BSA) o el inmunoconjugado de BSA (BSA-compuesto 1) producido según el método de BB-37 TFP.

La figura 130F muestra la expresión de HLR-DR en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con concentraciones equimolares de albúmina de suero bovino (BSA) o el inmunoconjugado de BSA (BSA-compuesto 1) producido según el método de BB-37 TFP.

La figura 130G muestra la expresión de HLA-DR en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con concentraciones equimolares de albúmina de suero bovino (BSA) o el inmunoconjugado de BSA (BSA-compuesto 1) producido según el método de BB-37 TFP.

La figura 130H muestra la LC-MS de BSA-M desnuda.

La figura 131A muestra la expresión de CD14 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con concentraciones equimolares de hemocianina de lapa californiana (KLH) o el inmunoconjugado de KLH (KLH-compuesto 1) producido según el método de BB-17 TFP.

La figura 131B muestra la expresión de CD16 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con concentraciones equimolares de hemocianina de lapa californiana (KLH) o el inmunoconjugado de KLH (KLH-compuesto 1) producido según el método de BB-17 TFP.

La figura 131C muestra la expresión de CD123 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con concentraciones equimolares de hemocianina de lapa californiana (KLH) o el inmunoconjugado de KLH (KLH-compuesto 1) producido según el método de BB-17 TFP.

La figura 131D muestra la expresión de CD40 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con concentraciones equimolares de hemocianina de lapa californiana (KLH) o el inmunoconjugado de KLH (KLH-compuesto 1) producido según el método de BB-17 TFP.

La figura 131E muestra la expresión de CD86 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con concentraciones equimolares de hemocianina de lapa californiana (KLH) o el inmunoconjugado de KLH (KLH-compuesto 1) producido según el método de BB-17 TFP.

La figura 131F muestra la expresión de HLA-DR en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con concentraciones equimolares de hemocianina de lapa californiana (KLH) o el inmunoconjugado de KLH (compuesto 1 de KLH) producido según el método de BB-17 TFP.

La figura 132A muestra que el Enbrel (Amgen) y el inmunoconjugado de Enbrel (BB-01 Enbrel), producidos usando el método de conjugación de BB-01, muestran una reactividad comparable con el anticuerpo de detección de IgG antihumana cuando se capturan en placas ELISA recubiertas con IgG antihumana.

La figura 132B muestra que el inmunoconjugado de Enbrel (BB-01 Enbrel), producido usando el método de conjugación de BB-01, pero no el Enbrel (Amgen), muestra una fuerte reactividad con el anticuerpo del anticompuesto 1 después de la captura en una placa ELISA recubierto con IgG antihumana.

La figura 132C muestra que el cetuximab (Imclone/Lilly) y el inmunoconjugado de cetuximab (BB-01 Cetuximab), producidos usando el método de conjugación de BB-01, muestran una reactividad comparable con el anticuerpo de detección de IgG antihumana cuando se capturan en placas ELISA recubiertas con IgG antihumana.

La figura 132D muestra que el inmunoconjugado de cetuximab (BB-01 Cetuximab), producido usando el método de conjugación de BB-01, pero no el cetuximab (Imclone/Lilly), muestra una fuerte reactividad con el anticuerpo del anticompuesto 1 después de la captura en una placa ELISA recubierta de IgG antihumana.

La figura 132E muestra que el ipilimumab (BMS) y el inmunoconjugado de ipilimumab (BB-01 Ipilimumab), producidos usando el método de conjugación de BB-01, muestran una reactividad comparable con el anticuerpo de detección de IgG antihumana cuando se capturan en placas ELISA recubiertas con IgG antihumana.

La figura 132F muestra que el inmunoconjugado de ipilimumab (BB-01 Ipilimumab), producido usando el método de conjugación de BB-01, pero no el ipilimumab (BMS), muestra una fuerte reactividad con el anticuerpo del anticompuesto 1 después de la captura en una placa ELISA recubierta con IgG antihumana.

La figura 132G muestra que el obinutuzumab (Roche) y el inmunoconjugado de obinutuzumab (Obinutuzumab BB-01), producido usando el método de conjugación de BB-01, muestran una reactividad comparable con el anticuerpo de detección de IgG antihumana cuando se capturan en placas ELISA recubiertas con IgG antihumana.

La figura 132H muestra que el inmunoconjugado de obinutuzumab (BB-01 Obinutuzumab), producido usando el método de conjugación de BB-0 1, pero no el obinutuzumab (Roche), muestra una fuerte reactividad con el anticuerpo del anticompuesto 1 después de la captura en una placa ELISA recubierta con IgG antihumana.

La figura 132I muestra que el rituximab (Roche) y el inmunoconjugado de rituximab (BB-01 rituximab), producidos usando el método de conjugación de BB-01, muestran una reactividad comparable con el anticuerpo de detección de IgG antihumana cuando se capturan en placas ELISA recubiertas con IgG antihumana.

La figura 132J muestra que el inmunoconjugado de rituximab (BB-01 rituximab), producido usando el método de conjugación de BB-01, pero no el rituximab (Roche), muestra una fuerte reactividad con el anticuerpo del anticompuesto 1 después de la captura en una placa ELISA recubierta con IgG antihumana.

La figura 132K muestra que el anticuerpo antidectina 2 (Biorad MCA2415) y el inmunoconjugado de antidectina 2 (BB-01 antidectina 2), producidos usando el método de conjugación de BB-01, muestran una reactividad comparable con el anticuerpo de detección de IgG cuando se recubren sobre una placa ELISA.

La figura 132L muestra que el inmunoconjugado de antidectina 2 (BB-01 antidectina 2), producido usando el método de conjugación de BB-01, pero no el anticuerpo antidectina 2 (Biorad MCA2415), muestra una fuerte reactividad con el anticuerpo anticompuesto 1 mediante el ensayo ELISA.

La figura 133A muestra que los inmunoconjugados de rituximab (rituximab BB-01) conservan la actividad de unión para la CD16a. La unión se analizó mediante ELISA como se describe en el Ejemplo 29. Los compuestos mostrados son rituximab, rituximab glicosilado (Invivogen hcd20-mab12) o inmunoconjugados de rituximab (rituximab BB-01). Los niveles de DAR en los conjugados de rituximab fueron los siguientes: BB-01, 1.1; BB-14, 2.0; BB-36 DAR bajo, 1.4; BB36 DAR alto, 2.8; BB37 DAR bajo, 1.7; BB-37 DAR alto, 2.6. El eje Y muestra la fracción de señal de OD máxima en la concentración más alta para cada muestra. El mutante glicosilado de rituximab muestra una unión disminuida, lo que coincide con el papel de la glicosilación en la función efectora.

La figura 133B muestra que el rituximab (Roche) y los inmunoconjugados de rituximab (BB-01 rituximab), producidos usando el método de conjugación de BB-01, muestran una unión comparable a CD64 inmovilizado en

placas ELISA. El rituximab que se había desglicosilado con PNGasa F muestra una unión deteriorada a CD64.

La figura 133C muestra que el rituximab y un inmunoconjugado de rituximab (rituximab BB-37) se unen a la proteína A. Se sometieron muestras duplicadas a la técnica de inmunoprecipitación usando proteína A sefarosa. No se detectó rituximab ni rituximab BB-37 libre en los sobrenadantes de la inmunoprecipitación. Existe una superposición considerable de los sitios de unión de proteína A y FcRN en la IgG. Por lo tanto, la conservación de la unión a la proteína A en el rituximab BB-37 sugiere la conservación de la unión a FcRN.

La figura 134A muestra la expresión de CD123 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-48 producido según el método de BB-48 o el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; Alphamab).

La figura 134B muestra la expresión de HLA-DR en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-48 producido según el método de BB-48 o el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; Alphamab).

La figura 134C muestra la expresión de CD14 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-48 producido según el método de BB-48 o el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; Alphamab).

La figura 134D muestra la expresión de CD16 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-48 producido según el método de BB-48 o el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; Alphamab).

La figura 134E muestra la expresión de CD40 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-48 producido según el método de BB-48 o el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; Alphamab).

La figura 134F muestra la expresión de CD86 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-48 producido según el método de BB-48 o el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; Alphamab).

La figura 134G muestra la LC-MS para el inmunoconjugado BB-48 producido según el método de BB-48.

La figura 135A muestra la expresión de CD123 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-49 producido según el método de BB-49 o el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; Alphamab).

La figura 135B muestra la expresión de HLA-DR en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-49 producido según el método de BB-49 o el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; Alphamab).

La figura 135C muestra la expresión de CD14 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-49 producido según el método de BB-49 o el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; Alphamab).

La figura 135D muestra la expresión de CD16 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-49 producido según el método de BB-49 o el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; Alphamab).

La figura 135E muestra la expresión de CD40 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-49 producido según el método de BB-49 o el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; Alphamab).

La figura 135F muestra la expresión de CD86 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-49 producido según el método de BB-49 o el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; Alphamab).

La figura 135G muestra la LC-MS para el inmunoconjugado BB-49 producido según el método de BB-49.

La figura 136A muestra la expresión de CD123 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-50 producido según el método de BB-50 o el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; Alphamab).

La figura 136B muestra la expresión de HLA-DR en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-50 producido según el método de BB-50 o el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; Alphamab).

La figura 136C muestra la expresión de CD14 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-50 producido según el método de BB-50 o el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; Alphamab).

La figura 136D muestra la expresión de CD16 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-50 producido según el método de BB-50 o el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; Alphamab).

La figura 136E muestra la expresión de CD40 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-50 producido según el método de BB-50 o el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; Alphamab).

La figura 136F muestra la expresión de CD86 en las células mieloides después de 18 horas de estimulación con el inmunoconjugado BB-50 producido según el método de BB-50 o el biosimilar de rituximab no conjugado (CD20; Alphamab).

La figura 136G muestra la LC-MS para el inmunoconjugado BB-50 producido según el método de BB-50.

La figura 137A muestra que el inmunoconjugado BB-01 producido según el método de BB-01 SATA (rituximab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD14 en las células mieloides en comparación con el inmunoconjugado de rituximab conjugado a través de los residuos de disulfuros entre cadenas después de la reducción con TCEP mediante SMCC-comp1 (rituximab-Cys-Comp1). Los datos se obtuvieron después de una incubación de 18 horas con rituximab Boltbody o rituximab-Cys-comp1.

La figura 137B muestra que el inmunoconjugado BB-01 producido según el método de BB-01 SATA (rituximab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por disminución de CD16 en las células mieloides en comparación con el inmunoconjugado de rituximab conjugado a través de los residuos de disulfuros entre cadenas después de la reducción con TCEP mediante SMCC-comp1 (rituximab-Cys-Comp1). Los datos se obtuvieron después de una incubación de 18 horas con rituximab Boltbody o rituximab-Cys-comp1.

La figura 137C muestra que el inmunoconjugado BB-01 producido según el método de BB-01 SATA (rituximab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD40 en las células mieloides en comparación con el inmunoconjugado de rituximab conjugado a través de los residuos de disulfuros entre cadenas después de la reducción con TCEP mediante SMCC-comp1 (rituximab-Cys-Comp1). Los datos se obtuvieron después de una incubación de 18 horas con rituximab Boltbody o rituximab-Cys-comp1.

La figura 137D muestra que el inmunoconjugado BB-01 producido según el método de BB-01 SATA (rituximab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD86 en las células mieloides en comparación con el inmunoconjugado de rituximab conjugado a través de los residuos de disulfuros entre cadenas después de la reducción con TCEP mediante SMCC-comp1 (rituximab-Cys-Comp1). Los datos se obtuvieron después de una incubación de 18 horas con rituximab Boltbody o rituximab-Cys-comp1.

La figura 137E muestra que el inmunoconjugado BB-01 producido según el método de BB-01 SATA (rituximab Boltbody) es superior a la hora de provocar la regulación por incremento de CD123 en las células mieloides en comparación con el inmunoconjugado de rituximab conjugado a través de los residuos de disulfuros entre cadenas después de la reducción con TCEP mediante SMCC-comp1 (rituximab-Cys-Comp1). Los datos se obtuvieron después de una incubación de 18 horas con rituximab Boltbody o rituximab-Cys-comp1.

La figura 137F muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de rituximab no conjugado (Roche) después de la reducción con TCEP que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab-cys-comp1.

La figura 137G muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de la cadena ligera de rituximab no conjugado (Roche) después de la reducción con TCEP que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab-cys-comp1.

La figura 137H muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de la cadena pesada del inmunoconjugado de rituximab-cys-comp1.

La figura 137I muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de la cadena pesada del inmunoconjugado de rituximab-cys-comp1.

La figura 138A muestra la secuencia de ADN del vector que codifica la cadena pesada de rituximab de tipo silvestre.

La figura 138B muestra la secuencia de ADN del vector que codifica la cadena ligera Kappa de rituximab con la mutación V205C (indicada mediante la numeración de Kabat).

La figura 138C muestra el mapa de vectores del plásmido de clonación pFUSE-CHIg-hG1 (Invivogen, pfuse-hchg1) que codifica la cadena pesada de IgG1 de rituximab de tipo silvestre.

La figura 138D muestra el mapa de vectores del plásmido de clonación pFUSE2-CLIg-hK (Invivogen, pfuse2-hclk) genomanipulado para codificar la mutación V205C en la región constante de la cadena ligera Kappa de Ig rituximab.

La figura 138E muestra la estructura del inmunoconjugado de rituximab-V205C producido mediante enlace directo del compuesto 1-SMCC a los residuos de cisteína genomanipulados como se describe en la figura 138D.

La figura 138F muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de rituximab no conjugado que contiene la mutación V205C que se utilizó para producir el inmunoconjugado de rituximab-V205C.

La figura 138G muestra un análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas del inmunoconjugado de rituximab-V205C producido mediante enlace directo del compuesto 1-SMCC a los residuos de cisteína genomanipulados como se describe en la figura 138D.

Descripción detallada de la invención

General

La invención proporciona inmunoconjugados de anticuerpo y adyuvante que tienen varias ventajas que incluyen: anticuerpos que estimulan la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, fagocitosis celular dependiente de anticuerpos y anticuerpos que bloquean las acciones de proteínas producidas por cáncer que actúan como moléculas de punto de control inmunitario, adyuvantes que estimulan la activación de células dendríticas y la proliferación de células T, y enlaces covalentes entre anticuerpo y adyuvante que estimulan la eficacia antitumoral. Por ejemplo, en algunos casos los monocitos humanos se someten a diferenciación de DC después de una estimulación durante la noche con inmunoconjugados de la invención, mientras que los protocolos de diferenciación de DC con estimulantes conocidos (p. ej., GM-CSF e IL-4) requieren períodos mucho más largos. Las células activadas por inmunoconjugados expresan mayores cantidades (p. ej., en algunos casos cantidades varias veces mayores) de moléculas coestimuladoras y citocinas inflamatorias de lo que se puede lograr con estimulantes conocidos.

Como se demuestra en la presente memoria, los inmunoconjugados son cuantitativa y cualitativamente más eficaces a la hora de provocar la activación inmunitaria que las mezclas de anticuerpos y adyuvantes unidos de forma no covalente. Además, como se demuestra en la presente memoria, los inmunoconjugados de anticuerpo y adyuvante unidos según la presente divulgación son mucho más eficaces que otros inmunoconjugados conocidos. Por ejemplo, se divulgan inmunoconjugados en la patente estadounidense 8.951.528. Sin embargo, estos inmunoconjugados no logran activar eficazmente las células mieloides (véanse, por ejemplo, las figuras 128A-129S). Otra publicación, la publicación de patente estadounidense 2017/0159772, también describe inmunoconjugados. Los inmunoconjugados que allí se divulgan tampoco activan eficazmente las células mieloides como se observa en las figuras 67A-68P. La publicación de solicitud de patente internacional WO 2015/103987 A1 muestra en la reivindicación 1 un sitio de unión del inmunoconjugado a un adyuvante (resiquimod) en una ubicación que, mediante experimentación, inactiva el adyuvante y da como resultado una activación mieloide insignificante. La publicación también indica que la conjugación del enlazador-adyuvante con el anticuerpo se produce a través de residuos de la bisagra de cisteína (enlaces tioéter) (WO 2015/103987, párrafos 0273-0273) después de la reducción del anticuerpo con un exceso de DTT. Mediante experimentación, este modo de conjugación impide que el inmunoconjugado active eficazmente las células mieloides (véanse las figuras 67A-68P y 137A-137I). Por el contrario, los inmunoconjugados de la invención proporcionan una actividad biológica superior como se observa, por ejemplo, en las figuras 67G-K, 128A-12M, 129E-129 y 137A-137I.

Finalmente, la administración sistémica de los conjugados adyuvante-anticuerpo permite atacar simultáneamente el tumor primario y las metástasis asociadas sin la necesidad de inyecciones intratumorales ni resección quirúrgica.

Como se demuestra en las figuras 1-138G, se crearon y sometieron a ensayo numerosos inmunoconjugados según la presente divulgación y otras fuentes.

Definiciones

Tal como se usa en la presente memoria, el término "inmunoconjugado" se refiere a un constructo de anticuerpo, o anticuerpo, que está unido de forma covalente a un grupo químico que no existe de manera natural como se describe en la presente memoria. Los términos "inmunoconjugado", "inmunoconjugado de anticuerpo-adyuvante", "AAC" y "Boltbody" se utilizan indistintamente en la presente memoria.

Tal como se usa en la presente memoria, la frase "constructo de anticuerpo" se refiere a un polipéptido que comprende un dominio de unión al antígeno y un dominio Fc. Una constructo de anticuerpo puede comprender un anticuerpo.

Tal como se usa en la presente memoria, la frase "dominio de unión al antígeno" se refiere a una proteína, o una porción de una proteína, que se une específicamente a un antígeno específico (p. ej., un paratopo). Por ejemplo, esa porción de una proteína de unión a antígeno que contiene los residuos de aminoácidos que interactúan con un antígeno y confieren a la proteína de unión a antígeno su especificidad y afinidad por el antígeno.

Tal como se usa en la presente memoria, la frase "dominio Fc" se refiere a la región cristalizable del fragmento o la región de la cola de un anticuerpo. El dominio Fc interactúa con los receptores Fc en la superficie de las células.

Tal como se usa en la presente memoria, la frase "dominio de unión específico" se refiere a una proteína, o una porción de una proteína, que se une específicamente a un segundo antígeno que es distinto del antígeno unido por el dominio de unión al antígeno de los inmunoconjugados. El dominio de unión específico puede conjugarse con el constructo de anticuerpo en un extremo C-terminal del dominio Fc.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo" se refiere a un polipéptido que comprende una región de unión a antígeno (incluida la región determinante de la complementariedad (CDR)) de un gen de inmunoglobulina o fragmentos del mismo que se une específicamente a un antígeno y lo reconoce. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como numerosos genes de inmunoglobulina de región variable.

Una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) ejemplar comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipéptidas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kD) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kD). El extremo N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígenos. Los términos cadena ligera variable (V_L) y cadena pesada variable (V_H) se refieren a estas cadenas ligeras y pesadas respectivamente. Las cadenas ligeras se clasifican en kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican en gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

Los anticuerpos IgG son moléculas grandes de aproximadamente 150 kDa compuestas por cuatro cadenas péptidas. Los anticuerpos IgG contienen dos cadenas pesadas idénticas de clase γ de aproximadamente 50 kDa y dos cadenas ligeras idénticas de aproximadamente 25 kDa, por tanto, una estructura cuaternaria tetramérica. Las dos cadenas pesadas están unidas entre sí y a una cadena ligera cada una mediante uniones disulfuro. El tetrámero resultante tiene dos mitades idénticas, que juntas forman la forma de Y. Cada extremo de la horquilla contiene un sitio de unión a antígeno idéntico. Existen cuatro subclases de IgG (IgG1, 2, 3 y 4) en humanos, denominadas por orden de su abundancia en el suero (siendo IgG1 la más abundante). Típicamente, la región de unión al antígeno de un anticuerpo será más crítica en cuanto a especificidad y afinidad de unión.

Los anticuerpos IgA diméricos tienen alrededor de 320 KDa. La IgA tiene dos subclases (IgA1 e IgA2) y puede producirse tanto de forma monomérica como dimérica. La forma de IgA dimérica (secretora o sIgA) es la más abundante.

Los anticuerpos existen, p. ej., como inmunoglobulinas intactas o como varios fragmentos bien caracterizados producidos por digestión con diversas peptidasas. Así, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo debajo de los enlaces disulfuro en la región de la bisagra para producir F(ab)'2, un dímero de Fab que a su vez es una cadena ligera unida a V_H-C_H1 por una unión disulfuro. El F(ab)'2 puede reducirse en condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región de la bisagra, lo que convierte el dímero F(ab)'2 en un monómero Fab'. El monómero Fab' es fundamentalmente Fab con parte de la región de la bisagra (véase, *Fundamental Immunology* (Paul ed., 7ª ed. 2012). Si bien se definen diversos fragmentos de anticuerpos en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que dichos fragmentos pueden sintetizarse *de novo* ya sea químicamente o mediante el uso de metodología de ADN recombinante. Por tanto, el término anticuerpo, tal como se usa en la presente memoria, también incluye fragmentos de anticuerpos producidos mediante la modificación de anticuerpos completos o aquellos sintetizados *de novo* usando metodologías de ADN recombinante (p. ej., Fv de cadena única) o aquellas identificadas usando bibliotecas de presentación de fagos (véase, por ej., McCafferty et al., *Nature*, 348: 552-554 (1990)).

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (incluidos anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos siempre y cuando presenten la actividad biológica deseada. "Fragmento de anticuerpo", y todas las variantes gramaticales del mismo, tal como se usa en la presente memoria, se define como una porción de un anticuerpo intacto que comprende el sitio de unión al antígeno o la región variable del anticuerpo intacto, en el que la porción está libre de los dominios constantes de la cadena pesada (es decir, CH2, CH3 y CH4, dependiendo del isotipo del anticuerpo) de la región Fc del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')2 y Fv; diacuerpos; cualquier fragmento de anticuerpo que es un polipéptido que tiene una estructura primaria que consiste en una secuencia ininterrumpida de residuos de aminoácidos contiguos (denominado en la presente memoria "fragmento de anticuerpo de cadena sencilla" o "polipéptido de cadena sencilla"), que incluye, sin limitación, (1) moléculas Fv de cadena sencilla (scFv); (2) polipéptidos de cadena sencilla que contienen solo un dominio variable de cadena ligera, o un fragmento del mismo que contiene las tres CDR del dominio variable de cadena ligera, sin un grupo de cadena pesada asociado; (3) polipéptidos de cadena sencilla que contienen solo una región variable de cadena pesada, o un fragmento de los mismos que contiene las tres CDR de la región variable de cadena pesada, sin un grupo de cadena ligera asociado; (4) nanocuerpos que comprenden dominios Ig únicos de especies no humanas u otros módulos de unión de dominio único específicos; y (5) estructuras multiespecíficas o multivalentes formadas a partir de fragmentos de anticuerpos. En un fragmento de anticuerpo que comprende una o más cadenas pesadas, la(s) cadena(s) pesada(s) pueden contener cualquier secuencia de dominio constante (p. ej., CH1 en el isotipo de IgG) encontrada en una región no Fc de un anticuerpo intacto, y/o pueden contener cualquier secuencia de la región de la bisagra encontrada en un anticuerpo intacto, y/o puede contener una secuencia zipper de leucina fusionada o situada en la secuencia de la región de la bisagra o la secuencia del dominio constante de la(s) cadena(s) pesada(s).

Tal como se usa en la presente memoria, el término "biosimilar" en referencia a un producto biológico significa que el producto biológico es muy similar al producto de referencia a pesar de diferencias menores en los componentes

clínicamente inactivos, y no existen diferencias clínicamente significativas entre el producto biológico y el producto de referencia en términos de seguridad, pureza y potencia del producto.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "epítopo" significa cualquier determinante antigénico de un antígeno al que se une el sitio de unión al antígeno, también denominado paratopo, de un anticuerpo. Los determinantes epitópicos normalmente consisten en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar, y normalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en la presente memoria para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos también se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y a polímeros de aminoácidos que no existen de manera natural.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "adyuvante" se refiere a una sustancia capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria en un sujeto expuesto al adyuvante.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "adyuvante" se refiere a un adyuvante que está unido de forma covalente a un anticuerpo como se describe en la presente memoria. El adyuvante puede desencadenar la respuesta inmunitaria mientras está unido al anticuerpo, o después de la escisión (p. ej., escisión enzimática) del anticuerpo después de la administración de un inmunoconjugado al sujeto.

Tal como se usan en la presente memoria, los términos "receptor de reconocimiento de patrones" y "PRR" se refieren a cualquier elemento de una clase de proteínas de mamíferos conservadas que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o patrones moleculares asociados a daños (DAMP) y actúan como elementos de señalización clave de la inmunidad innata. Los receptores de reconocimiento de patrones se dividen en PRR unidos a la membrana, PRR citoplasmáticos y PRR secretados. Ejemplos de PRR unidos a la membrana incluyen receptores de tipo Toll (TLR) y receptores de lectina de tipo C (CLR). Ejemplos de PRR citoplasmáticos incluyen receptores de tipo NOD (NLR) y receptores de tipo Rig-I (RLR).

Tal como se usa en la presente memoria, los términos "receptor de tipo Toll" y "TLR" se refieren a cualquier elemento de una familia de proteínas de mamíferos altamente conservadas que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos y actúan como elementos de señalización clave de la inmunidad innata. Los polipéptidos TLR comparten una estructura característica que incluye un dominio extracelular que tiene repeticiones ricas en leucina, un dominio transmembrana y un dominio intracelular que participa en la señalización de TLR.

Los términos "receptor 1 de tipo Toll" y "TLR1" se refieren a ácidos nucleicos o polipéptidos que comparten por lo menos el 70 %; 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con una secuencia de TLR1 disponible públicamente, p. ej., el número de acceso de GenBank AAY85643 para el polipéptido TLR1 humano, o el número de acceso de GenBank AAG37302 para el polipéptido TLR1 murino.

Los términos "receptor 2 de tipo Toll" y "TLR2" se refieren a ácidos nucleicos o polipéptidos que comparten por lo menos el 70 %; 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con una secuencia de TLR2 disponible públicamente, p. ej., el número de acceso de GenBank AAY85648 para el polipéptido TLR2 humano, o el número de acceso de GenBank AAD49335 para el polipéptido TLR2 murino.

Los términos "receptor 3 tipo Toll" y "TLR3" se refieren a ácidos nucleicos o polipéptidos que comparten por lo menos el 70 %; 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con una secuencia de TLR3 disponible públicamente, p. ej., el número de acceso de GenBank AAC34134 para el polipéptido TLR3 humano, o el número de acceso de GenBank AAK26117 para el polipéptido TLR3 murino.

Los términos "receptor 4 tipo Toll" y "TLR4" se refieren a ácidos nucleicos o polipéptidos que comparten por lo menos el 70 %; 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con una secuencia de TLR4 disponible públicamente, p. ej., el número de acceso de GenBank AAY82270 para el polipéptido TLR4 humano, o el número de acceso de GenBank AAD29272 para el polipéptido TLR4 murino.

Los términos "receptor 5 tipo Toll" y "TLR5" se refieren a ácidos nucleicos o polipéptidos que comparten por lo menos el 70 %; 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con una secuencia de TLR5 disponible públicamente, p. ej., el número de acceso de GenBank ACM69034 para el polipéptido TLR5 humano, o el número de acceso de GenBank AAF65625 para el polipéptido TLR5 murino.

Los términos "receptor 6 tipo Toll" y "TLR6" se refieren a ácidos nucleicos o polipéptidos que comparten por lo menos el 70 %; 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con una secuencia de TLR6 disponible públicamente, p. ej., el número de acceso de GenBank ABY67133 para el polipéptido TLR6 humano, o el número de acceso de GenBank AAG38563 para el polipéptido TLR6 murino.

Los términos "receptor 7 tipo Toll" y "TLR7" se refieren a ácidos nucleicos o polipéptidos que comparten por lo menos el 70 %; 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con una secuencia de TLR7 disponible públicamente, p. ej., el número de acceso de GenBank AAZ99026 para el polipéptido TLR7

humano, o el número de acceso de GenBank AAK. 62676 para el polipéptido TLR7 murino.

Los términos "receptor 8 tipo Toll" y "TLR8" se refieren a ácidos nucleicos o polipéptidos que comparten por lo menos el 70 %; 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con una secuencia de TLR8 disponible públicamente, p. ej., el número de acceso de GenBank AAZ95441 para el polipéptido TLR8 humano, o el número de acceso de GenBank AAK. 62677 para el polipéptido TLR8 murino.

Los términos "receptor 7/8 de tipo Toll" y "TLR7/8" se refieren a ácidos nucleicos o polipéptidos que son tanto agonistas de TLR7 como agonistas de TLR8.

Los términos "receptor 9 de tipo Toll" y "TLR9" se refieren a ácidos nucleicos o polipéptidos que comparten por lo menos el 70 %; 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con una secuencia de TLR9 disponible públicamente, p. ej., el número de acceso de GenBank AAF78037 para el polipéptido TLR9 humano, o el número de acceso de GenBank AAK. 28488 para el polipéptido TLR9 murino.

Los términos "receptor 10 de tipo Toll" y "TLR10" se refieren a ácidos nucleicos o polipéptidos que comparten por lo menos el 70 %; 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con una secuencia de TLR10 disponible públicamente, p. ej., el número de acceso de GenBank AAK26744 para el polipéptido TLR10 humano.

Los términos "receptor 11 de tipo Toll" y "TLR11" se refieren a ácidos nucleicos o polipéptidos que comparten por lo menos el 70 %; 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con una secuencia de TLR11 disponible públicamente, p. ej., el número de acceso de GenBank AAS83531 para el polipéptido TLR11 murino.

Un "agonista de TLR" es una sustancia que se une, directa o indirectamente, a un TLR (p. ej., TLR7 y/o TLR8) para inducir la señalización de TLR. Cualquier diferencia detectable en la señalización de los TLR puede indicar que un agonista estimula o activa un TLR. Las diferencias en la señalización pueden manifestarse, por ejemplo, como cambios en la expresión de genes diana, en la fosforilación de componentes de transducción de señales, en la localización intracelular de elementos en dirección 3' tales como NK-κB, en la asociación de determinados componentes (como IRAK). con otras proteínas o estructuras intracelulares, o en la actividad bioquímica de componentes tales como las quinasas (tal como MAPK).

Tal como se usa en la presente memoria, el término "aminoácido" se refiere a cualquier unidad monomérica que pueda incorporarse en un péptido, polipéptido o proteína. Los aminoácidos incluyen α-aminoácidos que existen de manera natural y sus estereoisómeros, así como aminoácidos no naturales (que no existen de manera natural) y sus estereoisómeros. Los "estereoisómeros" de un aminoácido dado se refiere a isómeros que tienen la misma fórmula molecular y enlaces intramoleculares pero diferentes disposiciones tridimensionales de enlaces y átomos (p. ej., un L-aminoácido y el D-aminoácido correspondiente).

Los aminoácidos que existen de manera natural son aquellos codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que luego se modifican, p. ej., hidroxiprolina, *γ*-carboxiglutamato, y *O*-fosfoserina. Los α-aminoácidos que existen de manera natural incluyen, sin limitación, alanina (Ala), cisteína (Cys), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), fenilalanina (Phe), glicina (Gly), histidina (His), isoleucina (Ile), arginina (Arg), lisina (Lys), leucina (Leu), metionina (Met), asparagina (Asn), praliné (Pro), glutamina (Gln), serina (Ser), treonina (Thr), valina (Val), triptófano (Trp), tirosina (Tyr) y combinaciones de los mismos. Los estereoisómeros de α-aminoácidos que existen de manera natural incluyen, sin limitación, D-alanina (D-Ala), D-cisteína (D-Cys), ácido D-aspártico (D-Asp), ácido D-glutámico (D-Glu), D-fenilalanina (D-Phe), D-histidina (D-His), D-isoleucina (D-Ile), D-arginina (D-Arg), D-lisina (D-Lys), D-leucina (D-Leu), D-metionina (D-Met), D-asparagina (D-Asn), D-prolina (D-Pro), D-glutamina (D-Gln), D-serina (D-Ser), D-treonina (D-Thr), D-valina (D-Val), D-triptófano (D-Trp), D-tirosina (D-Tyr) y combinaciones de los mismos.

Los aminoácidos no naturales (que no se existen de manera natural) incluyen, sin limitación, análogos de aminoácidos, miméticos de aminoácidos, aminoácidos sintéticos, glicinas con sustituyentes en el nitrógeno, y N-metilaminoácidos en configuración L o D que funcionan de forma parecida a los aminoácidos que existen de manera natural. Por ejemplo, los "análogos de aminoácidos" pueden ser aminoácidos no naturales que tienen la misma estructura química básica que los aminoácidos que existen de manera natural (es decir, un carbono que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino) pero que tienen grupos modificados en la cadena lateral o esqueletos péptidos modificados, p. ej., homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metilsulfonio. Los "miméticos de aminoácidos" se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de forma parecida a un aminoácido natural. En la presente memoria se puede hacer referencia a los aminoácidos mediante los símbolos habitualmente conocidos de tres letras o mediante los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "inhibidores de puntos de control inmunitario" se refiere a cualquier modulador que inhiba la actividad de la molécula de punto de control inmunitario. Los inhibidores de puntos de control inmunitario pueden incluir, pero no se limitan a, proteínas de unión a moléculas de puntos de control inmunitario, inhibidores de moléculas pequeñas, anticuerpos, derivados de anticuerpos (incluidas fusiones

Fc, fragmentos Fab y scFv), conjugados de anticuerpo-fármaco, oligonucleótidos antisentido, ARNip, aptámeros, péptidos y miméticos de péptidos.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "grupo de enlace" se refiere a un grupo funcional que une de forma covalente dos o más grupos en un compuesto o material. Por ejemplo, el grupo de enlace puede servir para unir de forma covalente un adyuvante a un anticuerpo en un inmunoconjugado.

Los enlaces útiles para conectar grupos de enlace a proteínas y otros materiales incluyen, pero no se limitan a, amidas, aminas, ésteres, carbamatos, ureas, tioéteres, tiocarbamatos, tiocarbonatos y tioureas. Un grupo de enlace "divalente" contiene dos puntos de unión para unir dos grupos funcionales; los grupos de enlace polivalentes pueden tener otros puntos de unión para unir grupos funcionales adicionales. Por ejemplo, los grupos de enlace divalente incluyen polímeros divalentes tales como poli(etilenglicol) divalente, poli(propilenglicol) divalente y poli(alcohol vinílico) divalente.

Tal como se usa en la presente memoria, cuando el término "opcionalmente presente" se usa para referirse a una estructura química (p. ej., "R" o "Q"), si esa estructura química no está presente, el enlace originalmente hecho a la estructura química se realiza directamente al átomo adyacente.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "enlazador" se refiere a un grupo funcional que une de forma covalente dos o más grupos en un compuesto o material. Por ejemplo, el enlazador puede servir para unir de forma covalente un adyuvante a un constructo de anticuerpo en un inmunoconjugado.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "alquilo" se refiere a un radical alifático saturado, lineal o ramificado, que tiene el número de átomos de carbono indicado. El alquilo puede incluir un número cualquiera de carbonos, tal como C_{1-2}, C_{1-3}, C_{1-4}, C_{1-5}, C_{1-6}, C_{1-7}, C_{1-8}, C_{1-9}, C_{1-10}, C_{2-3}, C_{2-4}, C_{2-5}, C_{2-6}, C_{3-4}, C_{3-5}, C_{3-6}, C_{4-5}, C_{4-6} y C_{5-6}. Por ejemplo, el alquilo de C_{1-6} incluye, pero no se limita a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, tert-butilo, pentilo, isopentilo, hexilo, etc. El alquilo también puede referirse a grupos alquilo que tienen hasta 30 átomos de carbono, tales como, entre otros, heptilo, octilo, nonilo, decilo, etc. Los grupos alquilo pueden estar sustituidos o no sustituidos. Los grupos "alquilo sustituidos" pueden estar sustituidos con uno o más grupos seleccionados entre halo, hidroxi, amino, oxo (=O), alquilamino, amido, acilo, nitro, ciano y alcoxi. El término "alquileno" se refiere a un radical alquilo divalente.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "heteroalquilo" se refiere a un grupo alquilo como se describe en la presente memoria, en el que uno o más átomos de carbono se reemplazan opcional e independientemente con un heteroátomo seleccionado entre N, O y S. El término "heteroalquileno" se refiere a un radical heteroalquilo divalente.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "carbociclo" se refiere a un conjunto de anillo saturado o parcialmente insaturado, monocíclico, bicíclico fusionado o policíclico con puente que contiene de 3 a 12 átomos en el anillo, o el número de átomos indicado. Los carbociclos pueden incluir un número cualquiera de carbonos, tal como C_{3-6}, C_{4-6}, C_{5-6}, C_{3-8}, C_{4-8}, C_{5-8}, C_{6-8}, C_{3-9}, C_{3-10}, C_{3-11} y C_{3-12}. Los anillos carbocíclicos monocíclicos saturados incluyen, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y ciclooctilo. Los anillos carbocíclicos bicíclicos y policíclicos saturados incluyen, por ejemplo, norbomano, [2.2.2]biciclooctano, decahidronaftaleno y adamantano. Los grupos carbocíclicos también pueden estar parcialmente insaturados y tener uno o más enlaces dobles o triples en el anillo. Los grupos carbocíclicos representativos que están parcialmente insaturados incluyen, pero no se limitan a, ciclobuteno, ciclopenteno, ciclohexeno, ciclohexadieno (isómeros 1,3 y 1,4), cicloheptено, cicloheptadieno, cicloocteno, ciclooctadieno (isómeros 1,3, 1,4 y 1,5), norborneno y norbornadieno.

Los grupos carbocíclicos insaturados también incluyen grupos arilo. El término "arilo" se refiere a un sistema de anillos aromáticos que tiene un número cualquiera adecuado de átomos en el anillo y un número cualquiera adecuado de anillos. Los grupos arilo pueden incluir un número cualquiera adecuado de átomos en el anillo, tales como 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 átomos en el anillo, así como de 6 a 10, 6 a 12, o de 6 a 14 elementos en el anillo. Los grupos arilo pueden ser monocíclicos, fusionados para formar grupos bicíclicos o tricíclicos, o unidos por un enlace para formar un grupo biarilo. Los grupos arilo representativos incluyen fenilo, naftilo y bifenilo. Otros grupos arilo incluyen bencilo, que tiene un grupo de enlace de metileno. Algunos grupos arilo tienen de 6 a 12 elementos en el anillo, tales como fenilo, naftilo o bifenilo. Otros grupos arilo tienen de 6 a 10 elementos en el anillo, tales como, por ejemplo, fenilo o naftilo.

Un carbociclo "divalente" se refiere a un grupo carbocíclico que tiene dos puntos de unión para unir de forma covalente dos restos en una molécula o material. Los carbociclos pueden estar sustituidos o no sustituidos. Los "carbociclos sustituidos" pueden estar sustituidos con uno o más grupos seleccionados entre halo, hidroxi, amino, alquilamino, amido, acilo, nitro, ciano y alcoxi.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "heterociclo" se refiere a grupos heterocicloalquilo y grupos heteroarilo. El "heteroarilo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un conjunto de anillo aromático monocíclico o bicíclico o tricíclico condensado que contiene de 5 a 16 átomos en el anillo, donde de 1 a 5 de los átomos del anillo son un heteroátomo tal como N, O o S. También pueden ser útiles otros heteroátomos que incluyen, pero no se limitan a, B, Al, Si y P. Los heteroátomos pueden oxidarse para formar restos tales como,

entre otros, -S(O)- y -$S(O)_2$-. Los grupos heteroarilo pueden incluir un número cualquiera de átomos en el anillo, tales como 3 a 6, 4 a 6, 5 a 6, 3 a 8, 4 a 8, 5 a 8, 6 a 8, 3 a 9, 3 a 10, 3 a 11, o de 3 a 12 elementos en el anillo. Se puede incluir un número cualquiera adecuado de heteroátomos en los grupos heteroarilo, tales como 1, 2, 3, 4 o 5, o 1 a 2, 1 a 3, 1 a 4, 1 a 5, 2 a 3, 2 a 4, 2 a 5, 3 a 4 o 3 a 5. El grupo heteroarilo puede incluir grupos tales como pirrol, piridina, imidazol, pirazol, triazol, tetrazol, pirazina, pirimidina, piridazina, triazina (isómeros 1,2,3, 1,2,4 y 1,3,5), tiofeno, furano, tiazol, isotiazol, oxazol e isoxazol. Los grupos heteroarilo también pueden fusionarse a sistemas de anillos aromáticos, tales como un anillo de fenilo, para formar elementos que incluyen, pero no se limitan a, benzopirroles tales como indol e isoindol, benzopiridinas tales como quinolina e isoquinolina, benzopirazina (quinoxalina), benzopirimidina (quinazolina), benzopiridazinas tales como ftalazina y cinolina, benzotiofeno y benzofurano. Otros grupos heteroarilo incluyen anillos heteroarilo unidos por un enlace, tal como la bipiridina. Los grupos heteroarilo pueden estar sustituidos o no sustituidos. Los grupos "heteroarilo sustituidos" pueden estar sustituidos con uno o más grupos seleccionados entre halo, hidroxi, amino, oxo (=O), alquilamino, amido, acilo, nitro, ciano y alcoxi.

Los grupos heteroarilo se pueden unir por medio de cualquier posición en el anillo. Por ejemplo, el pirrol incluye 1-, 2- y 3-pirrol, la piridina incluye 2-, 3- y 4-piridina, el imidazol incluye 1-, 2-, 4- y 5-imidazol, el pirazol incluye 1-, 3-, 4- y 5-pirazol, el triazol incluye 1-, 4- y 5-triazol, el tetrazol incluye 1- y 5-tetrazol, la pirimidina incluye 2-, 4-, 5- y 6-pirimidina, la piridazina incluye 3- y 4- piridazina, 1,2,3-triazina incluye 4- y 5-triazina, 1,2,4-triazina incluye 3-, 5- y 6-triazina, 1,3,5-triazina incluye 2-triazina, tiofeno incluye 2 - y 3-tiofeno, el furano incluye 2 y 3-furano, el tiazol incluye 2-, 4- y 5-tiazol, el isotiazol incluye 3-, 4- y 5-isotiazol, el oxazol incluye 2-, 4- y 5-oxazol, el isoxazol incluye 3-, 4- y 5-isoxazol, el indol incluye 1-, 2- y 3 -indol, el isoindol incluye 1- y 2-isoindol, la quinolina incluye 2-, 3- y 4-quinolina, la isoquinolina incluye 1-, 3- y 4-isoquinolina, la quinazolina incluye 2- y 4-quinoazolina, la cinolina incluye 3- y 4-cinolina, el benzotiofeno incluye 2- y 3-benzotiofeno, y el benzofurano incluye 2- y 3-benzofurano.

El "heterociclilo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un sistema de anillo saturado que tiene de 3 a 12 elementos en el anillo y de 1 a 4 heteroátomos de N, O y S. También pueden ser útiles otros heteroátomos, que incluyen, pero no se limitan a, B, Al, Si y P. Los heteroátomos pueden oxidarse para formar restos tales como, entre otros, -S(O)- y -$S(O)_2$-. Los grupos heterociclilo pueden incluir un número cualquiera de átomos en el anillo, tales como 3 a 6, 4 a 6, 5 a 6, 3 a 8, 4 a 8, 5 a 8, 6 a 8, 3 a 9, 3 a 10, 3. a 11, o de 3 a 12 elementos en el anillo. Se puede incluir un número cualquiera adecuado de heteroátomos en los grupos heterociclilo, tales como 1, 2, 3 o 4, o 1 a 2, 1 a 3, 1 a 4, 2 a 3, 2 a 4 o 3 a 4. El grupo heterociclilo puede incluir grupos tales como aziridina, azetidina, pirrolidina, piperidina, azepano, azocano, quinuclidina, pirazolidina, imidazolidina, piperazina (isómeros 1,2, 1,3 y 1,4), oxirano, oxetano, tetrahidrofurano, oxano (tetrahidropirano), oxepano, tiirano, tietano, tiolano (tetrahidrotiofeno), tiano (tetrahidrotiopirano), oxazolidina, isoxazolidina, tiazolidina, isotiazolidina, dioxolano, ditiolano, morfolina, tiomorfolina, dioxano o ditiano. Los grupos heterociclilo también pueden fusionarse a sistemas de anillos aromáticos o no aromáticos para formar elementos que incluyen, pero no se limitan a, indolina. Los grupos heterociclilo pueden estar sustituidos o no sustituidos. Los grupos "heterociclilo sustituidos" pueden estar sustituidos con uno o más grupos seleccionados entre halo, hidroxi, amino, oxo (=O), alquilamino, amido, acilo, nitro, ciano y alcoxi.

Los grupos heterociclilo se pueden unir por medio de cualquier posición en el anillo. Por ejemplo, la aziridina puede ser 1- o 2-aziridina, la azetidina puede ser 1- o 2-azetidina, la pirrolidina puede ser 1-, 2- o 3-pirrolidina, la piperidina puede ser 1-, 2-, 3- o 4- piperidina, la pirazolidina puede ser 1-, 2-, 3- o 4-pirazolidina, la imidazolidina puede ser 1-, 2-, 3- o 4-imidazolidina, la piperazina puede ser 1-, 2-, 3- o 4-piperazina , el tetrahidrofurano puede ser 1- o 2-tetrahidrofurano, la oxazolidina puede ser 2-, 3-, 4- o 5-oxazolidina, la isoxazolidina puede ser 2-, 3-, 4- o 5-isoxazolidina, la tiazolidina puede ser 2-, 3 -, 4- o 5-tiazolidina, la isotiazolidina puede ser 2-, 3-, 4- o 5-isotiazolidina y la morfolina puede ser 2-, 3- o 4-morfolina.

Tal como se usa en la presente memoria, los términos "halo" o "halógeno", por sí mismos o como parte de otro sustituyente, significan, a menos que se indique lo contrario, un átomo monovalente de flúor, cloro, bromo o yodo.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "carbonilo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, se refiere a -C(O)-, es decir, un átomo de carbono con doble enlace a oxígeno y unido a otros dos grupos en el resto que tiene el carbonilo.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "amino" se refiere a un resto -NR_3, en el que cada grupo R es H o alquilo. Una amina puede ionizarse para formar el catión de amonio correspondiente.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "hidroxi" se refiere al resto -OH.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "ciano" se refiere a un átomo de carbono con triple enlace a un átomo de nitrógeno (es decir, el resto C=N).

Tal como se usa en la presente memoria, el término "carboxi" se refiere al resto -C(O)OH. Un grupo carboxi puede ionizarse para formar el anión de carboxilato correspondiente.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "amido" se refiere a un resto -NRC(O)R o -$C(O)NR_2$, donde cada grupo R es H o alquilo.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "nitro" se refiere al resto -NO_2.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "oxo" se refiere a un átomo de oxígeno que tiene un doble enlace a un compuesto (es decir, O=).

Tal como se usa en la presente memoria, los términos "tratar" y "tratamiento" se refieren a cualquier indicio de éxito en el tratamiento o mejora de una lesión, patología, afección o síntoma (p. ej., deterioro cognitivo), incluido cualquier parámetro objetivo o subjetivo tal como la reducción; remisión; disminución de los síntomas o hacer que el síntoma, lesión, patología o afección sea más tolerable para el paciente; reducción de la tasa de progresión de los síntomas; disminución de la frecuencia o duración del síntoma o afección; o, en algunas situaciones, prevención de la aparición del síntoma. El tratamiento o mejora de los síntomas puede basarse en cualquier parámetro objetivo o subjetivo; incluido, p. ej., el resultado de una exploración física.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "cáncer" se refiere a afecciones que incluyen cánceres sólidos, linfomas y leucemias. Ejemplos de diferentes tipos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, cáncer de pulmón (p. ej., cáncer de pulmón no microcítico o NSCLC), cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de hígado (es decir, hepatocarcinoma), cáncer renal (es decir, carcinoma de células renales), cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de tiroides, cáncer pleural, cáncer de páncreas, cáncer de útero, cáncer de cuello uterino, cáncer testicular, cáncer anal, cáncer de vías biliares, tumores carcinoides gastrointestinales, cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar, cáncer de apéndice, cáncer de intestino delgado, cáncer de estómago (gástrico), cáncer del sistema nervioso central, cáncer de piel (p. ej., melanoma), coriocarcinoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de sangre, sarcoma osteogénico, fibrosarcoma, neuroblastoma, glioma, melanoma, linfoma de células B, linfoma no hodgkiniano, linfoma de Burkitt, linfoma de células pequeñas, linfoma de células grandes, leucemia monocítica, leucemia mielógena, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda y mieloma múltiple.

Tal como se usan en la presente memoria, los términos "cantidad eficaz" y "cantidad terapéuticamente eficaz" se refieren a una dosis de una sustancia tal como un inmunoconjugado que produce los efectos terapéuticos para los que se administra. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento y podrá determinarla un experto en la materia utilizando técnicas conocidas (véase, por ej., Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Pickar, *Dosage Calculations* (1999); *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11.ª edición, 2006, Brunton, Ed., McGraw-Hill; y Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 21ª edición, 2005, Hendrickson, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins).

Tal como se usa en la presente memoria, el término "sujeto" se refiere a animales tales como mamíferos, que incluyen, pero no se limitan a, primates (p. ej., humanos), vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, ratas, ratones y similares. En determinadas realizaciones, el sujeto es un humano.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "administrar" se refiere a la administración por vía parenteral, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intratumoral, intralesional, intranasal o subcutánea, administración por vía oral, administración como supositorio, contacto tópico, administración intratecal o la implantación de un dispositivo de liberación lenta, p. ej., una minibomba osmótica, al sujeto.

Los términos "aproximadamente" y "alrededor de", tal como se usan en la presente memoria para modificar un valor numérico, indican un intervalo cercano que rodea ese valor explícito. Si "X" fuera el valor, "aproximadamente X" o "alrededor de X" indicaría un valor de 0.9X a 1.1X, p. ej., de 0.95X a 1.05X o de 0.99X a 1.01X. Cualquier referencia a "aproximadamente X" o "alrededor de X" indica específicamente por lo menos los valores X, 0.95X, 0.96X, 0.97X, 0.98X, 0.99X, 1.01X, 1.02X, 1.03X, 1.04X y 1.05X. Así, "aproximadamente X" y "alrededor de X" pretenden enseñar y proporcionar respaldo en la descripción escrita para una limitación en la reivindicación de, p. ej., "0.98X".

Inmunoconjugados de adyuvantes de anticuerpos

La invención proporciona inmunoconjugados que contienen un constructo de anticuerpo que comprende un dominio de unión al antígeno y un dominio Fc, un adyuvante y un enlazador, como se define en las reivindicaciones, en los que cada adyuvante está unido de forma covalente al anticuerpo por medio del enlazador.

Los inmunoconjugados tal como se describen en la presente memoria pueden proporcionar una respuesta de activación inesperadamente aumentada de una célula presentadora de antígeno (APC). Esta mayor activación puede detectarse *in vitro* o *in vivo*. En algunos casos, se puede detectar una mayor activación de APC en forma de un tiempo reducido para alcanzar un nivel específico de activación de APC. Por ejemplo, en un ensayo *in vitro*, el porcentaje de activación de APC se puede lograr con una dosis equivalente con un inmunoconjugado dentro del 1%, 10 % o 50 % del tiempo requerido para recibir el mismo porcentaje o parecido de activación de APC con una mezcla de anticuerpo no conjugado y agonista de TLR. En algunos casos, un inmunoconjugado puede activar las APC (p. ej., células dendríticas) y/o las células NK en una cantidad de tiempo reducida. Por ejemplo, en algunos casos, una mezcla de anticuerpos agonistas de TLR puede activar las APC (p. ej., células dendríticas) y/o las células NK y/o inducir la diferenciación de células dendríticas después de la incubación con la mezcla durante 2, 3, 4, 5, 1-5, 2-5, 3-5 o 4-7 días; mientras que, por el contrario, los inmunoconjugados descritos en la presente memoria pueden activar y/o inducir la diferenciación en 4 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas o 1 día. De forma

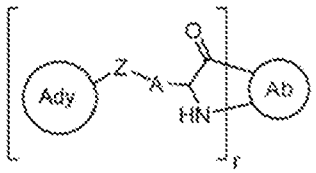
alternativa, el aumento de la activación de APC se puede detectar en forma de una concentración reducida de inmunoconjugado requerida para alcanzar una cantidad (p. ej., porcentaje de APC), nivel (p. ej., medido por un nivel de regulación por incremento de un marcador adecuado) o tasa (p. ej., según lo detectado por un tiempo de incubación requerido para activar) de la activación de APC.

Los inmunoconjugados de la presente invención deben incluir una región Fc. Como se ilustra en las figuras 130A-131E, las proteínas que no se unen a FcR no activan las células mieloides cuando se conjugan con el compuesto 1.

En una realización, los inmunoconjugados de la presente invención proporcionan más del 5 % de aumento de la actividad en comparación con los inmunoconjugados de la técnica anterior (por ejemplo, los inmunoconjugados que se divulgan en la patente '528). En otra realización, los inmunoconjugados de la presente invención proporcionan más del 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 % o un aumento del 70 % de la actividad en comparación con los inmunoconjugados de la técnica anterior. El aumento de la actividad puede evaluarse por cualquier medio conocido por un experto en la materia y puede incluir activación mieloide o evaluación mediante secreción de citocinas.

En una realización, los inmunoconjugados de la presente invención tienen una relación mejorada entre el fármaco y adyuvante. En algunas realizaciones, el número promedio de adyuvantes por inmunoconjugado oscila entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10. Un experto en la materia puede determinar la relación deseable entre el fármaco y el adyuvante dependiendo del efecto deseado del tratamiento. Por ejemplo, puede desearse una relación entre fármaco y adyuvante superior a 1.2. En una realización, puede ser deseable una relación entre el fármaco y el adyuvante mayor que 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0, 2.2, 2.4, 2.6, 2.8, 3.0, 3.2, 3.4, 3.6, 3.8, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 o 9.0. En otra realización, puede ser deseable una relación entre el fármaco y el adyuvante inferior a 10.0, 9.0, 8.0, 7.0, 6.0, 5.0, 4.0, 3.8, 3.6, 3.4, 3.2, 3.0, 2.8, 2.6, 2.4, 2.2, 2.0, 1.8, 1.6, 1.4, 1.2, 0.8, 0.6, 0.4 o 0.2. La relación entre el fármaco y el adyuvante se puede evaluar mediante cualquier medio conocido por un experto en la materia.

Los inmunoconjugados de la invención contienen grupos de enlace que unen de forma covalente los adyuvantes a los anticuerpos. En algunas realizaciones, el inmunoconjugado tiene una estructura según la fórmula I:



(I)

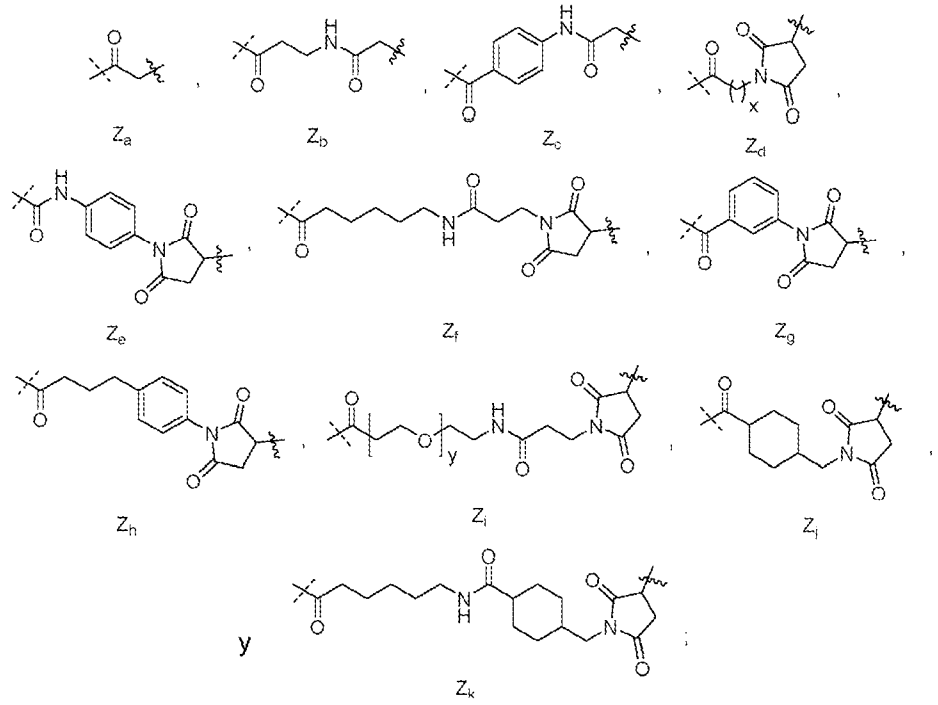
o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en la que Ab es un anticuerpo; A es una cadena lateral de aminoácidos no modificada en el anticuerpo o una cadena lateral de aminoácidos modificada en el anticuerpo; Z es un grupo de enlace; Ady es un adyuvante como se define en la reivindicación 1;

y el subíndice r es un número entero de 1 a 10 (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10).

En determinadas realizaciones de los inmunoconjugados de la fórmula I, A es una cadena lateral de lisina modificada con tiol. En algunas realizaciones de los inmunoconjugados de la fórmula I, A es una cadena lateral de cisteína.

En algunas realizaciones, Z se selecciona de:

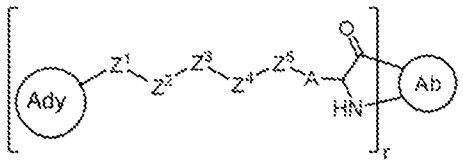
60



en el que el subíndice x es un número entero de 1 a 12 (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12);

El subíndice y es un número entero del 1 al 30 (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30); la línea discontinua (“ - - - ”) representa el punto de unión al adyuvante; y la línea ondulada (“ ~~~ ”) representa el punto de unión a una cadena lateral de aminoácidos en el anticuerpo.

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado tiene una estructura según la fórmula II:



(II)

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en la que Ab es un anticuerpo; en la que A es una cadena lateral de aminoácidos no modificada en el anticuerpo o una cadena lateral de aminoácidos modificada en el anticuerpo; en el que Ady es un adyuvante como se define en la reivindicación 1;

en el que el subíndice r es un número entero de 1 a 10 (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10); y en el que:

Z^1 se selecciona entre -C(O)-, -C(O)NH-, $-CH_2-$;

Z^2 y Z^4 se seleccionan independientemente de un enlace, alquileno de C_{1-30} y heteroalquileno de 3 a 30 elementos, en el que:

uno o más agrupamientos de átomos adyacentes en el alquileno de C_{1-30} y heteroalquileno de 3 a 30 elementos se reemplazan opcional e independientemente por -C(O)-, $-NR^aC(O)-$, o $-C(O)NR^a-$,

uno o más agrupamientos de átomos adyacentes en el alquileno de C_{1-30} y heteroalquileno de 3 a 30 elementos se reemplazan opcional e independientemente por un carbociclo divalente de 4 a 8 elementos,

uno o más agrupamientos de átomos adyacentes en el alquileno de C_{1-30} y heteroalquileno de 3 a 30 elementos se reemplazan opcional e independientemente por un heterociclo divalente de 4 a 8 elementos que tiene de uno a cuatro heteroátomos seleccionados de O, S y N, y

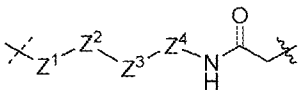
cada R^a se selecciona independientemente entre H y alquilo de C_{1-6};

Z^3 se selecciona entre un enlace, un péptido divalente y un polímero divalente; y

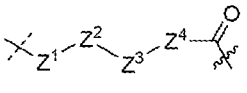
Z^5 está unido a la cadena lateral de una cadena lateral de aminoácido en el anticuerpo.

En determinadas realizaciones de los inmunoconjugados de la fórmula II, Z^5 es un grupo unido a un tiol. En determinadas realizaciones de los inmunoconjugados de la fórmula II, Z^5 es un grupo unido a un tiol y A es una cadena lateral de lisina modificada con tiol. En determinadas realizaciones de los inmunoconjugados de la fórmula II, Z^5 es un grupo unido a un tiol y A es una cadena lateral de cisteína.

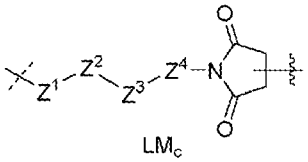
En determinadas realizaciones de los inmunoconjugados de la fórmula II, el grupo de enlace (es decir, los componentes estructurales entre el adyuvante ("Ady") y el aminoácido ("A")) incluye una estructura seleccionada entre:



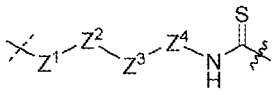
LM_a ,



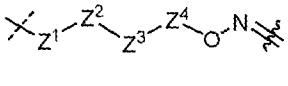
LM_b ,



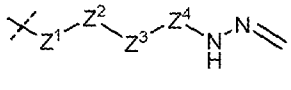
LM_c ,



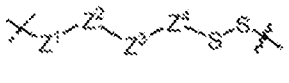
LM_d ,



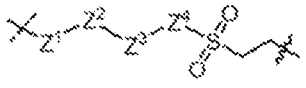
LM_e ,



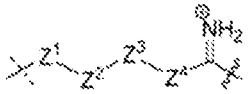
LM_f ,



LM_g ,

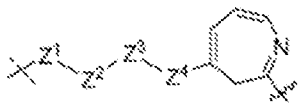


LM_h ,



LM_i ,

y



LM_j ;

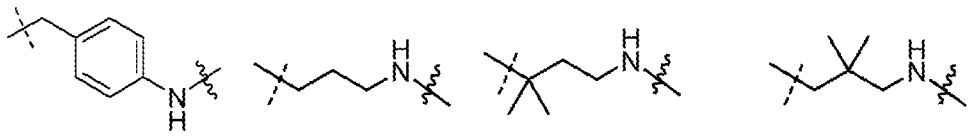
en el que Z^1, Z^2, Z^3 y Z^4 se describen como arriba; la línea discontinua (“ - - - ”) representa el punto de unión al adyuvante; y la línea ondulada (“ ~~~ ”) representa el punto de unión a una cadena lateral de aminoácidos en un anticuerpo.

En algunas realizaciones, Z^3 es un péptido divalente. En algunas realizaciones, el péptido incluye un primer residuo seleccionado entre un residuo de alanina, un residuo de valina, un residuo de leucina, un residuo de isoleucina, un residuo de metionina, un residuo de fenilalanina, un residuo de triptófano y un residuo de praliné. En algunas de dichas realizaciones, el péptido incluye un segundo aminoácido seleccionado entre un residuo de lisina desprotegido, un residuo de lisina protegido, un residuo de arginina desprotegido, un residuo de arginina protegido, un residuo de histidina, un residuo de ornitina desprotegido, un residuo de ornitina protegido, un residuo de lisina y una citrulina. En algunas realizaciones, el péptido incluye un primer residuo seleccionado entre un residuo de fenilalanina y un residuo de valina. En algunas de dichas realizaciones, el péptido incluye un segundo residuo seleccionado entre un residuo de lisina y un residuo de citrulina. Típicamente, el péptido contendrá aproximadamente de 2 a 12 residuos de aminoácidos. Por ejemplo, el péptido puede contener de 2 a 8 residuos de aminoácidos, o de 2 a 4 residuos de aminoácidos. En algunas realizaciones, el péptido es un dipéptido. En algunas realizaciones, el péptido es un tetrapéptido.

En algunas realizaciones, el péptido se selecciona de Phe-Lys; Val-Lys; Phe-Phe-Lys; D-Phe-Phe-Lys; Gly-Phe-Lys; Ala-Lys; Val Cit; Val-Ala; Phe-Cit; Leu-Cit; Isla-Cit; Trp Cit; Phe-Ala; Gly-Phe-Leu-Gly; Ala-Leu-Ala-Leu; Phe-N9-tosilo-Arg; y Phe-N9-nitro-Arg. En algunas realizaciones, el péptido puede escindirse mediante una proteasa tal como catepsina B, catepsina C o catepsina D. Los péptidos sensibles a catepsina B pueden ser particularmente útiles como componentes enlazadores, porque la catepsina B está implicada en varias patologías y procesos oncogénicos. Si bien la expresión y actividad de la catepsina B está estrechamente regulada en tejidos y órganos sanos, la regulación puede alterarse en múltiples niveles en tumores y otras neoplasias malignas. Se ha observado

sobreexpresión de catepsina B en diversos cánceres, incluidos el de cerebro, pulmón, próstata, mama y colorrectal. Véase, por ej., Gondi et al., *Expert Opin. Ther. Targets*, 2013; 17(3): 281-291. Por lo tanto, los enlazadores que contienen componentes peptídicos sensibles a la catepsina B, tales como los dipéptidos Phe-Lys y Val-Cit, pueden escindirse cuando un inmunoconjugado alcanza una diana maligna, tal como un tumor en un sujeto. Debido a que estos componentes peptídicos son en general insensibles a las enzimas del aparato circulatorio y de los tejidos sanos, los adyuvantes no se liberan antes de que el inmunoconjugado alcance la diana en el sujeto.

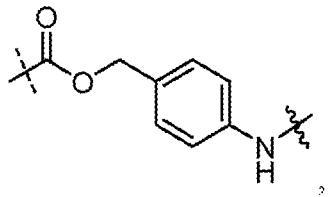
En algunas realizaciones, Z^2 se selecciona entre el grupo que consisten en alquileno de C_{1-30} y heteroalquileno de 3 a 30 elementos, en los que uno o más agrupamientos de átomos adyacentes se reemplazan opcional e independientemente por -C(O)-, -NHC(O)- o -C(O)NH-; y uno o más grupos de átomos adyacentes se reemplazan opcional e independientemente por un carbociclo divalente de 4 a 8 elementos. En algunas realizaciones, Z^2 se selecciona entre:



Z^2_a , Z^2_b , Z^2_c , y Z^2_d ;

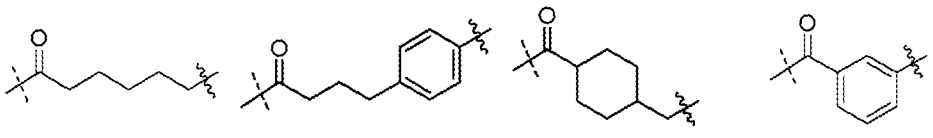
en el que la línea discontinua (“ - - - ”) representa el punto de unión a Z^1, y la línea ondulada (“ ~~~ ”) representa el punto de unión a Z^3.

En determinadas realizaciones, $-Z^1-Z^2-$ es:



en el que la línea discontinua (“ - - - ”) representa el punto de unión al adyuvante y la línea ondulada (“ ~~~ ”) representa el punto de unión a Z^3. En algunas de dichas realizaciones, Z^3 es un péptido divalente seleccionado entre Phe-Lys y Val-Cit.

En algunas realizaciones, Z^4 es un alquileno de C_{1-30}, en el que uno o más agrupamientos de átomos adyacentes se reemplazan opcional e independientemente por -C(O)-, -NHC(O)- o - C(O)NH-; y uno o más grupos de átomos adyacentes se reemplazan opcional e independientemente por un carbociclo divalente de 4 a 8 elementos. En algunas realizaciones, Z^4 se selecciona entre:



Z^4_a , Z^4_b , Z^4_c , y Z^4_d ;

en el que la línea discontinua (“ - - - ”) representa el punto de unión a Z^3, y la línea ondulada (“ ~~~ ”) representa el punto de unión a Z^5. En algunas de dichas realizaciones, Z^3 es un péptido divalente seleccionado entre Phe-Lys y Val-Cit.

Un experto en la materia apreciará que los adyuvantes en los conjugados se pueden unir de forma covalente a los anticuerpos usando diversas químicas para la modificación de proteínas, y que los grupos de enlace descritos anteriormente resultan de la reacción de grupos funcionales de proteínas (es decir, cadenas laterales de aminoácidos), con reactivos que tienen grupos enlazadores reactivos. En la técnica se conoce una amplia variedad de dichos reactivos. Ejemplos de dichos reactivos incluyen, pero no se limitan a, ésteres de N-hidroxisuccinimidilo (NHS) y ésteres de N-hidroxisulfosuccinimidilo (sulfo-NHS) (reactivos con aminas); carbodiimidas (reactivas con aminas y carboxilo); hidroximetilfosfinas (reactivas con aminas); maleimidas (reactivas con tiol); acetamidas halogenadas tales como N-yodoacetamidas (reactivas con tiol); arilazidas (reactivas con amina primaria); arilazidas fluoradas (reactivas mediante inserción de carbono-hidrógeno (CH)); ésteres de pentafluorofenilo (PFP) (reactivos

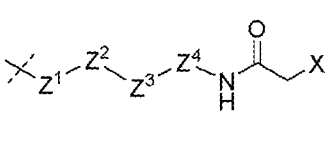
con aminas); ésteres de tetrafluorofenilo (TFP) (reactivos con aminas); imidoésteres (reactivos con aminas); isocianatos (reactivos con hidroxilo); vinilsulfonas (reactivas con tiol, amina e hidroxilo); disulfuros de piridilo (reactivos con tiol); y derivados de benzofenona (reactivos mediante la inserción de enlaces C-H).

Otros reactivos incluyen, pero no se limitan a, los descritos en Hermanson, *Bioconjugate Techniques* 2ª edición, Academic Press, 2008.

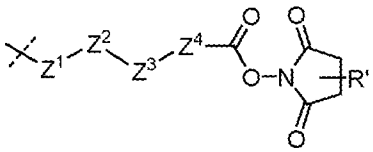
Los enlazadores que contienen grupos maleimida, grupos vinilsulfona, grupos disulfuro de piridilo y grupos acetamida halogenados son particularmente útiles en enlaces covalentes a grupos tiol en un anticuerpo. Los grupos tiol de un anticuerpo en general se encuentran en las cadenas laterales de cisteína. Los grupos tiol libres pueden estar presentes en residuos de cisteína naturales y accesibles a disolventes en el anticuerpo. Los tioles libres también pueden estar presentes en residuos de cisteína genomanipulados, como se describe a continuación. Además, se pueden generar grupos tiol mediante la reducción total o parcial de los enlaces disulfuro entre las cadenas laterales de cisteína en un anticuerpo. También se pueden añadir grupos tiol a cadenas laterales de lisina usando métodos conocidos con reactivos que incluyen, pero no se limitan a, 2-iminotiolano (reactivo de Traut), *N*-succinimidil-*S*-acetiltioacetato (SATA) y SATP (*N*-succinimidil-*S*-acetiltiopropionato). Cuando el anticuerpo se modifica con reactivos acetilados como SATA y SATP, los grupos acetilo se pueden eliminar mediante hidrólisis con hidroxilamina o reactivos parecidos para generar grupos tiol libres para una conjugación adicional. Véase, por ej., Traut et al. (*Biochem.*, 12(17): 3266-3273 (1973)) y Duncan et al. (*Anal. Biochem.*, 132(1): 68-73 (1983)).

El enlazador puede tener cualquier longitud adecuada de modo que cuando el enlazador se une de forma covalente al constructo de anticuerpo y al adyuvante, se mantenga la función del constructo del anticuerpo y el adyuvante. El enlazador puede tener una longitud de aproximadamente 3 Å o más, por ejemplo, aproximadamente 4 Å o más, aproximadamente 5 Å o más, aproximadamente 6 Å o más, aproximadamente 7 Å o más, aproximadamente 8 A o más, aproximadamente 9 Å o más, o aproximadamente 10 Å o más. De forma adicional o alternativa, el enlazador puede tener una longitud de aproximadamente 50 Å o menos, por ejemplo, aproximadamente 45 Å o menos, aproximadamente 40 Å o menos, aproximadamente 35 Å o menos, aproximadamente 30 Å o menos, aproximadamente 25 Å o menos, aproximadamente 20 Å o menos, o aproximadamente 15 Å o menos. Por tanto, el enlazador puede tener una longitud limitada por dos cualesquiera de los puntos finales mencionados anteriormente. El enlazador puede tener una longitud de aproximadamente 3 Å a aproximadamente 50 Å, por ejemplo, de aproximadamente 3 Å a aproximadamente 45 Å, de aproximadamente 3 Å a aproximadamente 40 Å, de aproximadamente 3 Å a aproximadamente 35 Å, de aproximadamente 3 Å a aproximadamente 30 Å, de aproximadamente 3 Å a aproximadamente 25 Å, de aproximadamente 3 Å a aproximadamente 20 Å, de aproximadamente 3 Å a aproximadamente 15 Å, de aproximadamente 5 Å a aproximadamente 50 Å, de aproximadamente 5 Å a aproximadamente 25 Å, de aproximadamente 5 Å a aproximadamente 20 Å, de aproximadamente 10 Å a aproximadamente 50 Å, de aproximadamente 10 Å a aproximadamente 20 Å, de aproximadamente 5 Å a aproximadamente 30 Å o de aproximadamente 5 Å a aproximadamente 15 Å. En realizaciones preferidas, el enlazador tiene una longitud de aproximadamente 3 Å a aproximadamente 20 Å.

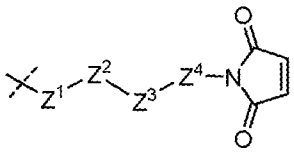
Por consiguiente, la invención proporciona realizaciones en las que los adyuvantes se unen de forma covalente al anticuerpo usando un reactivo (o reactivo de enlace covalente ("CBR")) seleccionado entre:



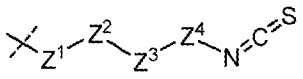
CBR_a,



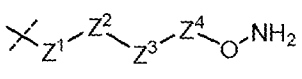
CBR_b,



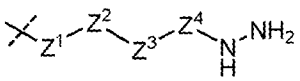
CBR_c,



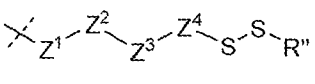
CBR_d,



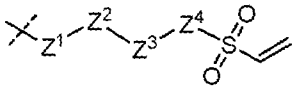
CBR_e,



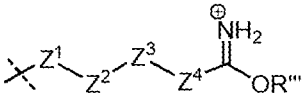
CBR_f,



CBR_g,

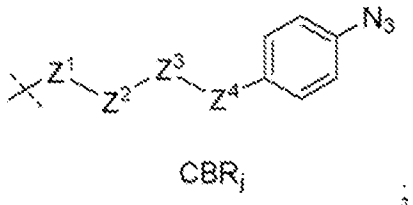


CBR_h,



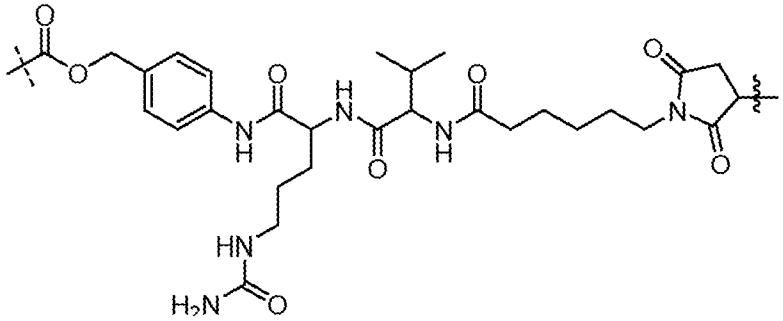
CBR_i,

y



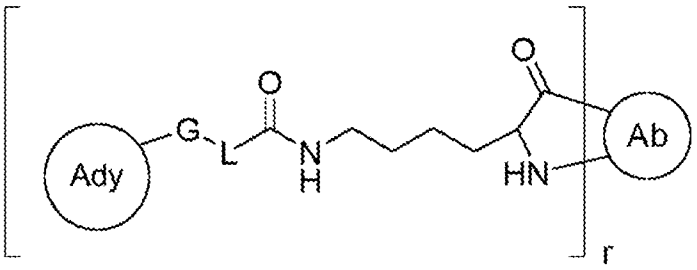
en el que X es halógeno (p. ej., yodo, bromo o cloro); R' es H o sulfo; R'' es arilo opcionalmente sustituido (p. ej., 3-carboxi-4-nitrofenilo) o heteroarilo opcionalmente sustituido (p. ej., piridin-2-ilo); R''' es alquilo opcionalmente sustituido (p. ej., metoxi); Z^1, Z^2, Z^3 y Z^4 son como se describe anteriormente; y la línea discontinua (“ - - - ”) representa el punto de unión al adyuvante.

En algunas realizaciones, el enlazador -Z^1-Z^2-Z^3-Z^4-Z^5- es:



en el que la línea discontinua (“ - - - ”) representa el punto de unión al adyuvante, y la línea ondulada (“ ~~~ ”) representa el punto de unión a una cadena lateral de aminoácidos del anticuerpo. En algunas de dichas realizaciones, la cadena lateral de aminoácido es una cadena lateral de cisteína o una cadena lateral de lisina modificada que contiene un grupo tiol.

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado tiene una estructura según la fórmula III:



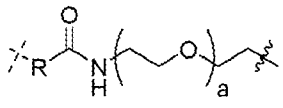
(III)

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que Ab es un anticuerpo con por lo menos una cadena lateral de lisina, Ady es un adyuvante como se define en la reivindicación 1,

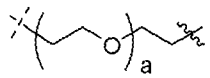
G es CH_2, C=O, o un enlace, L es un enlazador y el subíndice r es un número entero de 1 a 10 (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10). En determinadas realizaciones del inmunoconjugado de la fórmula III, ese anticuerpo no contiene una cadena lateral de lisina modificada con tiol.

En algunas realizaciones, L se selecciona de:

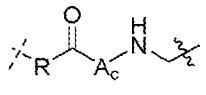
65



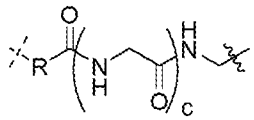
L1



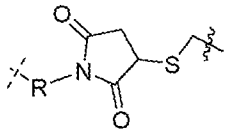
L2



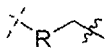
L3



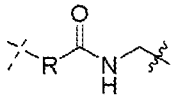
L4



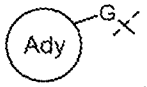
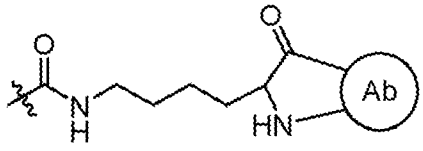
L5



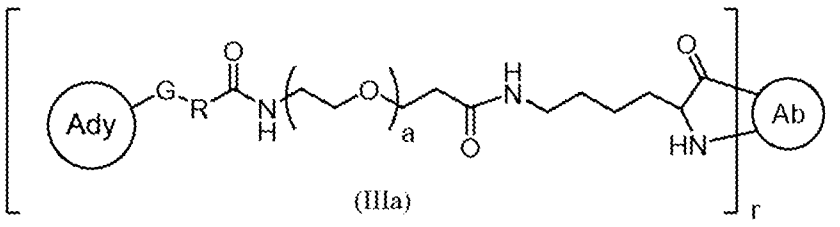
L6



L7

en la que R está opcionalmente presente y es una cadena de alquilo, heteroalquilo, arilo o heteroarilo lineal o ramificada, cíclica o lineal, saturada o insaturada, que comprende de 1 a 8 unidades de carbono; a es un número entero de 1 a 40; cada A se selecciona independientemente entre cualquier aminoácido; el subíndice c es un número entero de 1 a 20; la línea discontinua (" - - - ") representa el punto de unión a  ; y la línea ondulada (" ~~~ ") representa el punto de unión a 

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado tiene una estructura según la fórmula IIIa:

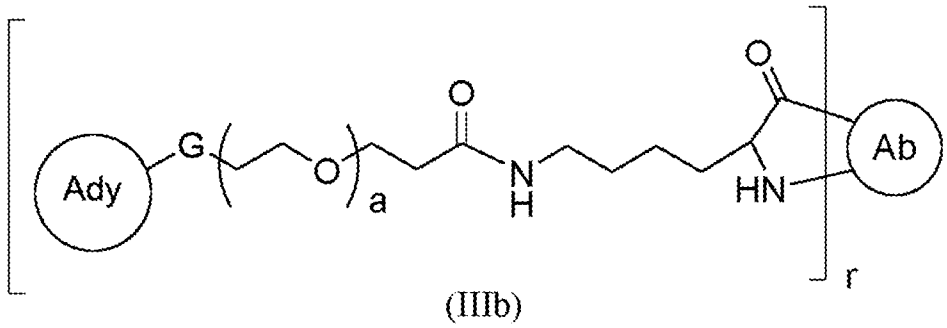


(IIIa)

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que Ab es un anticuerpo con por lo menos una cadena lateral de lisina; Ady es un adyuvante tal como se define en la reivindicación 1;

G es CH_2, C=O, o un enlace; R está opcionalmente presente y es una cadena de alquilo, heteroalquilo, arilo o heteroarilo lineal o ramificada, cíclica o lineal, saturada o insaturada, que comprende de 1 a 8 unidades de carbono; el subíndice a es un número entero de 1 a 40; y el subíndice r es un número entero de 1 a 10 (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10).

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado tiene una estructura según la fórmula IIIb:

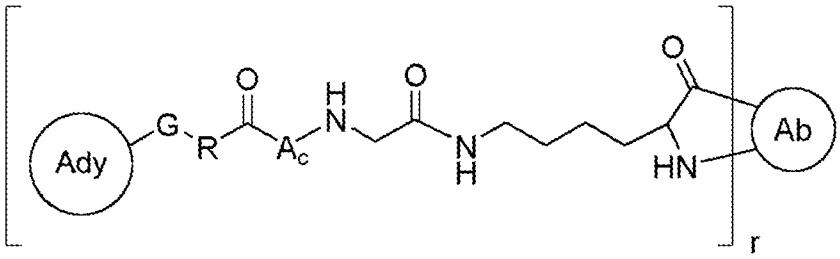


(IIIb)

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que Ab es un anticuerpo con por lo menos una cadena lateral de lisina; Ady es un adyuvante tal como se define en la reivindicación 1;

G es CH_2, C=O, o un enlace; el subíndice a es un número entero de 1 a 40; y el subíndice r es un número entero de 1 a 10 (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10).

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado tiene una estructura según la fórmula IIIc:

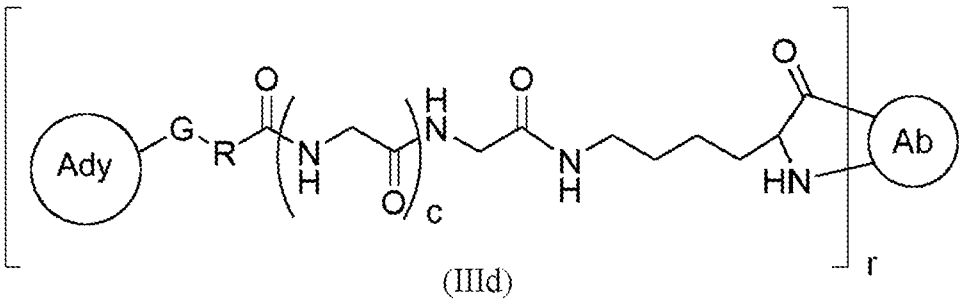


(IIIc)

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que Ab es un anticuerpo con por lo menos una cadena lateral de lisina; Ady es un adyuvante tal como se define en la reivindicación 1;

G es CH_2, C=O, o un enlace; R está opcionalmente presente y es una cadena de alquilo, heteroalquilo, arilo o heteroarilo lineal o ramificada, cíclica o lineal, saturada o insaturada, que comprende de 1 a 8 unidades de carbono; cada A se selecciona independientemente entre cualquier aminoácido; el subíndice c es un número entero de 1 a 20; y el subíndice r es un número entero de 1 a 10 (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10).

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado tiene una estructura según la fórmula IIId:

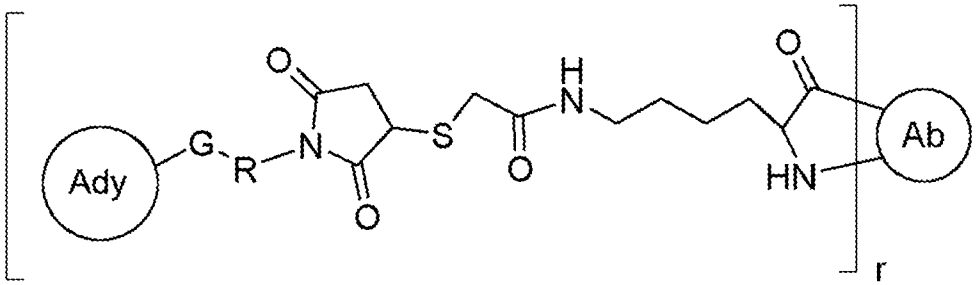


(IIId)

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que Ab es un anticuerpo con por lo menos una cadena lateral de lisina; Ady es un adyuvante tal como se define en la reivindicación 1;

G es CH_2, C=O, o un enlace; R está opcionalmente presente y es una cadena de alquilo, heteroalquilo, arilo o heteroarilo lineal o ramificada, cíclica o lineal, saturada o insaturada, que comprende de 1 a 8 unidades de carbono; el subíndice c es un número entero de 1 a 20; y el subíndice r es un número entero de 1 a 10 (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10).

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado tiene una estructura según la fórmula IIIe:

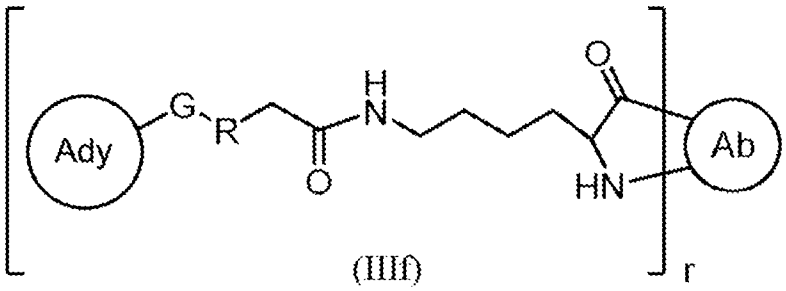


(IIIe)

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que Ab es un anticuerpo con por lo menos una cadena lateral de lisina; Ady es un adyuvante tal como se define en la reivindicación 1;

G es CH_2, C=O, o un enlace; R está opcionalmente presente y es una cadena de alquilo, heteroalquilo, arilo o heteroarilo lineal o ramificada, cíclica o lineal, saturada o insaturada, que comprende de 1 a 8 unidades de carbono; y el subíndice r es un número entero de 1 a 10 (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10).

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado tiene una estructura según la fórmula IIIf:

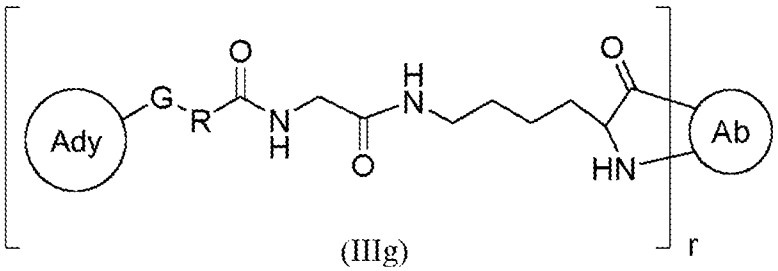


(IIIf)

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que Ab es un anticuerpo con por lo menos una cadena lateral de lisina; Ady es un adyuvante tal como se define en la reivindicación 1;

G es CH_2, C=O, o un enlace; R está opcionalmente presente y es una cadena de alquilo, heteroalquilo, arilo o heteroarilo lineal o ramificada, cíclica o lineal, saturada o insaturada, que comprende de 1 a 8 unidades de carbono; y el subíndice r es un número entero de 1 a 10 (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10).

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado tiene una estructura según la fórmula IIIg:

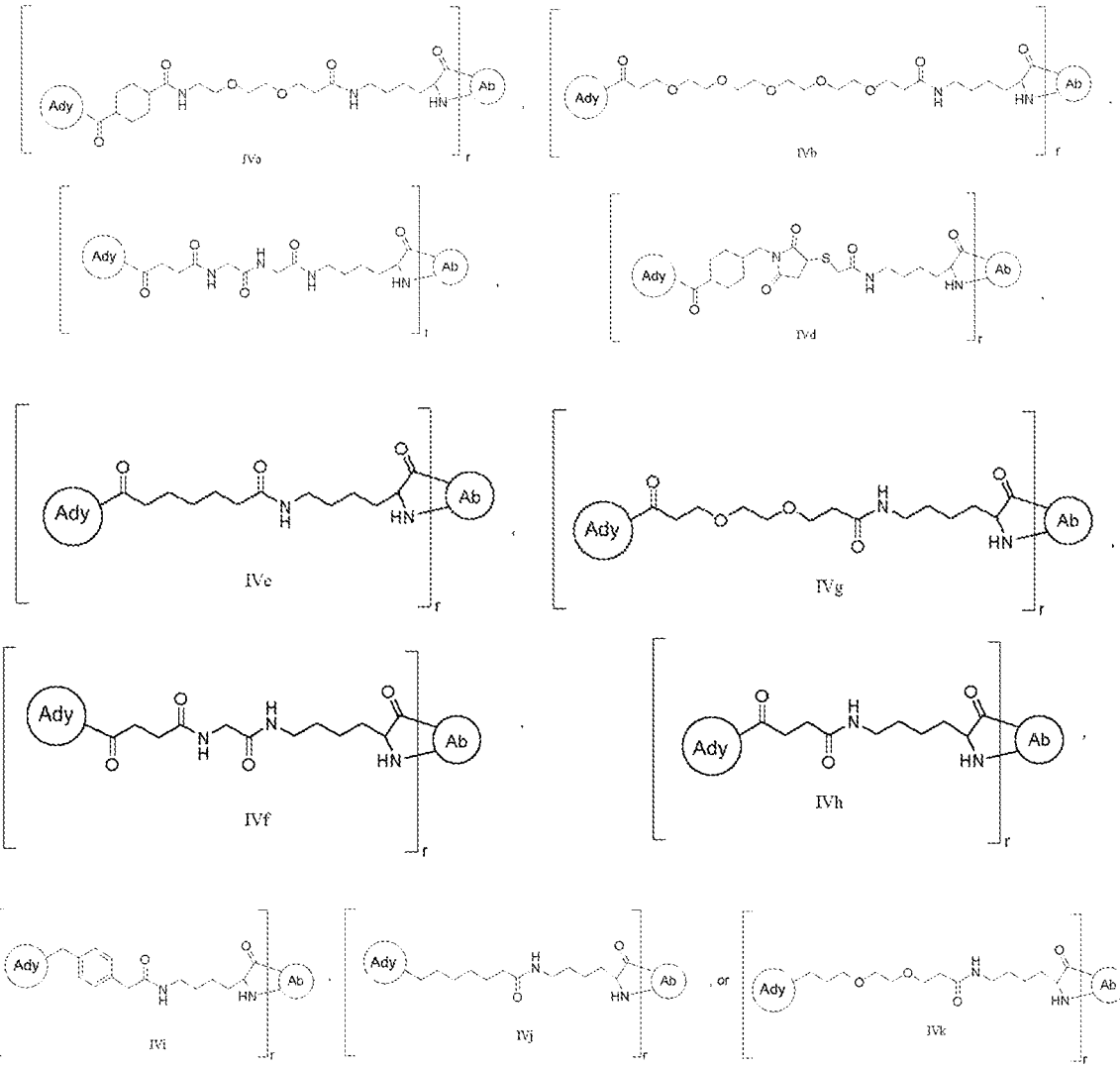


(IIIg)

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que Ab es un anticuerpo con por lo menos una cadena lateral de lisina; Ady es un adyuvante tal como se define en la reivindicación 1;

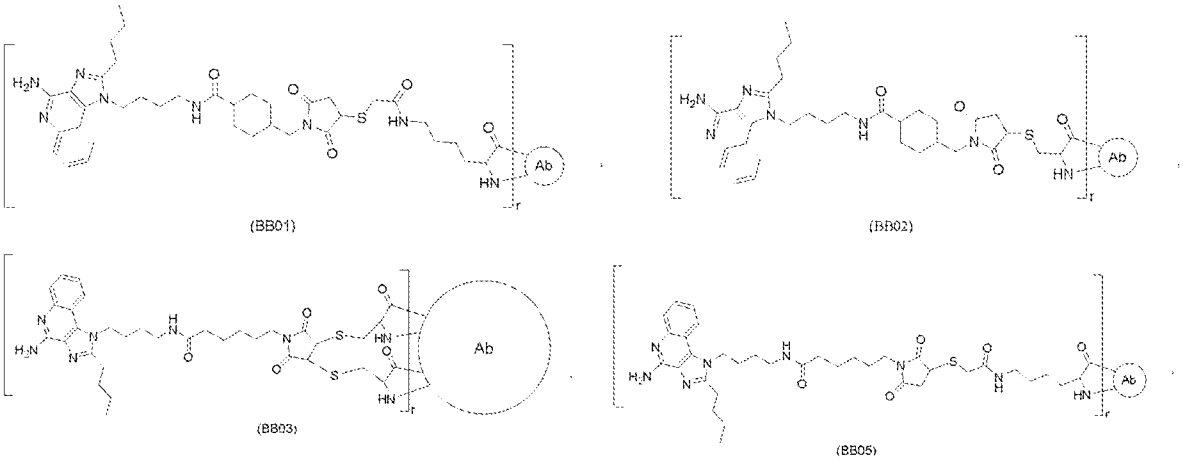
G es CH_2, C=O, o un enlace; R está opcionalmente presente y es una cadena de alquilo, heteroalquilo, arilo o heteroarilo lineal o ramificada, cíclica o lineal, saturada o insaturada, que comprende de 1 a 8 unidades de carbono; y el subíndice r es un número entero de 1 a 10 (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10).

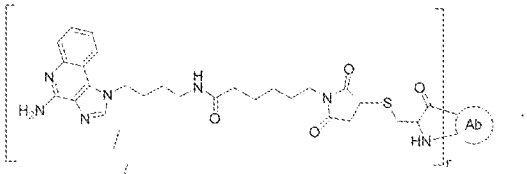
Por consiguiente, el inmunoconjugado puede tener una estructura según la fórmula IVa - fórmula IVk:



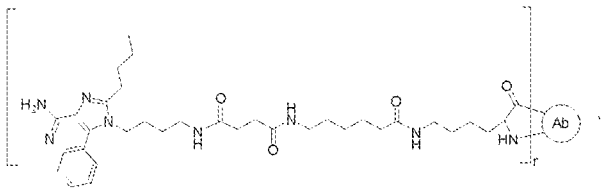
o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que Ab es un anticuerpo con por lo menos una cadena lateral de lisina; Ady es un adyuvante tal como se define en la reivindicación 1; y el subíndice r es un número entero de 1 a 10 (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10). En determinadas realizaciones, el subíndice r es un número entero de 1 a 4 (es decir, 1, 2, 3 o 4).

En determinados ejemplos de la presente divulgación (no según las reivindicaciones adjuntas), el inmunoconjugado tiene una estructura seleccionada entre:

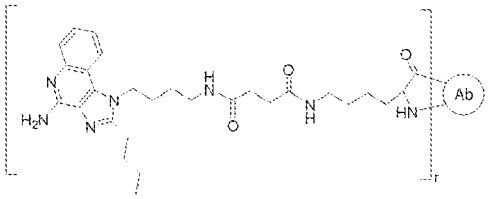




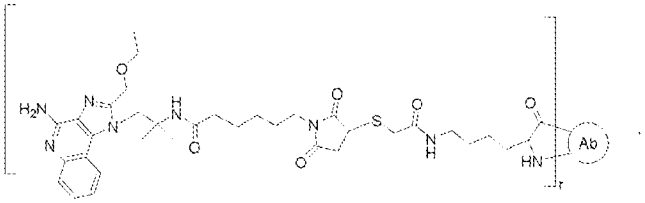
(BB06)



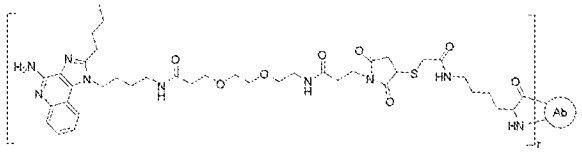
(BB08)



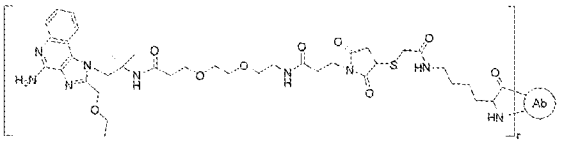
(BB09)



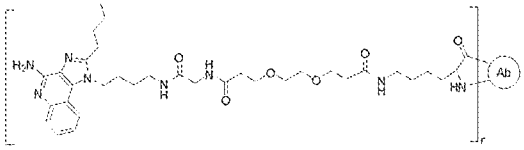
(BB10)



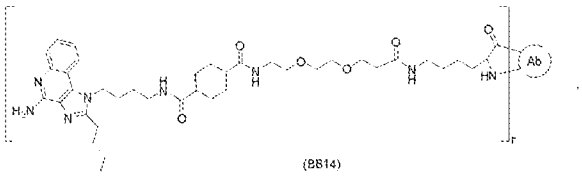
(BB11)



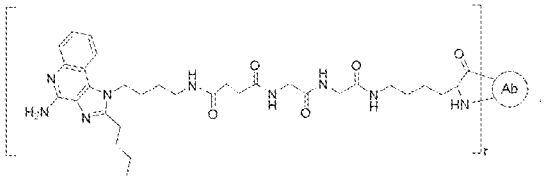
(BB12)



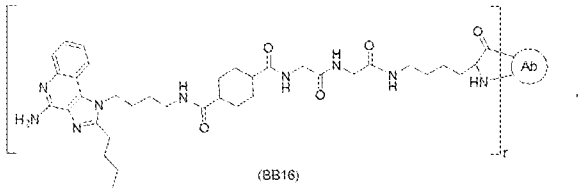
(BB13)



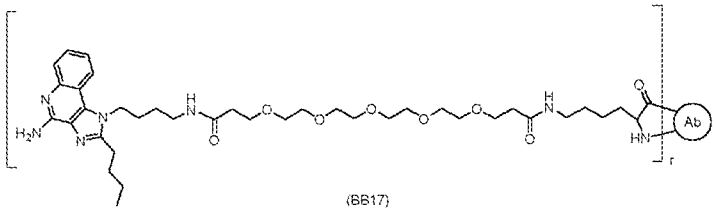
(BB14)



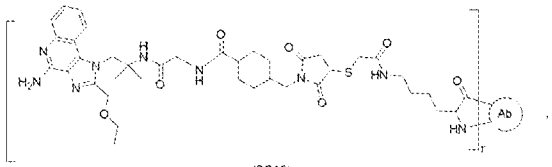
(BB15)



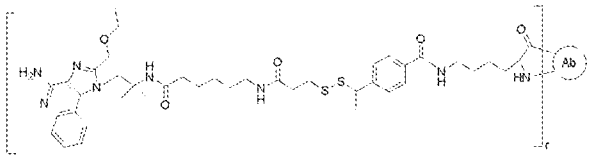
(BB16)



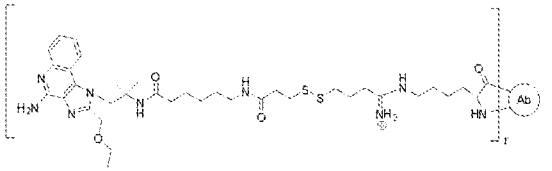
(BB17)



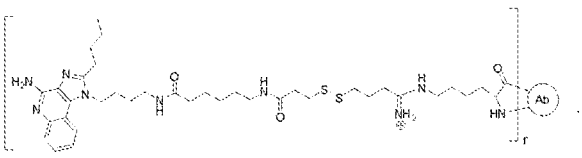
(BB18)



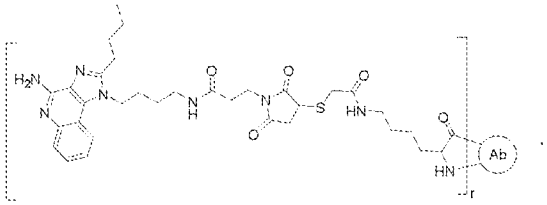
(BB19)



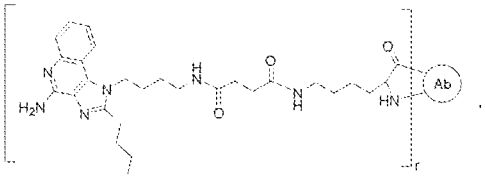
(BB20)



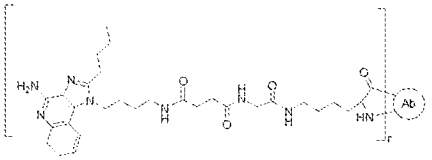
(BB21)



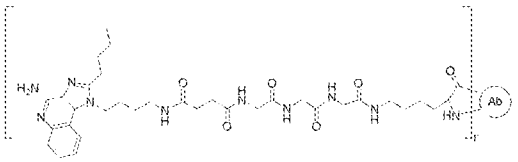
(BB22)



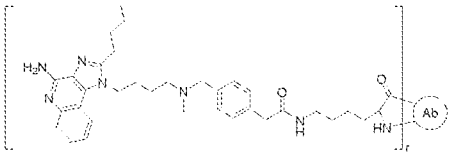
(BB23)



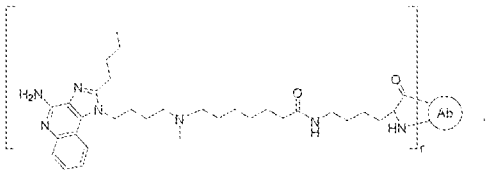
(BB24)



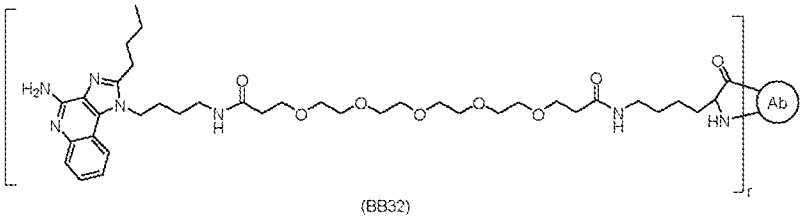
(BB25)



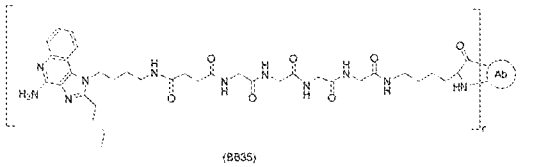
(BB26)



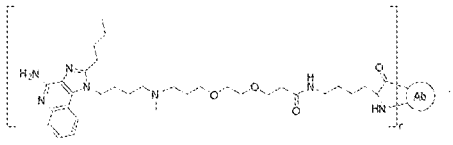
(BB27)



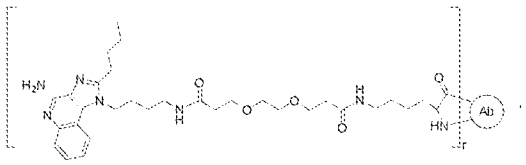
(BB32)



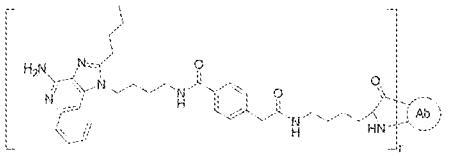
(BB35)



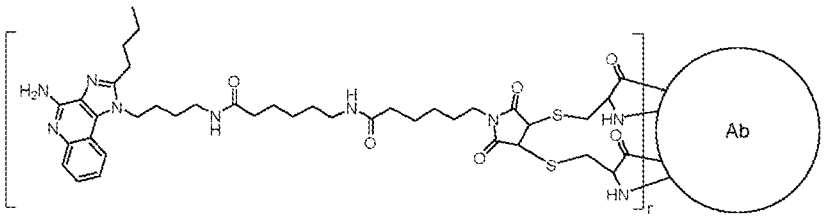
(BB36)



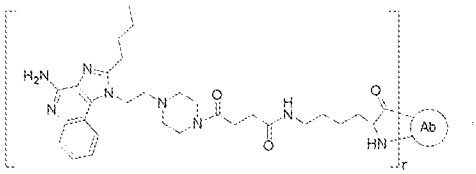
(BB37)



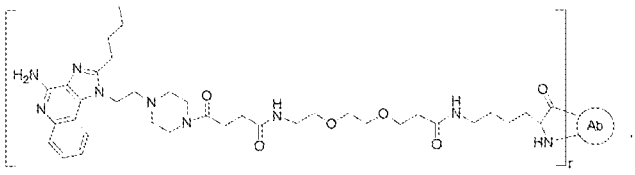
(BB38)



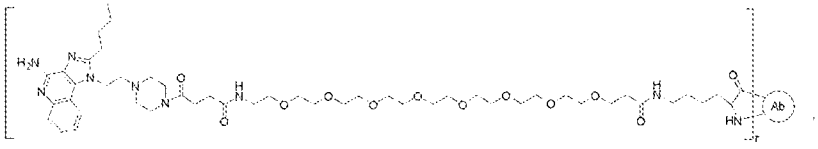
(BB41)



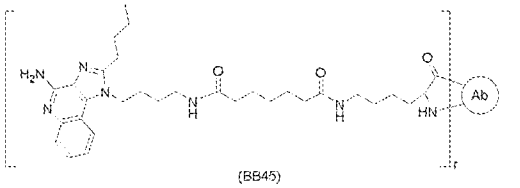
(BB42)



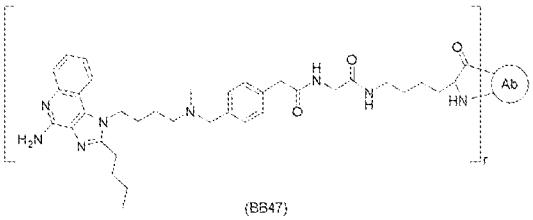
(BB43)



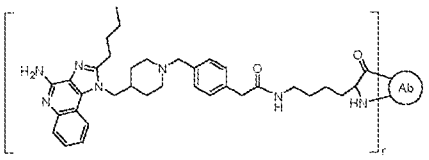
(BB44)



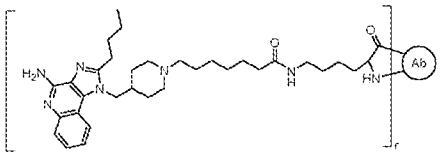
(BB45)



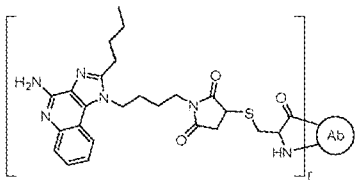
(BB47)



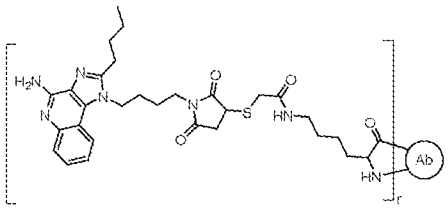
(BB48)



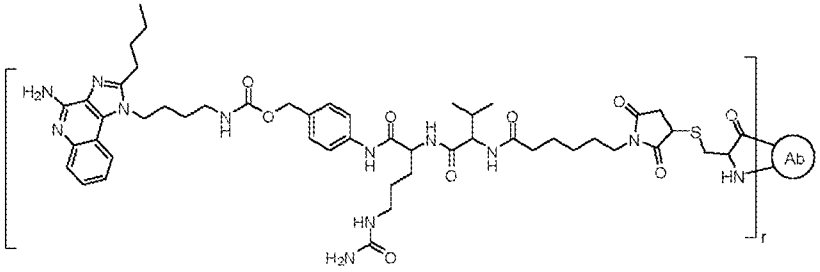
(BB49)



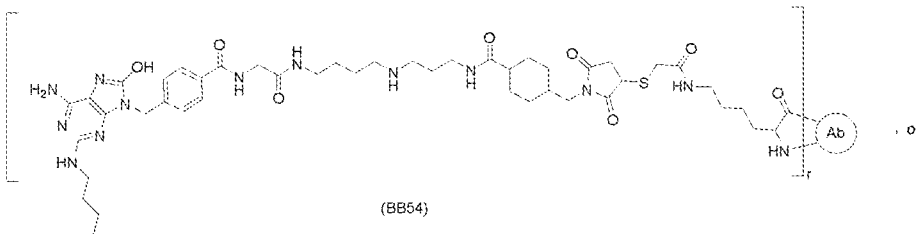
(BB51)



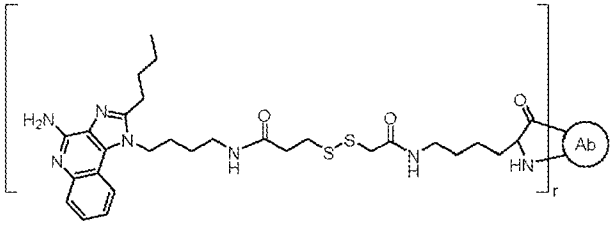
(BB52)



(BB53)



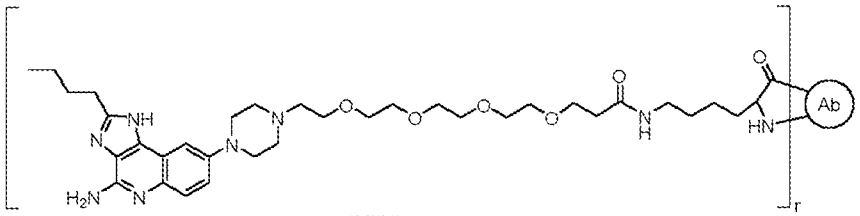
(BB54)



(BB55)

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que Ab es un anticuerpo con por lo menos una cadena lateral de lisina y el subíndice r es un número entero de 1 a 10 (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10).

En determinadas realizaciones, el inmunoconjugado tiene una estructura de:

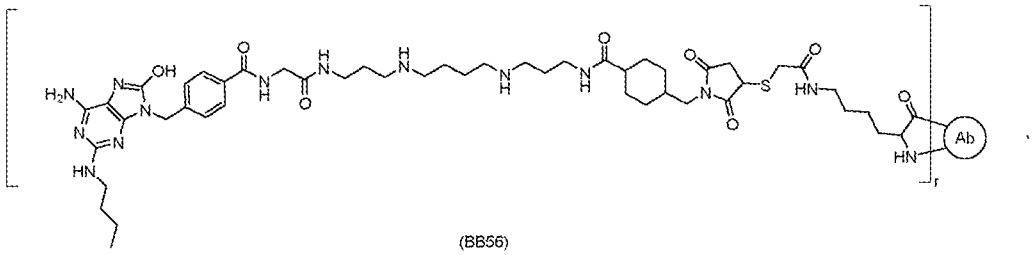


(BB50)

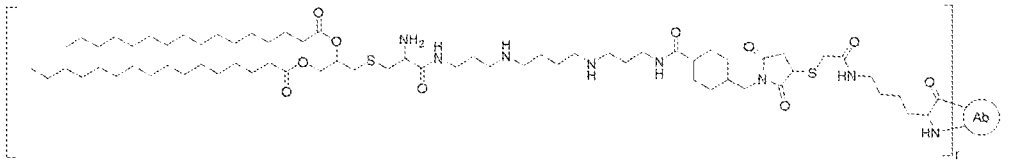
o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que Ab es un anticuerpo con por lo menos una cadena lateral de lisina y el subíndice r es un número entero de 1 a 10 (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10).

En determinadas realizaciones, el subíndice r es un número entero de 1 a 4 (es decir, 1, 2, 3 o 4).

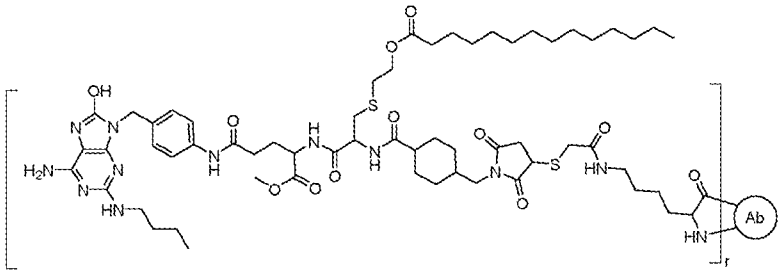
En determinados ejemplos de la presente divulgación (no según las reivindicaciones adjuntas), el inmunoconjugado tiene una estructura seleccionada entre:



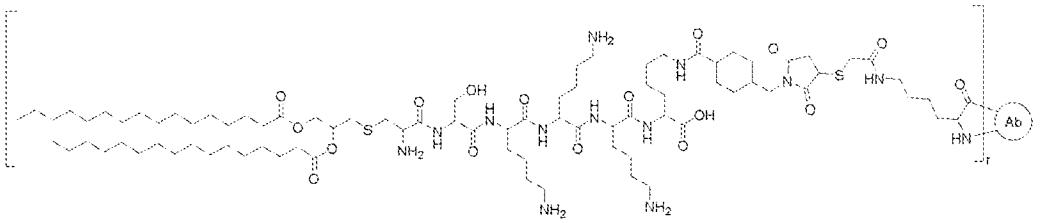
(BB56)



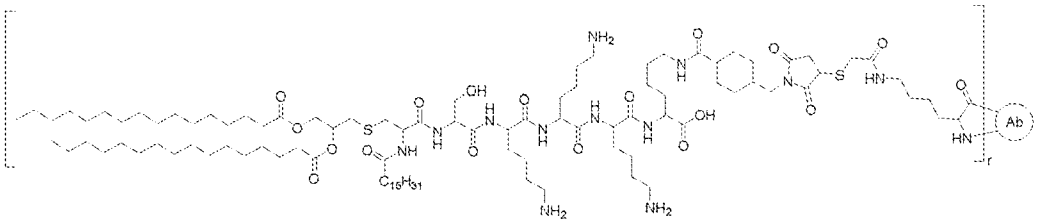
(BB57)



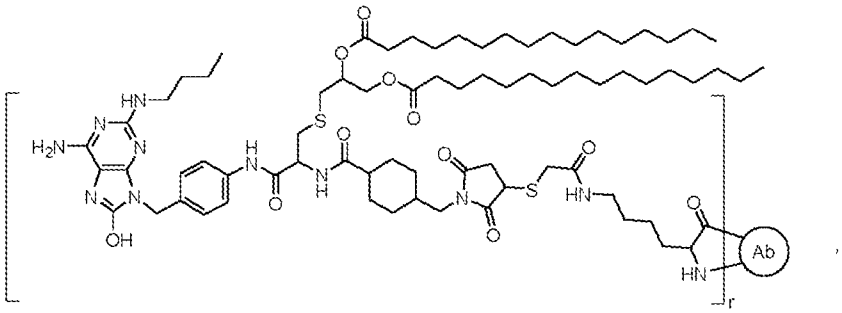
(BB58)



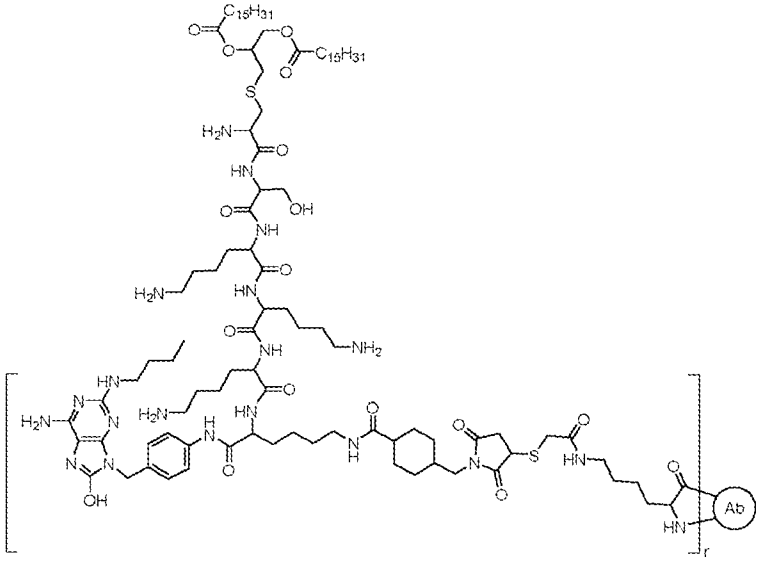
(BB59)



(BB60)

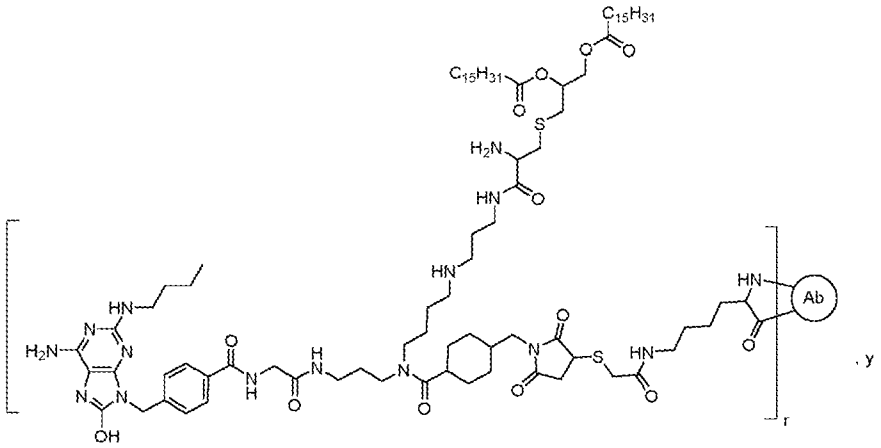


(BB61)

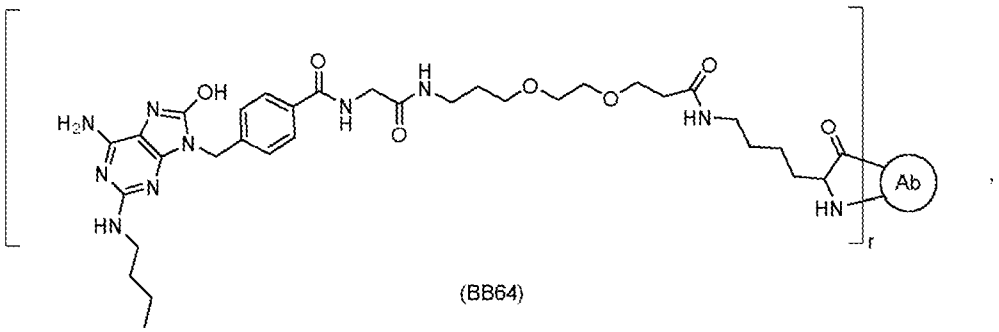


(BB62)

75



(BB63)

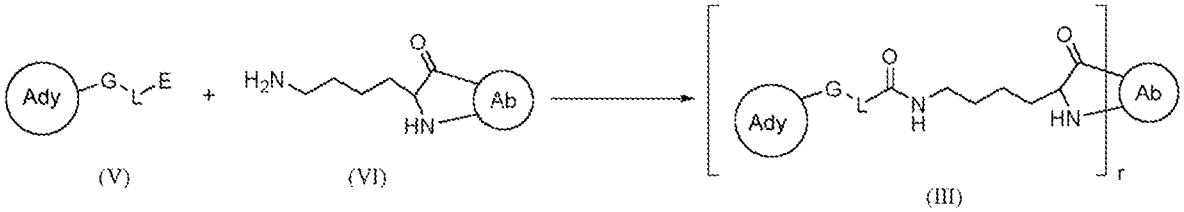


(BB64)

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que Ab es un anticuerpo con por lo menos una cadena lateral de lisina y el subíndice r es un número entero de 1 a 10 (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10).

En determinadas realizaciones, el subíndice r es un número entero de 1 a 4 (es decir, 1, 2, 3 o 4).

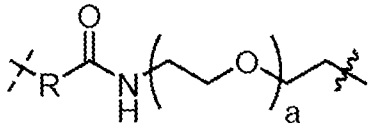
La presente divulgación también describe un método mejorado para producir un inmunoconjugado de la fórmula III a partir de uno o más compuestos de la fórmula V y un anticuerpo de la fórmula VI, comprendiendo el método la etapa de:



(V) (VI) (III)

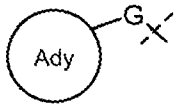
en el que Ady es un adyuvante; G es CH_2, C=O, o un enlace; L es un enlazador; E es un éster; la fórmula VI es un anticuerpo con por lo menos una cadena lateral de lisina; y el subíndice r es un número entero de 1 a 10 (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10). En determinadas realizaciones, el adyuvante ("Ady") es un agonista de TLR.

Puede usarse cualquier enlazador adecuado siempre que pueda unirse al anticuerpo (compuesto de la fórmula VI) a través de un éster. Por ejemplo, el enlazador ("L") puede tener la fórmula siguiente

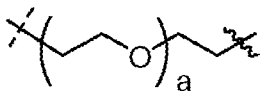


L1

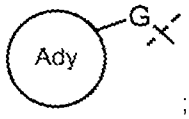
, en el que R está opcionalmente presente y es una cadena de alquilo, heteroalquilo, arilo o heteroarilo lineal o ramificada, cíclica o lineal, saturada o insaturada que comprende de 1 a 8 (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) unidades de carbono; el subíndice a es un número entero de 1 a 40; la línea



discontinua (“ - - - ”) representa el punto de unión a ; y la línea ondulada (“ ~~~ ”) representa el punto de unión a E. En algunas realizaciones, el subíndice a es un número entero de 1 a 20. En algunas realizaciones, el subíndice a es un número entero de 1 a 10. En algunas realizaciones, el subíndice a es un número entero de 1 a 5. En algunas realizaciones, el subíndice a es un número entero de 1 a 3. En determinadas realizaciones, R está presente y es una cadena de alquilo, heteroalquilo, arilo o heteroarilo lineal o ramificada, cíclica o lineal, saturada o insaturada, que comprende de 1 a 8 (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) unidades de carbono.

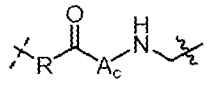


L2

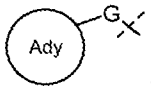
El enlazador ("L") puede tener la fórmula siguiente ; en el que el subíndice a es un número entero de 1 a 40; la línea discontinua (“ - - - ”) representa el punto de unión a 

; y la línea ondulada (“ ~~~ ”) representa el punto de unión a E.

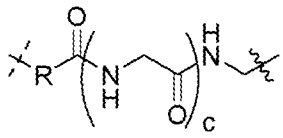
En algunas realizaciones, el subíndice a es un número entero de 1 a 20. En algunas realizaciones, el subíndice a es un número entero de 1 a 10. En algunas realizaciones, el subíndice a es un número entero de 1 a 5. En algunas realizaciones, el subíndice a es un número entero de 1 a 3.



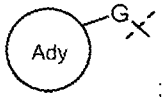
L3

El enlazador ("L") también puede tener la fórmula siguiente , en el que R está opcionalmente presente y es una cadena de alquilo, heteroalquilo, arilo o heteroarilo lineal o ramificada, cíclica o lineal, saturada o insaturada que comprende de 1 a 8 (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 , u 8) unidades de carbono; cada A se selecciona independientemente entre cualquier aminoácido; el subíndice c es un número entero de 1 a 20; la línea discontinua (“ - - - ”) representa el punto de unión a 

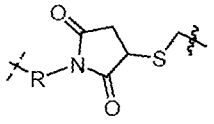
; y la línea ondulada (“ ~~~ ”) representa el punto de unión a E. En algunas realizaciones, el subíndice c es un número entero de 1 a 10. En algunas realizaciones, el subíndice c es un número entero de 1 a 5. En algunas realizaciones, el subíndice c es un número entero de 1 a 2. En determinadas realizaciones, R está presente y es una cadena de alquilo, heteroalquilo, arilo o heteroarilo lineal o ramificada, cíclica o lineal, saturada o insaturada, que comprende de 1 a 8 (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) unidades de carbono.



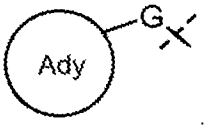
L4

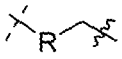
El enlazador ("L") también puede tener la fórmula siguiente ; en la que R está opcionalmente presente y es una cadena de alquilo, heteroalquilo, arilo o heteroarilo lineal o ramificada, cíclica o lineal, saturada o insaturada, que comprende de 1 a 8 (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) unidades de carbono; el subíndice c es un número entero de 1 a 20; la línea discontinua (“ - - - ”) representa el punto de unión a 

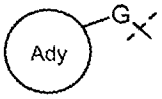
; y la línea ondulada (“ ~~~ ”) representa el punto de unión a E. En algunas realizaciones, el subíndice c es un número entero de 1 a 10. En algunas realizaciones, c es un número entero de 1 a 5. En determinadas realizaciones, R está presente y es una cadena de alquilo, heteroalquilo, arilo o heteroarilo lineal o ramificada, cíclica o lineal, saturada o insaturada, que comprende de 1 a 8 (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) unidades de carbono.

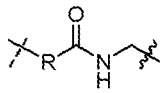


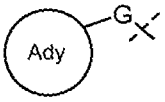
El enlazador ("L") también puede tener la fórmula siguiente L5 ,

en la que R está opcionalmente presente y es una cadena de alquilo, heteroalquilo, arilo o heteroarilo lineal o ramificada, cíclica o lineal, saturada o insaturada, que comprende de 1 a 8 (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) unidades de carbono; la línea discontinua (“ - - - ”) representa el punto de unión a  ; y la línea ondulada (“ ~~~ ”) representa el punto de unión a E. En determinadas realizaciones, R está presente y es una cadena de alquilo, heteroalquilo, arilo o heteroarilo lineal o ramificada, cíclica o lineal, saturada o insaturada, que comprende de 1 a 8 (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) unidades de carbono.

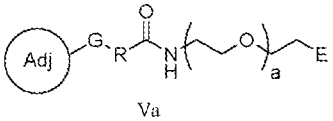


El enlazador ("L") también puede tener la fórmula siguiente L6 ., en el que R está opcionalmente presente y es una cadena de alquilo, heteroalquilo, arilo o heteroarilo lineal o ramificada, cíclica o lineal, saturada o insaturada que comprende de 1 a 8 (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 , u 8) unidades de carbono; la línea discontinua (“ - - - ”) representa el punto de unión a  ; y la línea ondulada (“ ~~~ ”) representa el punto de unión a E. En determinadas realizaciones, R está presente y es una cadena de alquilo, heteroalquilo, arilo o heteroarilo lineal o ramificada, cíclica o lineal, saturada o insaturada, que comprende de 1 a 8 (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) unidades de carbono.

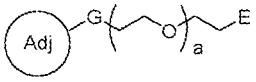


El enlazador ("L") también puede tener la fórmula siguiente L7 , en el que R está opcionalmente presente y es una cadena de alquilo, heteroalquilo, arilo o heteroarilo lineal o ramificada, cíclica o lineal, saturada o insaturada que comprende de 1 a 8 (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) unidades de carbono; la línea discontinua (“ - - - ”) representa el punto de unión a  ; y la línea ondulada ("/ ") representa el punto de unión a E. En determinadas realizaciones, R está presente y es una cadena de alquilo, heteroalquilo, arilo o heteroarilo lineal o ramificada, cíclica o lineal, saturada o insaturada, que comprende de 1 a 8 (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) unidades de carbono.

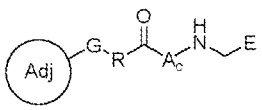
En algunas realizaciones, el compuesto de la fórmula V se selecciona de:



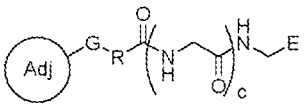
Va ,



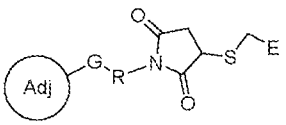
Vb ,



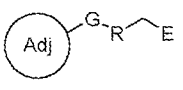
Vc ,



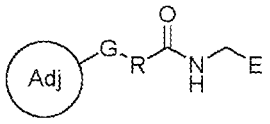
Vd ,



Ve ,



Vf , y

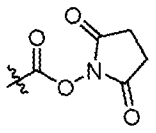


Vg

en el que G es CH_2, C=O, o un enlace; R está opcionalmente presente y es una cadena de alquilo, heteroalquilo, arilo o heteroarilo lineal o ramificada, cíclica o lineal, saturada o insaturada, que comprende de 1 a 8 unidades de carbono; el subíndice a es un número entero de 1 a 40; cada A se selecciona independientemente entre cualquier aminoácido; el subíndice c es un número entero de 1 a 20 y E es un éster.

Como se analiza previamente, existen muchas formas de formar un inmunoconjugado. Cada uno de los métodos de la técnica anterior tiene desventajas. El presente método incluye un proceso de una sola etapa que conjuga un adyuvante, modificado para incluir un enlazador, con la cadena lateral de lisina de un anticuerpo (compuesto de la fórmula VI). Este proceso es posible utilizando un éster. El éster puede ser cualquier éster adecuado capaz de enlazar el compuesto de la fórmula V a una cadena lateral de lisina de un anticuerpo (compuesto de la fórmula VI).

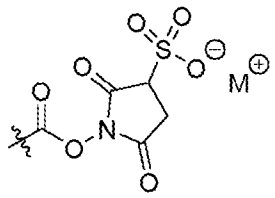
Por ejemplo, el éster de la fórmula V puede ser un éster de N-hidroxisuccinimida ("NHS") de fórmula:



E1

en el que la línea ondulada (“ ”) representa el punto de unión al enlazador ("L").

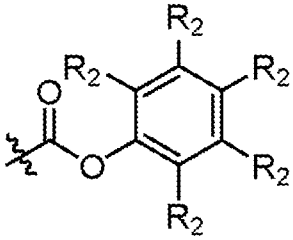
El éster de la fórmula V también puede ser un éster de sulfo-N-hidroxisuccinimida de fórmula:



E2

en el que M es cualquier catión y la línea ondulada (“ ”) representa el punto de unión al enlazador ("L"). Por ejemplo, el contraión catiónico ("M") puede ser un protón, amonio, una amina cuaternaria, un catión de un metal alcalino, un catión de un metal alcalinotérreo, un catión de un metal de transición, un catión de un metal de tierras raras, un catión de elemento del grupo principal, o una combinación de los mismos.

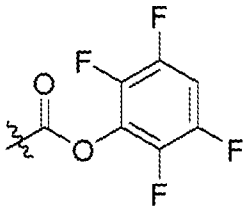
El éster de la fórmula V también puede ser un éster de fenol de fórmula:



E3

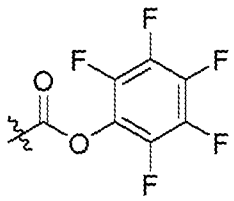
en el que cada R_2 se selecciona independientemente entre hidrógeno o flúor y la línea ondulada (“ ”) representa el punto de unión al enlazador ("L").

El éster de la fórmula V también puede ser un éster de fenol de fórmula:



E3a

(tetrafluorofenilo) o



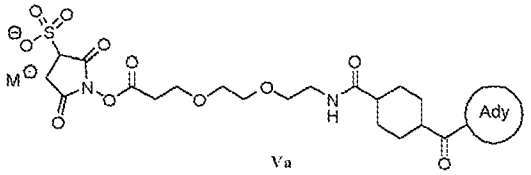
E3b

(pentafluorofenilo); en el que la línea ondulada (" ") representa el punto de unión al enlazador ("L").

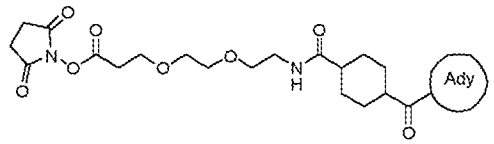
En algunas realizaciones, el anticuerpo de la fórmula VI y el éster de la fórmula V se combinan en cualquier tampón acuoso adecuado. Una lista ejemplar de tampones acuosos adecuados es solución salina tamponada con fosfato, solución salina tamponada con borato y solución salina tamponada con tris.

El uso de tetrafluorofenilo ("TFP") o pentafluorofenilo ("PFP") es especialmente eficaz en la síntesis de los inmunoconjugados de la presente invención.

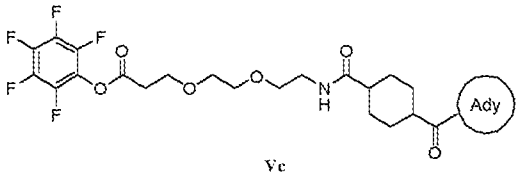
Por consiguiente, una lista ejemplar, pero no limitante, de compuestos de la fórmula V es:



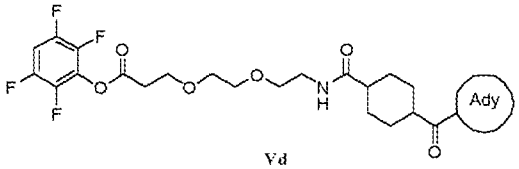
Va



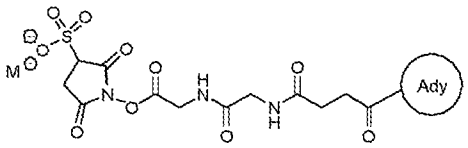
Vb



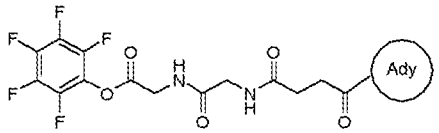
Vc



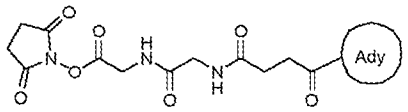
Vd



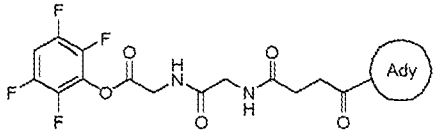
Ve



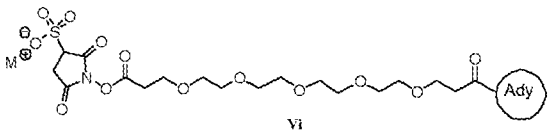
Vf



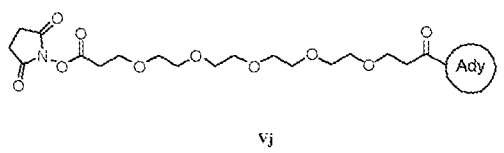
Vg



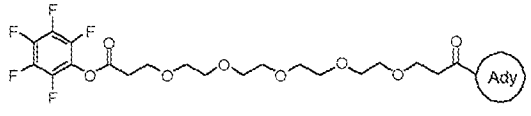
Vh



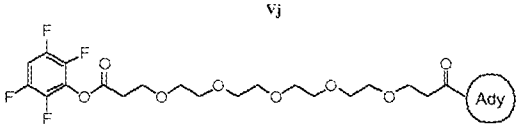
Vi



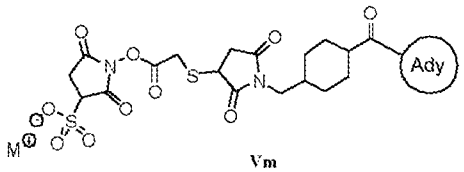
Vj



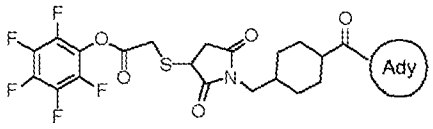
Vk



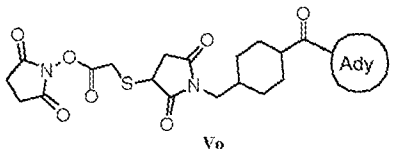
Vl



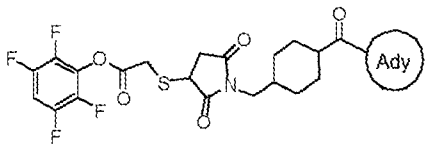
Vm



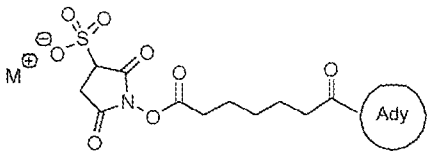
Vu



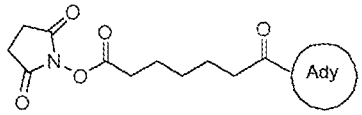
Vo



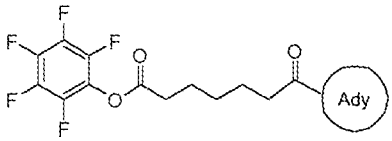
Vp



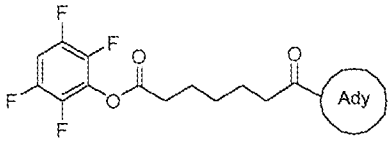
Vq



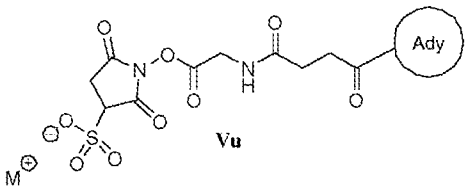
Vr



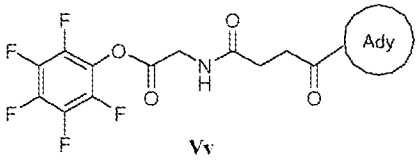
Vs



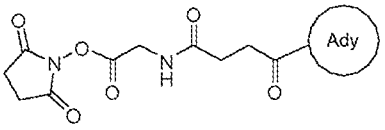
Vt



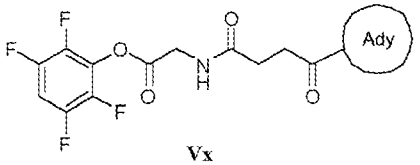
Vu



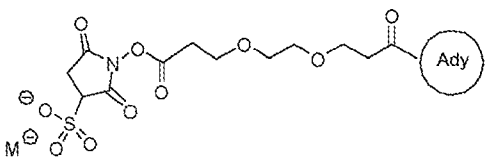
Vv



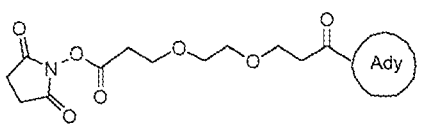
Vw



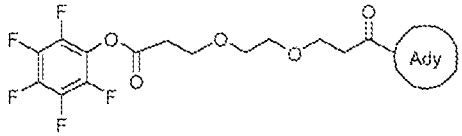
Vx



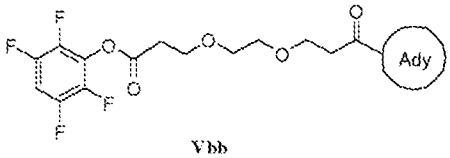
Vy



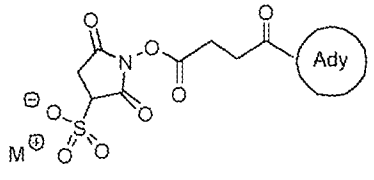
Vz



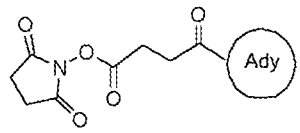
Vaa



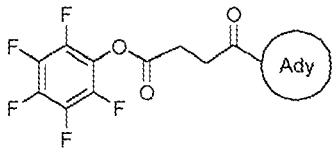
Vbb



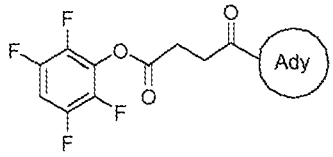
Vcc



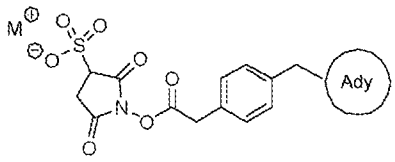
Vdd



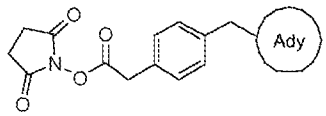
Vee



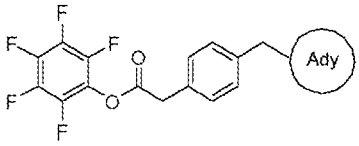
Vff



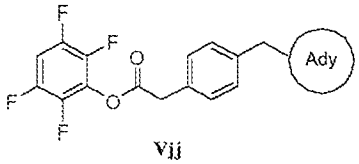
Vgg



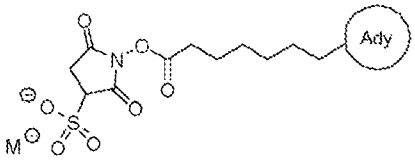
Vhh



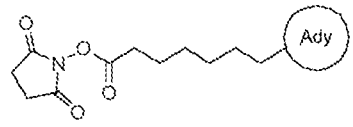
Vii



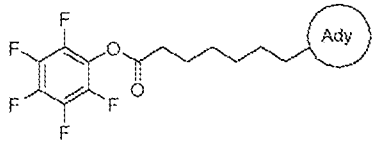
Vjj



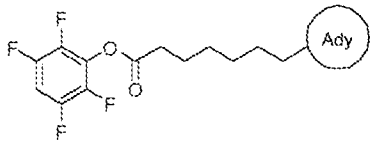
Vkk



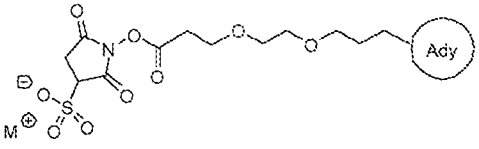
Vll



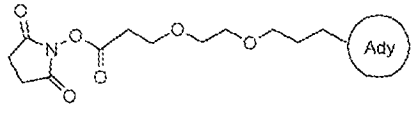
Vmm



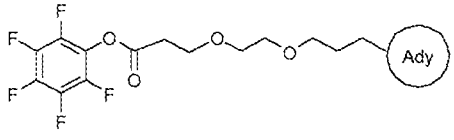
Vnn



Voo

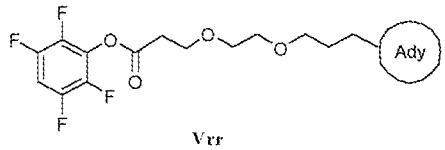


Vpp



Vqq

, or



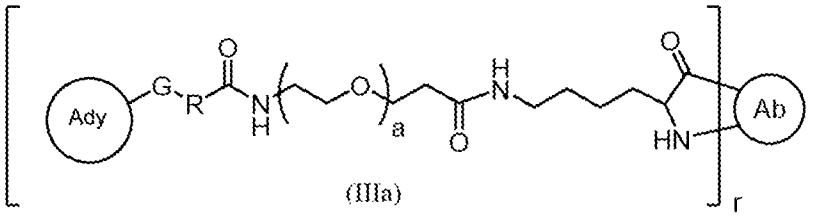
Vrr

en el que Ady es un adyuvante como se define en la reivindicación 1;

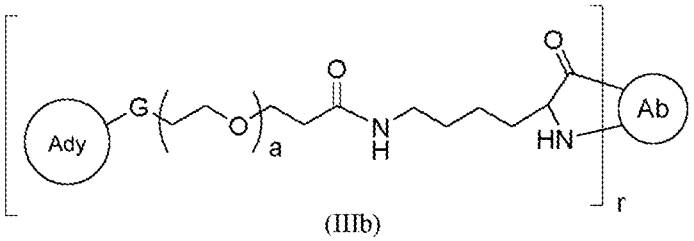
y M es cualquier catión. Por ejemplo, el contraión catiónico ("M")

puede ser un protón, amonio, una amina cuaternaria, un catión de un metal alcalino, un catión de un metal alcalinotérreo, un catión de un metal de transición, un catión de un metal de tierras raras, un catión de elemento del grupo principal, o una combinación de los mismos.

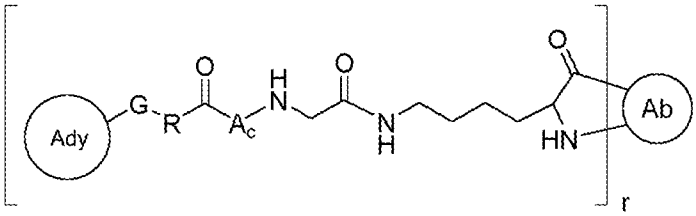
Por consiguiente, el uno o más compuestos de la fórmula V y un anticuerpo de la fórmula VI se pueden combinar para formar un inmunoconjugado de la fórmula III. Una lista ejemplar, pero no limitante, de inmunoconjugados de la fórmula III es:



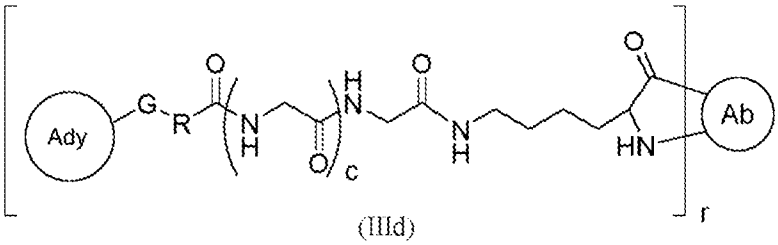
(IIIa),



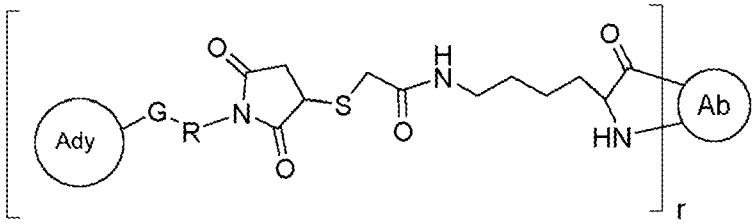
(IIIb),



(IIIc),

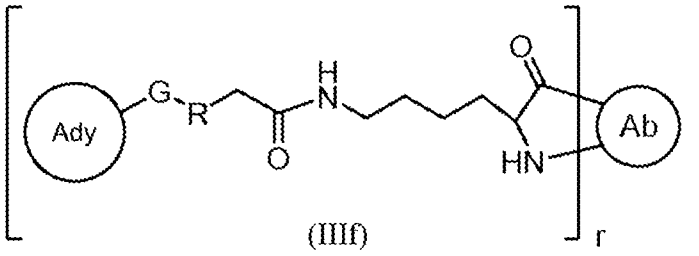


(IIId),



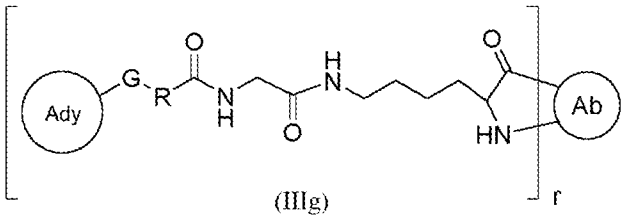
(IIIe),

83



(IIIf)

,



(IIIg)

;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que Ab es un anticuerpo con por lo menos una cadena lateral de lisina; Ady es un adyuvante tal como se define en la reivindicación 1;

G es CH_2, C=O, o un enlace; R está opcionalmente presente y es una cadena de alquilo, heteroalquilo, arilo o heteroarilo lineal o ramificada, cíclica o lineal, saturada o insaturada, que comprende de 1 a 8 unidades de carbono; el subíndice a es un número entero de 1 a 40; cada A se selecciona independientemente entre cualquier aminoácido; el subíndice c es un número entero de 1 a 20; y el subíndice r es un número entero de 1 a 10 (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10).

Adyuvantes

En algunas realizaciones, el adyuvante es un compuesto que provoca una respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, el adyuvante es un agonista del receptor de reconocimiento de patrones ("PRR"). Cualquier adyuvante capaz de activar un receptor de reconocimiento de patrones (PRR) puede instalarse en los inmunoconjugados de la invención. Tal como se usan en la presente memoria, los términos "receptor de reconocimiento de patrones" y "PRR" se refieren a cualquier elemento de una clase de proteínas de mamíferos conservadas que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos ("PAMP") o patrones moleculares asociados a daños ("DAMP"), y actúan como elementos de señalización clave de la inmunidad innata. Los receptores de reconocimiento de patrones se dividen en PRR unidos a la membrana, PRR citoplasmáticos y PRR secretados. Ejemplos de PRR unidos a la membrana incluyen receptores de tipo Toll ("TLR") y receptores de lectina de tipo C ("CLR"). Ejemplos de PRR citoplasmáticos incluyen receptores de tipo NOD ("NLR") y receptores de tipo Rig-I ("RLR"). En algunas realizaciones, el inmunoconjugado puede tener más de un adyuvante de PRR distinto. En determinadas realizaciones, el adyuvante en un inmunoconjugado de la invención es un agonista de receptor de tipo Toll (TLR). Los agonistas de TLR adecuados incluyen TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11 o cualquier combinación de los mismos (p. ej., agonistas de TLR7/8). Cualquier adyuvante capaz de activar un receptor de tipo Toll (TLR) puede instalarse en los inmunoconjugados de la invención. Los receptores de tipo Toll (TLR) son proteínas transmembrana de tipo I responsables de la iniciación de respuestas inmunitarias innatas en los vertebrados. Los TLR reconocen una variedad de patrones moleculares asociados a patógenos de bacterias, virus y hongos y actúan como una primera línea de defensa contra patógenos invasores. Los TLR provocan respuestas biológicas superpuestas pero distintas debido a diferencias en la expresión celular y en las vías de señalización que inician. Una vez activados (p. ej., mediante un estímulo natural o un agonista de TLR sintético), los TLR inician una cascada de transducción de señales que produce la activación de NF-κB por medio del gen 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloide de la proteína adaptadora (MyD88) y al reclutamiento del receptor de IL-1β de la quinasa asociada (IRAK). La fosforilación de IRAK conduce luego al reclutamiento del factor 6 asociado al receptor de TNF (TRAF6), lo que da como resultado la fosforilación del inhibidor de NF-κB, I-κB. Como resultado, NF-κB entra al núcleo celular e inicia la transcripción de genes cuyos promotores contienen sitios de unión de NF-κB, tales como las citocinas. Los modos adicionales de regulación para la señalización de TLR incluyen la inducción de TRAF6 dependiente de interferón (TRIF) que contiene el dominio TIR y la activación de vías independientes de MyD88 por medio de TRIF y TRAF3, lo que produce la fosforilación del factor de respuesta al interferón tres (IRF3). De forma parecida, la vía dependiente de MyD88 también activa varios elementos de la familia IRF, incluidos el IRF5 e IRF7, mientras que la vía dependiente de TRIF también activa la vía NF-κB.

Los ejemplos de agonistas de TLR3 incluyen poliinosina-ácido policitidílico (poli (I:C)), ácido poliadenílico-poliuridílico (poli (A:U) y poli(I)-poli(C12U).

Ejemplos de agonistas de TLR4 incluyen lipopolisacárido (LPS) y monofosforil lípido A (MPLA).

Un ejemplo de agonista de TLR5 incluye flagelina.

Ejemplos de agonistas de TLR9 incluyen oligodesoxinucleótidos CpG monocatenarios (ODN CpG). Se han identificado tres clases principales de ODN CpG estimuladores en función de las características estructurales y la actividad en las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas, en particular las células B y las células dendríticas plasmocitoides (pDC). Estas tres clases son clase A (Tipo D), clase B (Tipo K) y clase C.

Ejemplos de agonistas del receptor de tipo Nod (NLR) incluyen derivado acilado de iE-DAP, D-gamma-Glu-mDAP, L-Ala-gamma-D-Glu-mDAP, muramildipéptido con una cadena de ácido graso C18, muramildipéptido, muramiltripéptido, y muramildipéptido N-glicolilado.

Ejemplos de agonistas del receptor de tipo RIG-I (RLR) incluyen 5'ppp-dsma (5'-pppGCAUGCGACCUCUGUUUGA-3' (SEQ ID NO: 6): 3'-CGUACGCUGGAGACAAACU-5' (SEQ ID NO: 7)), y ácido poli(desoxiadenílico-desoxitimidílico) (Poli(dA:dT))

El estimulador de genes de interferón ("STING"), que puede actuar como un sensor de ADN citosólico, puede reconocer otros compuestos inmunoestimulantes, tales como el ADN citosólico y ácidos nucleicos bacterianos únicos llamados dinucleótidos cíclicos. El ADU-S1OO puede ser un agonista de STING. Ejemplos no limitantes de agonistas de STING incluyen: [G(2',5')pA(2',5')p] (2'2'-cGAMP) cíclico, [G(2',5')pA(3',5')p] (2'3'-cGAMP) cíclico, [G(3',5')pA(3',5')p] (3'3'-cGAMP) cíclico, monofosfato de diadenilato cíclico (c-di-AMP), 2',5'-3',5'-c-diAMP (2'3'-c-di-AMP), monofosfato cíclico de diguanilato (c-di-GMP), 2',5'-3',-5'-c-diGMP (2'3'-c-di-GMP), monofosfato cíclico de diinosina (c-di-IMP), monofosfato cíclico de diuridina (c-di-UMP), Se pueden reconocer KIN700, KIN1148, KIN600, KIN500, KIN100, KIN101, KIN400, KIN2000 o SB-9200.

Cualquier adyuvante capaz de activar TLR7 y/o TLR8 puede instalarse en los inmunoconjugados de la invención. Ejemplos de agonistas de TLR7 y agonistas de TLR8 se describen, p. ej., por Vacchelli et al. (*Oncolmmunology*, 2: 8, e25238, DOI: 10.4161/onci.25238 (2013)) y Carson et al. (publicación de la solicitud de patente estadounidense 2013/0165455). Tanto el TLR7 como TLR8 se expresan en monocitos y células dendríticas. En humanos, el TLR7 también se expresa en células dendríticas plasmocitoides (pDC) y células B. El TLR8 se expresa principalmente en células de origen mieloide, es decir, monocitos, granulocitos y células dendríticas mieloides. El TLR7 y TLR8 son capaces de detectar la presencia de ARN monocatenario "extraño" dentro de una célula, como un medio para responder a la invasión viral. El tratamiento de células que expresan TLR8 con agonistas de TLR8 puede dar como resultado la producción de niveles elevados de IL-12, IFN-γ, IL-1, TNF-α, IL-6 y otras citocinas inflamatorias. De forma parecida, la estimulación de células que expresan TLR7, tales como las pDC, con agonistas de TLR7 puede dar como resultado la producción de niveles elevados de IFN-α y otras citocinas inflamatorias. La interacción de TLR7/TLR8 y la producción de citocinas resultante pueden activar las células dendríticas y otras células presentadoras de antígenos, lo que estimula diversos mecanismos de respuesta inmunitaria innata y adquirida que provocan la destrucción del tumor.

Ejemplos de agonistas de TLR7, TLR8 o TLR7/8 incluyen, pero no se limitan a: Gardiquimod (1-(4-amino-2-etilaminometilimidazo[4,5-c]quinolin-1-il)-2-metilpropan-2-ol), imiquimod (R837) (agonista de TLR7), loxoribina (agonista de TLR7), IRM1 (1-(2-amino-2-metilpropil)-2-(etoximetil)-1H-imidazo-[4,5-c]quinolin-4-amina), IRM2 (2-metil-1-[2 -(3-piridin-3-ilpropoxi)etil]-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina) (agonista de TLR8), IRM3 (N-(2-[2-[4-amino-2-(2-metoxietil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]etoxi]etil)-N-metilciclohexanocarboxamida) (agonista de TLR8), CL097 (2-(etoximetil)-1H-imidazo [4,5-c]quinolin-4-amina) (agonista de TLR7/8), CL307 (agonista de TLR7), CL264 (agonista de TLR7), resiquimod (agonista de TLR7/8), 3M-052/MEDI9197 (agonista de TLR7/8), SD-101 (N-[(4S)-2,5-dioxo-4-imidazolidinil]-urea) (agonista de TLR7/8), motolimod (2-amino-N,N-dipropil-8-[4-(pirrolidina-1-carbonil)fenil]-3H-1-benzazepina-4-carboxamida) (agonista de TLR8), CL075 (3M002, 2-propiltiazolo[4,5-c]quinolin-4-amina) (agonista de TLR7/8) y TL8-506 (ácido 3H-1-benzazepina-4-carboxílico, 2-amino-8-(3-cianofenil)-, éster etílico) (agonista de TLR8).

Los ejemplos de agonistas de TLR2 incluyen, entre pero no se limitan a, un agente que comprende *N*-α-palmitoil-S-[2,3-bis(palmitoiloxi)-(2*RS*)-propil]-L-cisteína, palmitoil-Cys((*RS*)-2,3-di(palmitoiloxi)-propil) ("Pam3Cys"), p. ej., Pam3Cys , Pam3Cys-Ser-(Lys)4 (también conocida como "Pam3Cys-SKKKK" y "Pam_3CSK_4"), triacil lípido A ("OM-174"), ácido lipoteicoico ("LTA"), peptidoglicano y CL419 (S-(2,3-bis(palmitoiloxi)-(2RS)propil)-(R)-cisteinil espermina).

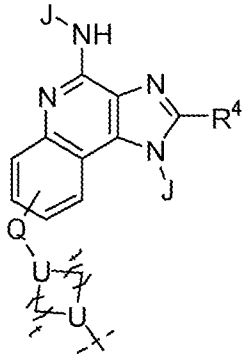
Un ejemplo de agonista de TLR2/6 es Pam_2CSK_4 (S-[2,3-bis(palmitoiloxi)-(2RS)-propil]-[R]-cisteinil-[S]-seril-[S]-lisil-[S]-lisil-[S]-lisil-[S]-lisina x 3 CF3COOH).

Los ejemplos de agonista de TLR2/7 incluyen CL572 (S-(2-miristoiloxietil)-(R)-cisteinil 4-((6-amino-2-(butilamino)-8-hidroxi-9H-purin-9-il)metilo)anilina), CL413 (S(2,3-bis(palmitoiloxi)-(2RS)propil)-(R)-cisteinil-(S)-seril-(S)-lisil-(S)-lisil-(S)-lisil-(S)-lisil 4-((6-amino-2-(butilamino)-8-hidroxi-9H-purin-9-il)metil)anilina) y CL401 (S(2,3-bis(palmitoiloxi) -(2RS)propil)-(R)-cisteinil 4-((6-amino-2(butilamino)-8-hidroxi-9H-purin-9-il)metil)anilina).

Las figuras 22A-22X muestran dónde podrían unirse los agonistas de TLR CL264, CL401, CL413, CL419, CL553, CL572, Pam_3CSK_4y Pam_2CSK_4 a inmunoconjugados de la presente invención al mismo tiempo que mantienen su actividad adyuvante. Específicamente, la ubicación donde se debe unir el enlazador al adyuvante está rodeada por un círculo.

En algunas realizaciones, el adyuvante es un compuesto de imidazoquinolina. Ejemplos de compuestos de imidazoquinolina útiles incluyen los descritos en las patentes estadounidenses 5.389.640; 6.069.149; y 7.968.562.

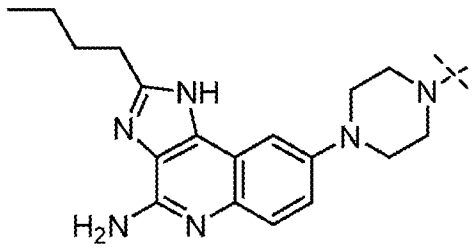
Según la invención, el adyuvante ("Ady") tiene la fórmula:



Ady **4c**

en el que cada J independientemente es hidrógeno, OR^4 o R^4; cada R^4 independientemente es hidrógeno, o un grupo alquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, arilalquilo o heteroarilalquilo que comprende de 1 a 8 (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) unidades de carbono; cada U es independientemente CH o N en el que por lo menos una U es N; cada subíndice t independientemente es un número entero de 1 a 3 (es decir, 1, 2 o 3); Q está ausente; y la línea discontinua (“ - - - ”) representa el punto de unión del adyuvante.

En determinadas realizaciones, el adyuvante ("Ady") es:



Ady-N

en el que la línea discontinua (“ - - - ”) representa el punto de unión del adyuvante.

En algunas realizaciones, el adyuvante no es un fluoróforo. En algunas realizaciones, el adyuvante no es un compuesto de radiodiagnóstico. En algunas realizaciones, el adyuvante no es un compuesto radioterapéutico. En algunas realizaciones, el adyuvante no es un inhibidor de tubulina. En algunas realizaciones, el adyuvante no es un reticulante/alquilador de ADN. En algunas realizaciones, el adyuvante no es un inhibidor de la topoisomerasa.

Anticuerpos

Los anticuerpos de los inmunoconjugados pueden ser anticuerpos alogénicos. Los términos "anticuerpo alogénico" o "aloanticuerpo" se refieren a un anticuerpo que no es del individuo en cuestión (p. ej., un individuo con un tumor y que busca tratamiento), pero es de la misma especie, o es de una especie diferente, pero se ha manipulado genéticamente para reducir, mitigar o evitar el reconocimiento como xenoanticuerpo (p. ej., no propio). Por ejemplo, el "anticuerpo alogénico" puede ser un anticuerpo humanizado. A menos que se indique específicamente lo contrario, "anticuerpo" y "anticuerpos alogénicos" tal como se usan en la presente memoria se refieren a inmunoglobulina G (IgG) o inmunoglobulina A (IgA).

Si una célula cancerosa de un individuo humano se pone en contacto con un anticuerpo que no fue generado por esa misma persona (p. ej., el anticuerpo fue generado por un segundo individuo humano, el anticuerpo fue generado por otra especie como un ratón, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado que fue generado por otra

especie, etc.), entonces el anticuerpo se considera alogénico (en relación con el primer individuo). Un anticuerpo monoclonal de ratón humanizado que reconoce un antígeno humano (p. ej., un antígeno específico del cáncer, un antígeno que está enriquecido en y/o sobre células cancerosas, etc.) se considera un "aloanticuerpo" (un anticuerpo alogénico).

En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo IgG alogénico policlonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo está presente en una mezcla de anticuerpos IgG policlonales con una pluralidad de especificidades de unión. En algunos casos, los anticuerpos de la mezcla se unen específicamente a diferentes moléculas diana, y en algunos casos los anticuerpos de la mezcla se unen específicamente a diferentes epítopos de la misma molécula diana. Por tanto, una mezcla de anticuerpos puede incluir en algunos casos más de un inmunoconjugado de la invención (p. ej., los adyuvantes pueden unirse de forma covalente a anticuerpos de una mezcla, p. ej., una mezcla de anticuerpos IgG policlonales, dando como resultado una mezcla de conjugados de anticuerpo y adyuvante de la invención). Se puede combinar una mezcla de anticuerpos de 2 o más individuos (p. ej., 3 o más individuos, 4 o más individuos, 5 o más individuos, 6 o más individuos, 7 o más individuos, 8 o más individuos, 9 o más individuos, 10 o más individuos, etc.). En algunos casos, se utiliza suero combinado como fuente de aloanticuerpo, donde el suero puede provenir de un número cualquiera de individuos, ninguno de los cuales es el primer individuo (p. ej., el suero puede combinarse de 2 o más individuos, 3 o más individuos, 4 o más individuos, 5 o más individuos, 6 o más individuos, 7 o más individuos, 8 o más individuos, 9 o más individuos, 10 o más individuos, etc.). En algunos casos, los anticuerpos se aíslan o purifican del suero antes de su uso. La purificación se puede llevar a cabo antes o después de combinar los anticuerpos de diferentes individuos.

En algunos casos en los que los anticuerpos en los inmunoconjugados comprenden IgG del suero, se desconocerán los antígenos diana para algunos de los anticuerpos (p. ej., más del 0 % pero menos del 50 %), la mitad de los anticuerpos, la mayoría de los anticuerpos (más del 50 % pero menos del 100 %), o incluso todos los anticuerpos (es decir, las IgG del suero). Sin embargo, hay muchas posibilidades de que por lo menos un anticuerpo en la mezcla reconozca el antígeno diana de interés porque dicha mezcla contiene una amplia variedad de anticuerpos específicos para una amplia variedad de antígenos diana.

En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo IgA alogénico policlonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo está presente en una mezcla de anticuerpos IgA policlonales con una pluralidad de especificidades de unión. En algunos casos, los anticuerpos de la mezcla se unen específicamente a diferentes moléculas diana, y en algunos casos los anticuerpos de la mezcla se unen específicamente a diferentes epítopos de la misma molécula diana. Por tanto, una mezcla de anticuerpos puede incluir en algunos casos más de un inmunoconjugado de la invención (p. ej., los adyuvantes pueden unirse de forma covalente a anticuerpos de una mezcla, p. ej., una mezcla de anticuerpos IgA policlonales, dando como resultado una mezcla de conjugados de anticuerpo y adyuvante de la invención). Se puede combinar una mezcla de anticuerpos de 2 o más individuos (p. ej., 3 o más individuos, 4 o más individuos, 5 o más individuos, 6 o más individuos, 7 o más individuos, 8 o más individuos, 9 o más individuos, 10 o más individuos, etc.). En algunos casos, se utiliza suero combinado como fuente de aloanticuerpo, donde el suero puede provenir de un número cualquiera de individuos, ninguno de los cuales es el primer individuo (p. ej., el suero puede combinarse de 2 o más individuos, 3 o más individuos, 4 o más individuos, 5 o más individuos, 6 o más individuos, 7 o más individuos, 8 o más individuos, 9 o más individuos, 10 o más individuos, etc.). En algunos casos, los anticuerpos se aíslan o purifican del suero antes de su uso. La purificación se puede llevar a cabo antes o después de combinar los anticuerpos de diferentes individuos.

En algunos casos en los que los anticuerpos en los inmunoconjugados comprenden IgA del suero, se desconocerán los antígenos diana para algunos de los anticuerpos (p. ej., más del 0 % pero menos del 50 %), la mitad de los anticuerpos, la mayoría de los anticuerpos (más del 50 % pero menos del 100 %), o incluso todos los anticuerpos (es decir, las IgA del suero). Sin embargo, hay muchas posibilidades de que por lo menos un anticuerpo en la mezcla reconozca el antígeno diana de interés porque dicha mezcla contiene una amplia variedad de anticuerpos específicos para una amplia variedad de antígenos diana.

En algunos casos, el anticuerpo en los inmunoconjugados incluye inmunoglobulina intravenosa (IGIV) y/o anticuerpos de (p. ej., enriquecidos con, purificados a partir de, p. ej., purificados por afinidad) de IVIG. La IVIG es un producto sanguíneo que contiene IgG (inmunoglobulina G) obtenida del plasma (p. ej., en algunos casos sin ninguna otra proteína) de muchos (p. ej., a veces más de 1 000 a 60 000) donantes de sangre normales y sanos. La IVIG está disponible comercialmente. La IVIG contiene un alto porcentaje de IVIG monomérica humana nativa y tiene un bajo contenido de IgA. Cuando se administra por vía intravenosa, la IVIG mejora varias enfermedades. Por lo tanto, la Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) ha aprobado el uso de IVIG para varias enfermedades que incluyen (1) la enfermedad de Kawasaki; (2) trombocitopenia mediada por el sistema inmunitario; (3) inmunodeficiencias primarias; (4) trasplante de células madre hematopoyéticas (en mayores de 20 años); (5) leucemia linfocítica crónica de células B; y (6) infección pediátrica por VIH de tipo 1. En 2004, la FDA aprobó el protocolo Cedars-Sinai IVIG para receptores de trasplantes de riñón, de modo que dichos receptores pudieran aceptar un riñón de un donante vivo de cualquier donante sano, independientemente del tipo de sangre (ABO incompatible) o de la compatibilidad del tejido. Estos y otros aspectos de IVIG se describen, por ejemplo, en las publicaciones de solicitudes de patente estadounidenses 2010/0150942; 2004/0101909; 2013/0177574; 2013/0108619 y 2013/0011388.

En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal de una subclase definida (p. ej., IgG_1, IgG_2, IgG_3,

IgG_4, IgA_1 o IgA_2). Si se usan combinaciones de anticuerpos, los anticuerpos pueden ser de la misma subclase o de subclases diferentes. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser anticuerpos IgG1. Los expertos en la materia pueden obtener diversas combinaciones de diferentes subclases, en diferentes proporciones relativas. En algunos casos, una subclase específica o una combinación específica de diferentes subclases puede ser particularmente eficaz en el tratamiento del cáncer o en la reducción del tamaño del tumor. Por consiguiente, algunas realizaciones de la invención proporcionan inmunoconjugados en los que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal está humanizado.

En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a un antígeno de una célula cancerosa. Por ejemplo, el anticuerpo puede unirse a un antígeno diana que esté presente en una cantidad de por lo menos 10; 100; 1.000; 10 000; 100 000; 1 000 000; 2.5 x 10^6; 5x10^6; o 1 x 10^7 copias o más en la superficie de una célula cancerosa.

En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a un antígeno en una célula inmunitaria o cancerosa con una afinidad mayor que un antígeno correspondiente en una célula no cancerosa. Por ejemplo, el anticuerpo puede reconocer preferiblemente un antígeno que contiene un polimorfismo que se encuentra en una célula cancerosa o inmunitaria en comparación con el reconocimiento de un antígeno de tipo silvestre correspondiente en la célula no cancerosa o no inmunitaria. En algunos casos, el anticuerpo se une a una célula cancerosa o inmunitaria con mayor avidez que a una célula no cancerosa o no inmunitaria. Por ejemplo, la célula cancerosa o inmunitaria puede expresar una mayor densidad de un antígeno, lo que proporciona una unión de mayor afinidad de un anticuerpo multivalente a la célula cancerosa o inmunitaria.

En algunos casos, el anticuerpo no se une significativamente a antígenos no cancerosos (p. ej., el anticuerpo se une a uno o más antígenos no cancerosos con por lo menos 10; 100; 1.000; 10 000; 100 000; o 1.000 000 veces de menor afinidad (mayor Kd) que el antígeno canceroso diana). En algunos casos, el antígeno canceroso diana al que se une el anticuerpo se enriquece en la célula cancerosa. Por ejemplo, el antígeno canceroso diana puede estar presente en la superficie de la célula cancerosa a un nivel que sea por lo menos 2, 5, 10; 100; 1 000; 10 000; 100 000; o 1 000 000 de veces mayor que la de una célula no cancerosa correspondiente. En algunos casos, la célula no cancerosa correspondiente es una célula del mismo tejido u origen que no es hiperproliferativa ni cancerosa. En general, un anticuerpo IgG en cuestión que se une específicamente a un antígeno (un antígeno diana) de una célula cancerosa se une preferiblemente a ese antígeno concreto en relación con otros antígenos disponibles. Sin embargo, no es necesario que el antígeno diana sea específico de la célula cancerosa o incluso esté enriquecido en células cancerosas en relación con otras células (p. ej., el antígeno diana puede expresarse mediante otras células). Por tanto, en la frase "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de una célula cancerosa", el término "específicamente" se refiere a la especificidad del anticuerpo y no a la singularidad del antígeno en ese tipo de célula concreta.

Región Fc modificada

En algunas realizaciones, los anticuerpos en los inmunoconjugados contienen una región Fc modificada, en el que la modificación modula la unión de la región Fc a uno o más receptores Fc.

Los términos "receptor Fc" o "FcR" se refieren a un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. Existen tres clases principales de receptores Fc: FcγR que se une a IgG, FcαR que se une a IgA y FcεR que se une a IgE. La familia FcγR incluye varios elementos, tales como FcγI (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16A), FcγRIIIB (CD16B). Los receptores Fcγ difieren en su afinidad por la IgG y también tienen diferentes afinidades por las subclases de IgG (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4).

En algunas realizaciones, los anticuerpos en los inmunoconjugados (p. ej., anticuerpos conjugados con un agonista de TLR tal como un agonista de TLR7/8 por medio de un enlazador) contienen una o más modificaciones (p. ej., inserción, deleción y/o sustitución de aminoácidos) en la región Fc que da como resultado una unión modulada (p. ej., unión aumentada o unión disminuida) a uno o más receptores Fc (p. ej., FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) y/o FcγRIIIB (CD16b)) en comparación con el anticuerpo nativo que carece de la mutación en la región Fc. En algunas realizaciones, los anticuerpos en los inmunoconjugados contienen una o más modificaciones (p. ej., inserción, deleción y/o sustitución de aminoácidos) en la región Fc que reducen la unión de la región Fc del anticuerpo a FcγRIIB. En algunas realizaciones, los anticuerpos en los inmunoconjugados contienen una o más modificaciones (p. ej., inserción, deleción y/o sustitución de aminoácidos) en la región Fc del anticuerpo que reducen la unión del anticuerpo a FcγRIIB mientras mantienen la misma unión o tienen una mayor unión a FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32A) y/o FcRyIIIA (CD16a) en comparación con el anticuerpo nativo que carece de la mutación en la región Fc. En algunas realizaciones, los anticuerpos en los inmunoconjugados contienen una o más modificaciones en la región Fc que aumentan la unión de la región Fc del anticuerpo a FcγRIIB.

En algunos casos, la unión modulada se proporciona mediante mutaciones en la región Fc del anticuerpo en relación con la región Fc nativa del anticuerpo. Las mutaciones pueden ser en un dominio CH2, un dominio CH3 o una combinación de los mismos. Una "región Fc nativa" es sinónimo de una "región Fc de tipo silvestre" y comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc que se encuentra en la naturaleza o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la región Fc que se encuentra en el anticuerpo nativo (p. ej., rituximab). Las regiones Fc humanas de secuencia nativa incluyen una región Fc de IgG1 humana de secuencia nativa; región Fc de IgG2 humana de secuencia nativa; región Fc de IgG3 humana de secuencia nativa; y región Fc de IgG4 humana de secuencia nativa, así como variantes naturales de la misma. La

secuencia Fc nativa incluye los diversos alotipos de Fc (véase, por ej., Jefferis et al., *mAbs*, 1(4): 332-338 (2009)).

En algunas realizaciones, las mutaciones en la región Fc que dan como resultado la unión modulada a uno o más receptores Fc pueden incluir una o más de las mutaciones siguientes: SD (S239D), SDIE (S239D/1332E), SE (S267E), SELF (S267E/L328F), SDIE (S239D/1332E), SDIEAL (S239D/1332E/A330L), GA (G236A), ALIE (A330L/1332E), GASDALIE (G236A/S239D/A330L/1332E), V9 (G237D/P238D/P271G/A330R), y V11 (G237D/P238D/H268D/P271G/A330R) y/o una o más mutaciones en los aminoácidos siguientes: E233, G237, P238, H268, P271, L328 y A330. Se describen modificaciones adicionales de la región Fc para modular la unión del receptor Fc, p. ej., en la publicación de la solicitud de patente estadounidense 2016/0145350 y las patentes estadounidenses 7.416.726 y 5.624.821.

En algunas realizaciones, la región Fc de los anticuerpos de los inmunoconjugados se modifica para tener un patrón de glicosilación alterado de la región Fc en comparación con la región Fc nativa no modificada.

La inmunoglobulina humana está glicosilada en el residuo Asn297 en el dominio Cγ2 de cada cadena pesada. Este oligosacárido enlazado a través del nitrógeno está compuesto por un heptasacárido principal, N-acetilglucosamina4manosa3 (GlcNAc4Man3). Se sabe que la eliminación del heptasacárido con endoglicosidasa o PNGasa F produce cambios conformacionales en la región Fc del anticuerpo, lo que puede reducir significativamente la afinidad de unión del anticuerpo para activar el FcγR y provocar una disminución de la función efectora. El heptasacárido principal a menudo está decorado con galactosa, que corta el GlcNAc, la fucosa o el ácido siálico, lo que afecta de manera diferencial a la unión del Fc al FcγR activador e inhibidor. Además, se ha demostrado que la sialización α2,6 mejora la actividad antiinflamatoria i*n vivo* mientras que la defucosilación da lugar a una mejor unión de FcγRIIIa y a un aumento de 10 veces en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y en la fagocitosis dependiente de anticuerpos. Por lo tanto, pueden usarse patrones de glicosilación específicos para controlar las funciones efectoras inflamatorias.

En algunas realizaciones, la modificación para alterar el patrón de glicosilación es una mutación. Por ejemplo, una sustitución en Asn297. En algunas realizaciones, Asn297 está mutado a glutamina (N297Q). Los métodos para controlar la respuesta inmunitaria con anticuerpos que modulan la señalización regulada por FcγR se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.º 7.416.726, así como los documentos US 2007/0014795 y US 2008/0286819.

En algunas realizaciones, los anticuerpos de los inmunoconjugados se modifican para contener una región Fab genomanipulada con un patrón de glicosilación que no existe de manera natural. Por ejemplo, las hibridomas pueden manipularse genéticamente para secretar mAb afucosilado, mAb desialilado o Fc desglicosilado con mutaciones específicas que permiten una mayor unión a FcRγIIIa y una mayor función efectora. En algunas realizaciones, los anticuerpos de los inmunoconjugados se manipulan genéticamente para que estén afucosilados (p. ej., rituximab afucosilado, disponible en Invivogen, hcd20-mab13).

En algunas realizaciones, la región Fc completa de un anticuerpo en los inmunoconjugados se intercambia con una región Fc diferente, de modo que la región Fab del anticuerpo se conjuga con una región Fc no nativa. Por ejemplo, la región Fab de rituximab, que normalmente comprende una región Fc de IgG1, se puede conjugar con IgG2, IgG3, IgG4 o IgA, o la región Fab de nivolumab, que normalmente comprende una región Fc de IgG4, se puede conjugar con IgG1, IgG2, IgG3, IgAl o IgG2. En algunas realizaciones, el anticuerpo modificado con Fc con un dominio Fc no nativo también comprende una o más modificaciones de aminoácidos, tales como la mutación S228P dentro del Fc de IgG4, que modulan la estabilidad del dominio Fc descrito. En algunas realizaciones, el anticuerpo modificado con Fc con un dominio Fc no nativo también comprende una o más modificaciones de aminoácidos descritas en la presente memoria que modulan la unión de Fc a FcR.

En algunas realizaciones, las modificaciones que modulan la unión de la región Fc a FcR no alteran la unión de la región Fab del anticuerpo a su antígeno en comparación con el anticuerpo nativo no modificado. En otras realizaciones, las modificaciones que modulan la unión de la región Fc a FcR también aumentan la unión de la región Fab del anticuerpo a su antígeno en comparación con el anticuerpo nativo no modificado.

Dianas de anticuerpos

En algunas realizaciones, el anticuerpo es capaz de unirse a una o más dianas seleccionadas entre (p. ej., se une específicamente a una diana seleccionada entre) 5T4, ABL, ABCFI, ACVRI, ACVRIB, ACVR2, ACVR2B, ACVRLI, ADORA2A, agrecano, AGR2, AICDA, AIFI, AIGI, AKAPI, AKAP2, AMH, AMHR2, ANGPTI, ANGPT2, ANGPTL3, ANGPTL4, ANPEP, APC, APOC1, AR, aromatasa, ATX, AXI, AZGPI (zinc-a-glucoproteína), B7.1, B7.2, B7-H1, BAD, BAFF, BAG1, BAI1, BCR, BCL2, BCL6, BDNF, BLNK, BLRI (MDR15), BlyS, BMP1, BMP2, BMP3B (GDF10), BMP4, BMP6, BMP8, BMPRIA, BMPRIB, BMPR2, BPAGI (plectina), BRCA1, C19orf1O (IL27w), C3, C4A, CS, C5R1, CANT1, CAPRIN-1, CASP1, CASP4, CAV1, CCBP2 (D6/JAB61), CCL1 (1-309), CCLI1 (eotaxina), CCL13 (MCP-4), CCL15 (MIP-Id), CCL16 (HCC-4), CCL17 (TARC), CCL18 (PARC), CCL19 (MIP-3b), CCL2 (MCP-1), MCAF, CCL20 (MIP-3a), CCL21 (MEP-2), SLC, exodus-2, CCL22(MDC/STC-I), CCL27 (CTACK/ILC), CCL28, CCL3 (MIP-Ia), CCL4 (MIPIb), CCL5(RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL8 (mcp-2), CCNAI, CCNA2, CCND1, CCNE1, CCNE2, CCR1 (CKR1/HM145), CCR2 (mcp-IRB/RA), CCR3 (CKR3/CMKBR3), CCR4, CCR5(CMKBR5/ChemR13), CCR6 (CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6), CCR7 (CKR7/EBI1), CCR8 (CMKBR8/TERI/CKR-L1), CCR9 (GPR-9-6), CCRL1 (VSHK1), CCRL2 (L-CCR), CD164, CD19, CDIC, CD2, CD20,

CD21, CD200, CD-22, CD24, CD27, CD28, CD3, CD33, CD35, CD37, CD38, CD3E, CD3G, CD3Z, CD4, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45RB, CD47, CD52, CD69, CD72, CD74, CD79A, CD79B, CD8, CD80, CD81, CD83, CD86, CD137, CD152, CD274, CDH1 (E-cadherina), CDH1O, CDH12, CDH13, CDH18, CDH19, CDH2O, CDH5, CDH7, CDH8, CDH9, CDK2, CDK3, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7, CDK9, CDKNIA (p21Wapl/Cip1), CDKN1B (p27Kip1), CDKN1C, CDKN2A (p16INK4a), CDKN2B, CDKN2C, CDKN3, CEBPB, CERI, CHGA, CHGB, quitinasa, CHST1O, CKLFSF2, CKLFSF3, CKLFSF4, CKLFSF5, CKLFSF6, CKLFSF7, CKLFSF8, CLDN3, CLDN7 (claudina-7), CLN3, CLU (clusterina), CMKLR1, CMKOR1 (RDC1), CNR1, COL18A1, COLIA1, COL4A3, COL6A1, CR2, Cripto, CRP, CSF1 (M-CSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (GCSF), CTL8, CTNNB1 (b-catenina), CTSB (catepsina B), CX3CL1 (SCYD1), CX3CR1 (V28), CXCL1 (GRO1), CXCL1O (IP-IO), CXCLI1 (ITAC/IP-9), CXCL12 (SDF1), CXCL13, CXCL14, CXCL16, CXCL2 (GRO2), CXCL3 (GRO3), CXCL5 (ENA-78/LIX), CXCL6 (GCP-2), CXCL9 (MIG), CXCR3 (GPR9/CKR-L2), CXCR4, CXCR6 (TYMSTR/STRL33/Bonzo), CYB5, CYC1, CYSLTR1, DAB2IP, DES, DKFZp451J0118, DNCL1, DPP4, E2F1, Engel, Edge, Fennel, EFNA3, EFNB2, EGF, EGFR, ELAC2, ENG, Enola, ENO2, ENO3, EPHA1, EPHA2, EPHA3, EPHA4, EPHA5, EPHA6, EPHA7, EPHA8, EPHA9, EPHA10, EPHB1, EPHB2, EPHB3, EPHB4, EPHB5, EPHB6, EPHRIN-A1, EPHRIN-A2, EPHRINA3, EPHRIN-A4, EPHRIN-A5, EPHRIN-A6, EPHRIN-B1, EPHRIN-B2, EPHRIN-B3, EPHB4, EPG, ERBB2 (Her-2), EREG, ERK8, receptor de estrógeno, Earl, ESR2, F3 (TF), FADD, farnesiltransferasa, FasL, FASNf, FCER1A, FCER2, FCGR3A, FGF, FGF1 (aFGF), FGF10, FGF11, FGF12, FGF12B, FGF13, FGF14, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF2 (bFGF), FGF20, FGF21, FGF22, FGF23, FGF3 (int-2), FGF4 (HST), FGF5, FGF6 (HST-2), FGF7 (KGF), FGF8, FGF9, FGFR3, FIGF (VEGFD), FIL1(EPSILON), FBL1 (ZETA), FLJ12584, FLJ25530, FLRT1 (fibronectina), FLT1, FLT-3, FOS, FOSL1(FRA-1), FY (DARC), GABRP (GABAa), GAGEB1, GAGEC1, GALNAC4S-6ST, GATA3, GD2, GDF5, GF11, GGT1, GM-CSF, GNAS1, GNRH1, GPR2 (CCR10), GPR31, GPR44, GPR81 (FKSG80), GRCC1O (C1O), GRP, GSN (Gelsolin), GSTP1, HAVCR2, HDAC, HDAC4, HDAC5, HDAC7A, HDAC9, Hedgehog, HGF, HIF1A, HIP1, histamina y receptores de histamina, HLA-A, HLA-DRA, HLA-E, HM74, HMOXI, HSP90, HUMCYT2A, ICEBERG, ICOSL, ID2, IFN-a, IFNA1, IFNA2, IFNA4, IFNA5, EFNA6, BFNA7, IFNB1, IFNgamma, IFNW1, IGBP1, IGF1, IGFIR, IGF2, IGFBP2, IGFBP3, IGFBP6, DL-1, ILIO, ILIORA, ILIORB, IL-1, IL1R1 (CD121a), IL1R2(CD121b), IL-IRA, IL-2, IL2RA (CD25), IL2RB(CD122), IL2RG(CD132), IL-4, IL-4R(CD123), IL-5, IL5RA(CD125), IL3RB(CD131), IL-6, IL6RA, (CD126), IR6RB(CD130), IL-7, IL7RA(CD127), IL-8, CXCR1 (IL8RA), CXCR2, (IL8RB/CD128), IL-9, IL9R(CD129), IL-10, IL10RA(CD210), IL10RB(CDW210B), IL-11, IL11RA, IL-12, IL-12A, IL-12B, IL-12RB1, IL-12RB2, IL-13, IL13RA1, IL13RA2, IL14, IL15, IL15RA, IL16, IL17, IL17A, IL17B, IL17C, IL17R, IL18, IL18BP, IL18R1, IL18RAP, IL19, ILIA, ILIB, ILIF10, ILIF5, IL1F6, ILIF7, IL1F8, DL1F9, ILIHY1, ILIR1, IL1R2, ILIRAP, ILIRAPLI, ILIRAPL2, ILIRL1, IL1RL2, ILIRN, IL2, IL20, IL20RA, IL21R, IL22, IL22R, IL22RA2, IL23, DL24, IL25, IL26, IL27, IL28A, IL28B, IL29, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL3, IL30, IL3RA, IL4, 1L4, IL6ST (glucoproteína 130), ILK, INHA, INHBA, INSL3, INSL4, IRAK1, IRAK2, ITGA1, ITGA2, ITGA3, ITGA6 (integrina α6), ITGAV, ITGB3, ITGB4 (integrina β4), JAG1, JAK1, JAK3, JTB, JUN, K6HF, KAI1, KDR, KITLG, KLF5 (GC Box BP), KLF6, KLK10, KLK12, KLK13, KLK14, KLK15, KLK3, KLK4, KLK5, KLK6, KLK9, KRT1, KRT19 (queratina 19), KRT2A, KRTHB6 (queratina tipo II específica para el cabello), LAMAS, LEP (leptina), Lingo-p75, LingoTroy, LPS, LTA (TNF-b), LTB, LTB4R (GPR16), LTB4R2, LTBR, MACMARCKS, MAG o OMgp, MAP2K7 (c-Jun), MCP-1, MDK, MIB1, midkine, MIF, MISRII, MJP-2, MK, MKI67 (Ki-67), MMP2, MMP9, MS4A1, MSMB, MT3 (metalotionectina-UI), mTOR, MTSS1, MUC1 (mucina), MYC, MYD88, NCK2, neurocan, NFKBI, NFKB2, NGFB (NGF), NGFR, NgR-Lingo, NgRNogo66, (Nogo), NgR-p75, NgR-Troy, NMEI (NM23A), NOTCH, NOTCH1, NOX5, NPPB, NROB1, NROB2, NRID1, NRID2, NRIH2, NRIH3, NRIH4, NR112, NR113, NR2C1, NR2C2, NR2E1, NR2E3, NR2F1, NR2F2, NR2F6, NR3C1, NR3C2, NR4A1, NR4A2, NR4A3, NR5A1, NR5A2, NR6A1, NRP1, NRP2, NT5E, NTN4, ODZ1, OPRDI, P2RX7, PAP, PART1, PATE, PAWR, PCA3, PCDGF, PCNA, PDGFA, PDGFB, PDGFRA, PDGFRB, PECAMI, peg-asparaginasa, PF4 (CXCL4), PGF, PGR, fosfacano, PIAS2, PI3 quinasa, PIK3CG, PLAU (uPA), PLG, PLXDC1, PKC, PKC-beta, PPBP (CXCL7), PPID, PR1, PRKCQ, PRKD1, PRL, PROC, PROK2, PSAP, PSCA, PTAFR, PTEN, PTGS2 (COX-2), PTN, RAC2 (P21Rac2), RANK, ligando RANK, RARB, RGS1, RGS13, RGS3, RNF11O (ZNF144), Ron, ROBO2, RXR, S100A2, SCGB 1D2 (lipofilina B), SCGB2A1 (mamaglobina 2), SCGB2A2 (mamaglobina 1), SCYE1 (citocina endotelial activadora de monocitos), SDF2, SERPENA1, SERPINA3, SERPINB5 (maspin), SERPINEI (PAI-I), SERPINFI, SHIP-1, SHIP-2, SHB1, SHB2, SHBG, SfcAZ, SLC2A2, SLC33A1, SLC43A1, SLIT2, SPP1, SPRR1B (Spr1), ST6GAL1, STAB1, STATE, STEAP, STEAP2, TB4R2, TBX21, TCP1O, TDGF1, TEK, TGFA, TGFB1, TGFB1I1, TGFB2, TGFB3, TGFBI, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR3, THIL, THBS1 (trombospondina-1), THBS2, THBS4, THPO, TIE (Tie-1), TIMP3, factor tisular, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TNF, TNF-α, TNFAIP2 (B94), TNFAIP3, TNFRSFI1A, TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFRSF21, TNFRSF5, TNFRSF6 (Fas), TNFRSF7, TNFRSF8, TNFRSF9, TNFSF1O (TRAIL), TNFSF11 (TRANCE), TNFSF12 (APO3L), TNFSF13 (abril), TNFSF13B, TNFSF14 (HVEM-L), TNFRSF14 (HVEM), TNFSF15 (VEGI), TNFSF18, TNFSF4 (ligando OX40), TNFSF5 (ligando CD40), TNFSF6 (FasL), TNFSF7 (ligando CD27), TNFSF8 (ligando CD30), TNFSF9 (ligando 4-IBB), TOLLIP, Receptores de tipo Toll, TOP2A (topoisomerasa lia), TP53, TPMI, TPM2, TRADD, TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF4, TRAPS, TRAF6, TRKA, TREM1, TREM2, TRPC6, TSLP, TWEAK, tirosinasa, uPAR, VEGF, VEGFB, VEGFC, versican, VHL C5, VLA-4, Wnt-1, XCL1 (linfotactina), XCL2 (SCM-lb), XCRI (GPR5/CCXCR1), YY1, ZFPM2, CLEC4C (BDCA-2, DLEC, CD303, CLECSF7), CLEC4D (MCL, CLECSF8), CLEC4E (Mincle), CLEC6A (dectina 2), CLECSA (MDL-1, CLECSF5), CLEC1B (CLEC-2), CLEC9A (DNGR-1), CLEC7A (dectina 1), PDGFRa, SLAMF7, GP6 (GPVI), LILRA1 (CD85I), LILRA2 (CD85H, ILT1), LILRA4 (CD85G, ILT7), LILRA5 (CD85F, ILT11), LILRA6 (CD85b, ILT8), NCR1 (CD335, LY94, NKp46), NCR3 (CD335, LY94, NKp46), NCR3 (CD337, NKp30), OSCAR, TARM1, CD300C, CD300E, CD300LB (CD300B), CD300LD (CD300D), KIR2DL4 (CD158D), KIR2DS, KLRC2 (CD159C, NKG2C), KLRK1 (CD314, NKG2D), NCR2 (CD336, NKp44), PILRB, SIGLEC1 (CD169, SN), SIGLEC14, SIGLEC15 (CD33L3), SIGLEC16, SIRPB1 (CD172B), TREM1 (CD354), TREM2 y KLRF1 (NKp80).

En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a un receptor acoplado a FcRγ. En algunas realizaciones, el receptor acoplado a FcRγ se selecciona entre el grupo que consiste en GP6 (GPVI), LILRA1 (CD85I), LILRA2 (CD85H, ILT1), LILRA4 (CD85G, ILT7), LILRA5 (CD85F, ILT11), LILRA6 (CD85b, ILT8), NCR1 (CD335, LY94, NKp46), NCR3 (CD335, LY94, NKp46), NCR3 (CD337, NKp30), OSCAR y TARM1.

En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a un receptor acoplado a DAP12. En algunas realizaciones, el receptor acoplado a DAP12 se selecciona entre el grupo que consiste en CD300C, CD300E, CD300LB (CD300B), CD300LD (CD300D), KIR2DL4 (CD158D), KIR2DS, KLRC2 (CD159C, NKG2C), KLRK1 (CD314, NKG2D), NCR2 (CD336, NKp44), PILRB, SIGLEC1 (CD169, SN), SIGLEC14, SIGLEC15 (CD33L3), SIGLEC16, SIRPB1 (CD172B), TREM1 (CD354) y TREM2.

En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a un receptor que porta hemITAM. En algunas realizaciones, el receptor que porta hemITAM es KLRF1 (NKp80).

En algunas realizaciones, el anticuerpo es capaz de unirse a una o más dianas seleccionadas entre CLEC4C (BDCA-2, DLEC, CD303, CLECSF7), CLEC4D (MCL, CLECSF8), CLEC4E (Mincle), CLEC6A (dectina 2), CLEC5A (MDL-1, CLECSF5), CLEC1B (CLEC-2), CLEC9A (DNGR-1) y CLEC7A (dectina 1). En algunas realizaciones, el anticuerpo es capaz de unirse a CLEC6A (dectina 2) o CLEC5A. En algunas realizaciones, el anticuerpo es capaz de unirse a CLEC6A (dectina 2).

En algunas realizaciones, el anticuerpo es capaz de unirse a una o más dianas seleccionadas entre (p. ej., se une específicamente a una diana seleccionada entre): ATP5I (Q06185), OAT (P29758), AIFM1 (Q9Z0X1), AOFA (Q64133), MTDC (P18155), CMC1 (Q8BH59), PREP (Q8K411), YMEL1 (088967), LPPRC (Q6PB66), LONM (Q8CGK3), ACON (Q99KI0), ODO1 (Q60597), IDHP (P54071), ALDH2 (P47738), ATPB (P56480), AATM (P05202), TMM93 (Q9CQW0), ERGI3 (Q9CQE7), RTN4 (Q99P72), CL041 (Q8BQR4), ERLN2 (Q8BFZ9), TERA (Q01853), DAD1 (P61804), CALX (P35564), CALU (O35887), VAPA (Q9WV55), MOGS (Q80UM7), GANAB (Q8BHN3), ERO1A (Q8R180), UGGG1 (Q6P5E4), P4HA1 (Q60715), HYEP (Q9D379), CALR (P14211), AT2A2 (O55143), PDIA4 (P08003), PDIA1 (P09103), PDIA3 (P27773), PDIA6 (Q922R8), CLH (Q68FD5), PPIB (P24369), TCPG (P80318), MOT4 (P57787), NICA (P57716), BASI (P18572), VAPA (Q9WV55), ENV2 (P11370), VAT1 (Q62465), 4F2 (P10852), ENOA (P17182), ILK (O55222), GPNMB (Q99P91), ENV1 (P10404), ERO1A (Q8R180), CLH (Q68FD5), DSG1A (Q61495), AT1A1 (Q8VDN2), HYOU1 (Q9JKR6), TRAP1 (Q9CQN1), GRP75 (P38647), ENPL (P08113), CH60 (P63038) y CH10 (Q64433). En la lista anterior, los números de acceso se muestran entre paréntesis.

En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a un antígeno seleccionado entre CDH1, CD19, CD20, CD29, CD30, CD38, CD40, CD47, EpCAM, MUC1, MUC16, EGFR, Her2, SLAMF7 y gp75. En algunas realizaciones, el antígeno se selecciona entre CD19, CD20, CD47, EpCAM, MUC1, MUC16, EGFR y Her2. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a un antígeno seleccionado entre el antígeno Tn y el antígeno de Thomsen-Friedenreich.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o proteína de fusión Fc se selecciona entre: abagovomab, abatacept (también conocido como ORENCIA™), abciximab (también conocido como REOPRO™, c7E3 Fab), adalimumab (también conocido como HUMIRA™), adecatumumab, alemtuzumab (también conocido como CAMPATH™, MabCampath o Campath-IH), altumomab, afelimomab, anatumomab mafenatox, anetumumab, anrukizumab, apolizumab, arcitumomab, aselizumab, atlizumab, atorolimumab, bapineuzumab, basiliximab (también conocido como SIMULECT™), bavituximab, bectumomab (también conocido como LYMPHOSCAN™), belimumab (también conocido como LYMPHO-STAT-B™), bertilimumab, besilesomab, bevacizumab (también conocido como AVASTIN™), biciromab brallobarbital, bivatuzumab mertansina, campath, canakinumab (también conocido como ACZ885), cantuzumab mertansina, capromab (también conocido como PROSTASCINT™), catumaxomab (también conocido como REMOVAB™), cedelizumab (también conocido como CIMZIA™), certolizumab pegol, cetuximab (también conocido como ERBITUX™), clenoliximab, dacetuzumab, dacliximab, daclizumab (también conocido como ZENAPAX™), denosumab (también conocido como AMG 162), detumomab, dorlimomab aritox, dorlixizumab, duntumumab, durimulumab, durmulumab, ecromeximab, eculizumab (también conocido como SOLIRIS™), edobacomab, edrecolomab (también conocido como Mab17-1A, PANOREX™), efalizumab (también conocido como RAPTIVA™), efungumab (también conocido como MYCOGRAB™), elsilimomab, enlimomab pegol, epitumomab cituxetan, efalizumab, epitumomab, epratuzumab, erlizumab, ertumaxomab (también conocido como REXOMUN™), etanercept (también conocido como ENBREL™), etaracizumab (también conocido como etaratuzumab, VITAXIN™, ABEGRIN™), exbivirumab, fanolesomab (también conocido como NEUTROSPEC™), faralimomab, felvizumab, fontolizumab (también conocido como HUZAF™), galiximab, gantenerumab, gavilimomab (también conocido como ABXCBL™), gemtuzumab ozogamicina (también conocido como MYLOTARG™), golimumab (también conocido como CNTO 148), gomiliximab, ibalizumab (también conocido como TNX-355), ibritumomab tiuxetan (también conocido como ZEVALIN™), igovomab, imciromab, infliximab (también conocido como REMICADE™), inolimomab, inotuzumab ozogamicina, ipilimumab (también conocido como MDX-010, MDX-101), iratumumab, keliximab, labetuzumab, lemalesomab, lebrilizumab, lerdelimumab, lexatumumab (también conocido como HGSETR2, ETR2-ST01), lexitumumab, libivirumab, lintuzumab, lucatumumab, lumiliximab, mapatumumab (también conocido como HGSETR1, TRM-1), maslimomab, matuzumab (también conocido como EMD72000), mepolizumab (también conocido como BOSATRIA™), metelimumab, milatuzumab, minretumomab, mitumomab, morolimumab, motavizumab (también conocido como NUMAX™),

muromonab (también conocido como OKT3), nacolomab tafenatox, naptumomab estafenatox, natalizumab (también conocido como TYSABRI™, ANTEGREN™), nebacumab, nerelimomab, nimotuzumab (también conocido como THERACIM hR3™, THERA-CIM-hR3™, THERALOC™), nofetumomab merpentan (también conocido como VERLUMA™), ocrelizumab, odulimomab, ofatumumab, omalizumab (también conocido como XOLAIR™), oregovomab (también conocido como OVAREX™), otelixizumab, pagibaximab, palivizumab (también conocido como SYNAGIS™), panitumumab (también conocido como ABX-EGF, VECTIBIX™), pascolizumab, pemtumomab (también conocido como THERAGYN™), pertuzumab (también conocido como 2C4, OMNITARG™), pexelizumab, pintumomab, priliximab, pritumumab, ranibizumab (también conocido como LUCENTIS™), raxibacumab, regavirumab, reslizumab, rituximab (también conocido como RITUXAN™, MabTHERA™), rovelizumab , ruplizumab, satumomab, sevirumab, sibrotuzumab, siplizumab (también conocido como MEDI-507), sontuzumab, stamulumab (también conocido como MYO-029), sulesomab (también conocido como LEUKOSCAN™), tacatuzumab tetraxetan, tadocizumab, talizumab, taplitumomab paptox, tefibazumab (también conocido como AUREXIS™), telimomab aritox, teneliximab, teplizumab, ticilimumab, tocilizumab (también conocido como ACTEMRA™), toralizumab, tositumomab, trastuzumab (también conocido como HERCEPTIN™), tremelimumab (también conocido como CP-675.206), tucotuzumab celmoleukin, tuvirumab, urtoxazumab, ustekinumab (también conocido como CNTO 1275), vapaliximab, veltuzumab, vepalimomab, visilizumab (también conocido como NUVION™), volociximab (también conocido como M200), votumumab (también conocido como HUMASPECT™), zalutumumab, zanolimumab (también conocido como HuMAXCD4), ziralimumab, zolimomab aritox, daratumumab, elotuxumab, obintunzumab, olaratumab, brentuximab vedotin, afibercept, abatacept, belatacept, afibercept, etanercept, romiplostim, SBT-040 (secuencias enumeradas en el documento US 2017/0158772). En algunas realizaciones, el anticuerpo es rituximab.

Inhibidores de puntos de control

Se contempla el uso de cualquier inhibidor de puntos de control inmunitario adecuado con los inmunoconjugados descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, el inhibidor de puntos de control inmunitario reduce la expresión o actividad de una o más proteínas de puntos de control inmunitario. En otra realización, el inhibidor de puntos de control inmunitario reduce la interacción entre una o más proteínas de puntos de control inmunitario y sus ligandos. En los métodos descritos en la presente memoria también se pueden usar ácidos nucleicos inhibidores que disminuyen la expresión y/o actividad de las moléculas de puntos de control inmunitario.

Los datos de la presente memoria muestran que el inhibidor del punto de control inmunitario Nivolumab, que normalmente es una IgG4, puede modificarse para incluir una Fc de IgG1 y posteriormente convertirse en un inmunoconjugado de la invención. Los datos indican que el inmunoconjugado nivolumab IgG1 sigue siendo muy potente. De forma parecida, cuando la IgG1 NQ Fc del atezolizumab de grado clínico se reemplazó por IgG1, se obtuvieron mejores resultados. (véanse las figuras 97A-97H).

La mayoría de los anticuerpos de punto de control están diseñados para no tener función efectora, ya que no intentan matar células, sino bloquear la señalización. Los inmunoconjugados de la presente invención pueden volver a añadir la "funcionalidad efectora" necesaria para activar la inmunidad mieloide. Así pues, para la mayoría de los inhibidores de anticuerpos de punto de control, esta detección será fundamental.

En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es el antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA4, también conocido como CD152), un inmunorreceptor de células T con dominios Ig e ITIM (TIGIT), una proteína relacionada con TNFR inducida por glucocorticoides (GITR, también conocida como TNFRSF18), coestimulador de células T inducible (ICOS, también conocido como CD278), CD96, relacionado con el receptor de poliovirus 2 (PVRL2, también conocido como CD112R, proteína de muerte celular programada 1 (PD-1, también conocida como CD279), ligando 1 de muerte celular programada 1 (PD-L1, también conocido como B7-H3 y CD274), ligando 2 de muerte celular programada (PD-L2, también conocido como B7-DC y CD273), gen de activación de linfocitos 3 (LAG-3, también conocido como CD223), B7-H4, receptor de inmunoglobulina asesina (KIR), elemento 4 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFRSF4, también conocido como OX40 y CD134) y su ligando OX40L (CD252), indoleamina 2,3-dioxigenasa 1 (IDO-1), indoleamina 2,3-dioxigenasa 2 (IDO-2), molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario 1 (CEACAM1), atenuador de linfocitos B y T (BTLA, también conocido como CD272), proteína de membrana de células T 3 (TIM3) , el receptor de adenosina A2A (A2Ar) y el supresor del dominio V de la Ig en la activación de células T (proteína VISTA). En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un inhibidor de CTLA4, PD-1 o PD-L1.

En algunas realizaciones, el anticuerpo se selecciona de: ipilimumab (también conocido como Yervoy®) pembrolizumab (también conocido como Keytruda®), nivolumab (también conocido como Opdivo®), atezolizumab (también conocido como Tecentrig®), avelumab (también conocido como Bavencio®) y durvalumab (también conocido como Imfinzi™). En algunas realizaciones, el anticuerpo se selecciona de: ipilimumab (también conocido como Yervoy®), pembrolizumab (también conocido como Keytruda®), nivolumab (también conocido como Opdivo®) y atezolizumab (también conocido como Tecentrig®).

En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un inhibidor de CTLA4. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo contra CTLA4. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo monoclonal contra CTLA4. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo humano o humanizado contra CTLA4.

En algunas realizaciones, el inhibidor de puntos de control inmunitario reduce la expresión o actividad de una o más proteínas de puntos de control inmunitario, tales como CTLA4.

En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un inhibidor de PD-1. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo contra PD-1. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo monoclonal contra PD-1. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo humano o humanizado contra PD-1. En algunas realizaciones, el inhibidor de puntos de control inmunitario reduce la expresión o actividad de una o más proteínas de puntos de control inmunitario, tales como PD-1.

En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un inhibidor de PD-L1. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo contra PD-L1. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo monoclonal contra PD-L1. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo humano o humanizado contra PD-L1. En algunas realizaciones, el inhibidor de puntos de control inmunitario reduce la expresión o actividad de una o más proteínas de puntos de control inmunitario, tales como PD-L1. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario reduce la interacción entre PD-1 y PD-L1.

En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un inhibidor de PD-L2. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo contra PD-L2. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo monoclonal contra PD L2. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo humano o humanizado contra PD-L2. En algunas realizaciones, el inhibidor de puntos de control inmunitario reduce la expresión o actividad de una o más proteínas de puntos de control inmunitario, tales como PD-L2. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario reduce la interacción entre PD-1 y PD-L2.

En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un inhibidor de LAG-3. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo contra LAG-3. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo monoclonal contra LAG-3. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo humano o humanizado contra LAG-3. En algunas realizaciones, el inhibidor de puntos de control inmunitario reduce la expresión o actividad de una o más proteínas de puntos de control inmunitario, tales como LAG-3.

En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un inhibidor de B7-H4. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo contra B7-H4. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo monoclonal contra B7-H4. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo humano o humanizado contra B7-H4. En algunas realizaciones, el inhibidor de puntos de control inmunitario reduce la expresión o actividad de una o más proteínas de puntos de control inmunitario, tales como B7-H4.

En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un inhibidor de KIR. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo contra KIR. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo monoclonal contra KIR. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo humano o humanizado contra KIR. En algunas realizaciones, el inhibidor de puntos de control inmunitario reduce la expresión o actividad de una o más proteínas de puntos de control inmunitario, tales como KIR.

En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un inhibidor de TNFRSF4. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo contra TNFRSF4. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo monoclonal contra TNFRSF4. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo humano o humanizado contra TNFRSF4. En algunas realizaciones, el inhibidor de puntos de control inmunitario reduce la expresión o actividad de una o más proteínas de puntos de control inmunitario, tales como TNFRSF4.

En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un inhibidor de OX40L. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo contra OX40L. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo monoclonal contra OX40L. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo humano o humanizado contra OX40L. En algunas realizaciones, el inhibidor de puntos de control inmunitario reduce la expresión o actividad de una o más proteínas de puntos de control inmunitario, tales como OX40L. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario reduce la interacción entre TNFRSF4 y OX40L.

En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un inhibidor de IDO-1. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo contra IDO-1. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo monoclonal contra IDO-1. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo humano o humanizado contra IDO-1. En algunas realizaciones, el inhibidor de puntos de control inmunitario reduce la expresión o actividad de una o más proteínas de puntos de control inmunitario, tales como IDO-1.

En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un inhibidor de IDO-2. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo contra IDO-2. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo monoclonal contra IDO-2. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo humano o humanizado contra IDO-2. En algunas realizaciones, el inhibidor de puntos de control inmunitario reduce la expresión o actividad de una o más proteínas de puntos de control inmunitario, tales como IDO-2.

En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un inhibidor de CEACAM1. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo contra CEACAM1. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo monoclonal contra CEACAM1. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo humano o humanizado contra CEACAM1. En algunas realizaciones, el inhibidor de puntos de control inmunitario reduce la expresión o actividad de una o más proteínas de puntos de control inmunitario, tales como CEACAM1.

En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un inhibidor de BTLA. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo contra BTLA. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo monoclonal contra BTLA. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo humano o humanizado contra BTLA. En algunas realizaciones, el inhibidor de puntos de control inmunitario reduce la expresión o actividad de una o más proteínas de puntos de control inmunitario, tales como BTLA.

En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un inhibidor de TIM3. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo contra TIM3. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo monoclonal contra TIM3. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo humano o humanizado contra TIM3. En algunas realizaciones, el inhibidor de puntos de control inmunitario reduce la expresión o actividad de una o más proteínas de puntos de control inmunitario, tales como TIM3.

En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un inhibidor de A2Ar. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo contra A2Ar. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo monoclonal contra A2Ar. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo humano o humanizado contra A2Ar. En algunas realizaciones, el inhibidor de puntos de control inmunitario reduce la expresión o actividad de una o más proteínas de puntos de control inmunitario, tales como A2Ar.

En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un inhibidor de la proteína VISTA. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo contra la proteína VISTA. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo monoclonal contra la proteína VISTA. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo humano o humanizado contra la proteína VISTA. En algunas realizaciones, el inhibidor de puntos de control inmunitario reduce la expresión o actividad de una o más proteínas de puntos de control inmunitario, tales como la proteína VISTA.

Biosimilares

Los inmunoconjugados de la presente invención también son eficaces con constructos de anticuerpos que son muy similares, o biosimilares, a los constructos de anticuerpos "innovadores" o disponibles comercialmente. Por ejemplo, se usaron anticuerpos biosimilares contra cetuximab, rituximab y trastuzumab en varios inmunoconjugados satisfactorios como se describe en la presente memoria y se observa en las figuras 71A-71AQ. Los inmunoconjugados biosimilares desencadenaron la activación mieloide con la misma eficacia que los anticuerpos disponibles comercialmente. A partir de estos estudios, se espera que los inmunoconjugados biosimilares funcionen de forma parecida a los inmunoconjugados de los productos innovadores.

Proporciones de DAR

Los inmunoconjugados de la presente invención proporcionan proporciones de DAR que son deseables. Como se muestra en las figuras 84A-87C, los inmunoconjugados según se describen en la presente memoria tienen proporciones de DAR de 0.7, 1.6 y 2.5.

Los inmunoconjugados mostrados con proporciones de DAR variables fueron todos eficaces a la hora de activar las células mieloides y desencadenar la secreción de citocinas. Los datos indican que los inmunoconjugados con proporciones de DAR variables fueron todos superiores a la hora de provocar la activación de APC, ya que la CD40, CD86 y HLA-DR se expresaron en niveles más altos en las APC estimuladas con inmunoconjugados en comparación con aquellas estimuladas solo con el anticuerpo. Los inmunoconjugados con diferentes DAR indujeron sistemáticamente la regulación por disminución de CD14 y CD16 y una mayor expresión de CD123, en comparación con el anticuerpo solo. A partir de estos estudios, se espera que todas las proporciones de DAR sean eficaces a la hora de provocar la activación de las células mieloides.

Modificación del isotipo

Los datos de la presente memoria muestran (véanse las figuras 88C-88H) que cuando la región Fc de IgG1 del anticuerpo, tal como rituximab, se intercambia por IgG1 AF, IgG1 NQ, IgG2, IgG3, IgG4 o IgA2, y luego se forma en un inmunoconjugado de la presente invención, la actividad del inmunoconjugado puede modularse y, a menudo, mejorarse, para la aplicación deseada.

Alrededor del 30 % de la IgG humana está glicosilada dentro de la región Fab, y el anticuerpo en los inmunoconjugados de la invención puede contener una región Fab genomanipulada con un patrón de glicosilación que no existe de manera natural. Por ejemplo, las hibridomas pueden manipularse genéticamente para secretar mAb afucosilado, mAb desialilado o Fc desglicosilado con mutaciones específicas que permiten una mayor unión a FcRγIIIa y una mayor función efectora.

Los anticuerpos para formar inmunoconjugados pueden contener residuos de cisteína genomanipulados (es decir, que no existen de manera natural) caracterizados por una reactividad alterada (p. ej., mejorada) hacia los reactivos usados para unir de forma covalente los adyuvantes a los anticuerpos. En determinadas realizaciones, un residuo de cisteína genomanipulado tendrá un valor de reactividad del tiol en el intervalo de 0.6 a 1.0. En muchos casos, el anticuerpo genomanipulado será más reactivo que el anticuerpo original.

En general, los residuos genomanipulados son residuos "libres" de cisteína que no forman parte de puentes disulfuro. El término "valor de reactividad del tiol" es una caracterización cuantitativa de la reactividad de los aminoácidos libres de cisteína. Tal como se usa en la presente memoria, el término "valor de reactividad del tiol" se refiere al porcentaje de un aminoácido libre de cisteína en un anticuerpo genomanipulado que reacciona con un reactivo tiol-reactivo y se convierte a un valor máximo de 1. Por ejemplo, un residuo de cisteína en un anticuerpo genomanipulado que reacciona con un rendimiento del 100 % con un reactivo tiol-reactivo, como una maleimida, para formar un anticuerpo modificado tiene un valor de reactividad con tiol de 1.0. Otro residuo de cisteína modificado genéticamente en el mismo anticuerpo original o en uno diferente que reacciona con un rendimiento del 80 % con un reactivo tiol-reactivo tiene un valor de reactividad del tiol de 0.8. La determinación del valor de reactividad del tiol de un residuo de cisteína concreto se puede realizar mediante ensayo ELISA, espectroscopía de masas, cromatografía de líquidos, autorradiografía u otras pruebas analíticas cuantitativas.

Los residuos de cisteína genomanipulados pueden ubicarse en las cadenas pesadas del anticuerpo o en las cadenas ligeras del anticuerpo. En determinadas realizaciones, los residuos de cisteína genomanipulados se localizan en la región Fc de las cadenas pesadas. Por ejemplo, residuos de aminoácidos en las posiciones L-15, L-43, L-110, L-144, L-168 en las cadenas ligeras de un anticuerpo o H-40, H-88, H-119, H-121, H-122, H-175 y H-179 en las cadenas pesadas de un anticuerpo se pueden reemplazar por residuos de cisteína. Los intervalos alrededor de 5 residuos de aminoácidos a cada lado de estas posiciones también se pueden reemplazar por residuos de cisteína, es decir, L-10 a L-20; L-38 a L-48; L-105 a L-115; L-139 a L-149; L-163 a L-173; H-35 a H-45; H-83 a H-93; H-114 a H-127; y H-170 a H-184, así como los intervalos en la región Fc seleccionada de H-268 a H-291; H-319 a H-344; H-370 a H-380; y H-395 a H-405, obteniéndose anticuerpos con cisteína genomanipulados útiles para formar inmunoconjugados. Otros anticuerpos diseñados se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses 7.855.275; 8.309.300 y 9.000.130.

Además de los anticuerpos, se pueden utilizar estructuras de proteínas alternativas como parte de los inmunoconjugados. El término "estructura de proteína alternativa" se refiere a una proteína o péptido no derivado de la inmunoglobulina. Dichas proteínas y péptidos en general son susceptibles a ser manipuladas genéticamente y pueden diseñarse para conferir monoespecificidad contra un antígeno determinado, biespecificidad o multiespecificidad. La manipulación genética de una estructura de proteína alternativa se puede llevar a cabo a partir de varios planteamientos. Se puede utilizar un planteamiento de injerto en bucle en el que se injertan secuencias de especificidad conocida en un bucle variable de una estructura. La aleatorización de secuencias y la mutagénesis se pueden utilizar para desarrollar una biblioteca de mutantes, que se pueden seleccionar utilizando diversas plataformas de presentación (p. ej., presentación en fagos) para identificar un nuevo aglutinante. La mutagénesis específica del sitio también se puede utilizar como parte de un planteamiento parecido. Existen estructuras de proteínas alternativas en una variedad de tamaños, que oscilan entre pequeños péptidos con una estructura secundaria mínima hasta proteínas grandes de tamaño parecido a un anticuerpo de tamaño completo. Los ejemplos de estructuras incluyen, pero no se limitan a, miniproteínas anudadas con cistina (también conocidas como knottinas), miniproteínas anudadas con cistina cíclica (también conocidas como ciclótidas), avímeros, aficuerpos, el décimo dominio tipo III de la fibronectina humana, DARPins (repeticiones de anquirina diseñadas) y anticalinas (también conocidas como lipocalinas). También se pueden manipular genéticamente ligandos que existen de manera natural con especificidad conocida para conferir una nueva especificidad contra una diana determinada. Ejemplos de ligandos que existen de manera natural que pueden manipularse genéticamente incluyen el ligando de EGF y el ligando de VEGF. Las proteínas genomanipuladas pueden producirse como proteínas monoméricas o como multímeros, dependiendo de la estrategia de unión y las especificidades deseadas. Se pueden utilizar estrategias de manipulación genética de proteínas para fusionar estructuras de proteínas alternativas a dominios Fc.

Preparación de conjugados de adyuvantes de anticuerpos

Las reacciones para formar los inmunoconjugados de la invención se llevan a cabo en condiciones suficientes para unir de forma covalente el adyuvante al anticuerpo. En general, las reacciones se llevan a cabo poniendo en contacto un anticuerpo con un compuesto enlazador-adyuvante de modo que una cadena lateral de aminoácido

en el anticuerpo reacciona con el compuesto enlazador-adyuvante. En algunas realizaciones, el compuesto enlazador-adyuvante y el anticuerpo se usan en cantidades aproximadamente equimolares al formar los inmunoconjugados. En algunas realizaciones, se usa un exceso del compuesto enlazador-adyuvante al formar los inmunoconjugados. Por ejemplo, una mezcla de reacción para formar un inmunoconjugado puede contener de aproximadamente 1.1 a aproximadamente 50 equivalentes molares del compuesto adyuvante-enlazador en relación con el anticuerpo.

Las reacciones se pueden llevar a cabo a cualquier temperatura adecuada. En general, las reacciones se llevan a cabo a una temperatura de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 40 °C. Las reacciones se pueden llevar a cabo, por ejemplo, a aproximadamente 25 °C o aproximadamente 37 °C. Las reacciones se pueden llevar a cabo a cualquier pH adecuado. En general, las reacciones se llevan a cabo a un pH de aproximadamente 4.5 a aproximadamente 10. Las reacciones se pueden llevar a cabo, por ejemplo, a un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 9. En algunas realizaciones, la reacción se lleva a cabo a un pH casi neutro (es decir, alrededor de pH 7). En algunas realizaciones, la reacción se lleva a cabo a un pH que oscila entre 7.2 y 7.5. Las reacciones se pueden llevar a cabo durante cualquier período de tiempo adecuado. En general, las mezclas de reacción se incuban en las condiciones adecuadas durante entre aproximadamente 1 minuto y varias horas. Las reacciones se pueden llevar a cabo, por ejemplo, durante aproximadamente 1 minuto, o aproximadamente 5 minutos, o aproximadamente 10 minutos, o aproximadamente 30 minutos, o aproximadamente 1 hora, o aproximadamente 2 horas, o aproximadamente 4 horas, o aproximadamente 8 horas, o aproximadamente 12 horas, o aproximadamente 24 horas, o aproximadamente 48 horas, o aproximadamente 72 horas. Se pueden emplear otras condiciones de reacción en los métodos descritos en la presente memoria, dependiendo de la identidad del anticuerpo en el conjugado y el reactivo utilizado para instalar el adyuvante.

Las mezclas de reacción para formar los conjugados de adyuvante de anticuerpo pueden contener reactivos adicionales del tipo utilizado típicamente en reacciones de bioconjugación. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, las mezclas de reacción pueden contener tampones (p. ej., ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1il]etanosulfónico (HEPES), ácido 3-morfolinopropano-1-sulfónico (MOPS), fosfato de potasio, fosfato de sodio, solución salina tamponada con fosfato, citrato de sodio, acetato de sodio y borato de sodio), cosolventes (p. ej., dimetilsulfóxido, dimetilformamida, etanol, metanol, tetrahidrofurano, acetona y ácido acético), sales (p. ej., NaCl, KCl, $CaCl_2$ y sales de Mn^{2+} y Mg^{2+}), detergentes/tensioactivos (p. ej., un tensioactivo no iónico tal como *N,N*-bis[3-(D-gluconamido)propil]colamida, polioxietileno (20) cetil éter, óxido de dimetildecilfosfina, octilfenoxi poli(etilenoxi)etanol ramificado, un copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno, *t*-octilfenoxipolietoxietanol, monooleato de polioxietileno (20) sorbitán y similares; un tensioactivo aniónico tal como colato de sodio, *N*-lauroilsarcosina, dodecilsulfato de sodio y similares; un tensioactivo catiónico tal como bromuro de hexadeciltrimetilamonio, bromuro de trimetil(tetradecil)amonio y similares; o un tensioactivo zwitteriónico tal como amidosulfobetaína, 3-[(3-colamidopropil)dimetil-amonio]-1-propanosulfonato y similares), quelantes (p. ej., etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-*N,N,N',N'*-ácido tetraacético (EGTA), ácido 2-({2-[bis(carboximetil)amino]etil} (carboximetil)amino)acético (EDTA) y ácido 1,2-bis(o-aminofenoxi)etano-*N,N,N',N'*-tetraacético (BAPTA)) y agentes reductores (p. ej., ditiotreitol (DTT), β-mercaptoetanol (BME) y tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP)). Se pueden usar tampones, codisolventes, sales, detergentes/tensioactivos, quelantes y agentes reductores en cualquier concentración adecuada, que un experto en la materia puede determinar fácilmente. En general, se incluyen tampones, codisolventes, sales, detergentes/tensioactivos, quelantes y agentes reductores en las mezclas de reacción en concentraciones que oscilan entre aproximadamente 1 µM y aproximadamente 1 M. Por ejemplo, se puede incluir un tampón, un codisolvente, una sal, un detergente/tensioactivo, un quelante o un agente reductor en una mezcla de reacción a una concentración de aproximadamente 1 µM, o aproximadamente 10 µM, o aproximadamente 100 µM, o aproximadamente 1 mM, o aproximadamente 10 mM, o aproximadamente 25 mM, o aproximadamente 50 mM, o aproximadamente 100 mM, o aproximadamente 250 mM, o aproximadamente 500 mM, o aproximadamente 1 M.

Formulación y administración de inmunoconjugados

En un aspecto relacionado, la invención proporciona una composición que comprende una pluralidad de inmunoconjugados como se define en las reivindicaciones adjuntas. En algunas realizaciones, el número promedio de adyuvantes por inmunoconjugado oscila entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10. El número promedio de adyuvantes por inmunoconjugado puede oscilar, por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 6, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 4. El número promedio de adyuvantes por inmunoconjugado puede ser aproximadamente 0.8, 1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2, 2.2, 2.4, 2.6, 2.8, 3, 3.2, 3.4, 3.6, 3.8, 4.0 o 4.2. En algunas realizaciones, el número promedio de adyuvantes por inmunoconjugado es de aproximadamente 4. En algunas realizaciones, el número promedio de adyuvantes por inmunoconjugado es de aproximadamente 2. En algunos casos, el anticuerpo está unido de forma covalente a un único adyuvante. En algunos casos, el anticuerpo está unido de forma covalente a 2 o más adyuvantes (p. ej., 3 o más, 4 o más, o 5 o más adyuvantes). En algunos casos, el anticuerpo está unido de forma covalente a 1-10 adyuvantes (p. ej., 1-8, 1-5, 1-3, 2-10, 2-8, 2-5, 2-3 o 3-8 adyuvantes). En algunos casos, el anticuerpo está unido de forma covalente a 2-10 adyuvantes (p. ej., 2-8, 2-5, 2-3, o 3-10, o 3-8 adyuvantes). En algunos casos, en los que el anticuerpo está unido de forma covalente a más de un adyuvante, los adyuvantes unidos pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, en algunos casos dos o más adyuvantes pueden ser iguales (p. ej., dos moléculas diferentes del mismo adyuvante pueden unirse cada una al anticuerpo en un sitio diferente del anticuerpo). En algunos casos, el anticuerpo está unido de forma covalente a 2 o más adyuvantes diferentes (p. ej., 3 o más, 4 o

más, o 5 o más adyuvantes diferentes). Por ejemplo, cuando se genera un inmunoconjugado de la invención, se pueden poner en contacto uno o más anticuerpos con una mezcla que incluye dos o más (p. ej., 3 o más, 4 o más, o 5 o más) compuestos enlazador-adyuvante diferentes de modo que las cadenas laterales de aminoácidos en el uno o más anticuerpos reaccionan con los compuestos enlazador-adyuvante, lo que da como resultado uno o más inmunoconjugados, cada uno de los cuales está unido de forma covalente a dos o más adyuvantes diferentes.

La conjugación de anticuerpos específicos del sitio permite la colocación exacta del adyuvante en el anticuerpo y un DAR homogéneo en comparación con el producto de conjugación heterogéneo resultante de la unión a residuos de lisina en el anticuerpo. Se pueden generar inmunoconjugados específicos del sitio mediante diversas modificaciones del anticuerpo. Los métodos para la conjugación específica del sitio incluyen los métodos siguientes, pero no se limitan a los métodos descritos en la presente memoria. Un método para la conjugación específica del sitio implica la incorporación de una secuencia que luego es reconocida por una enzima, lo que resulta en una modificación química. Por ejemplo, la enzima FGE reconoce la secuencia Cys-X-Pro-X-Arg. La coexpresión del anticuerpo modificado junto con FGE en cultivo de mamíferos genera un anticuerpo que contiene una etiqueta de aldehído en el(los) sitio(s) genomanipulado(s). Se pueden usar otras enzimas que reconozcan secuencias o residuos naturales para su conversión en grupos químicamente reactivos que permitan la conjugación específica del sitio. Las transglutaminasas bacterianas (BTG) pueden catalizar la formación de enlaces entre residuos de glutamina y aminas primarias; la enzima bacteriana sortasa A puede catalizar reacciones de transpeptidación a través de un motivo de reconocimiento. También se pueden incorporar aminoácidos no naturales en la secuencia del anticuerpo que luego se pueden hacer reaccionar para generar conjugados específicos del sitio. Los residuos naturales, tal como el aminoácido selenocisteína, pueden incorporarse al anticuerpo y posteriormente hacerse reaccionar con los grupos reactivos apropiados que incluyen, pero no se limitan a, maleimidas y yodoacetamidas para la conjugación específica del sitio. Otro método es la incorporación de residuos de cisteína genomanipulados que se añaden a la cadena pesada o ligera del constructo del anticuerpo. Los vectores que codifican las cadenas pesada y/o ligera se modifican para incorporar la secuencia de codones para un residuo de cisteína (secuencia del vector en las figuras 138A-138B y mapa de vectores en las figuras 138C-138D). La conjugación se realiza reduciendo primero el anticuerpo y luego reoxidándolo para regenerar las uniones disulfuro nativas del anticuerpo, lo que da como resultado el descubrimiento de un tiol reactivo. Una vez que reacciona con el adyuvante-enlazador, el producto resultante contiene una población homogénea de inmunoconjugado con un DAR definido por el número de residuos de cisteína genomanipulados en el anticuerpo (estructura que se muestra en la figura 138E). Por ejemplo, la incorporación de una mutación en la cadena ligera en la posición 205 de una valina a cisteína (mutación V205C) da como resultado un producto con el adyuvante conjugado en los sitios definidos (V205C; figuras 138F-138G).

En algunas realizaciones, la composición comprende además uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, los inmunoconjugados de la invención se pueden formular para la administración parenteral, tal como administración intravenosa (IV) o administración en una cavidad corporal o lumen de un órgano. De forma alternativa, los inmunoconjugados pueden inyectarse intratumoralmente. Las formulaciones para inyección comprenderán habitualmente una solución del inmunoconjugado disuelta en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear se encuentran el agua y la solución de Ringer, un cloruro de sodio isotónico. Además, convencionalmente se pueden emplear aceites fijos estériles como disolvente o medio de suspensión. Con esta finalidad, se puede emplear cualquier aceite fijo suave, incluidos monoglicéridos o diglicéridos sintéticos. Además, también se pueden utilizar ácidos grasos tal como el ácido oleico en la preparación de inyectables. Estas soluciones son estériles y en general están libres de materias indeseables. Estas formulaciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales y bien conocidas. Las formulaciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según sea necesario para aproximarse a las condiciones fisiológicas tales como agentes reguladores y tamponadores del pH, agentes reguladores de la toxicidad, p. ej., acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio y similares. La concentración del inmunoconjugado en estas formulaciones puede variar ampliamente y se seleccionará principalmente en función de los volúmenes de fluido, viscosidades, peso corporal y similares, según el modo particular de administración seleccionado y las necesidades del paciente. En determinadas realizaciones, la concentración de un inmunoconjugado en una formulación en solución para inyección oscilará entre aproximadamente el 0.1 % (p/p) y aproximadamente el 10 % (p/p).

En otro aspecto, la invención proporciona un inmunoconjugado como se define en las reivindicaciones adjuntas o una composición como se define en las reivindicaciones adjuntas para su uso en el tratamiento del cáncer. El tratamiento incluye comprender administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del inmunoconjugado (p. ej., como una composición como se define en las reivindicaciones adjuntas) a un sujeto que lo necesita. Por ejemplo, el tratamiento puede incluir la administración del inmunoconjugado obteniéndose una dosis de aproximadamente 100 ng/kg a aproximadamente 50 mg/kg al sujeto. La dosis de inmunoconjugado puede oscilar entre aproximadamente 5 mg/kg y aproximadamente 50 mg/kg, entre aproximadamente 10 µg/kg y aproximadamente 5 mg/kg, o entre aproximadamente 100 µg/kg y aproximadamente 1 mg/kg. La dosis de inmunoconjugado puede ser de aproximadamente 100, 200, 300, 400 o 500 µg/kg. La dosis de inmunoconjugado puede ser de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mg/kg. La dosis de inmunoconjugado también puede estar fuera de estos intervalos, dependiendo del conjugado en particular así como del tipo y gravedad del cáncer que se está tratando. La frecuencia de administración puede oscilar desde una dosis única hasta múltiples dosis por semana o con más frecuencia. En algunas realizaciones, el inmunoconjugado se administra de aproximadamente una vez al mes a aproximadamente cinco veces por semana. En algunas realizaciones, el inmunoconjugado se administra

una vez por semana.

Algunas realizaciones de la invención proporcionan el inmunoconjugado o la composición para su uso en el tratamiento del cáncer como se describe anteriormente, en el que el cáncer es un cáncer de cabeza y cuello. El cáncer de cabeza y cuello (así como el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello) se refiere a una variedad de cánceres caracterizados por carcinomas de células escamosas de la cavidad oral, faringe y laringe, glándulas salivales, senos paranasales y cavidad nasal, así como de los ganglios linfáticos de la parte superior del cuello. Los cánceres de cabeza y cuello representan aproximadamente del 3 al 5 por ciento de todos los cánceres en los Estados Unidos. Estos cánceres son más comunes en hombres y en personas mayores de 50 años. El consumo de tabaco (incluido el tabaco sin humo) y alcohol son los factores de riesgo más importantes en el cáncer de cabeza y cuello, en particular los de cavidad oral, orofaringe, hipofaringe y laringe. El ochenta y cinco por ciento de los cánceres de cabeza y cuello están relacionados con el consumo de tabaco. En realizaciones de la invención, los inmunoconjugados se pueden usar para atacar varias células malignas. Por ejemplo, los inmunoconjugados pueden usarse para dirigirse a células epiteliales escamosas del labio, cavidad oral, faringe, laringe, cavidad nasal o senos paranasales. Los inmunoconjugados se pueden usar para atacar células de carcinoma mucoepidermoide, células de carcinoma adenoide quístico, células de adenocarcinoma, células cancerosas indiferenciadas de células pequeñas, células de estesioneuroblastoma, células de linfoma de Hodgkin y células de linfoma no hodgkiniano. En algunas realizaciones, los usos para tratar el cáncer de cabeza y cuello incluyen la administración de un inmunoconjugado que contiene un anticuerpo que es capaz de unirse a EGFR (p. ej., cetuximab, panitumumab, matuzumab y zalutumumab), PD-1 (p. ej., pembrolizumab) y/o MUC1.

Algunas realizaciones de la invención proporcionan el inmunoconjugado o la composición para su uso en el tratamiento del cáncer como se describe anteriormente, en el que el cáncer es cáncer de mama. El cáncer de mama puede originarse en diferentes áreas de la mama y se han caracterizado varios tipos diferentes de cáncer de mama. Por ejemplo, los inmunoconjugados de la invención se pueden usar para tratar el carcinoma ductal *in situ*; carcinoma ductal invasivo (p. ej., carcinoma tubular; carcinoma medular; carcinoma mucinoso; carcinoma papilar; o carcinoma cribiforme de mama); carcinoma lobulillar *in situ*; carcinoma lobulillar invasivo; cáncer de mama inflamatorio; y otras formas de cáncer de mama. En algunas realizaciones, los usos para tratar el cáncer de mama incluyen la administración de un inmunoconjugado que contiene un anticuerpo que es capaz de unirse a HER2 (p. ej., trastuzumab, margetuximab), glucoproteína NMB (p. ej., glembatumumab) y/o MUC1.

Ejemplos

Obsérvese que los inmunoconjugados que no se engloban en el alcance de las reivindicaciones no forman parte de la presente invención.

Ejemplo 1. Imidazoquinolinas para la conjugación de anticuerpos

Se sintetizaron compuestos de imidazoquinolina con un grupo amino libre (Compuesto 1) o un grupo maleimida (Compuesto 2) según el esquema 1, lo que permitió la evaluación rápida de la tecnología del enlazador y la eficacia del inmunoconjugado de anticuerpo-adyuvante.

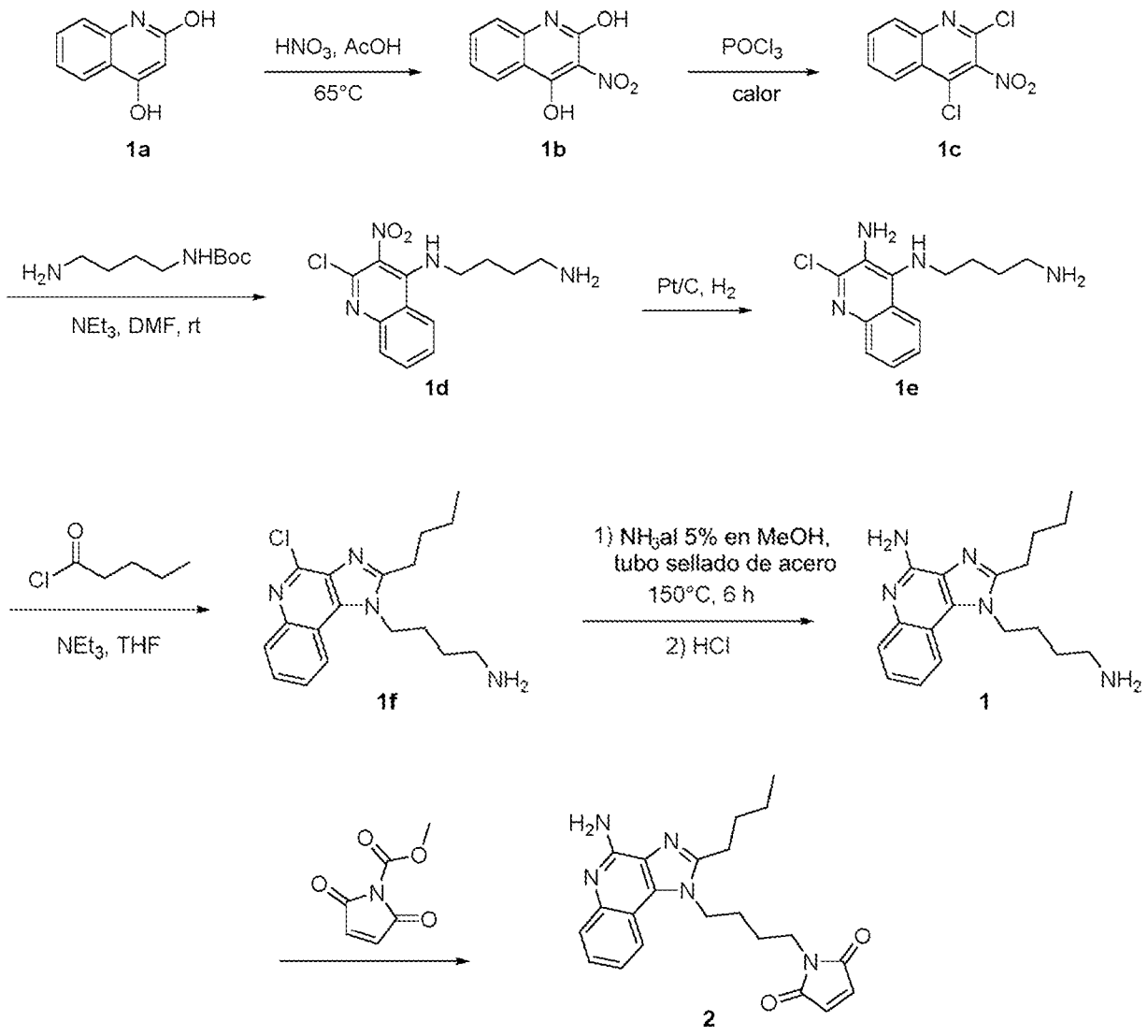
Para determinar si la funcionalización del adyuvante afectaba a la capacidad del compuesto 2 o del compuesto 1 a la hora de provocar la activación inmunitaria, se estimularon células presentadoras de antígeno humano con diluciones seriadas 10 veces de R848, el compuesto 2, el compuesto 1 o un agonista de TLR de control, CL307, durante 18 horas antes del análisis mediante citometría de flujo. Los datos indicaron que el compuesto 2 y el compuesto 1 se comportaron de forma parecida al R848 en cada concentración analizada (figura 4; los datos del compuesto 1 no se muestran).

A continuación, se analizó directamente la capacidad de cada agonista de TLR funcionalizado para activar TLR7 o TLR8 humanos. Las células HEK293 se cotransfectaron con TLR7 o TLR8 humano o TLR7 murino y un gen indicador de fosfatasa alcalina embrionaria secretada inducible bajo el control del promotor mínimo de IFN-β fusionado a los sitios de unión de NF-κB y AP-1. Posteriormente, las células se incubaron con diluciones seriadas al doble de cada uno de los adyuvantes indicados durante 12 horas a 37 °C en presencia de un sustrato de fosfatasa alcalina. La actividad se midió mediante espectrofotometría (DO 650 nm). Los datos indican que el compuesto 1 activó tanto el TLR7 como el TLR8 humanos, mientras que el compuesto 2 era específico para la actividad de TLR7 (figura 2).

De forma parecida, tanto el compuesto 2 como el compuesto 1 activaron el TLR7 murino (figura 2).

Esquema 1

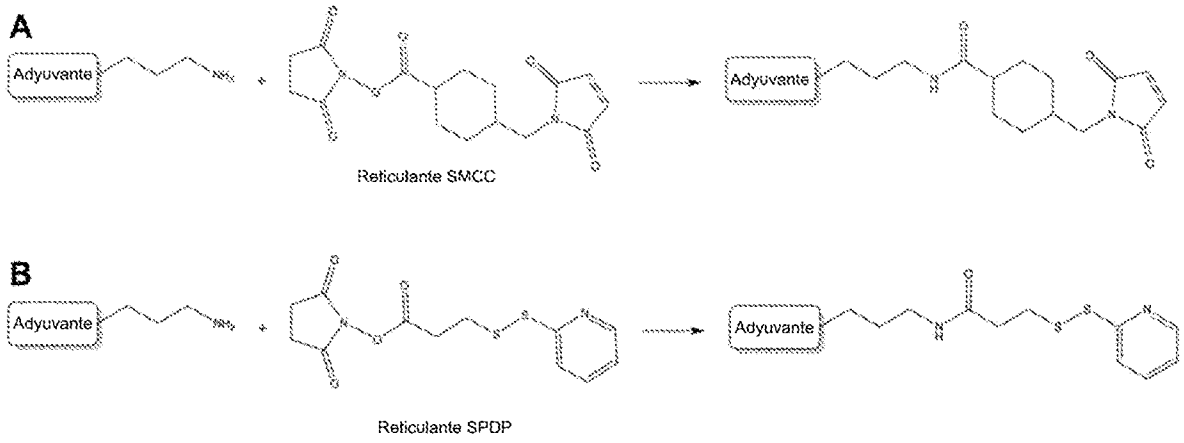
98



Ejemplo 2. Preparación de conjugados de adyuvantes de anticuerpos

El compuesto 1 se modificó con un reticulante no escindible (SMCC, ThermoFisher Scientific) y un reticulante escindible (SPDP, ThermoFisher Scientific) en la preparación para la conjugación con rituximab según el esquema general descrito en el esquema 2A y el esquema 2B.

Esquema 2A y 2B



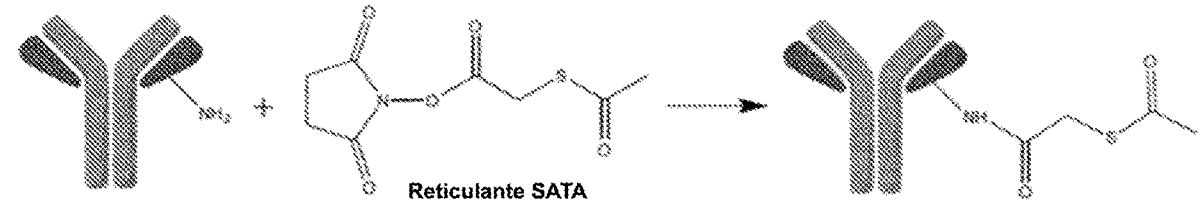
Se conjugaron adyuvantes con una amina libre (R848, el compuesto 1, etc.) con SMCC, SPDP u otros enlazadores que contenían NHS haciendo reaccionar los compuestos en una relación molar de 1:1 en PBS u otros tampones adecuados a pH 7-7.5. Todas las reacciones se protegieron de la luz y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. En la medida de lo posible, los conjugados de adyuvante-reticulante se purificaron mediante cromatografía de líquidos a alta presión (HPLC) de fase inversa. Los conjugados de adyuvante-reticulante se utilizaron de inmediato después de la conjugación, como se describe a continuación.

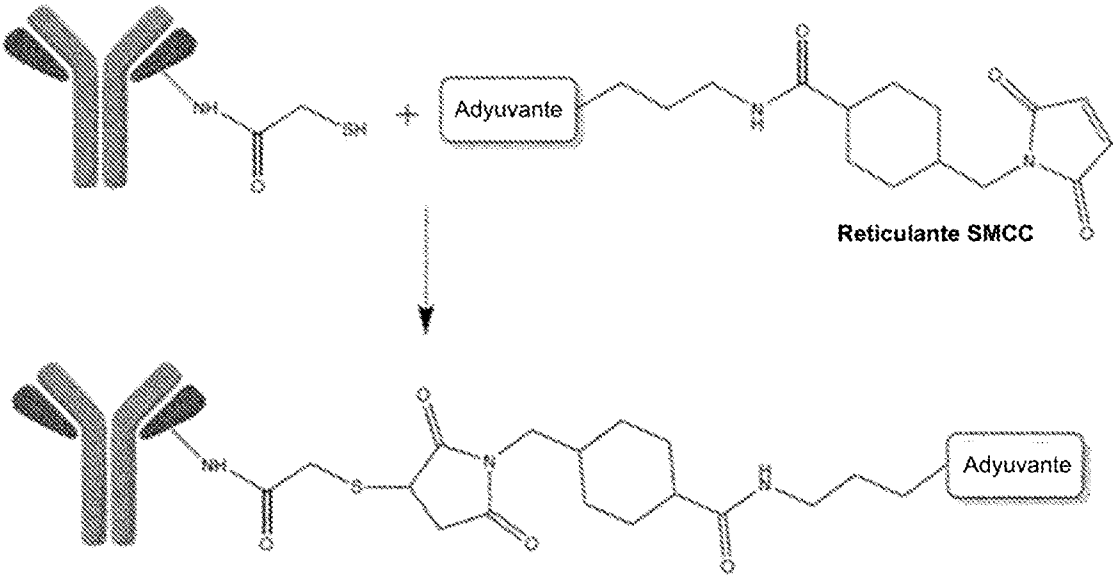
Se desalinizaron las combinaciones de adyuvante-enlazador y se intercambió el tampón en agua desionizada con columnas de desalación Zeba Spin (ThermoFisher Scientific). Posteriormente, las muestras se analizaron en un espectrómetro de masas con cromatógrafo de líquidos de cuadrupolo único Shimadzu LC/MS-2020. Para la detección de compuestos se utilizó un método con un gradiente que oscila entre 0 y el 100 % de acetonitrilo adecuado para la detección de moléculas pequeñas dentro de 100-1000 m/z.

La eficacia de la reacción se evaluó mediante LC-MS e indicó que la mayoría del SMCC libre había reaccionado con el compuesto 1 para formar el compuesto 1-SMCC, que tenía el peso molecular previsto de 531 (figura 3, panel inferior derecho). Se observaron eficacias de reacción parecidas con el compuesto 1-SPDP (no se muestran los datos).

Después de la conjugación satisfactoria del compuesto 1 con los reticulantes, los anticuerpos se modificaron con el reticulante SATA para convertir las aminas libres en el anticuerpo en grupos sulfuidrilo protegidos. Después de la conjugación de SATA, los grupos sulfuridrilo se desacetilaron con hidroxilamina y los tioles expuestos se hicieron reaccionar con el componente maleimida del compuesto adyuvante-SMCC como se muestra en el esquema 3.

Esquema 3





Ab-SATA-SMCC-Adyuvante

El anticuerpo se volvió a suspender en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a 1-5 mg/ml y el reticulante SATA (ThermoFisher Scientific) se volvió a suspender a 70 mM en DMSO anhidro inmediatamente antes de su utilización. El anticuerpo se hizo reaccionar con un exceso molar de 10 veces de SATA a temperatura ambiente durante 30 minutos. El anticuerpo modificado con SATA se purificó del exceso de reactivo y subproductos con 3

lavados en PBS con unidades de filtro centrífugas Amicon Ultra equilibradas con membranas Ultracel-100 según las instrucciones del fabricante (EMD Millipore). El número de reticulantes SATA por anticuerpo se determinó mediante espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF).

El anticuerpo modificado con SATA se desacetiló después de una incubación de 2 horas a temperatura ambiente en PBS a un pH entre 7.2 y 7.5 con hidroxilamina 0.05 M y 2.5 mM de EDTA. Posteriormente, el anticuerpo desacetilado modificado con SATA se purificó del exceso de reactivo y subproductos con 3 lavados en PBS que contenía 5 mM de EDTA con unidades de filtro centrífugas Amicon Ultra equilibradas con membranas Ultracel-100 según las instrucciones del fabricante (EMD Millipore). Posteriormente, el anticuerpo modificado con SATA desacetilado purificado reaccionó con un exceso molar de 5 a 40 veces de adyuvante-reticulante durante 30 minutos a una hora a temperatura ambiente. El exceso molar exacto fue 10 veces mayor que el número promedio de moléculas SATA por anticuerpo según lo determinado por MALDI-TOF. Después de la conjugación, el inmunoconjugado adyuvante de anticuerpo se purificó del exceso de reactivo y subproductos con 3 lavados en PBS con unidades de filtro centrífugas Amicon Ultra equilibradas con membranas Ultracel-100 según las instrucciones del fabricante (EMD Millipore).

La relación promedio entre el fármaco y el anticuerpo se determinó mediante MALDI-TOF. Las muestras se desalinizaron y se intercambió el tampón utilizando columnas de desalinización Zeba Spin (ThermoFisher Scientific) en agua desionizada. Primero se aplicó matriz (ácido sinapínico) en la placa objetivo de muestra MALDI y se dejó secar. A continuación, la muestra se mezcló en una relación 1:1 con y sin un estándar de albúmina de suero bovino (BSA) (BSA 0.25-1 pM) y se sembró sobre la placa con las muestras de matriz. Una vez secas tanto la matriz como la capa de muestra, las muestras se analizaron en un AB Sciex TOF/TOF 5800 (Universidad de Stanford, Canary Center). Un detector de alta masa (CovalX) con ionización negativa permitió una mayor sensibilidad y resolución de los tamaños de proteínas en el intervalo de un anticuerpo IgG completamente intacto (-150 000 kDa).

Después de la conjugación satisfactoria del inmunoconjugado de anticuerpo-adyuvante (Ab-SATA-SMCC-Adyuvante se muestra en el esquema 3), la relación promedio entre el fármaco y el anticuerpo se determinó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Tabla 1). La diferencia de masa entre el anticuerpo modificado con SATA y el no modificado se utilizó para determinar cuántos enlazadores estaban presentes por anticuerpo. La diferencia de masa entre el anticuerpo modificado con SATA y los inmunoconjugados se utilizó para determinar la relación promedio entre el fármaco y el anticuerpo (DAR).

Tabla 1. Determinación de la relación entre el fármaco y el anticuerpo basada en MALDI-TOF MS.

Muestra	Peso molecular (Da)	Diferencia de masa (Da)	Modificación Ab
Anticuerpo	145 772	-	-
Anticuerpo-SATA	146 210	438	3.77 Enlazadores/Ab
Anticuerpo-SATA-SPDP-compuesto 1	146 944	1172	2.07 Fármacos/Ab
Anticuerpo-SATA-SMCC-compuesto 1	147 309	1 537	2.07 Fármacos/Ab

Ejemplo 3. Evaluación de la actividad de conjugados de adyuvantes de anticuerpos *in vitro*

Aislamiento de células presentadoras de antígeno humano. Se seleccionaron negativamente células presentadoras de antígenos (APC) humanas a partir de células mononucleares de sangre periférica humana obtenidas a partir de donantes de sangre sanos (Stanford Blood Center) mediante centrifugación en gradiente de densidad usando un cóctel de enriquecimiento de monocitos humanos RosetteSep (Stem Cell Technologies) que contenía anticuerpos monoclonales contra CD2, CD3, CD8, CD19, CD56, CD66b y CD235a. Posteriormente, las APC inmaduras se purificaron con una pureza > 97 % mediante selección negativa utilizando un kit de enriquecimiento de monocitos humanos EasySep sin agotamiento de CD16 que contenía anticuerpos monoclonales contra CD2, CD3, CD19, CD20, CD56, CD66b, CD123 y CD235a.

Preparación de las células tumorales. Las células tumorales se volvieron a suspender en PBS con suero fetal bovino (FBS) al 0.1 % de 1 a 10 x 10^6 células/ml. Posteriormente, las células se incubaron con 2 µM de CFSE para producir una concentración final de 1 µM. La reacción finalizó después de 2 minutos mediante la adición de 10 mL de medio completo con FBS al 10 % y se lavó una vez con el medio completo. Las células se fijaron en paraformaldehído al 2 % y se lavaron tres veces con PBS o se dejaron sin fijar antes de congelar las células en DMSO al 10 %, FBS al 20 % y medio al 70 %.

Cocultivos de APC tumorales. 2 x 10^5 APC se incubaron con o sin 6.5 x 10^5 células tumorales autólogas o

alogénicas marcadas con CFSE en placas de 96 pocillos (Corning) que contenían medio IMDM (Gibco) complementado con suero fetal bovino al 10 %, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio , aminoácidos no esenciales, 2-ME 50 µM y, donde se indica, diversas concentraciones de anticuerpo antitumoral y los adyuvantes indicados. Las células y los sobrenadantes libres de células se analizaron después de 18 horas mediante citometría de flujo.

Resultados. Para determinar la capacidad de los inmunoconjugados a la hora de provocar la activación inmunitaria, se incubaron las APC humanas (~95 % de monocitos) obtenidas a partir de sangre fresca con células de linfoma de células B humanas marcadas con CFSE (Toledo, ATCC) en una relación de 3:1 y diluciones seriadas al doble del compuesto 1, rituximab (Ab), rituximab + compuesto 1 (mezcla) o rituximab-SATA-SMCC-compuesto 1 (conjugado). En estos experimentos, el inmunoconjugado tenía un promedio de 2.1 moléculas del compuesto 1 por anticuerpo y las dosis del compuesto 1 se ajustaron en consecuencia para asegurar que se compararan cantidades equimolares del compuesto 1 en todas las condiciones. Después de 18 horas, se analizó la expresión de los marcadores de activación en las células mediante citometría de flujo. Los datos indican que los inmunoconjugados fueron muy superiores a la hora de provocar la activación de APC, ya que la CD40, CD86 y HLA-DR se expresaron a niveles varias veces mayores en las APC estimuladas con el inmunoconjugado en comparación con aquellas estimuladas con Ab solo, el compuesto 1 solo o la mezcla (figura 4).

Dado el alto nivel de marcadores de activación observado después de la activación del inmunoconjugado, se investigó la expresión de PD-L1, un marcador inhibidor que está altamente correlacionado con el grado de activación de APC. Sorprendentemente, los inmunoconjugados fueron mucho menos potentes a la hora de provocar la regulación por incremento de la expresión de PD-L1 en comparación con el adyuvante solo o la mezcla (figura 5). En particular, la expresión de PD-L1 fue insignificante con un inmunoconjugado de 0.1 µM, que corresponde a la concentración bioactiva máxima (figura 4, figura 5). Estos datos sugieren que el inmunoconjugado puede activar vías de señalización imprevistas en las APC humanas.

En apoyo de esta hipótesis, las células estimuladas con el inmunoconjugado desarrollaron inesperadamente dendritas y experimentaron cambios morfológicos coherentes con la diferenciación de los monocitos en las DC. Este hallazgo impulsó el análisis de las moléculas de superficie asociadas a DC. Coherente con su morfología, las APC estimuladas con el inmunoconjugado, pero no con la mezcla, regularon por disminución la expresión de CD14, CD16 y CD163 de una manera dependiente de la dosis (figura 6). La regulación por disminución de estas moléculas, que se expresan en monocitos y macrófagos, pero que disminuyen considerablemente en las DC derivadas de monocitos, indica que los monocitos humanos expuestos al inmunoconjugado se diferenciaron rápidamente en las DC. Coherente con estos datos, las APC estimuladas con el inmunoconjugado regularon positivamente la expresión de CD123, un marcador de CD inflamatorias humanas derivadas de monocitos (figura 6).

Si bien la expresión de moléculas estimuladoras de células T tales como CD40, CD86 y HLA-DR es necesaria para una activación eficaz de las células T, las APC también influyen en la naturaleza de la respuesta inmunitaria resultante a través de la secreción de citocinas. Por lo tanto, se investigó la capacidad de los inmunoconjugados a la hora de provocar la secreción de citocinas en APC humanas después de la estimulación como se describe anteriormente. Los datos indican que las células diferenciadas con inmunoconjugado secretaron cantidades de IL-1β y TNFα varias veces mayores, mientras que la secreción de la citocina antiinflamatoria IL-10 tendió a disminuir (figura 7).

También se han preparado inmunoconjugados construidos con enlazadores escindibles y se ha descubierto que provocan la activación de APC y la diferenciación de DC *in vitro* (figura 8). Las APC humanas que eran ~95 % de monocitos se estimularon con diluciones seriadas al doble de rituximab-SATA-SPDP-compuesto 1 (conjugado, escindible), rituximab solo (Ab), el compuesto 1 solo o rituximab + compuesto 1 (mezcla) en presencia de células tumorales marcadas con CFSE. El inmunoconjugado - escindible tenía un DAR de 1.4 según lo confirmado por MALDI-TOF. Después de 18 horas, se analizaron las APC humanas CD19- mediante citometría de flujo; n=3.

Ejemplo 4. Evaluación de la eficacia de conjugados de adyuvantes de anticuerpos *in vivo*

En los estudios de tumores, se inyectaron 2×10^5 células de melanoma B16F10 por vía subcutánea (sc) por encima del flanco derecho en ratones C57BL/6. Después de diez días, o cuando los tumores alcanzaron 25 mm^2, a los ratones se les administraron inyecciones intravenosas de 400 µg del inmunoconjugado (anti-GP75-SATA-SMCC-compuesto 1) (DAR= 1.74) o se trataron intratumoralmente con 400 µg del inmunoconjugado (anti-GP75-SATA-SMCC-compuesto 1) o una mezcla de 1.5 µg de compuesto 1 y 400 µg de anti-GP75 (TA99). Los tratamientos posteriores se administraron los días 2 y 4 después del tratamiento inicial. El desarrollo del tumor se midió 2-3 veces por semana con calibradores.

Los ratones tratados con el inmunoconjugado, pero no con la mezcla, redujeron sus tumores (figura 9A). A continuación, se administraron dosis equivalentes de αGP75 inmunoconjugado por vía intratumoral o intravenosa en ratones con tumores establecidos. Sorprendentemente, la administración intravenosa provocó la regresión del tumor, aunque se estima que menos del 10 % del inmunoconjugado alcanzó el tumor (figura 9B).

Los estudios descritos en la presente memoria demuestran que los inmunoconjugados son cuantitativa y cualitativamente más eficaces a la hora de provocar la activación inmunitaria e inmunidad antitumoral que

cantidades equimolares de mezclas de anticuerpos y adyuvantes unidos de forma no covalente. Es poco probable que estos hallazgos sean el resultado de una simple extensión de la vida media sérica del adyuvante después de la conjugación de anticuerpos, porque se observaron profundas alteraciones fenotípicas y una biología novedosa durante cortos períodos de incubación *in vitro* cortos. Estos estudios indican que los monocitos de sangre periférica recién aislados de donantes humanos sanos se someten a una diferenciación de DC después de una estimulación durante la noche con inmunoconjugados, mientras que los protocolos de diferenciación de DC estándar con GM-CSF e IL-4 requieren seis días. Además, las APC humanas activadas por inmunoconjugado expresaron cantidades varias veces mayores de moléculas coestimuladoras y citocinas inflamatorias que las que se pueden lograr con dosis equivalentes de mezclas de anticuerpos y adyuvantes unidos de forma no covalente. Sin embargo, los inmunoconjugados provocan niveles mucho más bajos de moléculas co-estimuladoras negativas tales como PD-L1 y cantidades comparables de IL-10, lo que sugiere que los inmunoconjugados activan vías de señalización imprevistas. Sin quedar vinculado a ninguna teoría particular, se cree que la estimulación con inmunoconjugados se parece mucho a la inmunidad fisiológica mediada por anticuerpos mediante la cual las APC reconocen patógenos opsonizados (anticuerpos unidos a patógenos) con alta afinidad.

Ejemplo 5. Preparación y evaluación de la actividad de conjugados adicionales de adyuvantes de anticuerpos *in vitro*

Preparación de conjugados adicionales de adyuvantes de anticuerpos Se prepararon conjugados de anticuerpo y adyuvante adicionales usando los métodos descritos en los ejemplos 1 y 2. Se utilizaron los anticuerpos pembrolizumab (PD-1), nivolumab (PD-1), atezolizumab (PD-L1) e ipilimumab (CTLA4) para crear los conjugados de anticuerpo y adyuvante con enlazadores SATA-SMCC (véase el esquema 3 anterior).

Después de la conjugación satisfactoria del inmunoconjugado, la relación promedio entre el fármaco y el anticuerpo se determinó mediante LC-MS. El inmunoconjugado primero se desglicosiló utilizando PNGasa F para eliminar los glicanos del anticuerpo y luego se intercambió el tampón del inmunoconjugado a agua desionizada. Los conjugados de adyuvantes de anticuerpos se procesaron en una columna C4 eluida con acetonitrilo/agua en un Waters Xevo G2-XS QTof/Tof. Los datos sin procesar de espectrometría de masas se desconvolucionaron para determinar las proporciones entre fármaco y anticuerpo (DAR). Los datos de LC-MS indicaron una conjugación satisfactoria y unas proporciones de DAR deseables.

Aislamiento de células presentadoras de antígeno humano. Se seleccionaron negativamente células presentadoras de antígenos (APC) humanas a partir de células mononucleares de sangre periférica humana obtenidas a partir de donantes de sangre sanos (Stanford Blood Center) mediante centrifugación en gradiente de densidad utilizando un cóctel de enriquecimiento de monocitos humanos RosetteSep (Stem Cell Technologies) que contenía anticuerpos monoclonales contra CD14, CD16, CD40, CD86, CD123 y HLA-DR. Posteriormente, las APC inmaduras se purificaron con una pureza > 97 % mediante selección negativa utilizando un kit de enriquecimiento de monocitos humanos EasySep sin agotamiento de CD16 que contenía anticuerpos monoclonales contra CD14, CD16, CD40, CD86, CD123 y HLA-DR.

Preparación de las células tumorales. Se prepararon células tumorales según el ejemplo 3 anterior.

Cocultivos de APC tumorales. 2 x 10^5 APC se incubaron con o sin 6.5 x 10^5 células tumorales autólogas o alogénicas marcadas con CFSE en placas de 96 pocillos (Corning) que contenían medio IMDM (Gibco) complementado con suero fetal bovino al 10 %, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio , aminoácidos no esenciales, 2-ME 50 µM y, donde se indica, diversas concentraciones de anticuerpo. Las células y los sobrenadantes libres de células se analizaron después de 18 horas mediante citometría de flujo.

Resultados. Las APC humanas (~95 % de monocitos) obtenidas a partir de sangre fresca se incubaron con células de linfoma de células B humanas marcadas con CFSE (Toledo, ATCC) en una relación de 3:1 y diluciones seriadas al doble del anticuerpo solo o del anticuerpo-SATA- SMCC-compuesto 1 (conjugado). Después de 18 horas, se analizó la expresión de los marcadores de activación en las células mediante citometría de flujo. Los datos indican que los inmunoconjugados fueron superiores a la hora de provocar la activación de APC ya que la CD40, CD86 y HLA-DR tendían a expresarse a niveles más altos en las APC estimuladas con el inmunoconjugado en comparación con aquellas estimuladas con el anticuerpo solo (véanse las figuras 10D y 10E para ipilimumab, 11D y 11E para pembrolizumab, 12D y 12E para nivolumab y 13D y 13E para atezolizumab). Coherente con los resultados observados en el ejemplo 3, los inmunoconjugados regularon por disminución la CD14 (véanse las figuras 10C para ipilimumab, 11C para pembrolizumab, 12C para nivolumab y 13C para atezolizumab). Los resultados para estos inmunoconjugados fueron los previstos para CD16 y CD123 (no se muestran los datos) a partir de los resultados del ejemplo 3.

La capacidad de estos inmunoconjugados a la hora de provocar la secreción de citocinas en APC humanas después de la estimulación se investigó como se describe en el ejemplo 3 anterior. Los datos indican que las células diferenciadas con inmunoconjugado secretaron mayores cantidades de IL-1β y TNFα (véanse las figuras 14A y 14B para atezolizumab, 15A y 15B para nivolumab, 16A y 16B para pembrolizumab y 20 para ipilimumab).

Ejemplo 6. Preparación y evaluación de la actividad de los conjugados de adyuvante de antidectina 2 i*n vitro*

Preparación de conjugados adicionales de adyuvantes de anticuerpos Se preparó un conjugado de anticuerpo y adyuvante adicional usando los métodos descritos en los ejemplos 1 y 2. Se usó un anticuerpo antidectina 2 (CLEC6A) y un isotipo IgG2a de ratón para crear el conjugado adyuvante de anticuerpo con enlazadores SATA-SMCC (véase el esquema 3 anterior).

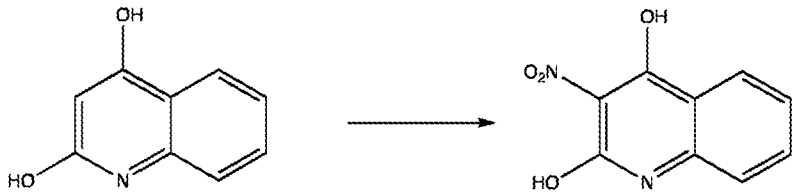
Se investigó la capacidad de este inmunoconjugado a la hora de provocar la secreción de citocinas en APC derivadas de monocitos murinos después de la estimulación como se describe en el ejemplo 3 anterior. Específicamente, la producción de citocinas se muestra en la figura 21 para monocitos pretratados con GM-CSP que se estimularon durante 18 horas con los inmunoconjugados o cantidades equivalentes de los componentes no conjugados. Los datos indican que las células diferenciadas con el inmunoconjugado secretaron mayores cantidades de TNFα, IL-6 e IL-12p70 (véase la figura 21) que cantidades equivalentes de los componentes (adyuvante solo, anticuerpo solo y conjugado de anticuerpo de control).

La dectina 2 y CLEC5A son receptores de lectina de tipo C que se asocian y envían señales a través de las proteínas adaptadoras FcRγ (FCER1G) y DAP12 (TYROBP), respectivamente, después de la reticulación del receptor. Estas proteínas adaptadoras contienen motivos de activación basados en tirosina (ITAM) de inmunorreceptores que median la señalización en dirección 3' a través de una vía dependiente de Syk, lo que provoca la activación de las células inmunitarias (es decir, la producción de citocinas, expresión de moléculas coestimuladoras, presentación de antígenos, etc.). Como se muestra (figura 21 y figura 23), los inmunoconjugados dirigidos contra estos receptores presentan efectos inmunoestimuladores sinérgicos mediante la participación simultánea del receptor acoplado a ITAM (a través del dominio de unión al antígeno) y otras vías de señalización (a través del adyuvante, p. ej., TLR7/8). Los inmunoconjugados dirigidos a otros receptores que se asocian con FcRγ y/o DAP12, o que contienen dominios de señalización parecidos (p. ej., hemITAM), pueden prepararse de manera similar y se espera que presenten efectos parecidos.

Ejemplo 7. Síntesis de un adyuvante TLR7/8

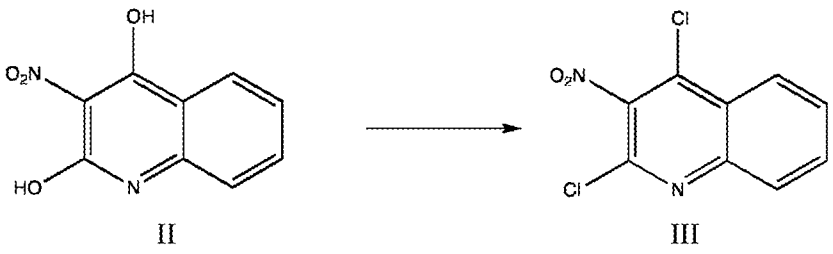
Se tomaron las etapas siguientes para preparar un adyuvante de TLR7/TLR8 (esquema 1, compuesto 1) adecuado para la conjugación con un anticuerpo para formar un inmunoconjugado como se describe en la presente memoria. Las masas de productos se confirmaron en un sistema UPLC (Waters Acquity) equipado con un detector espectrómetro Xevo XS QToF. Se inyectaron muestras disueltas en acetonitrilo:agua en una columna BEH200 C18 (2.1 mm de diámetro x 50 mm de longitud) eluida con un gradiente del 10-90 % de acetonitrilo:agua durante 5 minutos.

Esquema 4



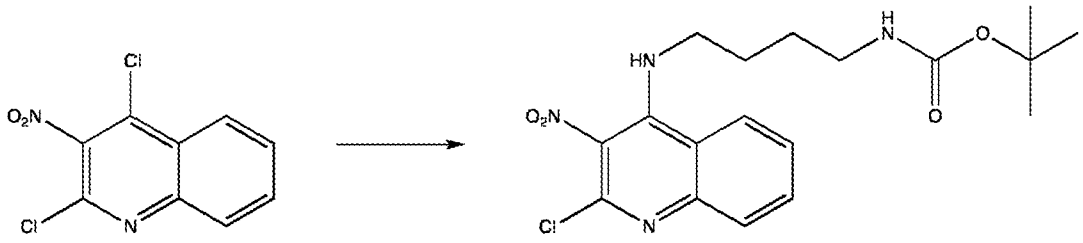
Se añadió lentamente ácido nítrico enfriado (0 ºC) (70 %, 160 mL) al quinolin-2,4-diol 1 (100 g, 621 mmol) en ácido acético glacial (600 mL) agitándolo en un baño de hielo. Se sacó la mezcla del baño de hielo y luego se calentó a temperatura ambiente. Se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Se calentó a 80 °C durante 1.5 horas y luego se enfrió la mezcla a 0 °C. Se añadió lentamente 1 L de agua a la mezcla para precipitar un sólido amarillo. Se agitó enérgicamente durante 15 minutos y luego se filtró. Se volvió a suspender el sólido en agua (1 litro) y se agitó enérgicamente durante 15 minutos y luego se filtró. Se repite con la etapa adicional de añadir lentamente $NaHCO_3$ sólido para llevar el pH a > 6 luego se filtró con succión durante la noche. Se volvió a suspender el sólido en éter etílico (750 mL) y se agitó enérgicamente para crear una suspensión fina. Se filtró y se repitió. Se filtró con succión durante la noche para secar. Rendimiento 112 g II (88 %) de sólido amarillo.

Esquema 5



A temperatura ambiente, se añadió lentamente disopropiletilamina (63 mL, 47 g, 0.36 mol, 2.5 eq.) a $POCl_3$ (300 mL). Mezcla calentada a 80 °C bajo una capa de Ar. Se añadió lentamente en porciones de 2 g nitrodiol II (30 g, 145 mmol, 1 eq.) durante 30 minutos manteniendo la temperatura por debajo de 95 °C. Una vez completada la adición, aumentar la temperatura a 110 °C y calentar durante 1 hora. Enfriar la reacción a 0 °C y luego verter lentamente en partes sobre hielo mientras se agita enérgicamente. Se añadió agua fría hasta el volumen final de 1.2 L y luego se agitó enérgicamente. Se decantó el licor madre acuoso y se añadió 1 L de agua al sólido oscuro, raspando el sólido pegajoso de las paredes del matraz para crear una suspensión. Se repite según sea necesario para obtener un sólido que pueda filtrarse. Se volvió a suspender el sólido en 1 L de agua y luego se añadió lentamente $NaHCO_3$ sólido hasta pH > 6. El sólido se filtró y luego se disolvió en EtOAc (500 mL). Se filtró la solución de EtOAc a través de Celite para eliminar la impureza negra insoluble. Se lavó el filtrado con $NaHCO_3$ saturado, agua, salmuera y luego se separó y se secó la capa orgánica con Na_2SO_4, se filtró y se concentró al vacío. El sólido marrón que se formó se trituró con hexanos/éter dietílico 3:1 (500 mL) y se filtró. El sólido tostado III (22 g, 30 mmol, 62 %) se usó tal cual en la reacción siguiente.

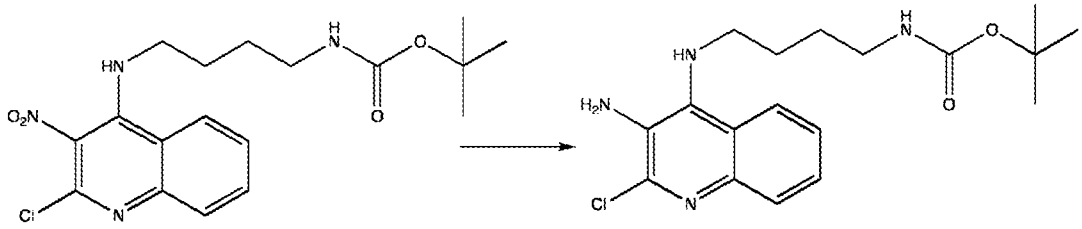
Esquema 6



III IV

A una solución del compuesto de nitrodicloro III (22 g, 62 mmol, 1 eq.) y K_2CO_3 sólido (17 g, 124 mmol, 2 eq.) en DMF (250 mL) a 0 °C se le añadió lentamente una solución de N-Boc-1,4-diaminobutano (12.8 g, 1.1 eq.) en DMF (60 mL) durante 30 minutos. Una vez completada la adición, la reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 30 minutos más. Se añadió agua (800 mL) y la mezcla se agitó enérgicamente. Se vertió el sobrenadante y el sólido húmedo se disolvió en acetato de etilo (500 mL). La solución se lavó con agua, salmuera, se separó, se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró al vacío. El sólido marrón se trituró con hexanos/éter dietílico 1:1 (400 mL) y se filtró para obtener un sólido amarillo IV (17 g, 43 mmol, 69 %) que se usó tal cual en la reacción siguiente.

Esquema 7

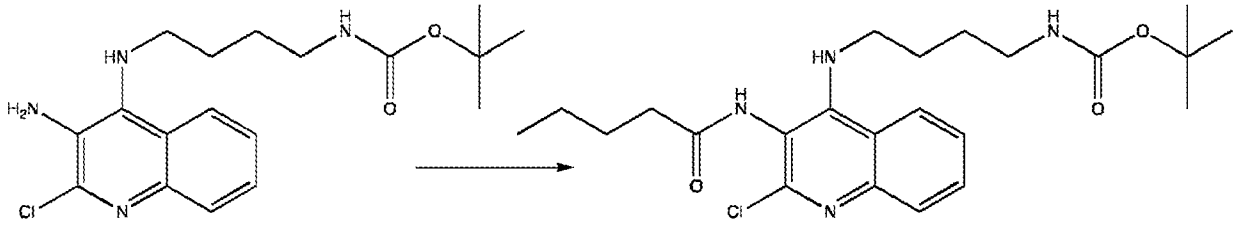


IV V

A una solución del compuesto de nitroamino IV (17 g, 43 mmol, 1 eq.) en metanol (400 mL) y agua (60 mL) a 0 °C se le añadió $NiCl_{.6}\cdot H_2O$ (0.51 g, 2.2 mmol, 0.05 eq.). Se añadió borohidruro de sodio (pélets, 3.2 g, 86 mmol, 2 eq.) y la reacción se agitó durante 1 h a 0 °C, luego se calentó a temperatura ambiente y se dejó agitar durante otros 15 minutos. Se añadió ácido acético glacial en partes para neutralizar cualquier $NaBH_4$ que no hubiera reaccionado hasta que se obtuvo un pH de ~5. La solución se filtró a través de un lecho de Celite para eliminar el material negro insoluble. El disolvente se eliminó al vacío. El sólido marrón oscuro se trituró con éter y luego se filtró para obtener un sólido tostado V (13.3 g, 37 mmol, 85 %) que se usó tal cual en la reacción siguiente.

Esquema 8

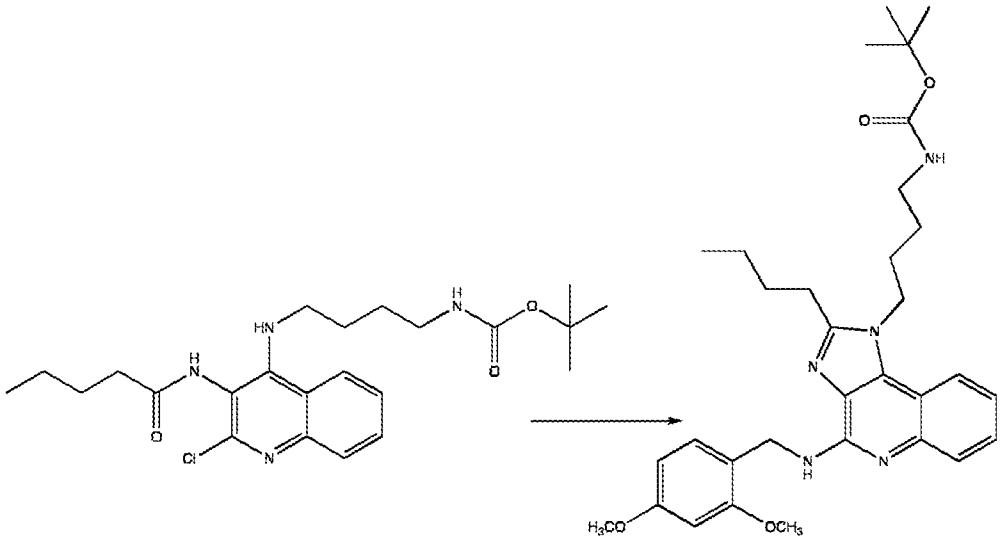
105



V VI

A una solución del compuesto de diamino V (13.3 g, 37 mmol, 1 eq.) en DMF (250 mL) que contenía disopropiletilamina (7.17 g, 9.7 mL, 56 mmol, 1.5 eq.), agitado a temperatura ambiente, se le añadió cloruro de valeroílo puro (5.5 mL, 5.5 g, 42 mmol, 1.2 eq.). La mezcla se agitó durante 30 minutos, luego se añadió hielo y luego se añadió agua hasta un volumen final de 1 L. La mezcla se agitó enérgicamente hasta que se formó un sobrenadante transparente. Se vertió el sobrenadante y el sólido bruto se disolvió en acetato de etilo (400 mL) y se filtró a través de un lecho de Celite. El filtrado se lavó con agua (400 mL), salmuera (400 mL), se separó y luego se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró. El sólido se trituró con éter, se filtró y se secó con succión. El sólido marrón obtenido VI (13.9 g, 31 mmol, 84%) se usó tal cual en la reacción siguiente.

Esquema 9

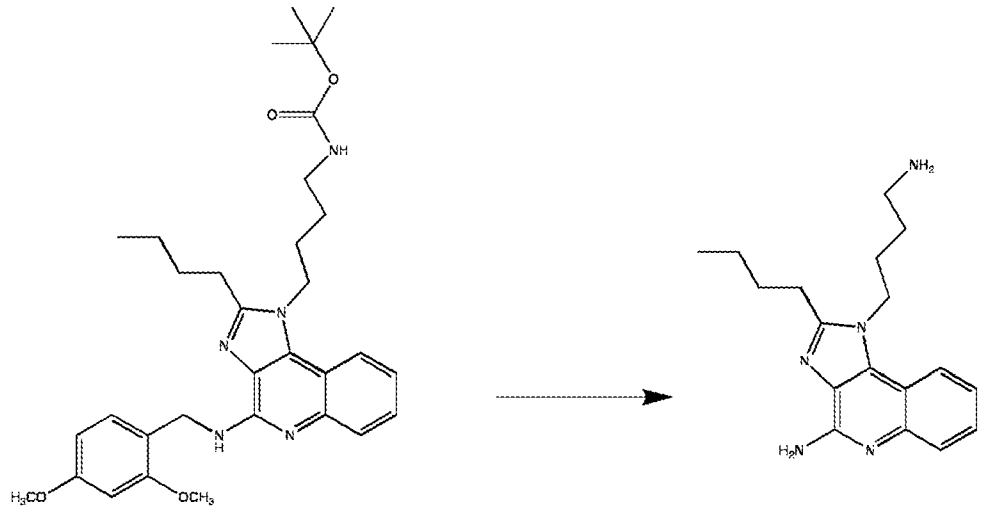


VI VII

En un matraz de fondo redondo de 500 mL equipado con un aparato Dean-Stark, se sometió a reflujo una mezcla de amida VI (13.9 g, 31 mmol, 1 eq.) y 2-clorobenzoico (2.4 g, 15.5 mmol. 0.5 eq.) en 150 mL de tolueno (temperatura del baño = 170 °C) durante 4 horas. Se retiraron el aparato Dean-Stark y el condensador hasta que se evaporó el 80-90 % del tolueno. Se añadió 2,4-dimetoxibencilamina (25 g, 150 mmol, 5 eq.) y la reacción se calentó de forma continua a 120 °C durante 1.25 horas. La reacción se enfrió y la mezcla cruda se diluyó con MeOH/agua (1 L) 1:1 y se agitó enérgicamente. Se decantó el sobrenadante (eliminando la mayor parte del exceso de 2,4-dimetoxibencilamina) y el producto bruto se repartió entre agua y acetato de etilo. Se añadió ácido acético hasta que la capa acuosa dio un pH de 5-6. La capa orgánica se lavó con agua, salmuera, se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró. El jarabe espeso de color marrón se disolvió en éter dietílico y se filtró para eliminar un sólido gris (no producto). El éter se eliminó obteniéndose un jarabe marrón (14.4 g, 26 mmol, 73 %) que se usó tal cual en la reacción siguiente.

Esquema 10

106

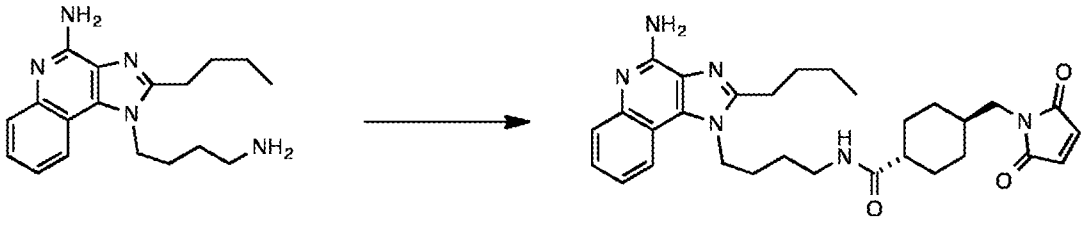


VII VIII

Al material VII (14.4 g, 26 mmol, 1 eq.) se le añadió agua (60 mL) y lentamente, con agitación, HCl concentrado (60 mL). La mezcla se agitó enérgicamente a temperatura ambiente durante 30 minutos y después se calentó a reflujo durante 1 hora. La reacción se enfrió en un baño de hielo y se añadieron pélets de NaOH sólido (28 g, 700 mmol) en partes durante 30 minutos hasta que se alcanzó un pH básico. La solución se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó enérgicamente. La solución se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó enérgicamente. Esta capa acuosa se extrajo 3 veces con isopropanol/diclorometano al 10 % (400 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron (Na_2SO_4), se filtraron y se concentraron obteniéndose un sólido marrón VIII (6.8 g, 22 mmol, 79 %).

Ejemplo 8. Síntesis de inmunoconjugados

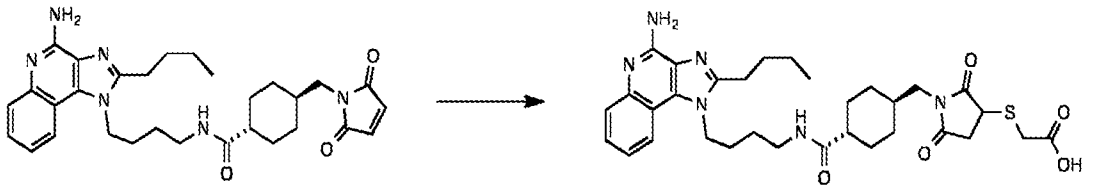
Esquema 11



VIII IX

Este ejemplo proporciona orientación sobre la síntesis de un inmunoconjugado utilizando el método del éster de TFP. Se disolvió el compuesto VIII (311 mg, 1 mmol) en 10 mL de dimetilformamida (DMF) y después se añadieron 2 equivalentes molares de diisopropiletilamina (DIPEA). Se disolvió un enlazador SMCC (1.5 mmol) en 10 mL de diclorometano y se añadió en una porción a VIII. La reacción se agitó durante la noche a 20 °C y se concentró hasta la sequedad mediante evaporación rotatoria. El producto bruto IX se purificó sobre gel de sílice usando un sistema de cromatografía ultrarrápida Buchi cargado con un cartucho desechable de 12 g y eluido con un gradiente de metanol al 0-10 % durante 15 minutos. Las fracciones puras se combinaron y se evaporaron hasta la sequedad obteniéndose 160 mg de un sólido IX de color amarillo pálido.

Esquema 12

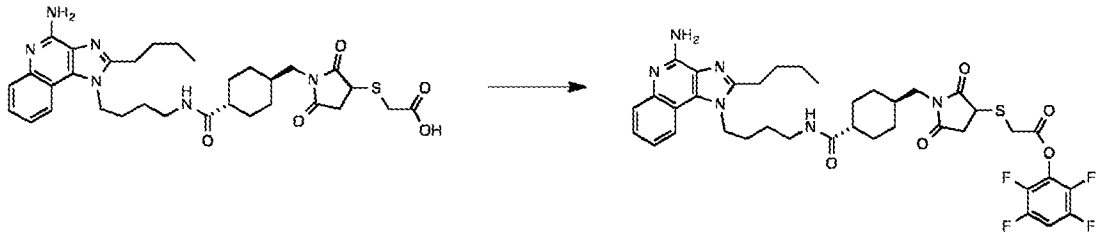


IX X

Se disolvió el compuesto IX (0.1 mmol, 53 mg) en 10 mL de diclorometano y luego se añadieron 2 equivalentes de

ácido tioglicólico a la vez. La mezcla se concentró hasta la sequedad al vacío y el residuo se lavó tres veces con 5 mL de éter dietílico.

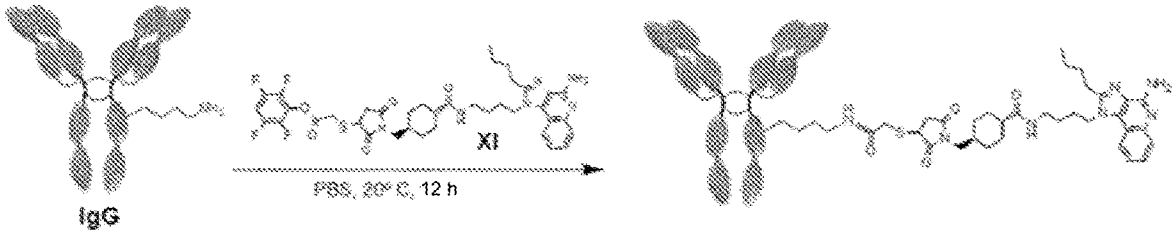
Esquema 13



X XI

Se disolvió el compuesto X (6.2 mg, 0.01 mmol) en 2 mL de THF y luego se añadieron 5 mg de tetrafluorofenol. Luego se añadieron 5 mg de diciclohexilcarbodiimida (DCC). La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente y luego se concentró hasta la sequedad al vacío. El producto bruto XI se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (columna preempaquetada de 4 gramos) y se eluyó con MeOH al 0-10 % en diclorometano. Las fracciones puras se combinaron y se evaporaron obteniéndose 3.6 mg de XI puro (confirmado por LC/MS). Luego se usó el éster de TFP XI en la etapa siguiente de conjugación de anticuerpos.

Esquema 14



Se intercambió el tampón de un anticuerpo IgG1 (específicamente, el anticuerpo anti-CD20 rituxumab) a PBS con un pH de 7.2 y se diluyó a 10 mg/ml (66 µM). El adyuvante activado por TFP, XI, se añadió a DMSO y se añadieron 6 equivalentes molares (en relación con IgG) a 1 mL de la solución de anticuerpo (10 mg) en una porción. La mezcla se invirtió varias veces para mezclar y se incubó durante la noche a 20 °C. El inmunoconjugado resultante ("BB-01") se purificó mediante intercambio de tampón a PBS (pH 7.2) usando una columna PD10 (SephadexG25®) de cromatografía de exclusión por tamaño. Se reunieron las fracciones puras y se determinó la concentración midiendo la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro de nanogotas. El rendimiento fue de 8 miligramos o aproximadamente el 80 % en base a la proteína recuperada. El producto inmunoconjugado se filtró de forma estéril a través de un filtro de jeringa de 0.2 µm y se almacenó a 4 °C hasta que se necesitó.

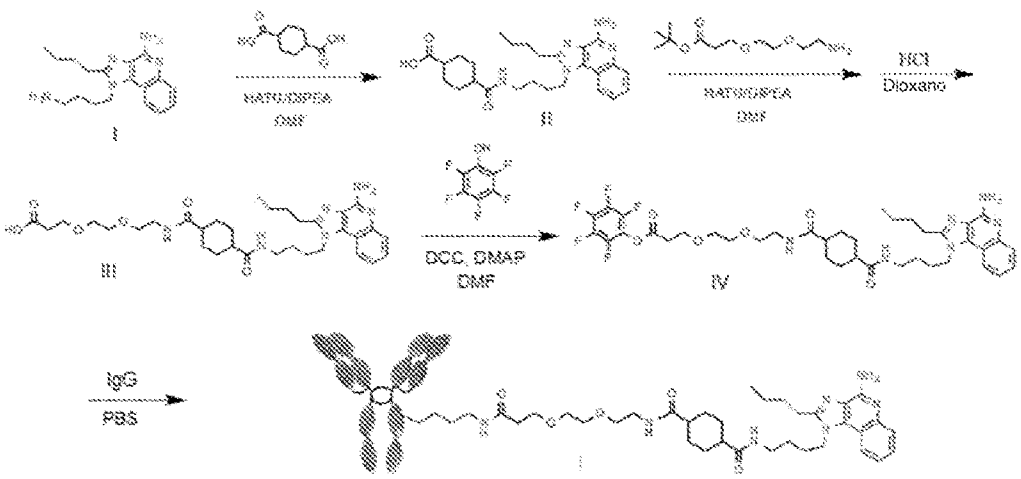
La caracterización de la relación entre el fármaco y el anticuerpo del inmunoconjugado resultante ("DAR") se realizó por medio del análisis de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas ("LC/MS") en un sistema UPLC (Waters Aquity) equipado con un detector de espectrómetro de masas Xevo XS QToF. El análisis se realizó mediante inyección de 5 µg del inmunoconjugado en una columna BEH200 C4 (2.1 mm de diámetro x 50 mm de longitud) eluida con un gradiente de 10-90 % de acetonitrilo:agua durante 4 minutos.

El análisis indicó que los inmunoconjugados sintetizados mediante el método TFP demostraron un DAR más alto que el inmunoconjugado sintetizado mediante el método SATA. Además, el método TFP produjo inmunoconjugados con cantidades reducidas de anticuerpo no conjugado (solo aproximadamente el 5 %) en comparación con el método de síntesis SATA (aproximadamente el 20 %) (compárense las figuras 1A y 1B).

Se realizó un análisis por cromatografía de exclusión por tamaño ("SEC") de BB-01 para determinar la pureza monomérica. El análisis se realizó en una columna SEC BEH200 eluida con PBS (pH 7.2) y 0.2 mL/min. El inmunoconjugado BB-01 sintetizado utilizando el método del éster activo de TFP contenía menos del 2 % de alto peso molecular agregado (figura 2B).

Ejemplo 9. Síntesis del inmunoconjugado BB-14 con un éster de pentafluorofenilo ("PFP")

Esquema 15



Este ejemplo proporciona orientación sobre la síntesis de un inmunoconjugado utilizando el método del éster de PFP. La modificación del éster del adyuvante y la conjugación del adyuvante modificado con el anticuerpo se muestran arriba en el esquema 12. Se disolvió trans-1,4-dicarboxilato de ciclohexano (1 g) en 10 mL de dimetilformamida ("DMF") y se añadió hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio ("HATU") (1 mmol) seguido de 1 mL de *N*-etilo-*N*(propan-2-il)propan-2-amina ("DIPEA"). Se añadió el compuesto 1 (311 mg) y la mezcla se agitó durante la noche a 20 °C. La mezcla de reacción se diluyó con 50 mL de diclorometano ("DCM") y se lavó con 20 mL de HCl 1 N. La capa de DCM se evaporó hasta la sequedad y el producto se purificó sobre gel de sílice eluyendo con MeOH al 0-10 % en DCM que contenía ácido acético al 1 %. Las fracciones puras se concentraron obteniéndose 220 mg de ácido purificado II. Se disolvió el compuesto II (100 mg) en THF y se añadieron 100 mg de HATU seguido de 200 µl de DIPEA. Se añadieron dos equivalentes de amino-PEG2-tert-butilcarboxilato y se agitaron durante una hora a 20 ºC. La mezcla se concentró hasta la sequedad y se añadieron 10 mililitros de HCl 4N en dioxano. La mezcla se concentró hasta la sequedad y el producto bruto III se purificó mediante HPLC preparativa obteniéndose 40 mg del compuesto III.

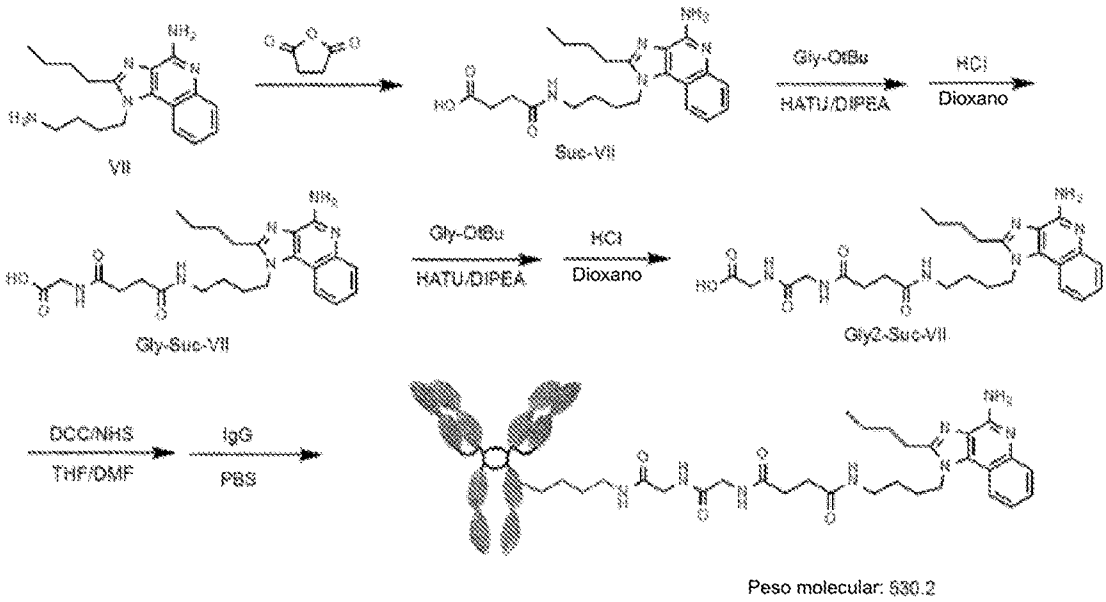
El compuesto III se convirtió en éster de PFP IV como se describe a continuación. Se añadió el compuesto III (35 mg) a 50 mg de PFP en 5 mL de THF y se añadieron 5 mL de DMF seguido de 20 mg de DCC. Se añadió DMAP (2-3 mg) y la solución se agitó durante la noche a 20 °C. La reacción se concentró y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (eluyendo con MeOH al 0-10 %) obteniéndose 17 mg de éster de PFP IV después de la liofilización en agua con acetonitrilo 1:2.

Se añadió éster de PFP IV (6 eq. molar en relación con IgG) a 20 mg de un anticuerpo IgG (específicamente, el anticuerpo anti-CD20 rituximab) (10 mg/ml en PBS) y se incubó a 37 °C durante la noche. El tampón del inmunoconjugado BB-14 resultante se intercambió a PBS (pH 7.2) eliminándose el exceso de reactivo de peso molecular pequeño y se determinó la concentración en la

nanogota. El rendimiento fue de 15 mg de inmunoconjugado (rendimiento del 75 %). El producto se almacenó a 4 ºC. Se determinó un DAR de 2.2 mediante análisis LC/MS. Además del DAR deseable y el alto rendimiento, el producto también tenía pocas impurezas según lo según lo determinado por el análisis SEC (véase las figuras 3 y 4).

Ejemplo 10. Síntesis del inmunoconjugado BB-15 con un éster de NHS

Esquema 16



La modificación del éster del adyuvante y la conjugación del adyuvante modificado con el anticuerpo se muestran arriba en el esquema 13. Se disolvió el compuesto VII (150 mg) en 20 mL de tetrahidroflurano ("THF") y se añadieron 10 mL de bicarbonato de sodio acuoso saturado. A continuación, se añadieron 50 mg de anhídrido succínico en una porción y la mezcla se agitó durante una hora a temperatura ambiente. Se añadieron lentamente veinte mililitros de HCl 1 N y la mezcla se extrajo con 2 x 50 mL de diclorometano. Los extractos orgánicos combinados se evaporaron hasta la sequedad. El producto bruto (Suc-VII) se purificó en una columna de gel de sílice de 4 gramos eluida con MeOH al 0-15 % (1 % de ácido acético) durante 15 minutos. Las fracciones puras se combinaron y se evaporaron obteniéndose 190 mg de VII-Suc puro.

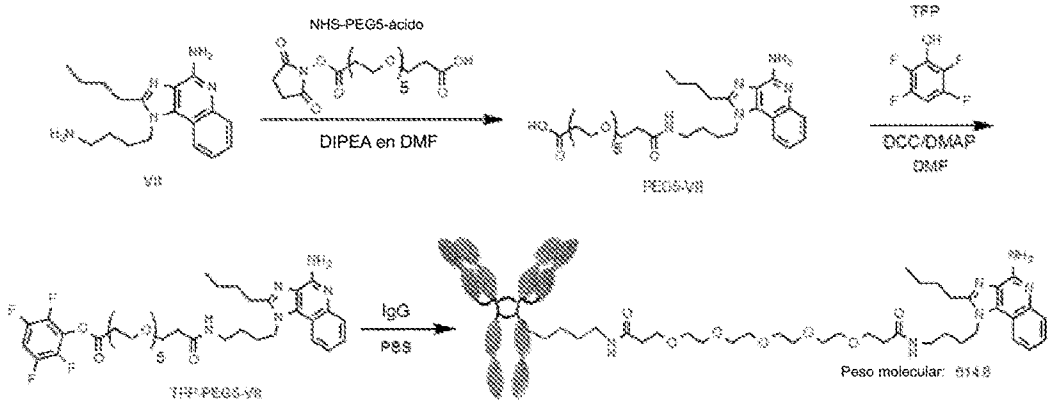
Se disolvió el compuesto VII-Suc (150 mg) en 10 mL de DMF y se añadió 1 equivalente de HATU seguido de 2 equivalentes de DIPEA. Se añadieron 1.5 equivalentes de glicina-OtBu y se agitaron durante la noche. Se evaporó el DMF y se trató el residuo con 5 mL de HCl 1 N en dioxano durante 30 minutos. El disolvente se evaporó y el Gly-Suc-VII bruto se purificó instantáneamente en una columna de gel de sílice de 4 gramos eluida con MeOH al 0-10 % durante 10 minutos. La evaporación de las fracciones puras proporcionó 110 mg de Gly-Suc-VII; el material puro se disolvió en DMF y se repitió el proceso anterior obteniéndose 60 mg de Gly2-Suc-VII puro.

El Gly2-Suc-VII puro (30 mg) se disolvió en 5 mL de DMF y se añadieron 1.5 equivalentes de NHS seguido de 5 mL de THF. Se añadió DCC (1.5 equivalentes) y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó y el éster de NHS bruto se purificó instantáneamente en un gel de sílice eluido con MeOH al 0-10 % en DCM durante 10 minutos. Las fracciones puras (determinadas por TLC) se combinaron y se evaporaron obteniéndose 1 mg de NHS-Gly2-Suc-VII puro después de la liofilización en agua con acetonitrilo.

El éster de NHS puro se disolvió en DMSO para preparar una solución 20 mM y se añadieron 6 eq. a 2 mL de un anticuerpo IgG (específicamente, el anticuerpo anti-CD20 rituximab) (10 mg/ml en PBS). La reacción de conjugación se incubó a temperatura ambiente durante la noche y se intercambió el tampón a PBS fresco eliminándose el exceso de adyuvante. El inmunoconjugado BB-15 purificado se filtró de forma estéril y se almacenó a 4 ºC. El rendimiento fue de aproximadamente 16 mg. Además de tener un alto rendimiento, el análisis LC/MS mostró altos niveles de pureza, bajos niveles de agregación y una relación DAR deseable (véase las figuras 5 y 6).

Ejemplo 11. Síntesis de inmunoconjugado con un éster de TFP

Esquema 17



Este ejemplo proporciona orientación sobre la síntesis de un inmunoconjugado con un enlazador diferente utilizando el método del éster de TFP. La modificación del éster del adyuvante y la conjugación del adyuvante modificado con el anticuerpo se muestran arriba en el esquema 14. Se disolvió el compuesto VII (311 mg, 1 mmol) en 10 mL de DMF y luego se añadieron 0.3 mL de DIPEA. El ácido NHS-PEGS (1.2 equivalentes) se disolvió en 5 mL de diclorometano y se añadió al compuesto VII en una porción. La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente y luego se concentró hasta la sequedad. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice en una columna de 4 gramos eluida con MeOH al 0-10 % en DCM que contenía ácido acético al 1 % durante 10 minutos obteniéndose 260 mg (rendimiento del 57 %) de PEGS-VII después de la concentración de las fracciones puras.

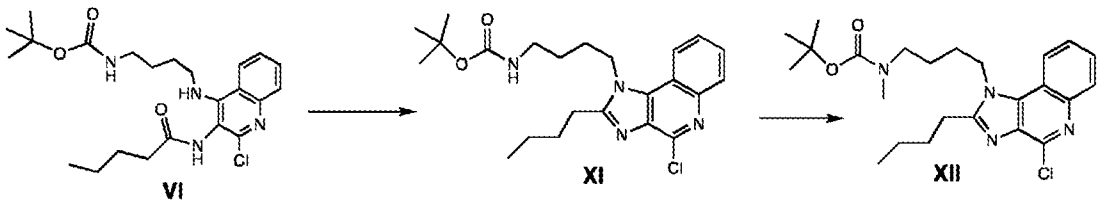
Se disolvió PEGS-VII (50 mg) en 10 mL de DMF y se añadió 1.5 eq. de PTF seguido de 1.2 eq. de DCC y 5 mg de DMAP. La reacción se agitó durante la noche, se concentró hasta la sequedad y se purificó en una columna de 4 gramos de gel de sílice eluida con MeOH al 0-10 % en DCM obteniéndose 35 mg de TFP-PEG5-VII puro después de la liofilización en agua con acetonitrilo 1:2.

El éster de TFP (TFP-PEG5-VII) se disolvió en DMSO para preparar 20 mM de una solución madre y se añadió a 20 mg de un anticuerpo IgG (específicamente, el anticuerpo anti-CD20 rituximab) en PBS a 10 mg/ml. Se dejó que la reacción de conjugación continuara durante la noche a temperatura ambiente. Se intercambió el tampón (GE, columna de desalinización PD10) del inmunoconjugado resultante a PBS con pH 7.4. El inmunoconjugado purificado se filtró de forma estéril utilizando un filtro de jeringa de 2 µm y se almacenó a 4 °C. El análisis LC/MS confirmó que el proceso obtuvo un DAR de 2.9 adyuvantes por anticuerpo (véase figura 7). El análisis SEC indicó cantidades mínimas de agregado (es decir, menos del 2 %) (véase la figura 8).

Ejemplo 12. Síntesis de otro adyuvante de TLR7/TLR8

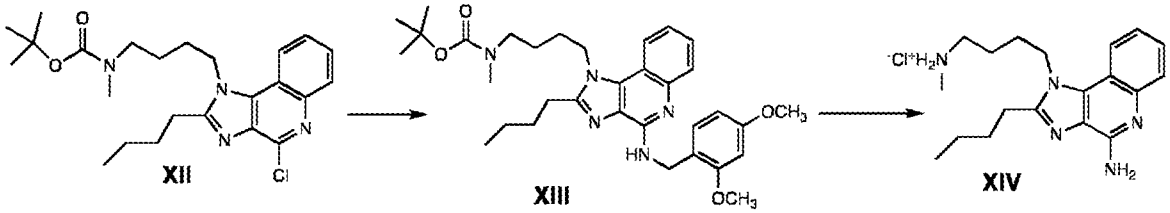
Este ejemplo proporciona orientación sobre cómo sintetizar otro adyuvante de TLR7/8. El compuesto XIV se sintetizó a partir del compuesto VI del esquema 8 del ejemplo 3.

Esquema 18



Se disolvió el compuesto VI (2 g) en tolueno con ácido acético seco al 20 % y se calentó a 75 °C durante la noche. El disolvente se eliminó al vacío obteniéndose 2 gramos del compuesto XI bruto. El compuesto XI se usó sin purificación adicional. Se disolvió el compuesto XI (2 g) en 20 mL de DMF y se añadieron lentamente 1.2 equivalentes de NaH (dispersión al 50 %) y la mezcla se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadió yoduro de metilo (2 equivalentes) en una porción y la mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La reacción se concentró hasta la sequedad y el producto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida. El producto se eluyó con un gradiente de MeOH al 0-10 % en diclorometano durante 15 min. Se combinaron las fracciones puras y se concentraron para producir 1 g del compuesto XII (rendimiento del 50 % en 2 etapas).

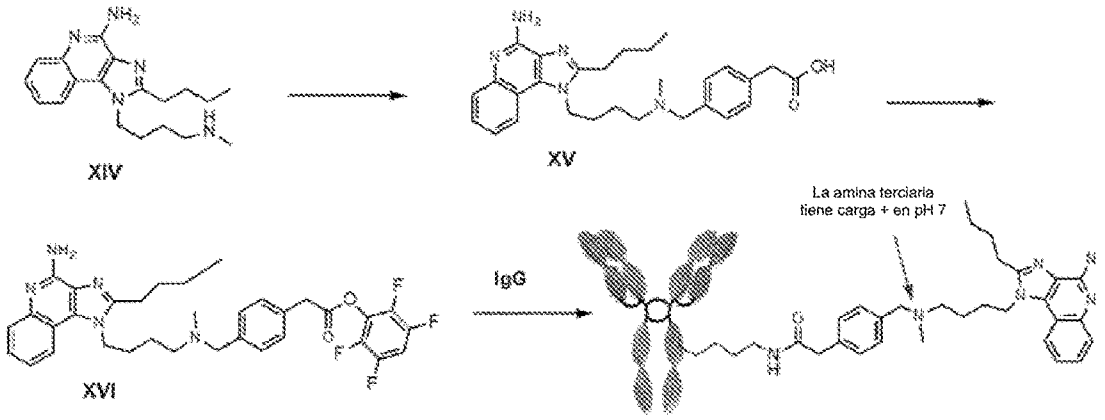
Esquema 19



Se disolvió el compuesto XII (10 g) en 10 mL de dimetoxibencilamina pura ("DMBA") y se calentó a 120 ºC durante 3 horas. La mezcla de reacción se enfrió y se diluyó con 100 mL de acetato de etilo. La solución resultante se lavó dos veces con ácido cítrico al 10 % en agua y una vez con agua para eliminar el exceso de DMBA. La capa orgánica se secó sobre $MgSO_4$ y se concentró al vacío obteniéndose el compuesto XIII bruto como un aceite marrón. El derivado de DMB bruto, compuesto XIII, se disolvió en diclorometano y se añadieron 2 mL de HCl 4 N en dioxano. Después de 2 horas, la mezcla de reacción se concentró hasta la sequedad y el compuesto de sal de HCl bruto XIV se disolvió en 3 mL de metanol. Se añadió lentamente éter etílico (20 mL) con agitación a la solución bruta y se formó un precipitado blanco. La reacción se filtró y el producto sólido blanco se lavó dos veces con 10 mL de éter etílico y se secó al vacío obteniéndose 4 gramos del compuesto de sal de HCl XIV. El análisis LC/MS confirmó el peso molecular correcto (M/z = 326.5) y una pureza superior al 95 %.

Ejemplo 13. Síntesis del inmunoconjugado BB-26 con un éster de TFP

Esquema 20

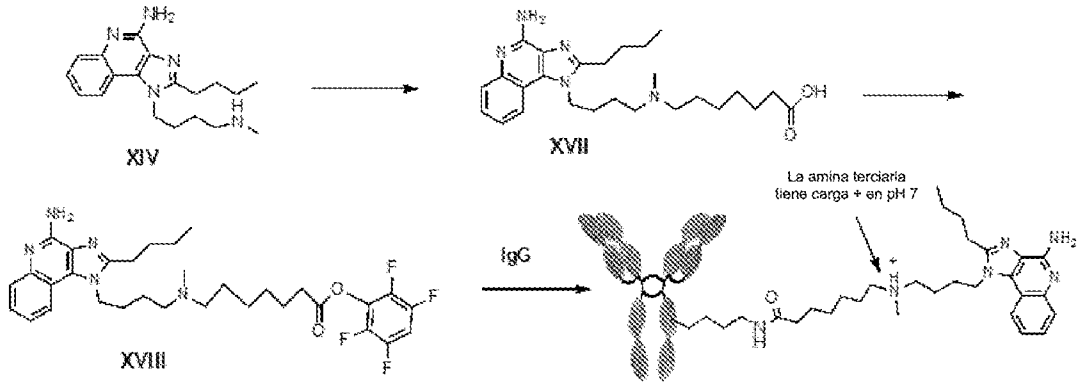


Este ejemplo proporciona orientación sobre la síntesis de un inmunoconjugado que contiene un enlazador de arilamina terciaria utilizando el método del éster de TFP. Se disolvió el compuesto XIV (300 mg) del ejemplo 12 en THF (10 mL) y 1.2 eq. de NaH (dispersión al 50 %). La mezcla se agitó durante 15 minutos y se añadieron 2 equivalentes de ácido 4-bromometilfenilacético. La reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente y se concentró hasta la sequedad. Se añadió un mL de ácido acético y el producto se purificó mediante HPLC preparativa en una columna C-18 eluida con un gradiente de 10-90 % de acetonitrilo en agua (0.1 % de TFA) durante 20 minutos obteniéndose 165 mg de compuesto de ácido fenilacético purificado XV. Se disolvió el compuesto XV (50 mg) en diclorometano/dimetilformamida (5 mL, 1:1) y se añadieron 2 equivalentes de TFP seguido de 1.5 equivalentes de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida ("EDCI"). La reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente y el producto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en una columna de gel de sílice de 4 gramos eluida con isopropanol al 0-10 % durante 10 minutos. Las fracciones puras se concentraron y liofilizaron en agua con acetonitrilo al 30 % obteniéndose 21 mg de compuesto de éster de TFP XVI purificado en forma de un sólido amarillo pálido. El peso molecular y la pureza se confirmaron mediante LC/MS (m/z = 621.7).

Conjugación con anticuerpo: El éster XVI de TFP se disolvió en DMSO anhidro para preparar 20 mM de una solución madre y se añadieron 6 equivalentes molares (en relación con el anticuerpo) a 20 mg de anticuerpo IgG (específicamente, el anticuerpo anti-CD20 rituximab) (10 mg/ml en PBS). La reacción de conjugación se incubó a 4 °C durante la noche. El tampón del inmunoconjugado resultante, BB-26, se intercambió a PBS (pH 7.2) eliminándose el exceso de reactivos de peso molecular pequeño. La concentración final se determinó midiendo el anticuerpo a 280 nm en el espectrofotómetro Nanodrop 1000. El rendimiento fue de 15 mg de BB-26, o el 75 % en base a la proteína recuperada. Como se observa en la figura 12A, se observó un agregado mínimo (menos del 1%) según se detectó mediante análisis SEC. Como se observa en la figura 12B, el producto tenía una relación DAR de 2.8 según se determinó mediante análisis LC/MS. Los inmunoconjugados BB-26 purificados se filtraron a través de un filtro estéril de 0.2 µM y se almacenaron a -20 °C.

Ejemplo 14. Síntesis de inmunoconjugado BB-27 con un éster de TFP

Esquema 21



Este ejemplo proporciona orientación sobre la síntesis de un inmunoconjugado que contiene un enlazador de alquilamina terciaria utilizando el método del éster de TFP. Se disolvió el compuesto XIV (200 mg) en metanol (20 mL) y se añadieron 3 equivalentes de heptanoato de 1-formil-7-tert-butilo seguido de 1.1 equivalentes de $NaCNBH_4$. La mezcla se agitó durante 1.5 horas a temperatura ambiente y se concentró hasta la sequedad. Se añadió TFA (5 ml) y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. El TFA se evaporó al vacío y el producto bruto se purificó mediante HPLC preparativa en una columna C-18. El producto se eluyó con un gradiente de acetonitrilo al 10-90 % en agua (TFA al 0.1 %) durante 20 minutos obteniéndose 110 mg del compuesto ácido XVII purificado (que se confirmó mediante LC/MS).

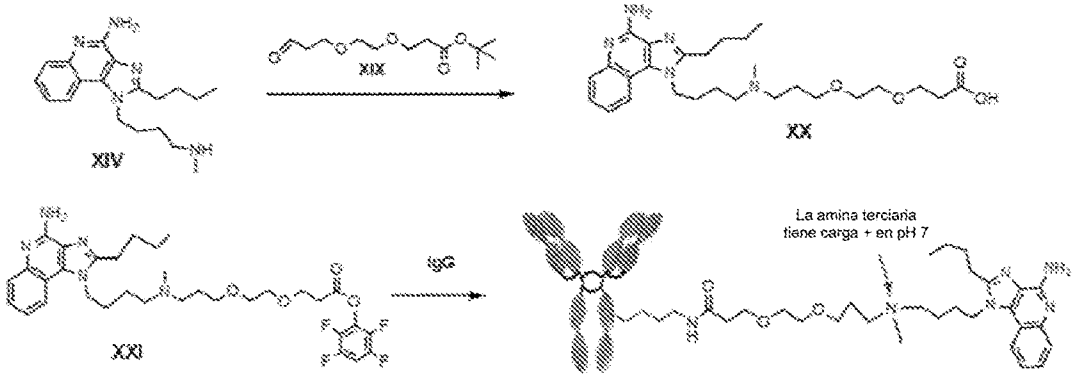
Se disolvió el compuesto XVII (50 mg) en diclorometano/dimetilformamida (5 mL, 1:1) y se añadieron 2 equivalentes de TFP seguido de 1.5 equivalentes de EDCI. La reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. El producto de éster de TFP XVIII bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en una columna de gel de sílice de 4 gramos eluida con isopropanol al 0-10 % durante 10 minutos. Las fracciones puras se concentraron y el residuo se liofilizó en agua con acetonitrilo al 30 % obteniéndose 14 mg del compuesto de éster de TFP XVIII purificado en forma de un sólido blanco. El peso molecular y la pureza se confirmaron mediante LC/MS (m/z = 601.7).

Conjugación con anticuerpo: Se disolvió éster de TFP XVIII en DMSO anhidro para preparar 20 mM de una solución madre y se añadieron 8 equivalentes molares (en relación con el anticuerpo) a 20 mg de un anticuerpo IgG (específicamente, el anticuerpo anti-CD20 rituximab) (10 mg/ml en PBS). La reacción de conjugación se incubó a 4 °C durante la noche. El tampón del inmunoconjugado resultante, BB-27, se intercambió a PBS (pH 7.2) eliminándose el exceso de reactivos de peso molecular pequeño. La concentración final se determinó midiendo los anticuerpos a 280 nm en el espectrofotómetro Nanodrop 1000. El rendimiento fue de 16 mg de inmunoconjugado BB-27 (80 %).

Se observó un agregado mínimo (menos del 1 %) según se detectó mediante análisis SEC. El producto tenía una relación DAR de 2.5 según se determinó mediante análisis LC/MS. El BB-27 purificado se filtró a través de un filtro estéril de 0.2 µM y se almacenó a -20 °C.

Ejemplo 15. Síntesis del inmunoconjugado BB-36 con un éster de TFP

Esquema 22



Este ejemplo proporciona orientación sobre la síntesis de un inmunoconjugado que contiene un enlazador de amina terciaria PEG utilizando el método de TFP. Se disolvió el compuesto XIV (200 mg) en metanol (20 mL) y se

añadieron 3 eq. de aldehído XIX seguido de 1.1 equivalentes de $NaCNBH_4$. La mezcla se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente y se concentró hasta la sequedad. Se añadió ácido trifluoroacético (TFA, 10 mL) y la reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. El TFA se evaporó al vacío y el producto bruto se purificó mediante HPLC preparativa en una columna C-18. El producto se eluyó con un gradiente de acetonitrilo al 10-90 % en agua (0.1 % de TFA) durante 20 minutos obteniéndose 85 mg de ácido XX purificado después de la liofilización de las fracciones puras combinadas (confirmado por LC/MS).

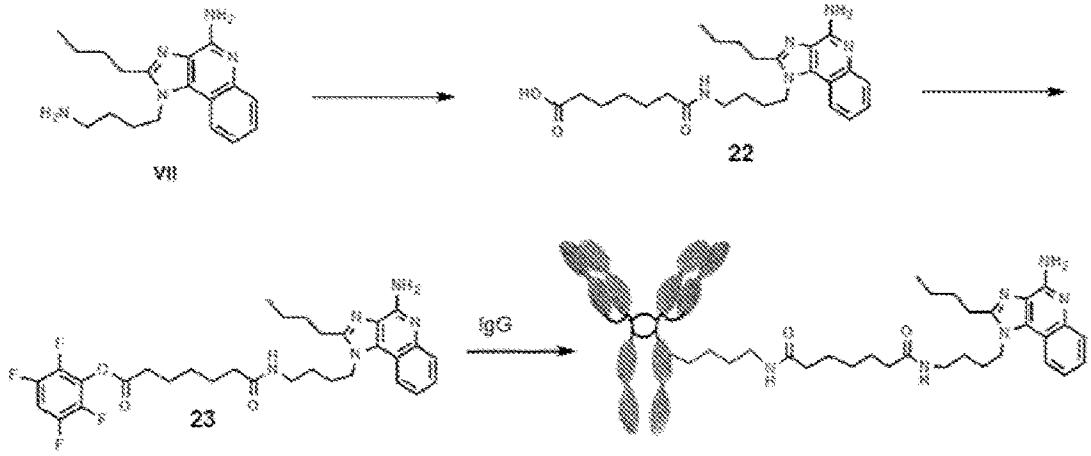
Se disolvió el compuesto XX (80 mg) en diclorometano/dimetilformamida (5 mL, 1:1) y se añadieron 2 equivalentes de TFP seguido de 1.2 equivalentes de EDCI. La reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. El producto éster de TFP XXI bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en una columna de gel de sílice de 4 gramos eluida isopropanol al 0-10 % durante 10 minutos. Las fracciones puras se concentraron y el residuo se liofilizó en agua con acetonitrilo al 30 % obteniéndose 45 mg de éster de TFP purificado del compuesto XXI en forma de un sólido beis. El peso molecular y la pureza se confirmaron mediante LC/MS (m/z = 647.7).

Conjugación con anticuerpo: El éster de TFP del compuesto XXI se disolvió en DMSO anhidro para preparar 20 mM de una solución madre y se añadieron 8 equivalentes molares (en relación con el anticuerpo) a un anticuerpo IgG1 (específicamente, el anticuerpo anti-CD20 rituxumab) (10 mg/ml en PBS). La reacción de conjugación se incubó a 4 °C durante la noche. El tampón del inmunoconjugado resultante, BB-36, se intercambió a PBS (pH 7.2) eliminándose el exceso de reactivos de peso molecular pequeño. La concentración final se determinó midiendo los anticuerpos a 280 nm en el espectrofotómetro Nanodrop 1000. El rendimiento fue de 15 mg de inmunoconjugado BB-36 (75 %) que se almacenó a 4 ºC hasta su uso.

Se observó un agregado mínimo (menos del 1 %) según se detectó mediante análisis SEC. El producto tenía una relación DAR de 2.2 según se determinó mediante análisis LC/MS. El inmunoconjugado BB-36 purificado se filtró a través de un filtro estéril de 0.2 µM y se almacenó a -20 °C.

Ejemplo 16. Síntesis del inmunoconjugado BB-45 con un éster de TFP

Esquema 23



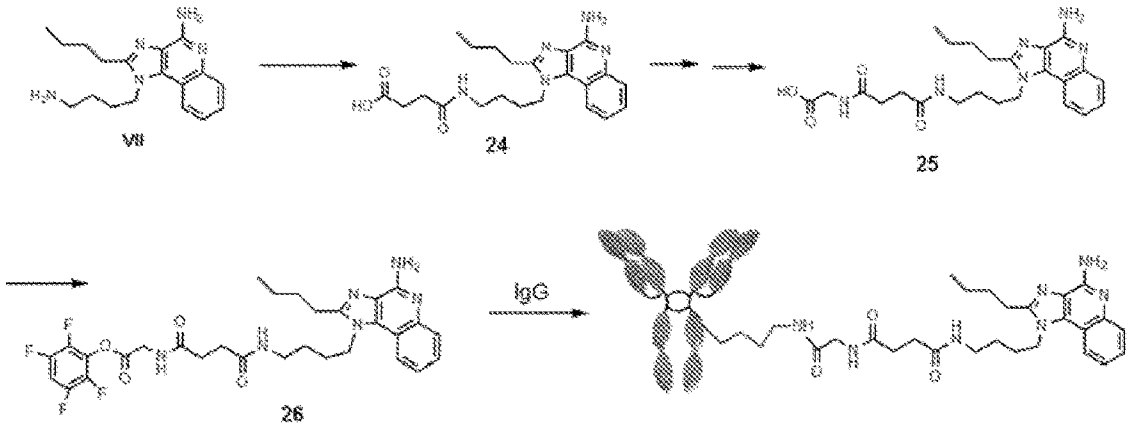
Este ejemplo proporciona orientación sobre la síntesis de un inmunoconjugado con un enlazador diferente utilizando el método del éster de TFP. Se disolvió el compuesto VII (311 mg, 1 mmol) en 10 mL de DMF y se añadieron 0.3 mL de DIPEA. En un recipiente separado, se disolvieron 1.2 equivalentes de ácido 7-metoxi-7-oxoheptanoico en 5 mL de DMF y se añadieron 1.5 equivalentes de DIPEA seguido de HATU (1.2 equivalentes). La mezcla añadió al compuesto VII se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró hasta la sequedad al vacío y el residuo se disolvió en 10 mL de tetrahidrofurano:agua (1:1). Se añadió un mL de hidróxido de litio 2 M en agua y la reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. El THF se eliminó mediante evaporación rotatoria y la solución acuosa se acidificó añadiendo 10 mL de ácido clorhídrico 1 M. La solución acuosa se extrajo 2 veces con diclorometano (20 mL) y la capa orgánica se combinó y se secó sobre sulfato de magnesio. La solución se filtró y el filtrado se concentró hasta la sequedad. El producto bruto 22 se purificó mediante cromatografía en gel de sílice en una columna de 4 gramos eluida con isopropanol al 0-10 % en DCM (p/1 % de ácido acético) durante 10 minutos. Las fracciones puras se combinaron y se concentraron obteniéndose 220 mg del producto 22 puro en forma de un sólido amarillo pálido.

Se disolvió el compuesto 22 (50 mg) en diclorometano/dimetilformamida (5 mL, 1:1) y se añadieron 2 equivalentes de TFP seguido de 1.5 equivalentes de EDCI. La reacción se agitó durante la noche a 22 °C y la reacción bruta se concentró hasta la sequedad. El producto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en una columna de gel de sílice de 4 gramos eluida con isopropanol al 0-10 % durante 10 minutos. Las fracciones puras se concentraron y el residuo se liofilizó en acetonitrilo al 30 % en agua obteniéndose 21 mg de éster de TFP 23 purificado en forma de un sólido amarillo pálido. El peso molecular y la pureza se confirmaron mediante LC/MS.

Conjugación con anticuerpo: Se disolvió el éster de TFP 23 en DMSO anhidro para preparar 20 mM de una solución madre y se añadieron 6 equivalentes molares (en relación con el anticuerpo) a 20 mg de un anticuerpo IgG (específicamente, el anticuerpo anti-CD20 rituximab) (10 mg/ml en PBS). La reacción de conjugación se incubó a 4 °C durante la noche. El tampón del inmunoconjugado resultante, BB-45, se intercambió a PBS (pH 7.2) eliminándose el exceso de impurezas de peso molecular pequeño. La concentración final se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro Thermo Nanodrop 1000. El rendimiento fue de 14 mg de BB-45, o el 70 % en base a la proteína recuperada. Se detectó un agregado mínimo (menos del 1 %) mediante análisis SEC y se determinó un DAR de 2.8 mediante análisis LC/MS. El inmunoconjugado purificado se filtró a través de un filtro estéril de 0.2 µM y se almacenó a -20 °C.

Ejemplo 17. Síntesis del inmunoconjugado BB-24 con un éster de TFP

Esquema 24



Este ejemplo proporciona orientación sobre la síntesis de un inmunoconjugado con un enlazador diferente utilizando el método del éster de TFP. Se disolvió el compuesto VII (150 mg) en 20 mL de THF y se añadieron 10 mL de bicarbonato de sodio acuoso saturado. Se añadió anhídrido succínico (50 mg) en una porción y la mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadieron lentamente 20 mL de HCl 1 N y la mezcla se extrajo con 2x 50 mL de diclorometano y los extractos orgánicos combinados se evaporaron hasta la sequedad. El producto bruto 24 se purificó en una columna de gel de sílice de 4 gramos eluida con MeOH al 0-15 % (1 % de ácido acético) durante 15 minutos. Las fracciones puras se combinaron y se evaporaron obteniéndose 180 mg de 24 puro.

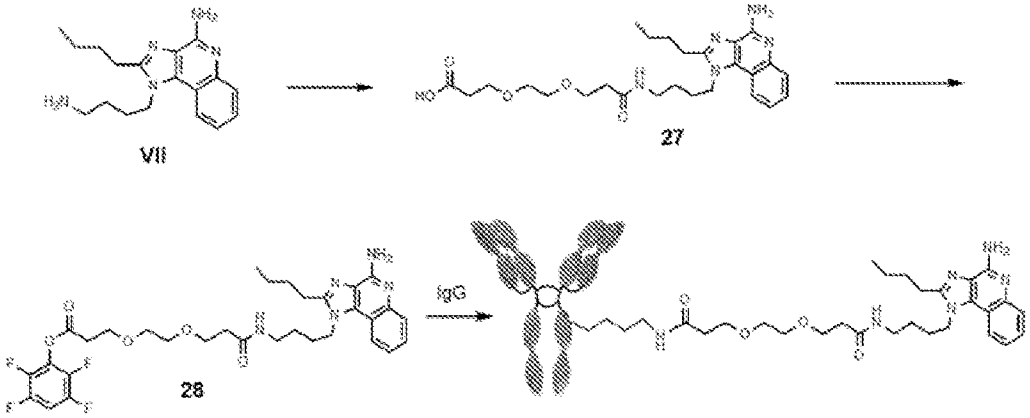
Se disolvieron ciento cincuenta mg de 24 en DMF (10 mL) y se añadió 1 equivalente de HATU seguido de 2 equivalentes de DIPEA. Se añadió un eq. y medio de glicinaOtBu y se agitó durante la noche. El DMF se evaporó y el residuo se trató con 5 mL de HCl 1 N en dioxano durante 30 minutos con agitación. El disolvente se evaporó y el residuo bruto se purificó instantáneamente en una columna de gel de sílice de 4 gramos eluida con isopropanol al 0-10 % durante 15 minutos. La evaporación de las fracciones puras proporcionó 110 mg de 25 puro.

Se disolvió el compuesto 25 (50 mg) en 10 mL de DMF y se añadió 1.5 eq. de PTF seguido de 1.2 eq. de DCC y 2 mg de DMAP. La reacción se agitó durante la noche, se concentró hasta la sequedad y se purificó sobre gel de sílice (columna de 4 g) eluida con IPA al 0-10 % en DCM obteniéndose 32 mg de éster de TFP puro, compuesto 26, después de la liofilización en agua con acetonitrilo 1:3.

Conjugación con anticuerpo: El éster de TFP, compuesto 26, se disolvió en DMSO anhidro para preparar 20 mM de solución madre y se añadieron 5 equivalentes molares (en relación con el anticuerpo) a 20 mg de anticuerpo a 10 mg/ml en PBS. La reacción de conjugación se incubó a 4 °C durante 6 horas. El tampón del inmunoconjugado resultante, BB-24, se intercambió a PBS (pH 7.4) eliminándose el exceso de impurezas de peso molecular pequeño. La concentración final de proteína se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro Nanodrop 1000. El rendimiento fue de 15 mg (75 % en base a la proteína recuperada). El análisis SEC detectó un agregado mínimo de menos del 1 % y se determinó que el DAR era de 2.8 adyuvantes por anticuerpo mediante análisis LC/MS. El inmunoconjugado purificado se filtró a través de un filtro estéril de 0.2 µM y se almacenó a -20 °C hasta que se necesitó.

Ejemplo 18. Síntesis del inmunoconjugado BB-37 con un éster de TFP

Esquema 25



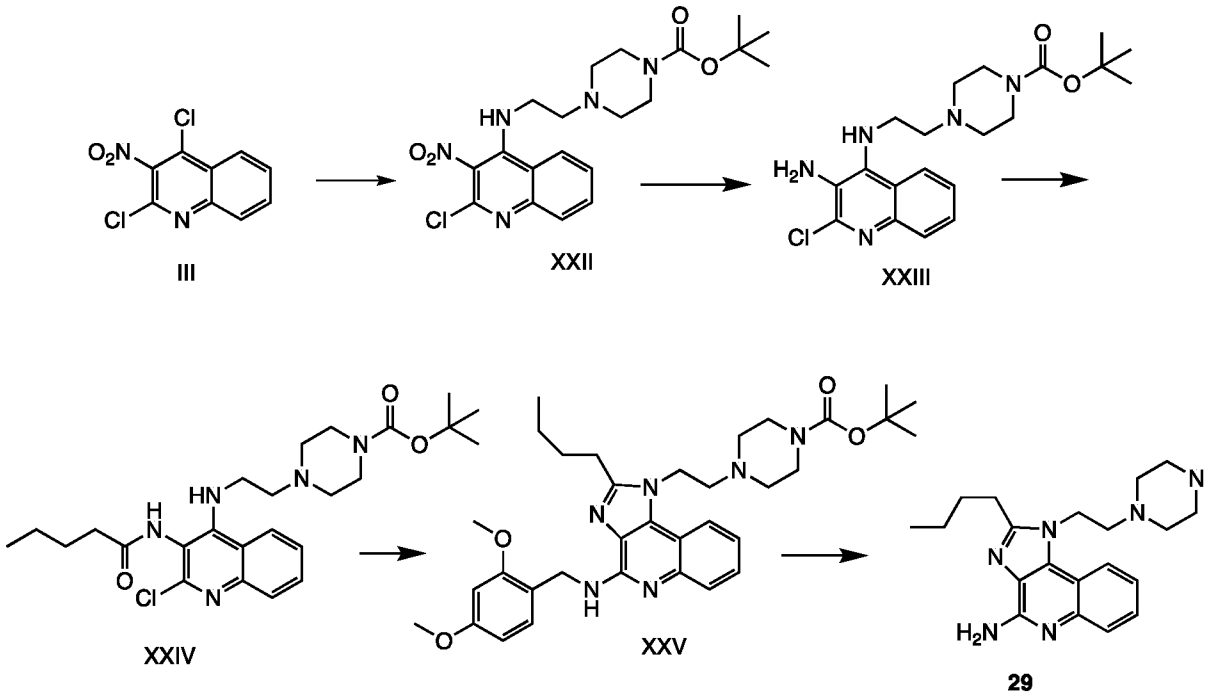
Este ejemplo proporciona orientación sobre la síntesis de un inmunoconjugado con un enlazador diferente utilizando el método de TFP. Se disolvió el compuesto VII (155 mg, 0.5 mmol) en 10 mL de DMF y se añadieron 0.2 mL de DIPEA. En un recipiente separado, se disolvieron 1.2 equivalentes de PEG2-monoéster metílico de dicarboxilato en 5 mL de DMF y se añadieron 2 equivalentes de DIPEA seguido de HATU (1.2 equivalentes). La mezcla se añadió a VII y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. La reacción se concentró hasta la sequedad al vacío y el residuo se disolvió en THF (5 mL). Se añadió un volumen igual de agua seguido de 2 mL de LiOH acuoso 1 M. La mezcla se agitó durante la noche y luego se añadieron 10 mL de HCl 1 N. La mezcla acidificada se extrajo 2 veces con diclorometano, se secó sobre sulfato de sodio, se concentró hasta la sequedad y se purificó mediante cromatografía en gel de sílice. El producto se eluyó con metanol al 0-10 % durante 10 minutos. Las fracciones puras se combinaron y se concentraron obteniéndose 110 mg del compuesto 27 puro en forma de un sólido amarillo pálido.

Se disolvió el compuesto 27 (50 mg) en diclorometano/dimetilformamida (5 mL, 1:1) y se añadieron 2 equivalentes de TFP seguido de 1.5 equivalentes de EDCI. La reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente y la reacción se concentró hasta la sequedad. El éster de TFP 28 bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en una columna de gel de sílice de 4 gramos eluida con 0-10 % de isopropanol durante 10 minutos. Las fracciones puras se concentraron y el residuo se liofilizó en acetonitrilo al 30 % en agua obteniéndose 41 mg de éster de TFP 23 purificado en forma de un sólido blanco. El peso molecular y la pureza se confirmaron mediante LC/MS.

Conjugación con anticuerpo: El éster de TFP 28 se disolvió en DMSO anhidro para preparar 20 mM de una solución madre y se añadieron 8 equivalentes molares (en relación con el anticuerpo) a 20 mL de un anticuerpo IgG (específicamente, el anticuerpo anti-CD20 rituximab) (10 mg/ml en PBS). La reacción de conjugación se incubó a 4 °C durante la noche. El tampón del inmunoconjugado resultante, BB-37, se intercambió a PBS (pH 7.2) eliminándose el exceso de impurezas de peso molecular pequeño. La concentración final se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro Thermo Nanodrop 1000. El rendimiento fue de 16 mg de inmunoconjugado BB-37, o el 70 % en base a la proteína recuperada. Se detectó un agregado mínimo (menos del 1%) mediante análisis SEC y se determinó un DAR de 2.3 mediante análisis LC/MS. El inmunoconjugado purificado se filtró a través de un filtro estéril de 0.2 µM y se almacenó a -20 °C.

Ejemplo 19. Síntesis de otro adyuvante de TLR7/8

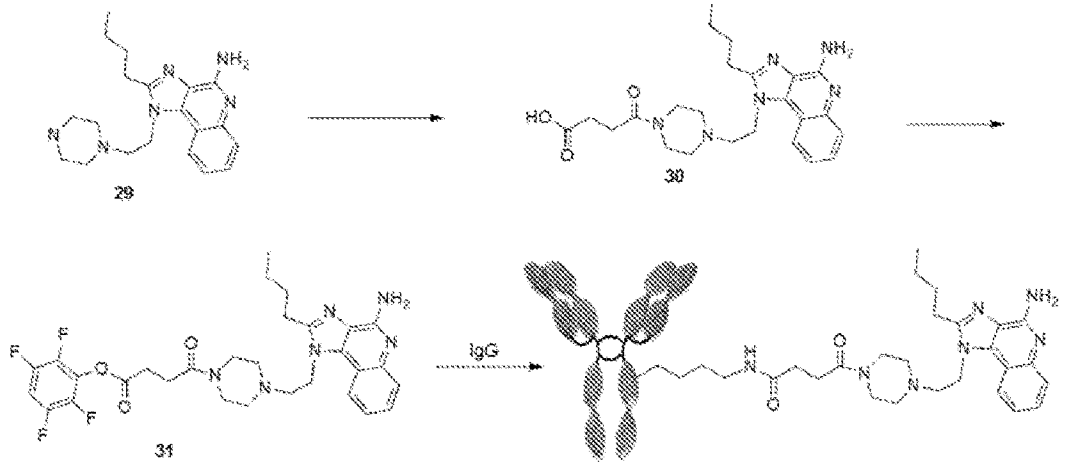
Esquema 26



Este ejemplo proporciona orientación sobre la síntesis de otro agonista de TLR. El compuesto 29 es un análogo del compuesto VII que contiene una cadena lateral de piperizina para la unión con el enlazador. Se sintetizó usando los métodos descritos previamente para la síntesis del compuesto VII, excepto que se sustituyó el Boc-diaminobutano utilizado en la etapa 3 de la síntesis por un análogo de piperizina protegido con Boc. La ruta sintética general para el compuesto 29 se describe en el esquema 23. La adición de la cadena lateral de piperizina permite la síntesis de inmunoconjugados que previamente eran inaccesibles debido a la inestabilidad. Análogos parecidos del compuesto VII que contienen enlazadores de succinato son propensos a la ciclación después de la activación de TFP y la piperizina impide la ciclación. Además, el grupo amino terciario dentro de la piperizina mantiene una carga positiva después de la unión y conjugación del enlazador. Las cargas positivas en esta ubicación son importantes para mejorar la potencia de TLR8. Posteriormente se usó el compuesto 29 para sintetizar inmunoconjugados como se describe a continuación en los ejemplos 19-21.

Ejemplo 20. Síntesis de inmunoconjugado BB-42 con un éster de TFP

Esquema 27



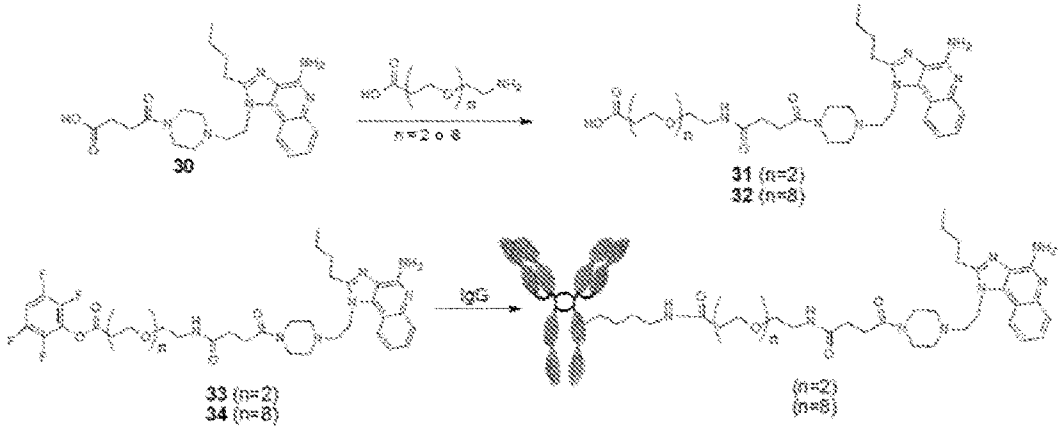
Este ejemplo proporciona orientación sobre la síntesis de un inmunoconjugado con un enlazador diferente utilizando el método del éster de TFP. Se disolvió el compuesto 29 (100 mg) en 10 mL de THF y se añadieron 2 mL de bicarbonato de sodio acuoso saturado seguido de 10 mL de agua. Se añadió anhídrido succínico (50 mg) en una porción y la mezcla se agitó a temperatura ambiente. Después de una hora, se añadieron lentamente 20 mL de HCl 1 N y la mezcla de reacción se extrajo con 2x 50 mL de diclorometano ("DCM"). Los extractos orgánicos combinados se evaporaron hasta la sequedad. El producto bruto 30 se purificó en una columna de gel de sílice de 4 gramos eluida con isopropanol al 0-15 % en DCM (ácido acético al 1 %) durante 15 minutos. Las fracciones puras se combinaron y se evaporaron hasta la sequedad obteniéndose 80 mg de ácido puro 30.

Se disolvió el compuesto 30 (50 mg) en diclorometano/dimetilformamida (5 mL, 1:1) y se añadieron 2 equivalentes de TFP seguido de 1.5 equivalentes de EDCI. La reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente y la reacción se concentró hasta la sequedad. El éster de TFP 31 bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida y se eluyó con 0-10 % de isopropanol durante 10 minutos. Las fracciones puras se concentraron y el residuo se liofilizó en acetonitrilo al 30 % en agua obteniéndose 41 mg de éster de TFP 31 purificado en forma de un sólido blanco. El peso molecular y la pureza se confirmaron mediante LC/MS.

El éster de TFP 31 se conjugó con un anticuerpo IgG1 (específicamente, el anticuerpo anti-CD20 rituximab) como se describe previamente para el BB-24 obteniéndose el BB-42. Los análisis SEC y LC/MS de BB-42 confirmaron el peso molecular, una alta pureza monomérica con menos del 2 % de agregado y un DAR de 1.7 (véanse las figuras 20A-B).

Ejemplo 21. Síntesis de inmunoconjugado BB-43 y BB-44 con un éster de TFP

Esquema 28



Este ejemplo proporciona orientación sobre la síntesis de inmunoconjugados con diferentes enlazadores utilizando el método del éster de TFP. El compuesto 30 (esquema 25) se acopló a enlazadores de polietilenglicol (PEG) que contenían 2 u 8 unidades de PEG para ampliar la distancia entre el adyuvante y el anticuerpo. La unión de las extensiones del enlazador PEG se realizó utilizando protocolos descritos previamente para la unión con el enlazador y la activación de TFP. Brevemente, se disolvieron 100 mg del compuesto 30 en 10 mL de DMF y se añadieron 0.2 mL de DIPEA seguido de HATU (1.2 equivalentes). Después de 1 hora, se añadió el enlazador amino PEG apropiado (n = 2 u 8) y se agitó durante 2 horas más a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró hasta la sequedad al vacío y el residuo se purificó mediante HPLC preparativa en una columna C-18 eluida con acetonitrilo al 10-90 % en agua durante 30 minutos. Las fracciones puras se combinaron y se liofilizaron obteniéndose 65 mg y 45 mg de los intermedios 31 o 32 en forma de una sustancia vítrea transparente.

Los compuestos 31 y 32 se convirtieron en los correspondientes ésteres de TFP 33 y 34 usando protocolos descritos previamente. Brevemente, el ácido libre 31 o 32 (50 mg) se disolvió en diclorometano/dimetilformamida (5 mL, 1:1) y se añadieron 2 equivalentes de TFP seguido de 1.5 equivalentes de EDCI. La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente y se concentró hasta la sequedad obteniéndose los ésteres de TFP brutos 33 y 34. Los ésteres de TFP brutos se purificaron mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice y se eluyeron con isopropanol al 0-10 % durante 10 minutos. Las fracciones puras se concentraron y el residuo se liofilizó en acetonitrilo al 30 % en agua obteniéndose los ésteres de TFP 33 y 34 purificados como sólidos transparentes. El peso molecular y la pureza de los compuestos puros se confirmaron mediante LC/MS.

Conjugación con anticuerpo: Los ésteres de TFP 33 y 34 se conjugaron con un anticuerpo IgG1 (específicamente, el anticuerpo anti-CD20 rituximab) utilizando los protocolos descritos previamente. Los ésteres de TFP se disolvieron en DMSO anhidro para preparar 20 mM de una solución madre y se añadieron 8 equivalentes molares (en relación con el anticuerpo) a 20 mg del anticuerpo IgG a 10 mg/ml en PBS. La reacción de conjugación se incubó a 4 °C durante 12 horas. El tampón del inmunoconjugado resultante, BB-43 y BB-44, se intercambió a PBS (pH 7.4) eliminándose el exceso de impurezas de peso molecular pequeño. La concentración final de proteína se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro Nanodrop 1000. Los rendimientos fueron del 75 % en base a la proteína recuperada. El análisis SEC detectó que había un agregado mínimo y los DAR de 1.0 y 1.7 adyuvantes por anticuerpo se determinaron mediante análisis LC/MS. Los inmunoconjugados purificados se filtraron a través de un filtro estéril de 0.2 µM y se almacenaron a -20 °C hasta que se necesitaron.

Ejemplo 22. Evaluación de la actividad del inmunoconjugado *in vitro*

Aislamiento de células presentadoras de antígeno humano. Se seleccionaron negativamente células presentadoras de antígenos (APC) humanas a partir de células mononucleares de sangre periférica humana obtenidas a partir de donantes de sangre sanos (Stanford Blood Center) mediante centrifugación en gradiente de

densidad utilizando un cóctel de enriquecimiento de monocitos humanos RosetteSep (Stem Cell Technologies) que contenía anticuerpos monoclonales contra CD14, CD16, CD40, CD86, CD123 y HLA-DR. Posteriormente, las APC inmaduras se purificaron con una pureza > 97 % mediante selección negativa utilizando un kit de enriquecimiento de monocitos humanos EasySep sin agotamiento de CD16 que contenía anticuerpos monoclonales contra CD14, CD16, CD40, CD86, CD123 y HLA-DR.

Preparación de las células tumorales. Las células tumorales se volvieron a suspender en PBS con suero fetal bovino (FBS) al 0.1 % de 1 a 10 x 10^6 células/ml. Posteriormente, las células se incubaron con 2 µM de CFSE para producir una concentración final de 1 µM. La reacción finalizó después de 2 minutos mediante la adición de 10 mL de medio completo con FBS al 10 % y se lavó una vez con el medio completo. Las células se fijaron en paraformaldehído al 2 % y se lavaron tres veces con PBS o se dejaron sin fijar antes de congelar las células en DMSO al 10 %, FBS al 20 % y medio al 70 %.

Cocultivos de APC tumorales. 2 x 10^5 APC se incubaron con o sin 6.5 x 10^5 células tumorales alogénicas marcadas con CFSE en placas de 96 pocillos (Corning) que contenían medio IMDM (Gibco) complementado con suero fetal bovino al 10 %, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio, aminoácidos no esenciales y, donde se indica, se prepararon diversas concentraciones de anticuerpo CD20 no conjugado, e inmunoconjugados de la invención según los ejemplos anteriores. Las células y los sobrenadantes libres de células se analizaron después de 18 horas mediante citometría de flujo o ELISA.

Los resultados de este ensayo se muestran en las figuras 9A-9F para el BB-17 y BB-01. Específicamente, los gráficos muestran que el BB-17 y el BB-01 preparados según los esquemas 11 y 14 desencadenan la activación mieloide mientras que el anticuerpo CD20 no conjugado de control no lo hace. Además, las figuras 23A-D muestran que el BB-14 provoca la activación mieloide como se indica en CD14, CD20, CD86 y HLA-DR mientras que el control no lo hace. Las figuras 24A-D muestran que el BB-15 provoca la activación mieloide como se indica en CD14, CD20, CD86 y HLA-DR mientras que el control no lo hace. Las figuras 25A-D muestran que el BB-27 provoca la activación mieloide como se indica en CD14, CD20, CD86 y HLA-DR mientras que el control no lo hace. Las figuras 26A-D muestran que el BB-45 provoca la activación mieloide como se indica en CD14, CD20, CD86 y HLA-DR mientras que el control no lo hace. Las figuras 27A-D muestran que el BB-24 provoca la activación mieloide como se indica en CD14, CD20, CD86 y HLA-DR mientras que el control no lo hace.

Ejemplo 23. Comparación de BB-01 con el conjugado comparativo IRM1 y el conjugado comparativo IRM2

Como se explica previamente, los inmunoconjugados se describen en la patente estadounidense 8.951.528 ("la patente '528"). Este ejemplo muestra que los inmunoconjugados descritos en la presente memoria son superiores a los inmunoconjugados descritos en la patente '528. El BB-01 se sintetizó según el esquema 15. Se prepararon conjugados comparativos IRM1 e IRM2 usando los adyuvantes descritos en la patente '528 como adyuvantes IRM1 e IRM2. Específicamente, el IRM1 e IRM2 se conjugaron con un anticuerpo IgG (específicamente, el anticuerpo anti-CD20 rituxumab) con un enlazador amida.

Se analizó el BB-01 y los conjugados comparativos IRM1 e IRM2 usando el ensayo del ejemplo 9. Los resultados se muestran en las figuras 10A-10F y 11A-11C. Concretamente, las figuras 10A-10F muestran que el BB-01 preparado según el esquema 11 provoca la activación mieloide mientras que los conjugados comparativos IRM1 e IRM2 y el anticuerpo CD20 no conjugado de control no lo hacen. Además, las figuras 11A-11C muestran que BB-01 preparado según el esquema 11 provoca la secreción de citocinas mientras que los conjugados comparativos IRM1 e IRM2 y el anticuerpo CD20 no conjugado de control no lo hacen.

Los conjugados comparativos IRM1 e IRM2 tuvieron una agregación excesiva según lo según lo determinado por LC/MS. Las figuras 15A-C muestran los resultados de la cromatografía de exclusión por tamaño después de la filtración con un filtro de 0.2 µM. El conjugado comparativo IRM1 tuvo una agregación del 4 % y se indica mediante el primer pico a los 4.5 min. El conjugado comparativo IRM2 tuvo una agregación del 9.5 % y se indica mediante el primer pico a los 4.5 min. Por el contrario, el BB-01 tuvo una pequeña cantidad de agregación. Esta diferencia se debe en parte al intermedio tiolado que tienen IRM1 e IRM2, que no es necesario para la síntesis de BB-01.

También se analizó la estabilidad en almacenamiento de BB-01 y los conjugados comparativos IRM1 e IRM2. Después de la síntesis, los conjugados se almacenaron en tubos cónicos de 15 mL durante varias horas. Después del almacenamiento, el tubo que contenía el conjugado comparativo IRM2 tenía un gran agregado sólido blanco en el fondo del tubo. Los tubos que contenían BB-01 y el conjugado comparativo IRM1 contenían únicamente fluido transparente y no tenían sedimentos.

Ejemplo 24. Generación de anticuerpo del anticompuesto 1

Se conjugó KLH (ThermoFisher, producto n.° 77600) o albúmina de suero bovino (Thermo Fisher, producto n.° 29130) con el compuesto 1 usando química reactiva con amina.

Para producir anticuerpos de conejo, se inmunizaron conejos inyectando en la almohadilla plantar 200 ug de conjugado KLH-compuesto 1, formulado en adyuvante completo de Freund. Los animales recibieron un refuerzo con 100 ug adicionales de conjugado inmunógeno 14, 28 y 42 días después de la primera administración. Se recogió sangre los días 35 y 49 y se aisló el suero y se analizó mediante ELISA para detectar anticuerpos del

anticompuesto 1. Las placas ELISA se recubrieron con conjugado BSA-compuesto 1 y los anticuerpos se detectaron con IgG anticonejo conjugada con peroxidasa (Jackson Immunoresearch, producto n.º 111-035-144).

Para producir anticuerpos murinos, a ratones C57BL/6 se les inyectaron por vía intravenosa 100 ug de conjugado del compuesto 1, seguido de dosis repetidas los días 6, 12 y 24 después de la primera administración. Se recogió sangre 12 y 24 días después de la administración y se analizó el suero mediante ELISA para detectar anticuerpos del anticompuesto 1. Después de una detección suficiente de anticuerpos, se recogió sangre, bazo y ganglios linfáticos y se cosechó en una suspensión de células individuales. Posteriormente, las células B se aislaron mediante selección negativa y se clasificaron mediante FACS. Se recogieron células B que dieron resultado positivo en la tinción de IgG, dieron resultado negativo en la tinción de IgM e IgD y dieron resultado positivo en la tinción para la interacción con el compuesto 1, según se midió usando un conjugado BSA-compuesto 1 y estreptavidina marcada con fluorescencia. Las células B aisladas se lavaron dos veces en medio completo y luego se fusionaron con células de mieloma SP2O usando polietilenglicol 1500 (Roche, producto n.º 10 783 641 001) según las instrucciones del fabricante. Las células de mieloma SP2O se mantuvieron antes de la fusión en DMEM complementado con FBS al 10 %, glutamina y penicilina estreptomicina. Las células fusionadas se sembraron a aproximadamente 100 000 células por pocillo en placas planas de 96 pocillos. Después de 1 a 2 días de incubación, se añadieron al medio el complemento HAT e IL-6 (producto ThermoFisher n.° 21060017 y producto Gibco n.° PHC0065). Se tomaron muestras del medio de 10 a 14 días después y se analizó mediante ELISA como se describe previamente para medir el anticuerpo del anticompuesto 1. Los clones positivos se expandieron, se subclonaron mediante dilución limitante y se analizaron adicionalmente para confirmar la producción de anticuerpos y, posteriormente, se criopreservaron las hibridomas. Las hibridomas se cultivaron en matraces tratados con cultivo de tejidos a 37 grados Celsius con CO_2 al 5 % en 10 % de medio completo e hibridoma-SFM al 90 % (Gibco, producto n.º 12045076). El medio se reemplazó con hibridoma-SFM al 100 % y las células se cultivaron durante 3 a 6 días más. Se recogió el medio y se filtró a través de un filtro de 0.22 µm. El anticuerpo se purificó utilizando columnas Hi-Trap Mabselect (GE Life Sciences, producto n.º 28-4082-53) y el tampón se intercambió a PBS estéril mediante diálisis o mediante columnas de desalinización.

Ejemplo 25: Detección de conjugación mediante ELISA

En cinco casos, el estado de conjugación de un constructo de anticuerpo no se pudo resolver mediante LC/MS a causa de la heterogeneidad del producto. Para determinar si la conjugación fue satisfactoria, se utilizó un ensayo ELISA. El anticuerpo utilizado para detectar la presencia de adyuvante en el anticuerpo fue el anticuerpo del anticompuesto 1 descrito en el ejemplo 18.

Las figuras X indican que las conjugaciones fueron satisfactorias para el inmunoconjugado de cetuximab, el anticuerpo desnudo de etanercept, el inmunoconjugado de etanercept, el inmunoconjugado de ipilimumbab y el inmunoconjugado de obinutuzumab.

Ejemplo 26. Detección ELISA del compuesto 1 acoplado a IgG humana de Ig-Fc humana

Se recubrieron placas ELISA Maxysorp (Fisher 44-2404-21) durante la noche con 1 ug/ml de IgG antihumana de cabra (Jackson Immunoresearch). Las placas se bloquearon con PBS que contenía BSA al 1% (Sigma A7030) y se incubaron con una titulación de los anticuerpos indicados o los conjugados de Boltbody (BB-01) correspondientes. Los anticuerpos unidos se detectaron con IgG antihumana de cabra conjugada con peroxidasa (Jackson), o un anticuerpo monoclonal de ratón contra el compuesto 1 seguido de IgG antirratón de cabra conjugada con peroxidasa (fragmento Fc específico). Se añadió TMB a los pocillos y se midió la absorbancia a 450 nM después de detener la reacción con la solución de parada de TMB (Fisher NC1291012).

Ejemplo 27. Detección ELISA del compuesto 1 acoplado a antidectina 2 de ratón

Se recubrieron placas de ELISA Maxisorp (Fisher 44-2404-21) durante la noche con 1 ug/ml de antidectina 2 de ratón (Invivogen) o antidectina 2 de ratón BB-01. Las placas se bloquearon con PBS que contenía BSA al 1 % (Sigma A7030) y se incubaron con cantidades tituladas de anti-IgG de ratón de cabra conjugada con peroxidasa, específica de cadena pesada y ligera (Jackson 115-035-003) para la detección del total de IgG, o cantidades tituladas de antisuero de conejo del anticompuesto 1 para la detección de Boltbody. Se detectó el anticompuesto 1 de conejo con anti-IgG de conejo caprino conjugada con peroxidasa, reactividad cruzada mínima con proteínas séricas humanas, de ratón y de rata (Jackson 111-035-144). Se añadió TMB a los pocillos y se midió la absorbancia a 450 nM después de detener la reacción con la solución de parada de TMB (Fisher NC1291012).

Aunque los párrafos anteriores se han descrito con bastante detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad y comprensión, un experto en la materia apreciará que se pueden poner en práctica determinados cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 28. Método para determinar la actividad de unión a la proteína A.

Se incubaron muestras duplicadas de rituximab o rituximab BB-37 (100 ul, 50 ug/ml en PBS) con 12.5 ul de perlas de sefarosa de proteína A (Thermo Fisher 22810) con rotación durante la noche. Las perlas se sedimentaron mediante centrifugación, se eliminó el sobrenadante y el líquido residual se eliminó de las perlas usando una punta de pipeta fina. Se añadió a las perlas tampón de muestra de Laemmli no reductor (100 ul). Las perlas y los

sobrenadantes se calentaron a 90 °C durante 5 minutos y se analizaron fracciones iguales mediante SDS-PAGE (gel NUPAGE al 4-12 %, tampón MOPS) seguido de tinción con Coomassie (GelCode™ Blue, ThermoFisher). El estándar de peso molecular es el marcador SeeBlue® Plus 2 (ThermoFisher LC5925). Como se observa en la figura 133C, la conservación de la unión a la proteína A en el rituximab BB-37 sugiere la conservación de la unión a FcRN.

Ejemplo 29. Método para determinar la actividad de unión a CD16a.

Se recubrieron placas de ELISA Maxysorp durante la noche con 1.5 ug/ml de proteína CD16a humana recombinante R&D Systems 4325-FC-050). Las placas se bloquearon con PBS que contenía BSA al 1 % y se incubaron con una titulación de anticuerpos o inmunoconjugados de anticuerpos. Los anticuerpos unidos se detectaron con peroxidasa conjugada AffiniPure F(ab') fragmento de IgG antihumana de cabra (Jackson 109-036-003). Se añadió TMB (Fisher PI34028) a los pocillos y se midió la absorbancia a 450 nM después de detener la reacción con la solución de parada de TMB (Fisher NC1291012). Como se observa en la figura 133A, el mutante glicosilado de rituximab muestra una unión disminuida, coherente con el papel de la glicosilación en la función efectora.

Ejemplo 30. Método para la determinación de la actividad de unión a CD64.

Se recubrieron placas de ELISA Maxysorp durante la noche con 1.5 ug/ml de proteína CD64 humana recombinante (R&D Systems). Las placas se bloquearon con PBS que contenía BSA al 1 % y se incubaron con una titulación de rituximab o inmunoconjugados de rituximab (rituximab BB-01). Los anticuerpos unidos se detectaron con un fragmento F(ab') de IgG antihumano de cabra AffiniPure conjugado con peroxidasa utilizando el desarrollo de color de TMB y se midió la absorbancia a 450 nM después de detener la reacción. Como se observa en la figura 133B, el rituximab que se había desglicosilado con PNGasa F muestra una unión deteriorada a CD64.

El uso de los términos "un" y "una" y "el" y "por lo menos uno" y referentes parecidos en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones siguientes) deben interpretarse como que cubren tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en la presente memoria o el contexto lo contradiga claramente. El uso del término "por lo menos uno" seguido de una lista de uno o más elementos (por ejemplo, "por lo menos uno de A y B") debe interpretarse en el sentido de un elemento seleccionado entre los elementos enumerados (A o B) o cualquier combinación de dos o más de los elementos enumerados (A y B), a menos que se indique lo contrario en la presente memoria o que el contexto lo contradiga claramente. Los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" deben interpretarse como términos abiertos (es decir, que significan "que incluyen, pero no se limitan a"), a menos que se indique lo contrario. La enumeración de intervalos de valores en la presente memoria tiene la intención de servir meramente como un método abreviado de referirse individualmente a cada valor separado que se encuentra dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario en la presente memoria, y cada valor separado se incorpora a la memoria descriptiva como si se mencionara individualmente en la presente memoria. Todos los métodos descritos en la presente memoria se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en la presente memoria o que el contexto lo contradiga claramente. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o del lenguaje ejemplar (p. ej., "tales como") provisto en la presente memoria, tiene como objetivo meramente iluminar mejor la invención y no representa una limitación en el alcance de la invención a menos que se reivindique lo contrario. Ninguna expresión en la memoria descriptiva debe interpretarse en el sentido indicar que algún elemento no reivindicado es fundamental para la práctica de la invención.

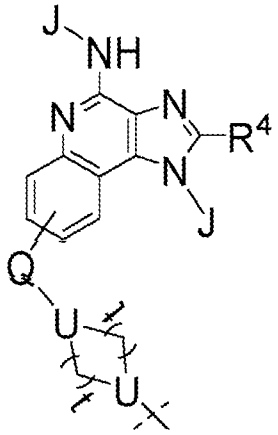
En la presente memoria se describen realizaciones preferidas de la presente invención, incluido el mejor modo conocido por los autores de la invención para llevar a cabo la invención. Las variaciones de esas realizaciones preferidas pueden resultar evidentes para los expertos en la materia tras leer la descripción anterior.

REIVINDICACIONES

1. Un inmunoconjugado que comprende

(a) un constructo de anticuerpo que comprende (i) un dominio de unión al antígeno y (ii) un dominio Fc,

(b) adyuvante de fórmula:



Ady 4c

en el que cada J independientemente es hidrógeno, OR^4, o R^4; cada R^4 independientemente es hidrógeno, o un grupo alquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, arilalquilo o heteroarilalquilo que comprende de 1 a 8 unidades de carbono; cada U es independientemente CH o N en el que por lo menos una U es N; cada subíndice t independientemente es un número entero de 1 a 3; y Q está ausente, y la línea discontinua del adyuvante representa el punto de unión del adyuvante, y

(c) un enlazador,

en el que el adyuvante está unido de forma covalente al constructo de anticuerpo por medio del enlazador.

2. El inmunoconjugado de la reivindicación 1, en el que cada U es N.

3. El inmunoconjugado de la reivindicación 1, en el que cada subíndice t es 2.

4. El inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el dominio de unión al antígeno se une a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en CDH1, CD19, CD20, CD29, CD30, CD38, CD40, CD47, EpCAM, MUC1, MUC16, EGFR, VEGF, HER2, SLAMF7, PDGFRa, gp75, CTLA4, PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG-3, B7-H4, KIR, TNFRSF4, OX40L, IDO-1, IDO-2, CEACAM1, BTLA, TIM3, A2Ar, VISTA, CLEC4C (BDCA-2, DLEC, CD303, CLECSF7), CLEC4D (MCL, CLECSF8), CLEC4E (Mincle), CLEC6A (dectina 2), CLEC5A (MDL-1, CLECSF5), CLEC1B (CLEC-2), CLEC9A (DNGR-1), y CLEC7A (dectina 1), y preferiblemente HER2, EGFR, PD-L1 y CD20.

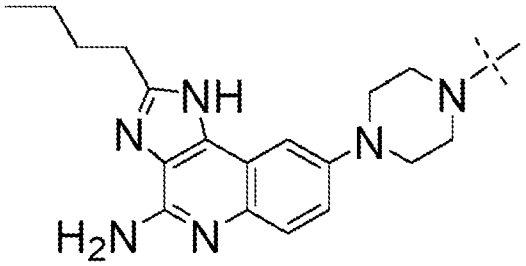
5. El inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el dominio de unión al antígeno se une a HER2 y en el que opcionalmente el anticuerpo es trastuzumab, un biosimilar de trastuzumab, pertuzumab o un biosimilar de pertuzumab.

6. El inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el dominio de unión al antígeno se une a EGFR y en el que opcionalmente el anticuerpo es cetuximab o un biosimilar de cetuximab.

7. El inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el dominio de unión al antígeno se une a PD-L1, y en el que opcionalmente el anticuerpo es atezolizumab, un biosimilar de atezolizumab, avelumab, un biosimilar de avelumab, durvalumab o un biosimilar de durvalumab.

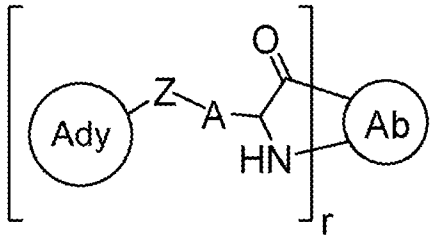
8. El inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el dominio de unión al antígeno se une a CD20 y en el que opcionalmente el anticuerpo es rituximab, un biosimilar de rituximab, obinutuzumab o un biosimilar de obinutuzumab.

9. El inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el adyuvante es



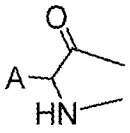
Ady-N

10. El inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el inmunoconjugado tiene una estructura según la fórmula I:



(I)

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que,

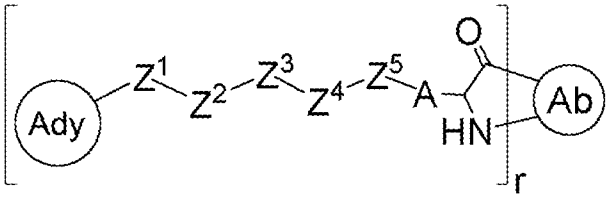
Ab es el anticuerpo siendo  un residuo de aminoácido del anticuerpo, en el que A es una cadena lateral modificada o no modificada del residuo de aminoácido,

Z es el enlazador,

Ady es el adyuvante,

y el subíndice r es un número entero del 1 al 10.

11. El inmunoconjugado de la reivindicación 10, en el que el inmunoconjugado tiene una estructura según la fórmula II:



(II)

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que Ab es un anticuerpo en el que A es una cadena lateral de aminoácidos no modificada en el anticuerpo o una cadena lateral de aminoácidos modificada en el anticuerpo;

Ady es el adyuvante,

el subíndice r es un número entero del 1 al 10,

Z^1 se selecciona entre -C(O)-, -C(O)NH- y $-CH_2-$,

Z^2 y Z^4 cada uno se selecciona independientemente entre un enlace, alquileno de C_{1-30} y heteroalquileno de 3 a 30 elementos, en el que

uno o más agrupamientos de átomos adyacentes en el alquileno de C_{1-30} y heteroalquileno de 3 a 30 elementos se reemplazan opcional e independientemente por -C(O)-, -$NR^aC(O)$-, or -$C(O)NR^a$-, en el que cada R^a se selecciona independientemente entre H y alquilo de C_{1-6},

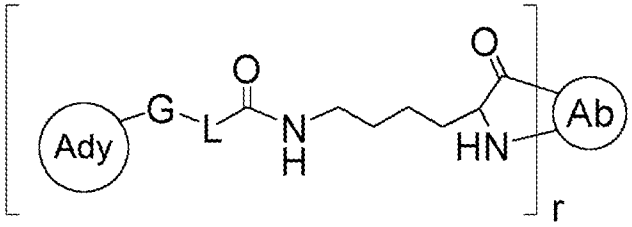
uno o más agrupamientos de átomos adyacentes en el alquileno de C_{1-30} y heteroalquileno de 3 a 30 elementos se reemplazan opcional e independientemente por un carbociclo divalente de 4 a 8 elementos, y

uno o más agrupamientos de átomos adyacentes en el alquileno de C_{1-30} y heteroalquileno de 3 a 30 elementos se reemplazan opcional e independientemente por un heterociclo divalente de 4 a 8 elementos que tiene de uno a cuatro heteroátomos seleccionados de O, S y N,

Z^3 es un enlace, un péptido divalente o un polímero divalente, y

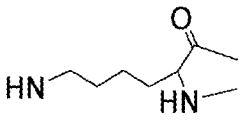
Z^5 está unido a la cadena lateral de una cadena lateral de aminoácido en el anticuerpo.

12. El inmunoconjugado de la reivindicación 10, en el que el inmunoconjugado tiene una estructura según la fórmula III:



(III)

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que,

Ab es el anticuerpo con  siendo un residuo de lisina del anticuerpo,

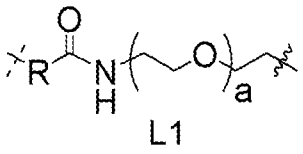
Ady es el adyuvante,

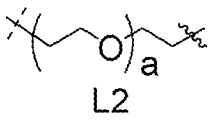
G es CH_2, C=O, o un enlace,

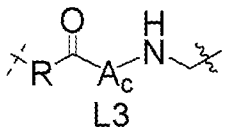
L es un grupo de enlace, y

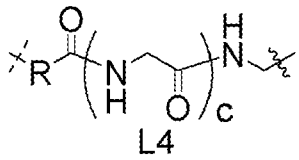
el subíndice r es un número entero del 1 al 10.

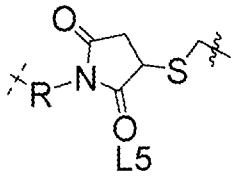
13. El inmunoconjugado de la reivindicación 12, en el que L es

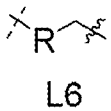

L1

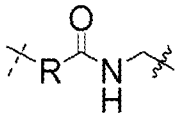

L2

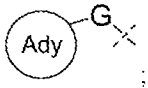
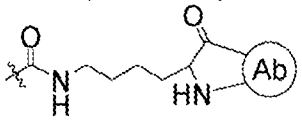

L3


L4

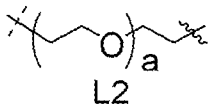

L5

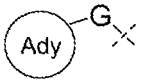
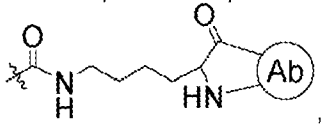

L6


L7

en la que R está opcionalmente presente y es una cadena de alquilo, heteroalquilo, arilo o heteroarilo lineal o ramificada, cíclica o lineal, saturada o insaturada, que comprende de 1 a 8 unidades de carbono; a es un número entero de 1 a 40; cada A se selecciona independientemente entre cualquier aminoácido; el subíndice c es un número entero de 1 a 20; la línea discontinua ("- - -") representa el punto de unión a  ; y la línea ondulada ("~~~") representa el punto de unión a  .

14. El inmunoconjugado de la reivindicación 12 o 13, en el que L es:


L2

, a es un número entero de 1 a 40; la línea discontinua ("- - -") representa el punto de unión a  ; y la línea ondulada ("~~~") representa el punto de unión a  , en el que cada adyuvante está unido de forma covalente al constructo del anticuerpo por medio del enlazador.

15. El inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que G es un enlace.

16. El inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14, en el que a es 1-10.

17. El inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que el subíndice r es un número entero de 1 a 5.

18. El inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que el anticuerpo comprende una

región Fc modificada, opcionalmente en el que (i) la región Fc modificada contiene por lo menos una inserción, deleción o sustitución de aminoácidos y/o (ii) la región Fc modificada está desglicosilada o afucosilada.

19. Una composición que comprende una pluralidad de inmunoconjugados según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, que opcionalmente comprende además uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

20. Un inmunoconjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 o una composición de la reivindicación 19 para su uso en el tratamiento del cáncer.

21. El inmunoconjugado o la composición para su uso según la reivindicación 20, en el que el dominio de unión al antígeno se une a HER2.

22. El inmunoconjugado o la composición para su uso según la reivindicación 20, en el que el cáncer es cáncer de mama, cáncer de cuello o cáncer de cabeza.

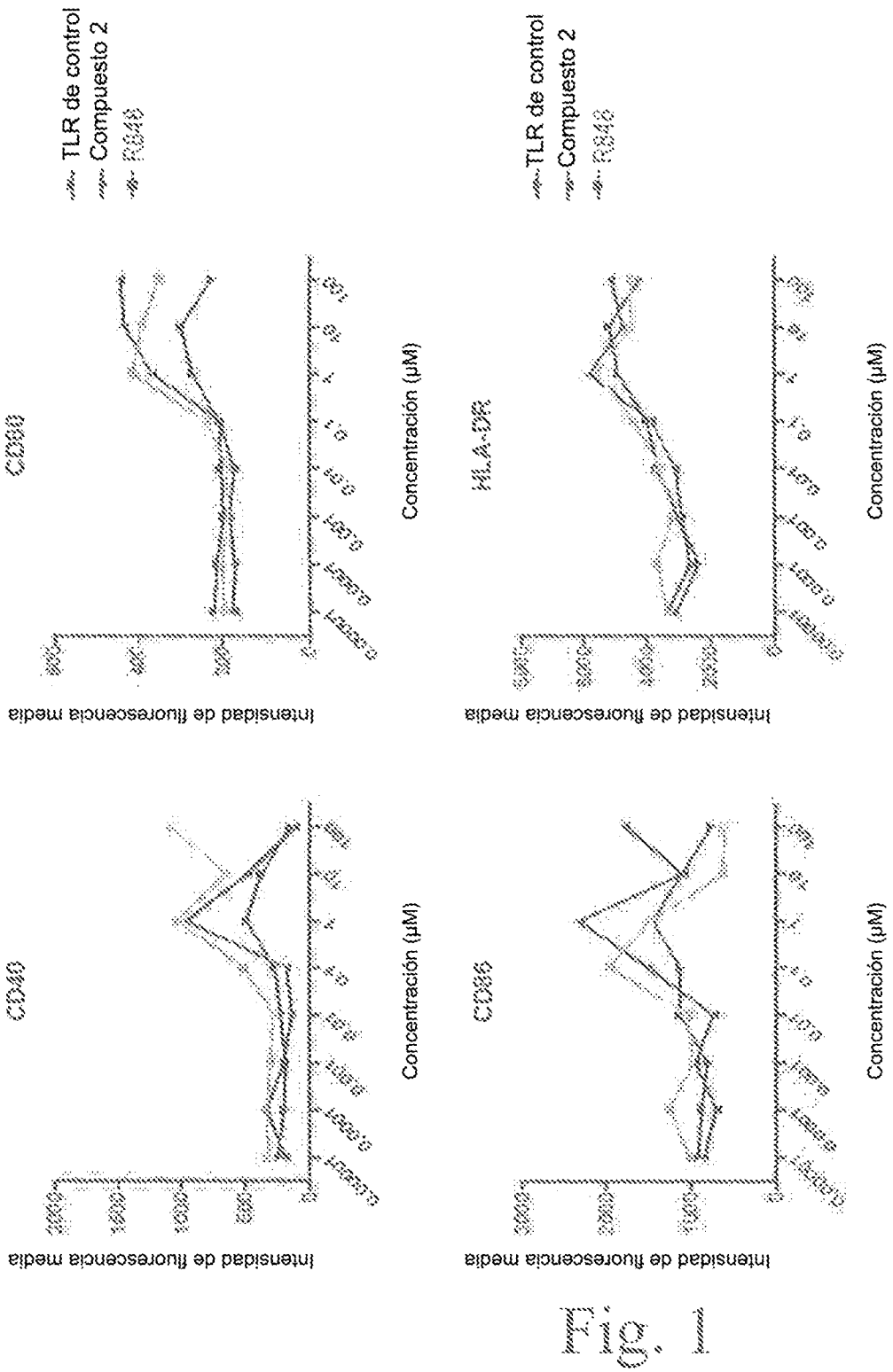

TLR de control
Compuesto 2
R848
CD80
CD40
HLA-DR
CD86
Intensidad de fluorescencia media
Concentración (μM)

Fig. 1

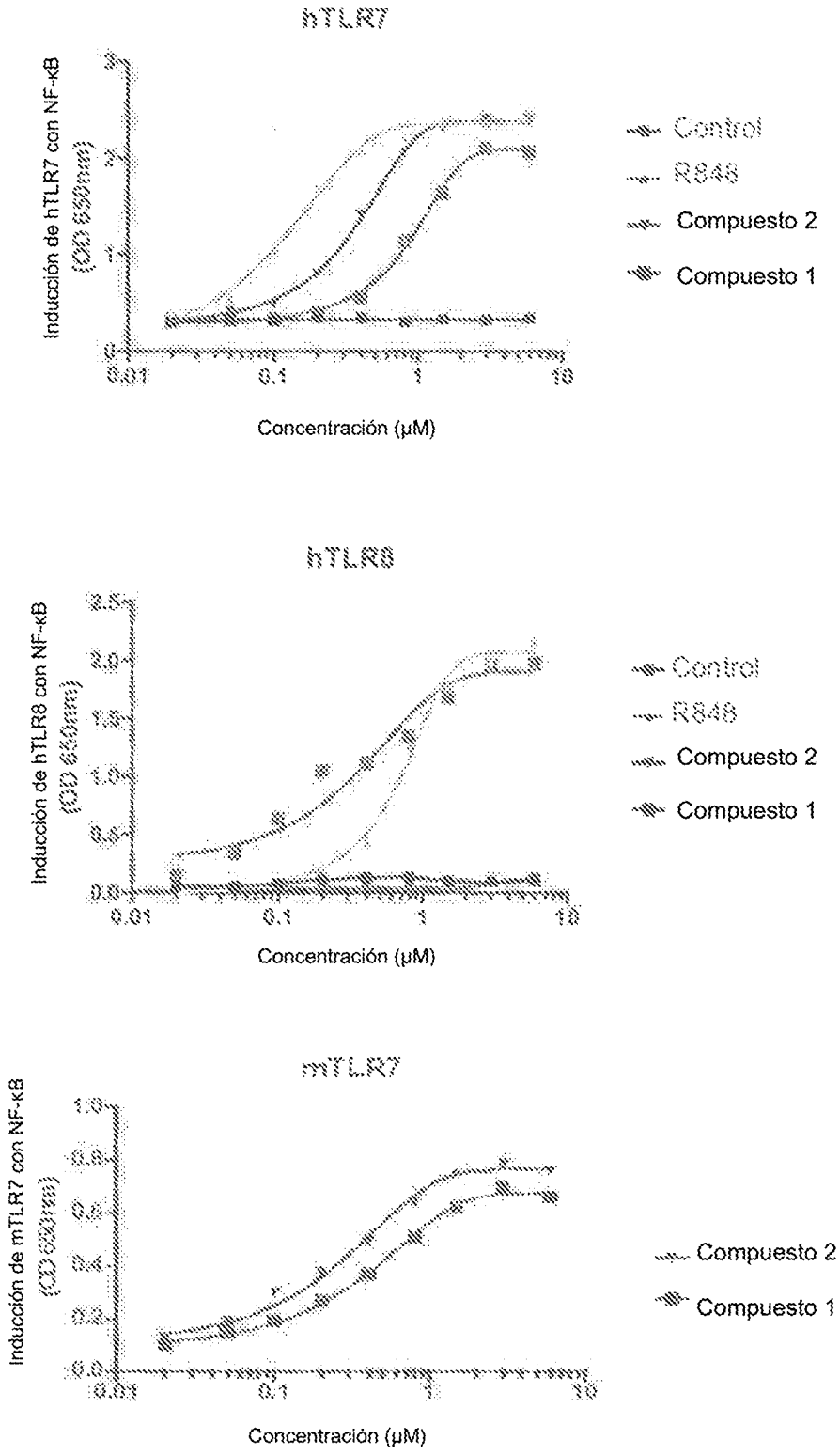

hTLR7
Inducción de hTLR7 con NF-κB
(OD 650nm)
0
1
2
3
0.01
0.1
1
10
Concentración (μM)
Control
R848
Compuesto 2
Compuesto 1
hTLR8
Inducción de hTLR8 con NF-κB
(OD 650nm)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
0.01
0.1
1
10
Concentración (μM)
Control
R848
Compuesto 2
Compuesto 1
mTLR7
Inducción de mTLR7 con NF-κB
(OD 650nm)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
0.01
0.1
1
10
Concentración (μM)
Compuesto 2
Compuesto 1

Fig. 2

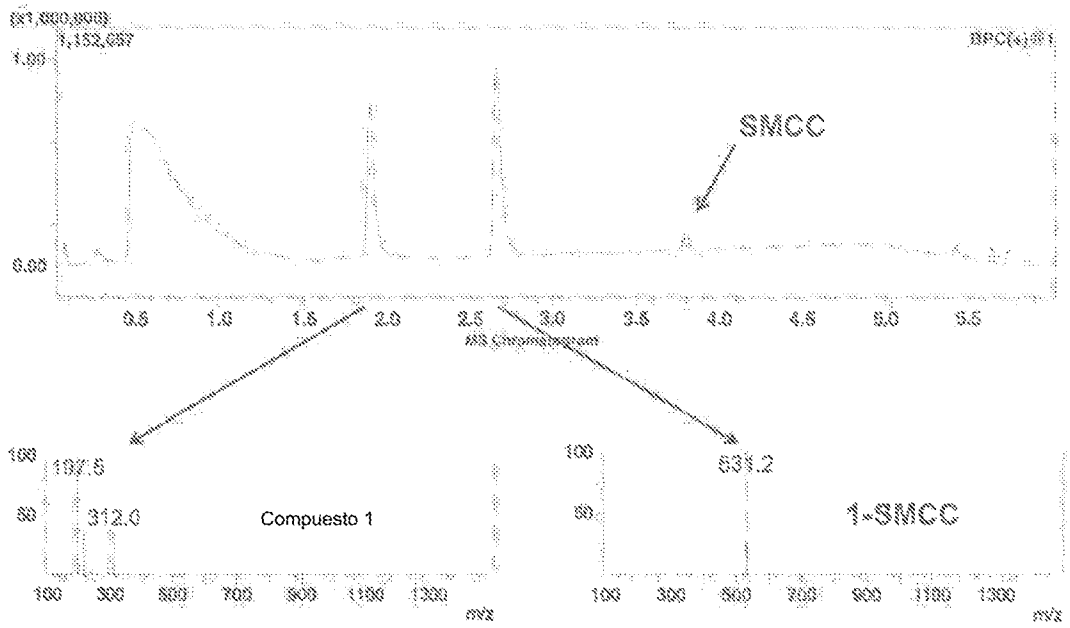

SMCC
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
4.0
4.5
5.0
5.5
197.5
312.0
Compuesto 1
631.2
1-SMCC
100
300
500
700
900
1100
1300
m/z

Fig. 3

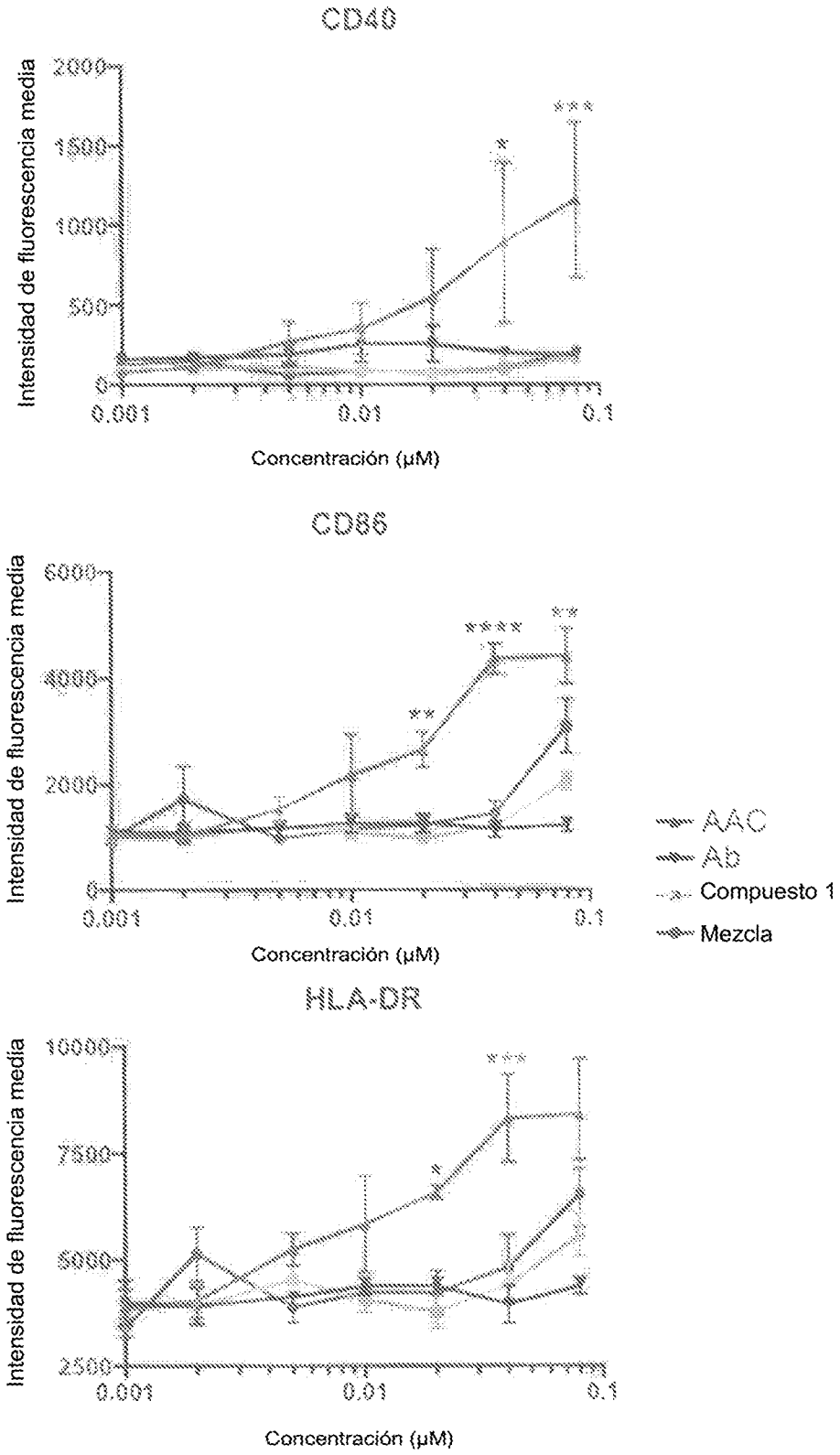

CD40
Intensidad de fluorescencia media
2000
1500
1000
500
0
0.001
0.01
0.1
Concentración (µM)
CD86
Intensidad de fluorescencia media
6000
4000
2000
0
0.001
0.01
0.1
Concentración (µM)
AAC
Ab
Compuesto 1
Mezcla
HLA-DR
Intensidad de fluorescencia media
10000
7500
5000
2500
0.001
0.01
0.1
Concentración (µM)

Fig. 4

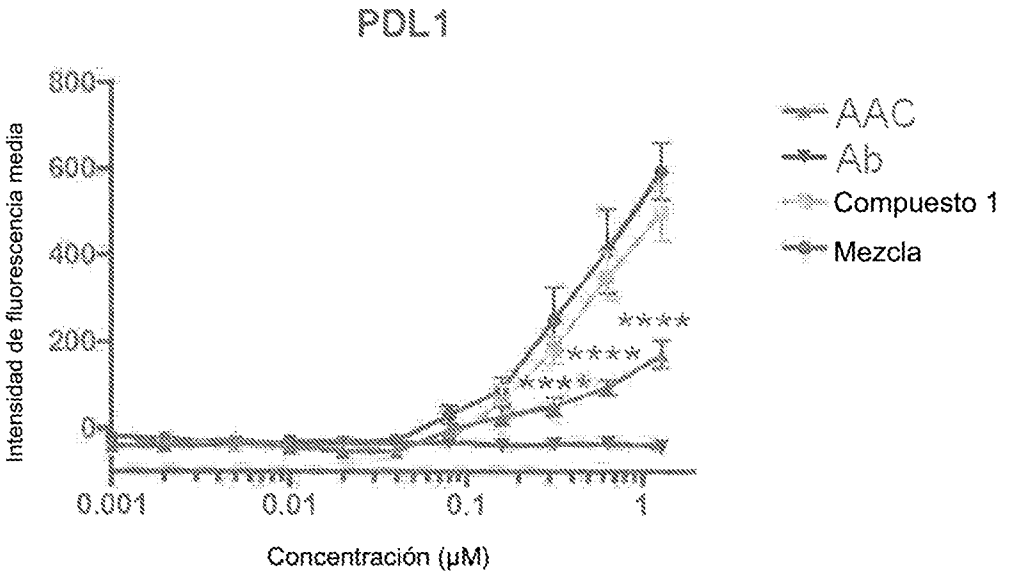

PDL1
Intensidad de fluorescencia media
800
600
400
200
0
0.001
0.01
0.1
1
Concentración (μM)
AAC
Ab
Compuesto 1
Mezcla
****
****
****

Fig. 5

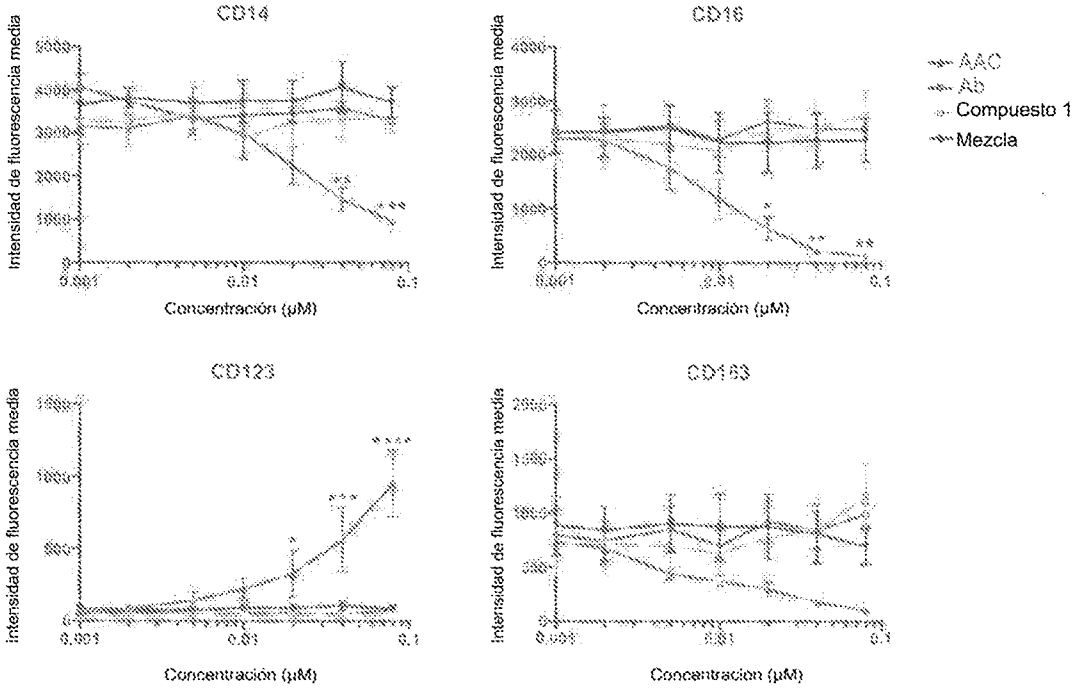

CD14
CD16
CD123
CD163
Intensidad de fluorescencia media
Concentración (μM)
AAC
Ab
Compuesto 1
Mezcla

Fig. 6

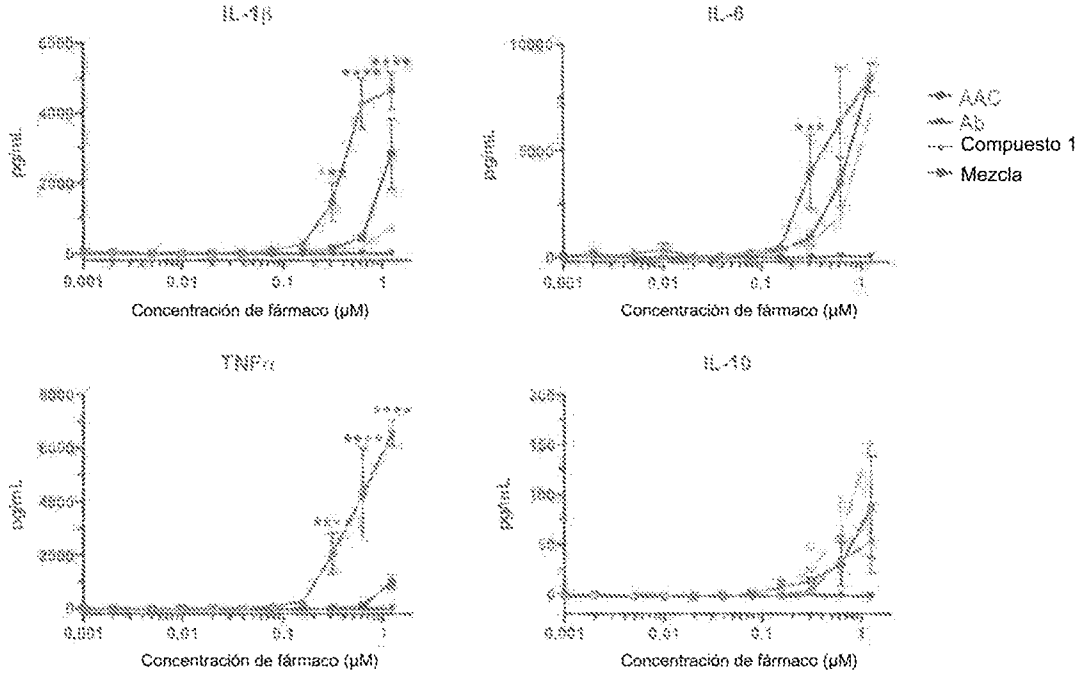
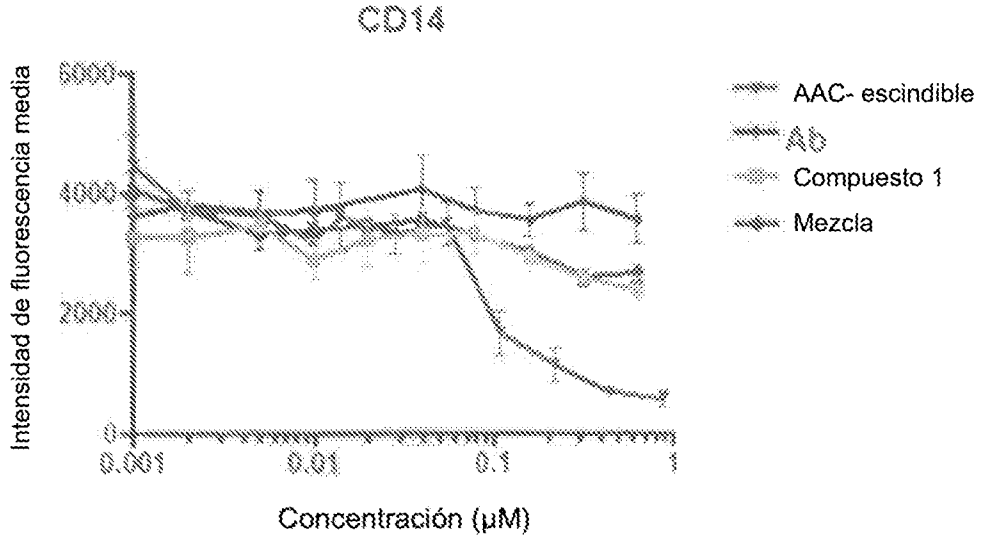

IL-1β
IL-6
TNFα
IL-10
pg/mL
Concentración de fármaco (μM)
AAC
Ab
Compuesto 1
Mezcla

Fig. 7


CD14
Intensidad de fluorescencia media
6000
4000
2000
0
0.001
0.01
0.1
1
Concentración (μM)
AAC- escindible
Ab
Compuesto 1
Mezcla

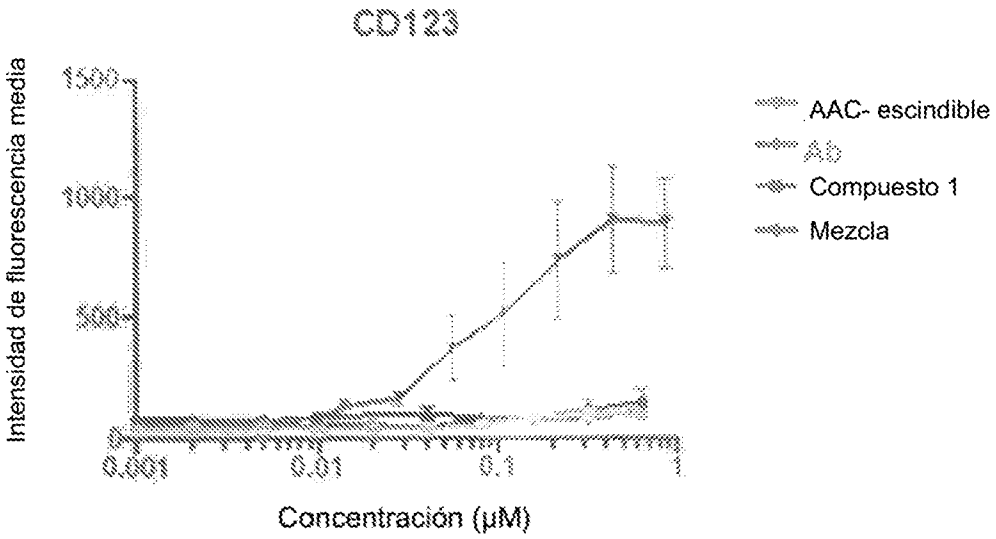

CD123
Intensidad de fluorescencia media
1500
1000
500
0
0.001
0.01
0.1
1
Concentración (μM)
AAC- escindible
Ab
Compuesto 1
Mezcla

Fig. 8A

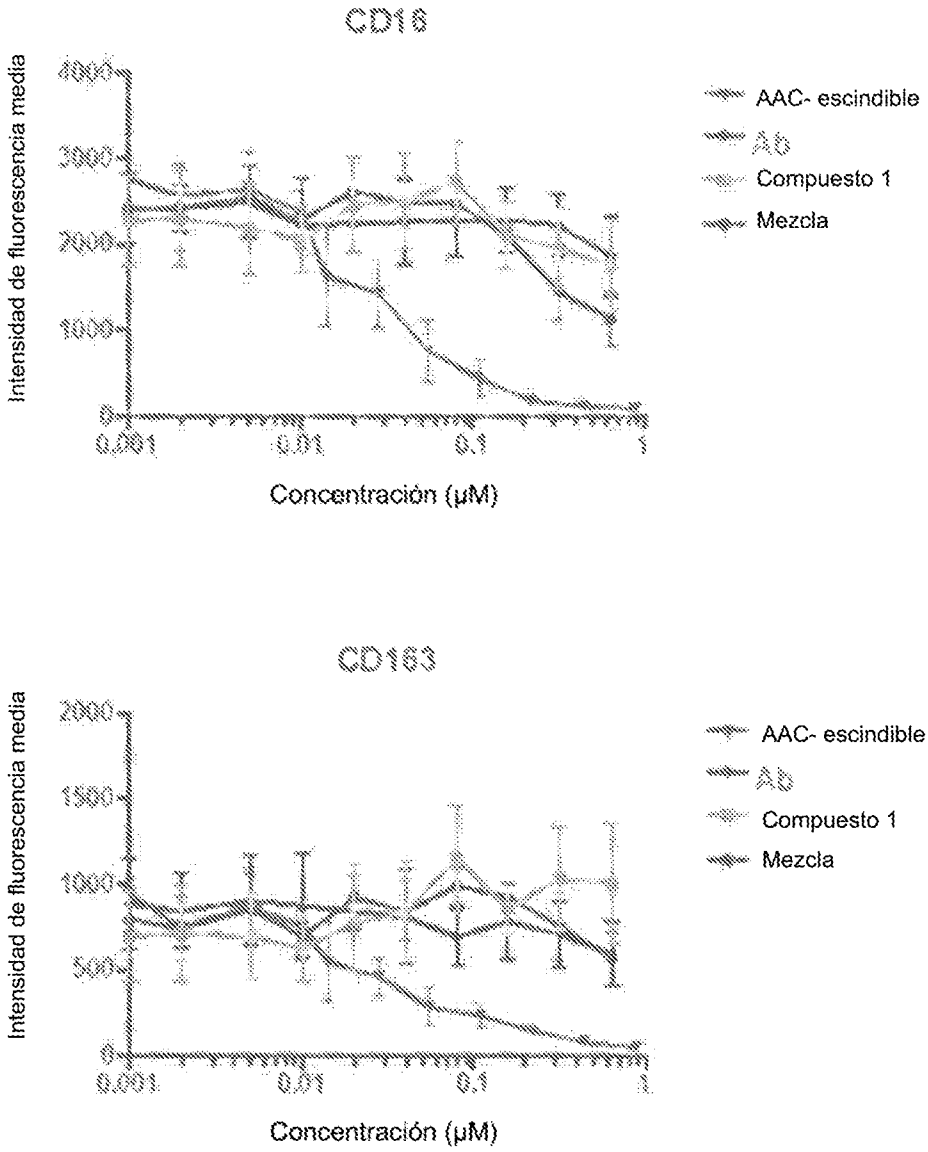

CD16
Intensidad de fluorescencia media
4000
3000
2000
1000
0
0,001
0,01
0,1
1
Concentración (µM)
AAC- escindible
Ab
Compuesto 1
Mezcla
CD163
Intensidad de fluorescencia media
2000
1500
1000
500
0
0,001
0,01
0,1
1
Concentración (µM)
AAC- escindible
Ab
Compuesto 1
Mezcla

Fig. 8B

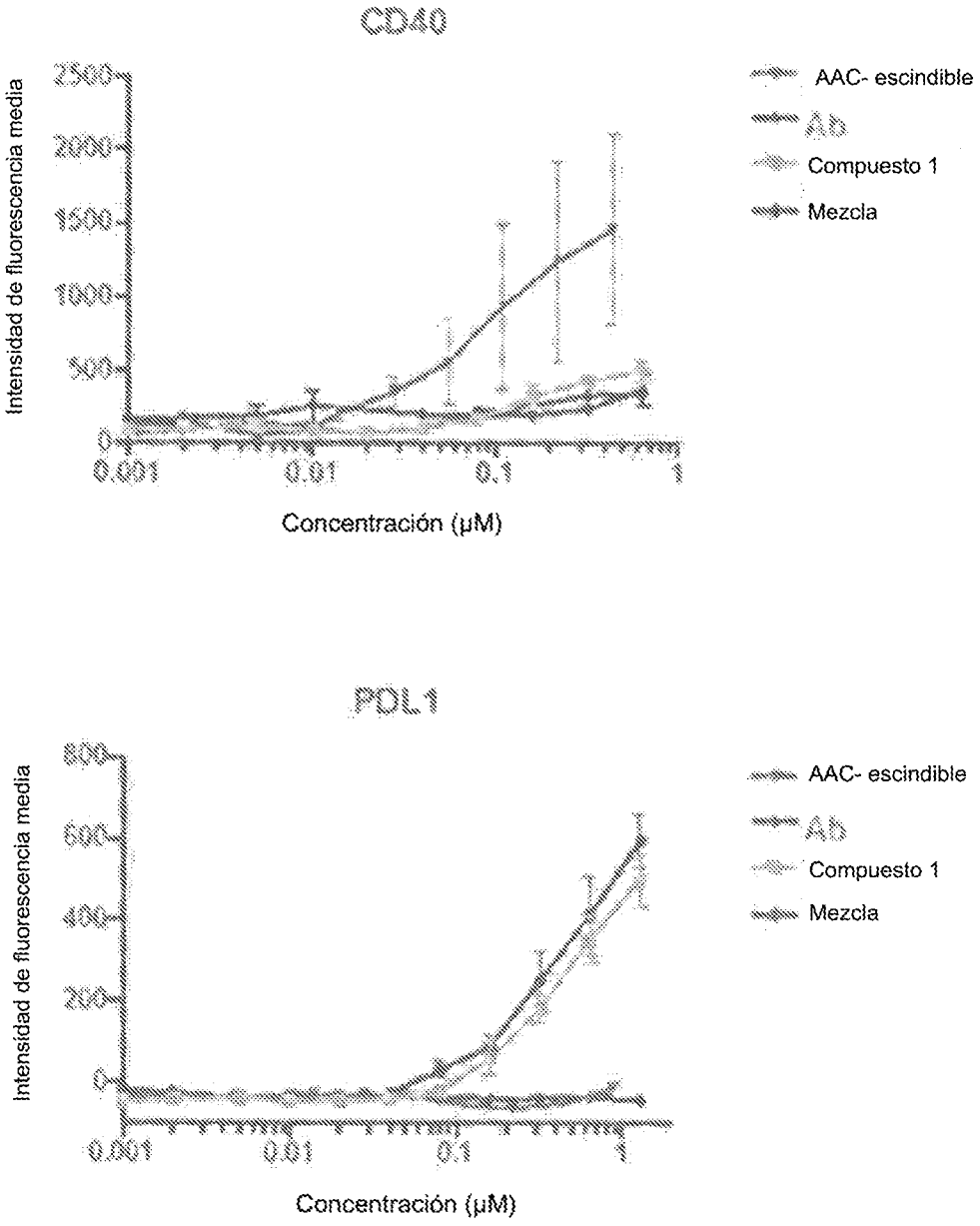

CD40
Intensidad de fluorescencia media
2500
2000
1500
1000
500
0
0.001
0.01
0.1
1
Concentración (µM)
AAC- escindible
Ab
Compuesto 1
Mezcla
PDL1
Intensidad de fluorescencia media
800
600
400
200
0
0.001
0.01
0.1
1
Concentración (µM)
AAC- escindible
Ab
Compuesto 1
Mezcla

Fig. 8C

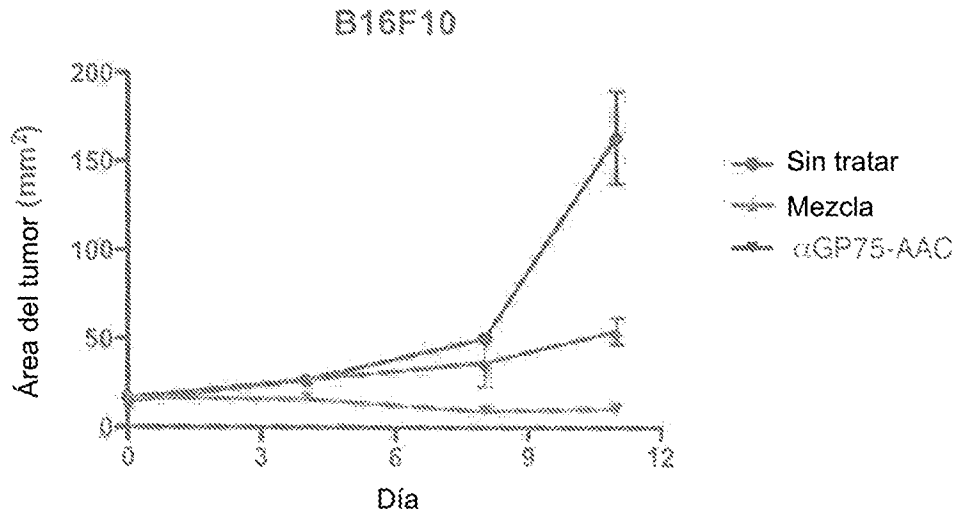

B16F10
Área del tumor (mm²)
200
150
100
50
0
0
3
6
9
12
Día
Sin tratar
Mezcla
αGP75-AAC

Fig. 9A

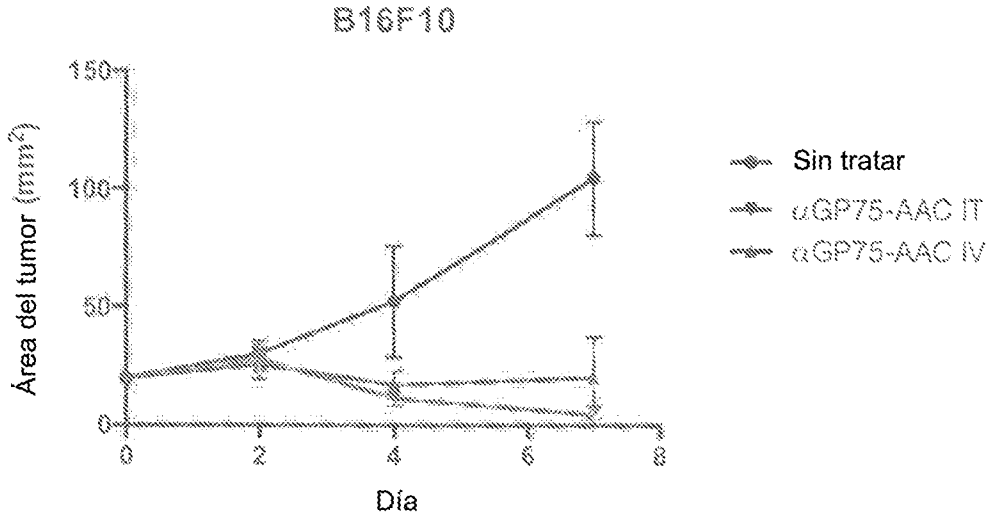

B16F10
Área del tumor (mm²)
150
100
50
0
0
2
4
6
8
Día
Sin tratar
αGP75-AAC IT
αGP75-AAC IV

Fig. 9B

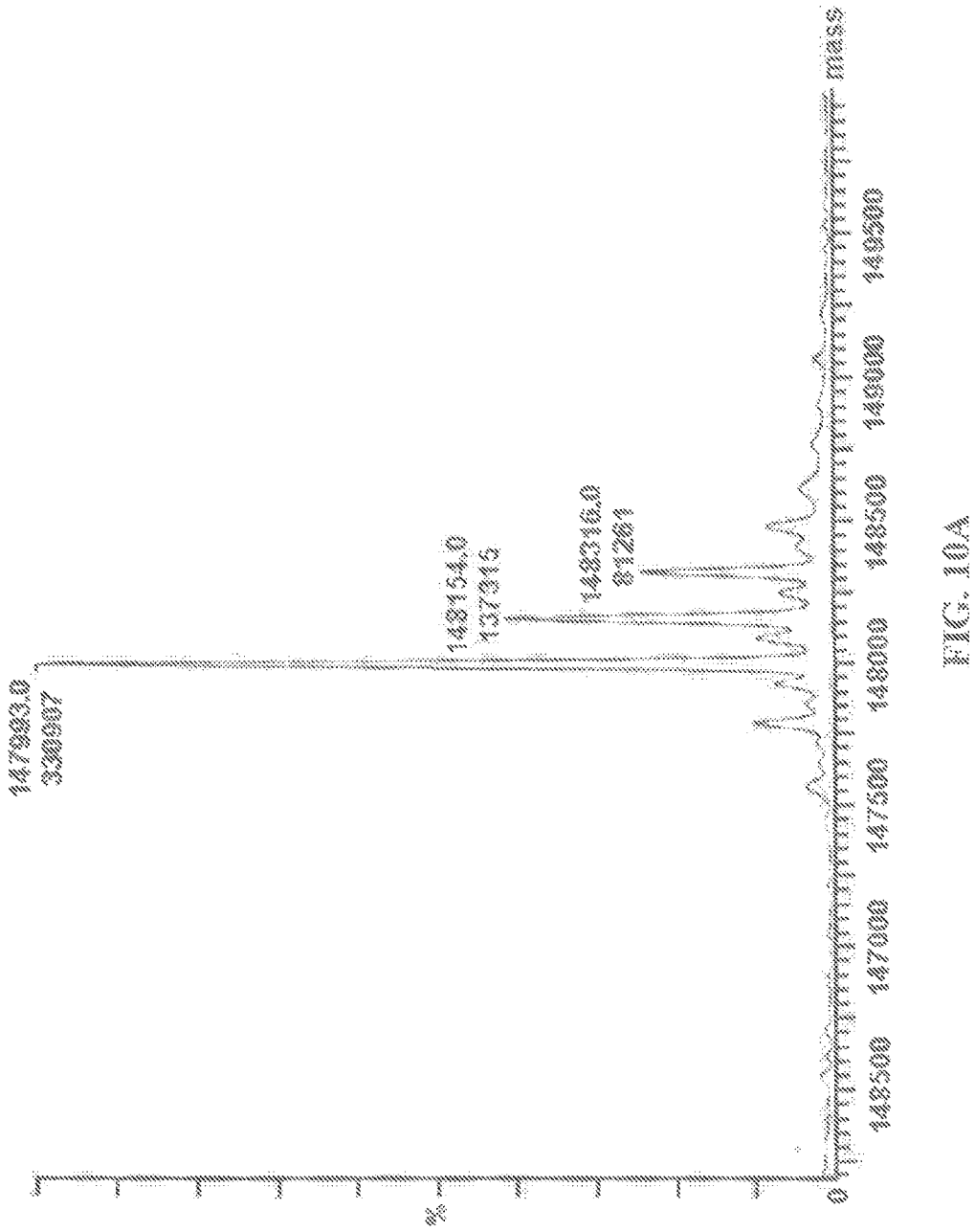

%
0
148500
147000
147500
148000
148500
149000
149500
mass
147983.0
330907
148154.0
137315
148316.0
81261

FIG. 10A

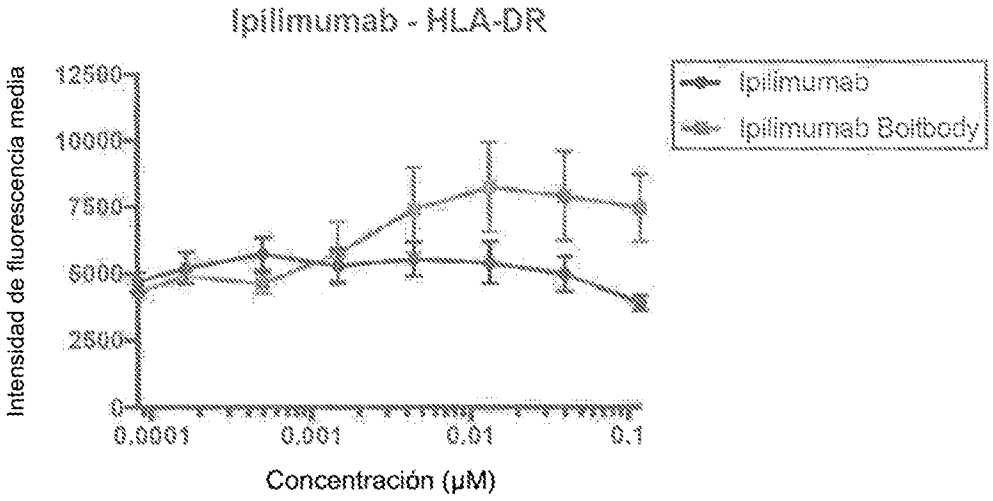


FIG. 10B

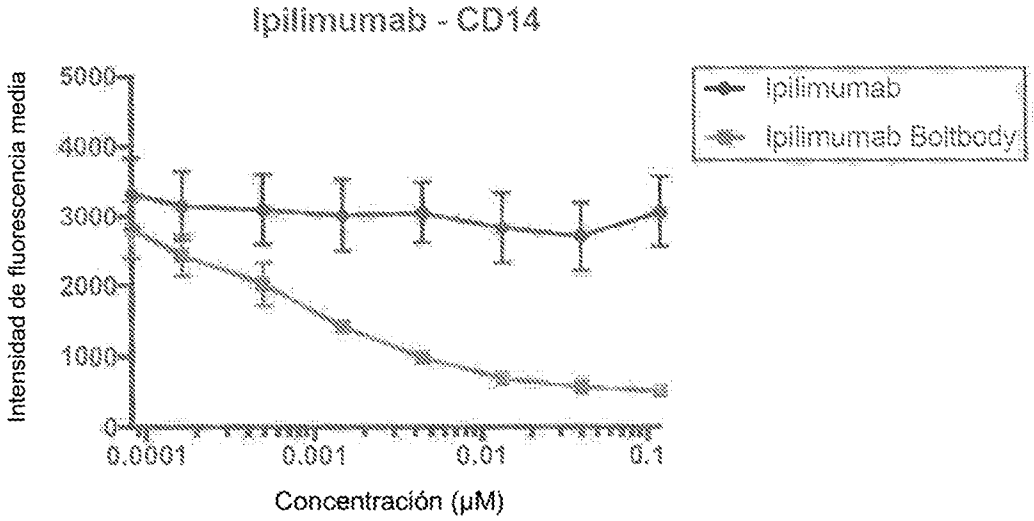


FIG. 10C

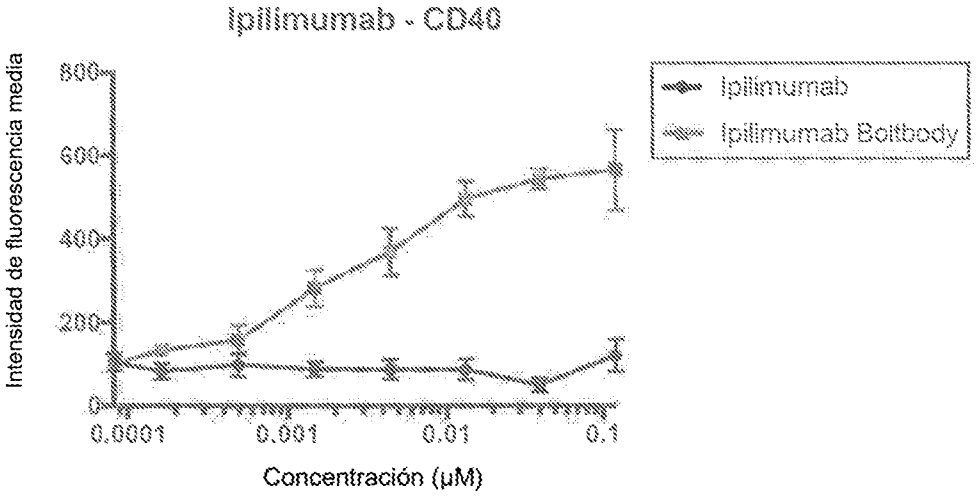


FIG. 10D

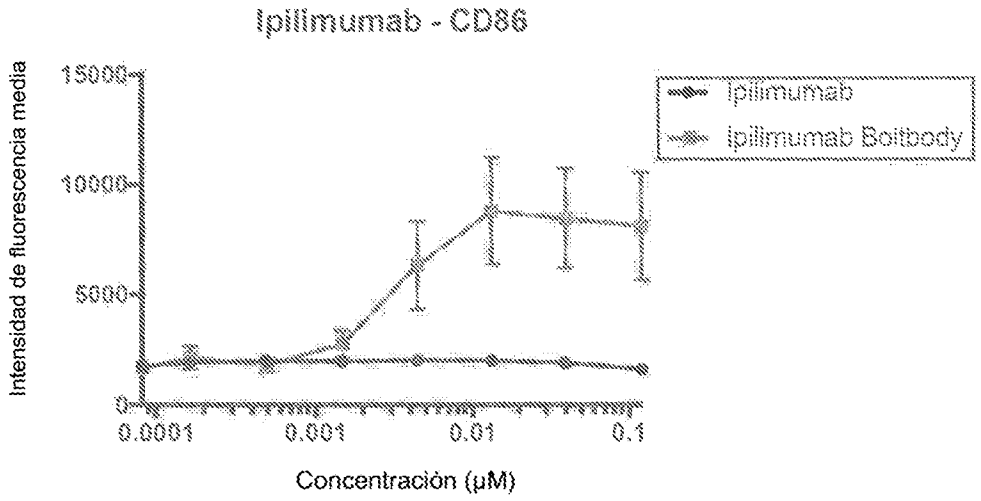


FIG. 10E

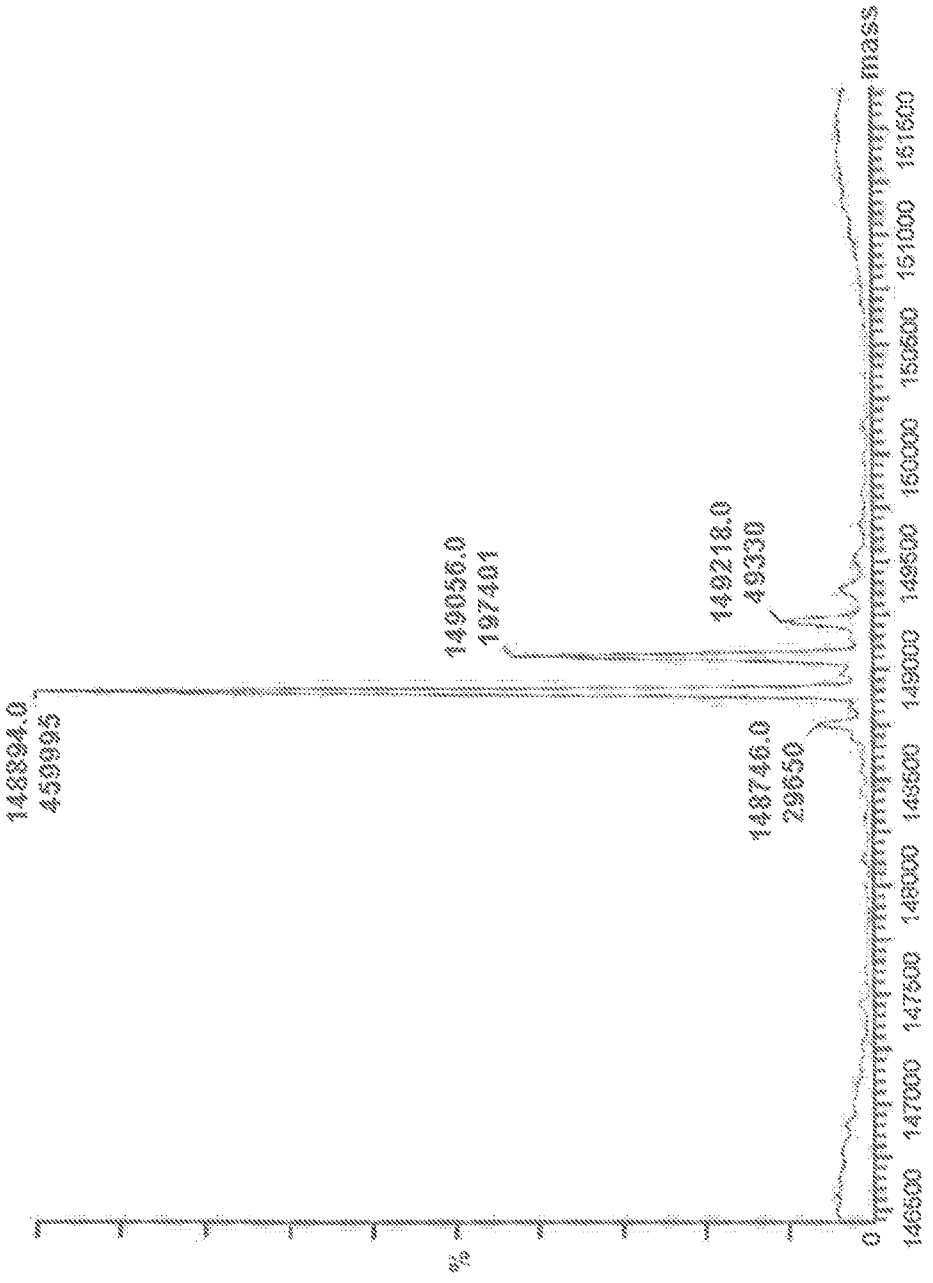

148394.0
459995
149056.0
197401
149218.0
49330
148746.0
29650
%
0
mass
146500
147000
147500
148000
148500
149000
149500
150000
150500
151000
151500

FIG. 11A

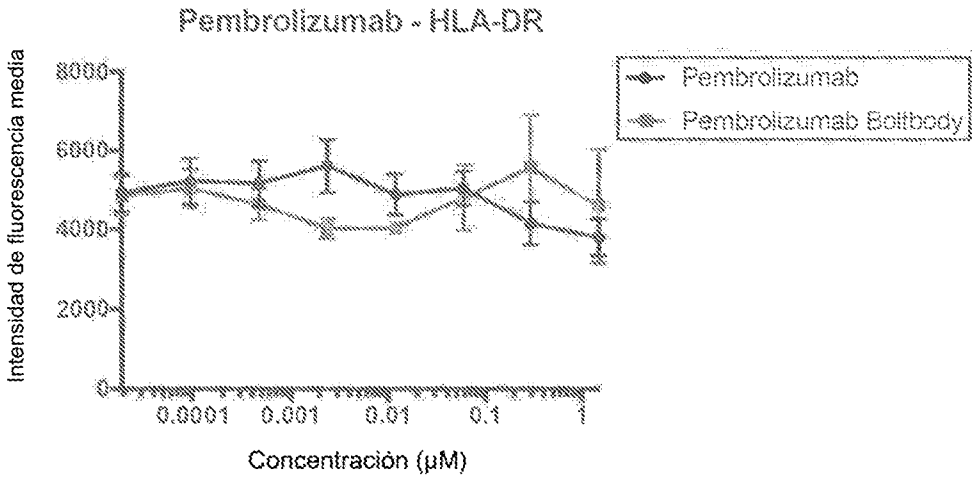


FIG. 11B

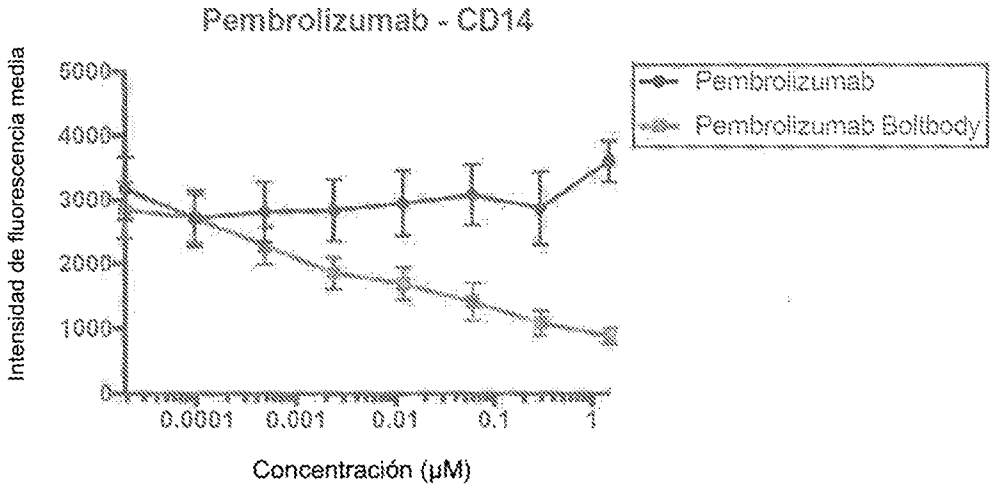


FIG. 11C

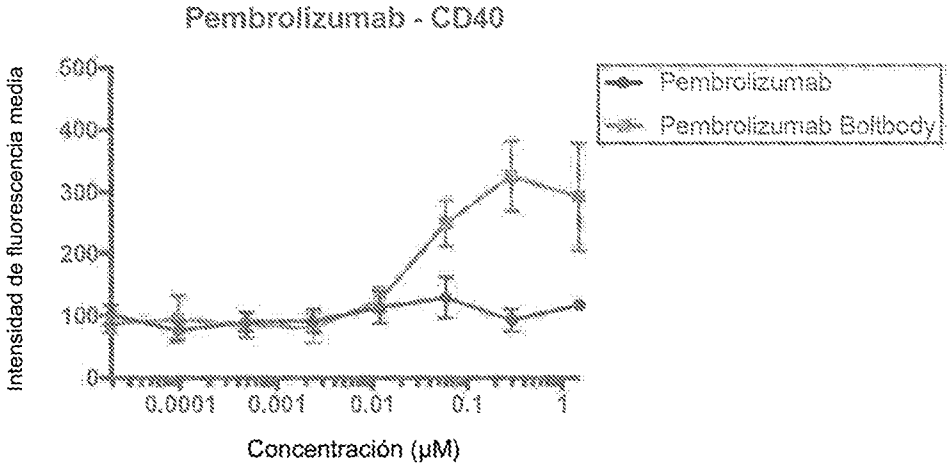


FIG. 11D

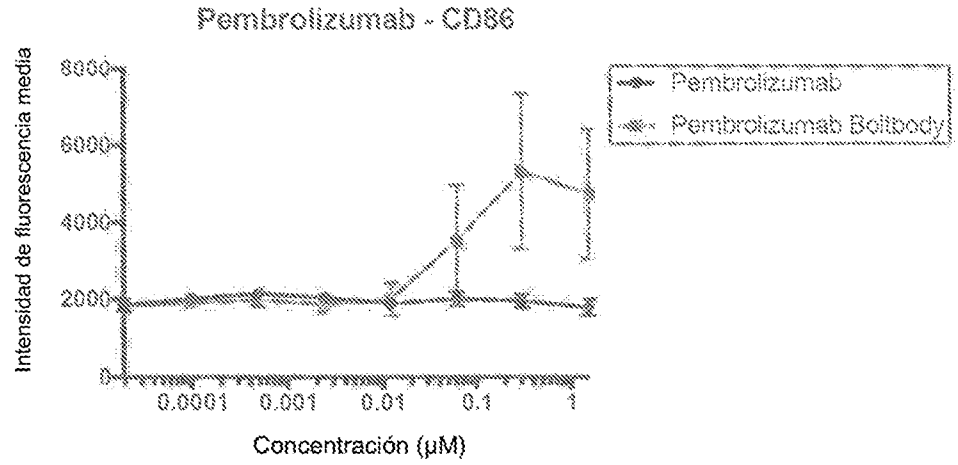


FIG. 11E

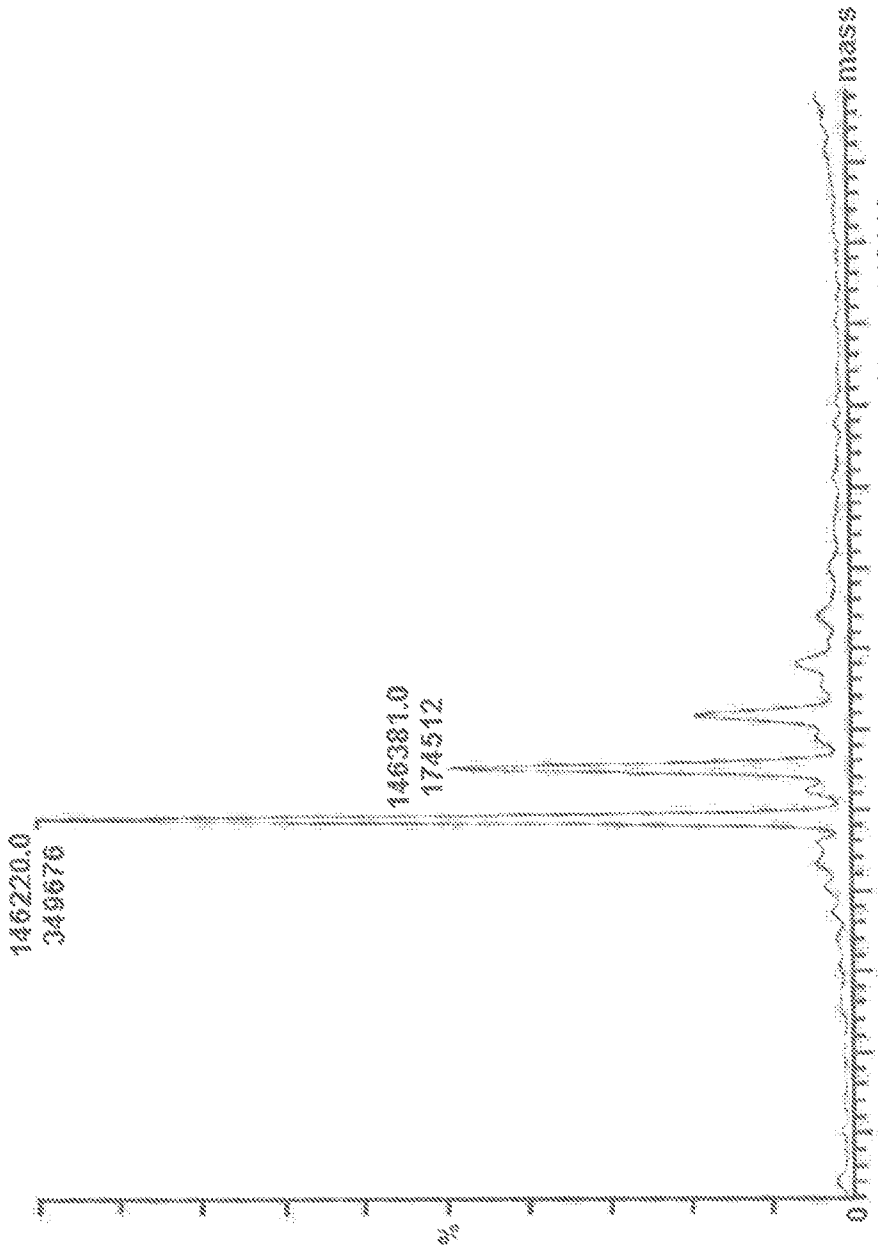

146220.0
349679
146381.0
174512
%
0
145500
146000
146500
147000
147500
148000
mass

FIG. 12A

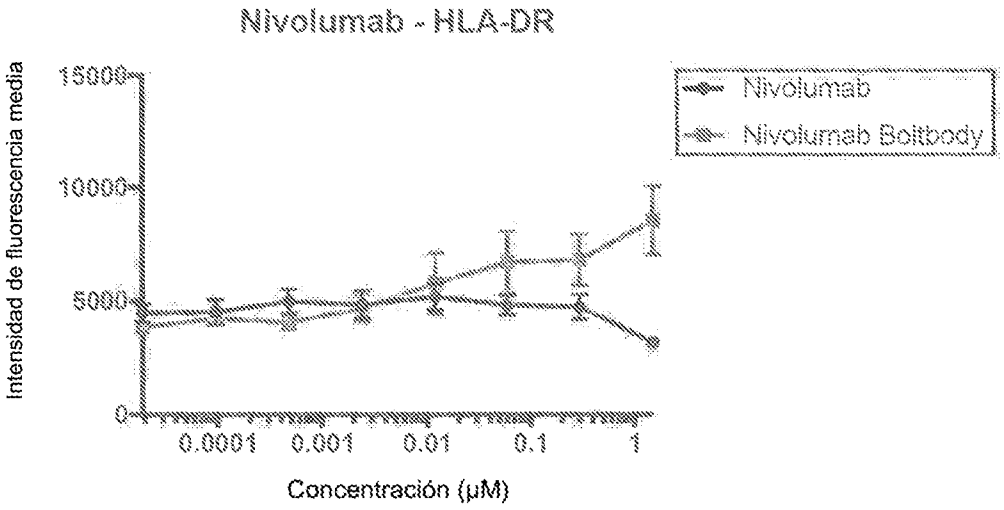


FIG. 12B

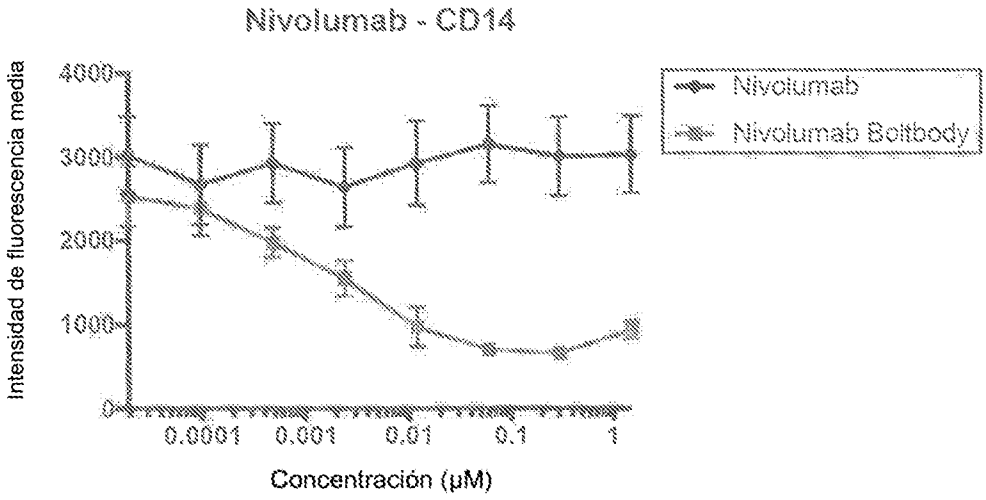


FIG. 12C

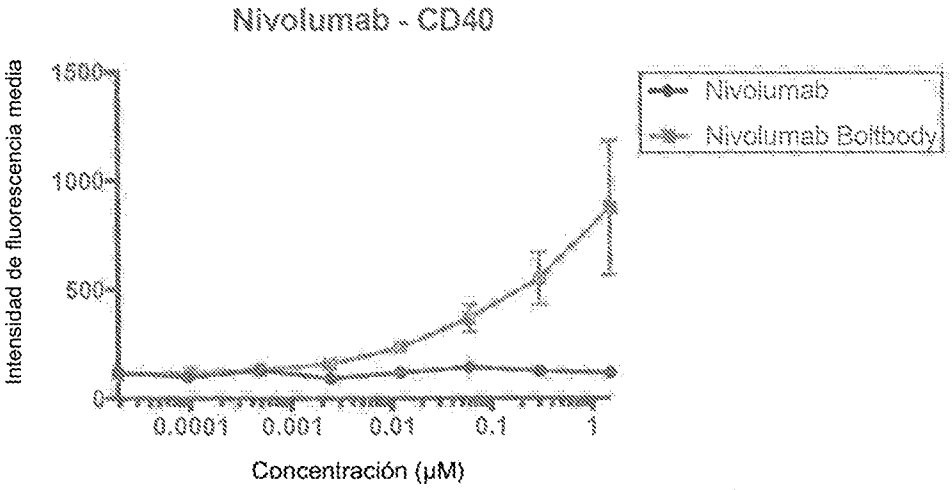


FIG. 12D

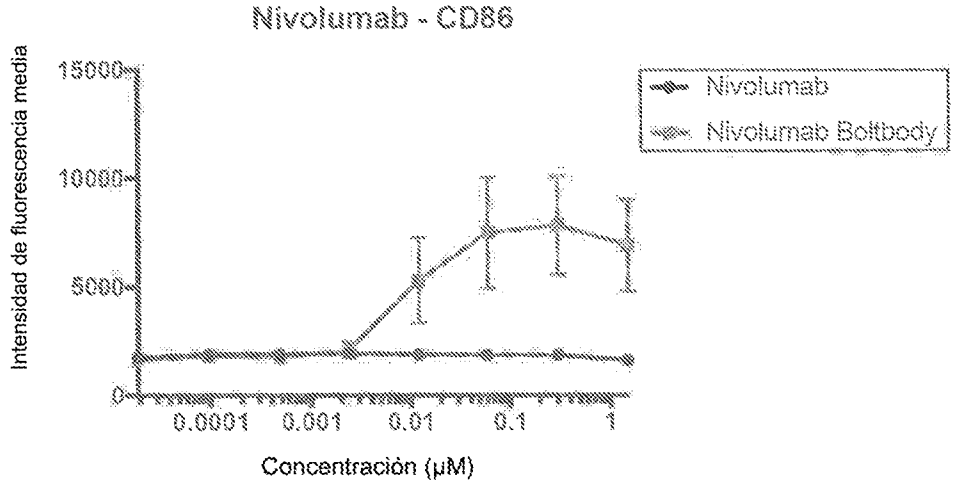


FIG. 12E

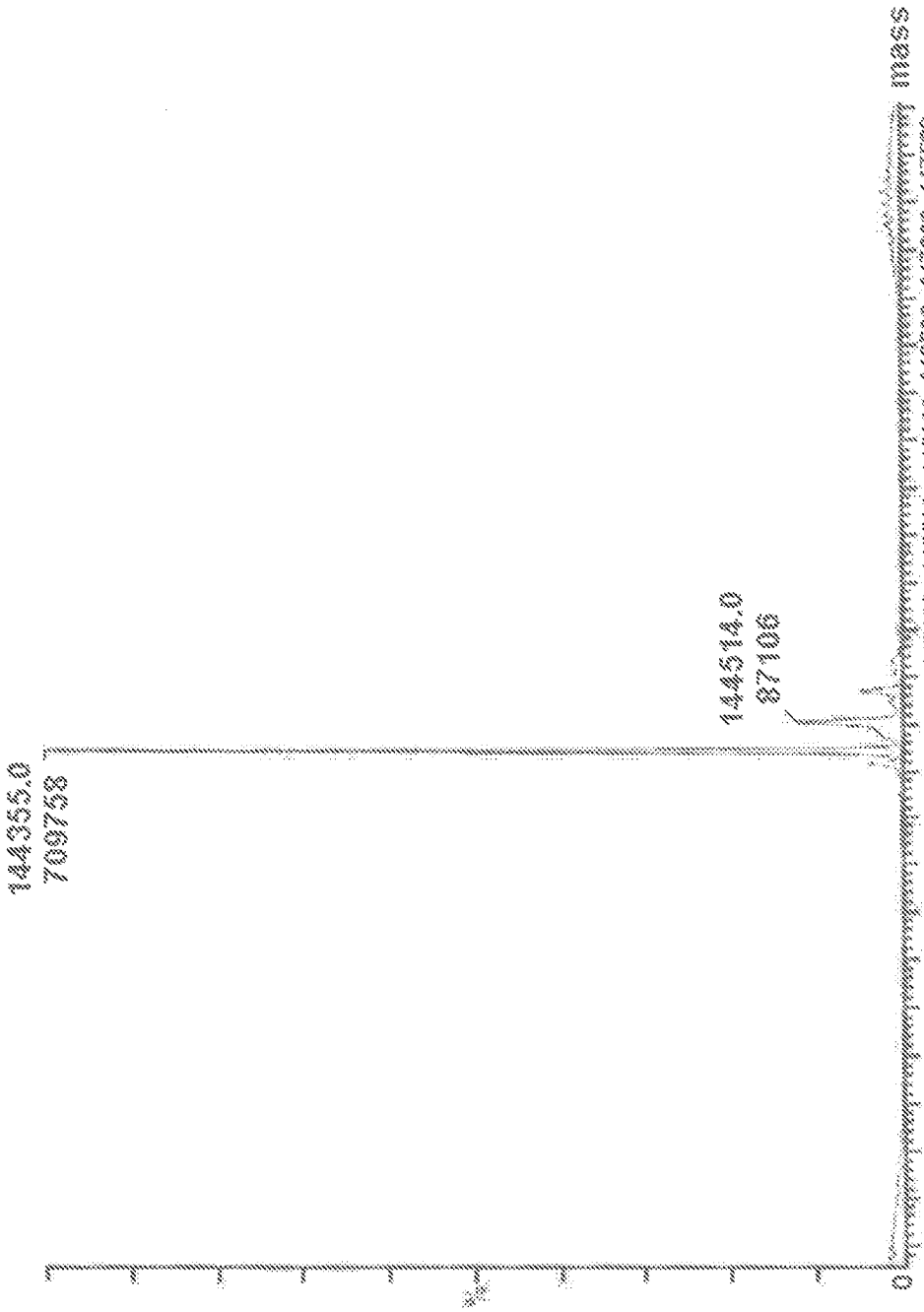

144355.0
709738
144314.0
87106
Mass
142000
142500
143000
143500
144000
144500
145000
145500
146000
146500
147000
147500

FIG. 13A

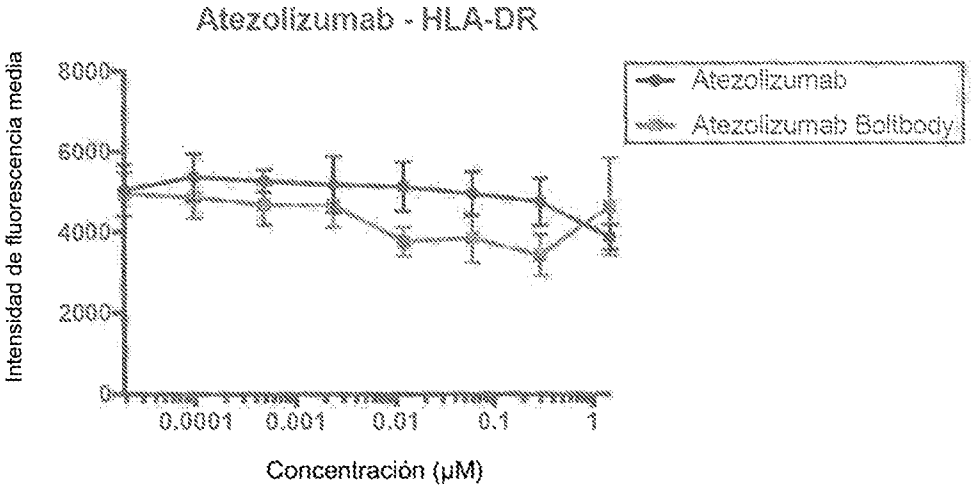


FIG. 13B

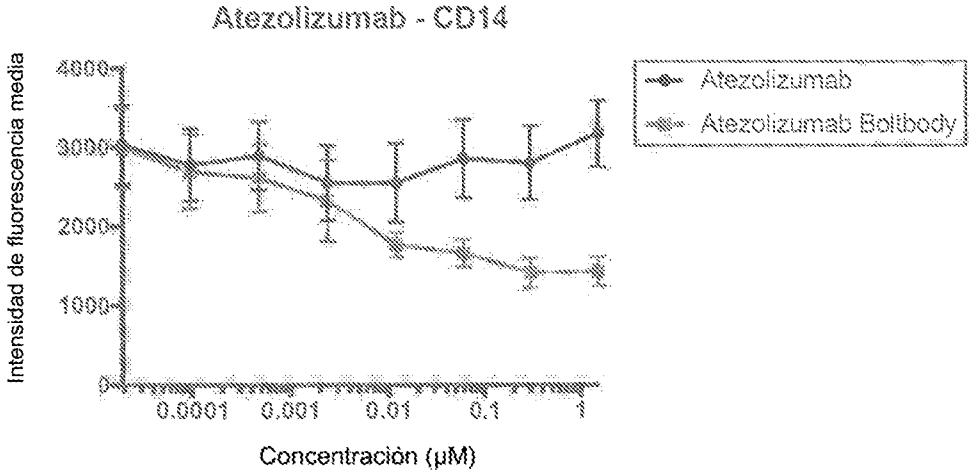


FIG. 13C

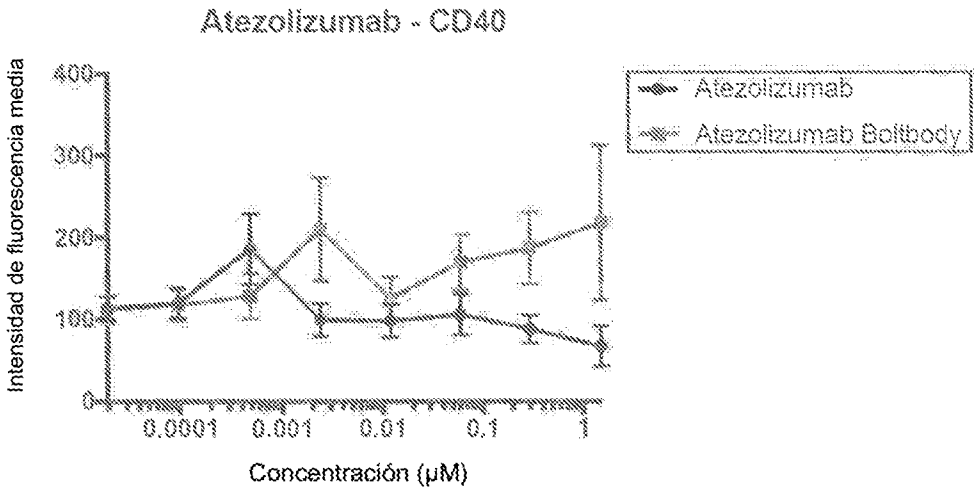


FIG. 13D

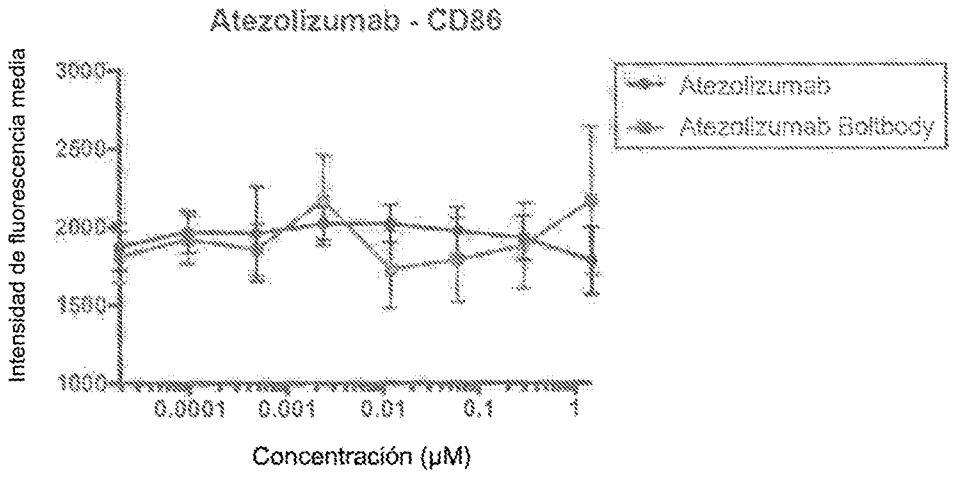


FIG. 13E

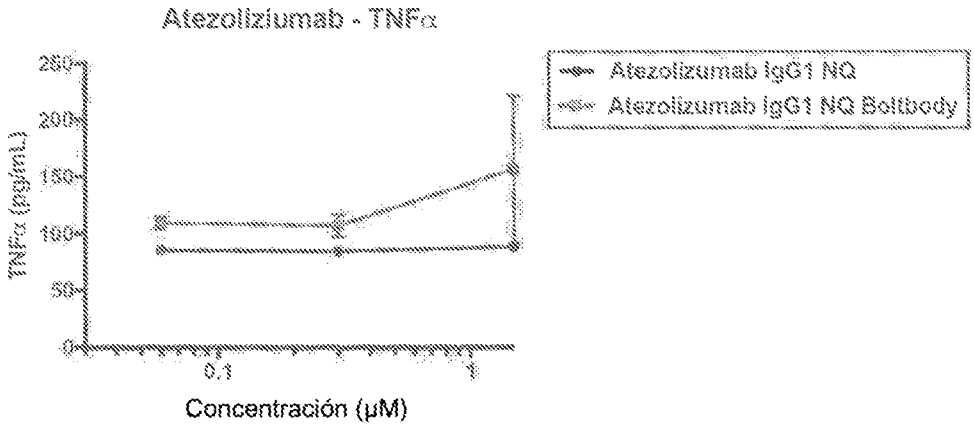


FIG. 14A

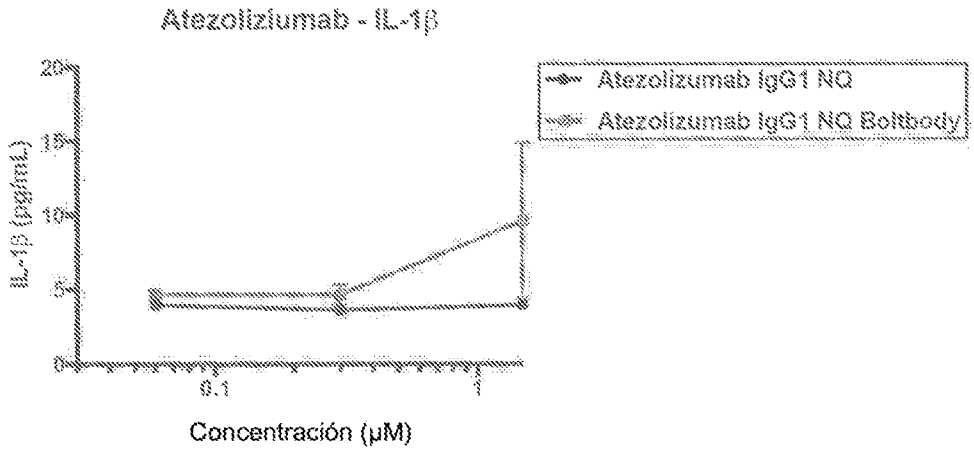


FIG. 14B

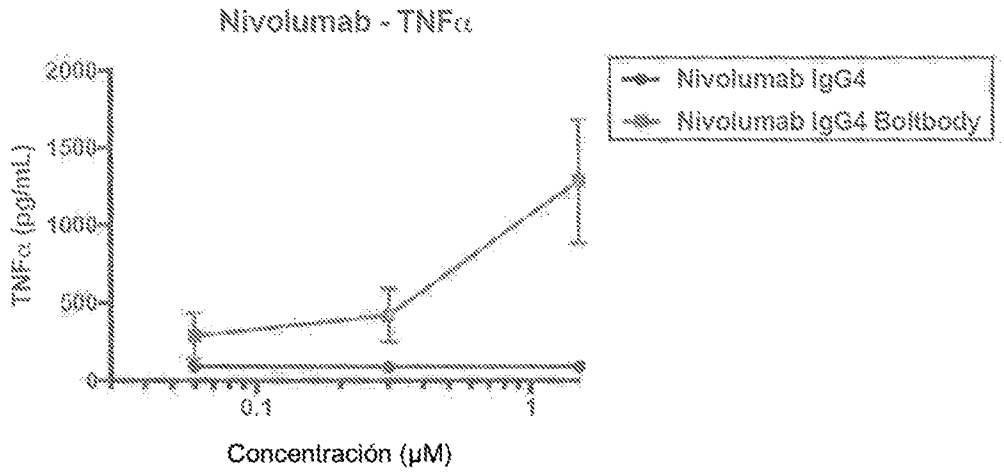


FIG. 15A

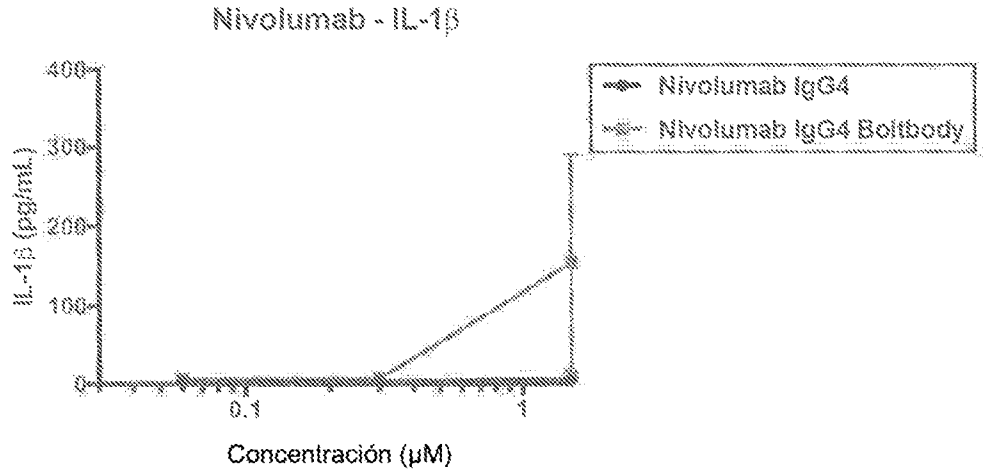


FIG. 15B

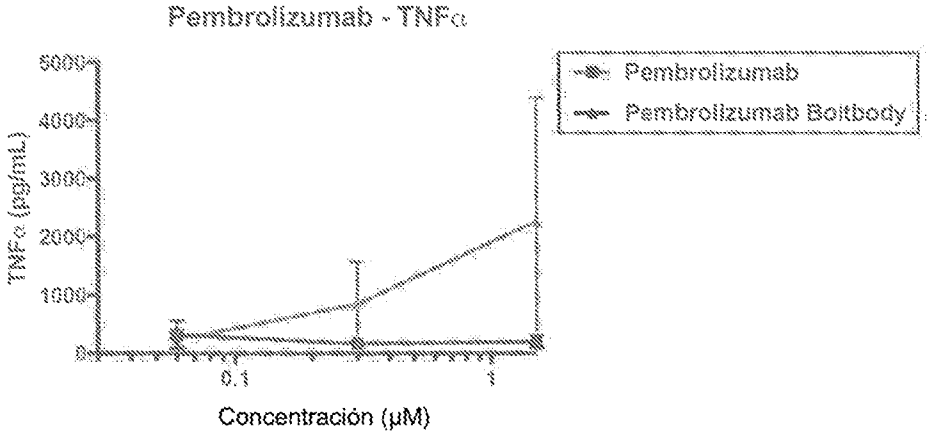


FIG. 16A

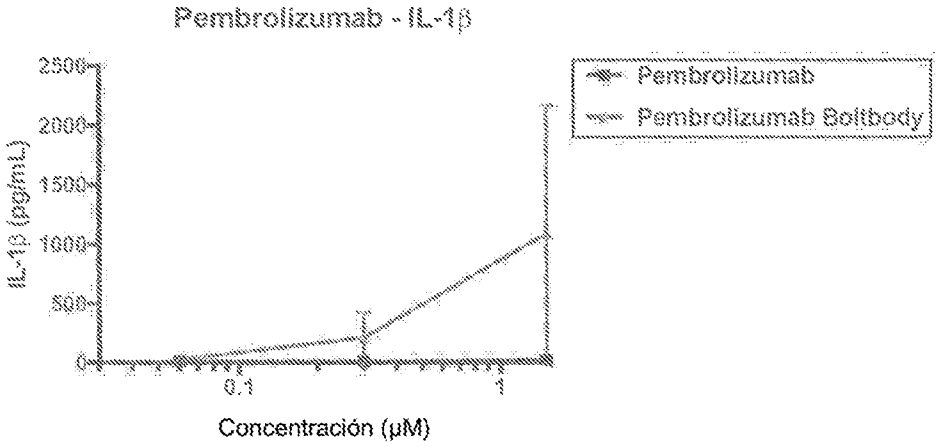


FIG. 16B

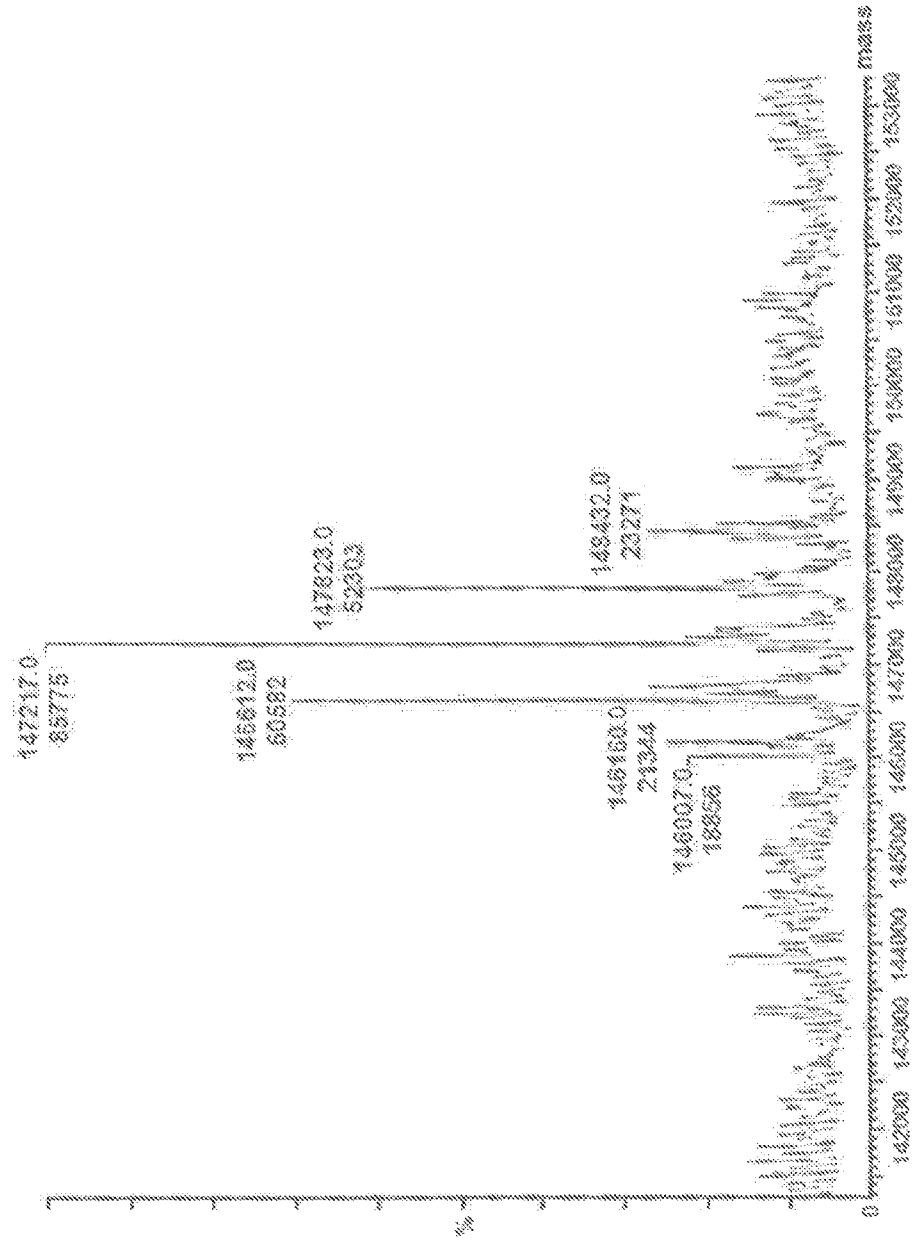

147217.0
65775
146612.0
60582
147823.0
52303
148432.0
23271
146168.0
21344
146027.8
18856
%
0
142000
143000
144000
146000
146200
147000
148000
149000
150000
151000
152000
153000
mass

FIG. 17

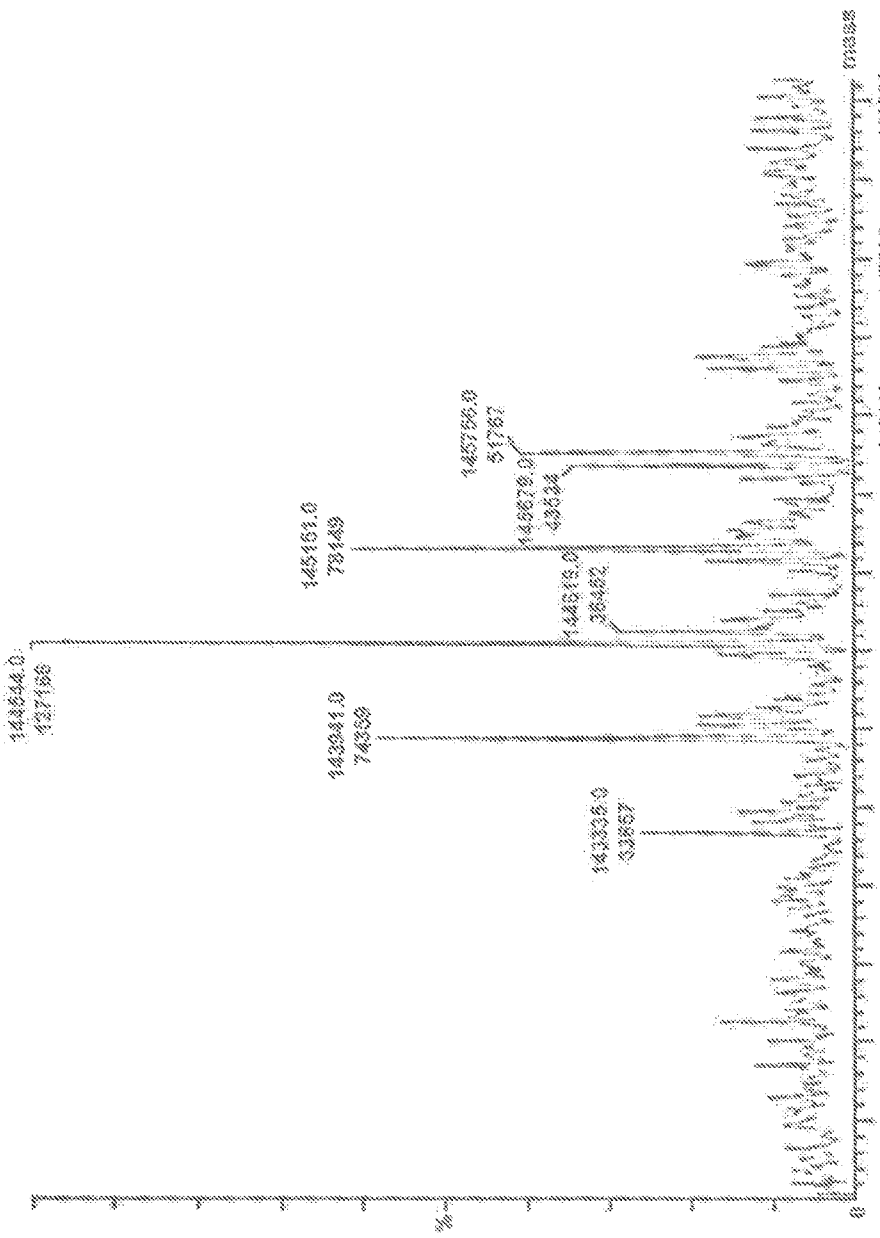

1446644.0
127166
1451161.0
79149
1457166.8
51767
1440878.0
43634
1448316.0
36482
1433941.0
74359
1433336.0
53667
%
0
1420000
1430000
1440000
1450000
1460000
1470000
1480000
m/z

FIG. 18

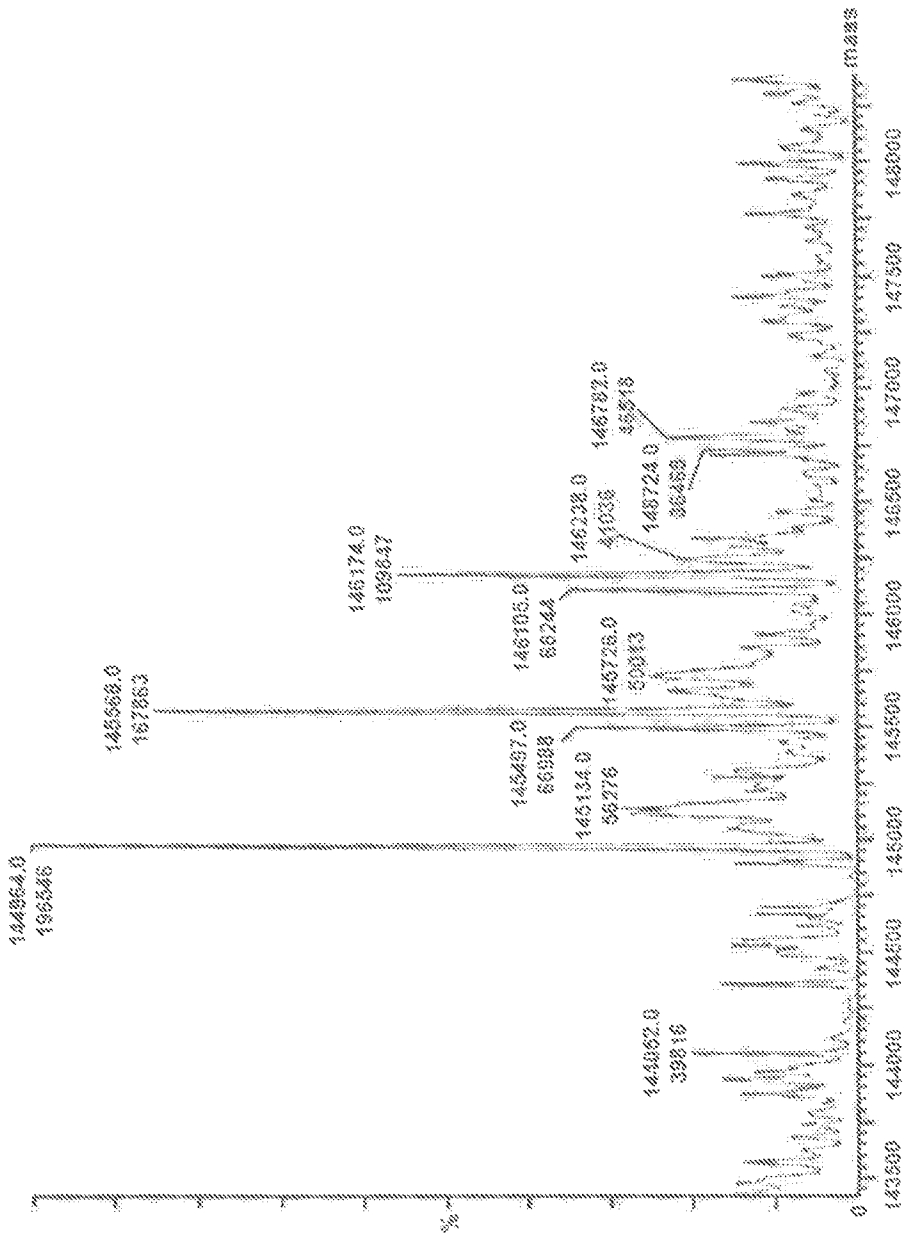

1443954.0
199349
1445668.0
167853
1446174.0
109847
1446662.0
39816
1447134.0
66276
1447497.0
66988
1447726.0
60013
1448038.0
41038
1448724.0
66488
1448782.0
55518
%
mass
0
143500
144000
144500
145000
145500
146000
146500
147000
147500
148000

FIG. 19

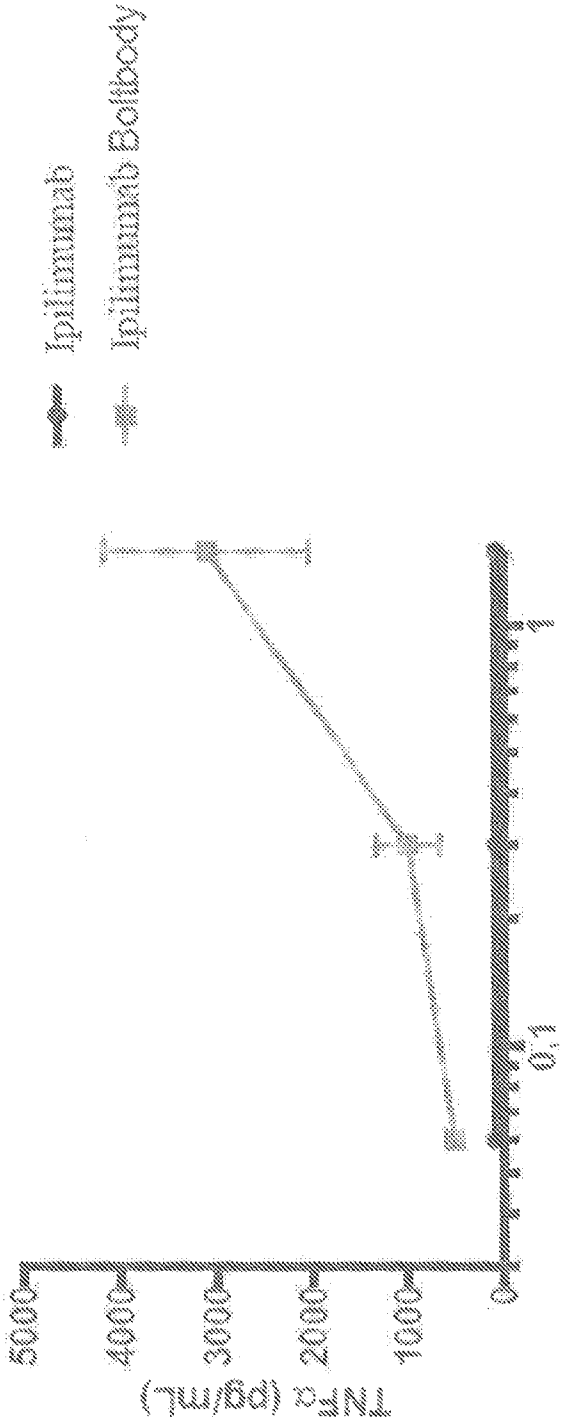

Ipilimumab
Ipilimumab Biosimilar
TNFα (pg/mL)
5000
4000
3000
2000
1000
0
0.1
1

FIG. 20

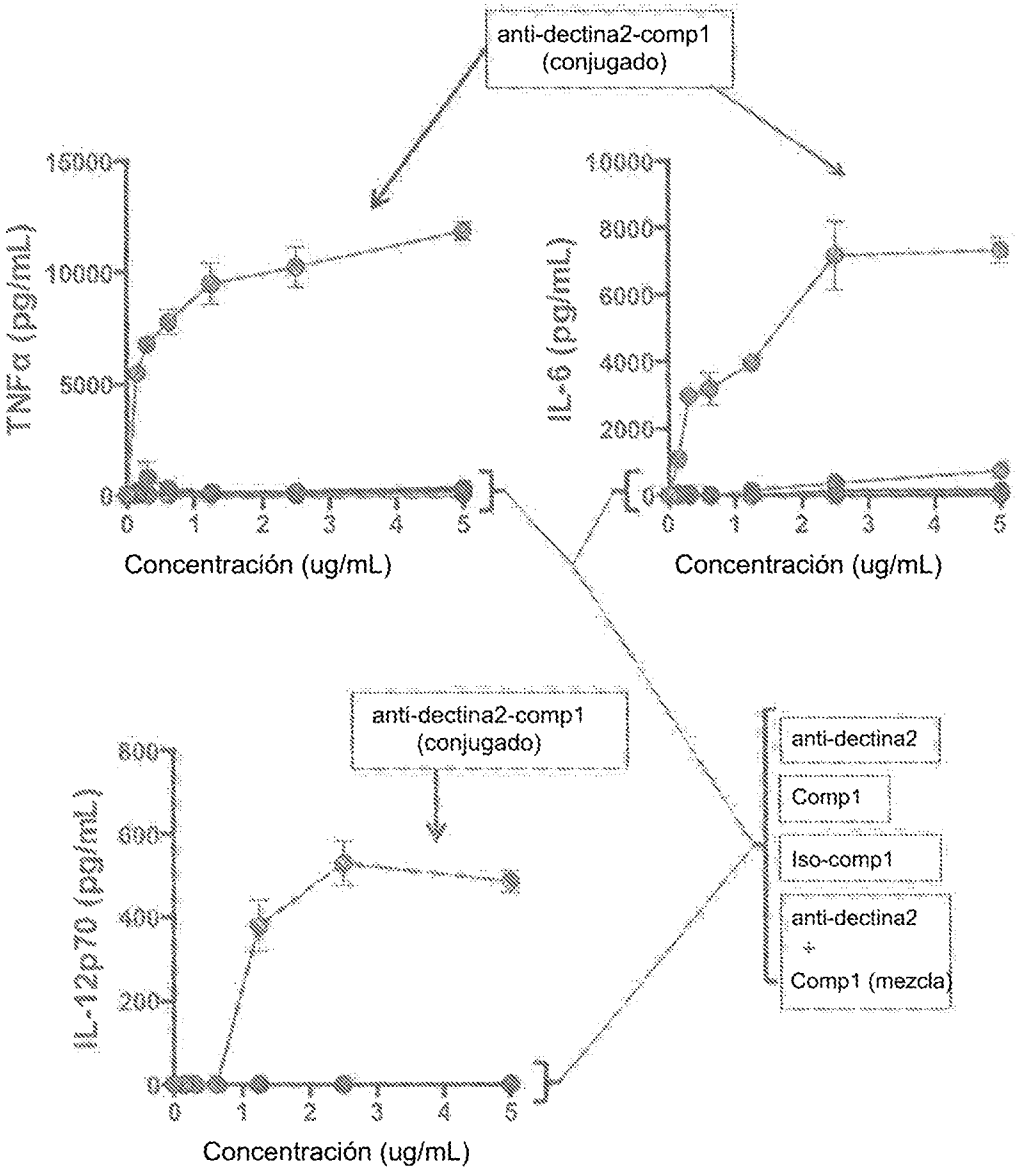

anti-dectina2-comp1
(conjugado)
TNFα (pg/mL)
15000
10000
5000
0
0 1 2 3 4 5
Concentración (ug/mL)
IL-6 (pg/mL)
10000
8000
6000
4000
2000
0
0 1 2 3 4 5
Concentración (ug/mL)
anti-dectina2-comp1
(conjugado)
IL-12p70 (pg/mL)
800
600
400
200
0
0 1 2 3 4 5
Concentración (ug/mL)
anti-dectina2
Comp1
Iso-comp1
anti-dectina2
+
Comp1 (mezcla)

Fig. 21

CL264 - Conjugación con el ácido carboxílico terminal

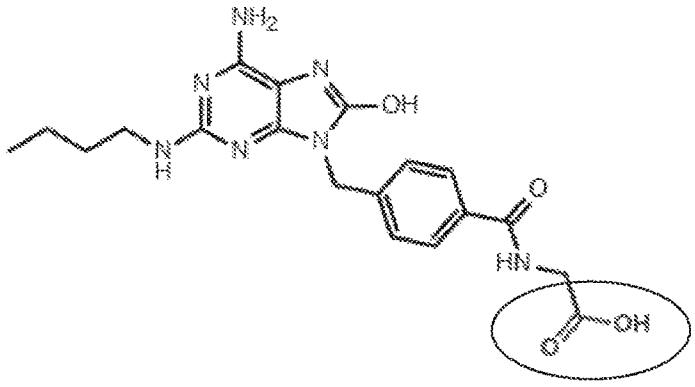


Fig. 22A

CL401 - Conjugación por medio de amina primaria

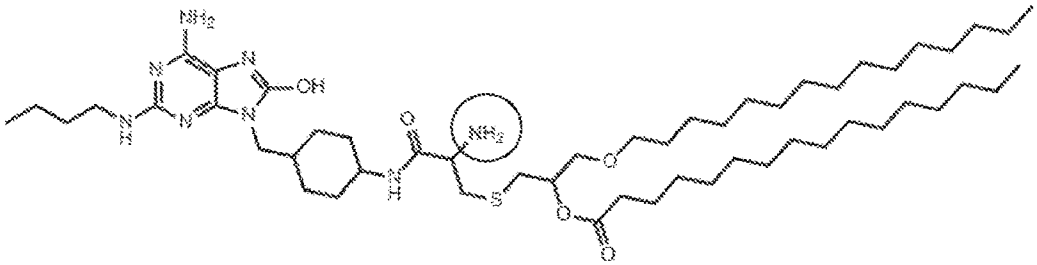


Fig. 22B

CL413 - Conjugación por medio del primer residuo de lisina

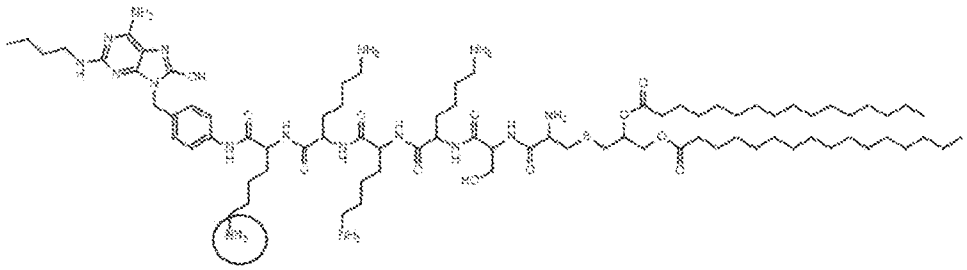


Fig. 22C

CL413 - Conjugación por medio del segundo residuo de lisina

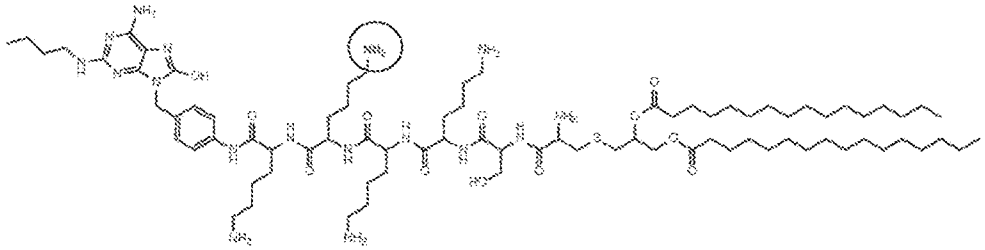


Fig. 22D

CL413 - Conjugación por medio del tercer residuo de lisina

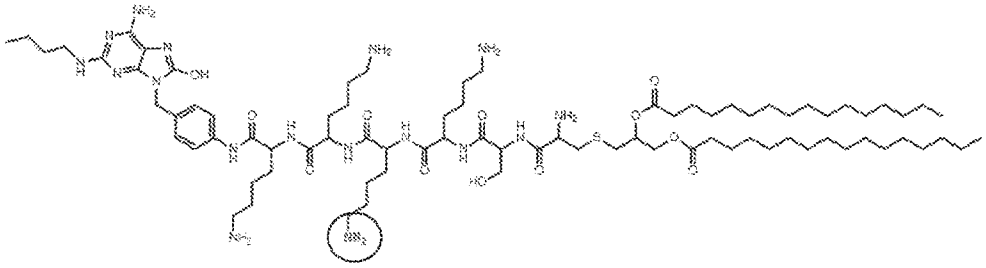


Fig. 22E

CL413 - Conjugación por medio del cuarto residuo de lisina

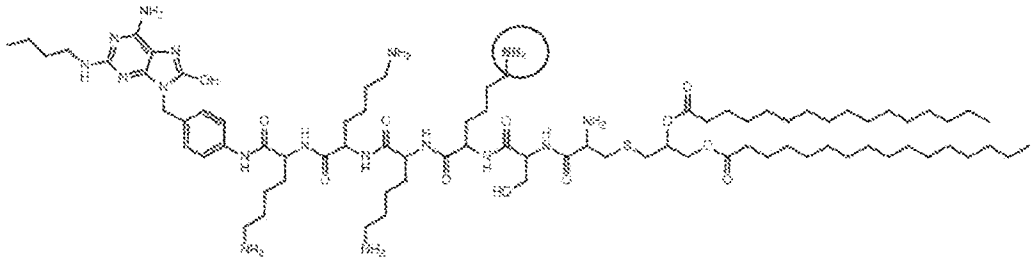


Fig. 22F

CL413 - Conjugación por medio de amina primaria

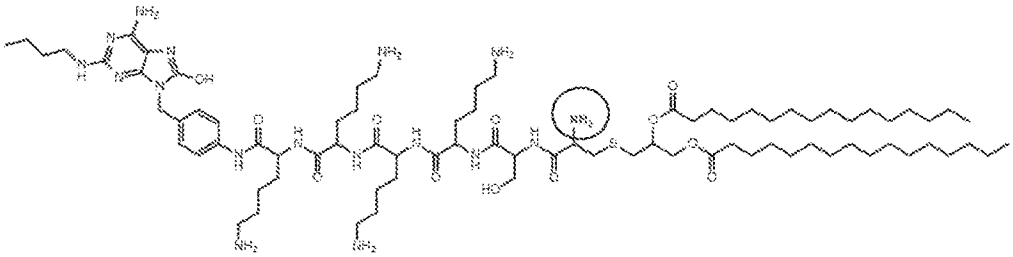
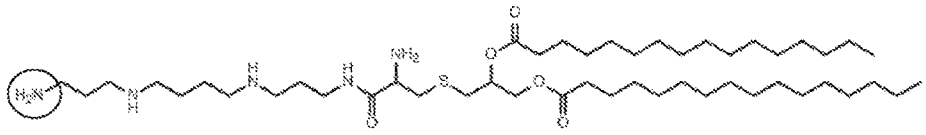


Fig. 22G

CL419 - Conjugación por medio de amina terminal



CL419 - Conjugación por medio de amina

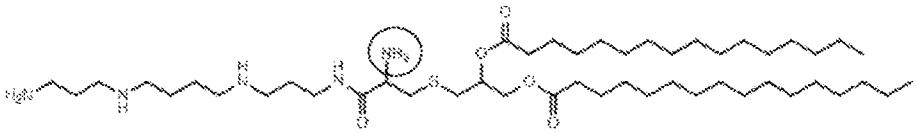


Fig. 22H

CL573 - Conjugación por medio de amina secundaria

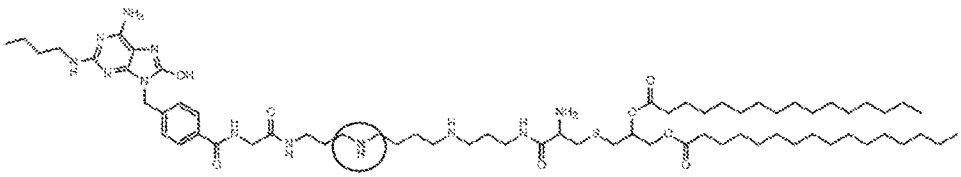


Fig. 22I

CL553 - Conjugación por medio de amina secundaria

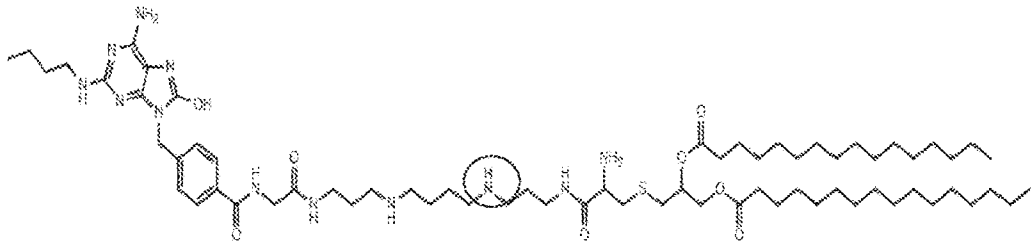


Fig. 22J

CL553 - Conjugación por medio de amina primaria

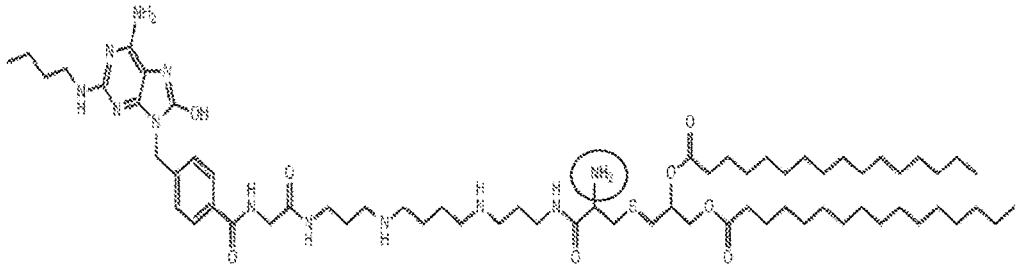


Fig. 22K

CL553 - Conjugación por medio de amina secundaria

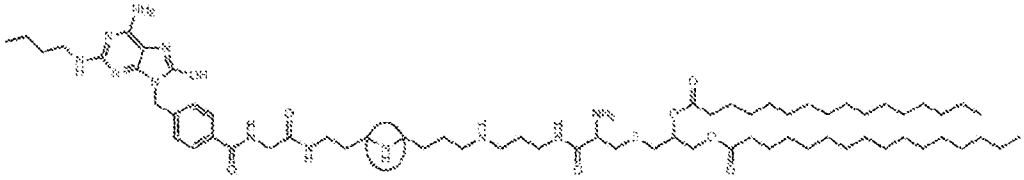
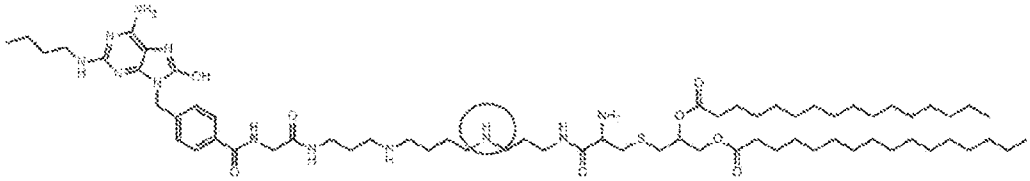


Fig. 22L

CL553 - Conjugación por medio de amina secundaria



CL553 - Conjugación por medio de amina secundaria

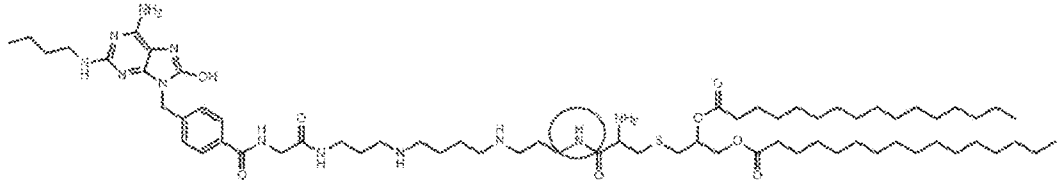
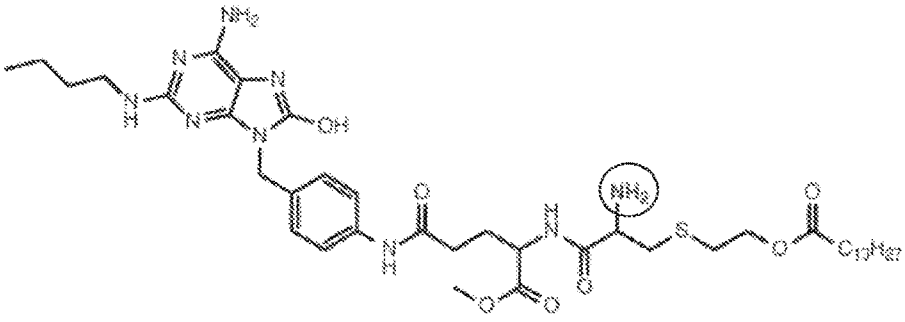


Fig. 22M

CL572 - Conjugación por medio de amina primaria



CL-572 Conjugación por medio de carboxilato

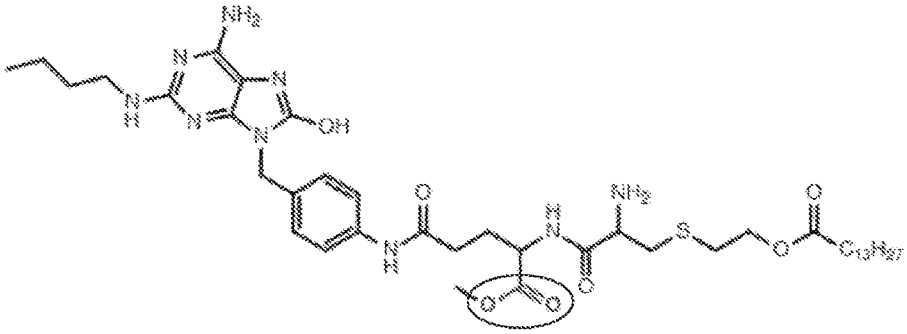


Fig. 22N

Pam2CSK4 - Conjugación por medio de ácido carboxílico terminal

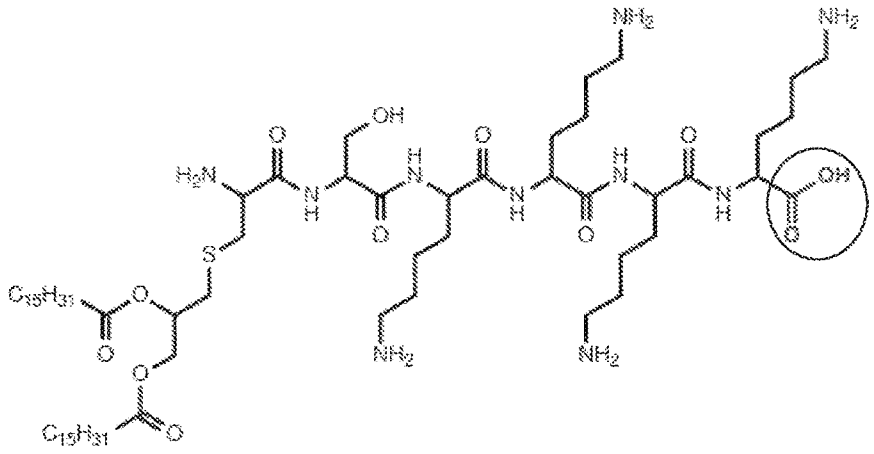


Fig. 22O

Pam2CSK4 - Conjugación por medio de la adición del tiol terminal

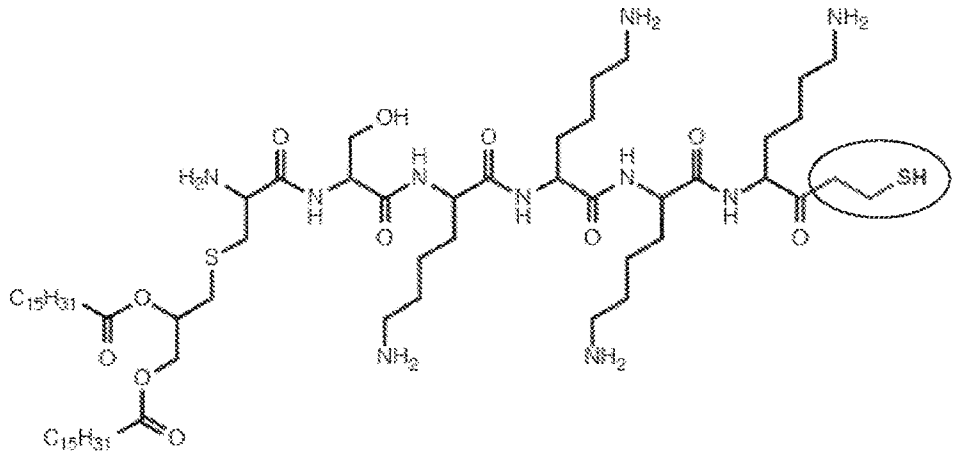


Fig. 22P

Pam2CSK4 - Conjugación por medío del segundo residuo de lisina

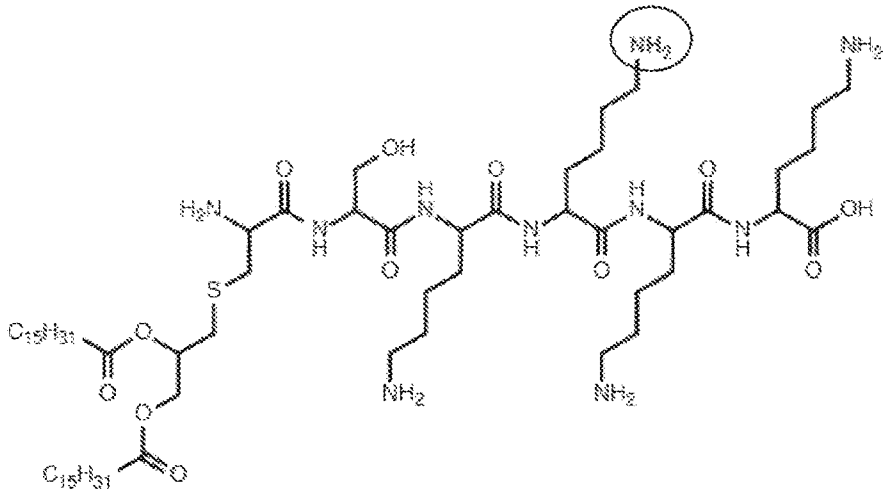


Fig. 22Q

Pam2CSK4 - Conjugación por medio del tercer residuo de lisina

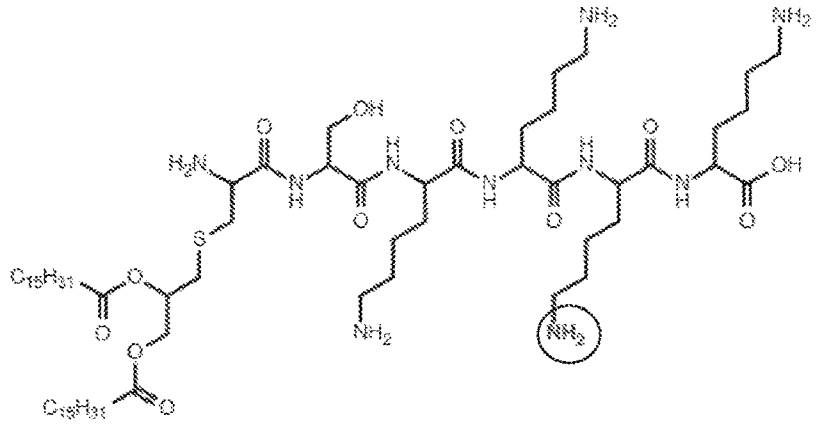


Fig. 22R

Pam2CSK4 - Conjugación por medio del residuo de lisina terminal

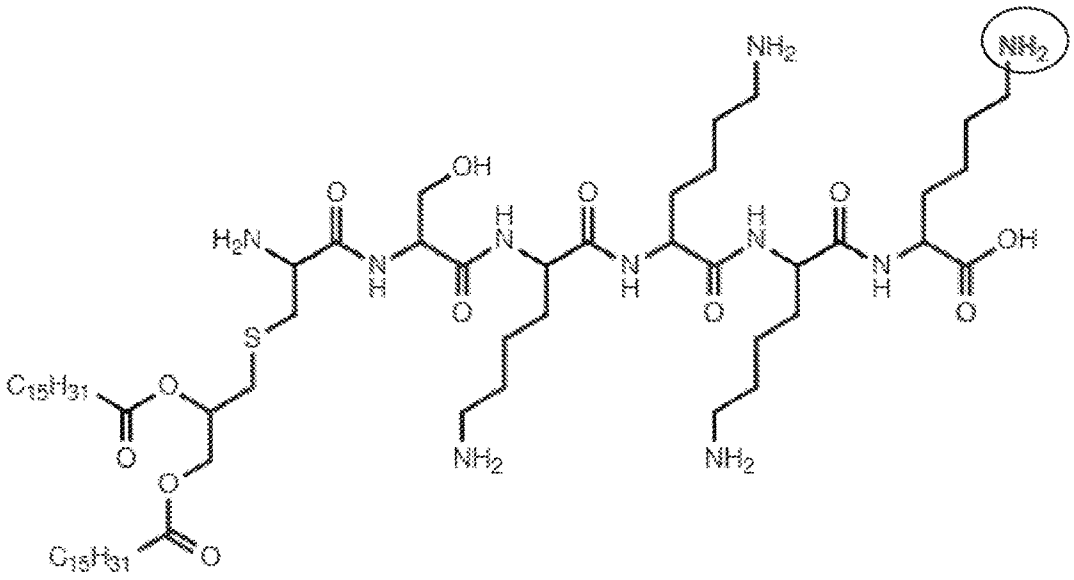


Fig. 22S

Pam3CSK4 - Conjugación por medio del ácido carboxílico terminal

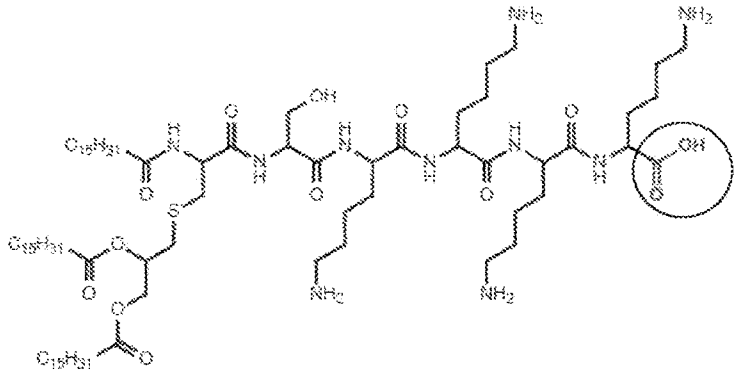


Fig. 22T

Pam3CSK4 - Conjugación por medio de la adición del tiol terminal

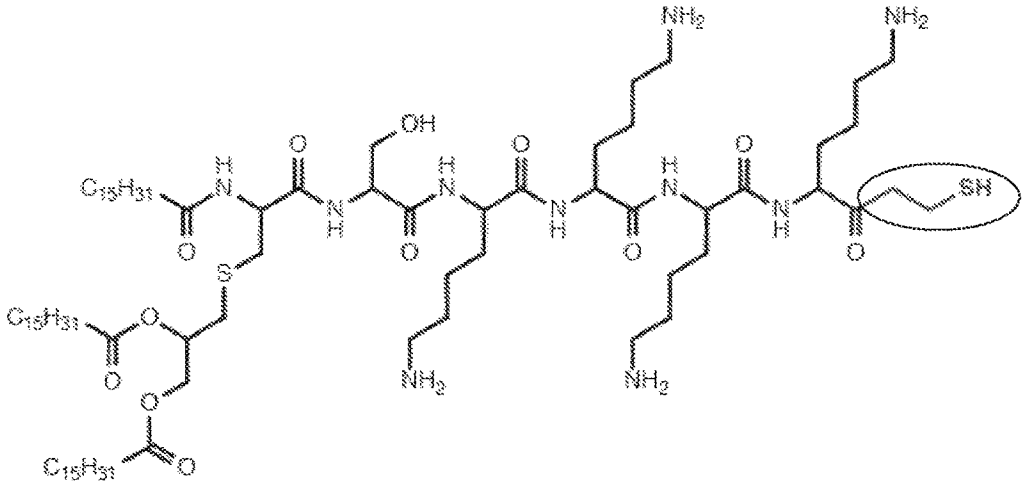


Fig. 22U

Pam3CSK4 -Conjugación por medio del segundo resíduo de lisina

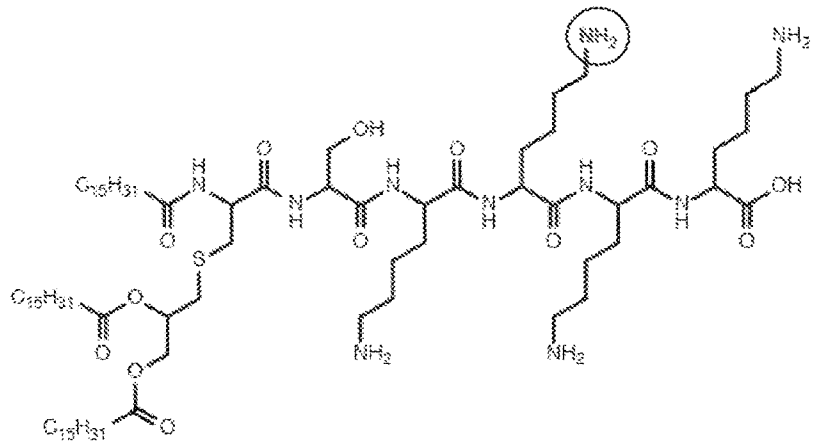


Fig. 22V

Pam3CSK4 - Conjugación por medio del tercer residuo de lisina

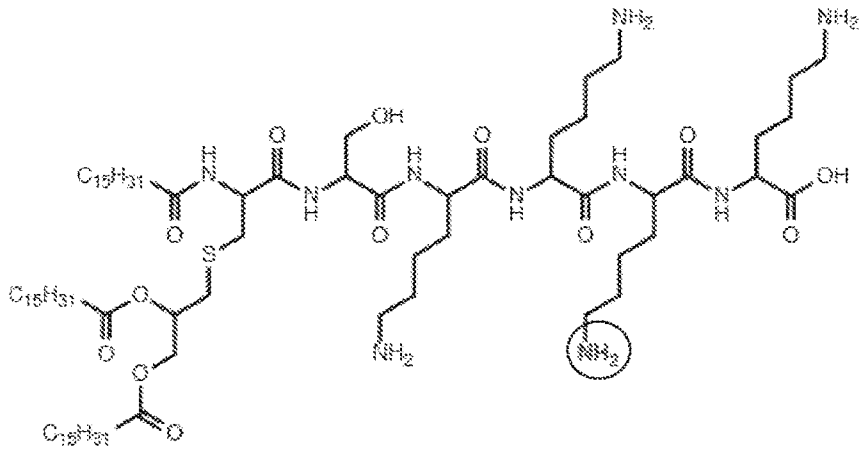


Fig. 22W

Pam3CSK4 - Conjugación por medio del residuo de lisina terminal

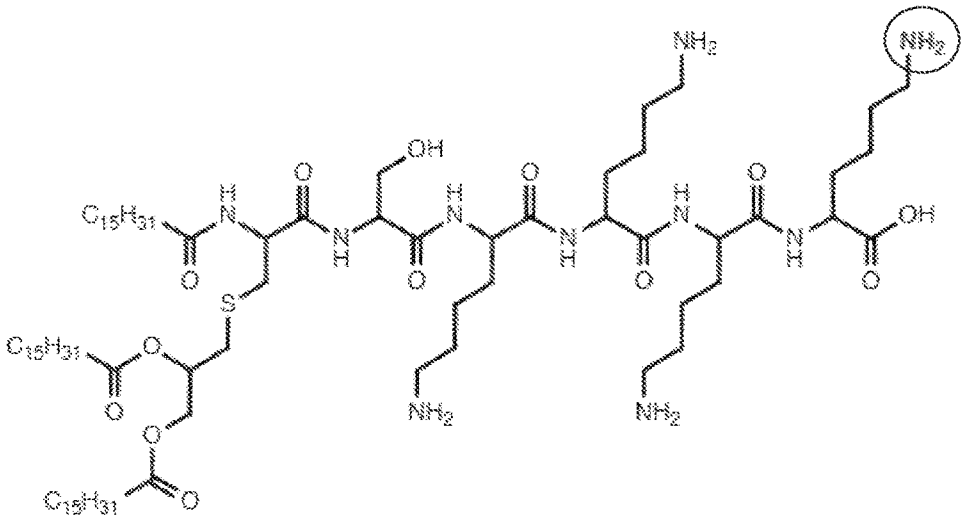


Fig. 22X

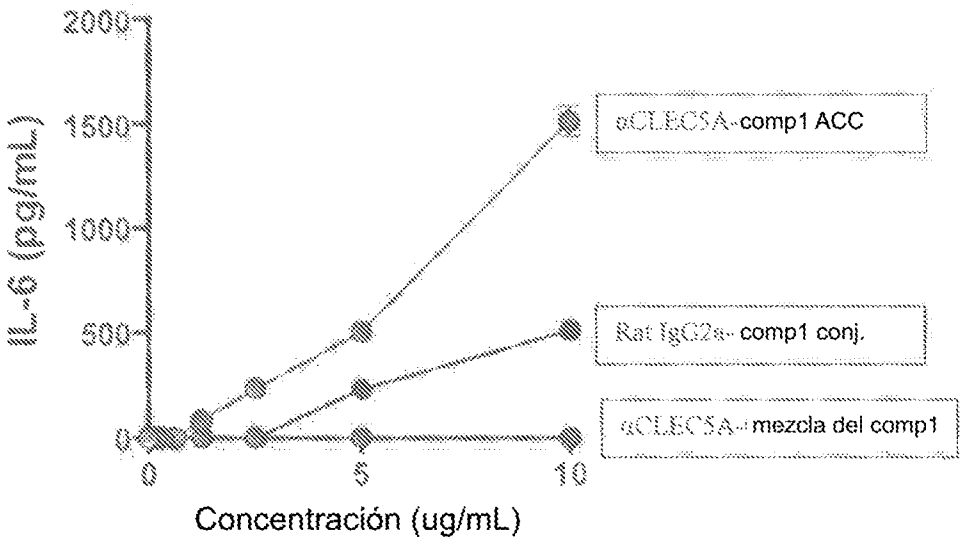


Fig. 23A

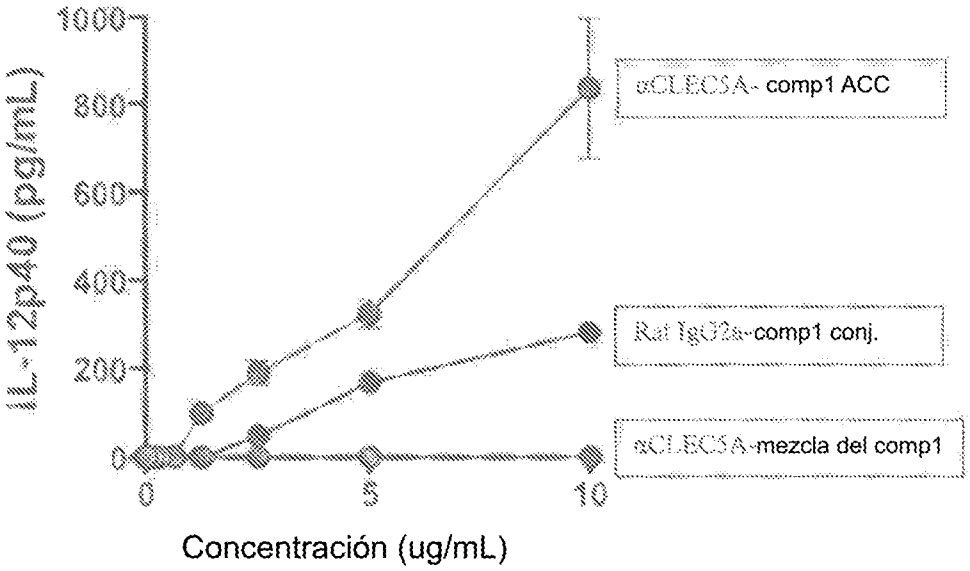


Fig. 23B

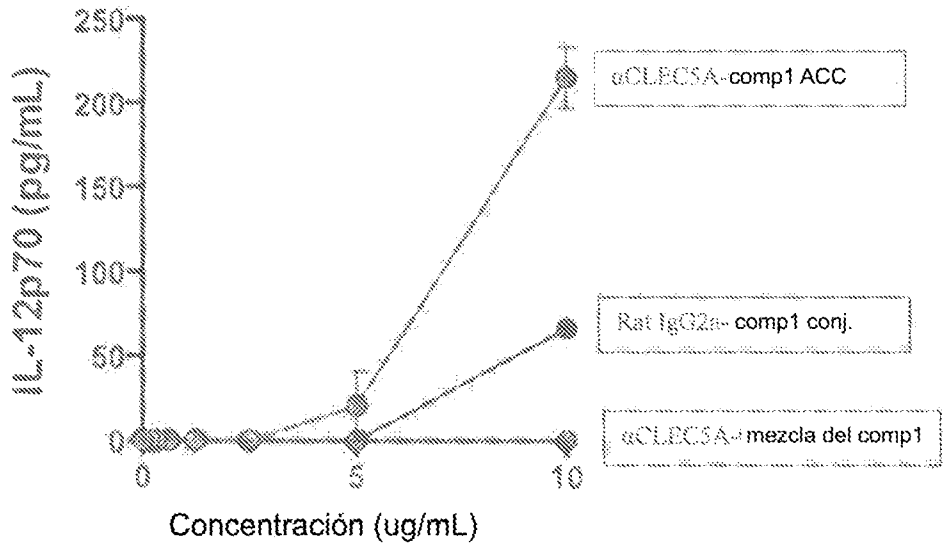


Fig. 23C

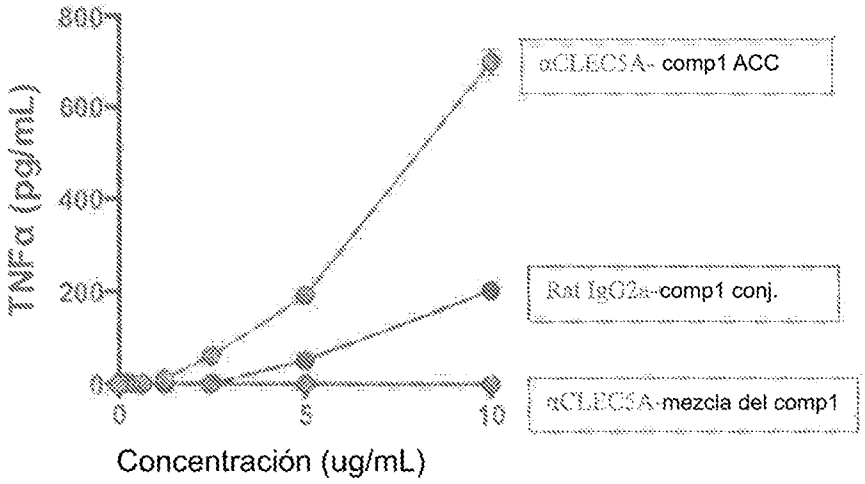


Fig. 23D

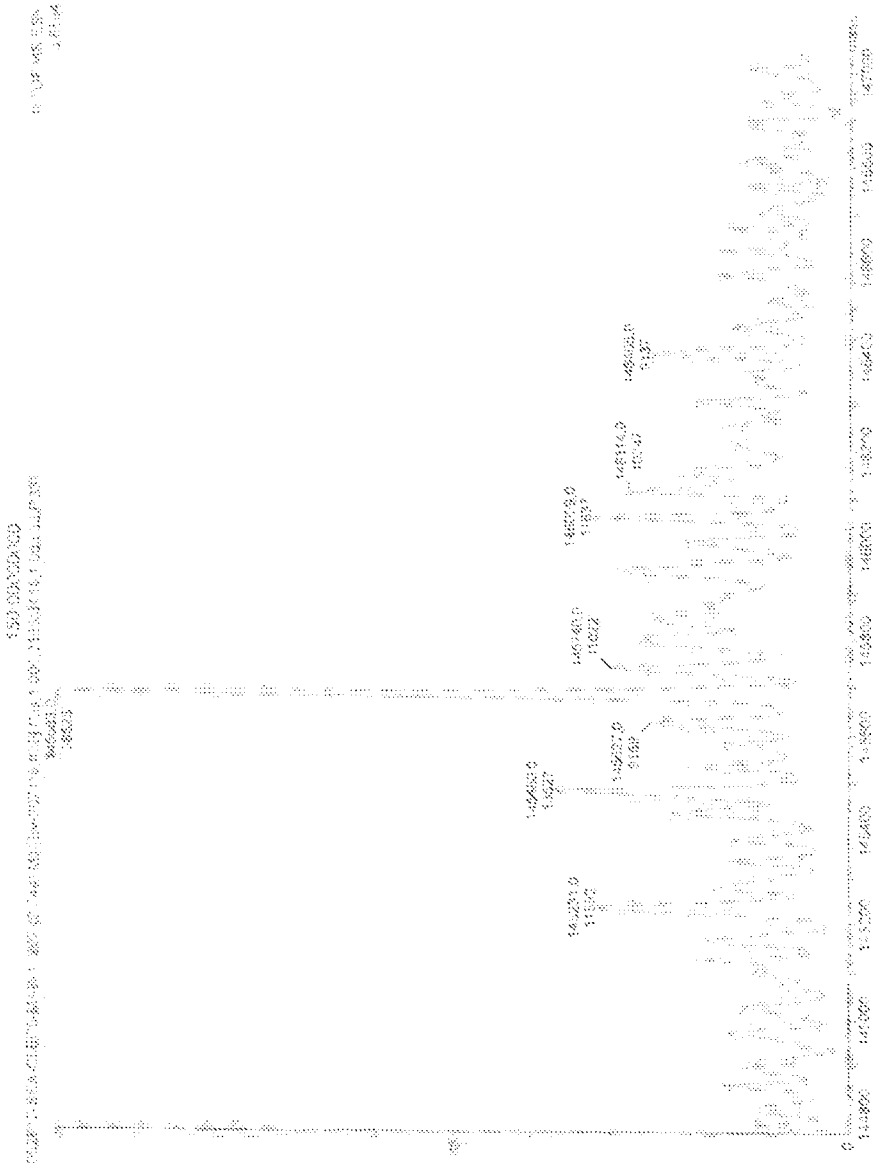


Fig. 23E

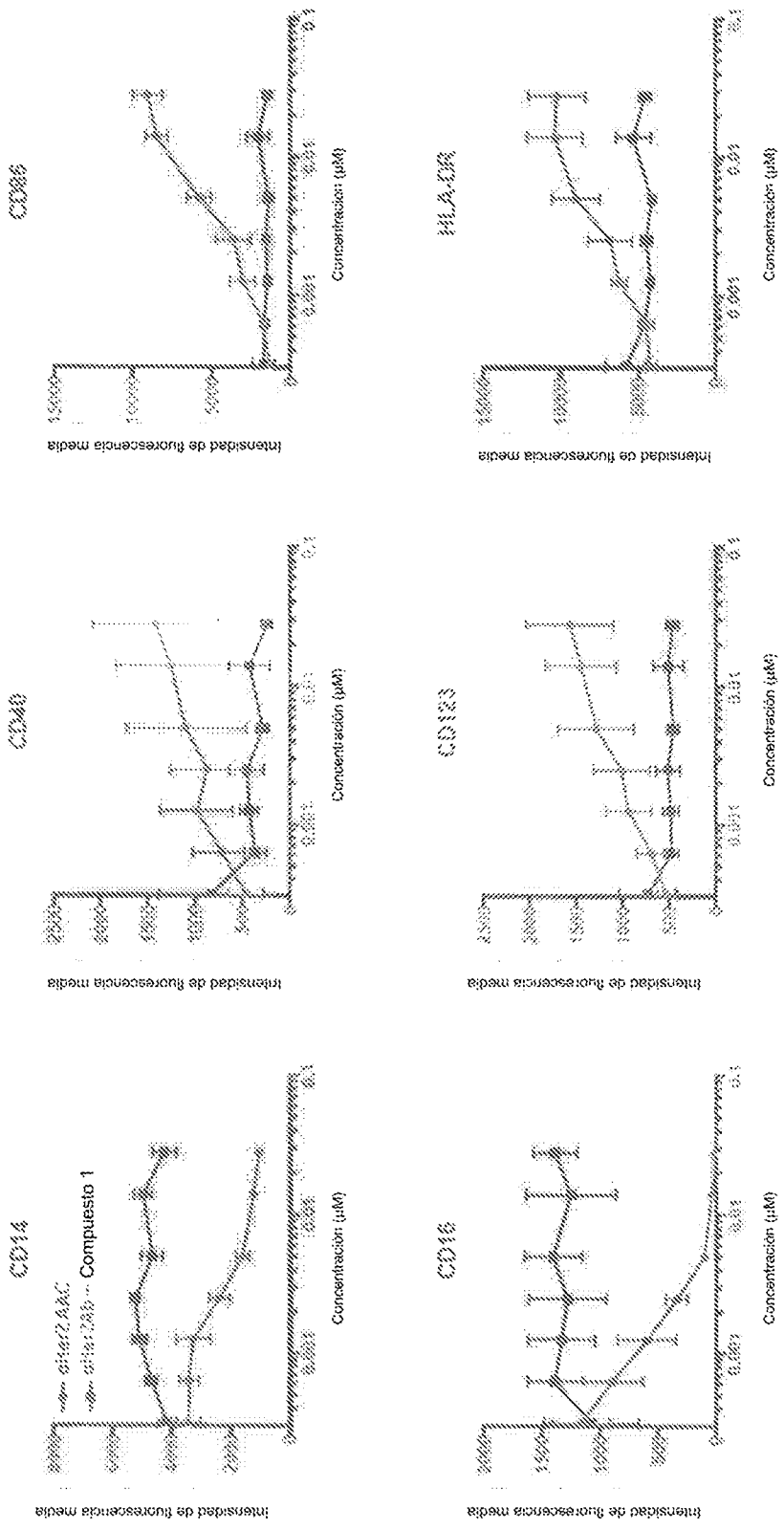

CD86
HLA-DR
CD40
CD123
CD14
CD16
Intensidad de fluorescencia media
Concentración (µM)
Compuesto 1

Fig. 24

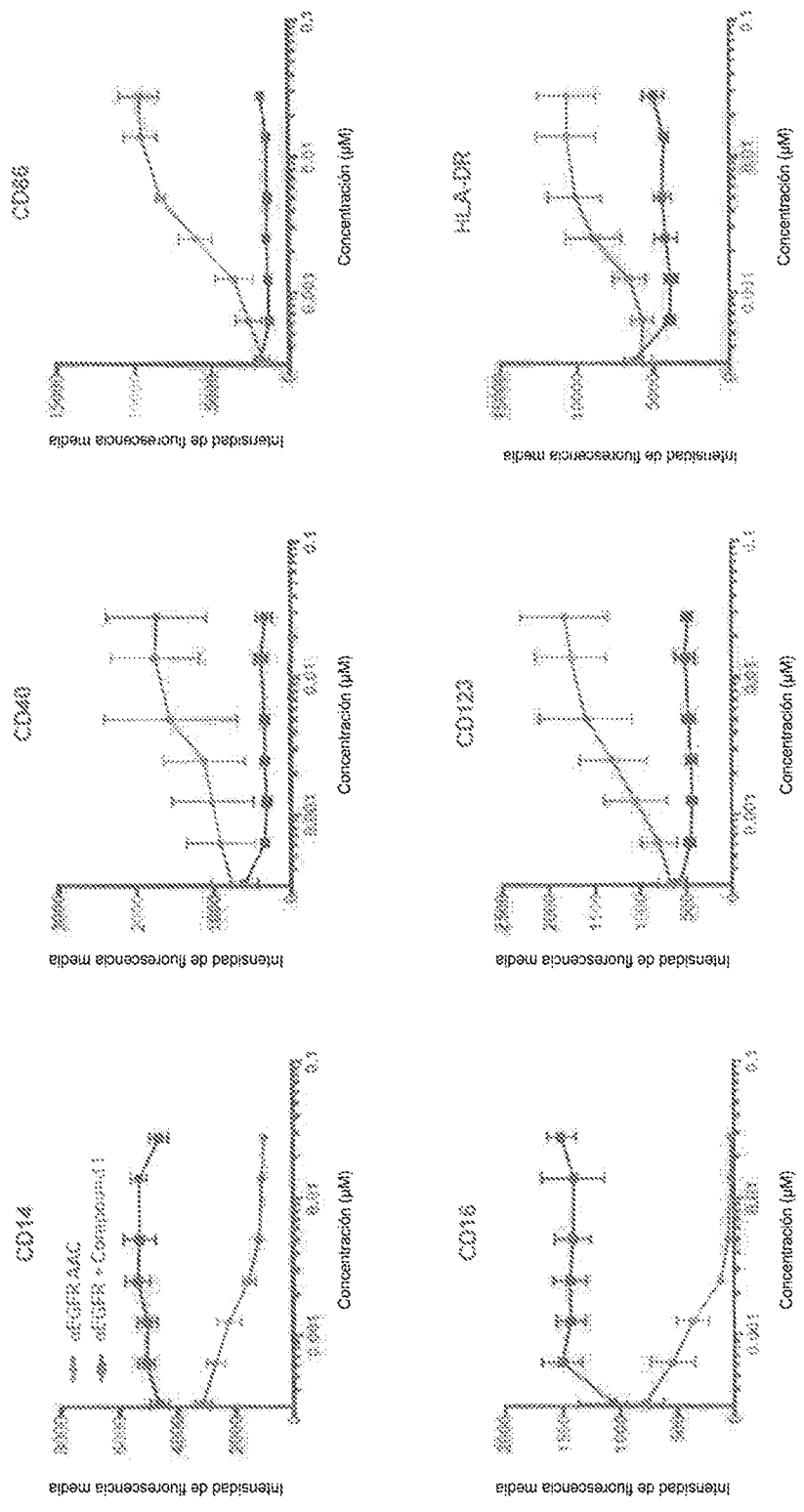

CD86
HLA-DR
CD48
CD123
CD14
CD16
Intensidad de fluorescencia media
Concentración (μM)
aEGFR AAC
aEGFR + Compound 1

Fig. 25

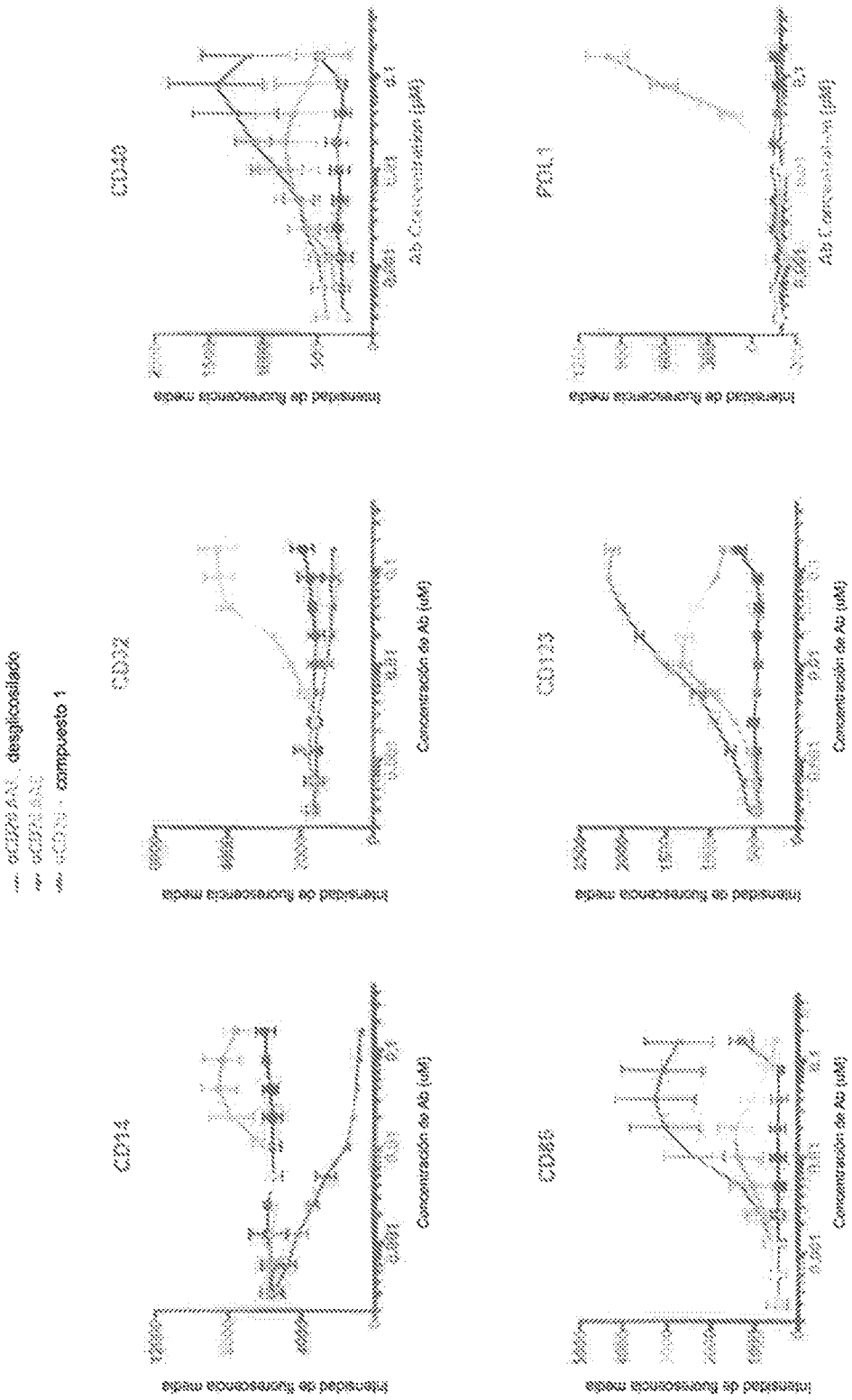

anti-CD19 AN - desglicosilado
anti-CD19 AN
CD19 - compuesto 1
CD40
CD32
CD23
CD14
CD86
FCGR1
Intensidad de fluorescencia media
Concentración de Ab (uM)

Fig. 26

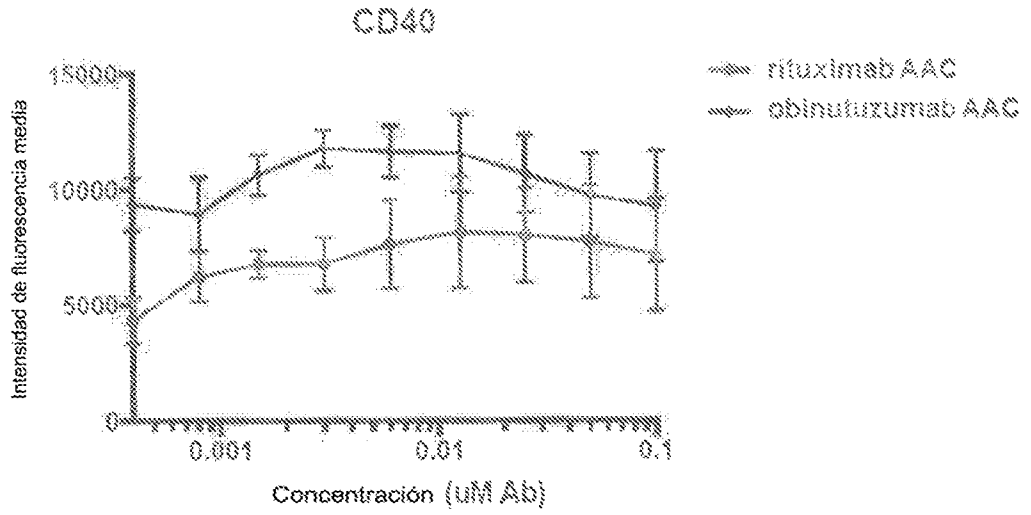

CD40
rituximab AAC
obinutuzumab AAC
Intensidad de fluorescencia media
15000
10000
5000
0
0.001
0.01
0.1
Concentración (uM Ab)

Fig. 27

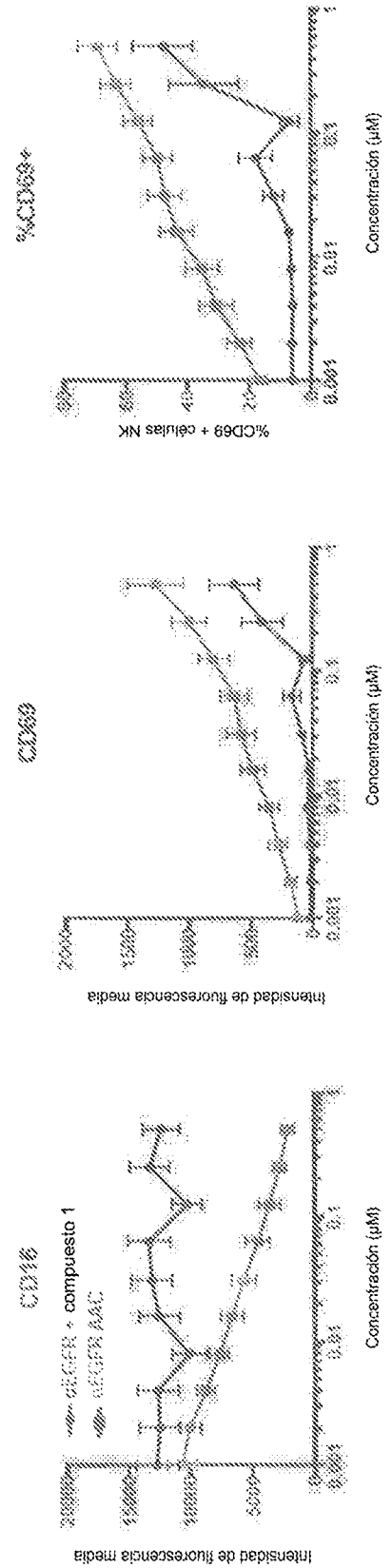

CD16
anti-CD16R + compuesta 1
anti-CD16R MAC
Intensidad de fluorescencia media
Concentración (µM)
CD69
Intensidad de fluorescencia media
Concentración (µM)
%CD69+
%CD69 + células NK
Concentración (µM)

Fig. 28

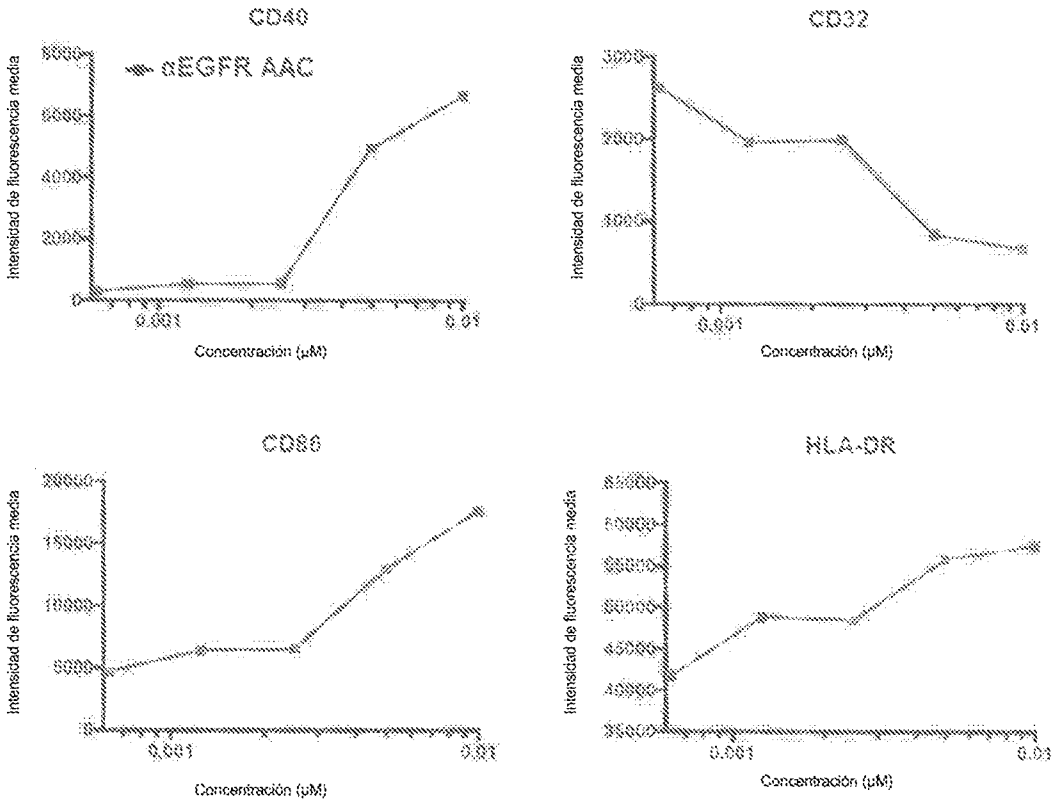

CD40
αEGFR AAC
Intensidad de fluorescencia media
Concentración (μM)
CD32
Intensidad de fluorescencia media
Concentración (μM)
CD86
Intensidad de fluorescencia media
Concentración (μM)
HLA-DR
Intensidad de fluorescencia media
Concentración (μM)

Fig. 29

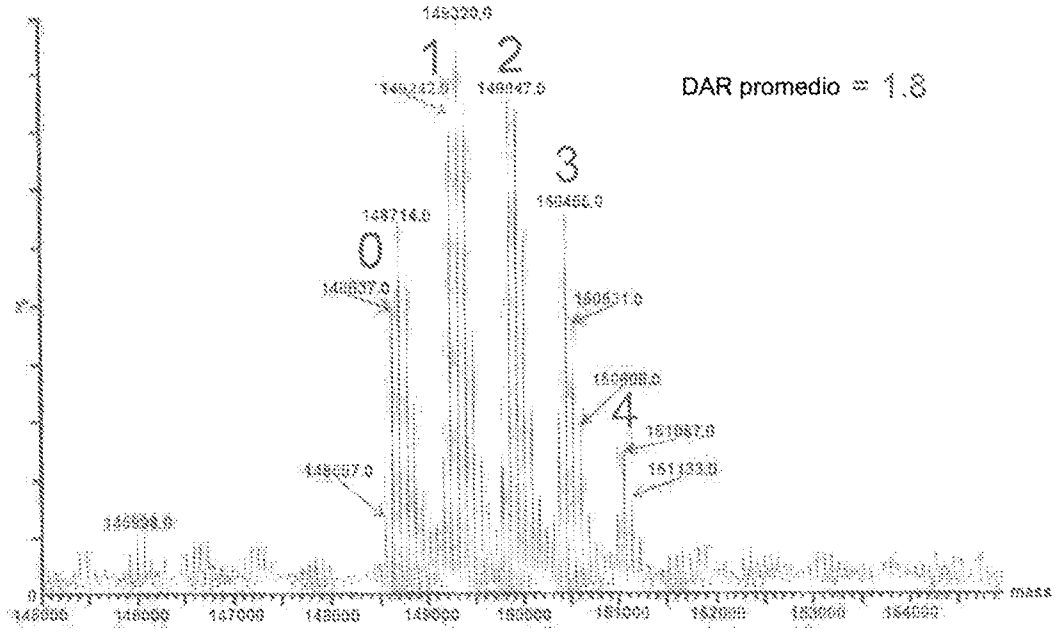


Fig. 30A

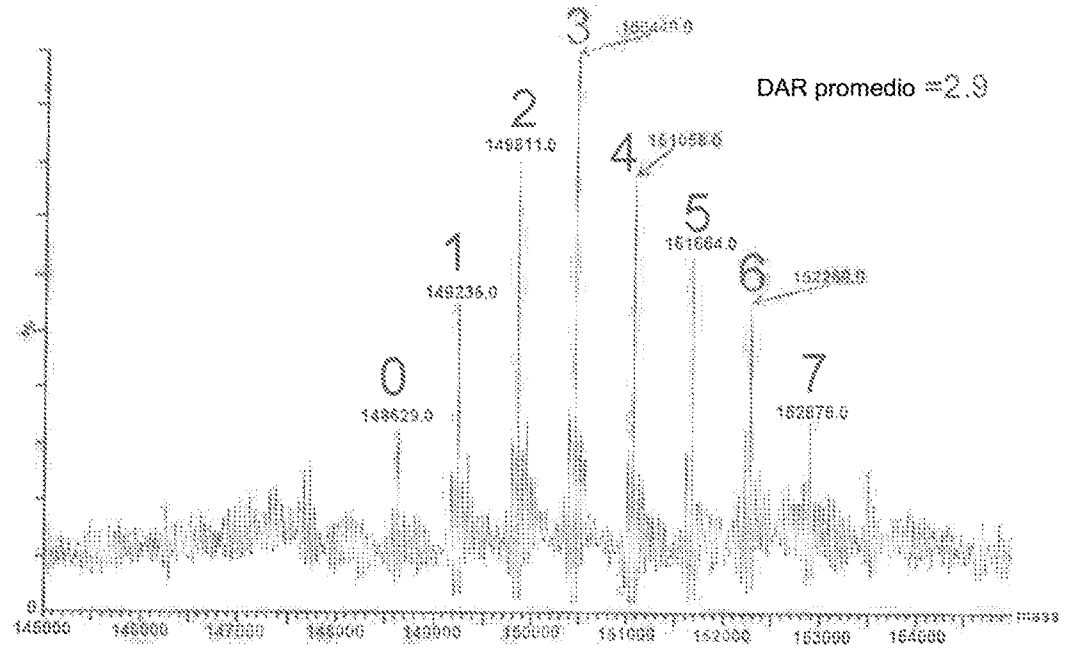


Fig. 30B

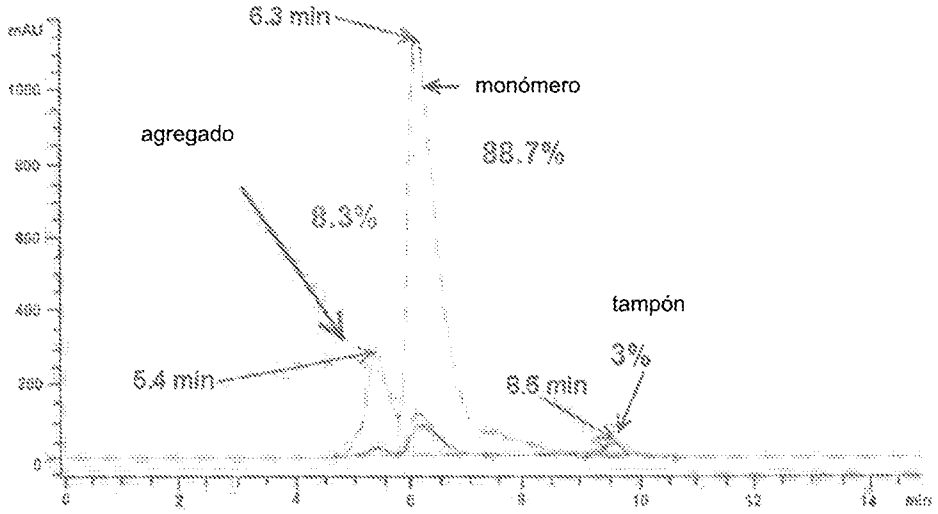


Fig. 31A

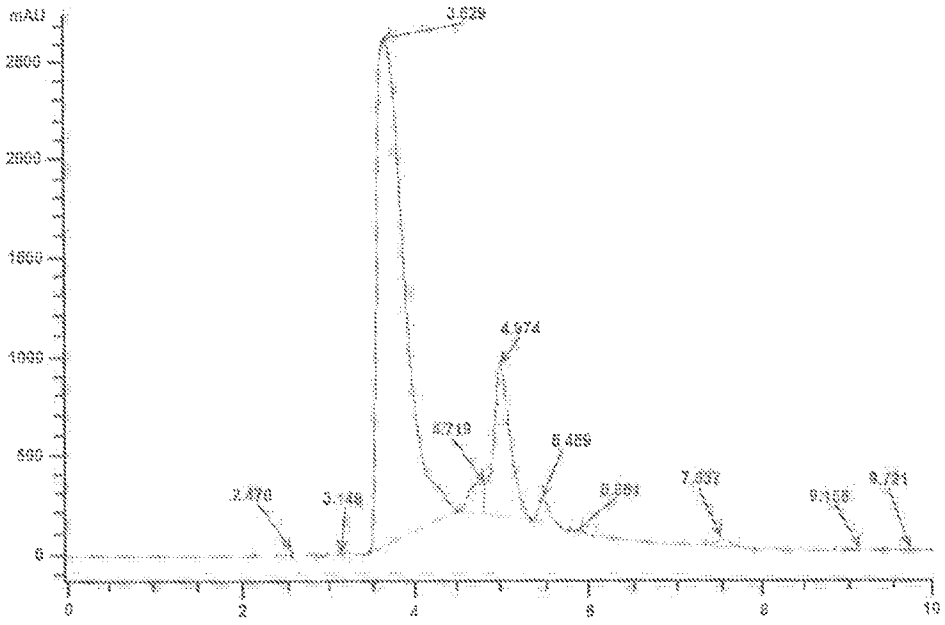


Fig. 31B

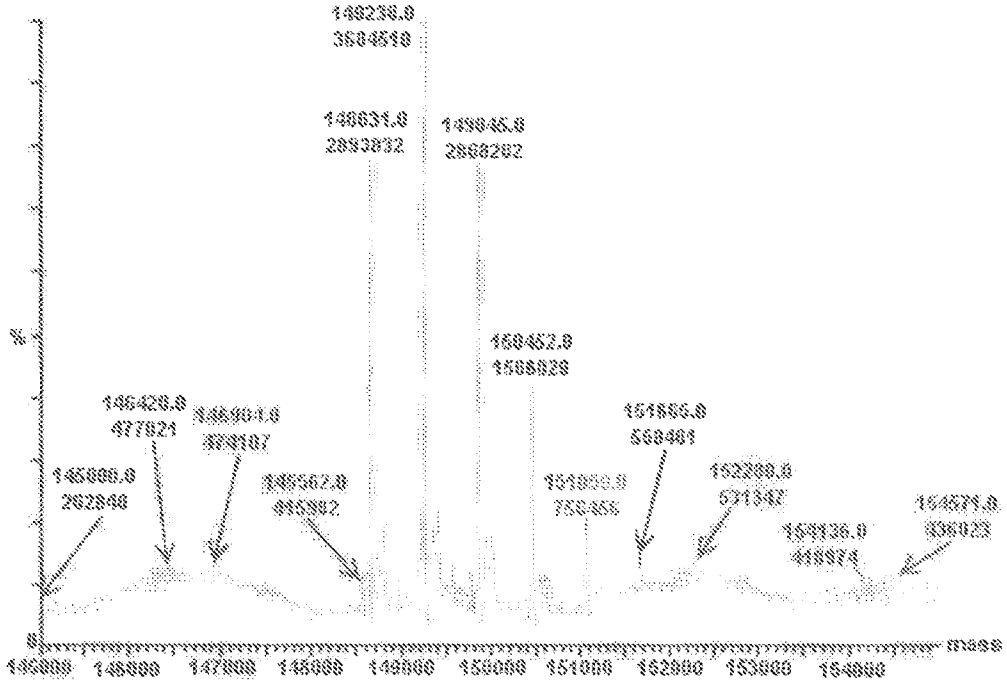

148236.8
3504618
148631.8
2893832
149045.8
2868282
150462.8
1508828
146426.8
477621
146901.8
874187
145088.8
262848
147562.8
915392
151850.8
558481
152288.8
571347
154671.8
356023
%
mass

Fig. 32

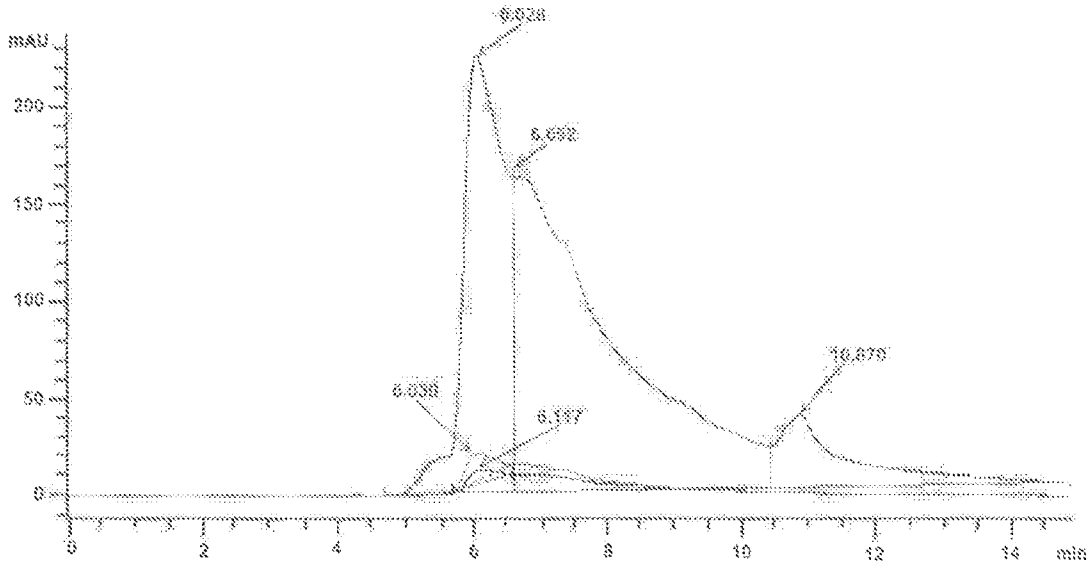

mAU
6.028
6.692
10.870
6.338
6.517
min

Fig. 33

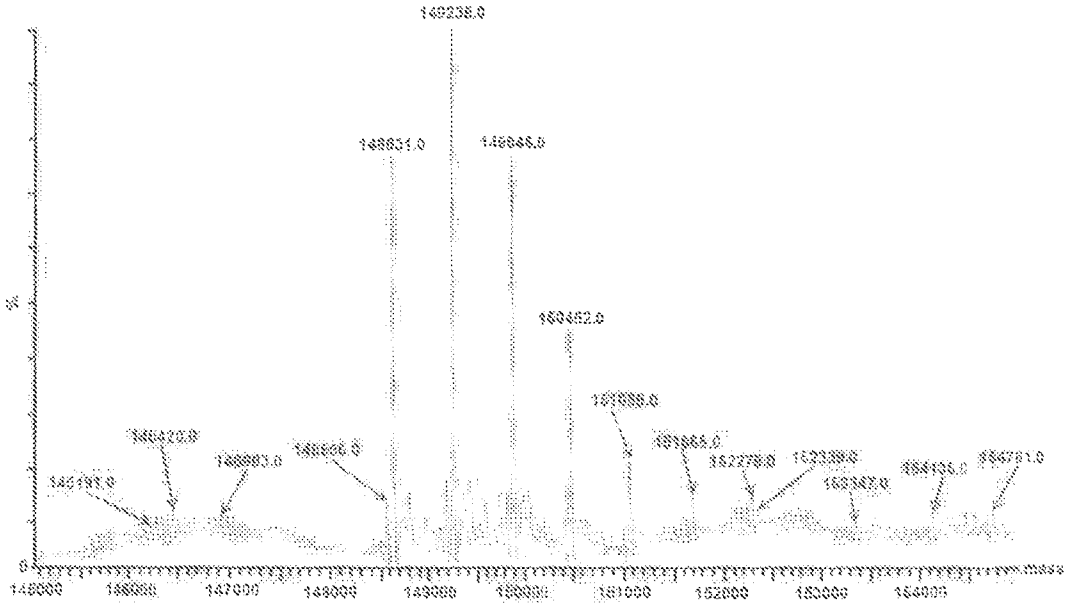

149238.0
148851.0
148646.0
150462.0
151688.0
152278.0
152342.0
154771.0
146191.0
148420.0
148883.0
148606.0
%
mass
148000
147000
149000
150000
151000
152000
153000
154000

Fig. 34

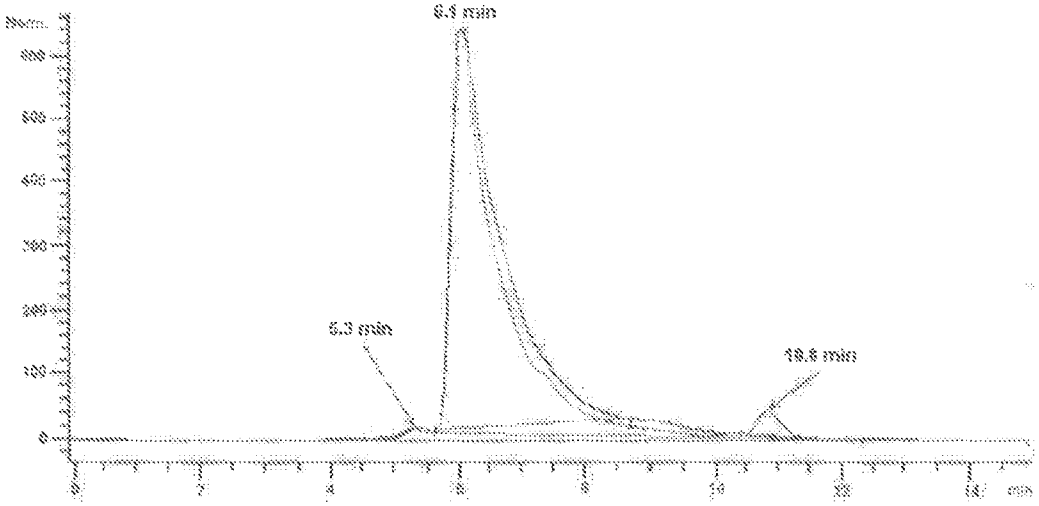

8.1 min
5.3 min
19.6 min
%
min

Fig. 35

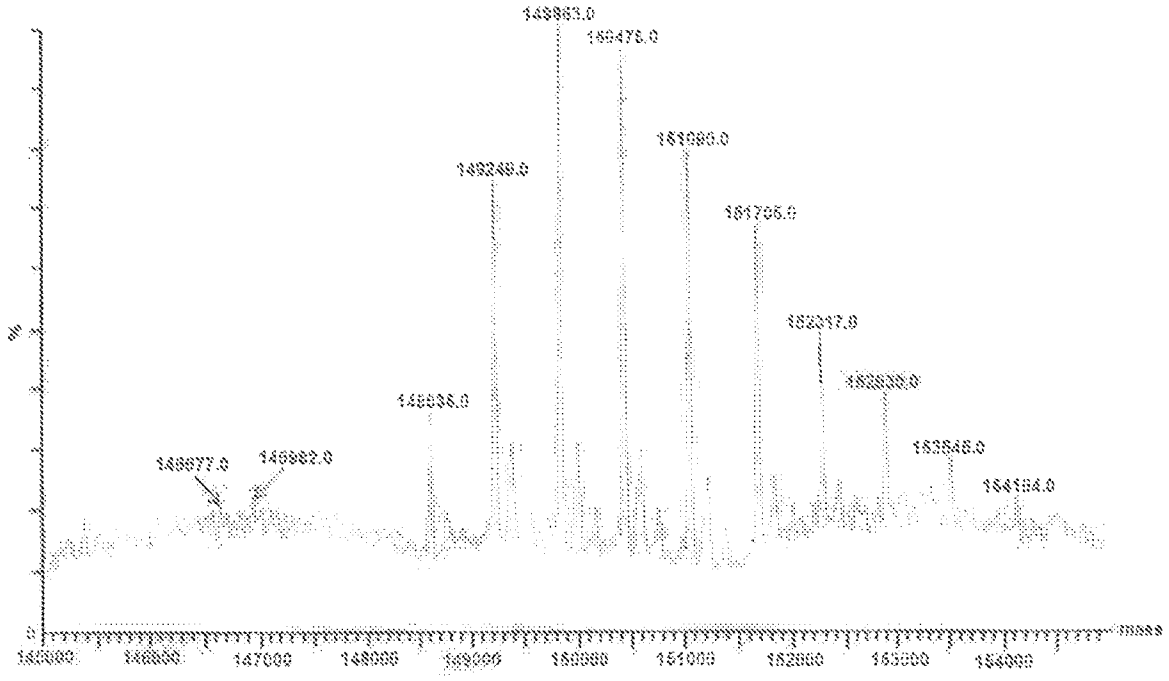

149863.0
150478.0
151080.0
149240.0
151795.0
152317.0
152830.0
148036.0
153548.0
148677.0
149982.0
154184.0
%
0
152000
151000
154000

Fig. 36

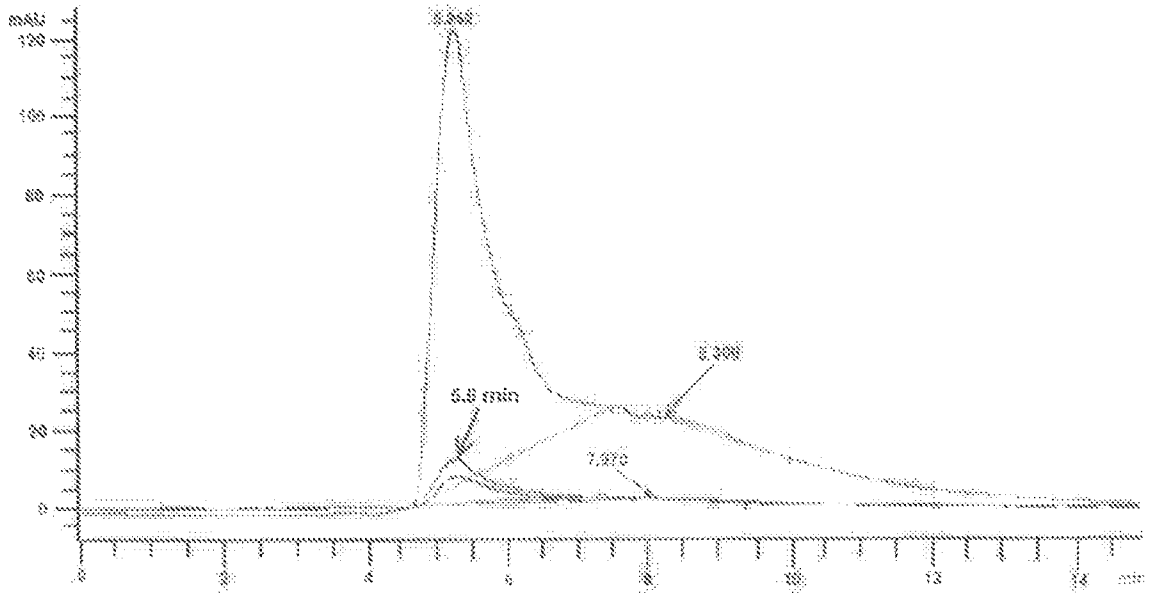

mAU
%
0
5.8 min
7.970
8
10
12

Fig. 37

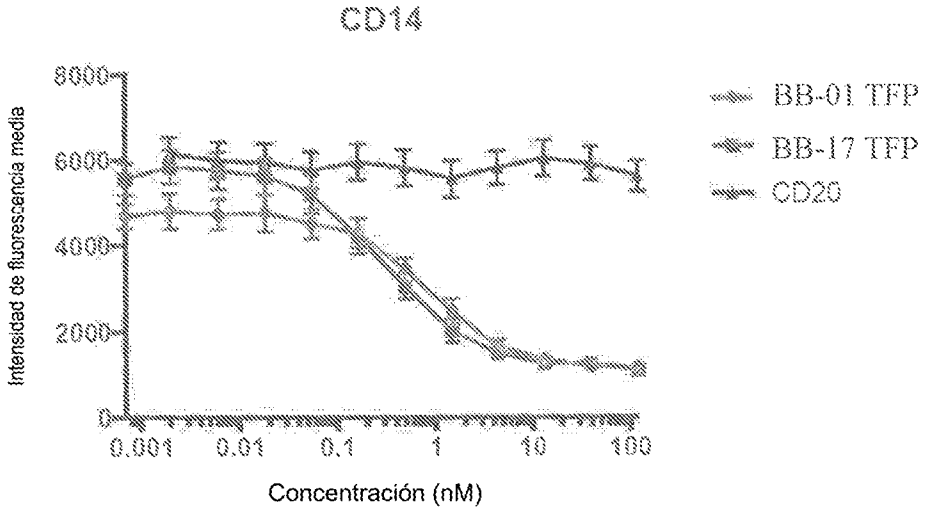


Fig. 38A

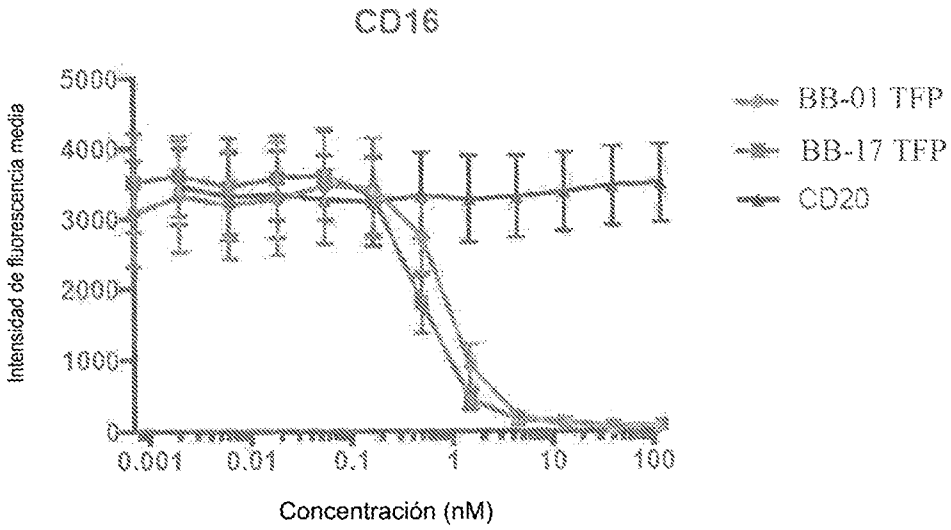


Fig. 38B

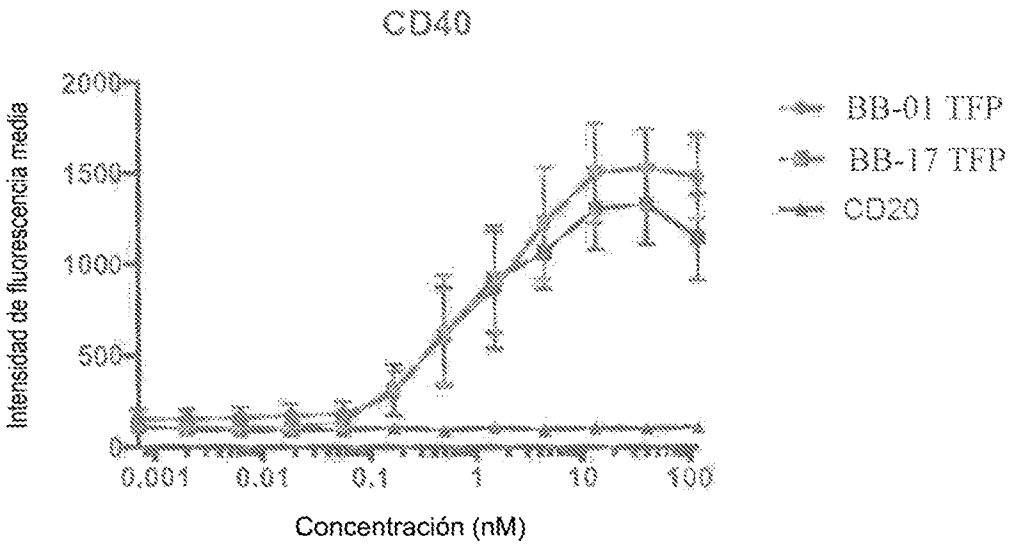


Fig. 38C

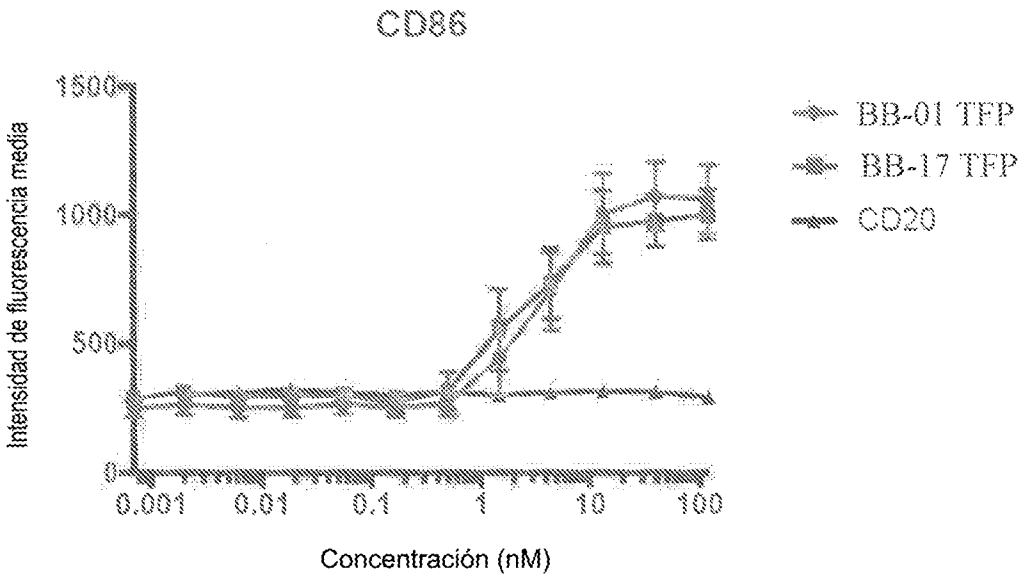


Fig. 38D

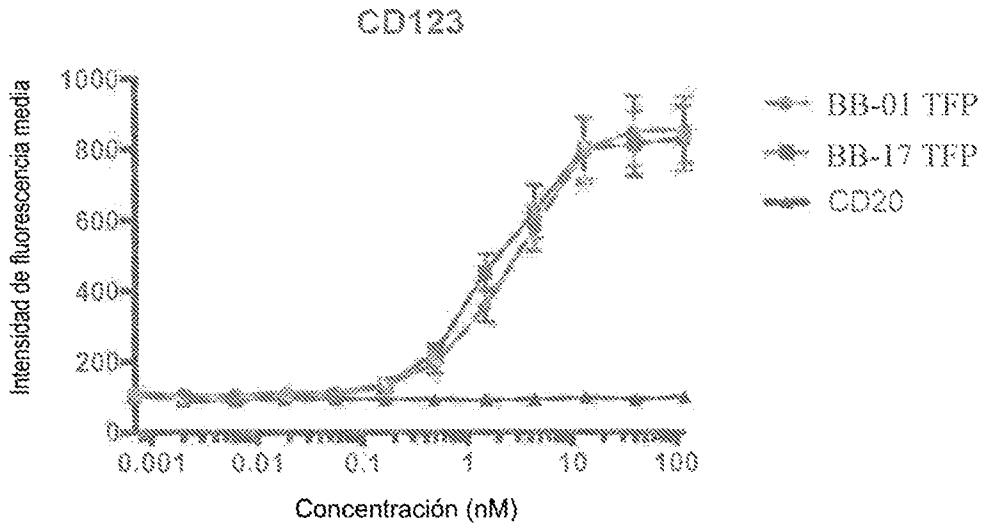


Fig. 38E

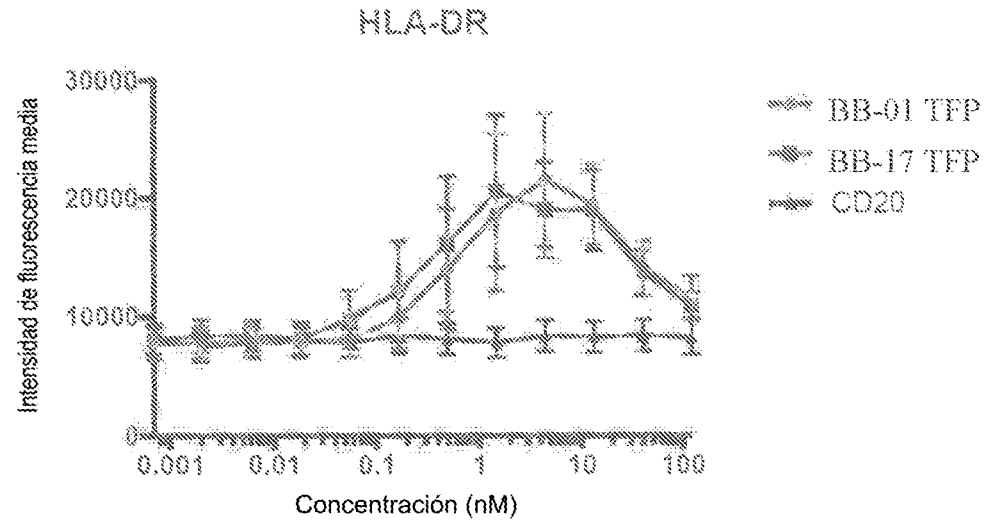


Fig. 38F

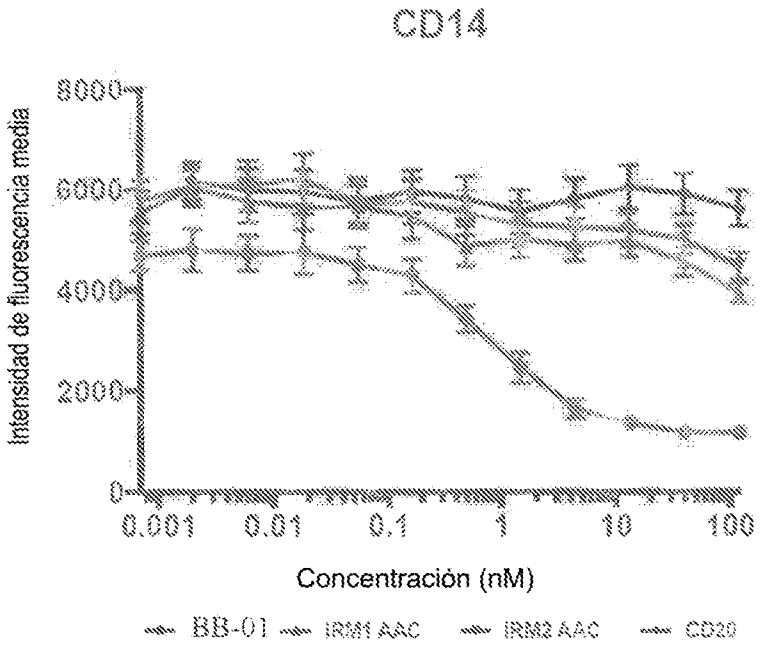


Fig. 39A

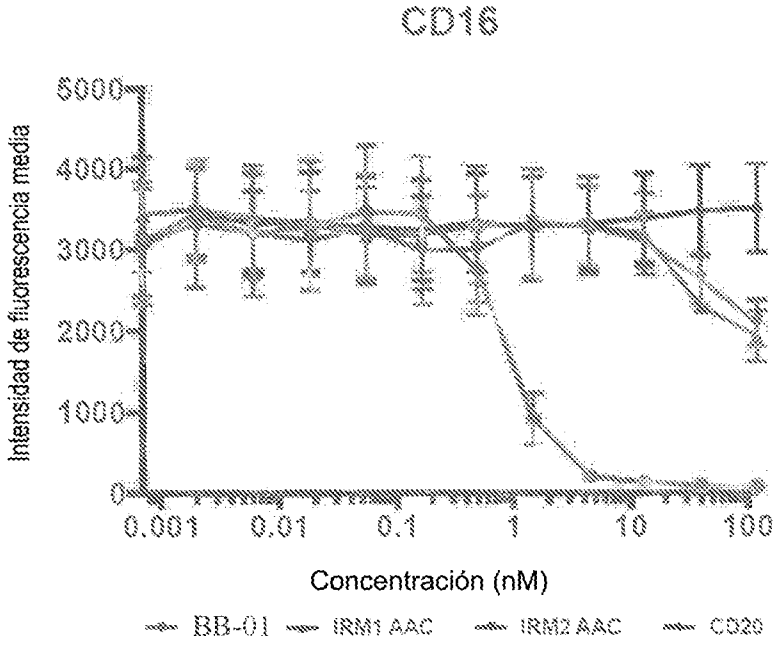


Fig. 39B

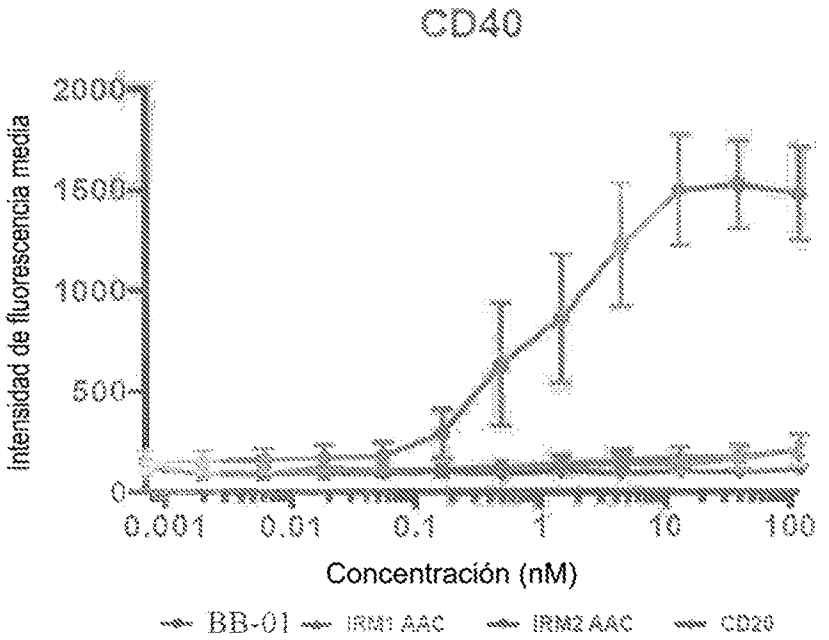


Fig. 39C

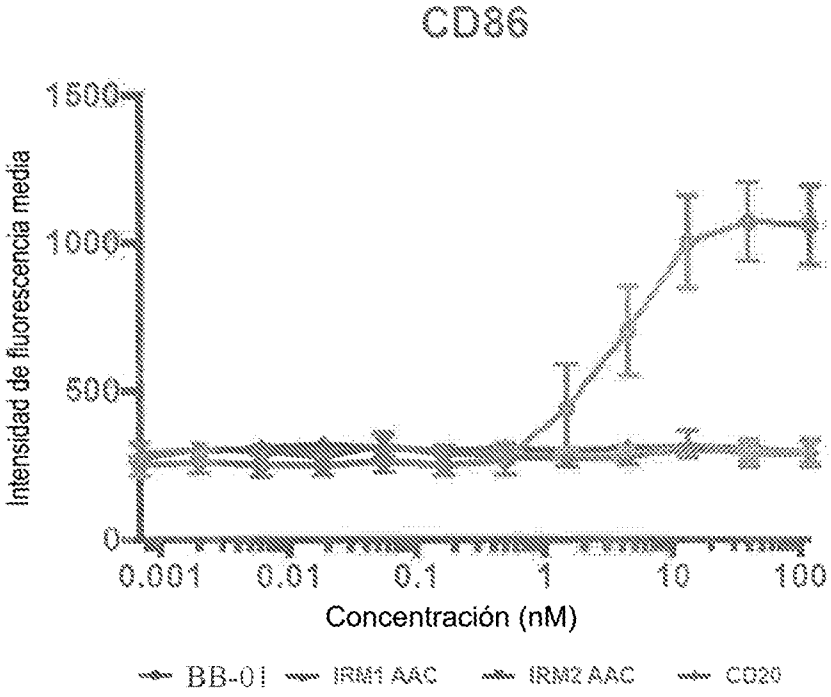


Fig. 39D

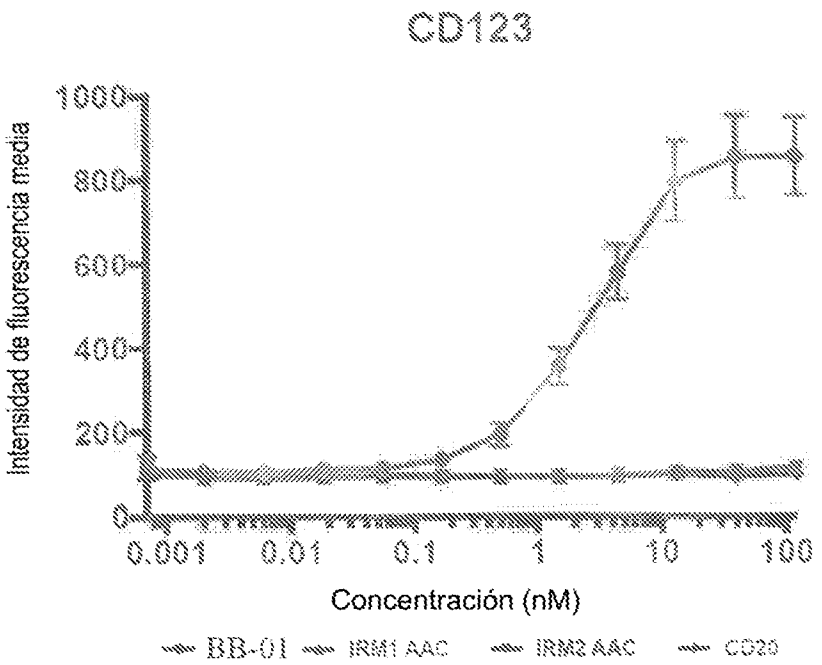


Fig. 39E

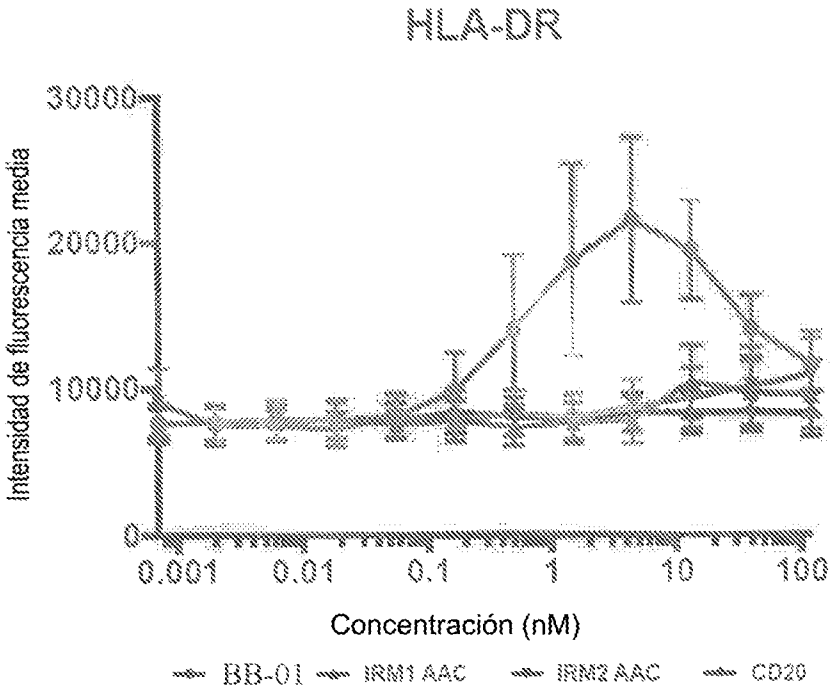


Fig. 39F

IL-1β

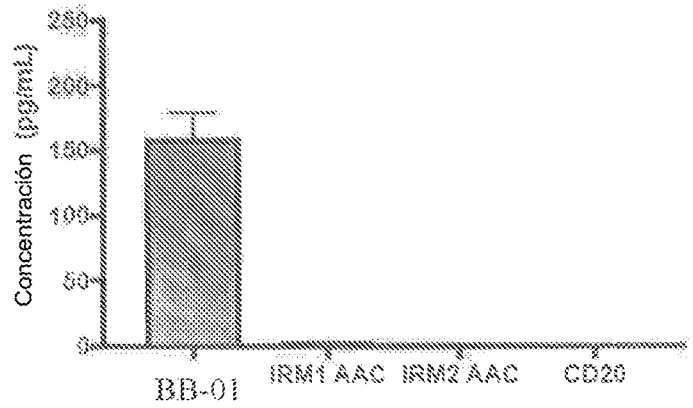


Fig. 40A

IL-6

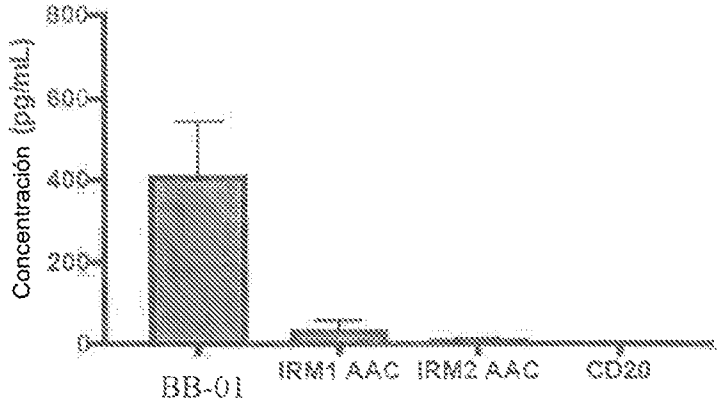


Fig. 40B

TNFα

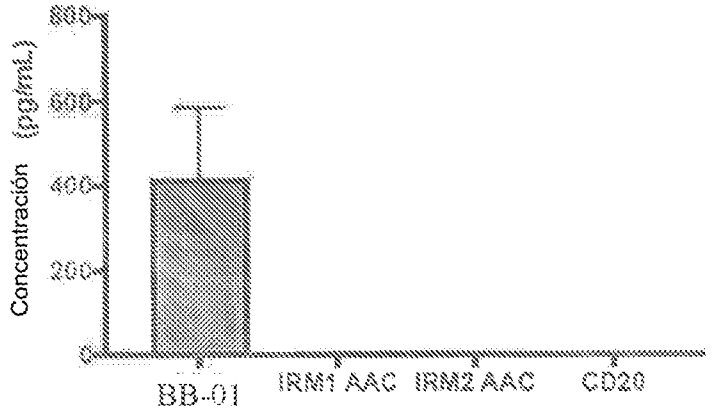


Fig. 40C

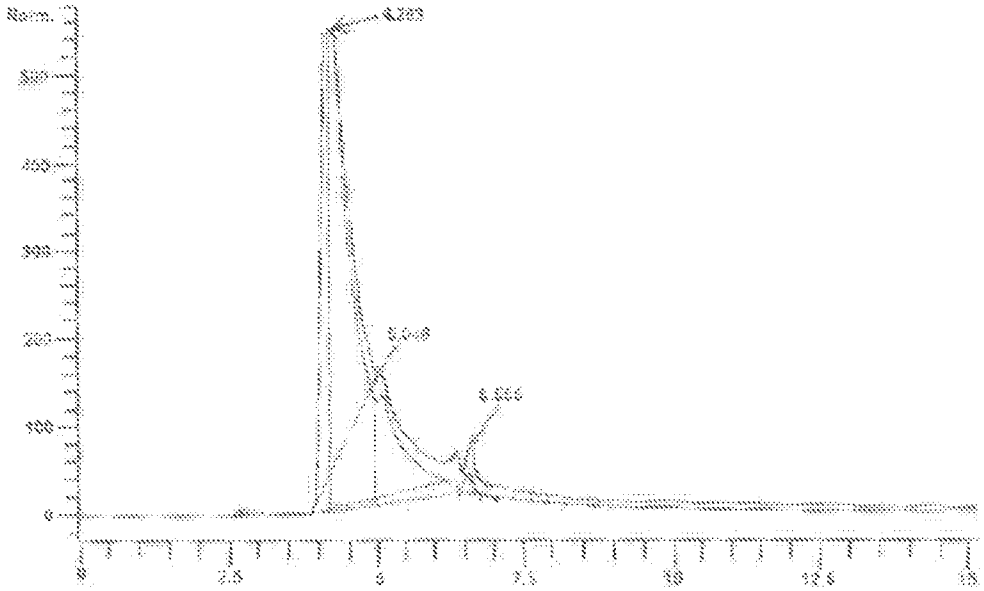


Fig. 41A

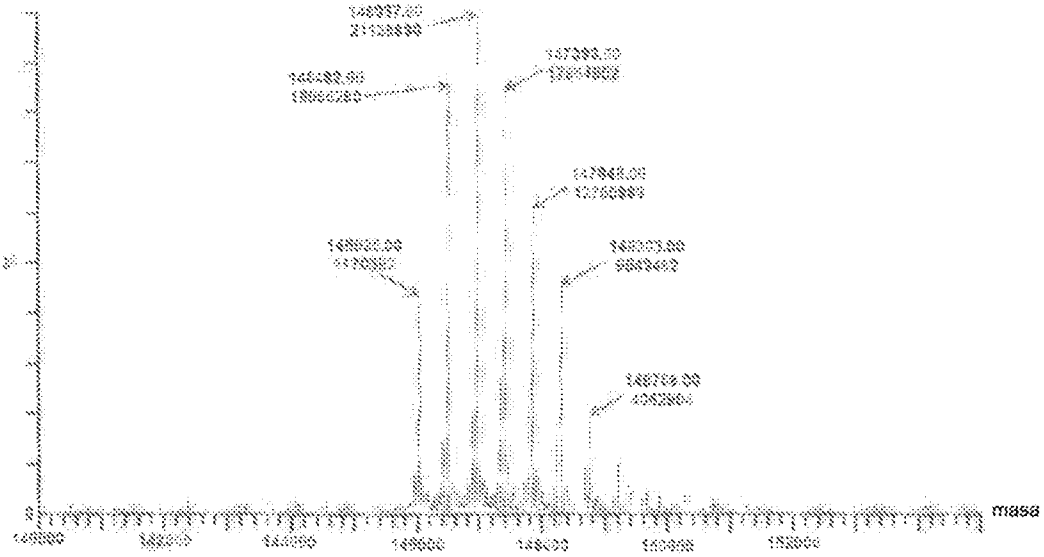


Fig. 41B

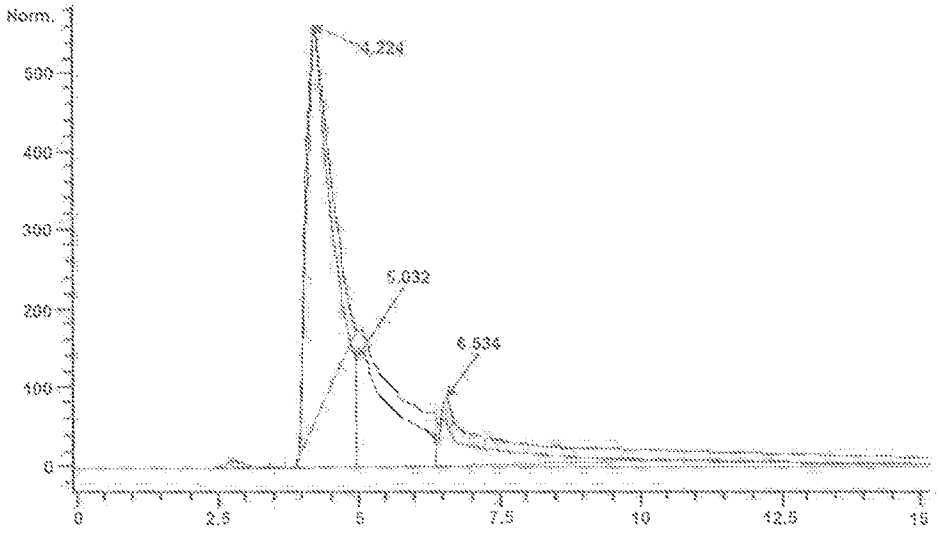


Fig. 42A

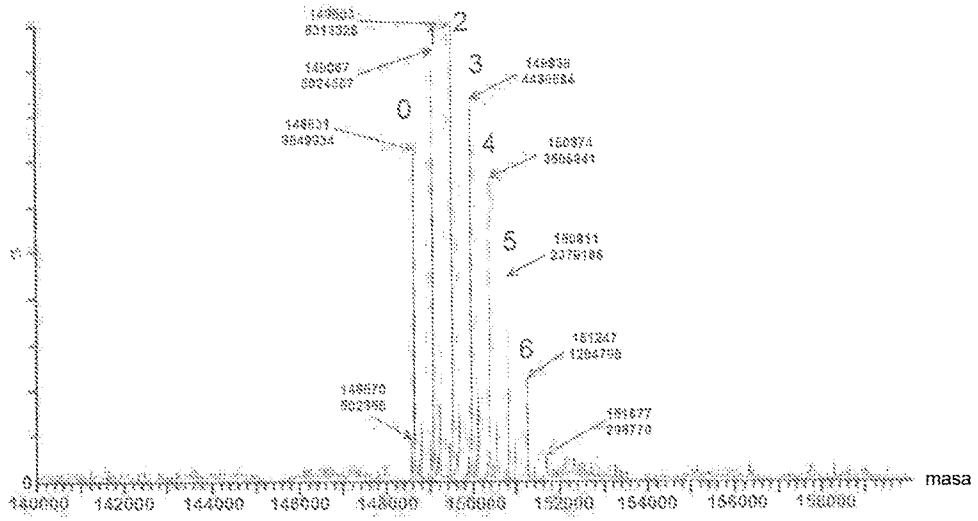


Fig. 42B

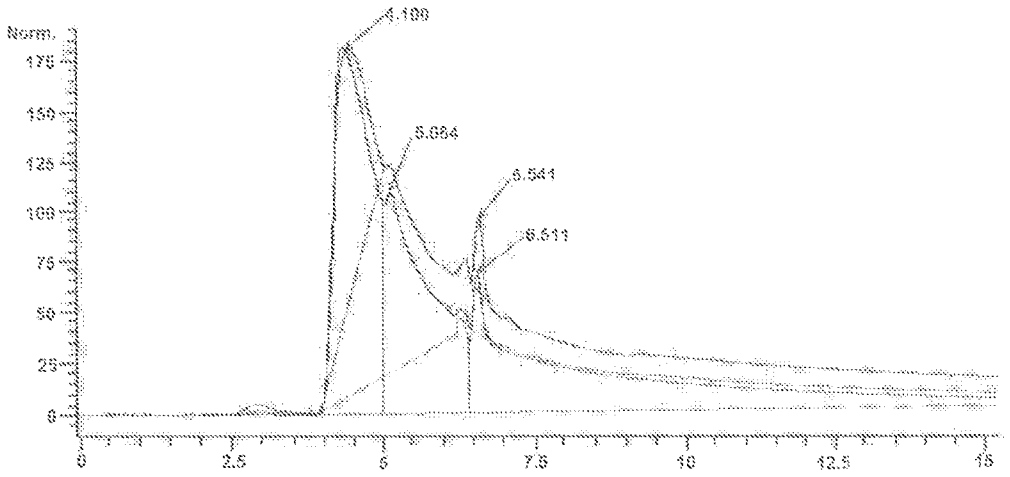


Fig. 43A

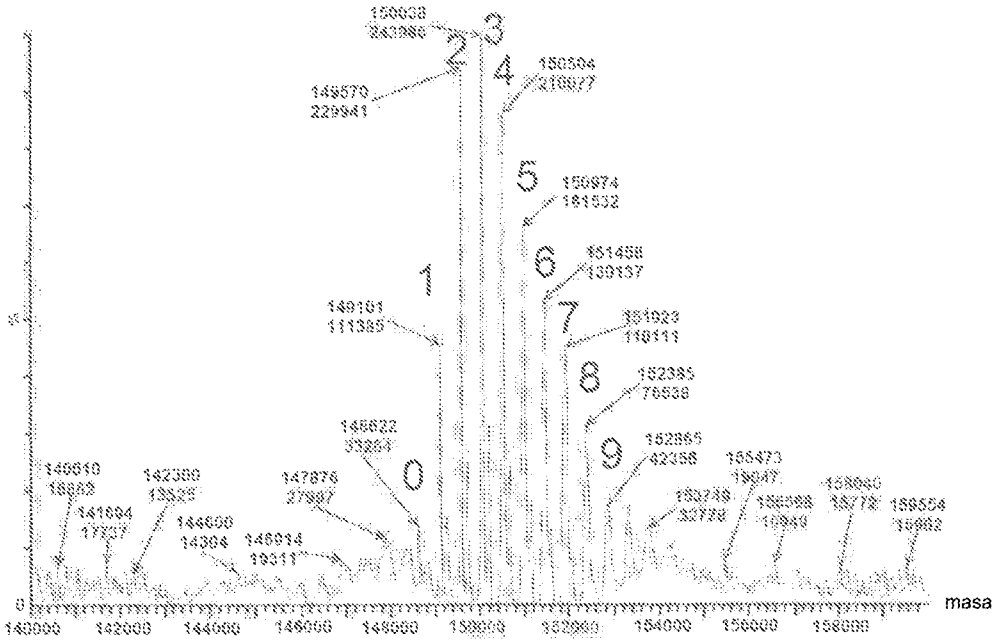


Fig. 43B

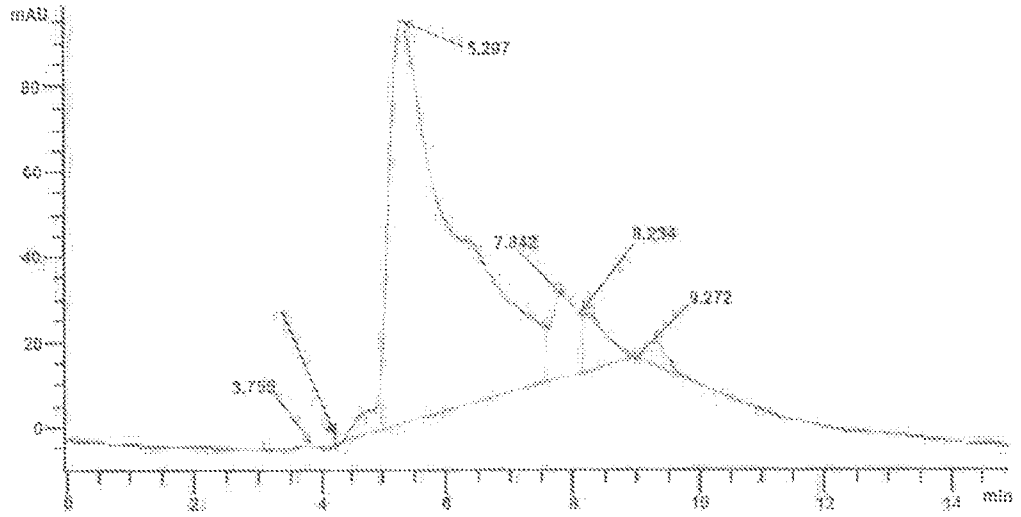


Fig. 44A

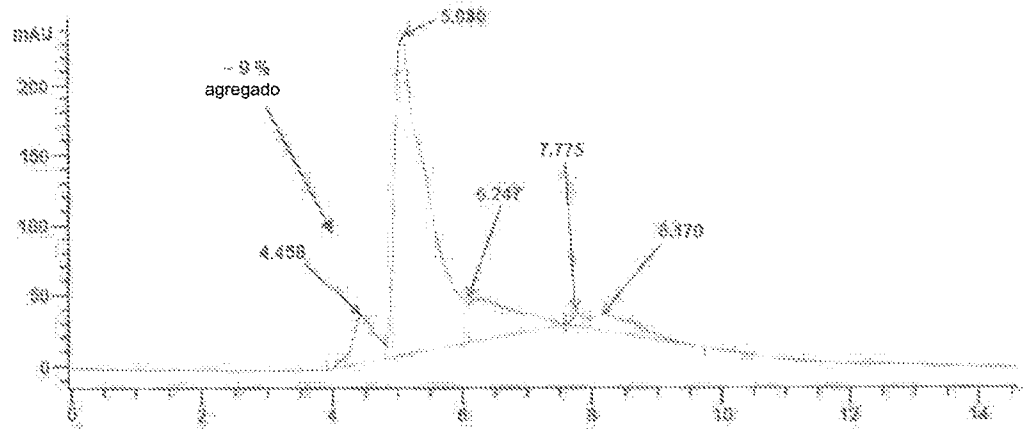


Fig. 44B

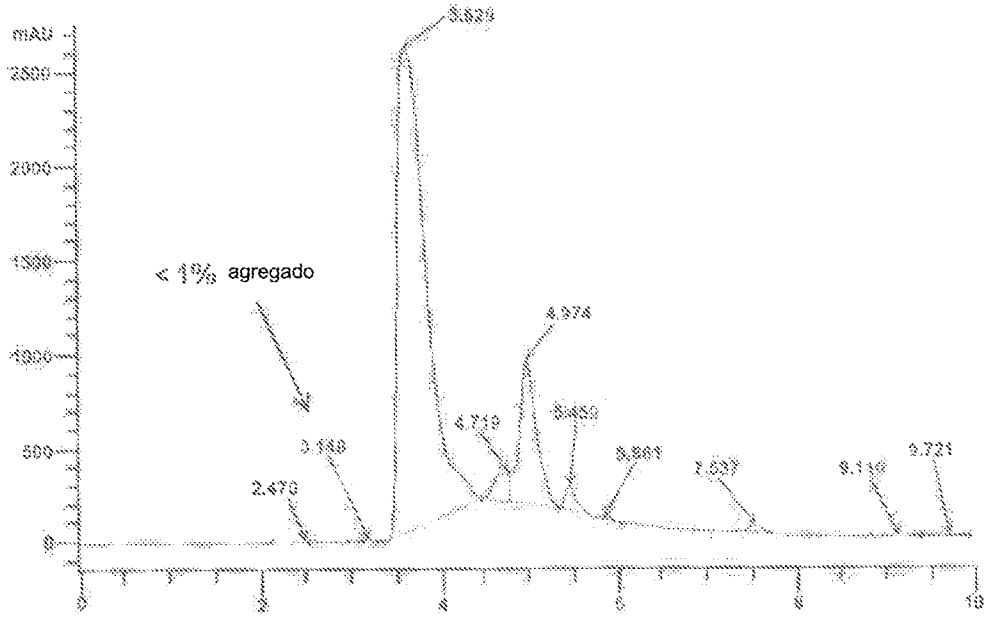

mAU
2500
2000
1500
1000
500
0
< 1% agregado
2.470
3.169
4.719
4.974
5.459
5.829
6.561
7.537
9.116
9.721
2
4
6
8
10

Fig. 44C

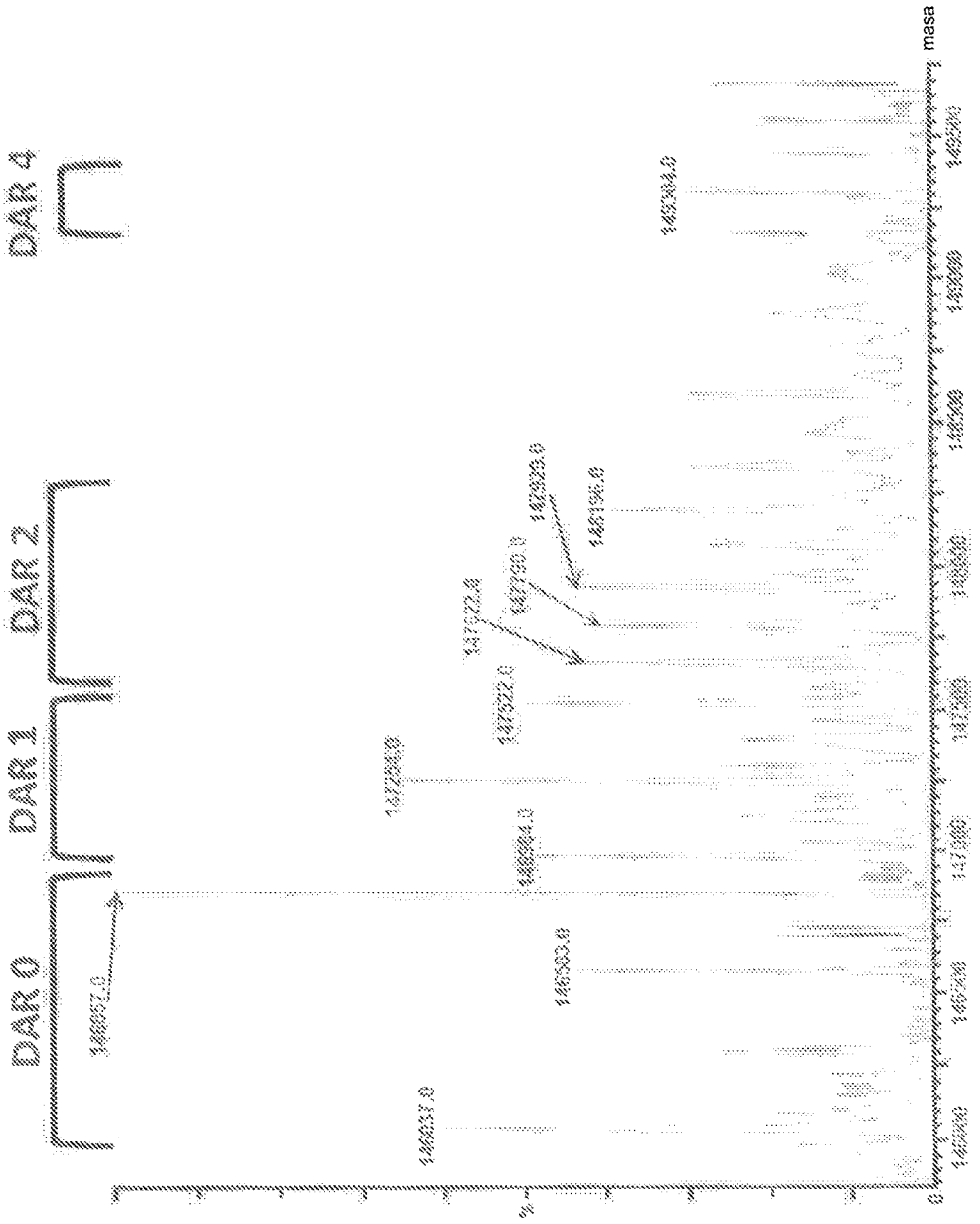

DAR 0
DAR 1
DAR 2
DAR 4
146957.0
147284.0
147322.4
147322.0
147790.0
148025.0
148196.8
146884.0
146303.8
146231.8
145304.0
%
masa

Fig. 15A

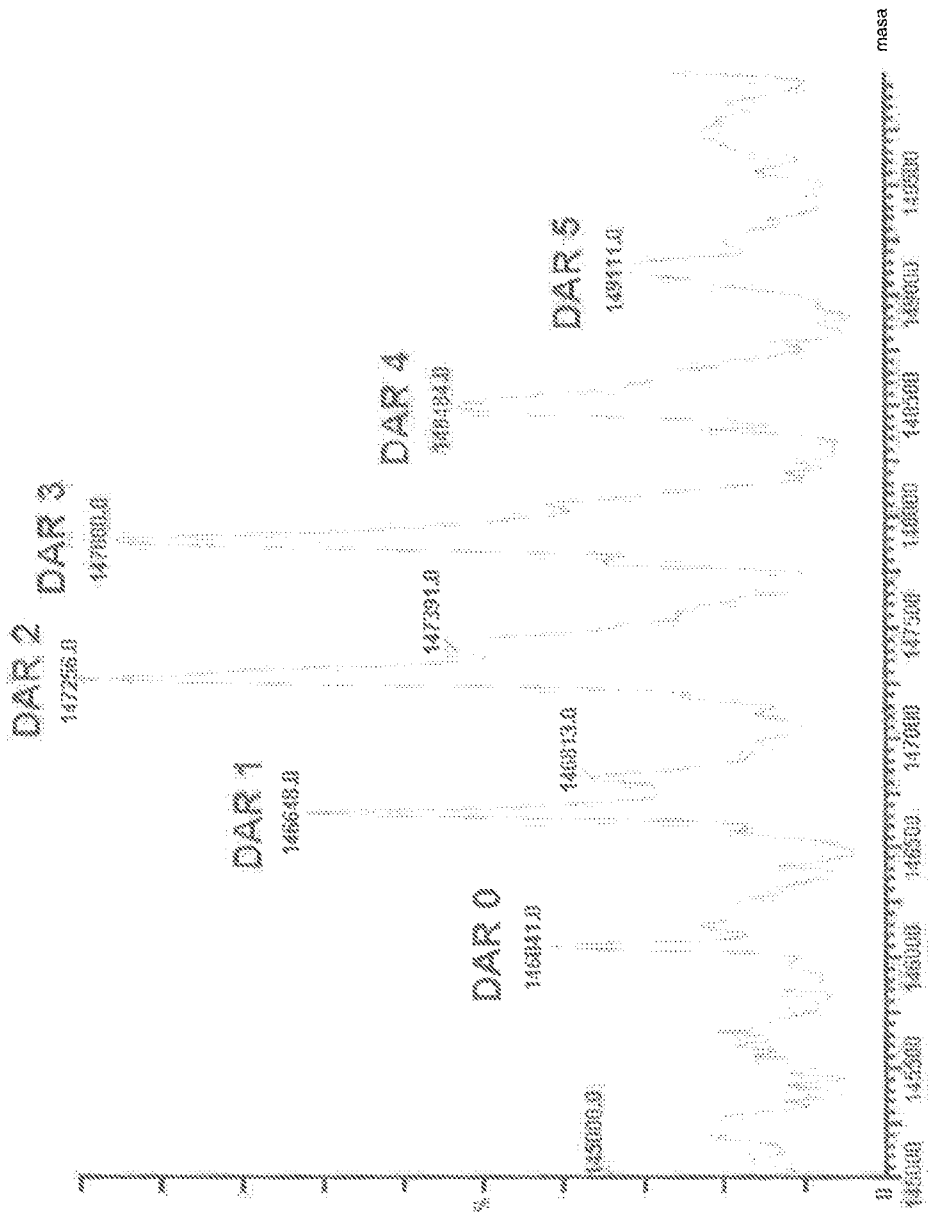

DAR 2
147256.0
DAR 3
147600.0
DAR 1
146648.0
DAR 4
147291.0
146494.0
DAR 0
146441.0
146013.0
DAR 5
146114.0
145000.0
%
masa

Fig. 45B

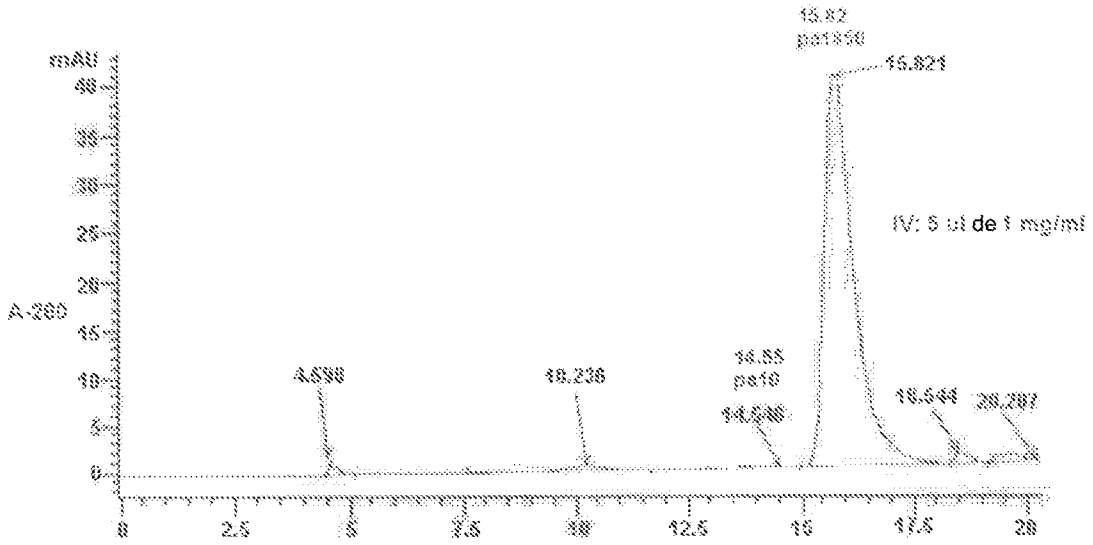


Fig. 46A

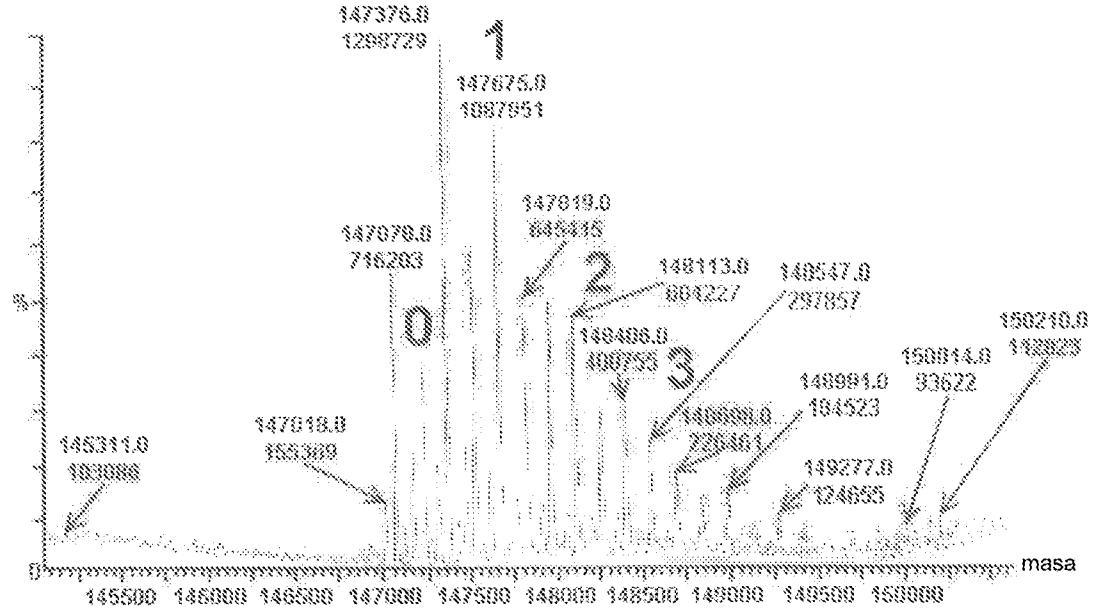


Fig. 46B

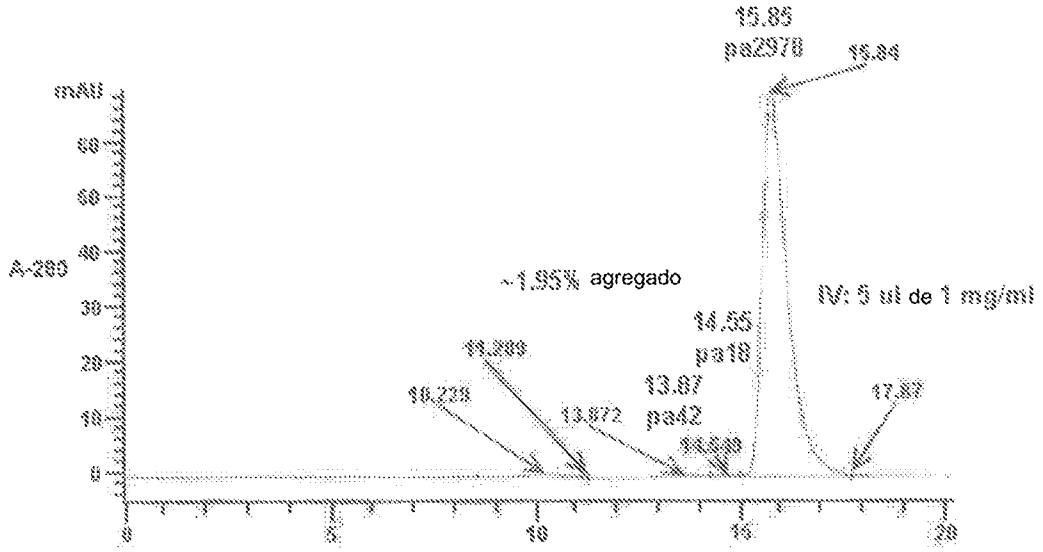


Fig. 47A

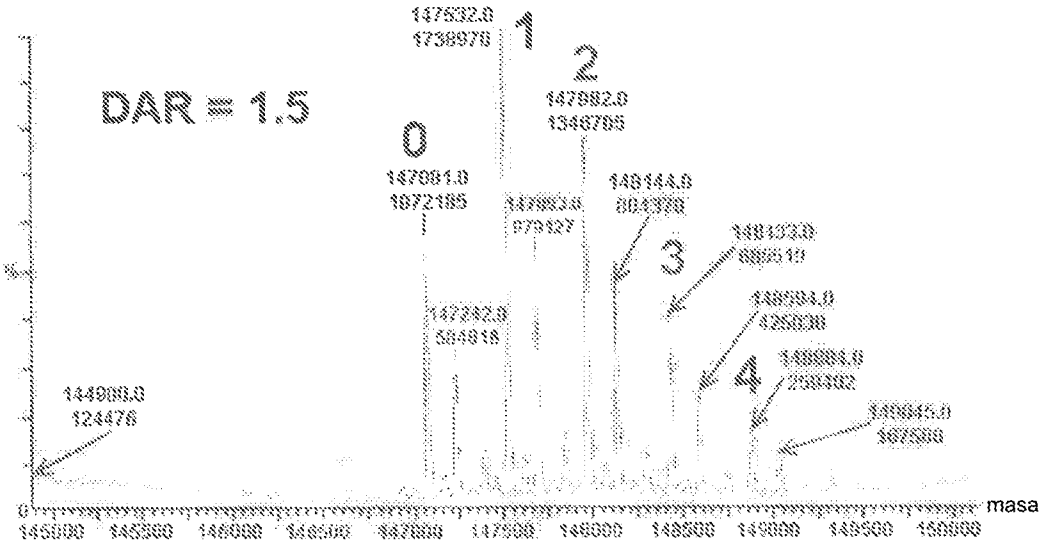


Fig. 47B

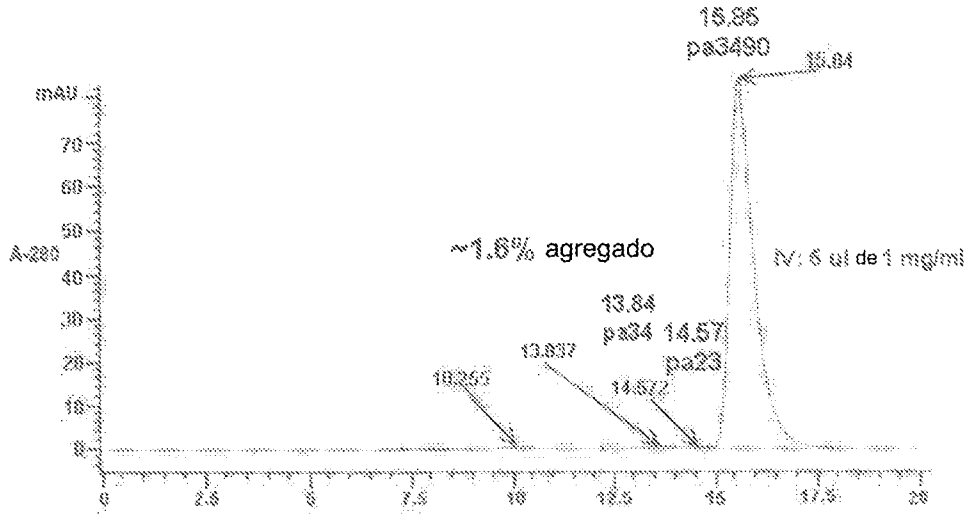


Fig. 48A

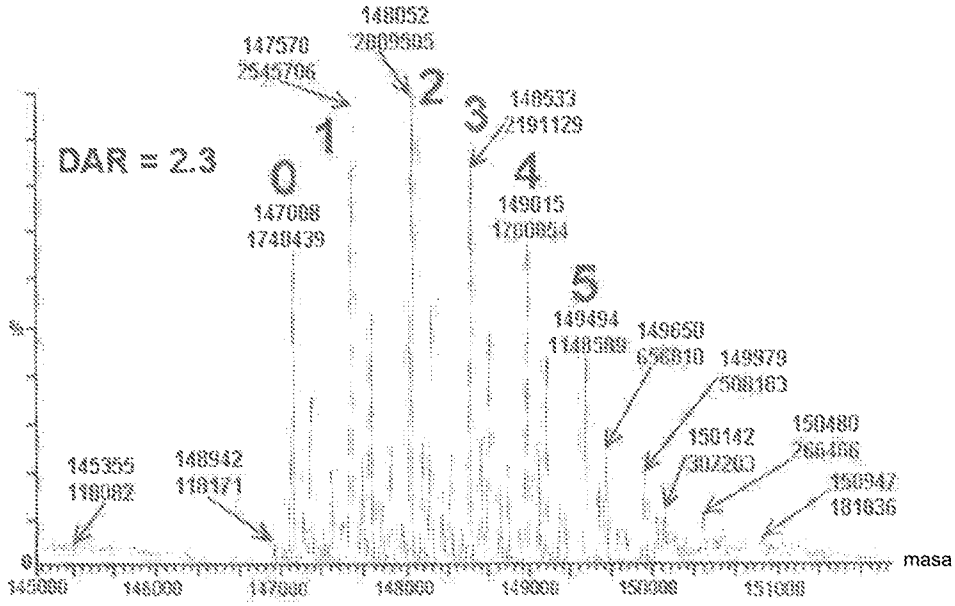


Fig. 48B

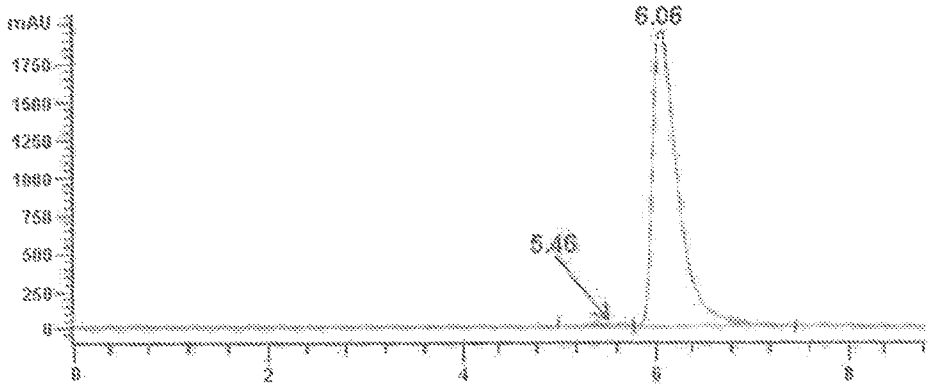


Fig. 49A

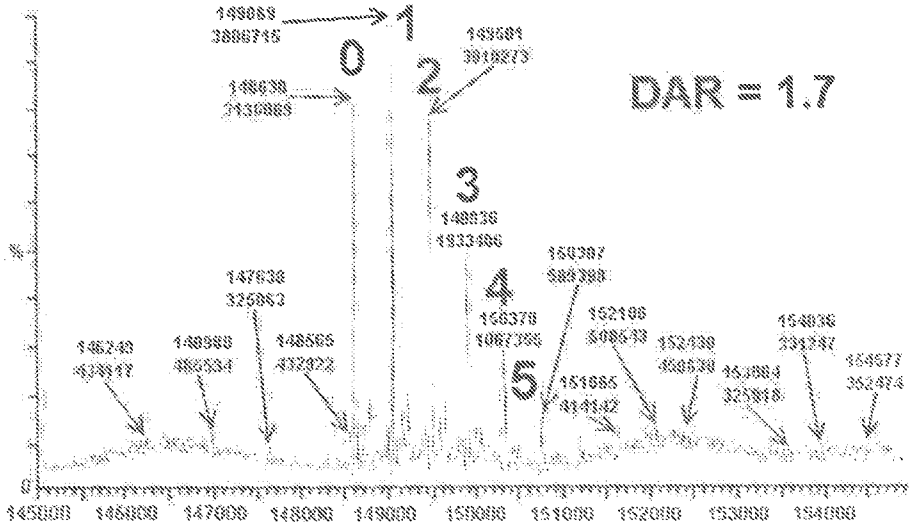


Fig. 49B

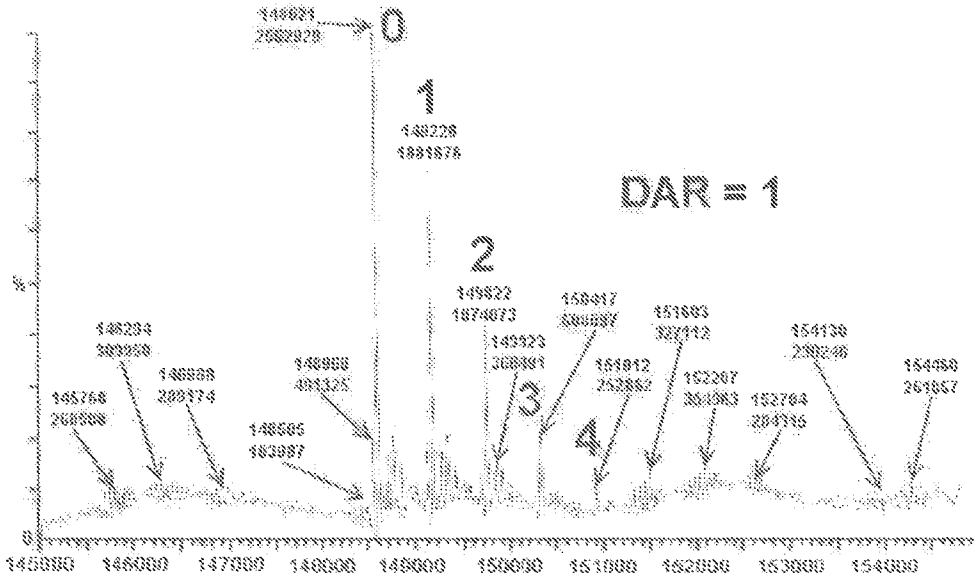

0
1
2
3
4
DAR = 1
%
145000
146000
147000
148000
149000
150000
151000
152000
153000
154000

Fig. 50

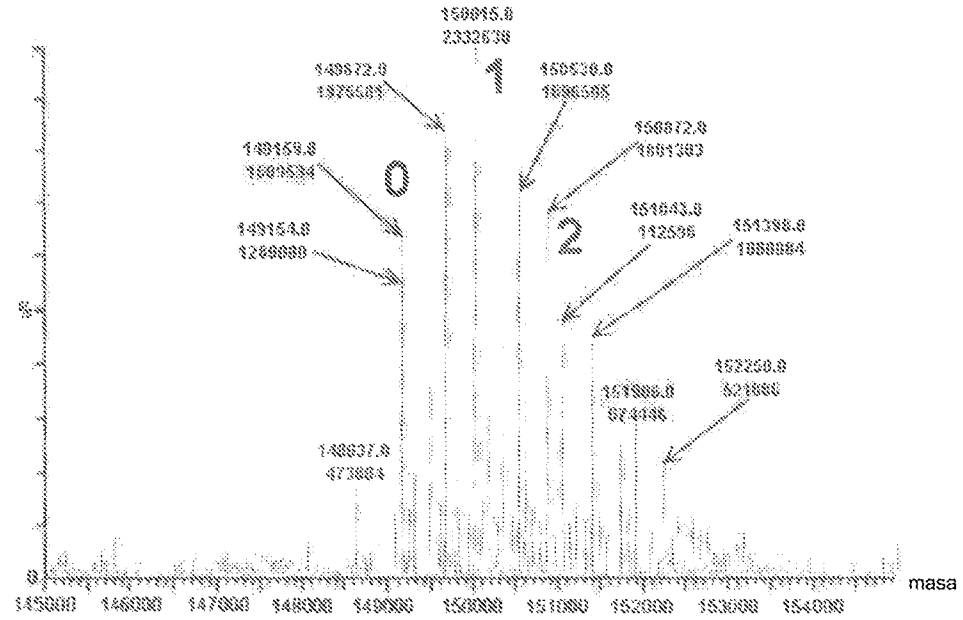

0
1
2
%
masa
145000
146000
147000
148000
149000
150000
151000
152000
153000
154000

Fig. 51

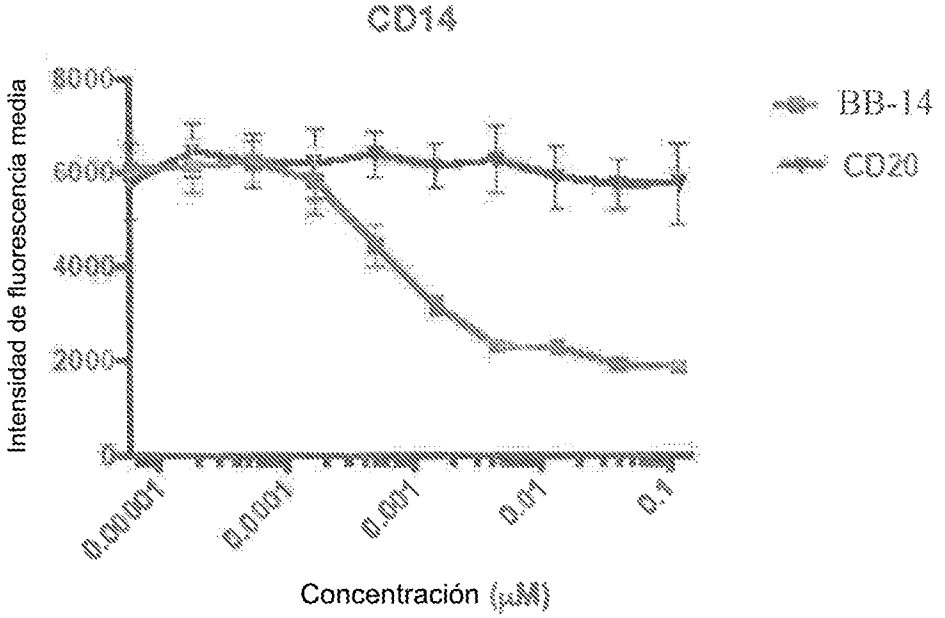


Fig. 52A

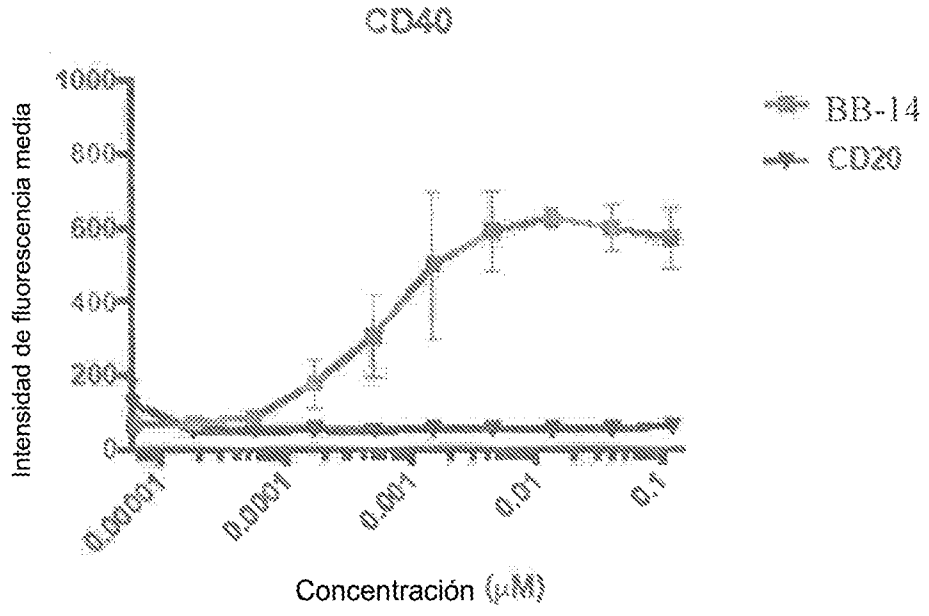


Fig. 52B

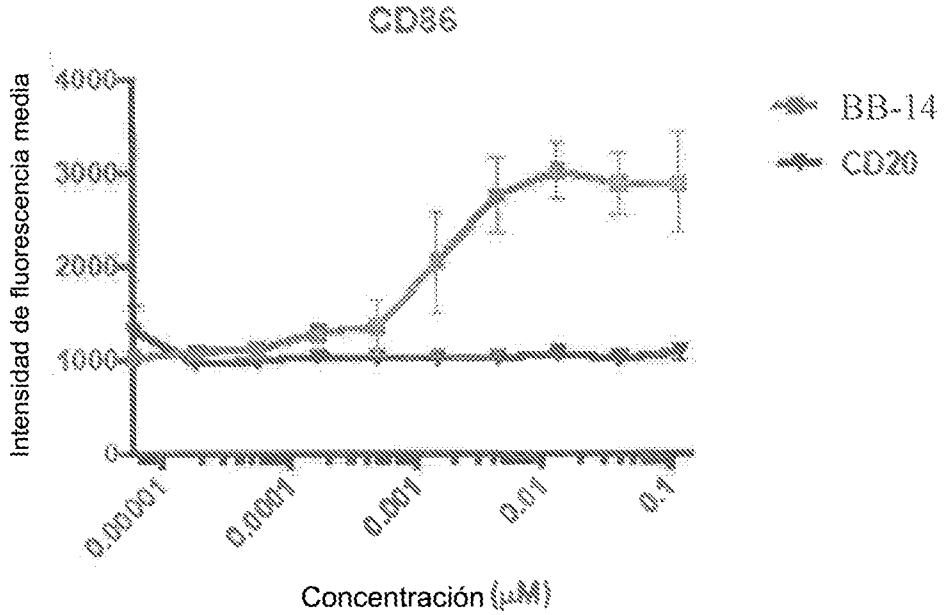


Fig. 52C

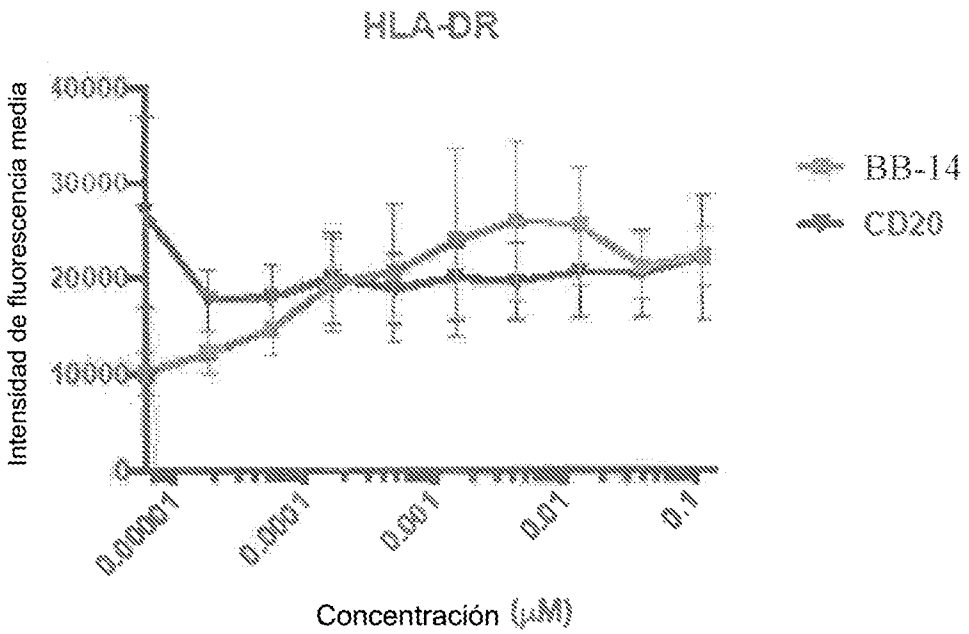


Fig. 52D

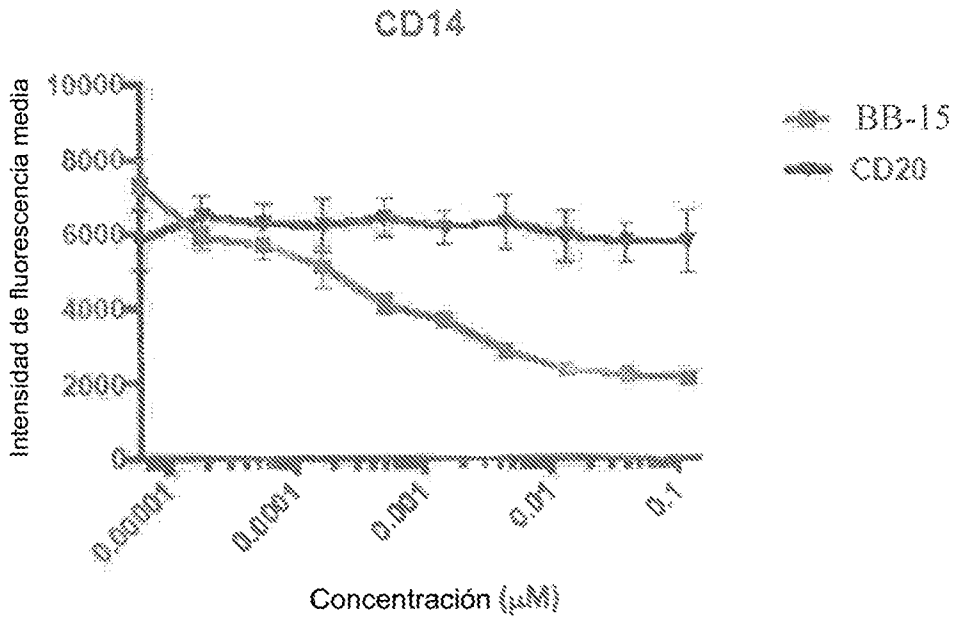


Fig. 53A

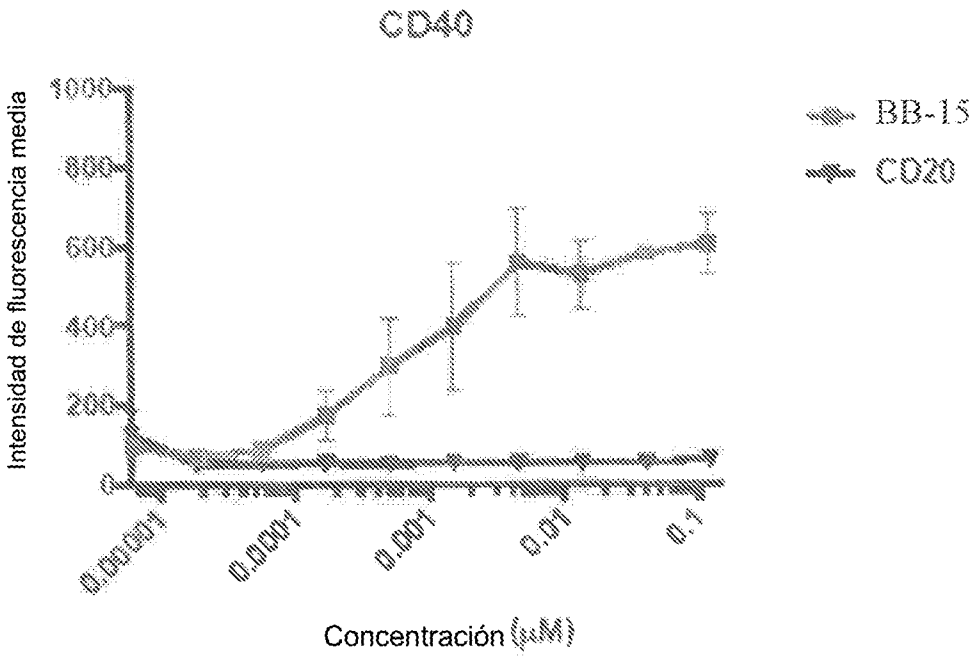


Fig. 53B

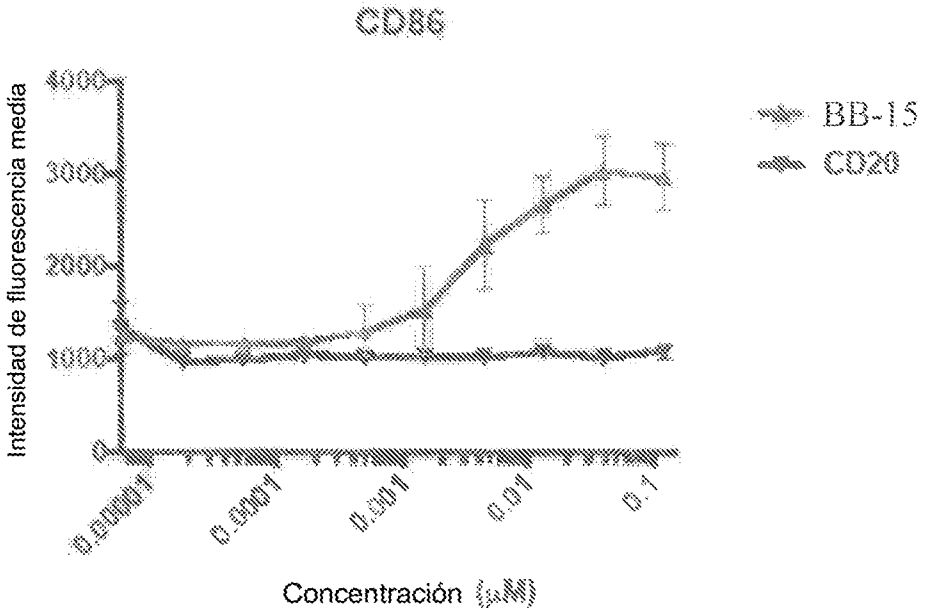


Fig. 53C

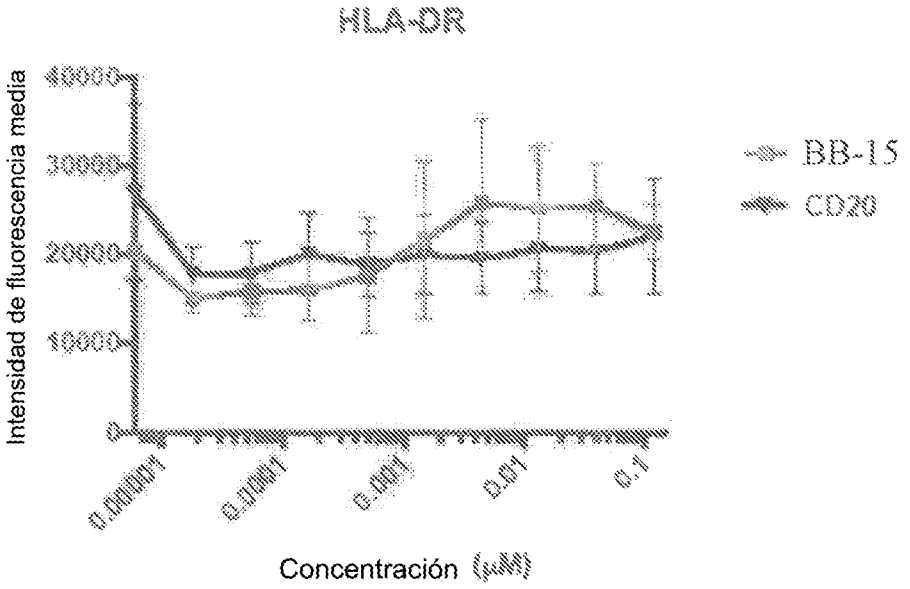


Fig. 53D

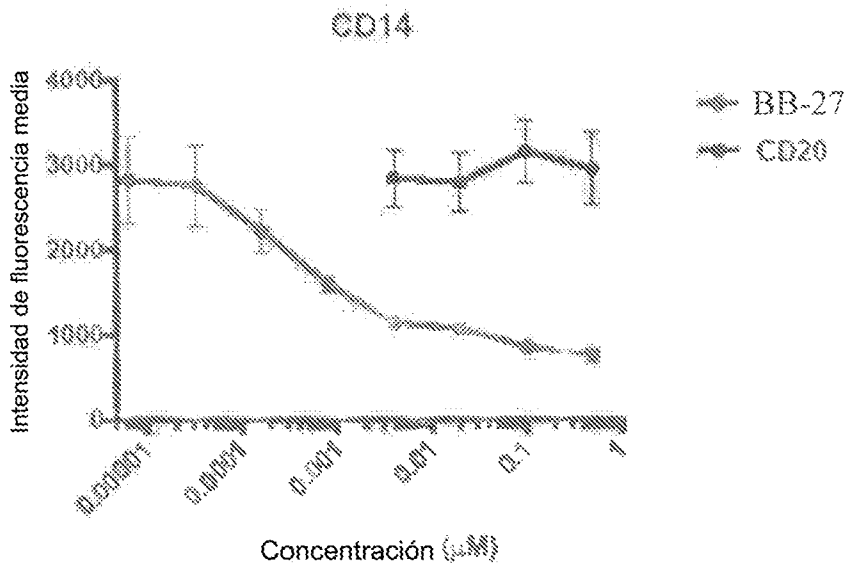


Fig. 54A

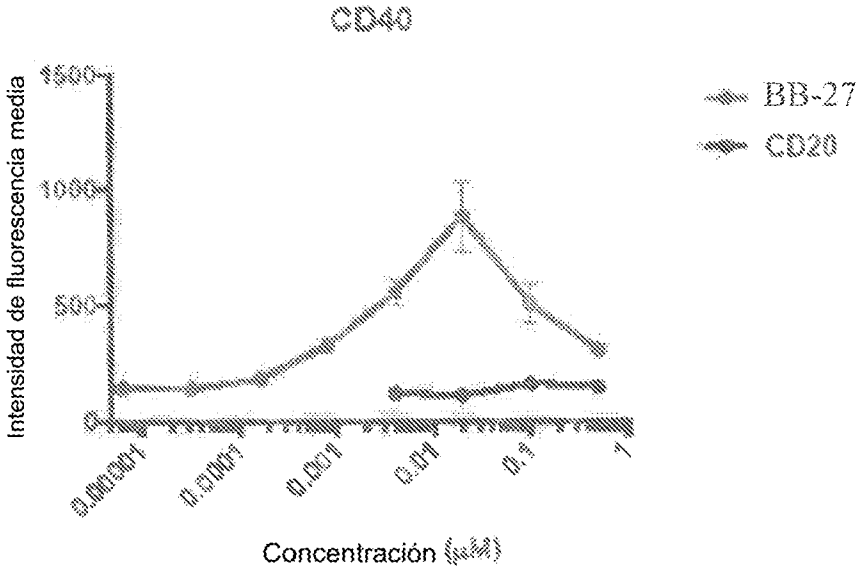


Fig. 54B

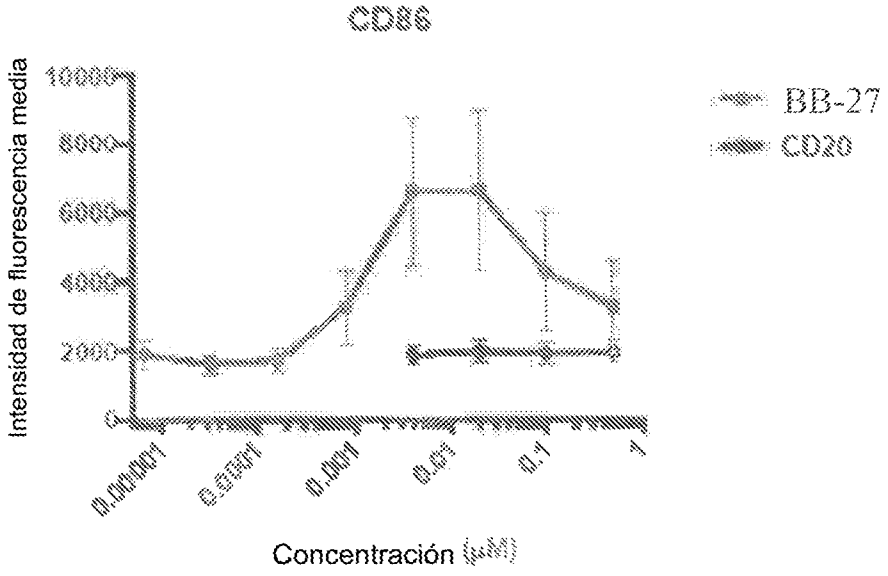


Fig. S4C

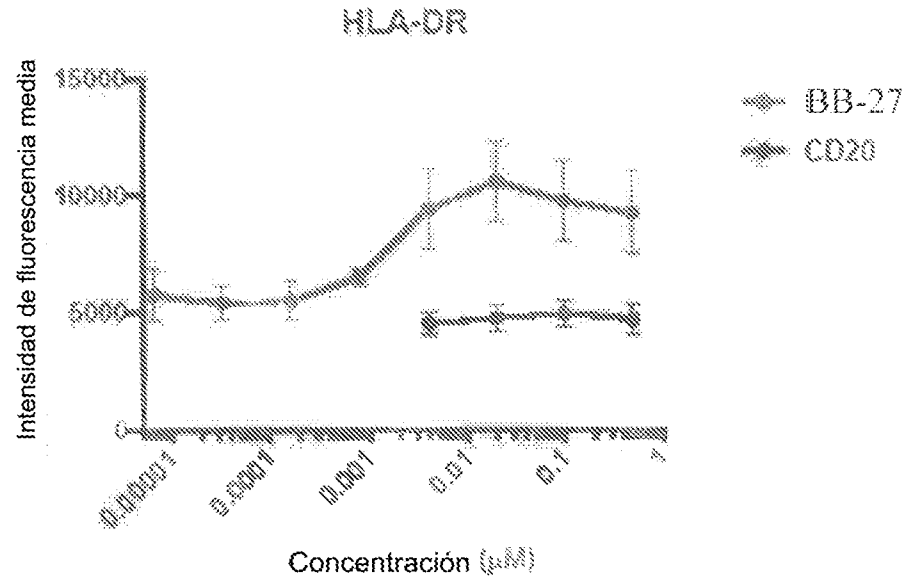


Fig. S4D

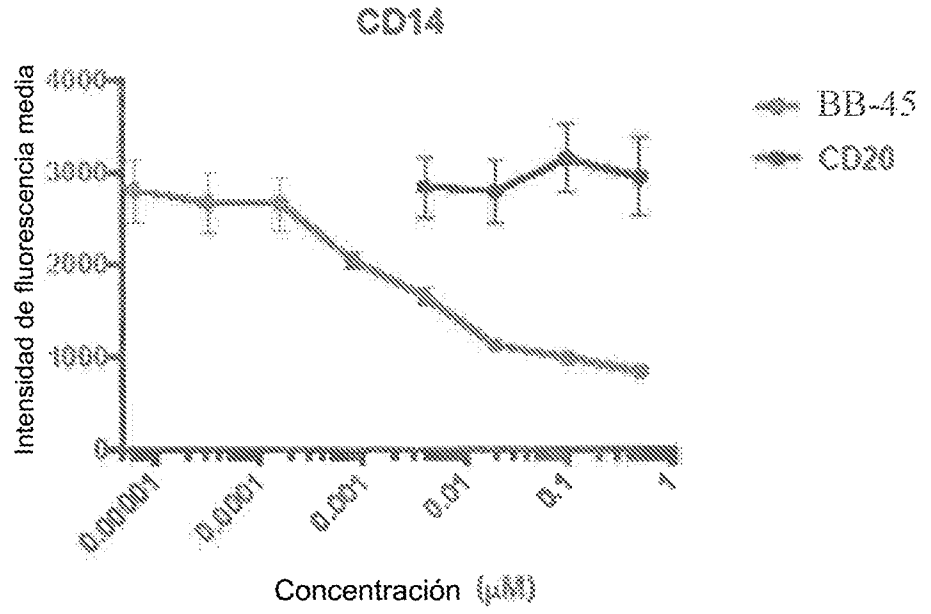


Fig. 55A

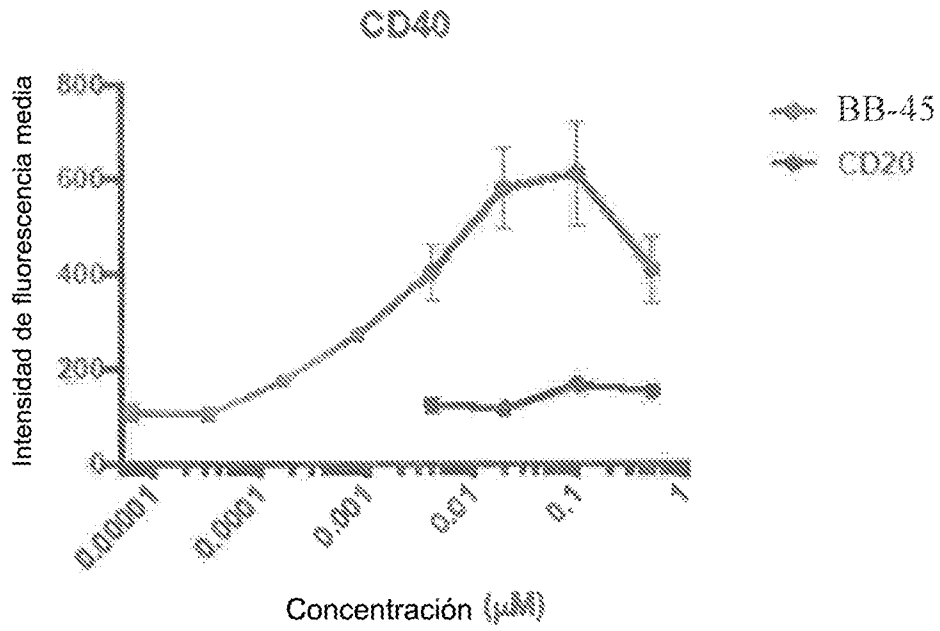


Fig. 55B

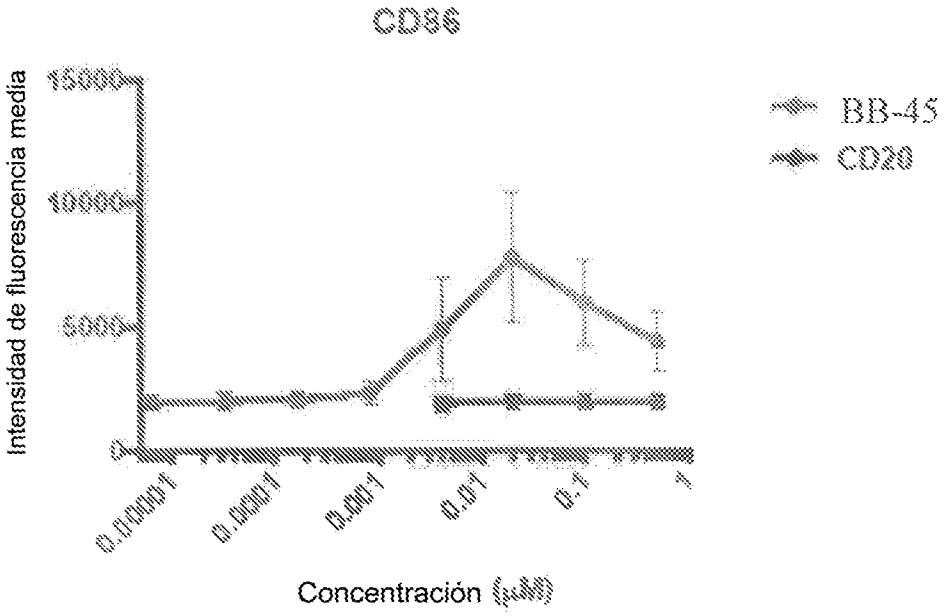


Fig. 55C

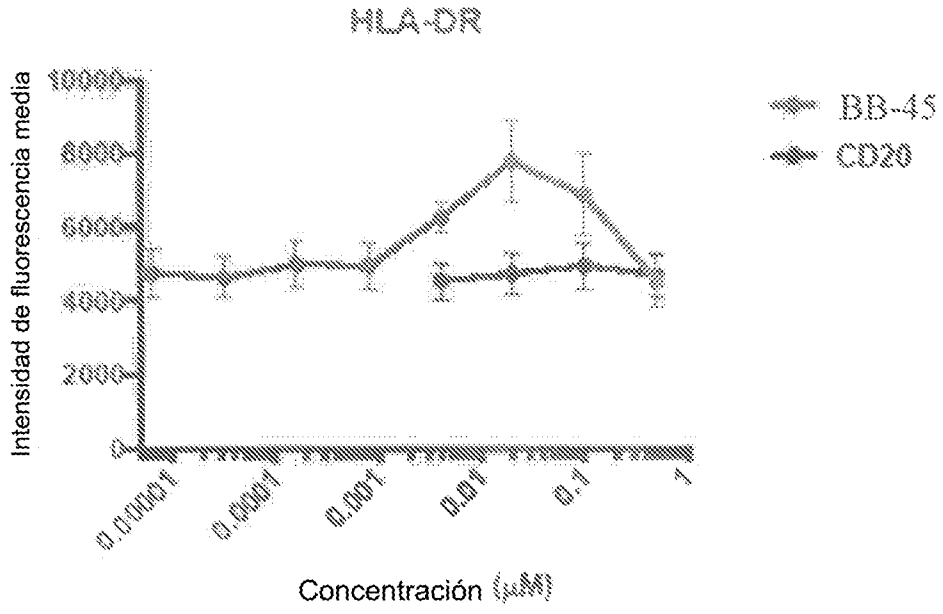


Fig. 55D

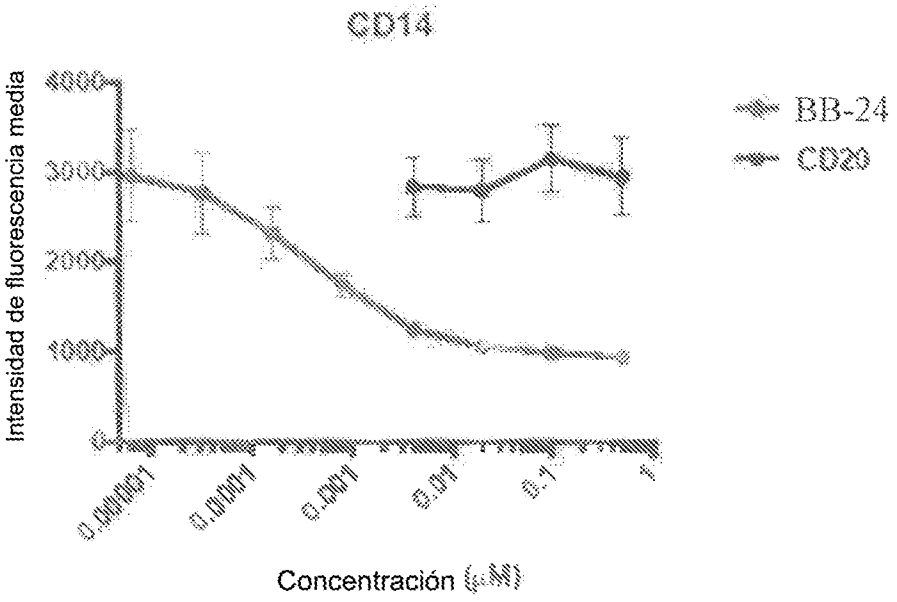


Fig. 56A

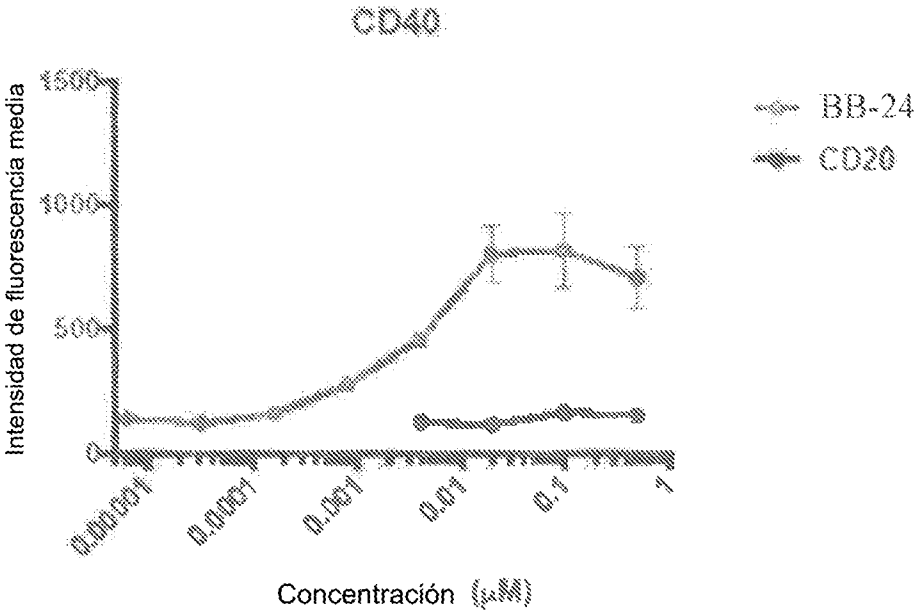


Fig. 56B

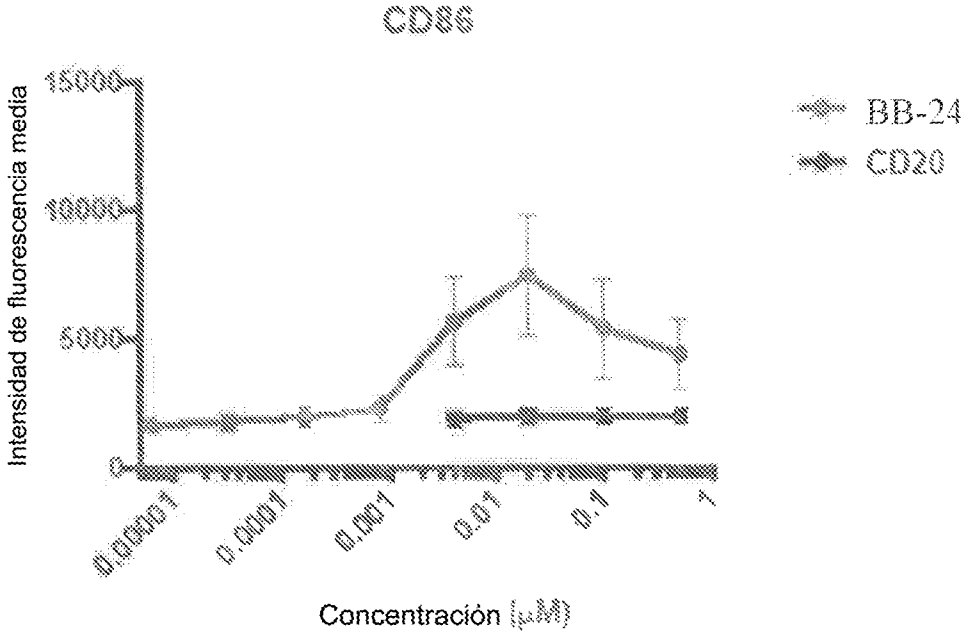


Fig. 56C

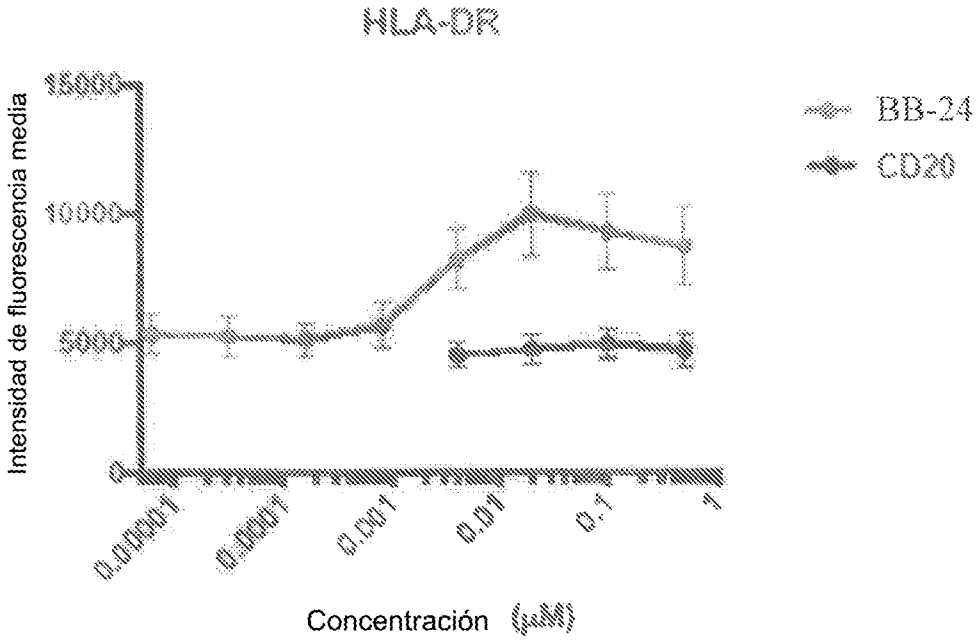


Fig. 56D

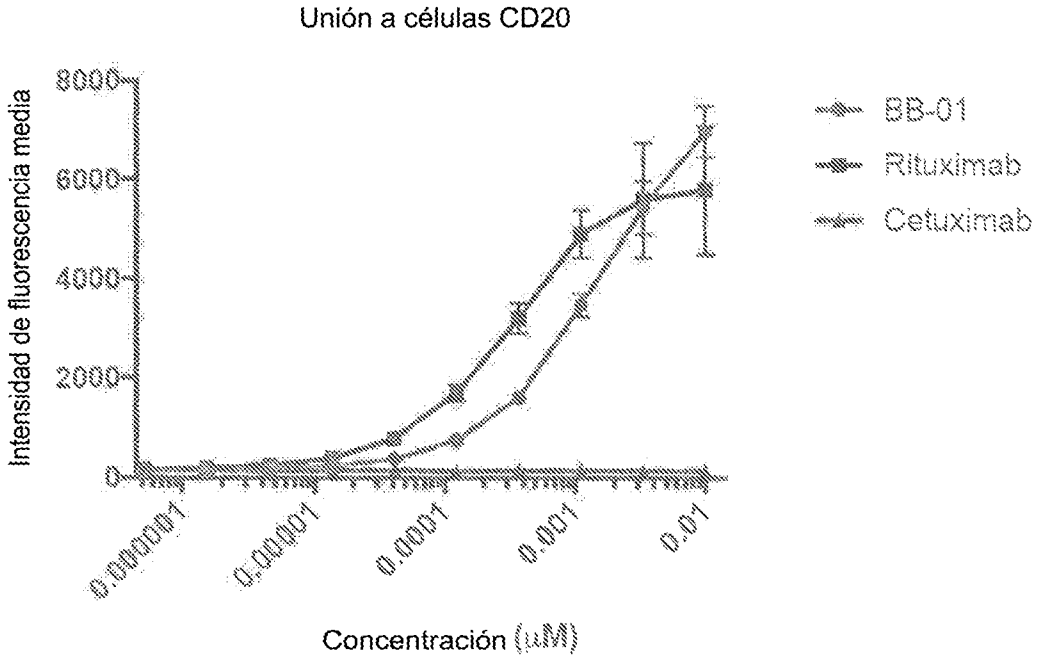

Unión a células CD20
Intensidad de fluorescencia media
8000
6000
4000
2000
0
0.000001
0.00001
0.0001
0.001
0.01
Concentración (μM)
BB-01
Rituximab
Cetuximab

Fig. 57

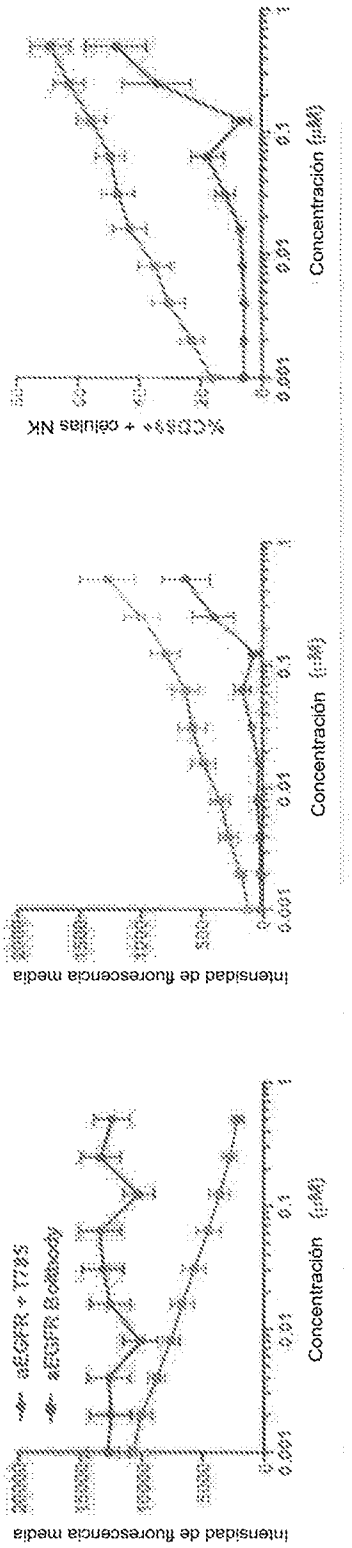

CD16
anti-HER2 x TTAS
anti-TTAS Antibody
Intensidad de fluorescencia media
Concentración (nM)
CD69
Intensidad de fluorescencia media
Concentración (nM)
%CD69+
%CD16+ células NK
Concentración (nM)

Fig. 58

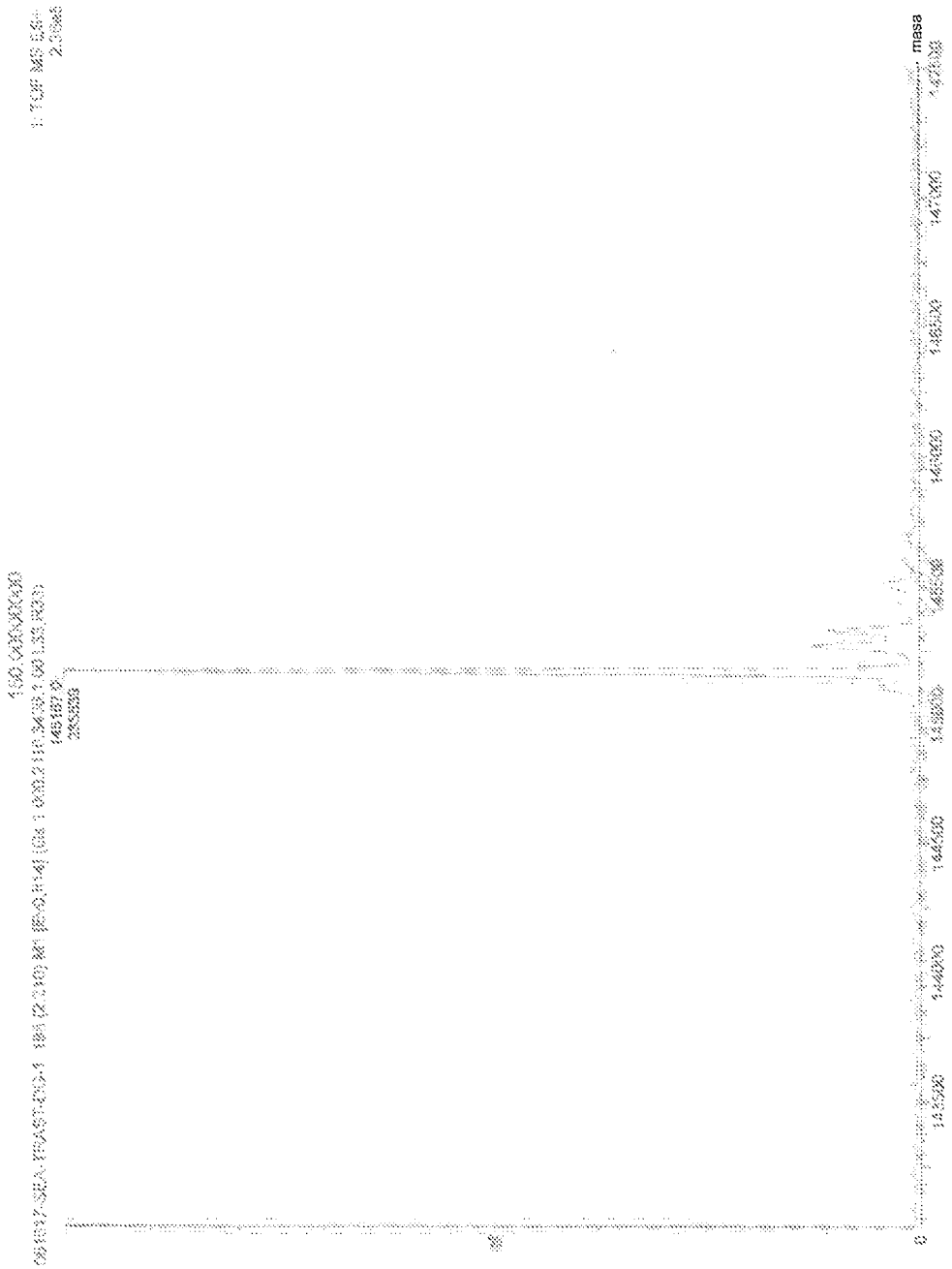


Fig. 59

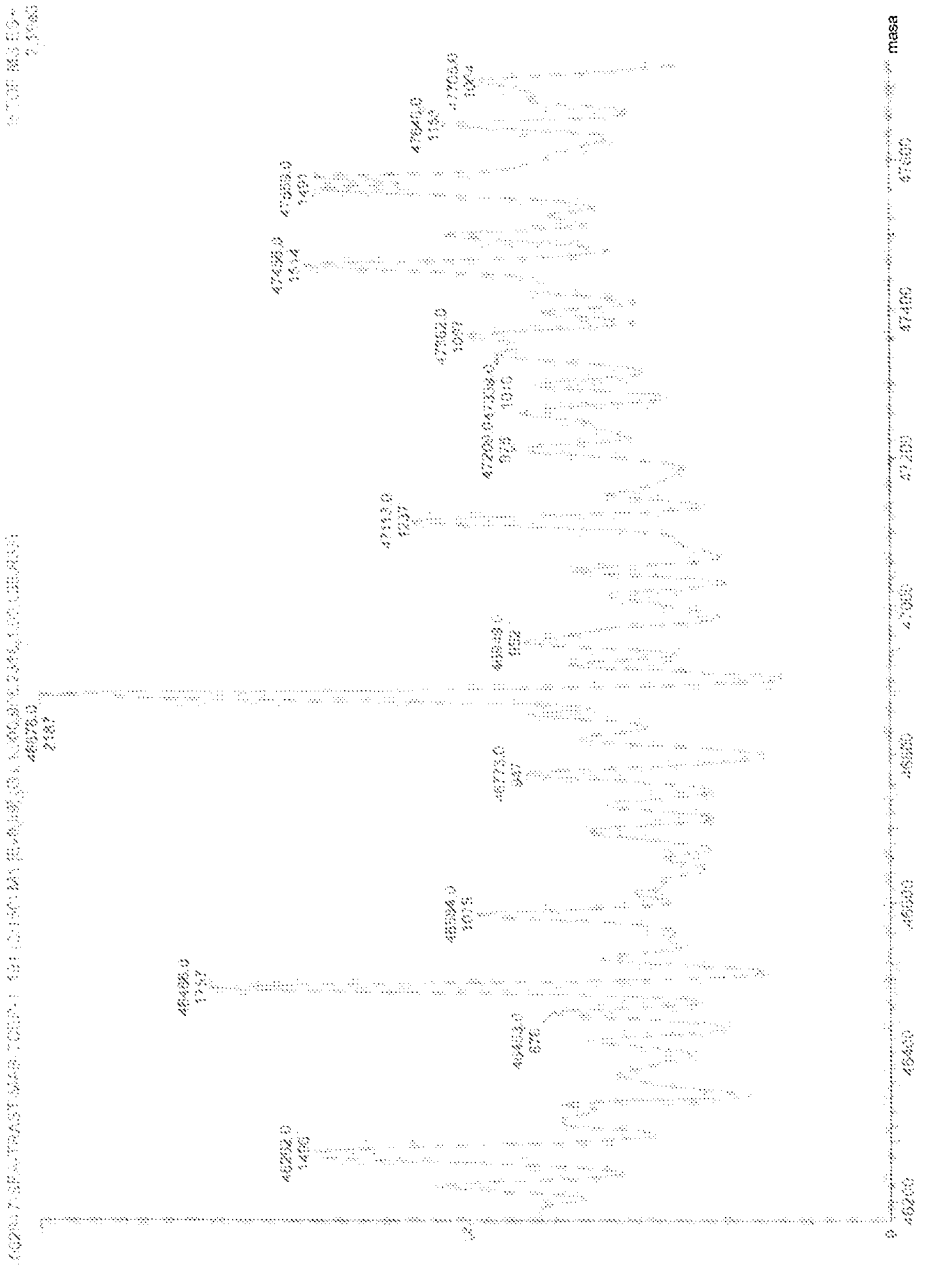


FIG. 31

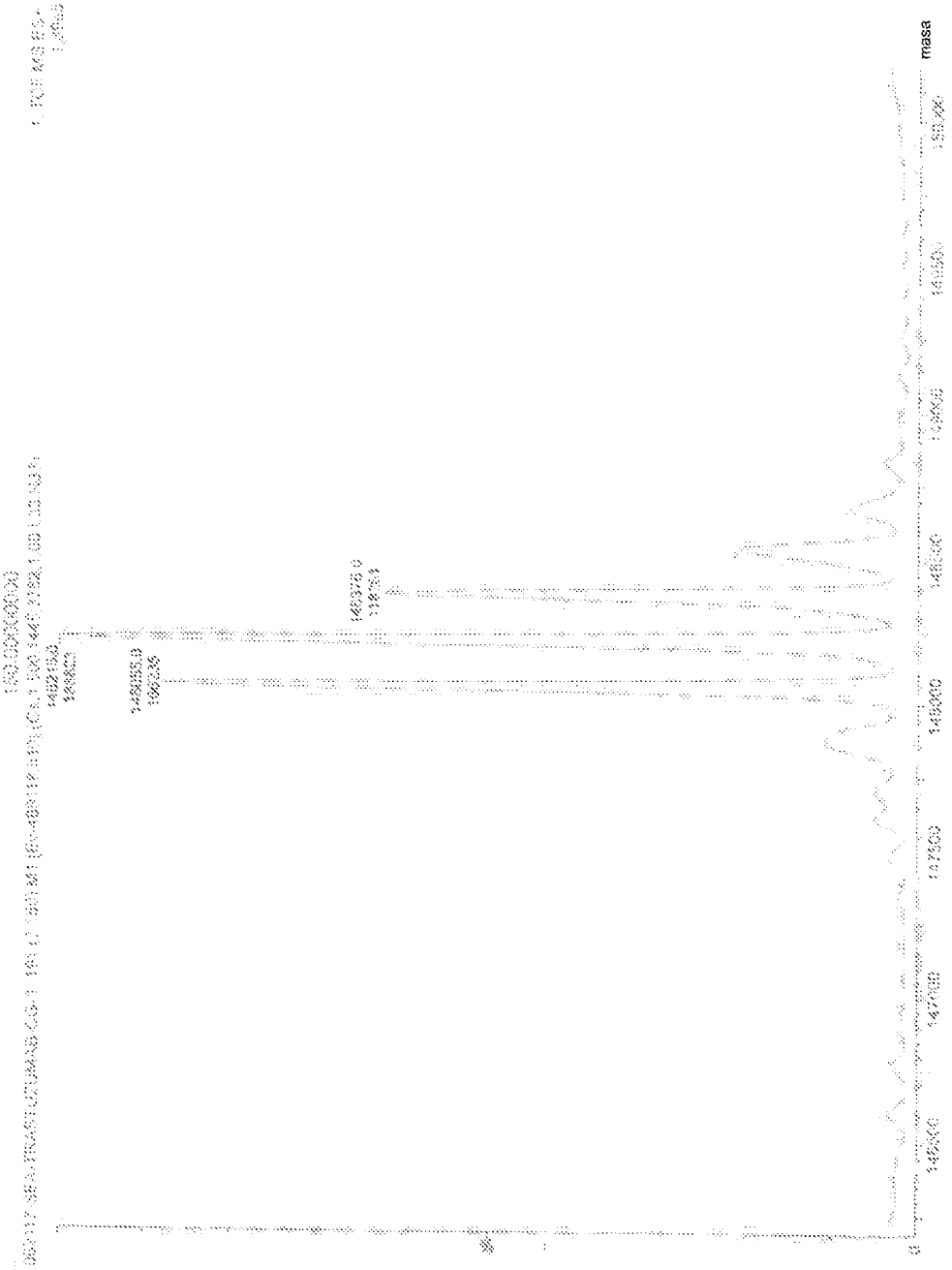


Fig. 61

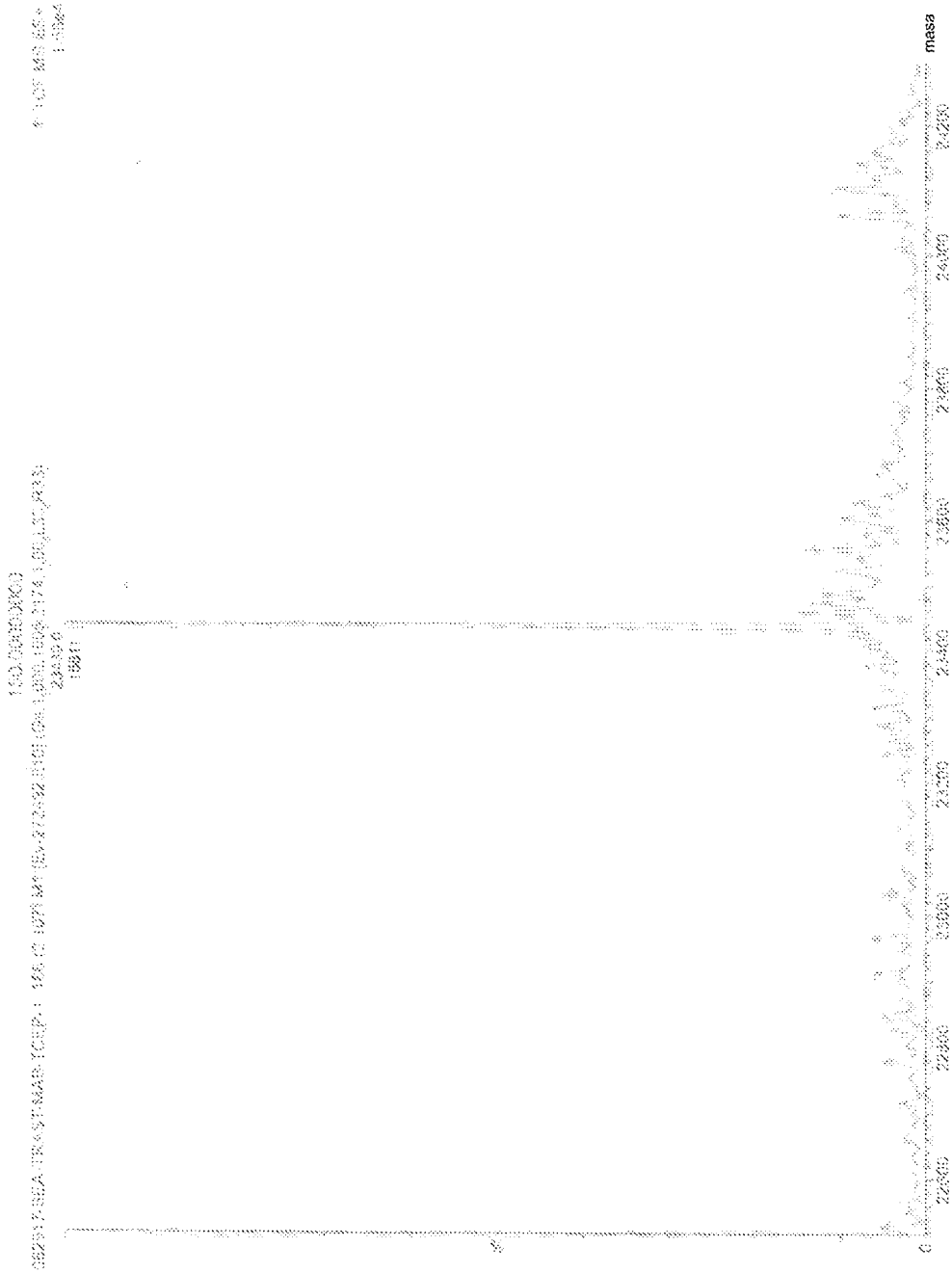


Fig. 62

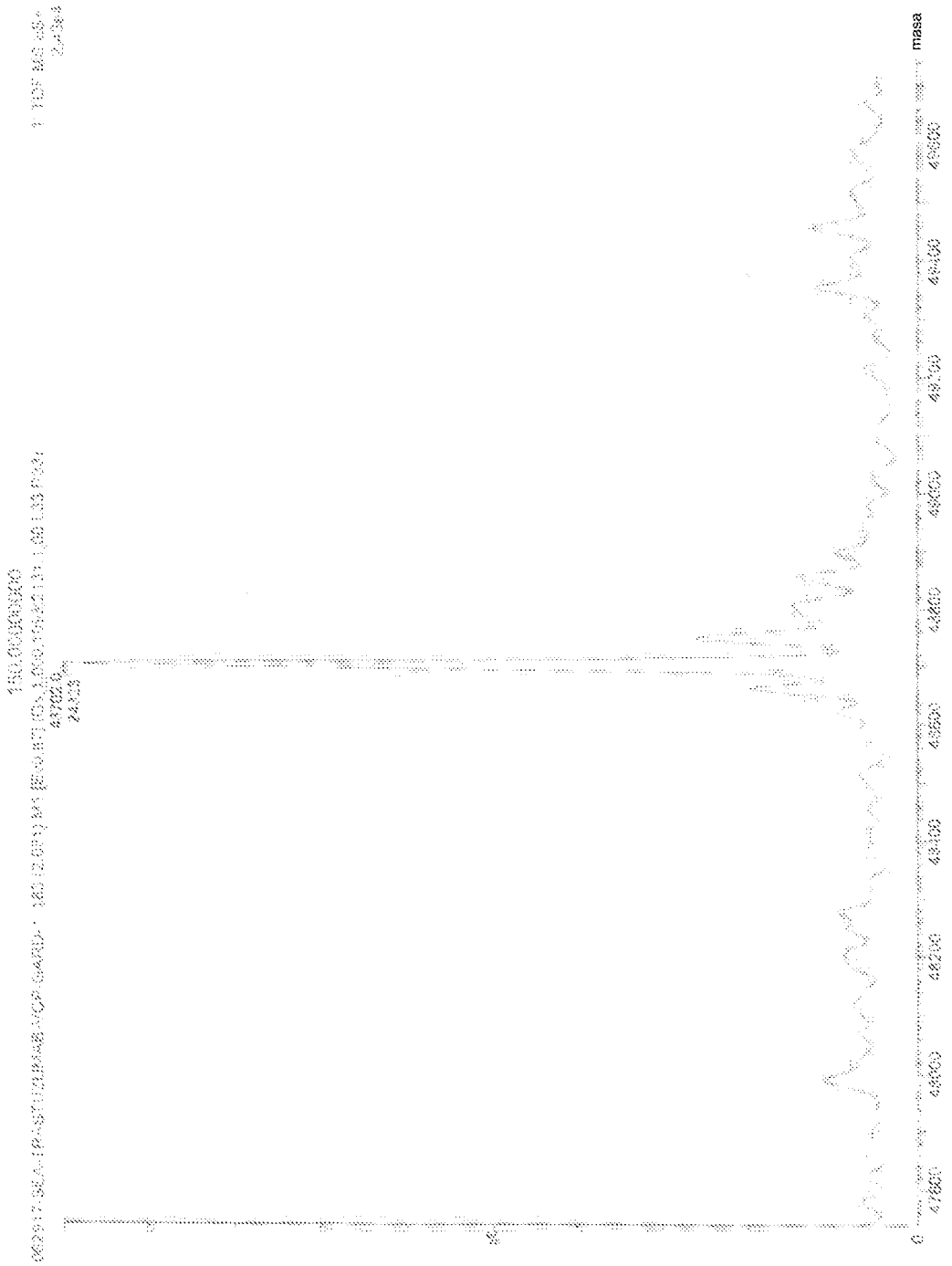


Fig. 63

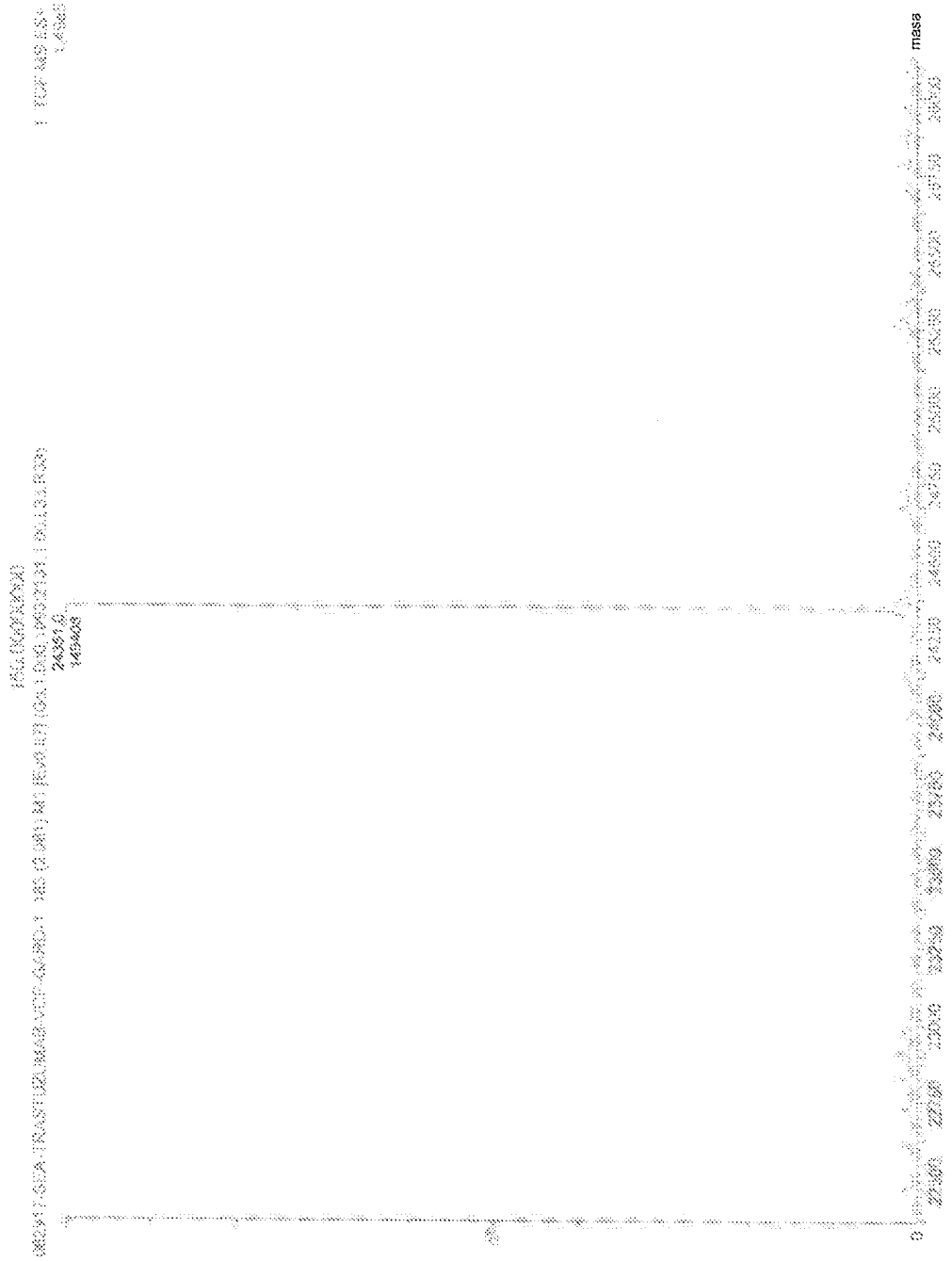


Fig. 64

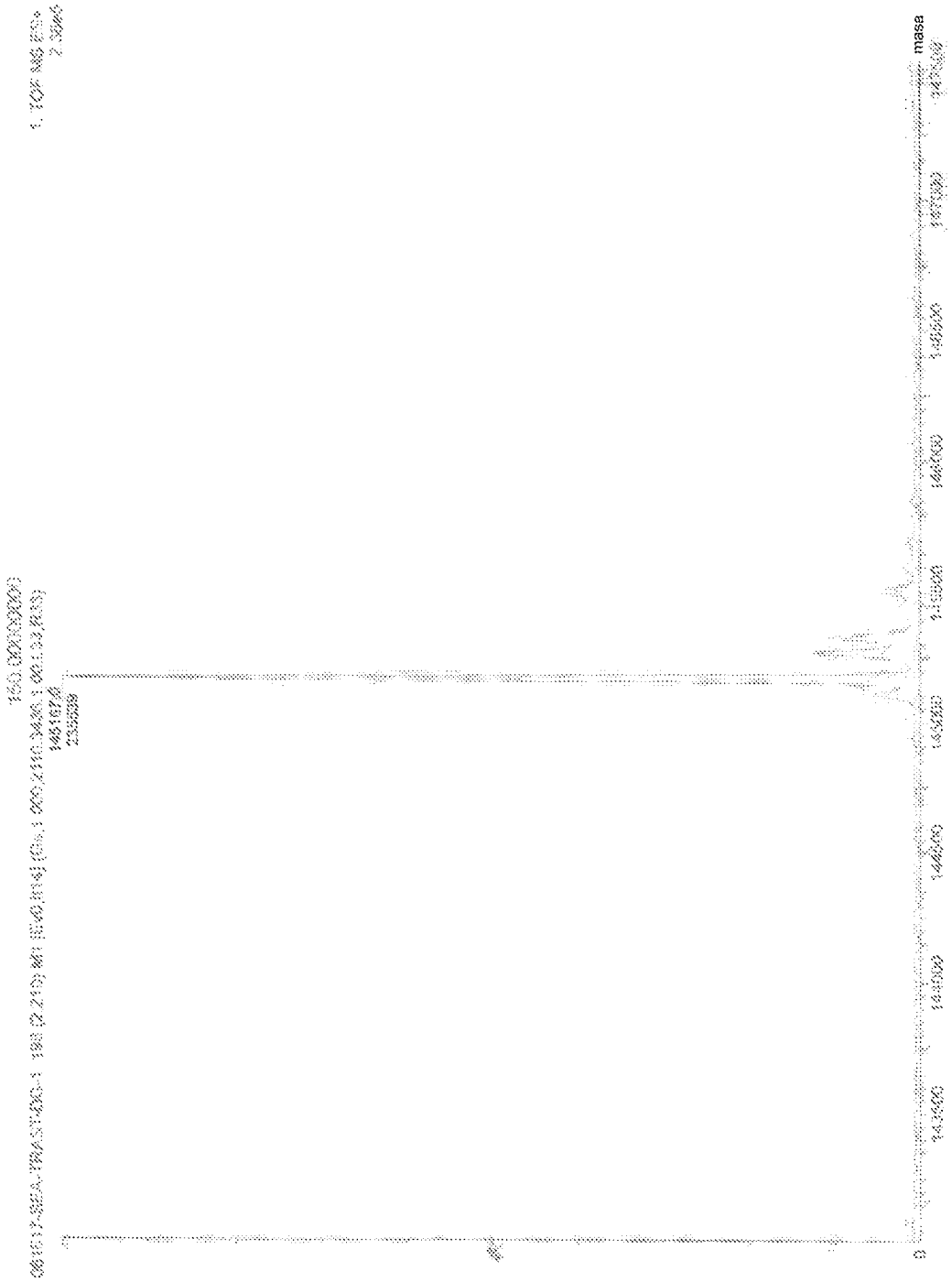


FIG. 31

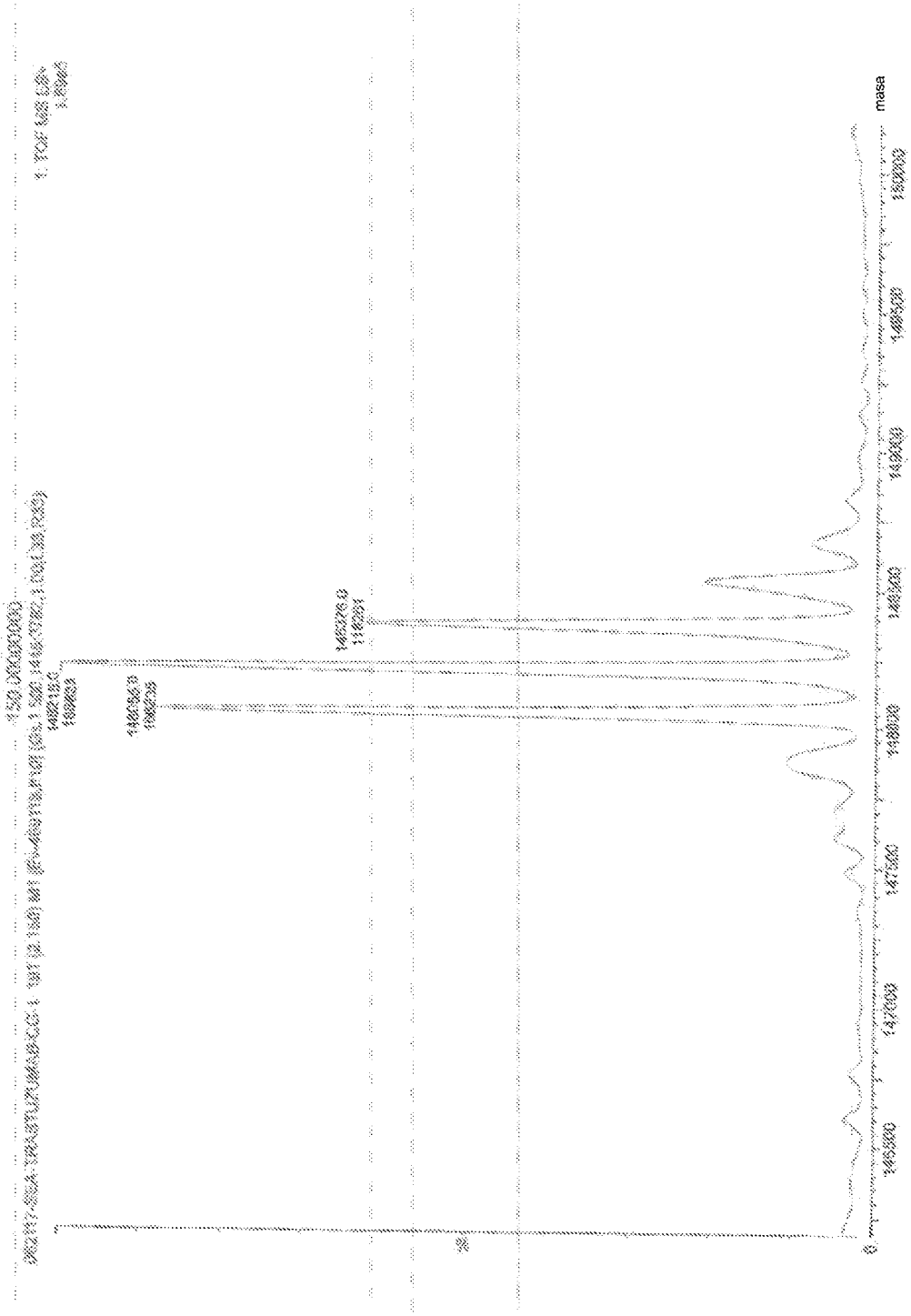


Fig. 66

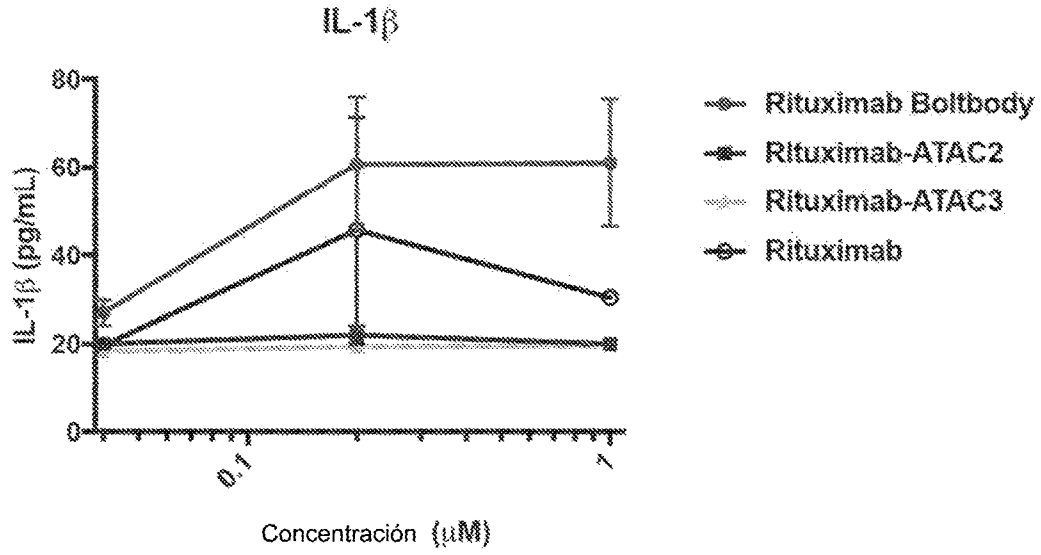


Fig. 67A

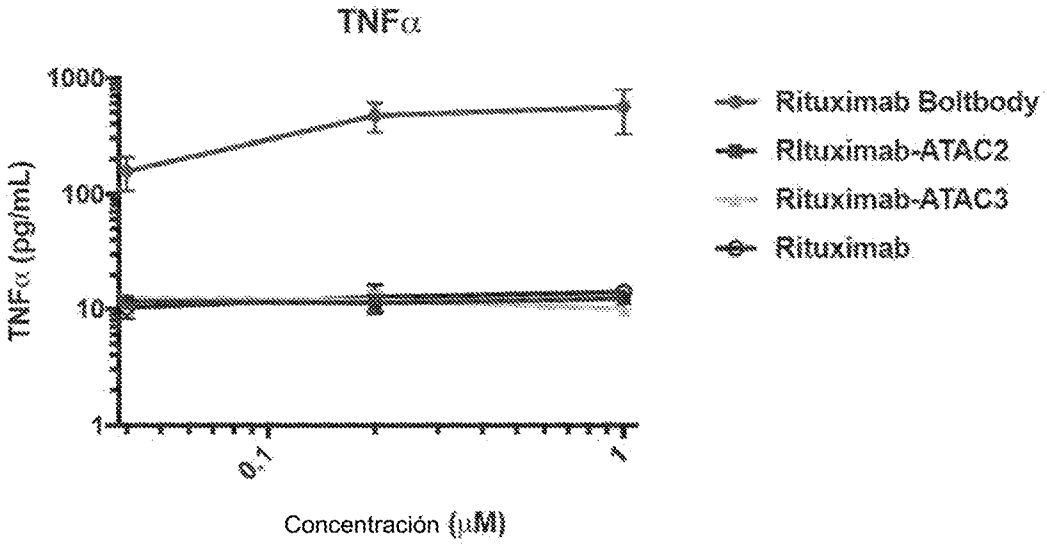


Fig. 67B

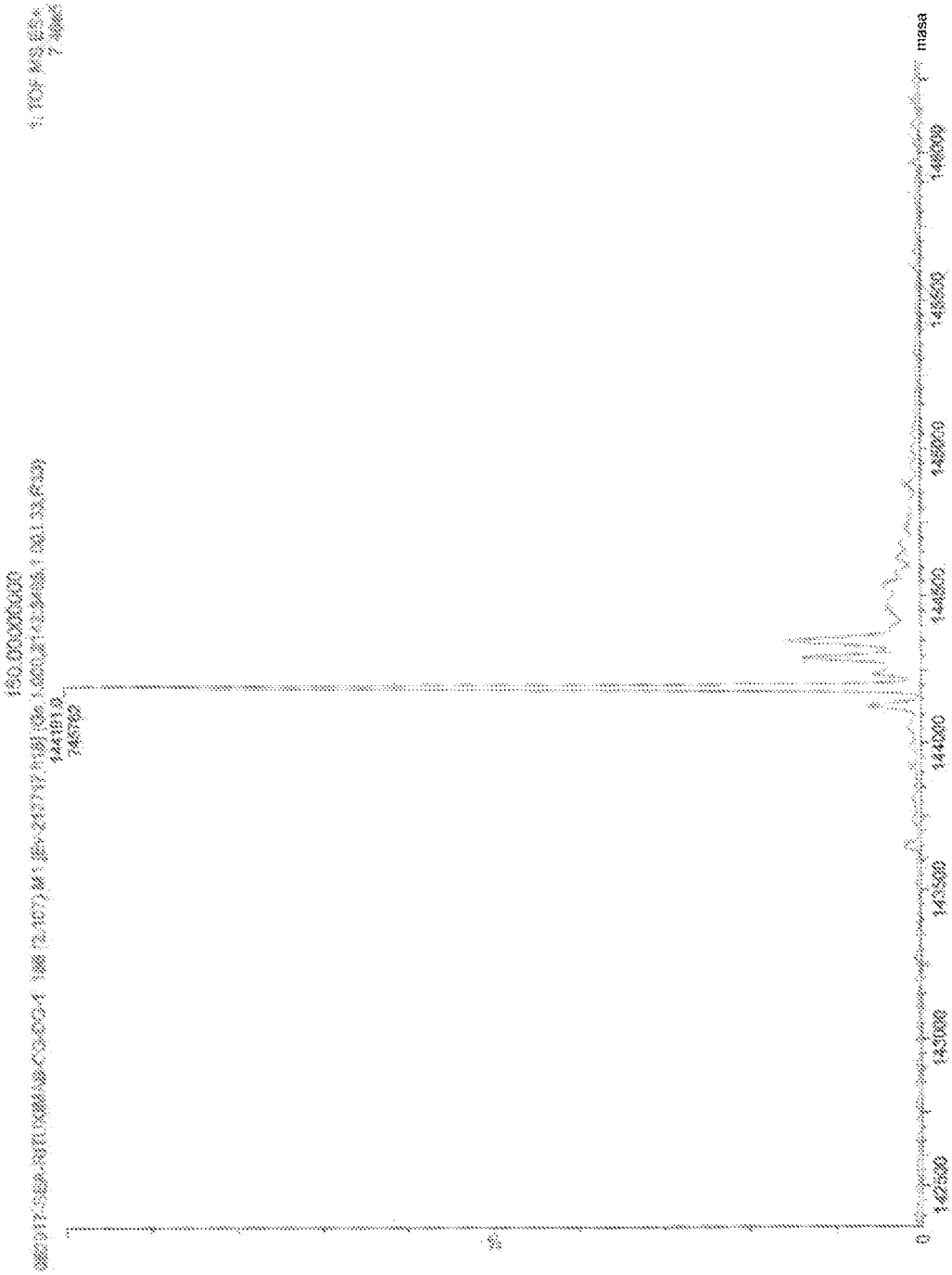


Fig. 67C

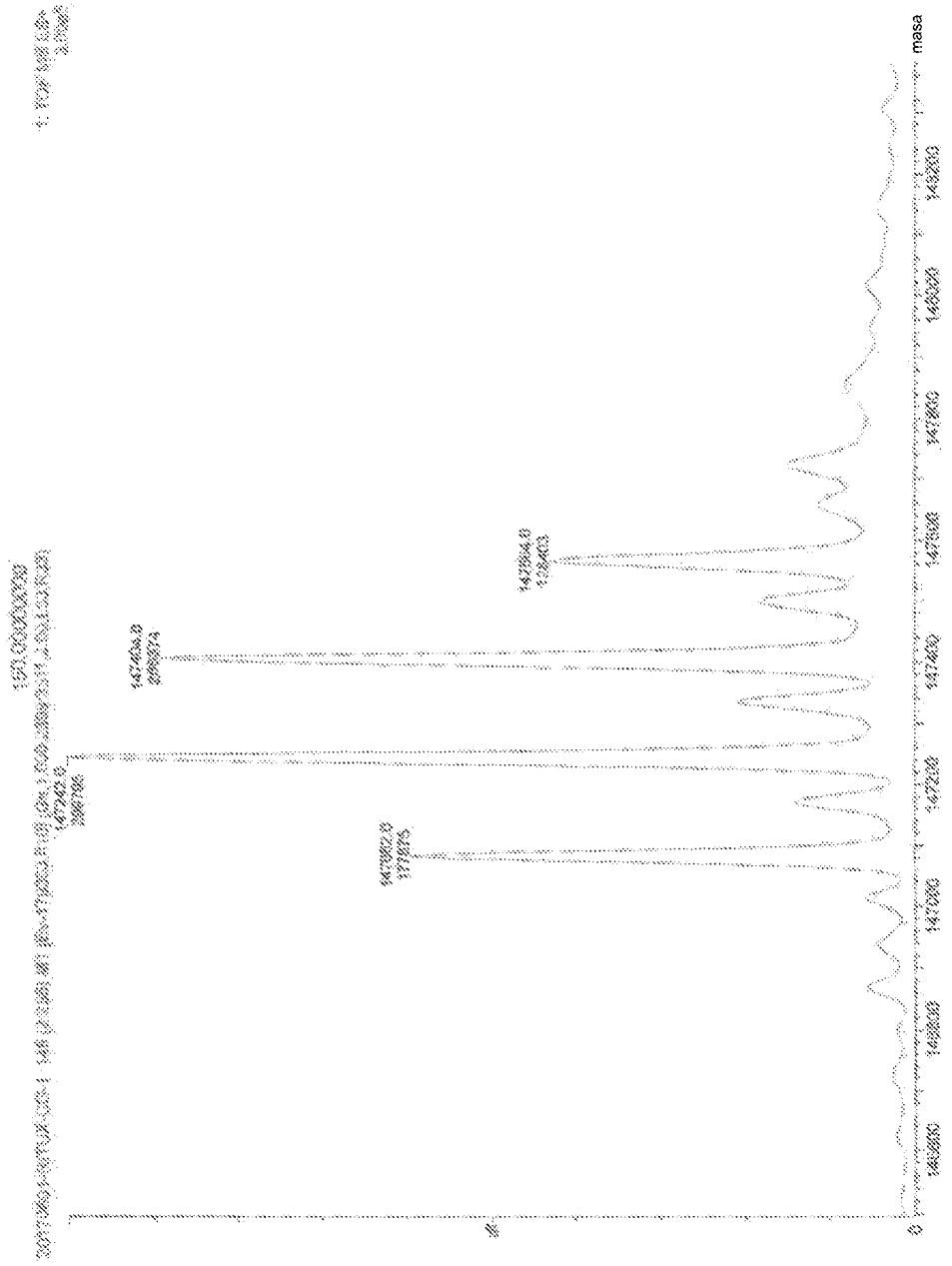


Fig. 67D

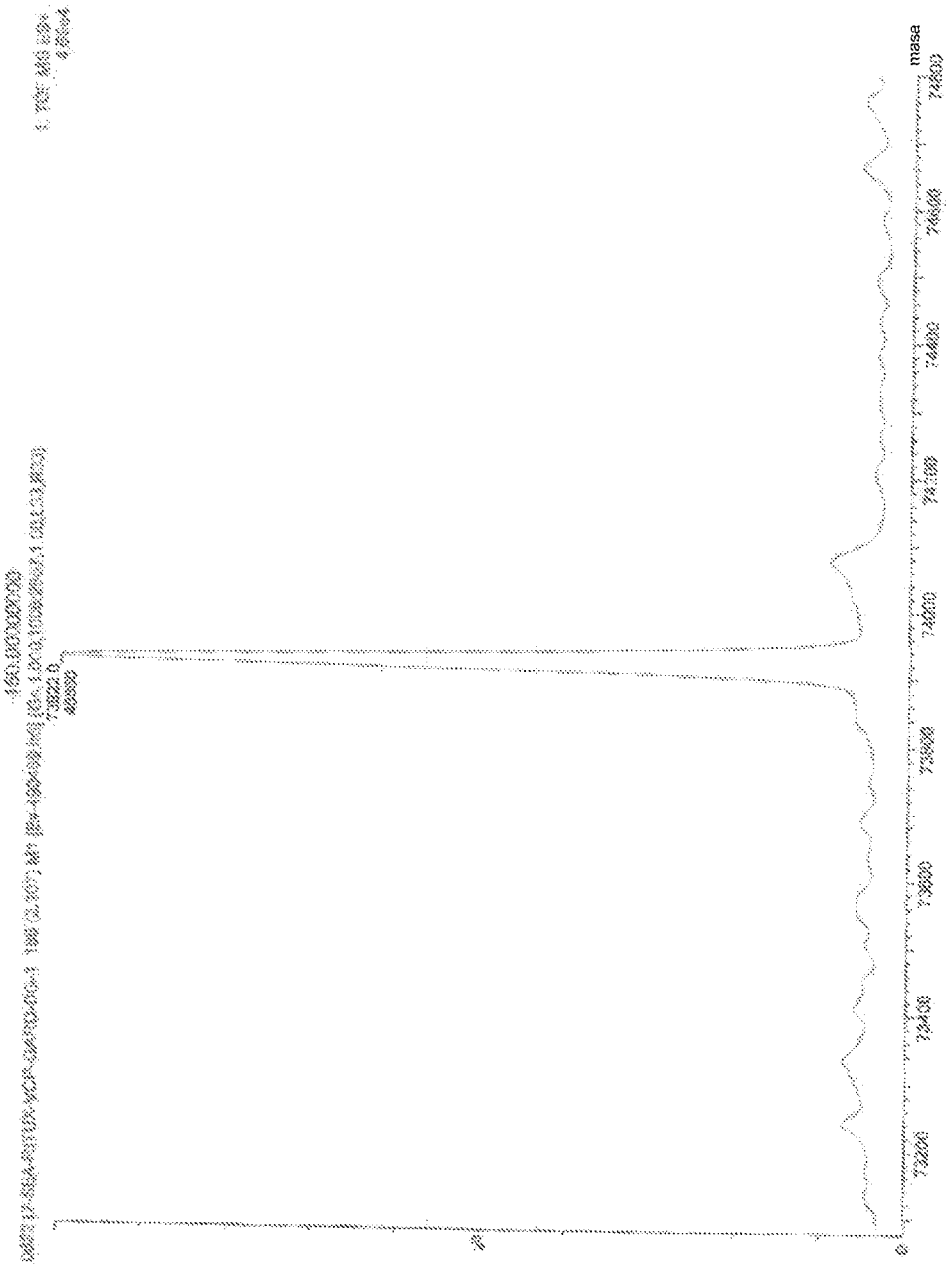


Fig. 67E

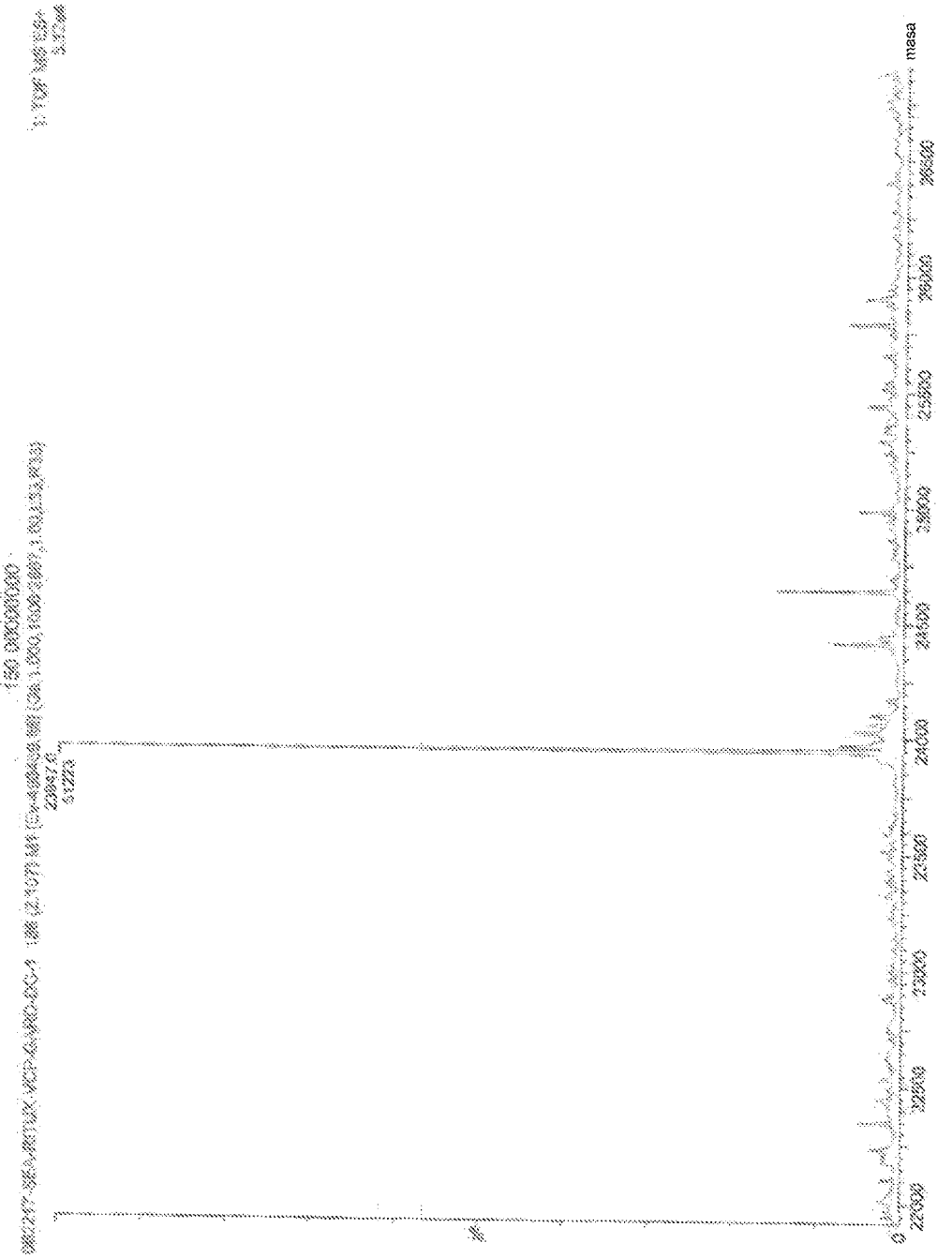


Fig. 67F

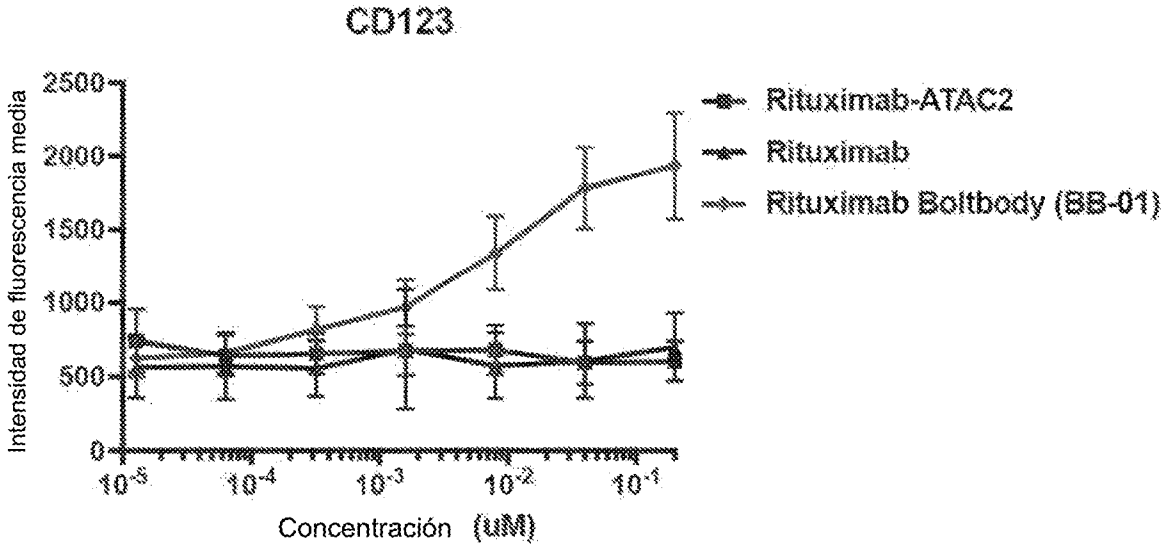

CD123
Intensidad de fluorescencia media
2500
2000
1500
1000
500
0
10^{-5}
10^{-4}
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
Concentración (uM)
Rituximab-ATAC2
Rituximab
Rituximab Boltbody (BB-01)

Fig. 67G

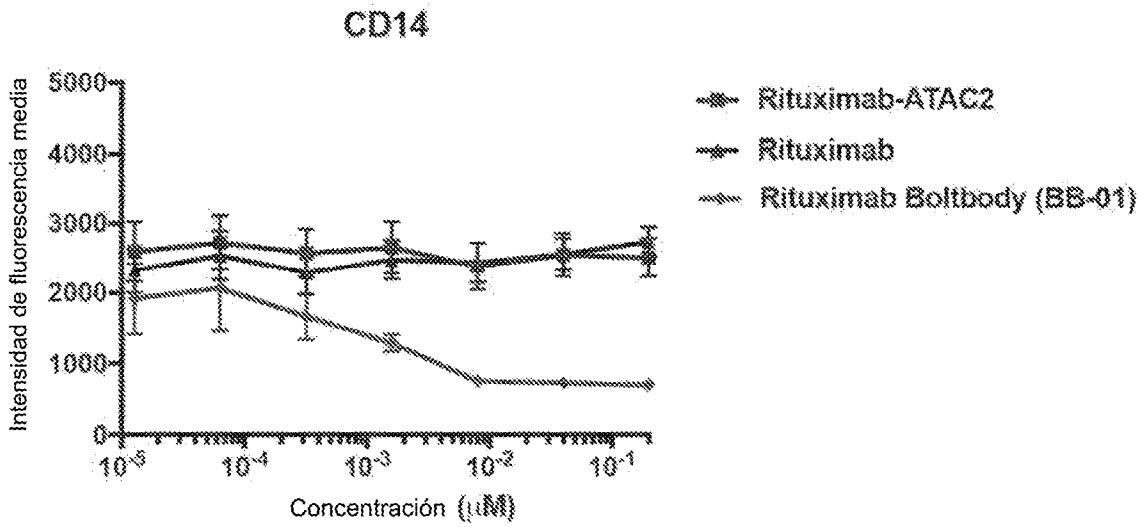


Fig. 67H

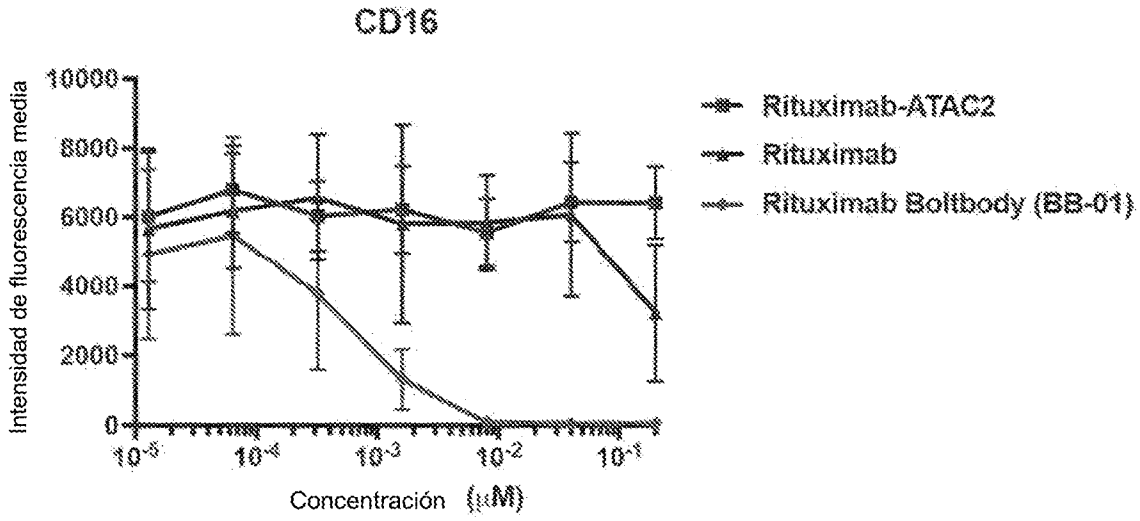


Fig. 67I

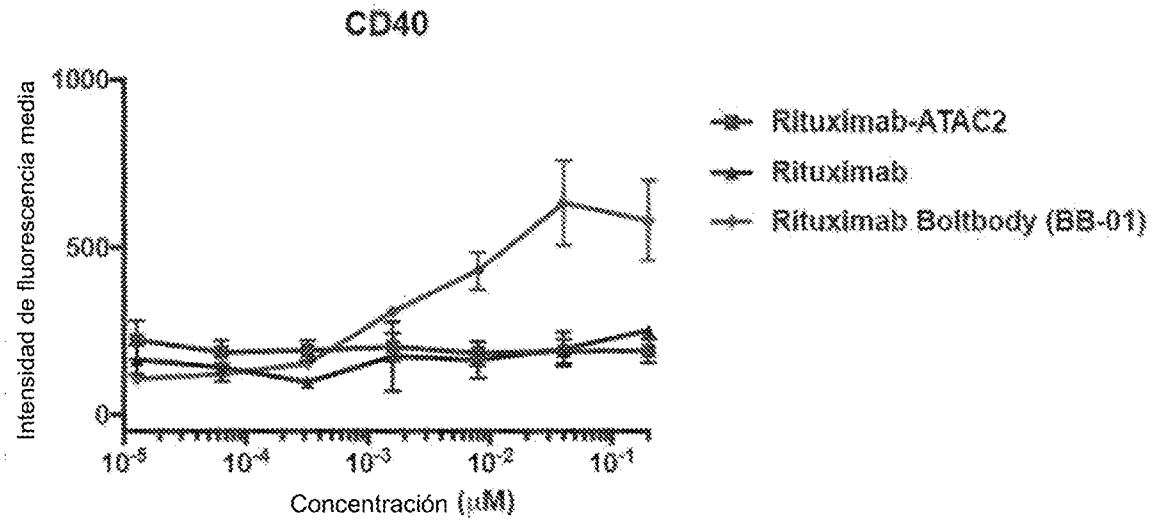


Fig. 67J

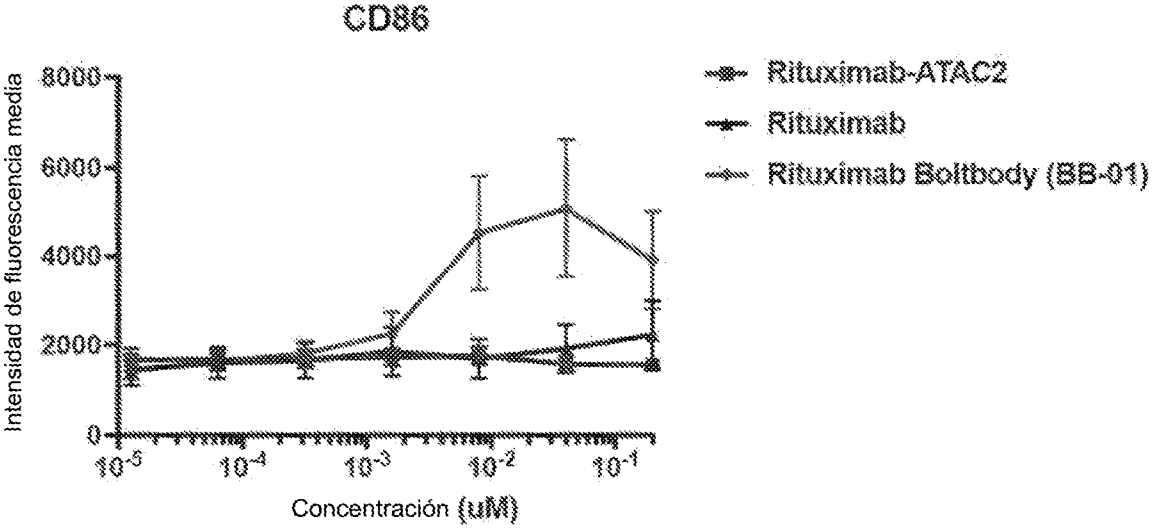


Fig. 67K

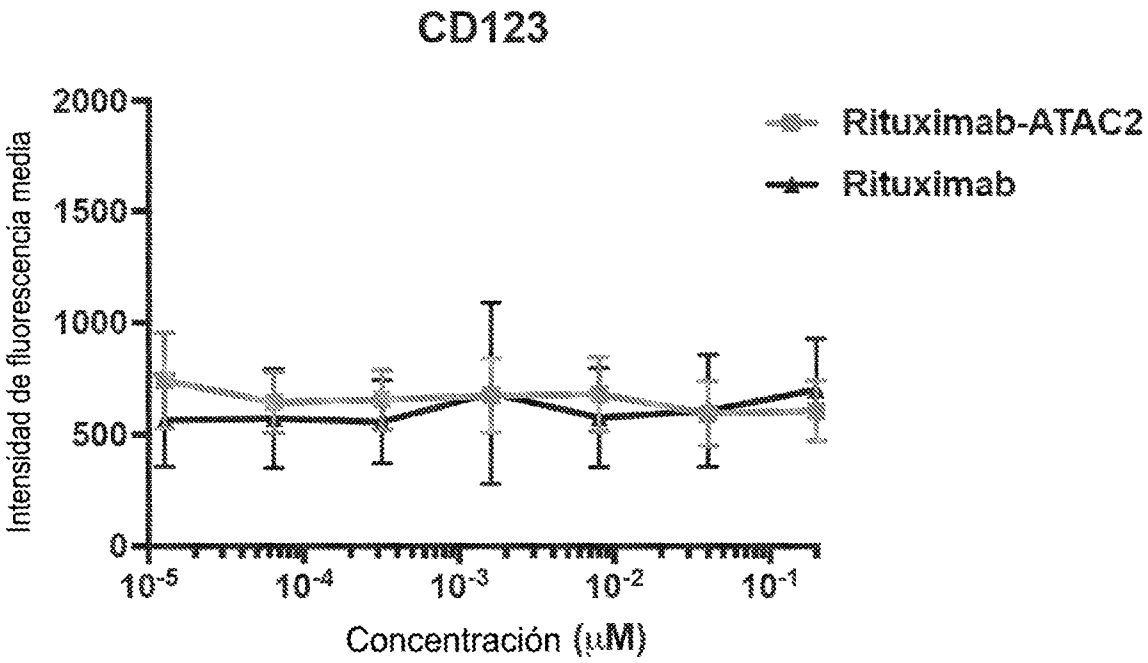

CD123
Rituximab-ATAC2
Rituximab
Intensidad de fluorescencia media
2000
1500
1000
500
0
10-5
10-4
10-3
10-2
10-1
Concentración (μM)

Fig. 67L

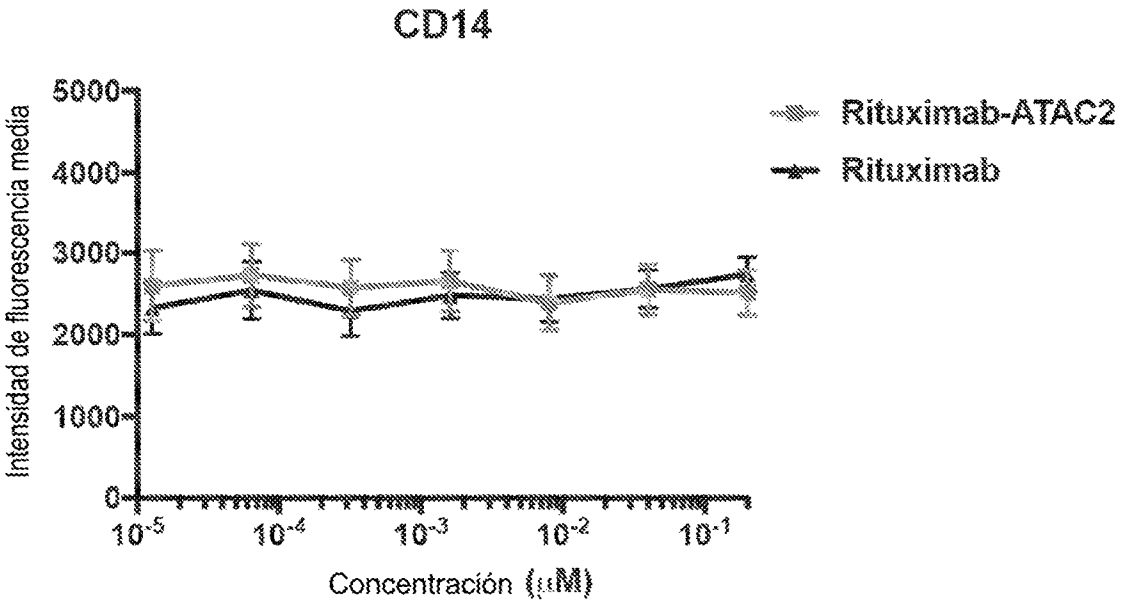


Fig. 67M

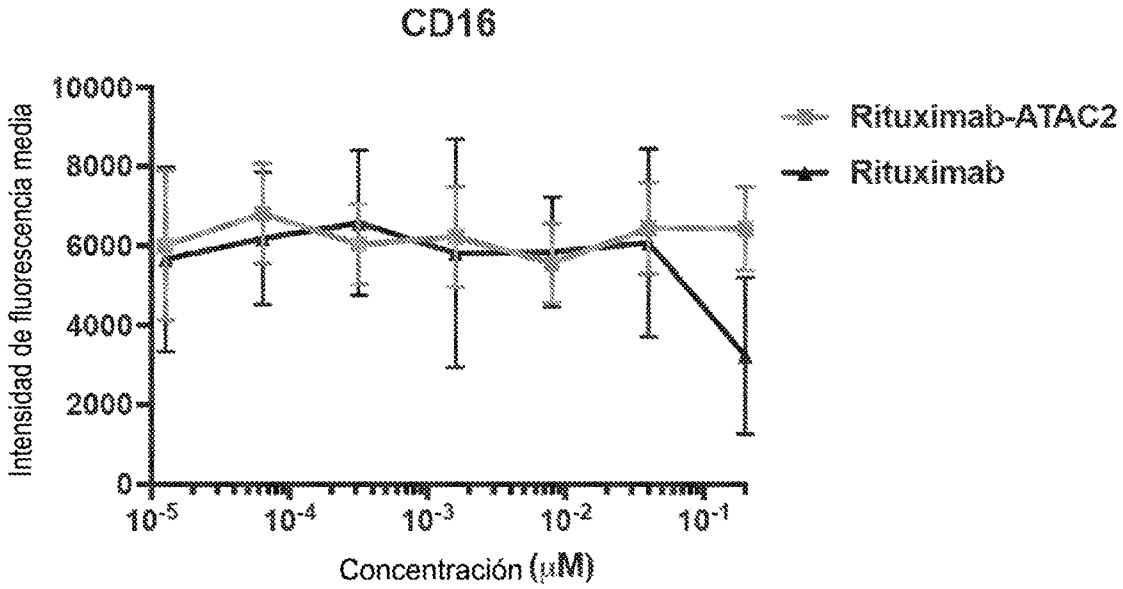


Fig. 67N

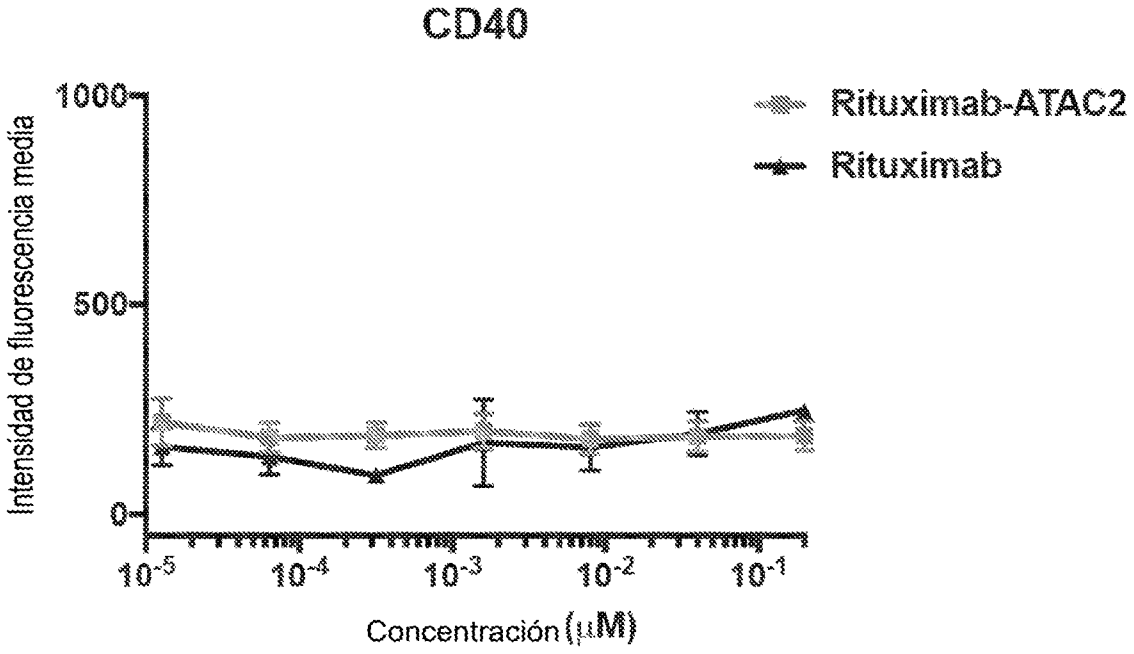


Fig. 67O

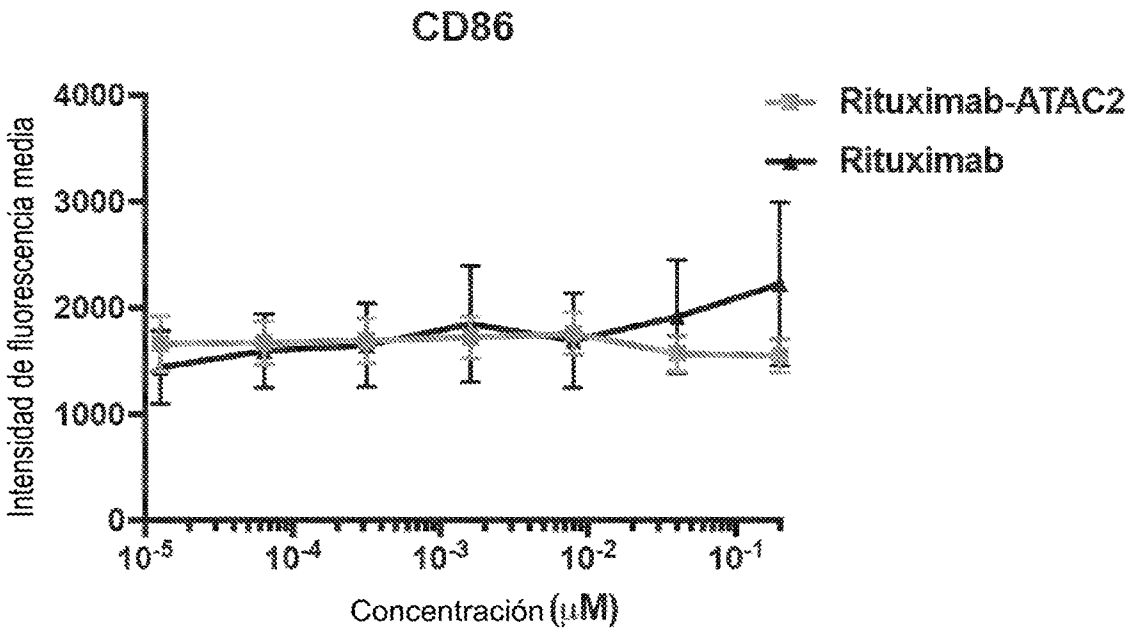


Fig. 67P

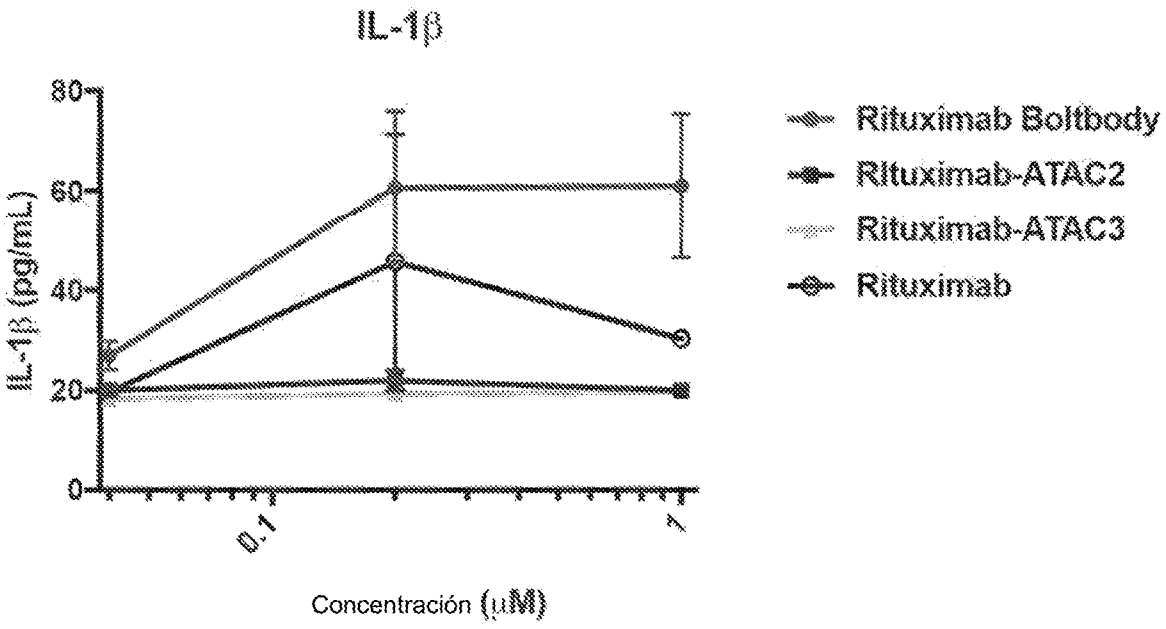

IL-1β
IL-1β (pg/mL)
80
60
40
20
0
0.1
1
Concentración (μM)
Rituximab Boltbody
RItuximab-ATAC2
Rituximab-ATAC3
Rituximab

Fig. 68A

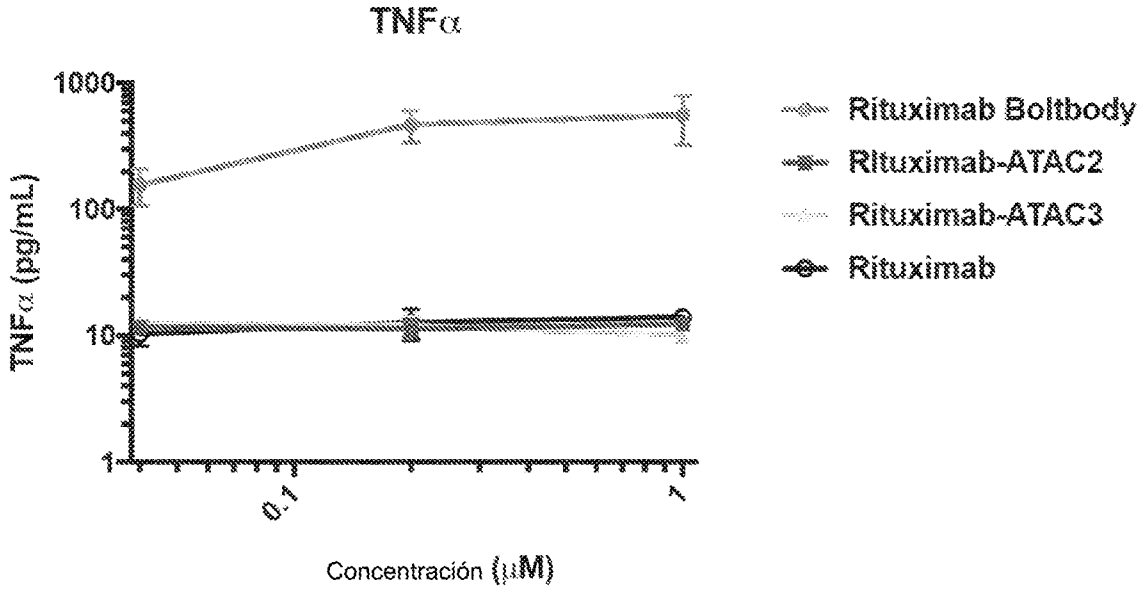

TNFα
1000
100
10
1
TNFα (pg/mL)
0.1
1
Concentración (μM)
Rituximab Boltbody
RItuximab-ATAC2
Rituximab-ATAC3
Rituximab

Fig. 68B

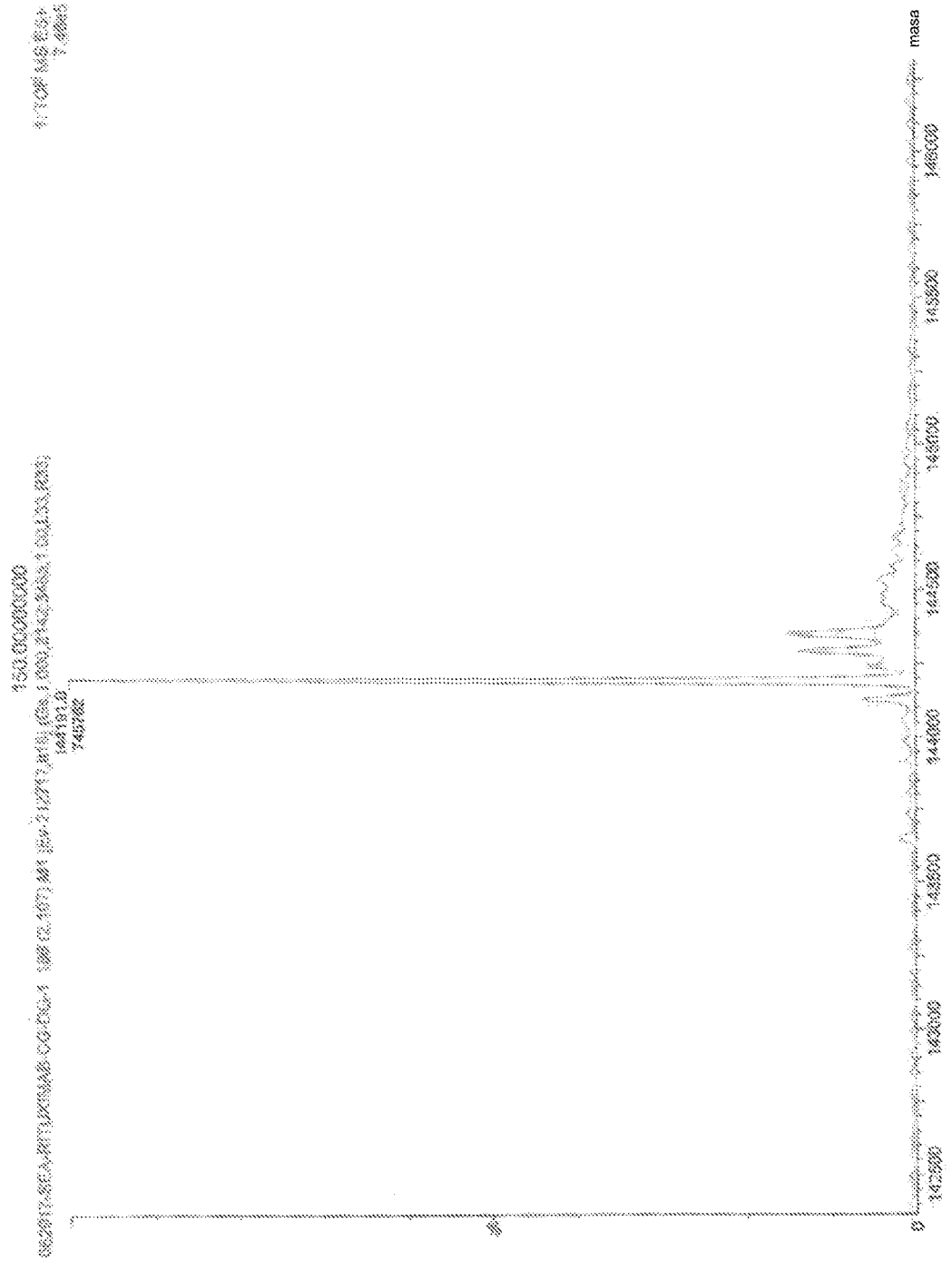

masa
1465000
1465500
1466000
1466500
1467000
1467500
1468000
1468500
1469000
1469500
1470000
1470500
%
0

Fig. 68C

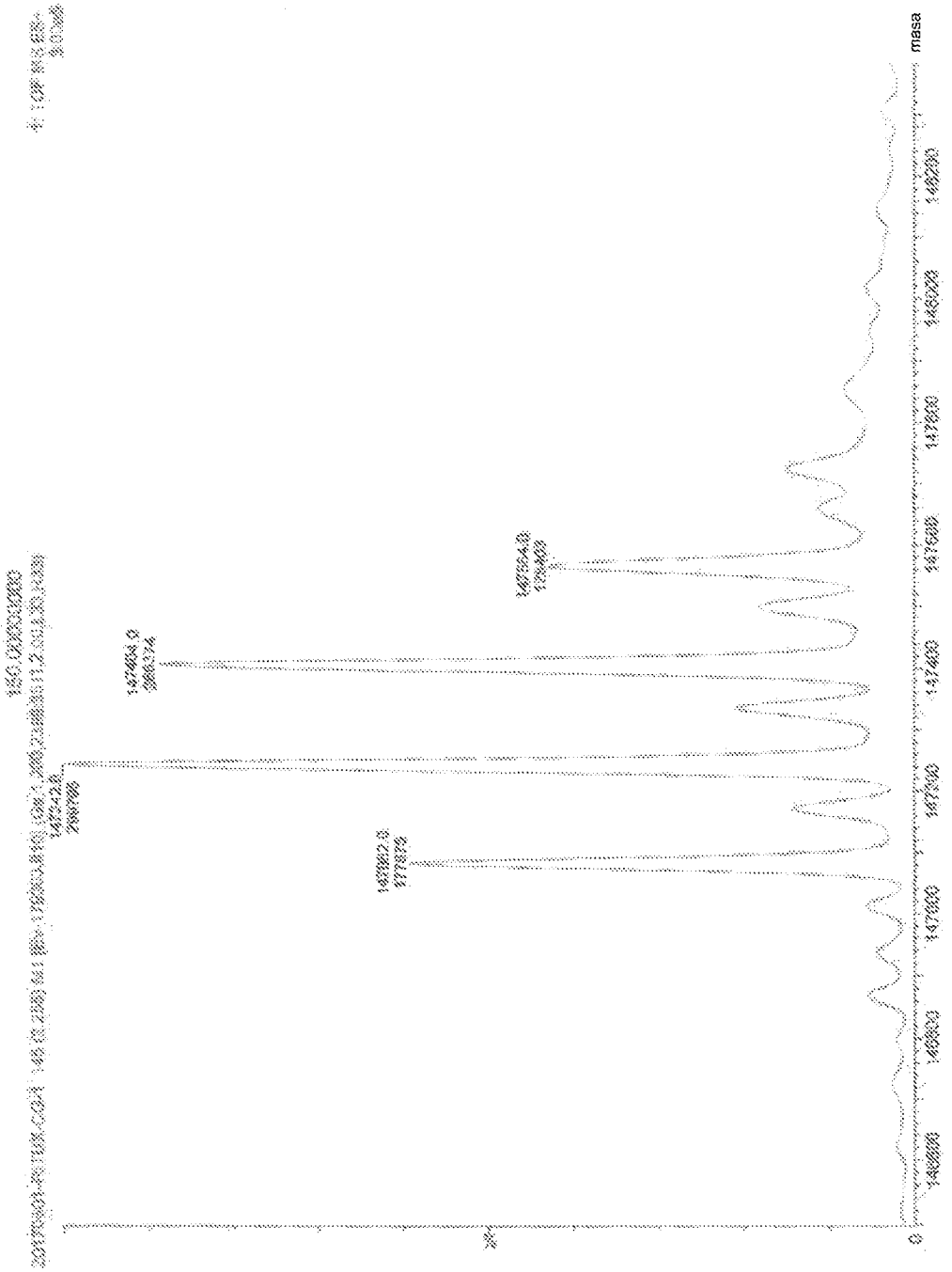


Fig. 68D

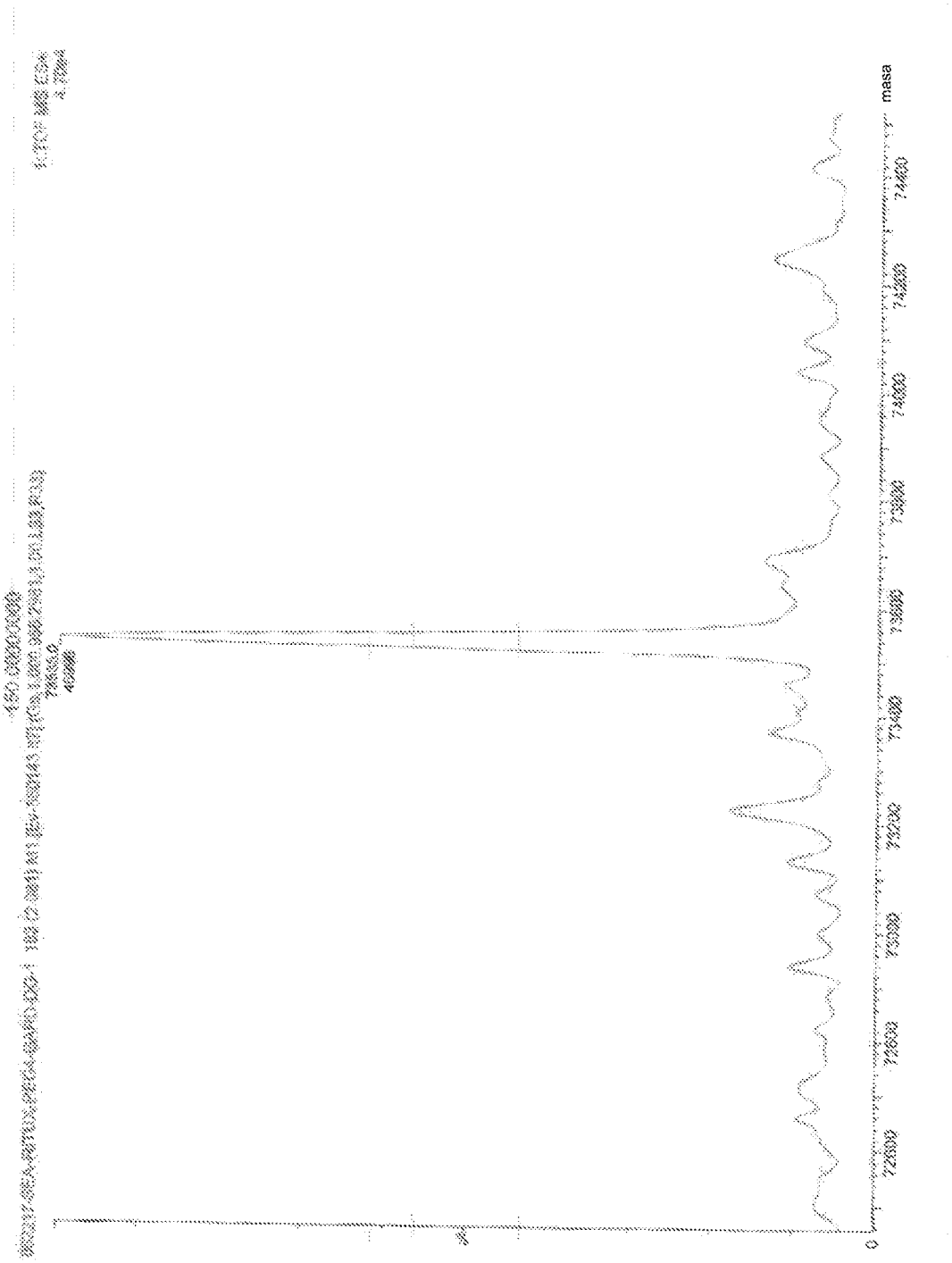


Fig. 68E

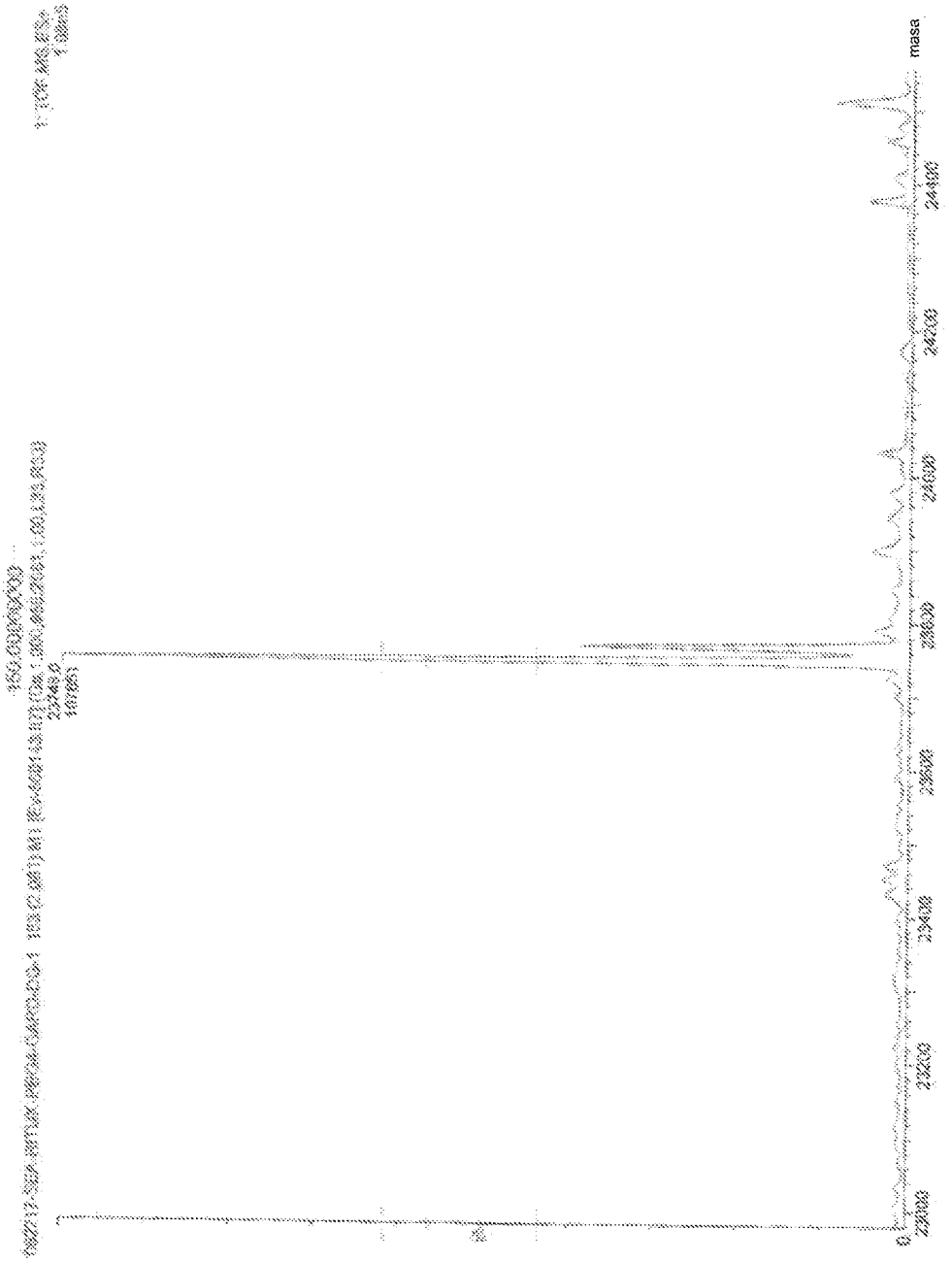


Fig. 68F

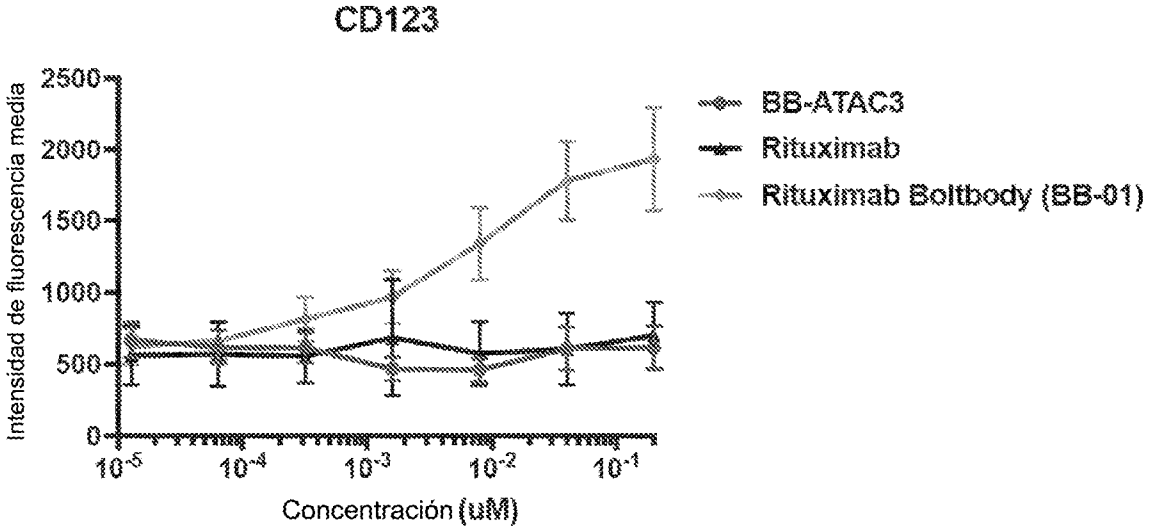

CD123
Intensidad de fluorescencia media
2500
2000
1500
1000
500
0
10^{-5}
10^{-4}
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
Concentración (uM)
BB-ATAC3
Rituximab
Rituximab Boltbody (BB-01)

Fig. 68G

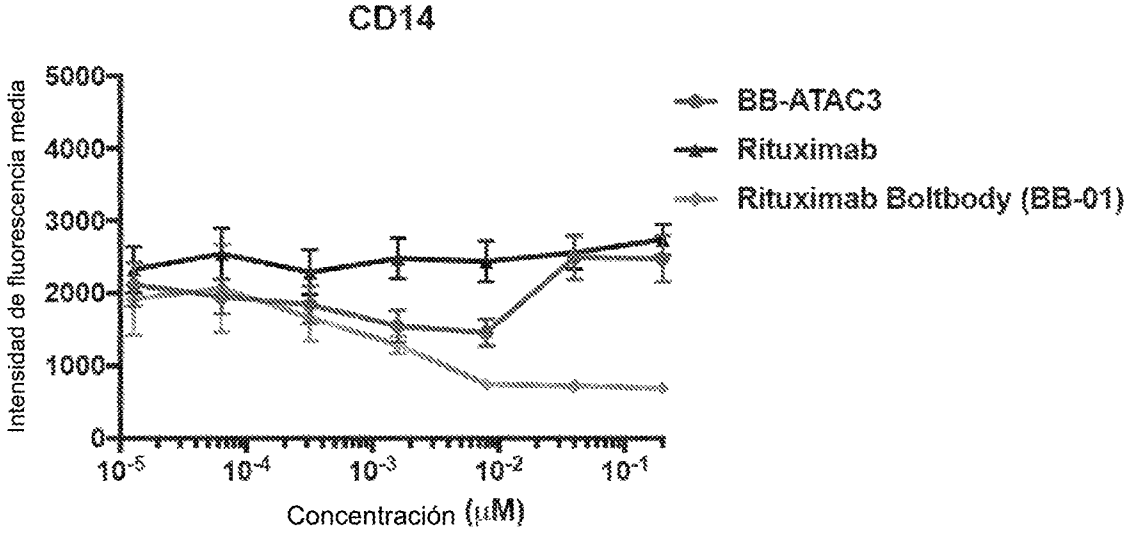


Fig. 68H

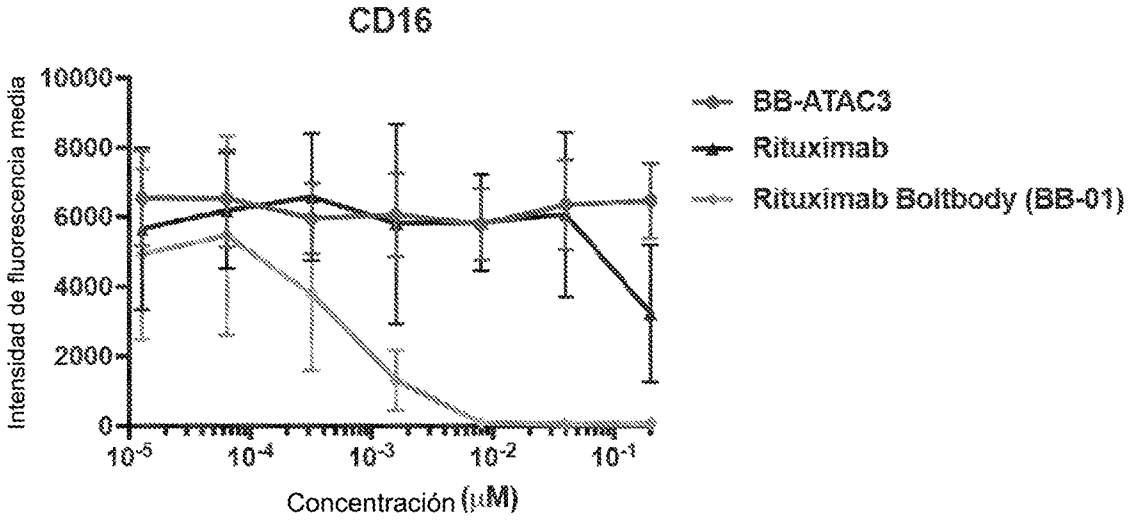


Fig. 68I

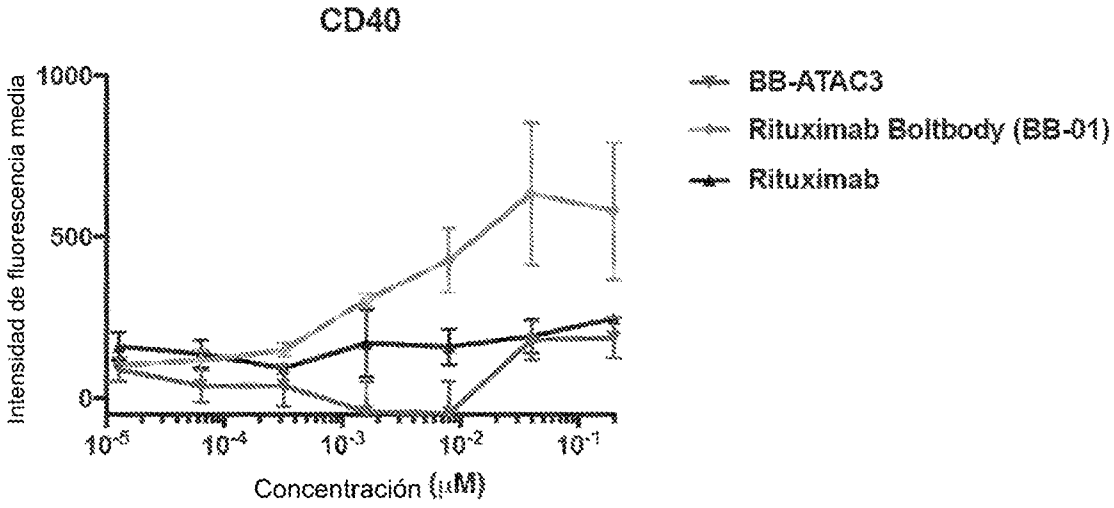


Fig. 68J

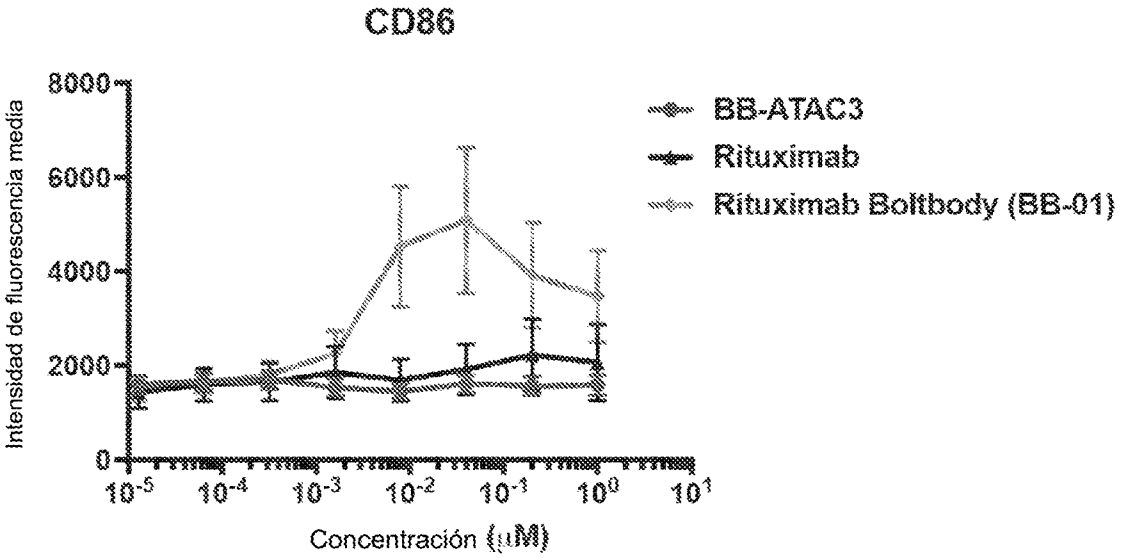


Fig. 68K

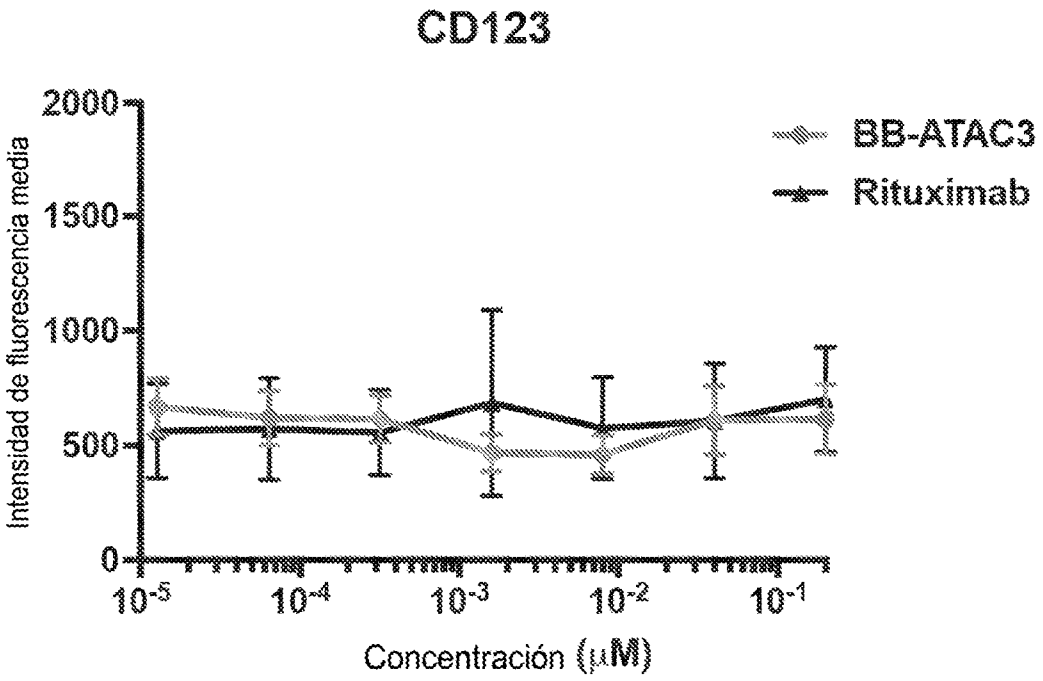


Fig. 68L

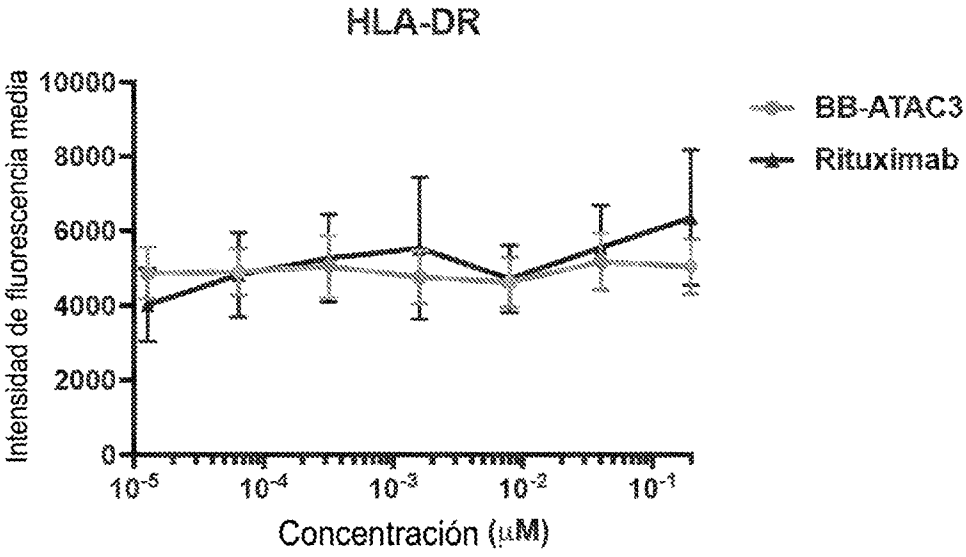


Fig. 68M

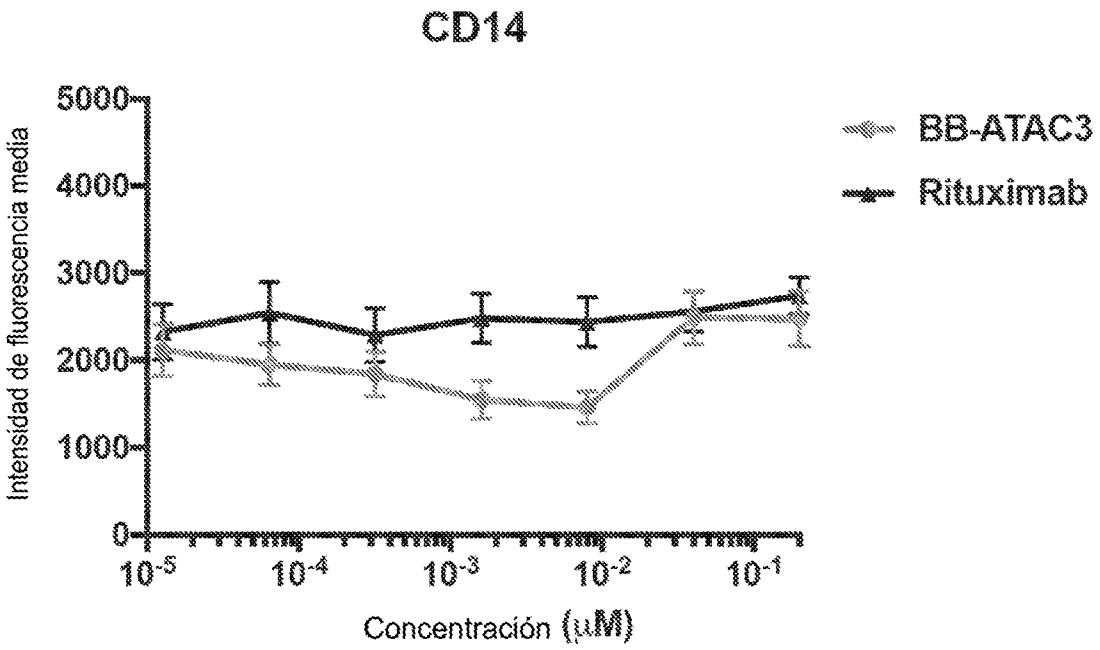


Fig. 68N

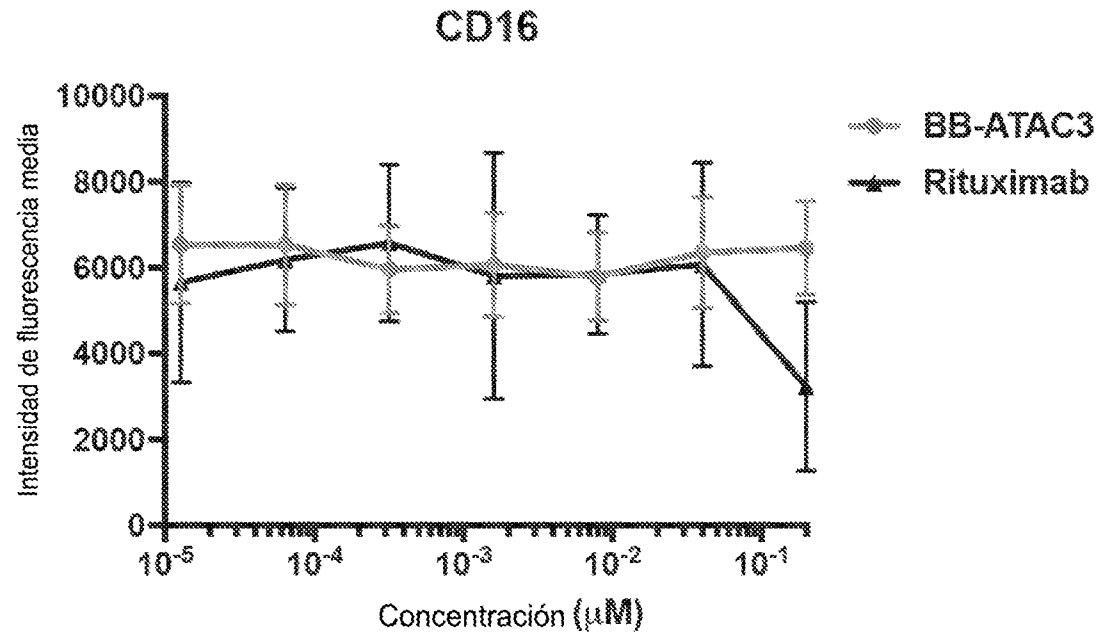


Fig. 68O

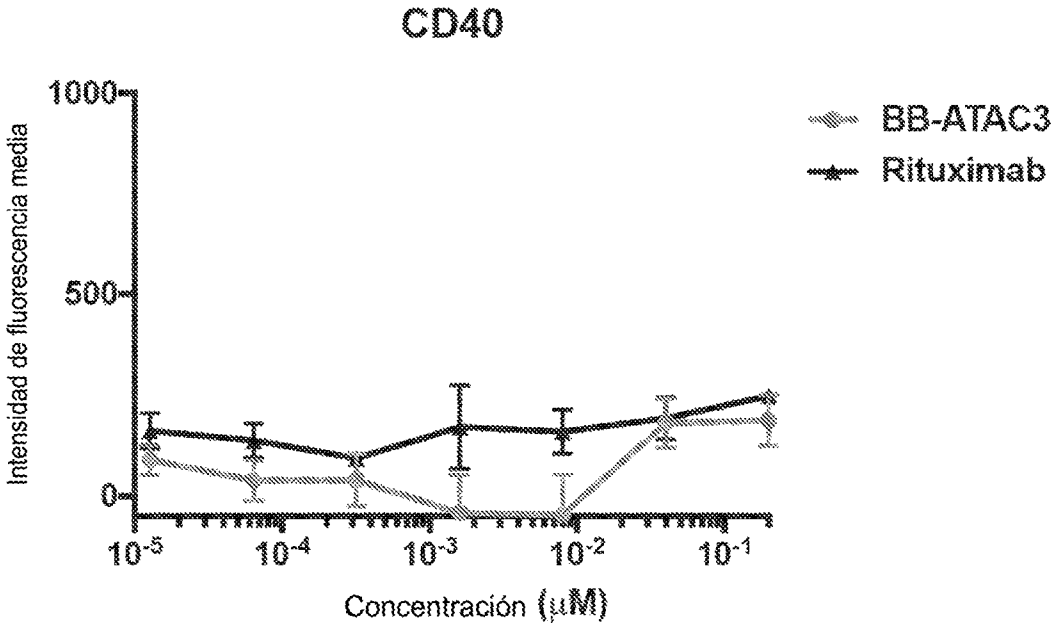


Fig. 68P

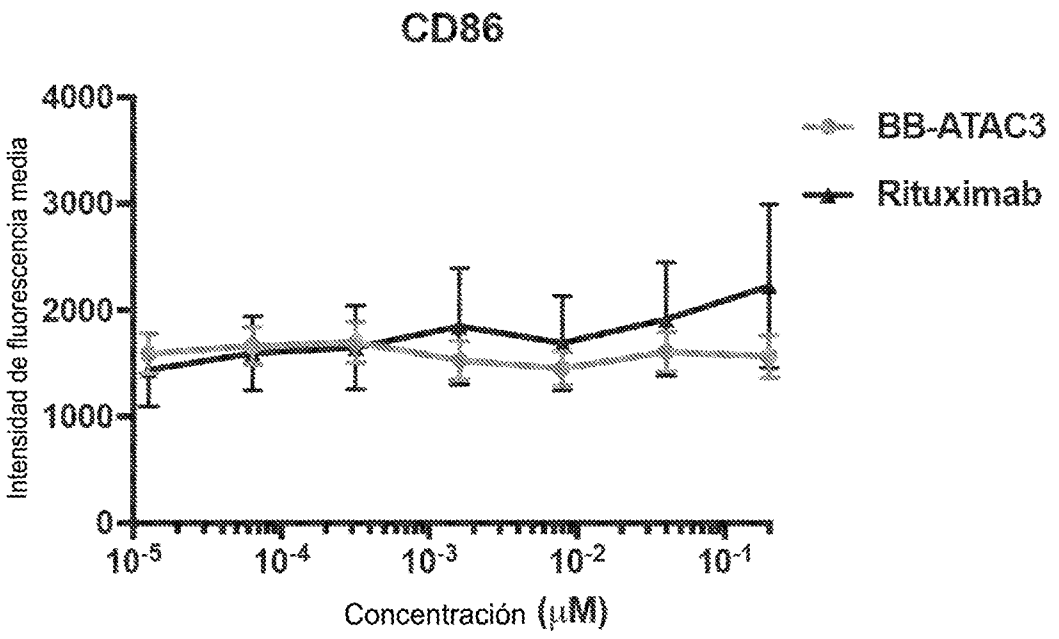


Fig. 68Q

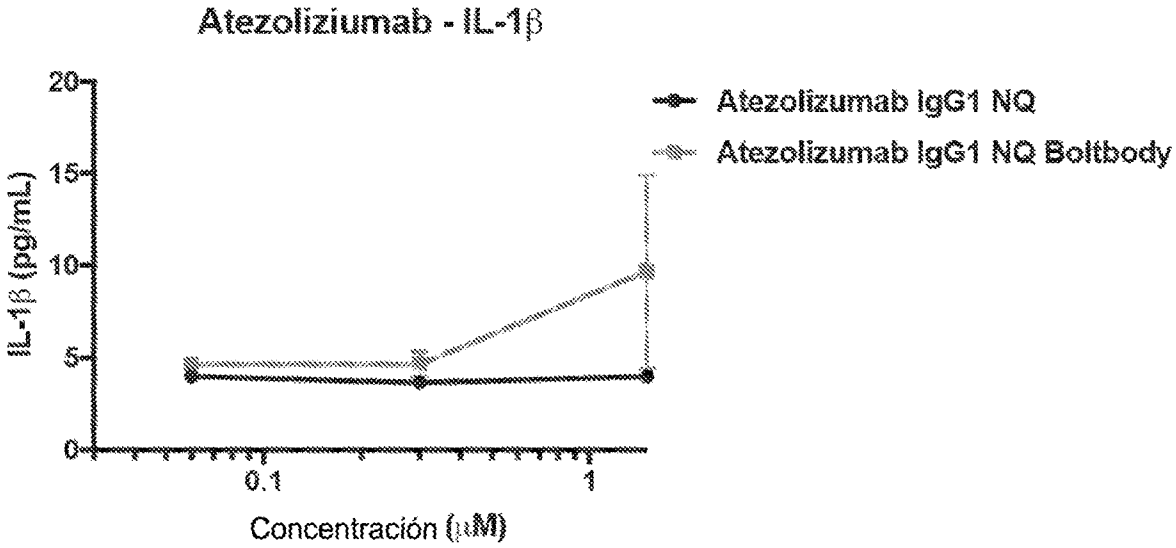


Fig. 69A

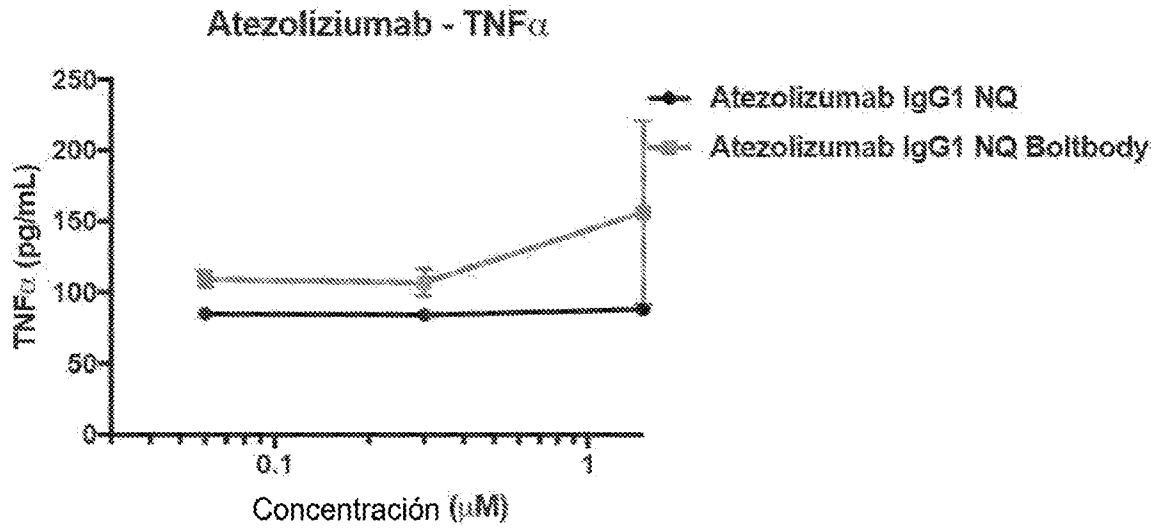


Fig. 69B

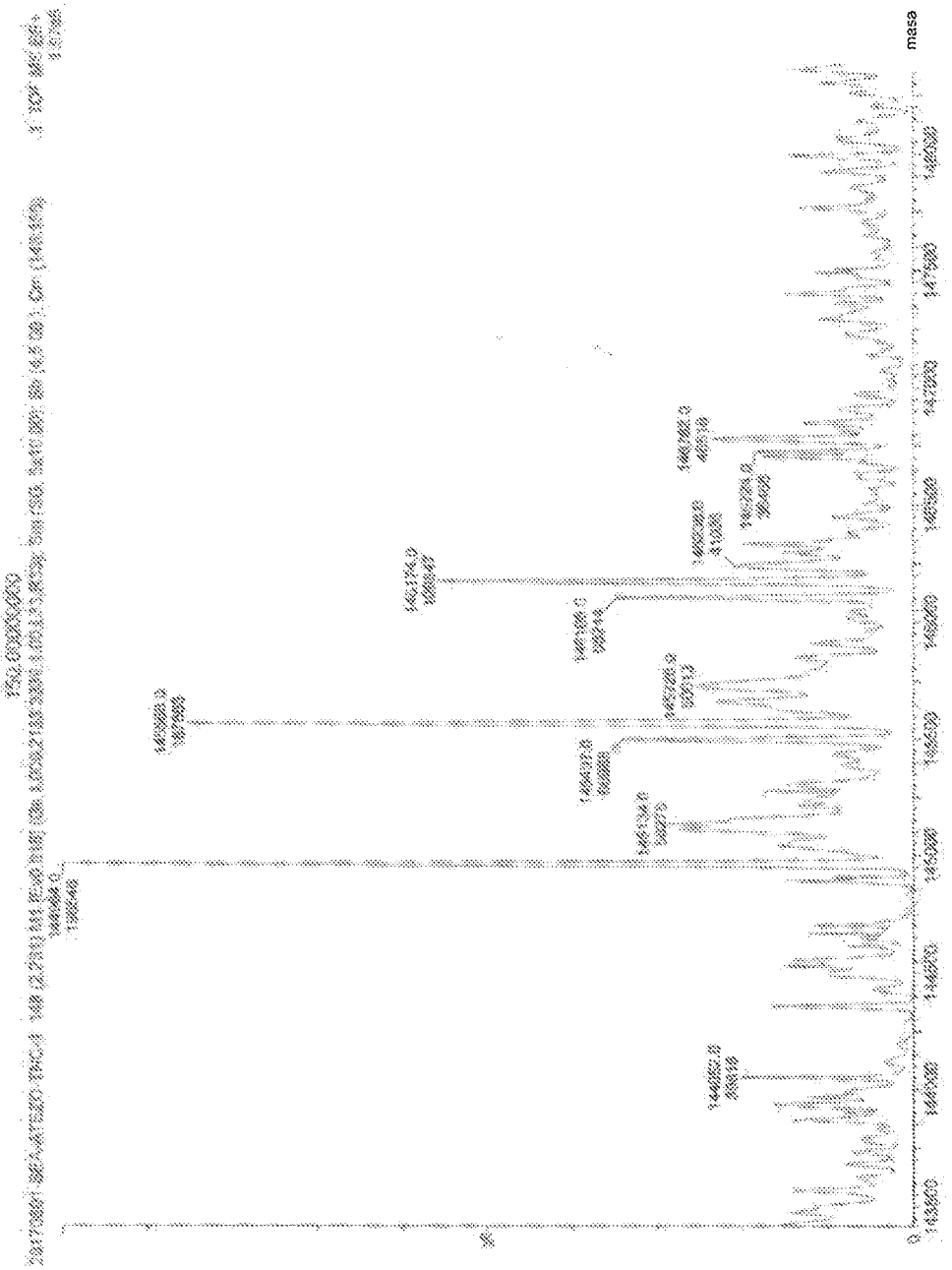


Fig. 69C

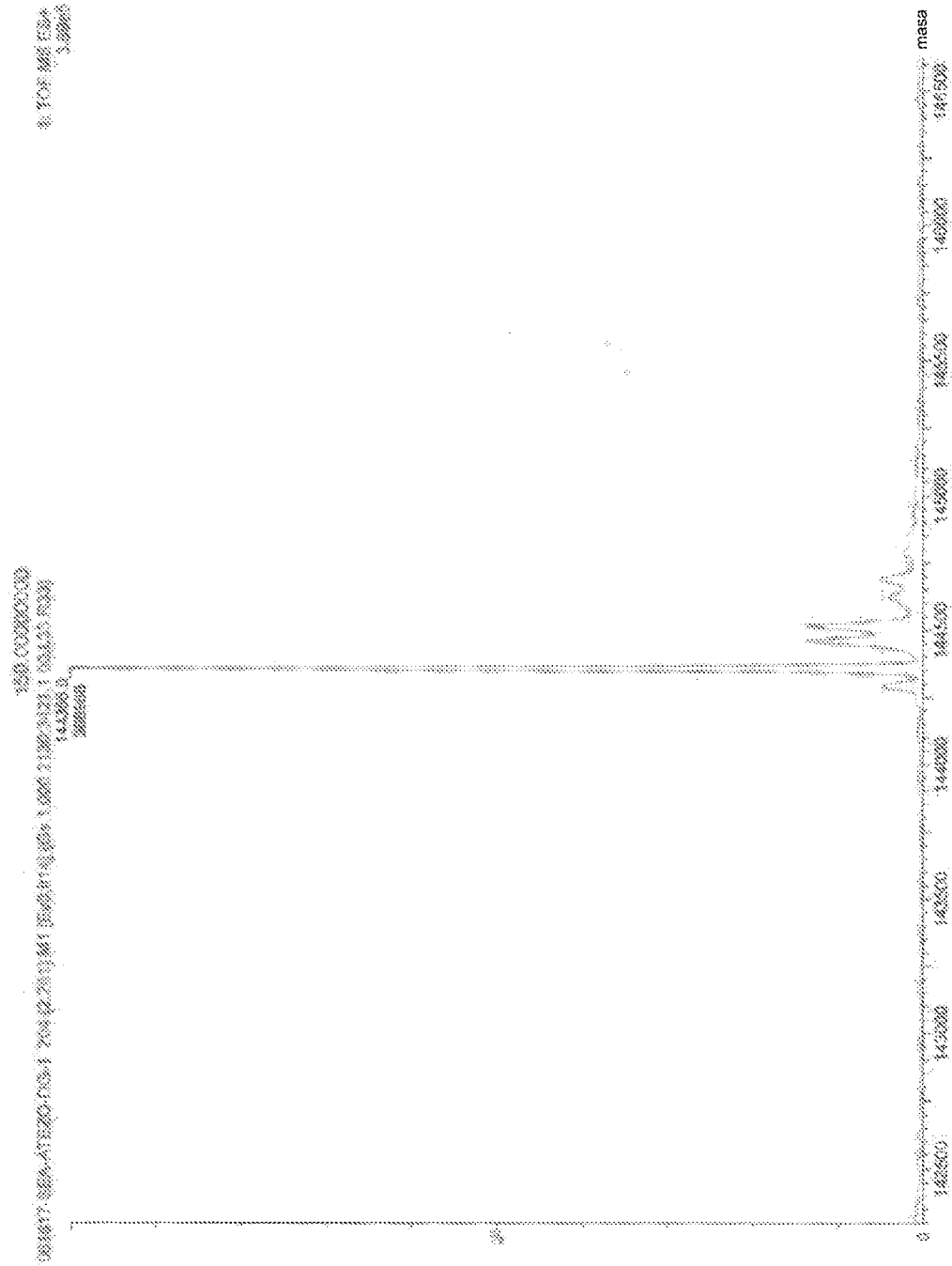


Fig. 69D

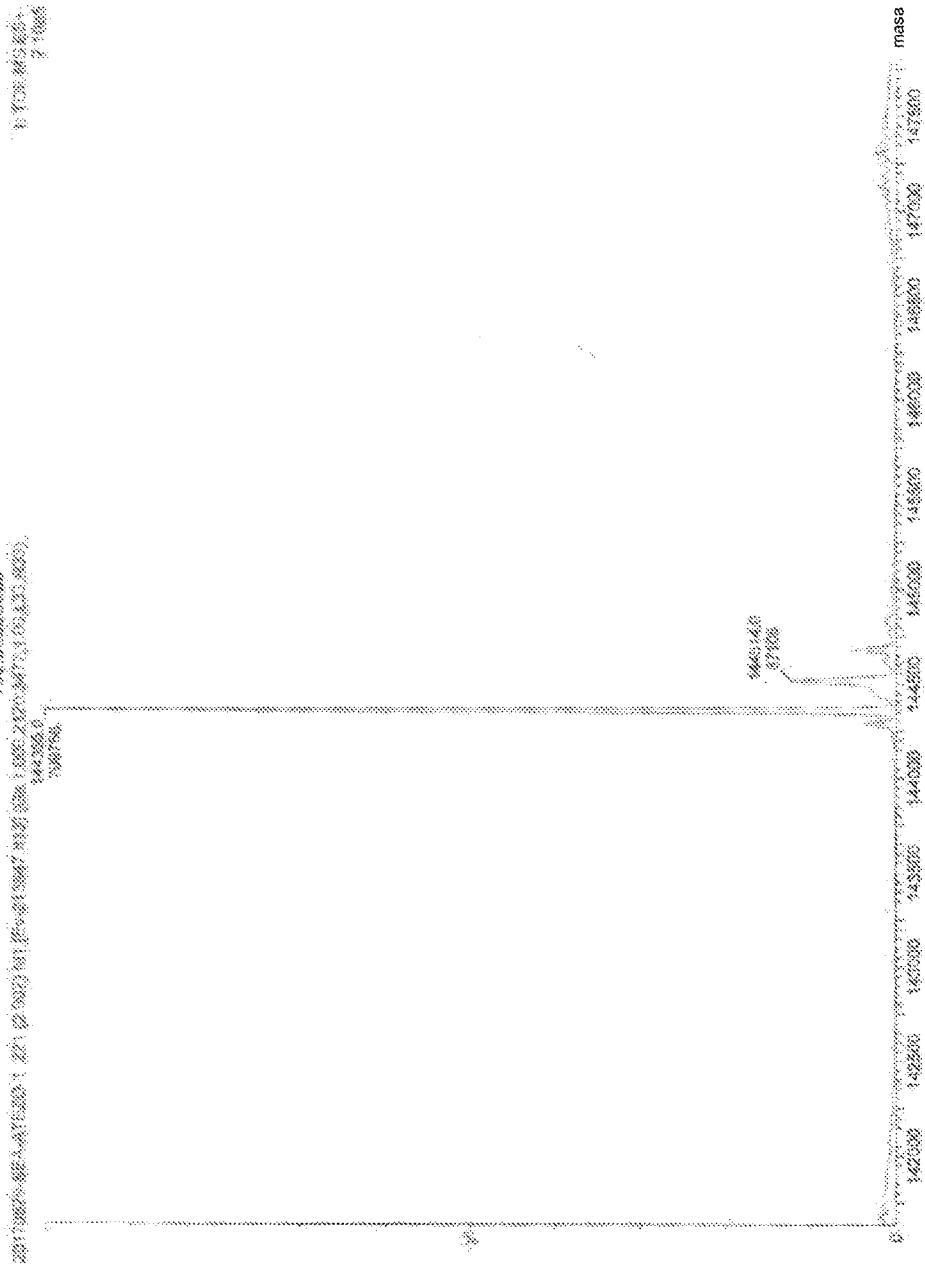


Fig. 69E

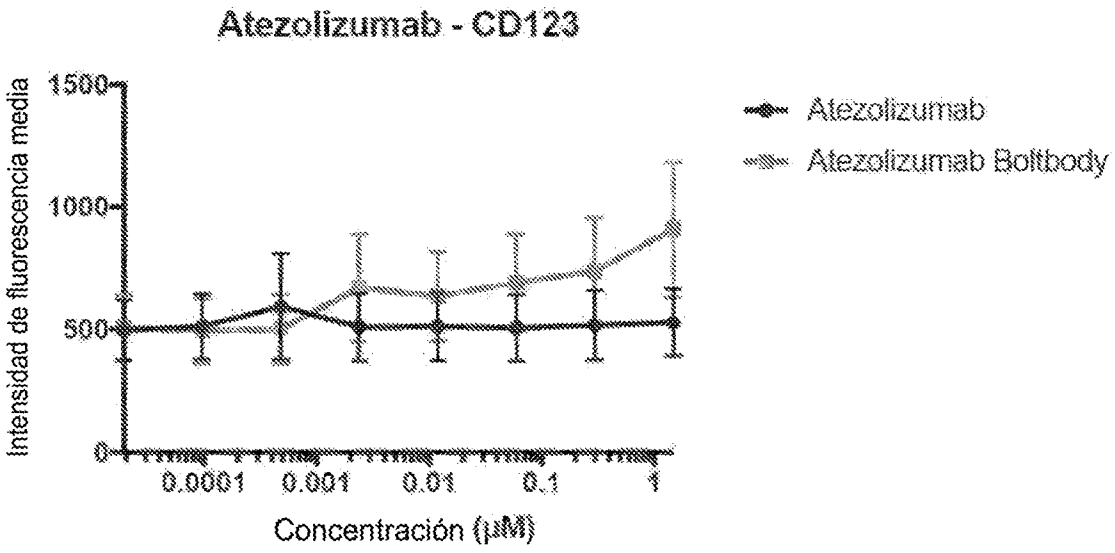


Fig. 69F

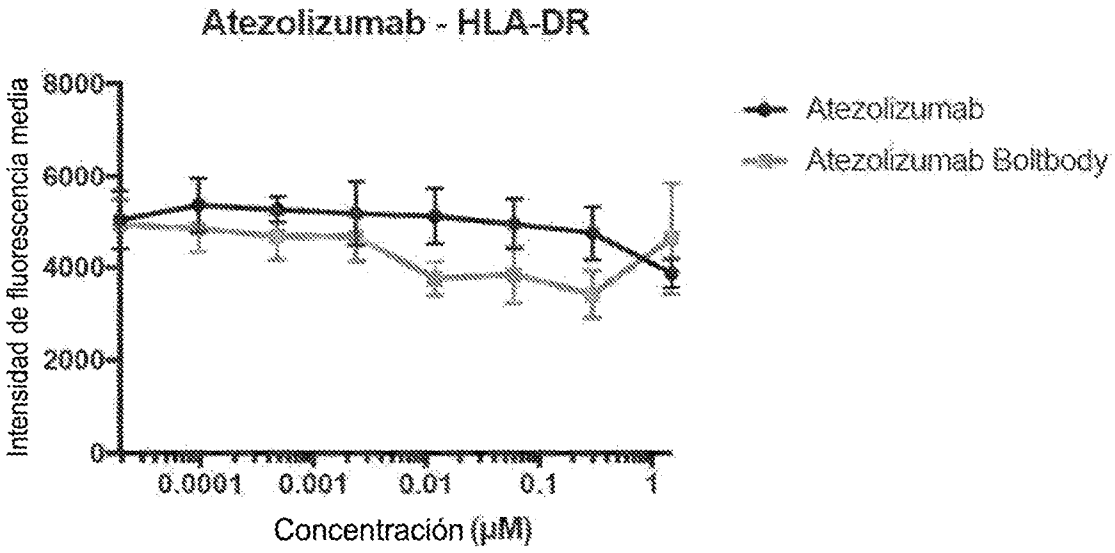


Fig. 69G

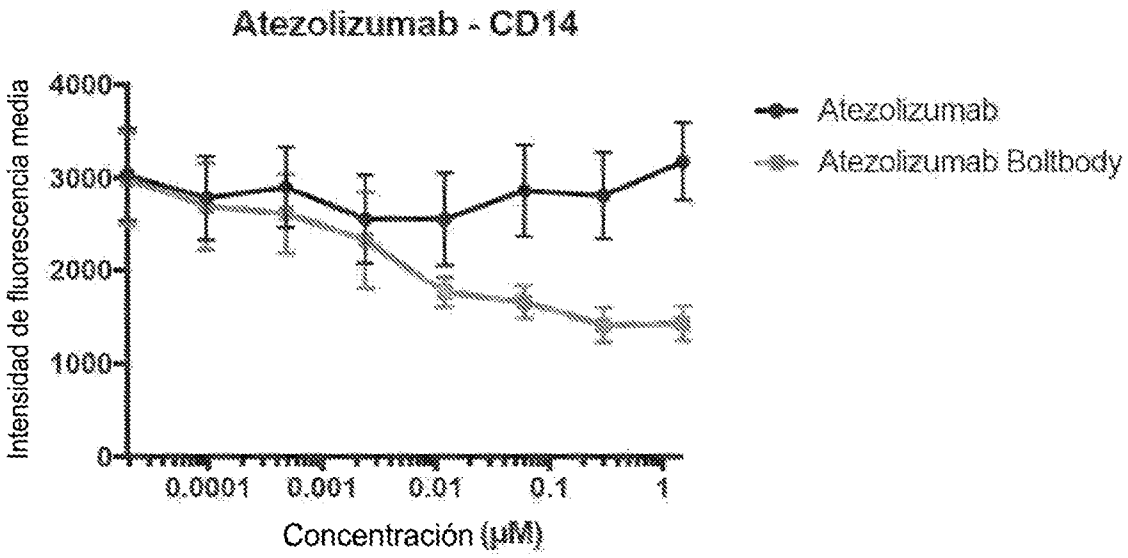


Fig. 69H

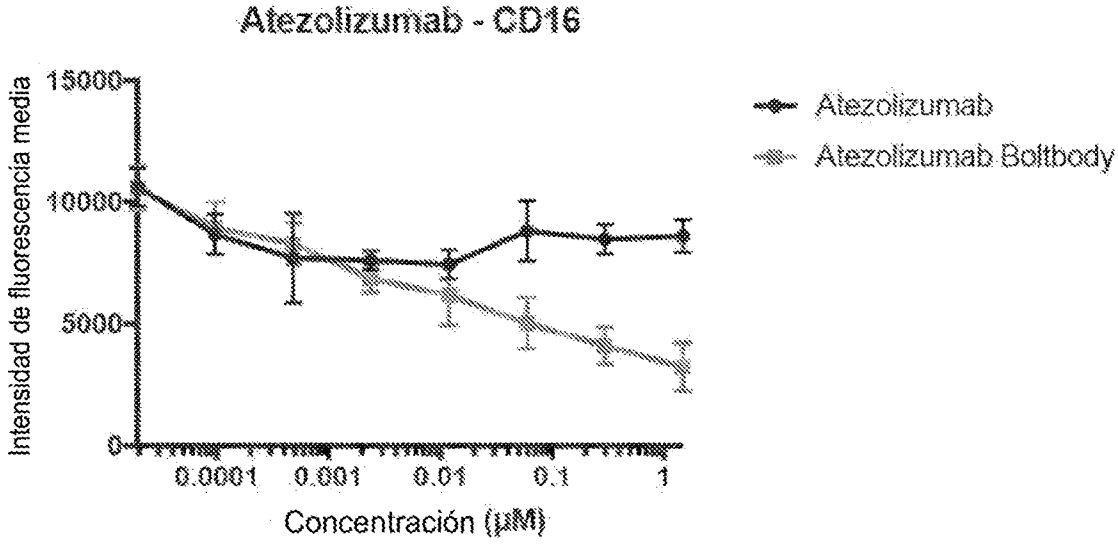


Fig. 69I

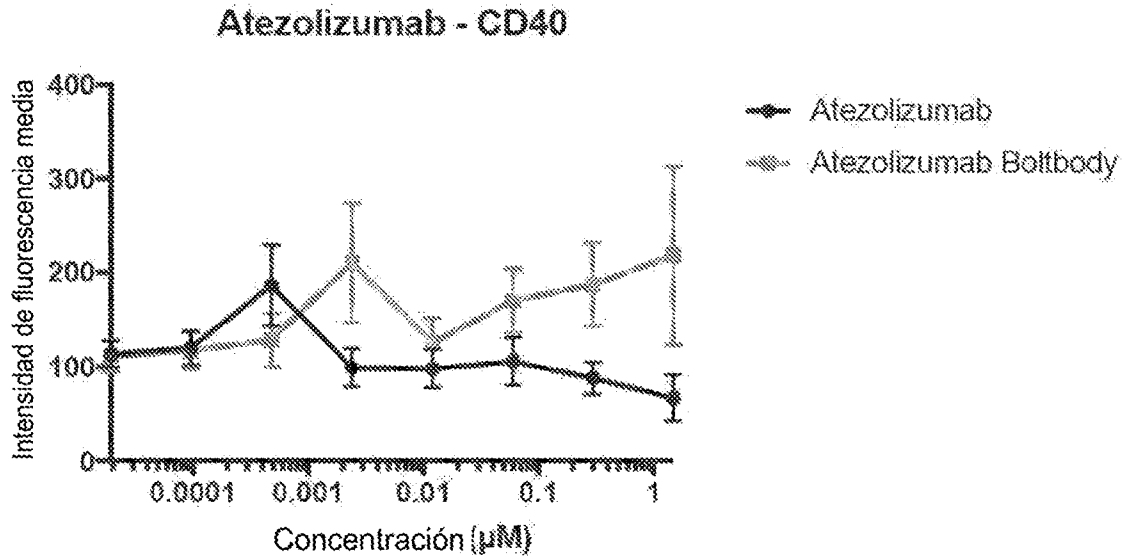


Fig. 69J

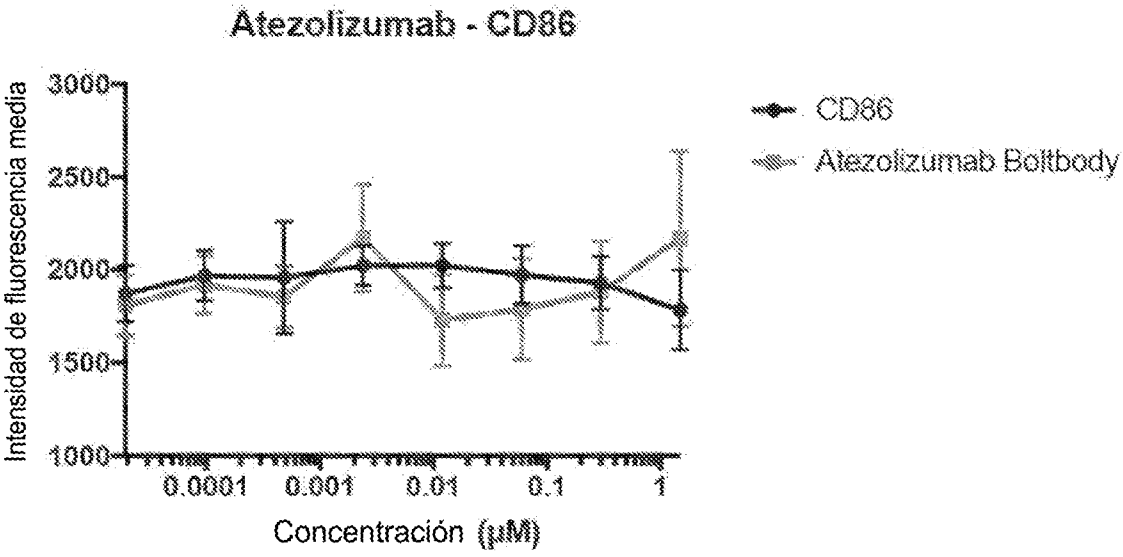


Fig. 69K

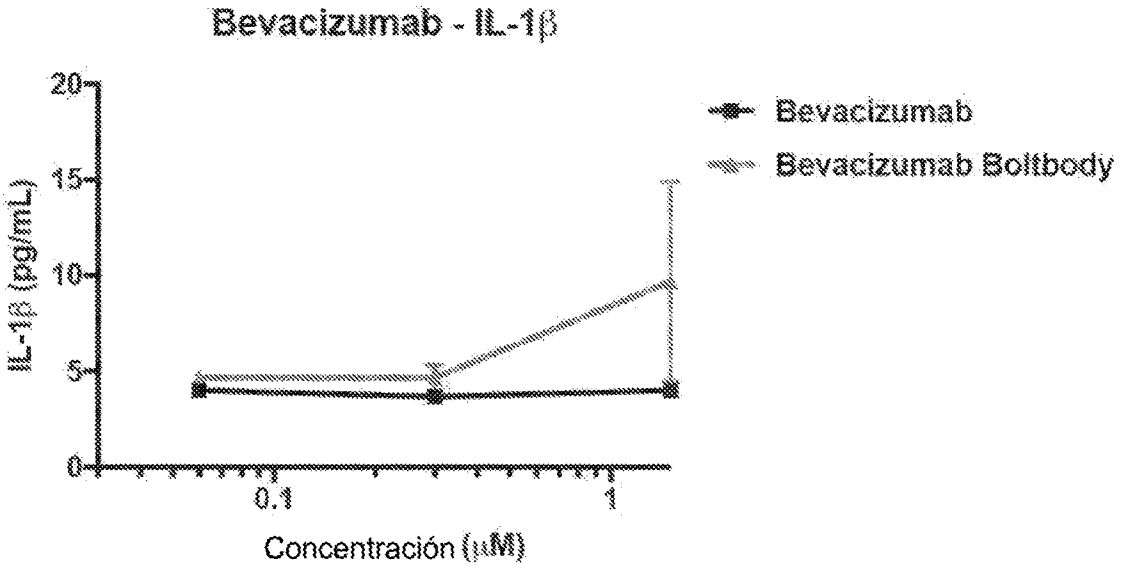


Fig. 70A

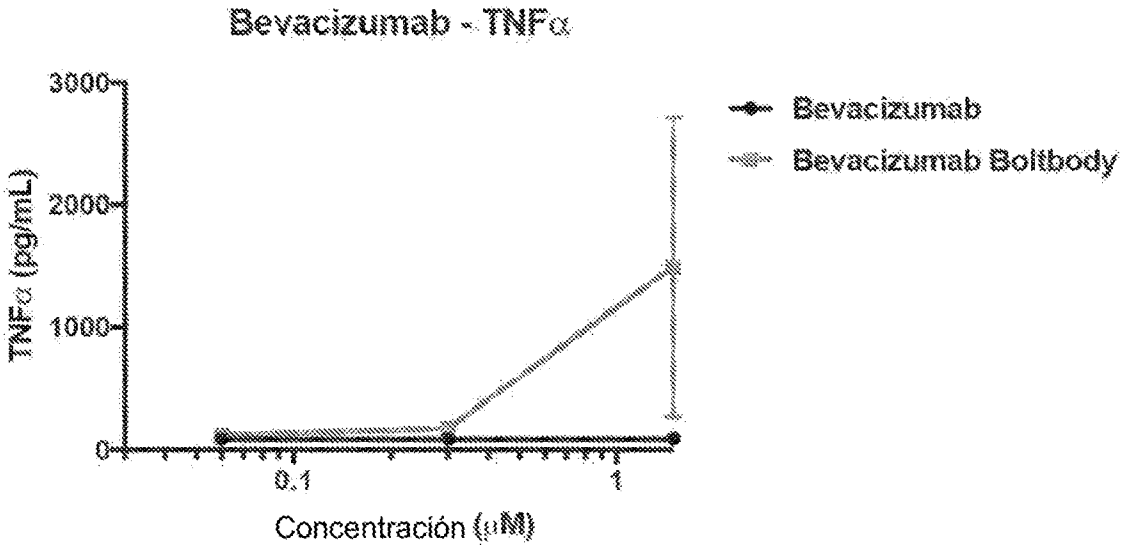


Fig. 70B

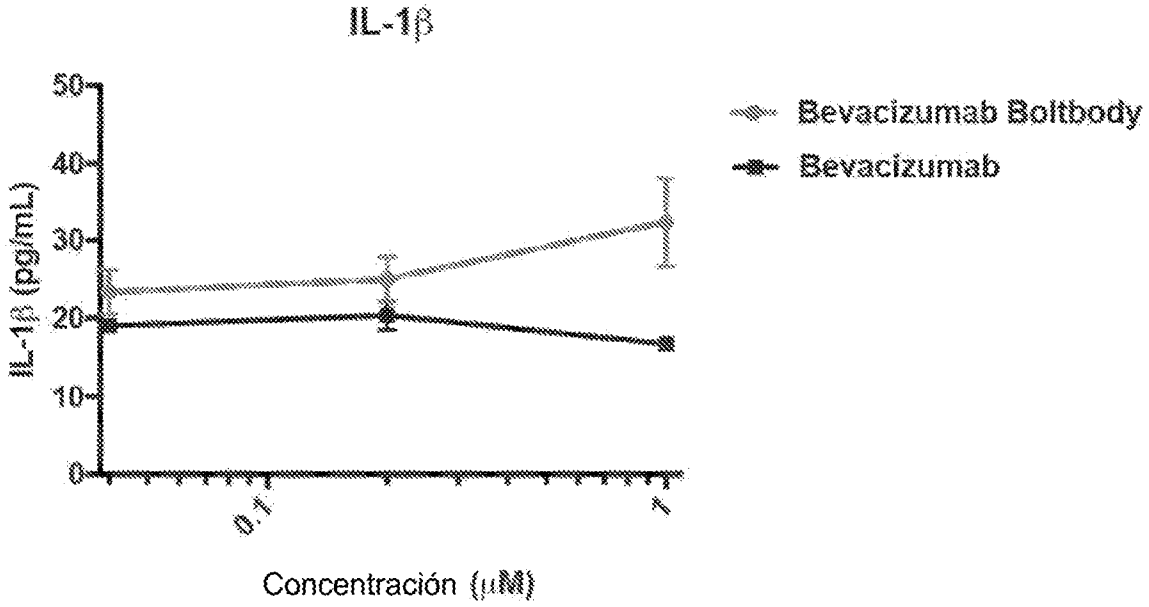


Fig. 70C

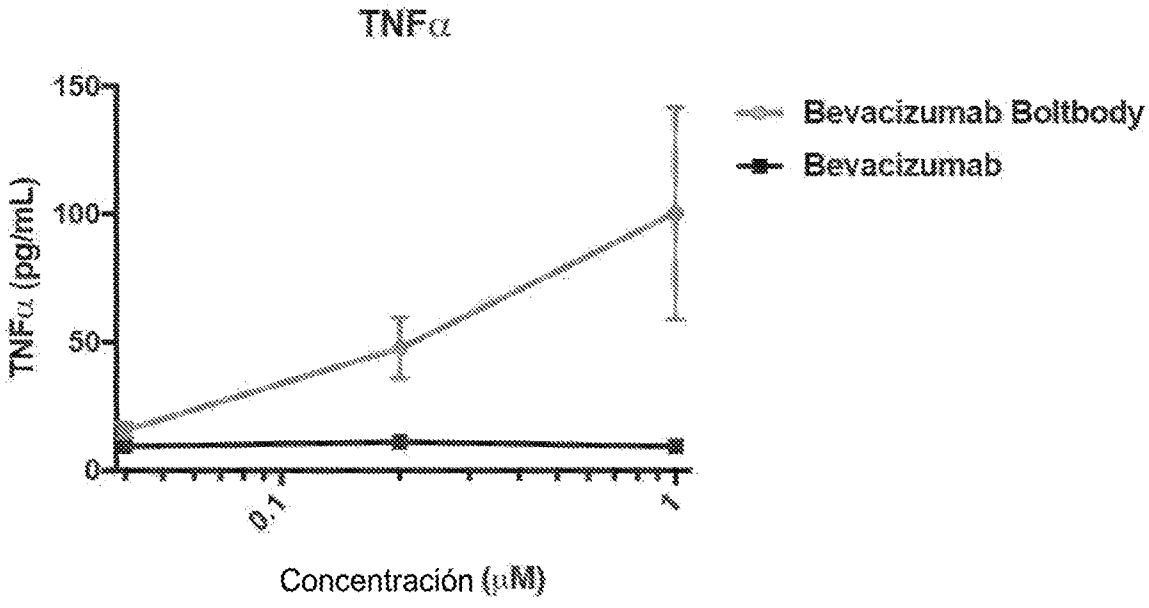


Fig. 70D

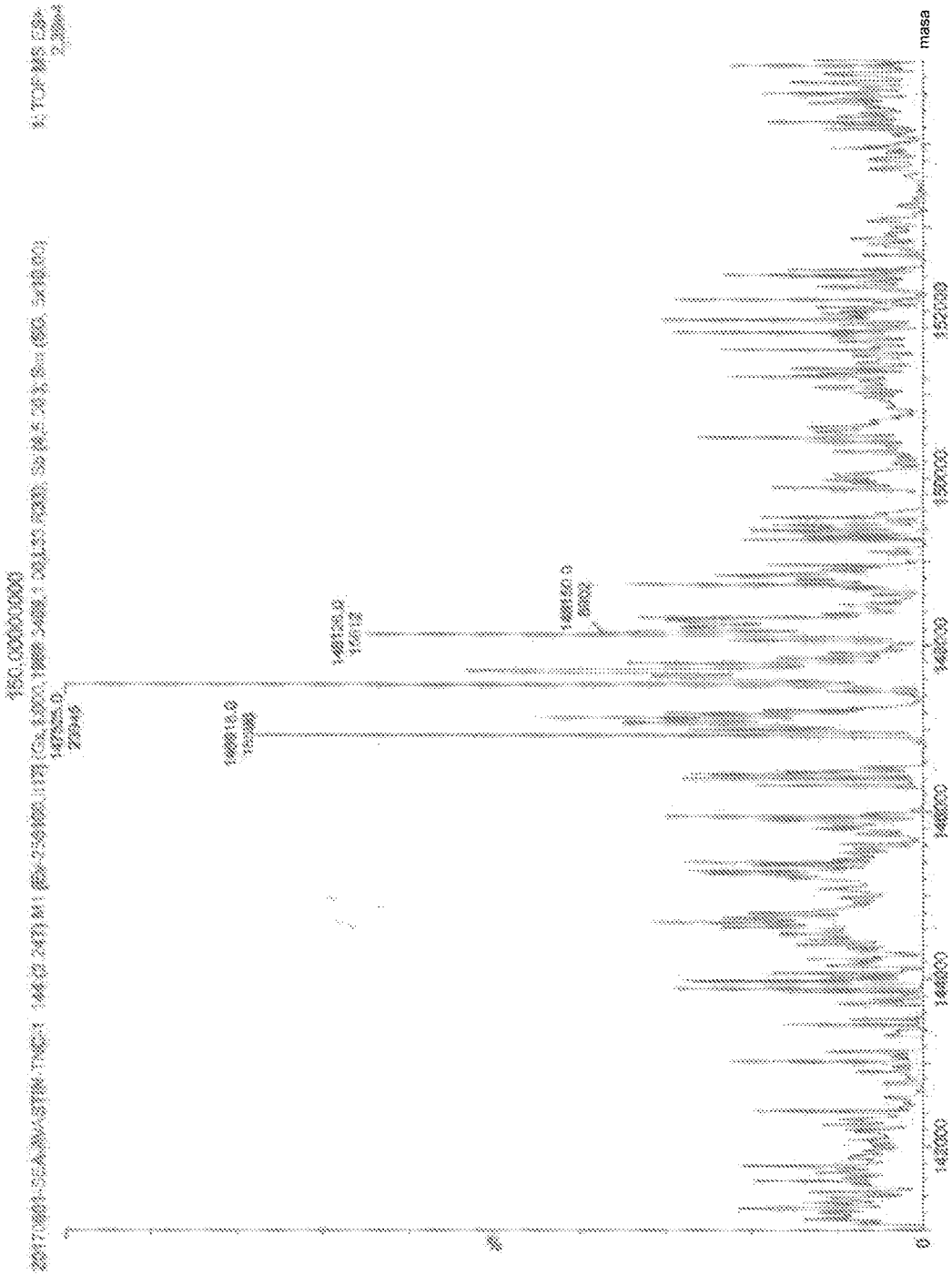


Fig. 70E

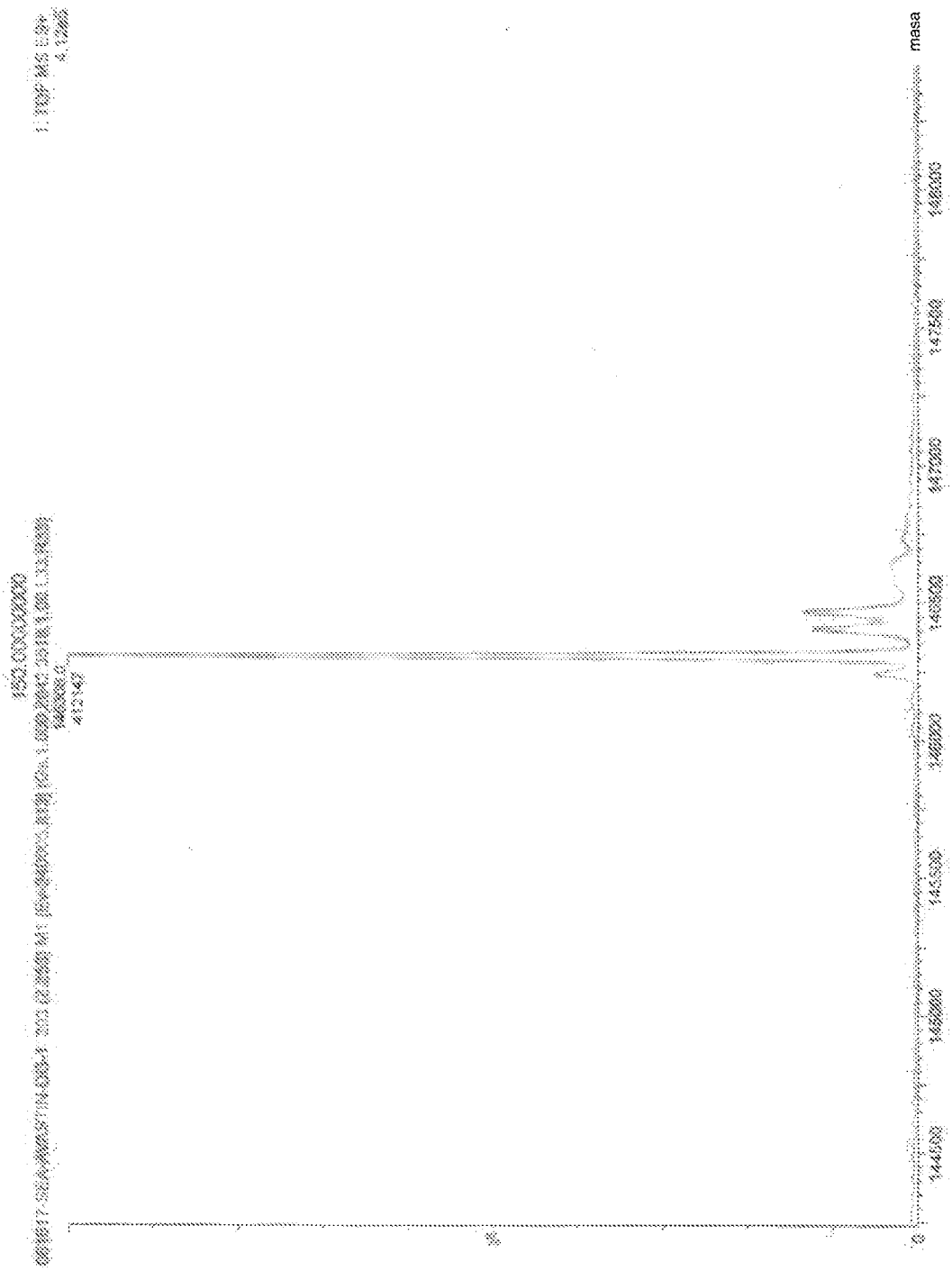

masa
%
0
144500
145000
145500
146000
146500
147000
147500
148000

Fig. 70F

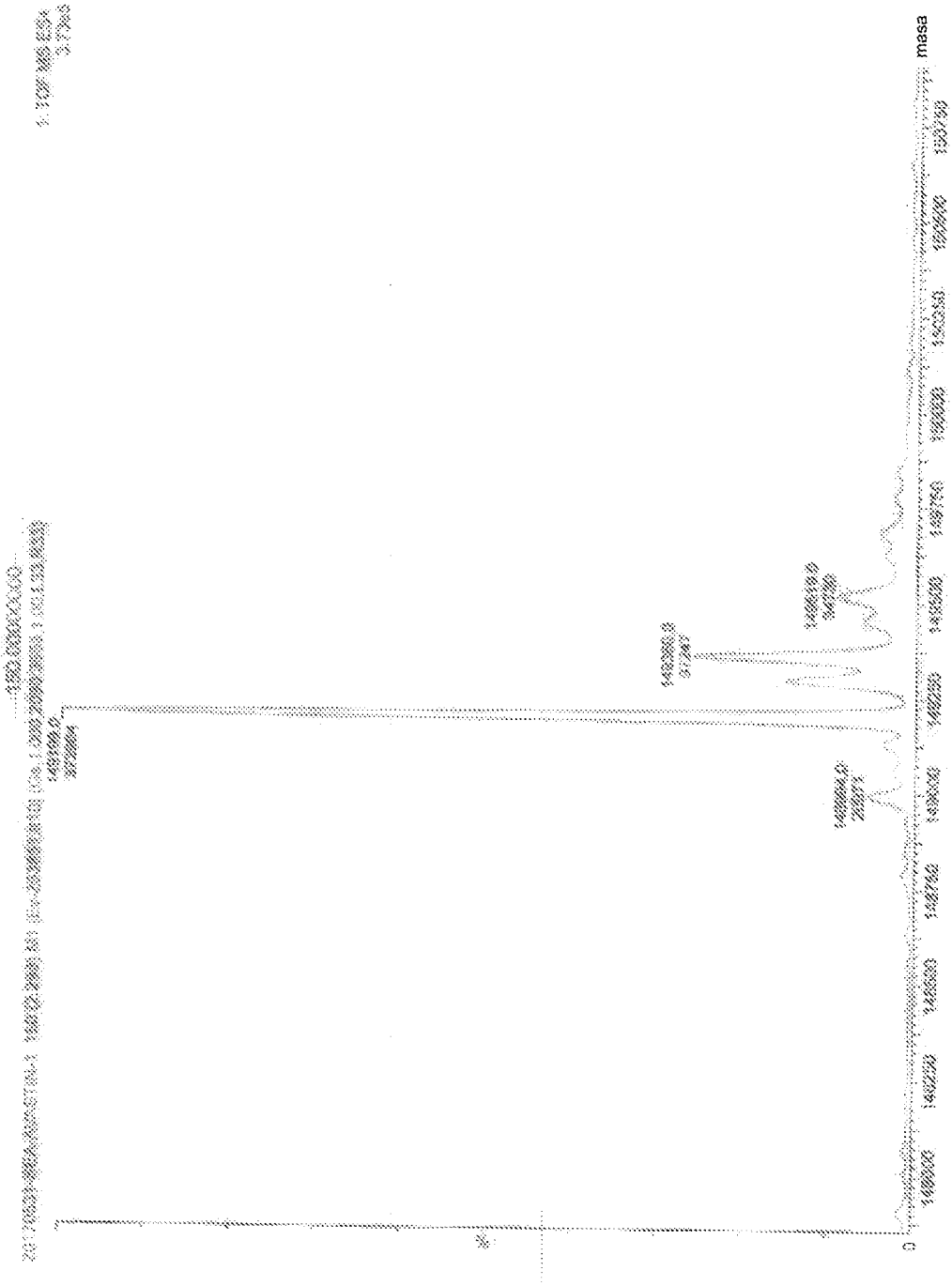


Fig. 70G

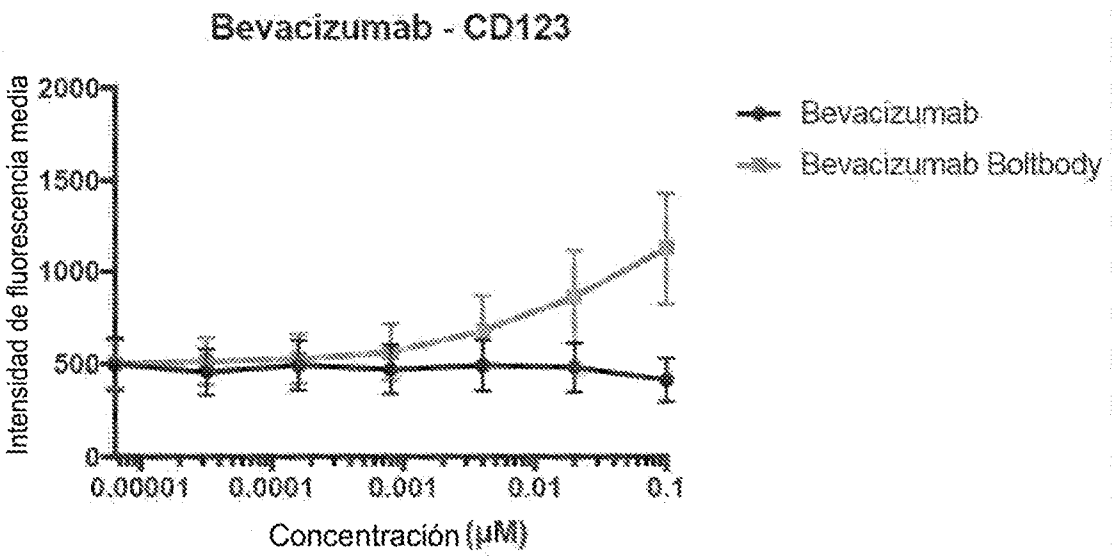


Fig. 70H

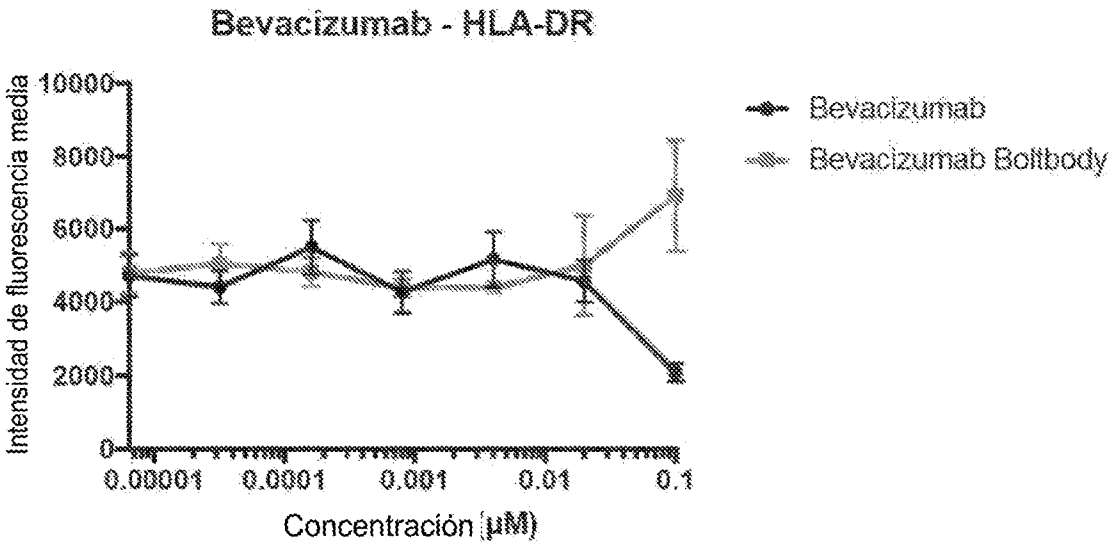


Fig. 70I

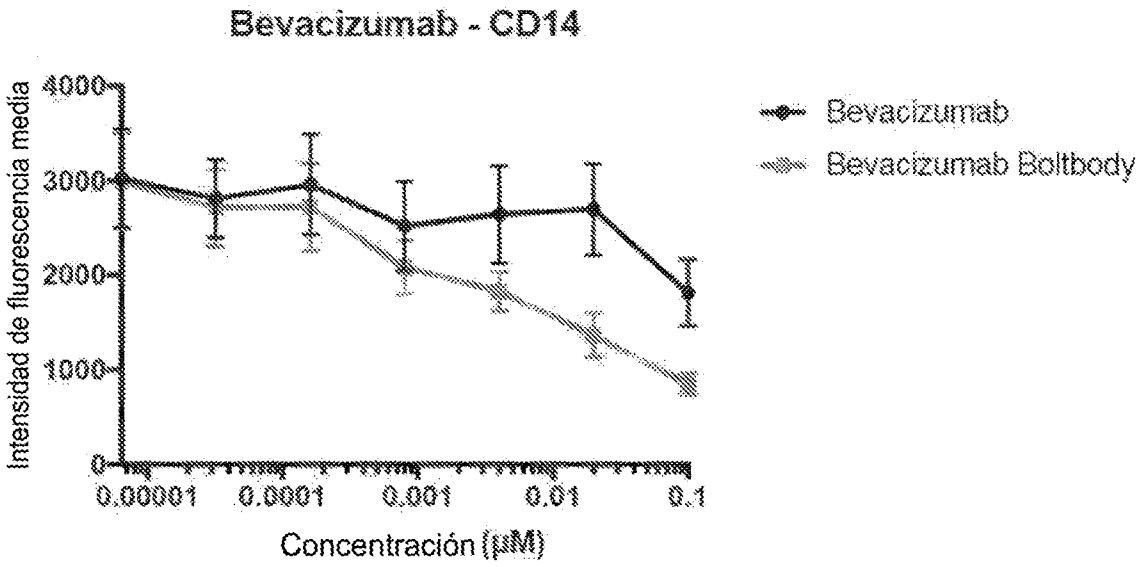


Fig. 70J

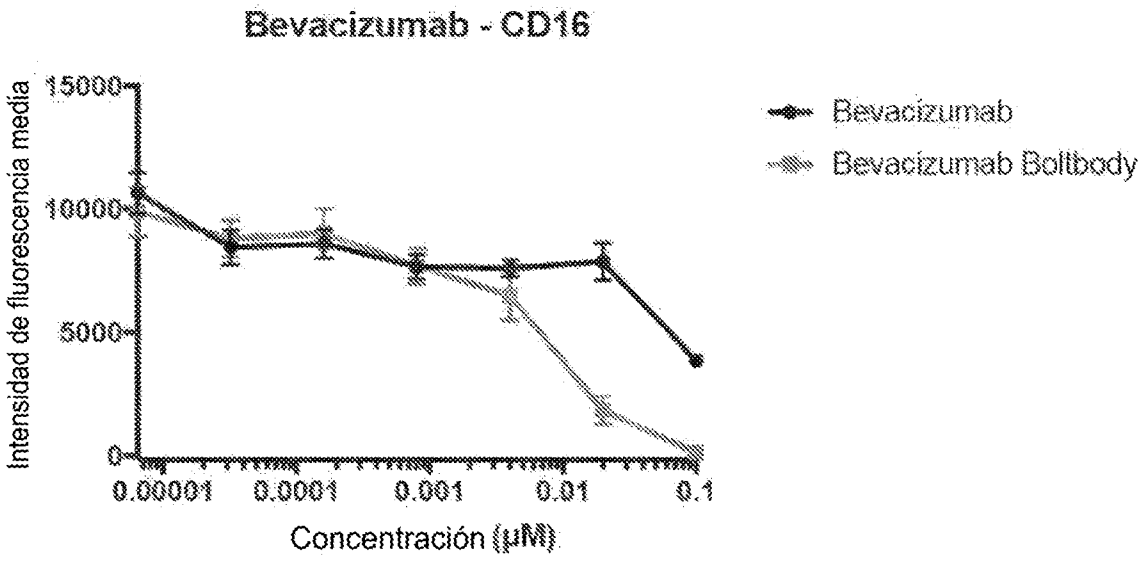


Fig. 70K

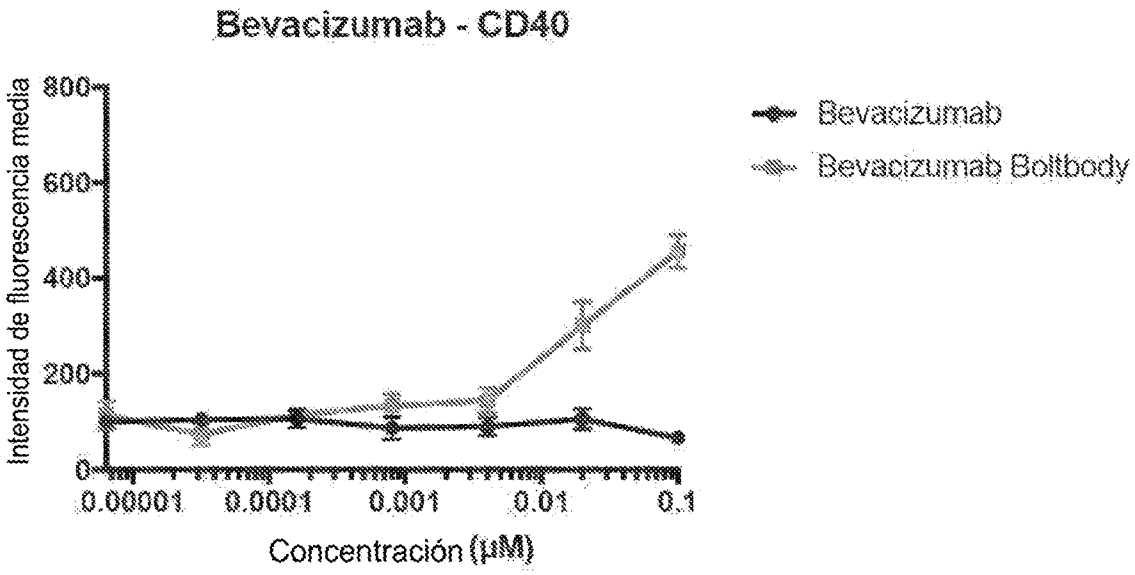


Fig. 70L

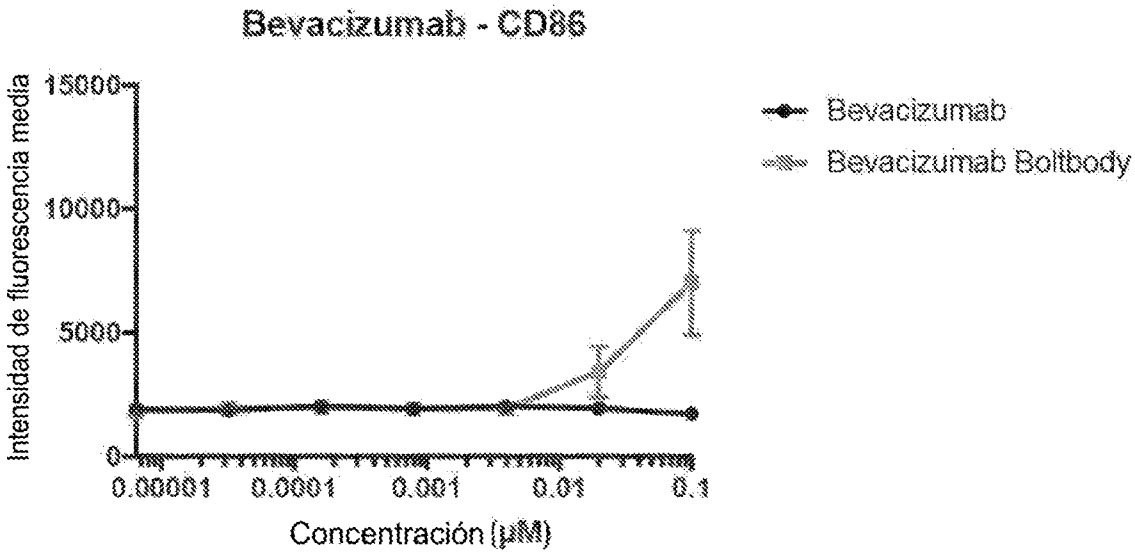


Fig. 70M

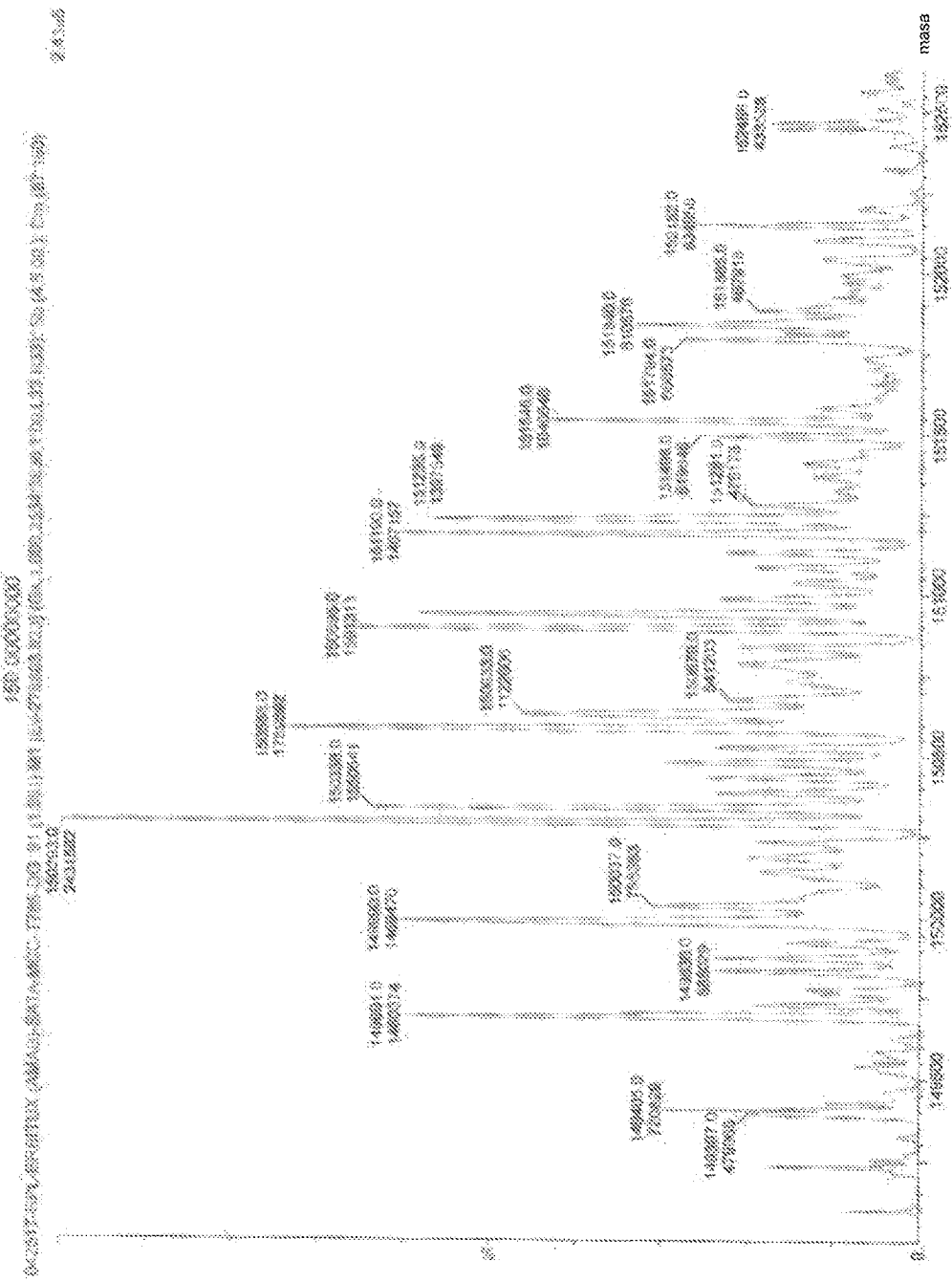


Fig. 71A

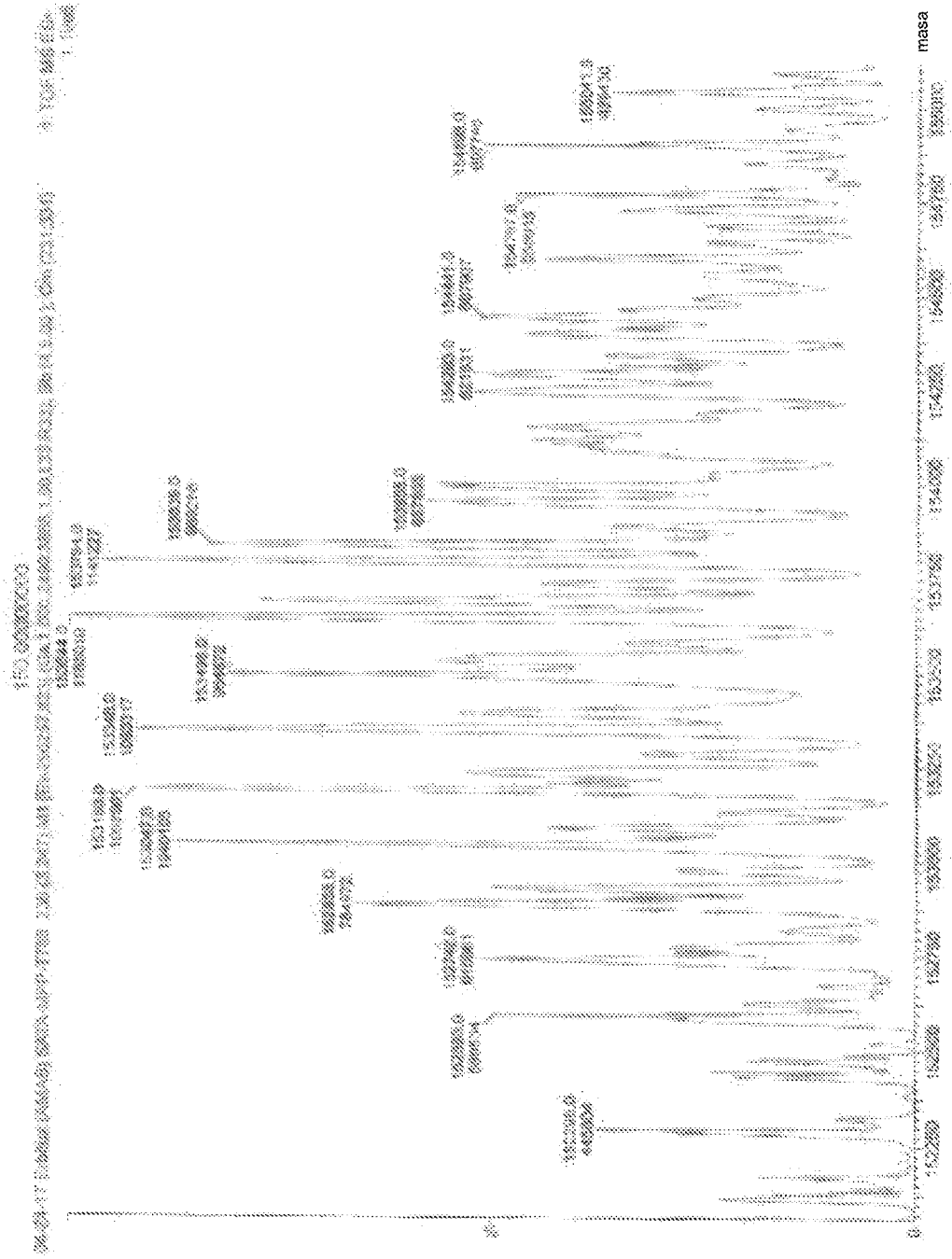


Fig. 71B

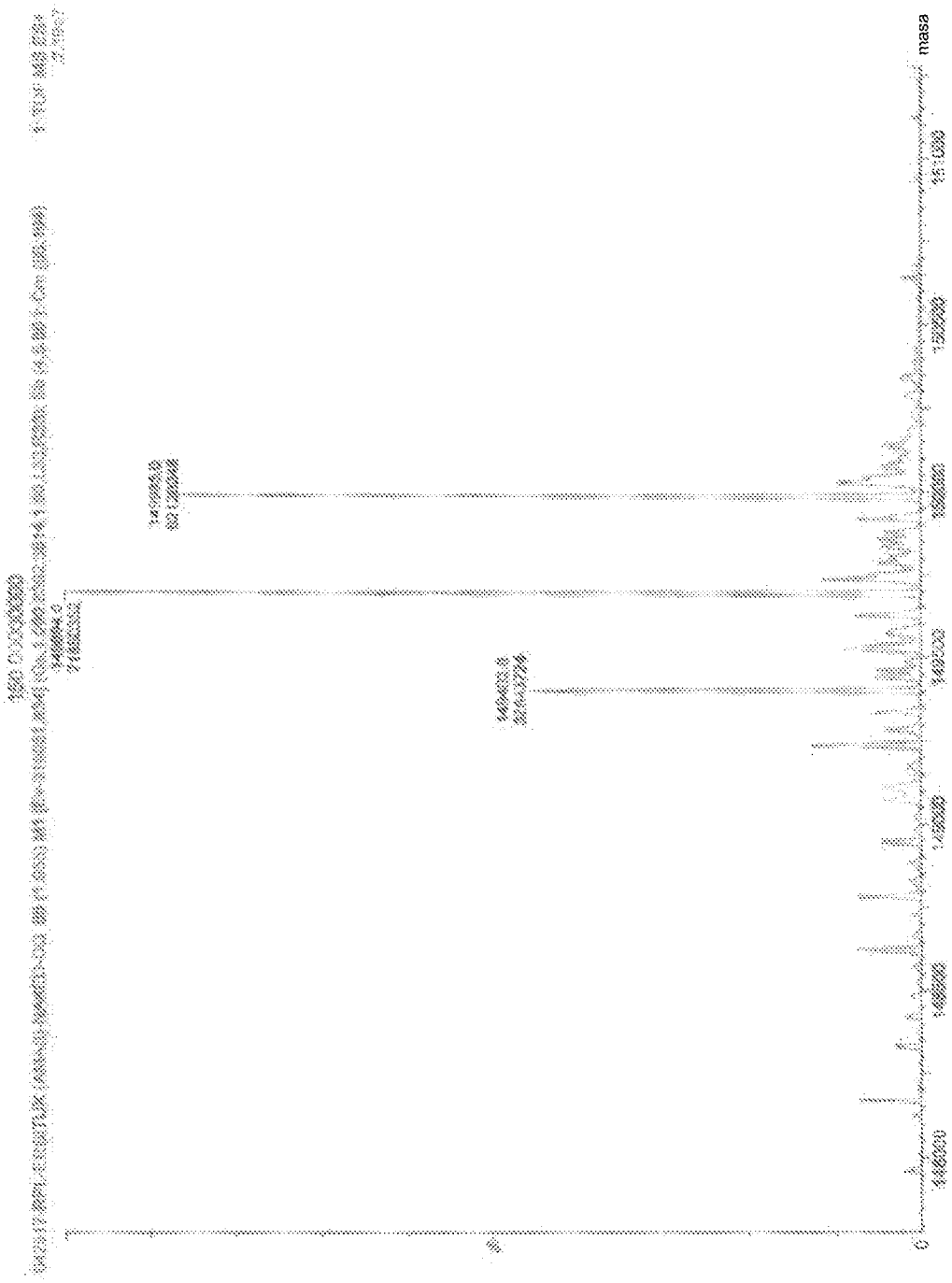


Fig. 71C

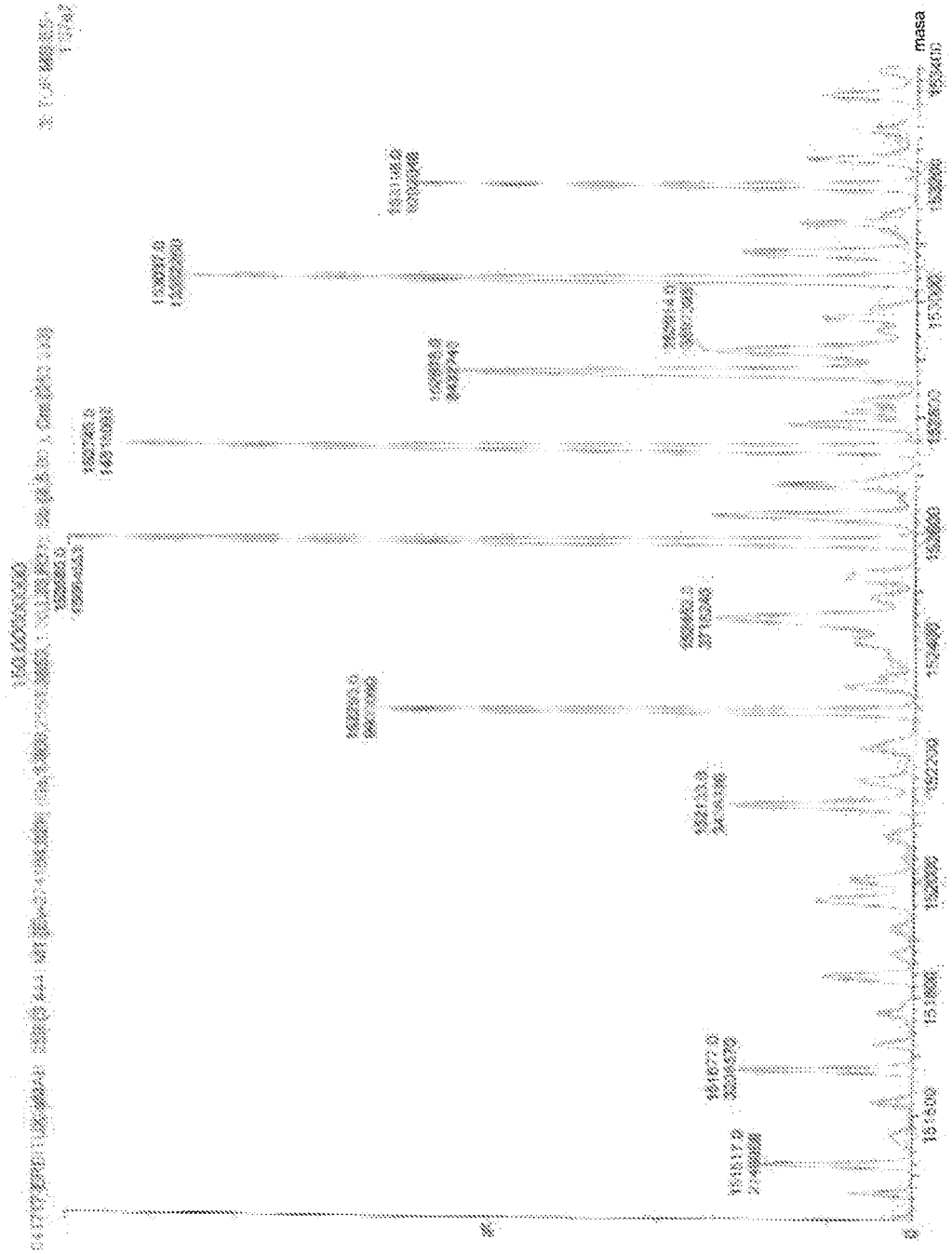


Fig. 71D

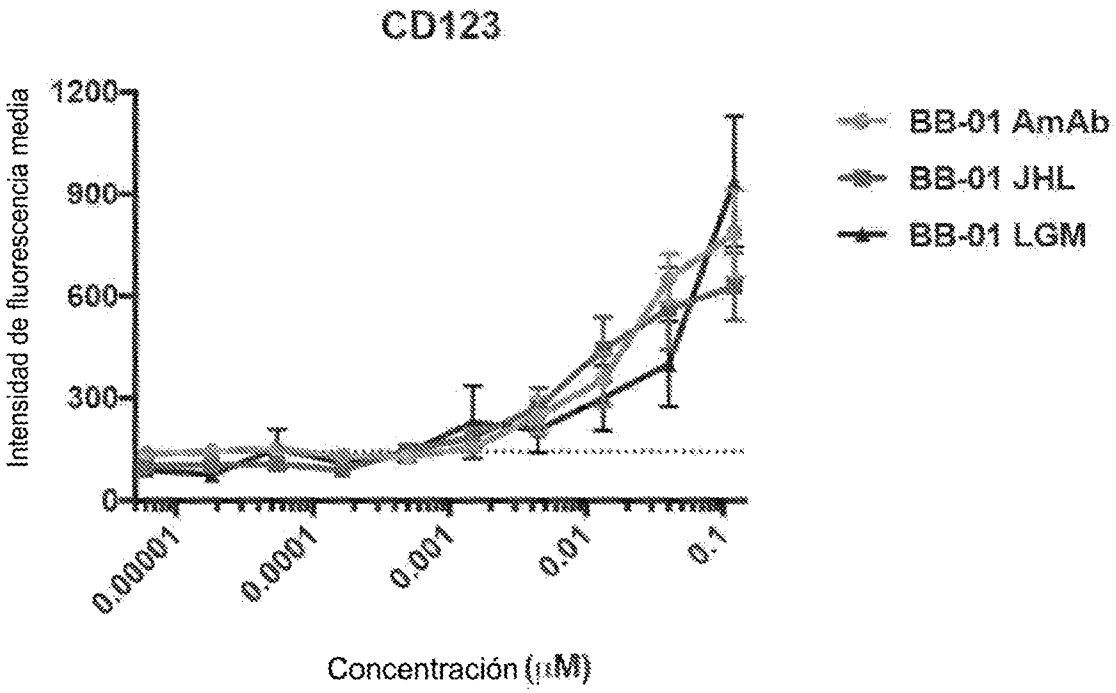


Fig. 71E

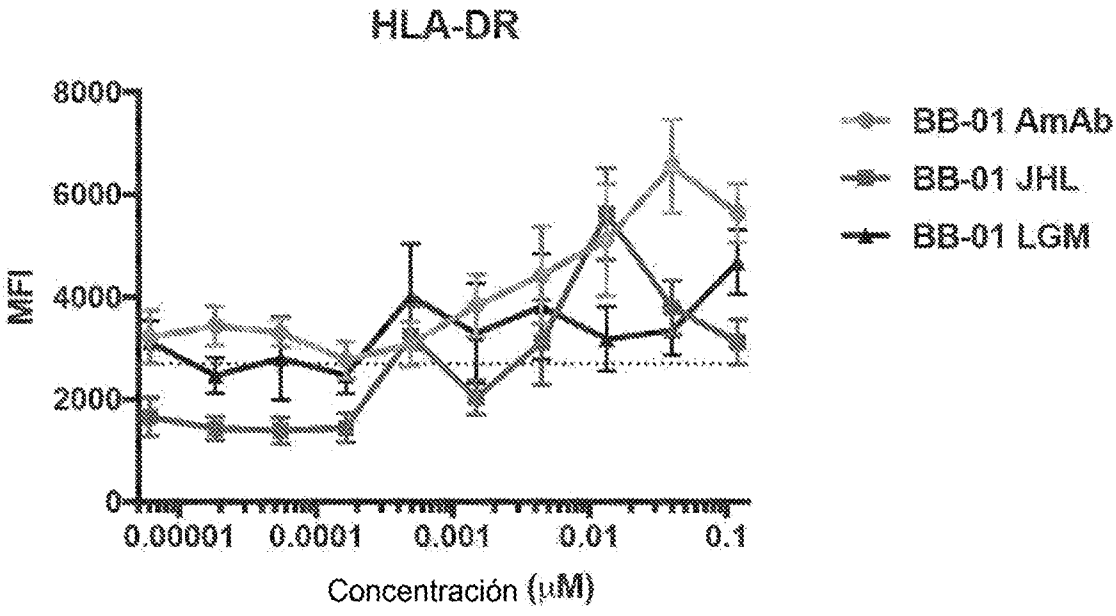


Fig. 71F

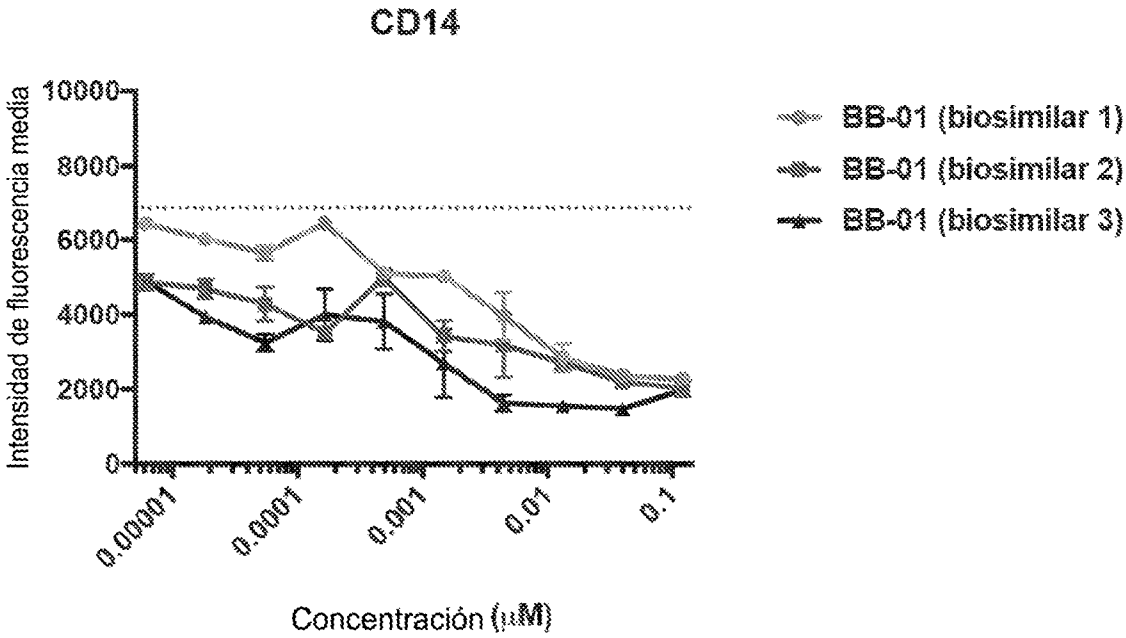


Fig. 71G

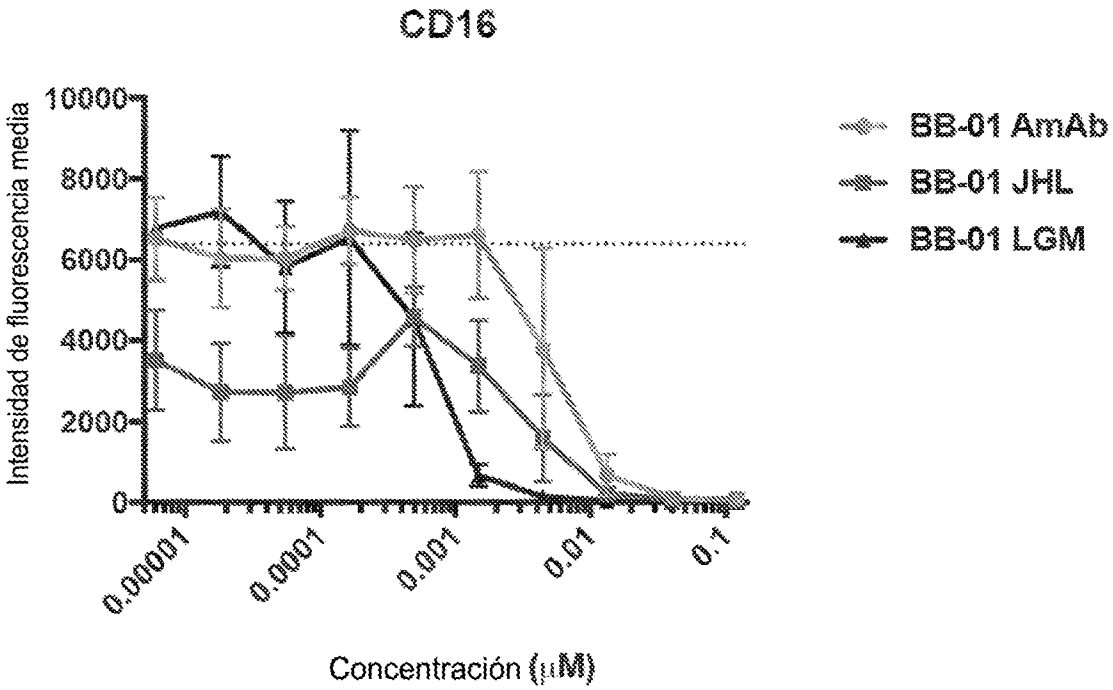


Fig. 71H

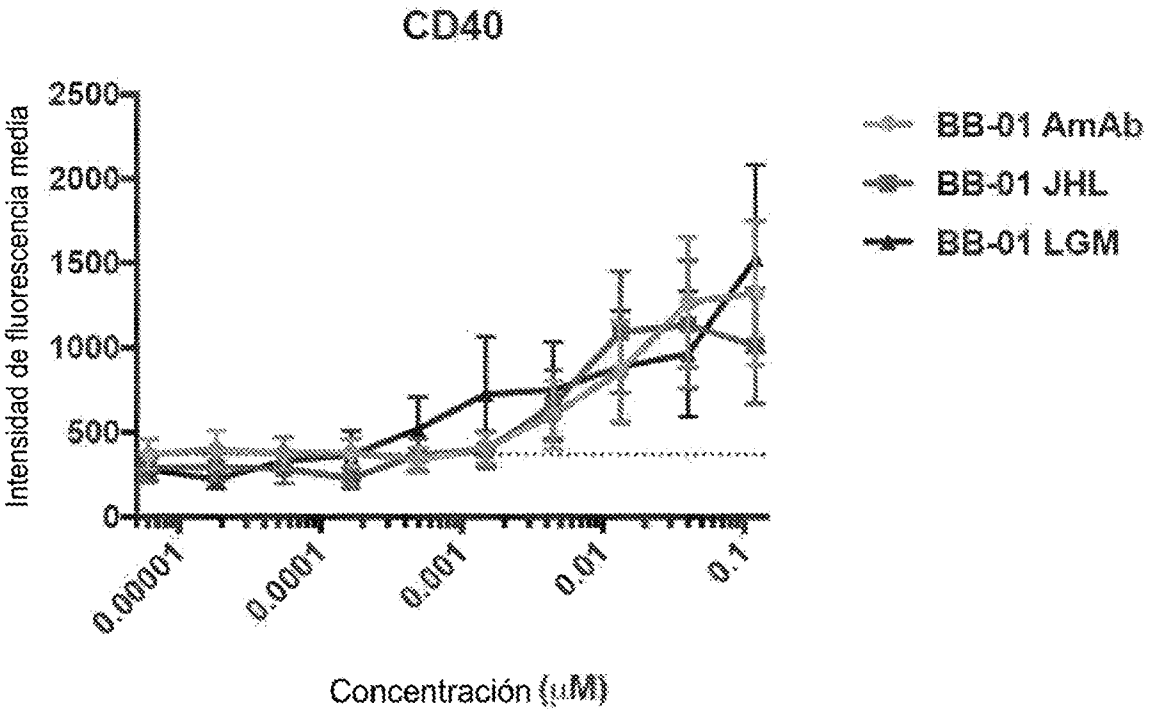


Fig. 71I

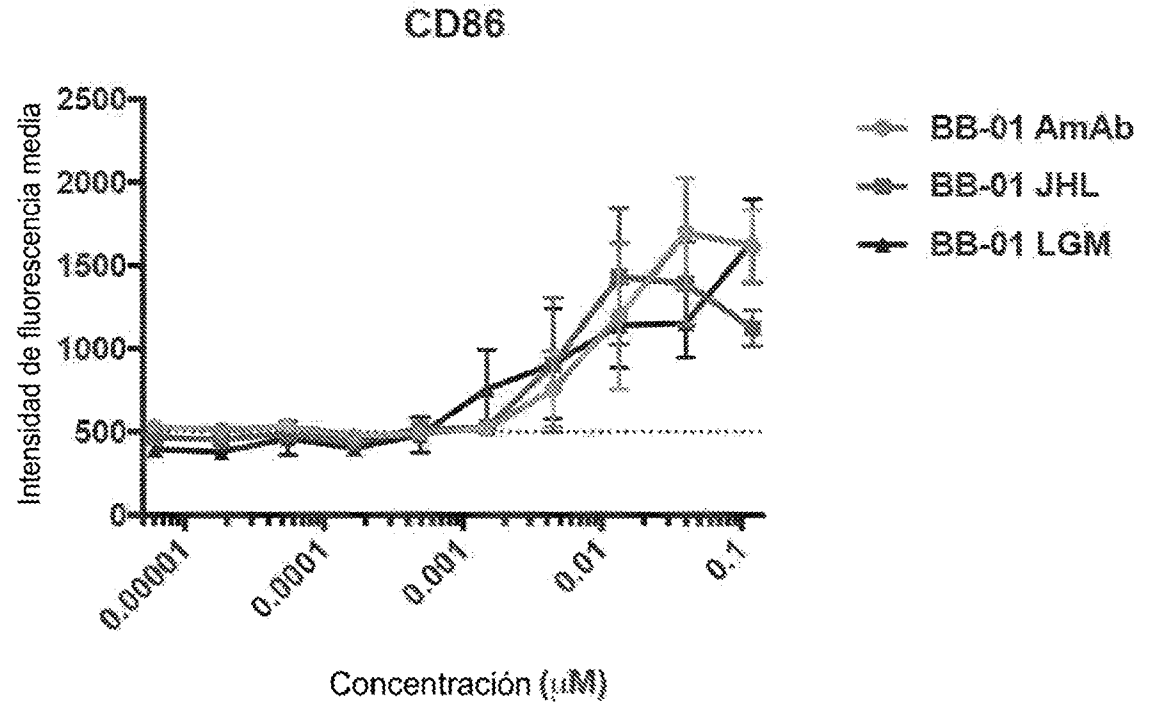


Fig. 71J

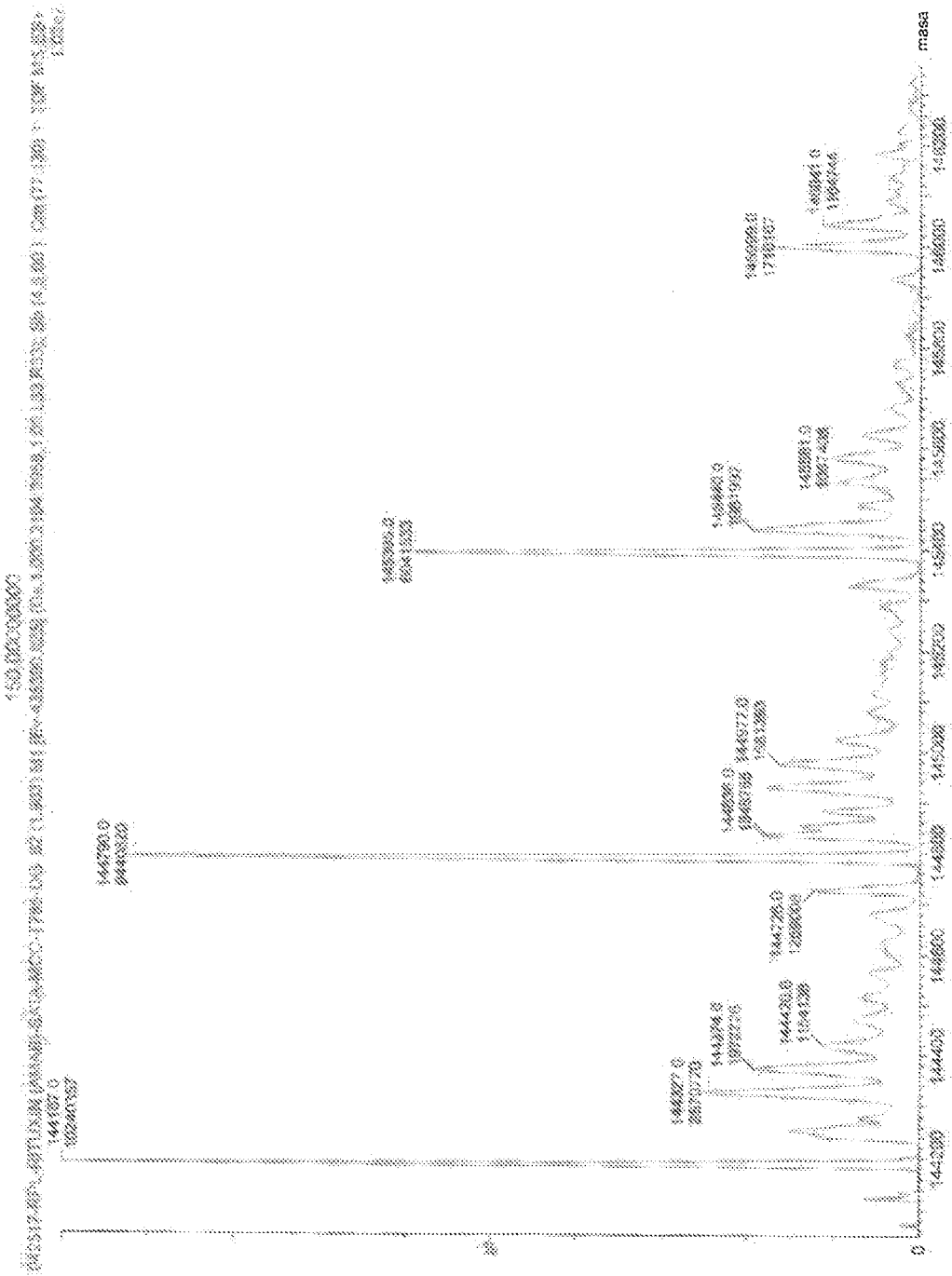


Fig. 71K

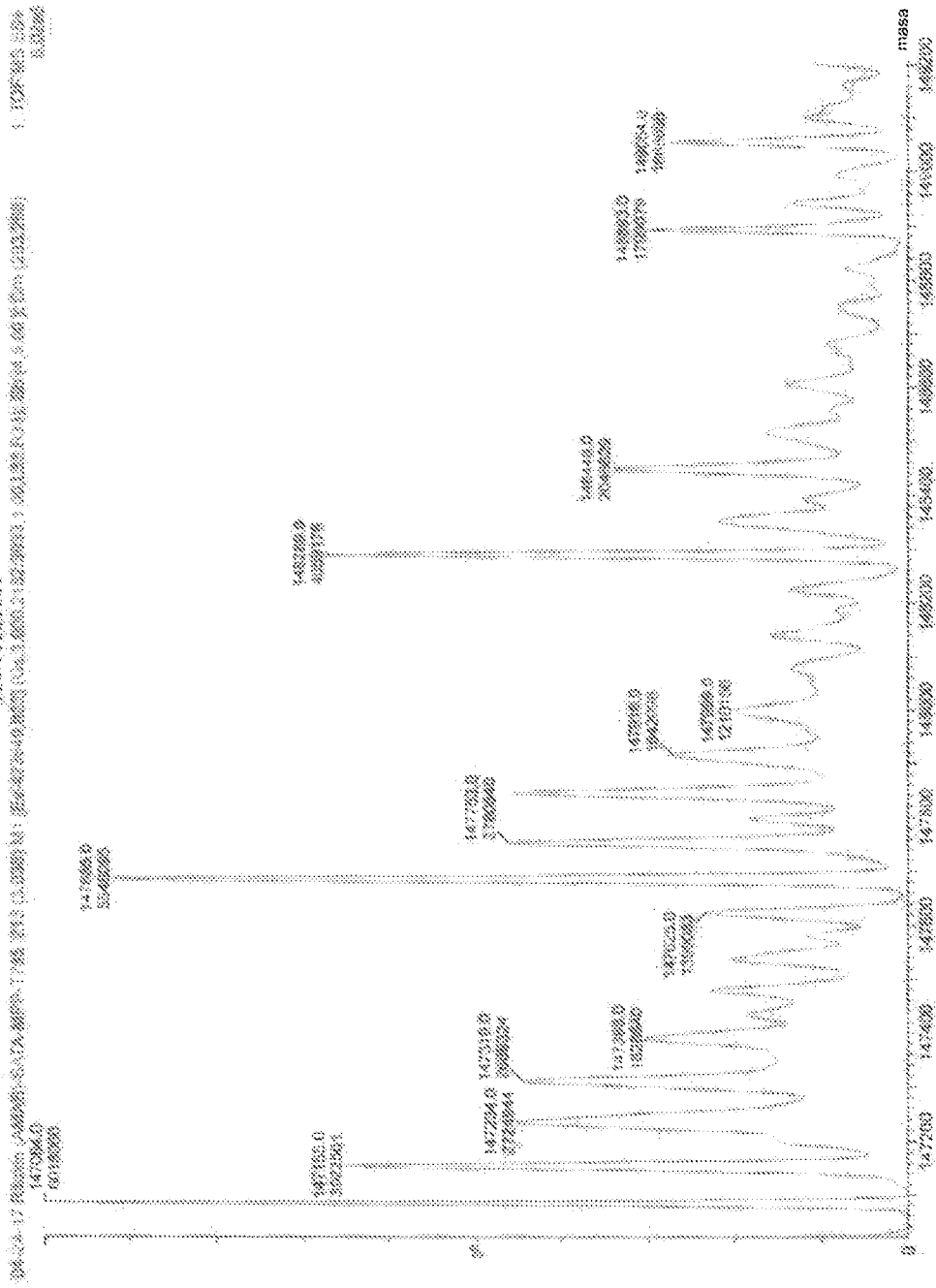


Fig. 71L

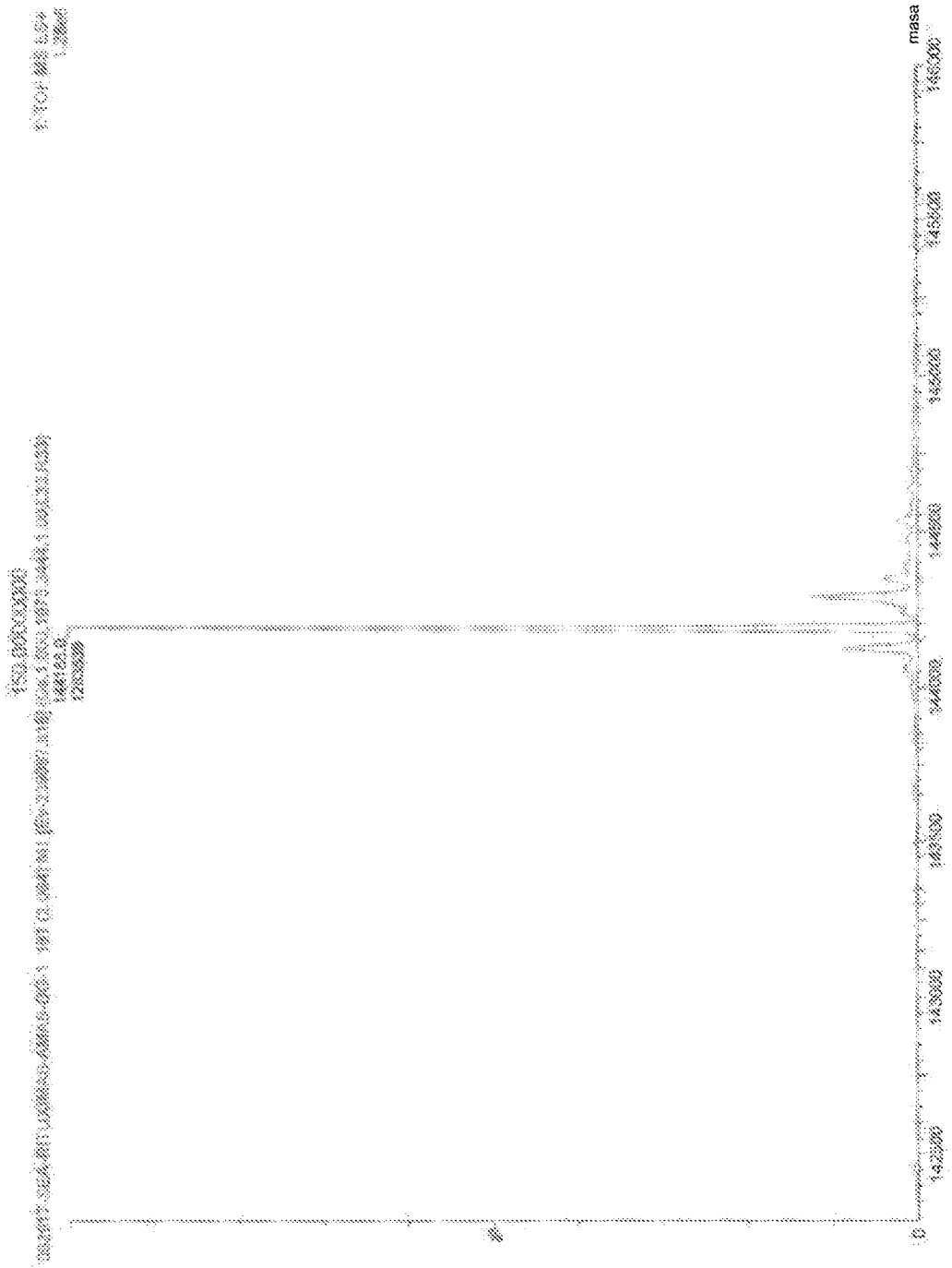


Fig. 71M

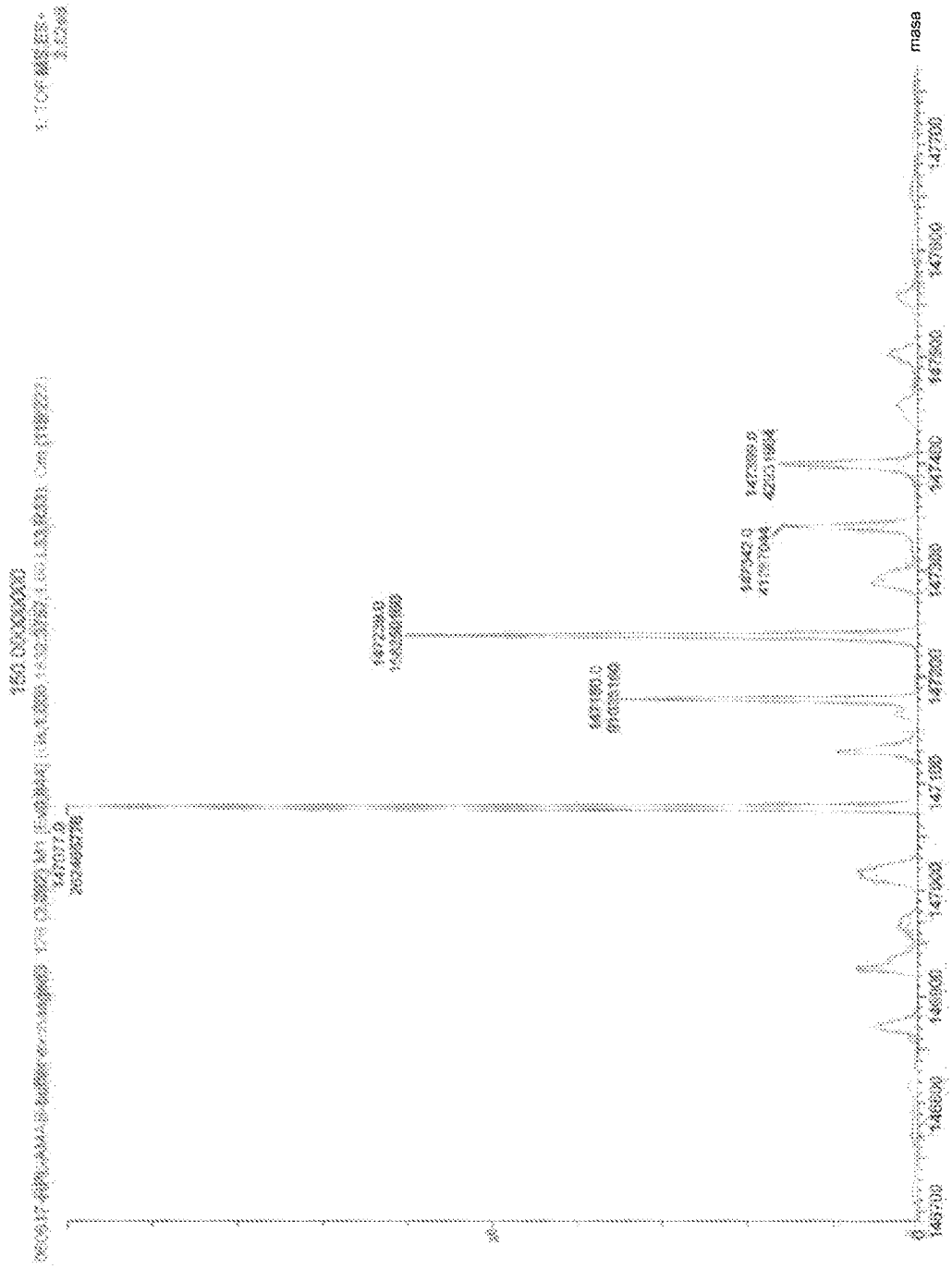


Fig. 71N

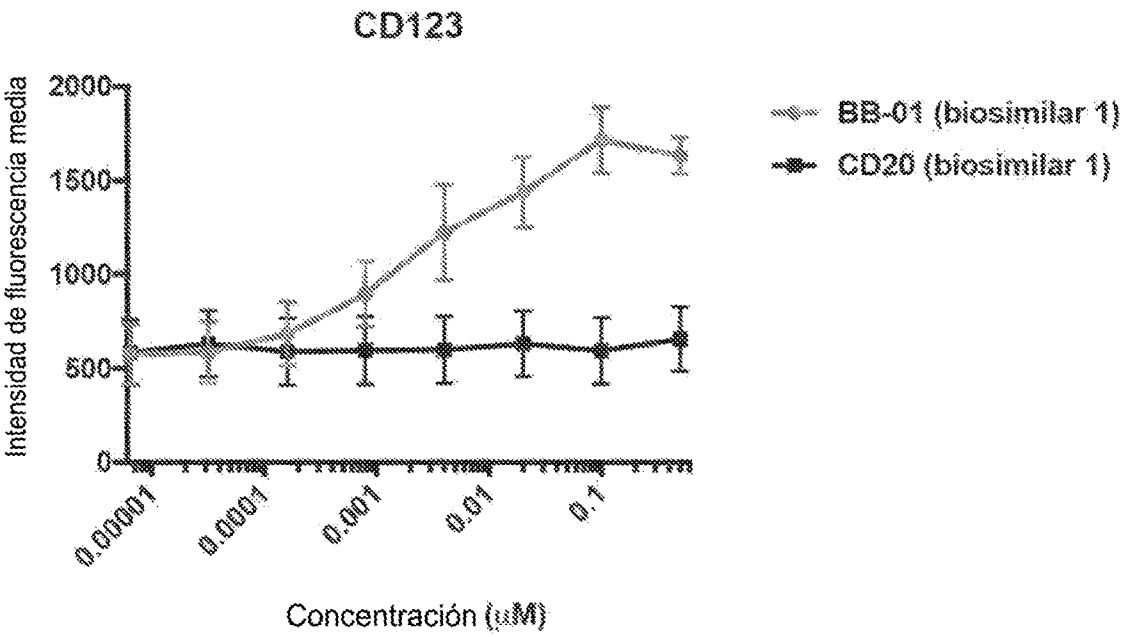


Fig. 71O

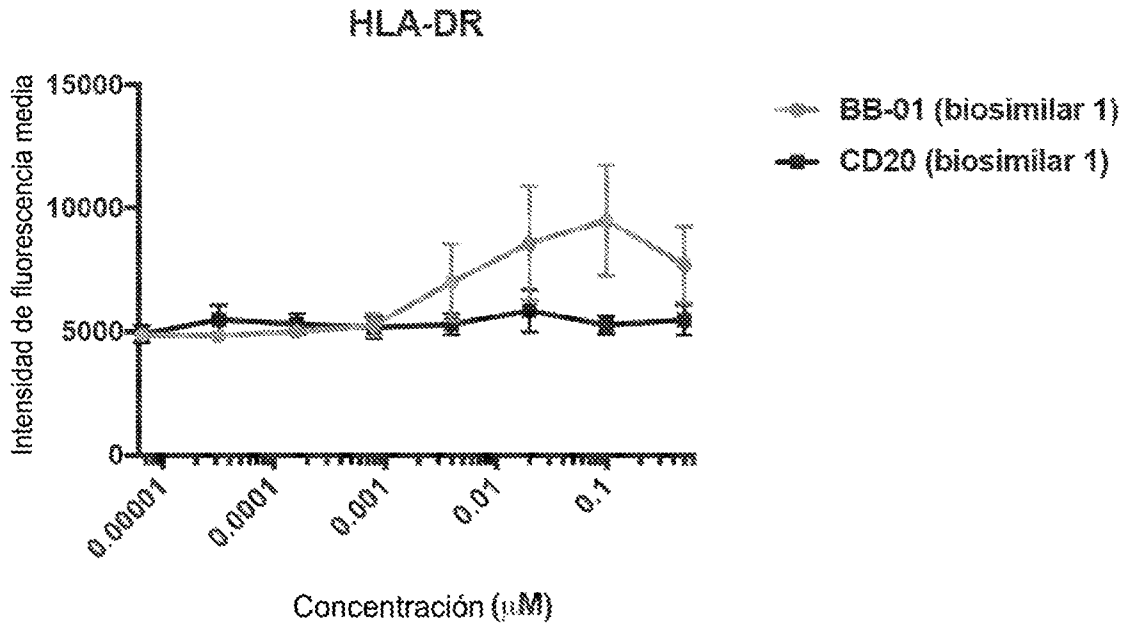


Fig. 71P

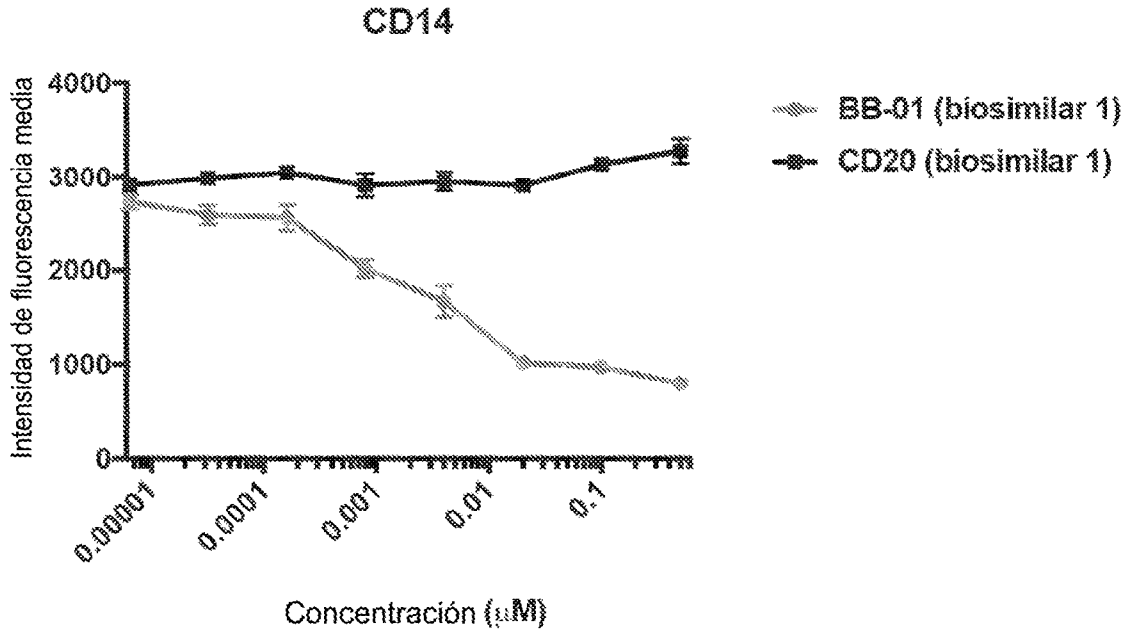


Fig. 71Q

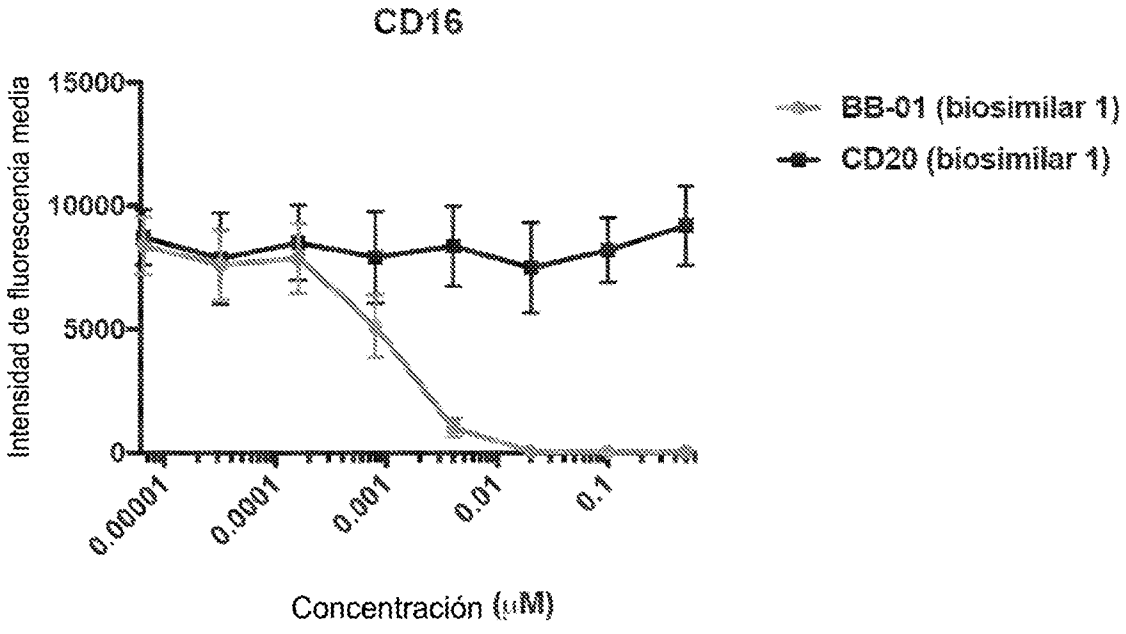


Fig. 71R

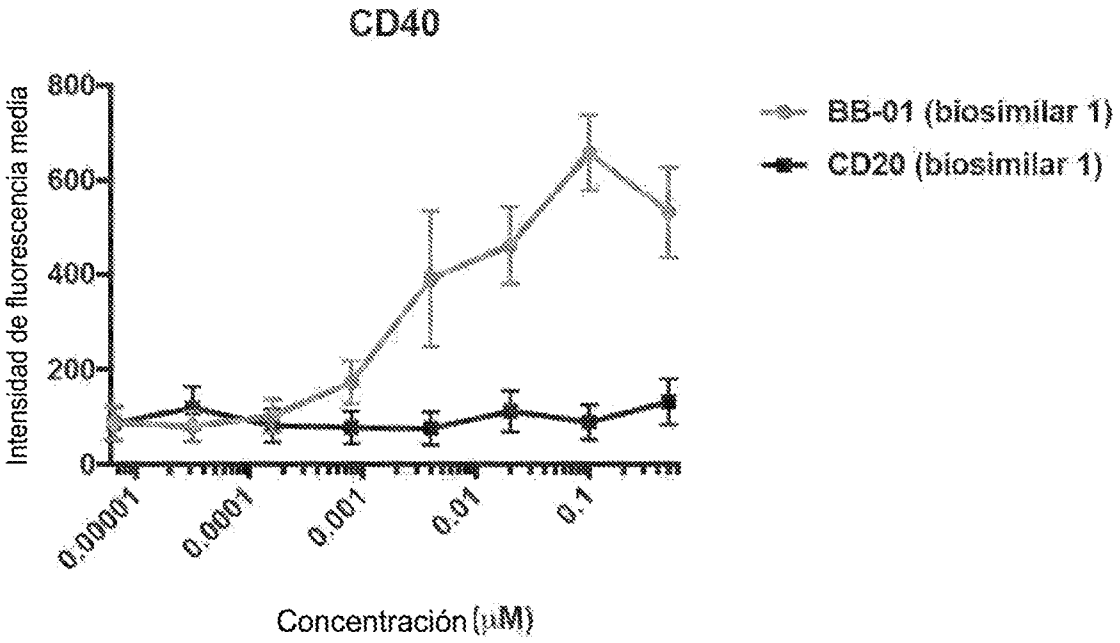


Fig. 71S

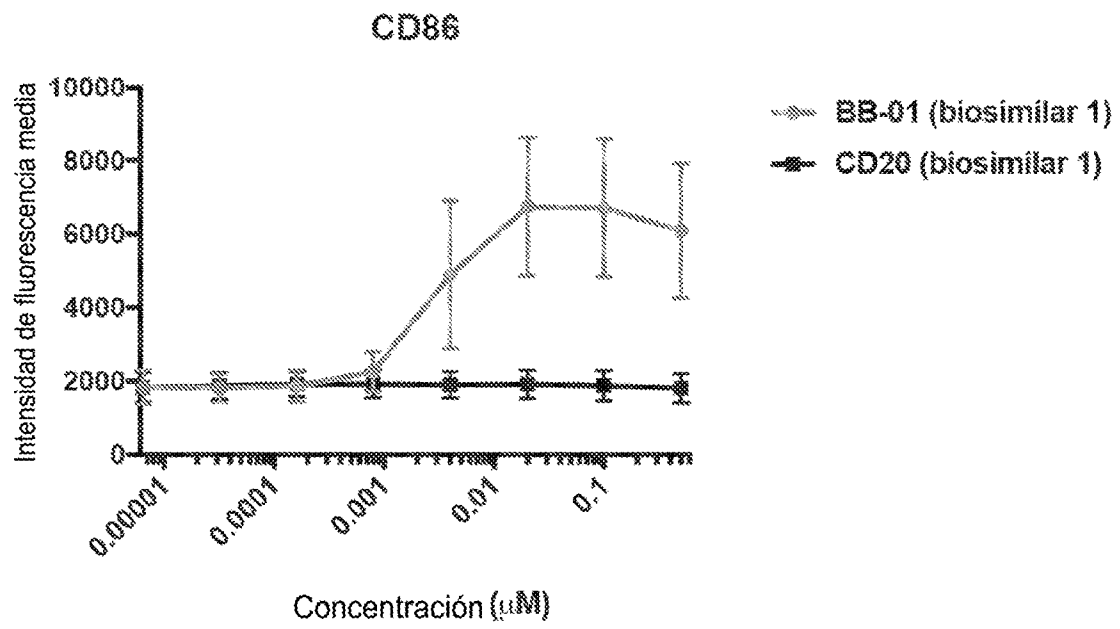


Fig. 71T

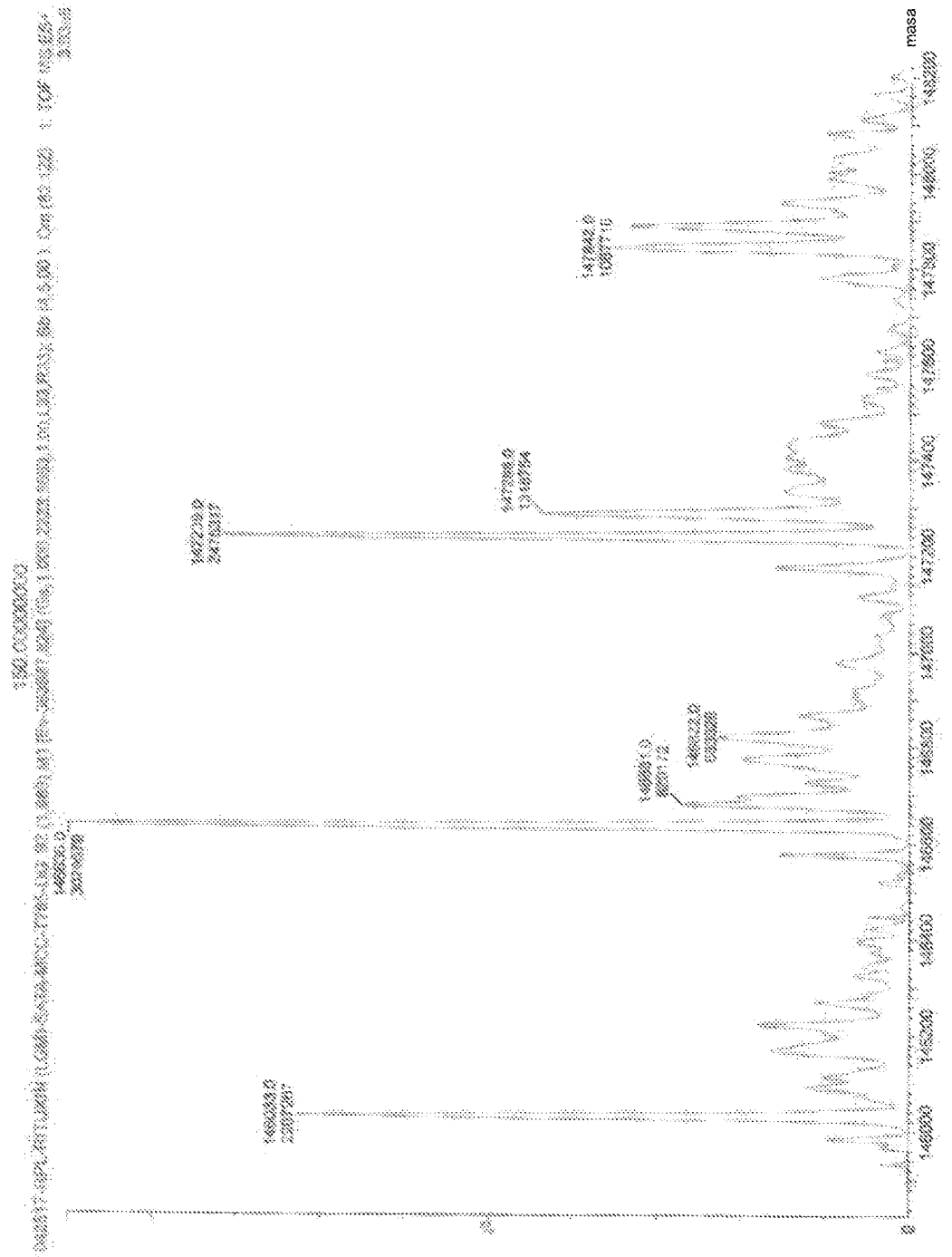


Fig. 71U

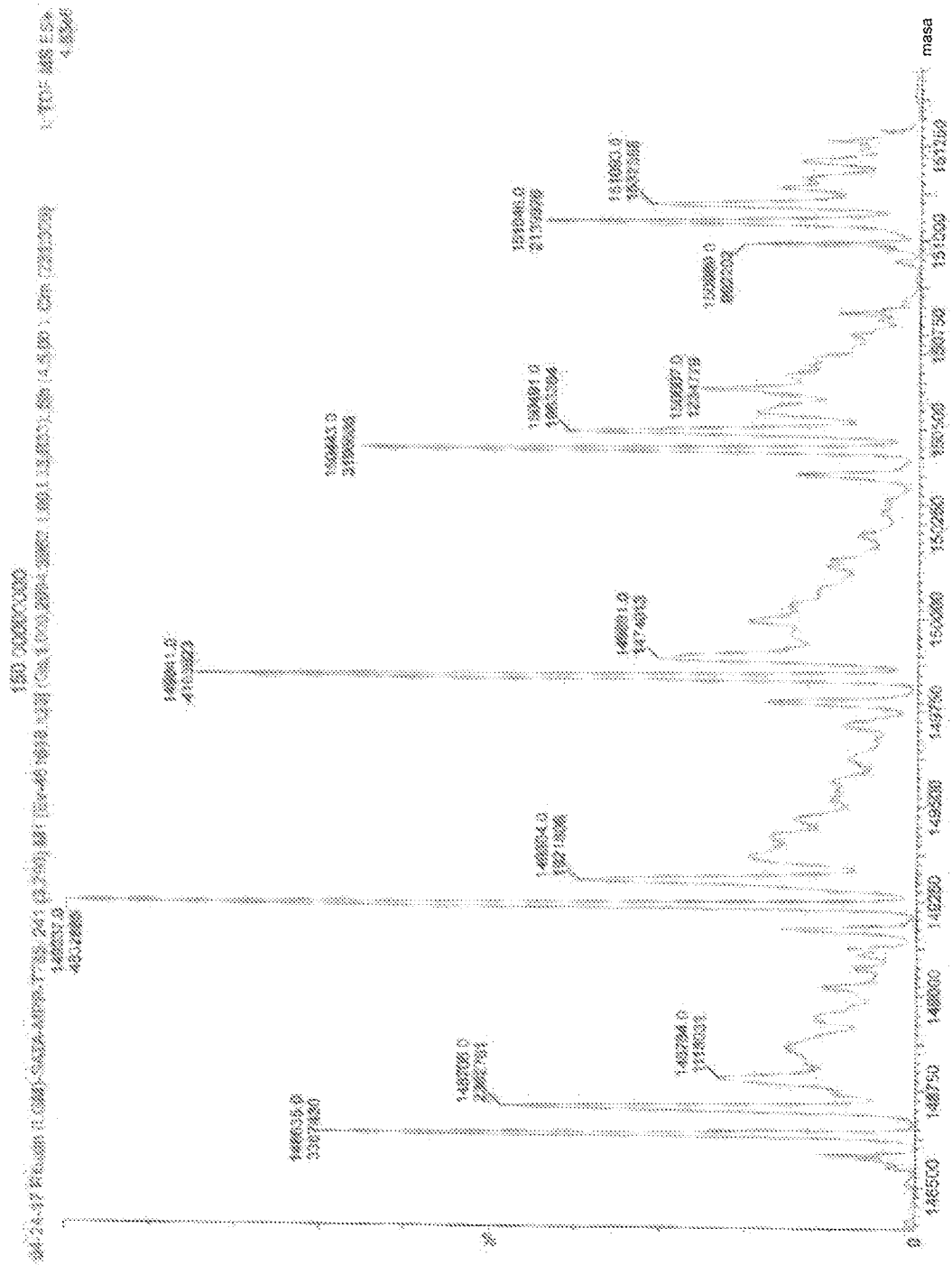


Fig. 71V

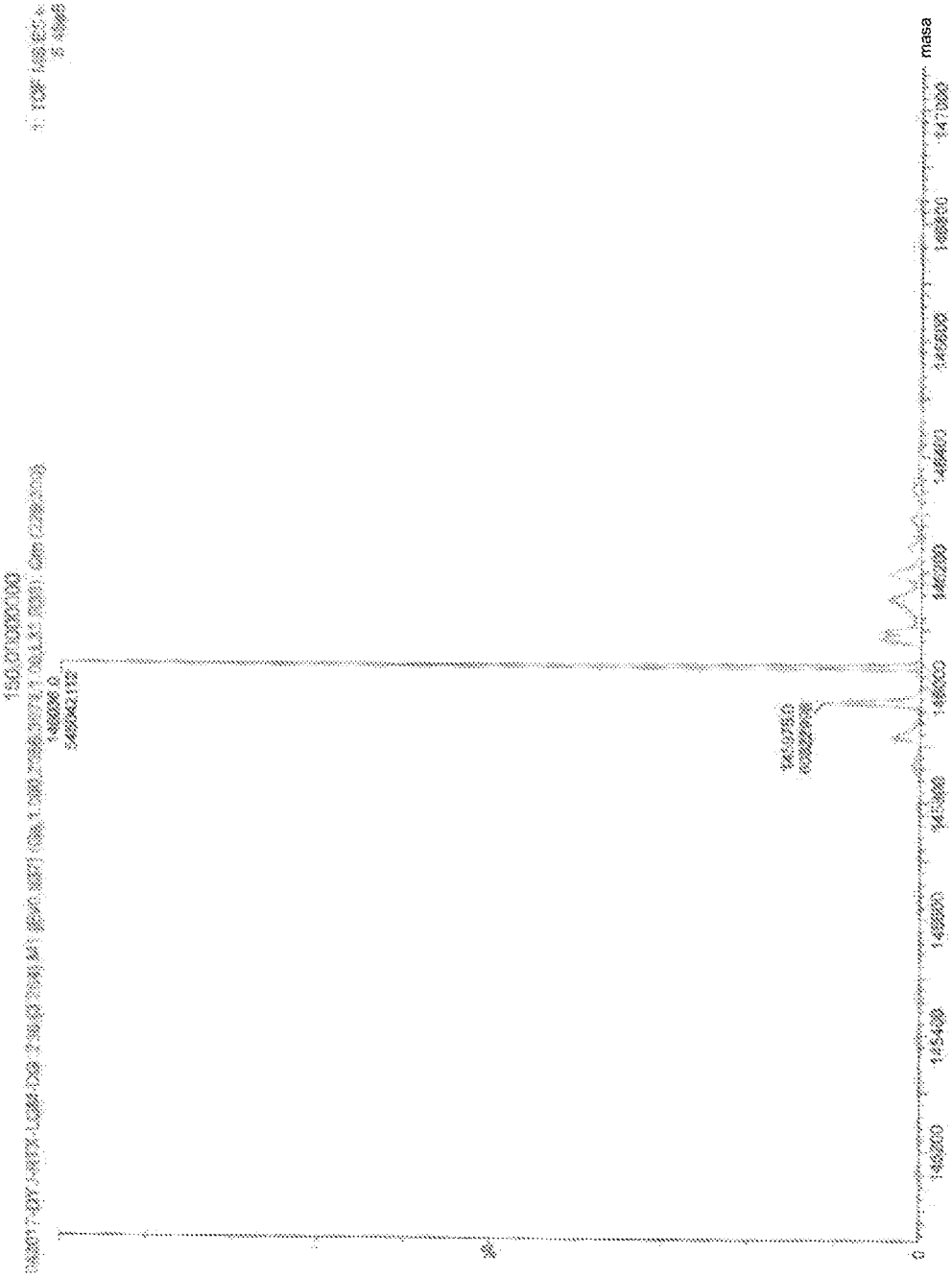


Fig. 71W

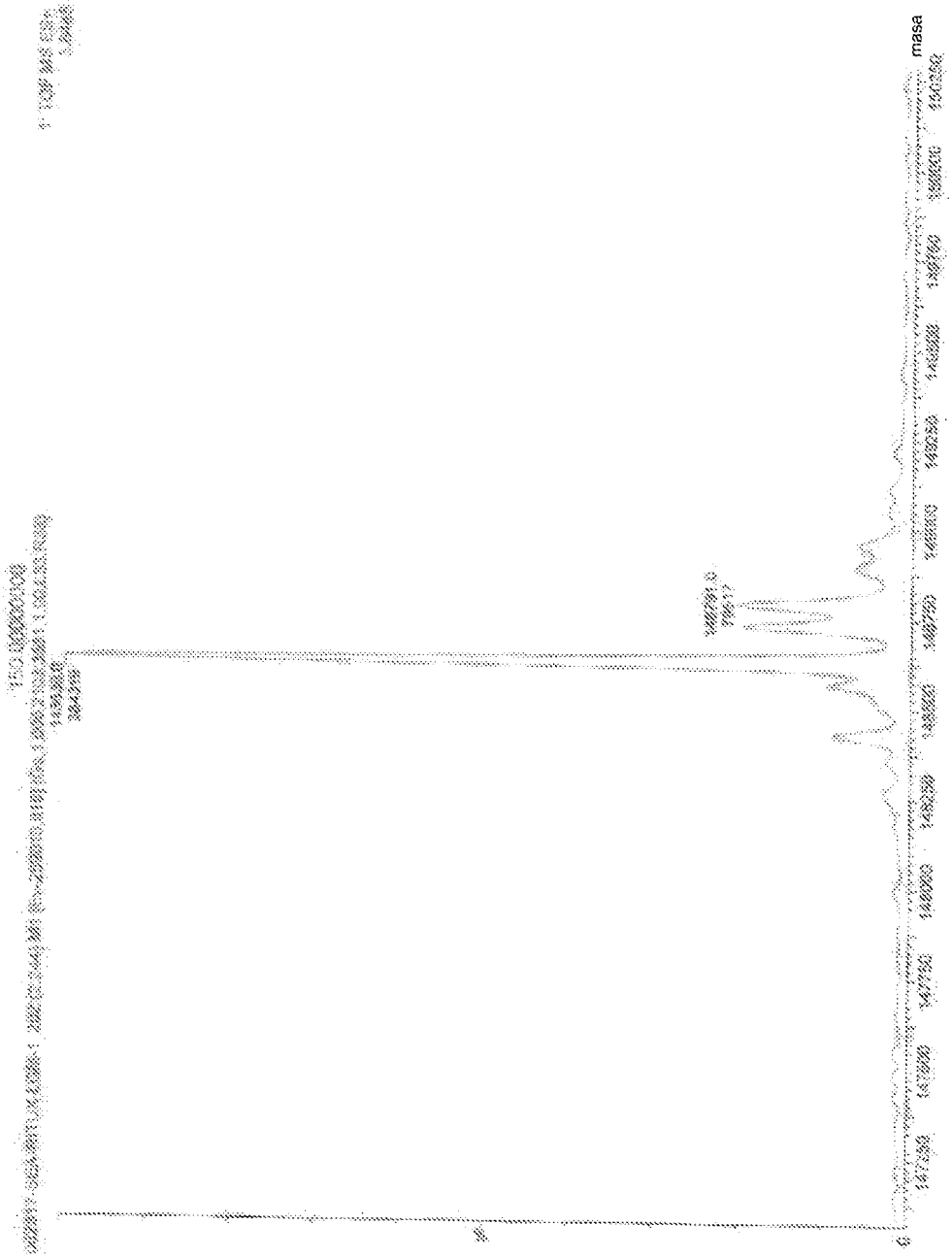


Fig. 71X

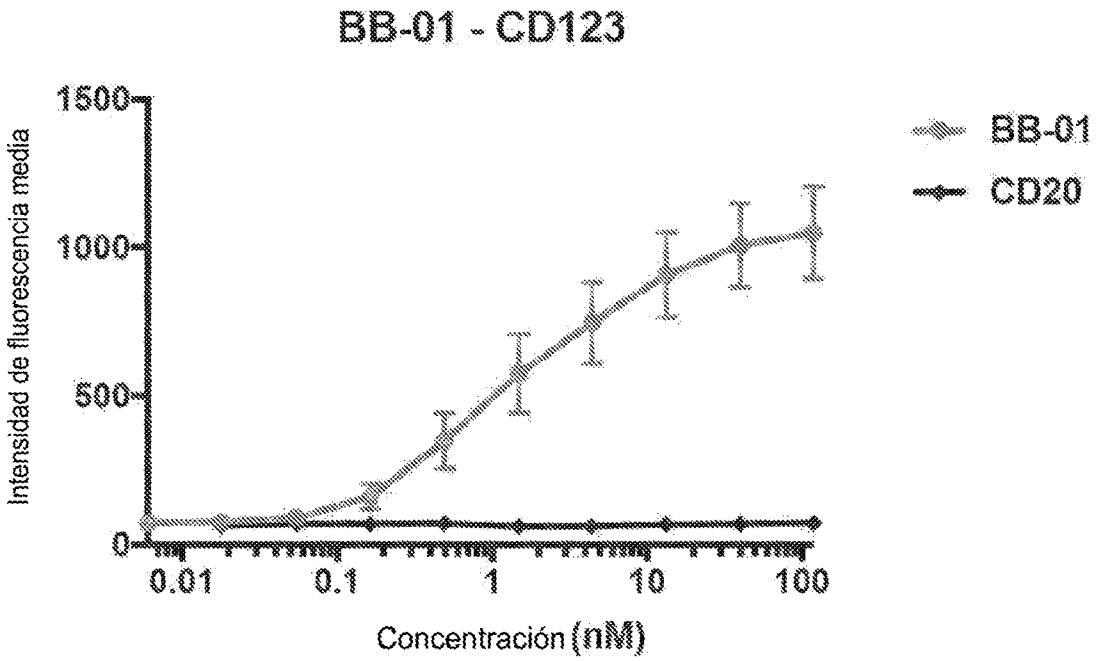


Fig. 71Y

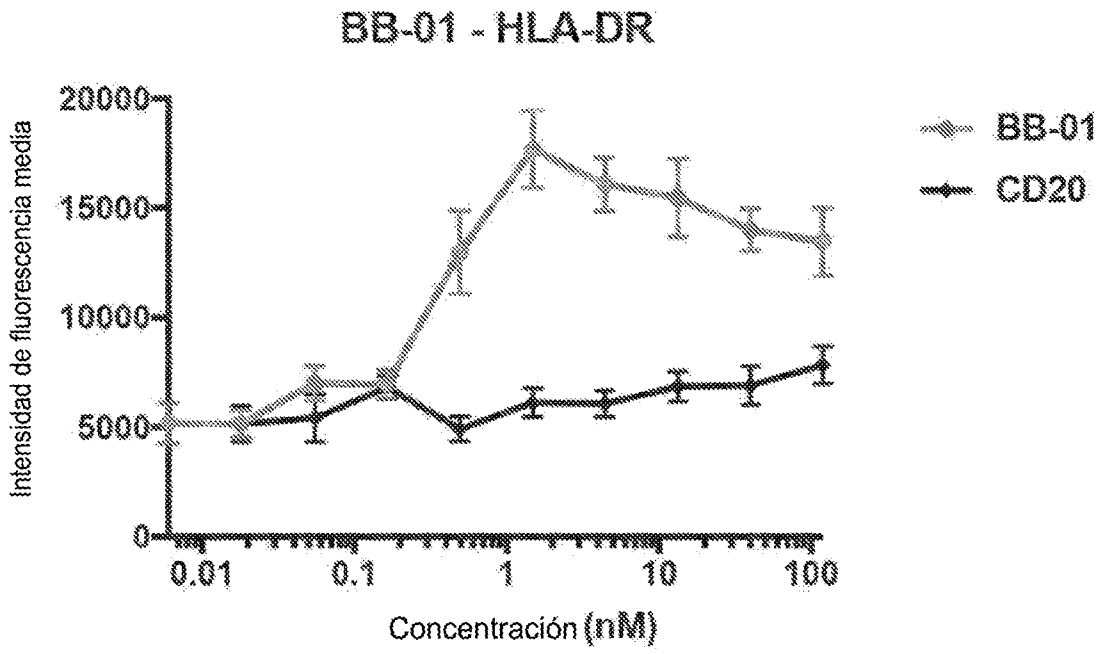


Fig. 71Z

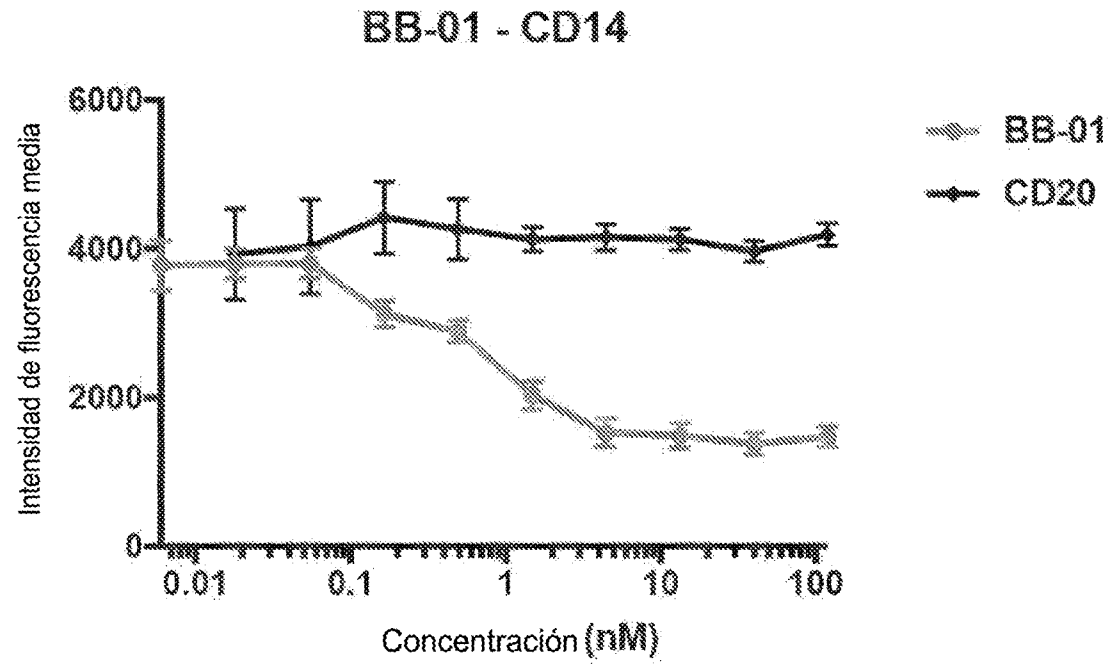


Fig. 71AA

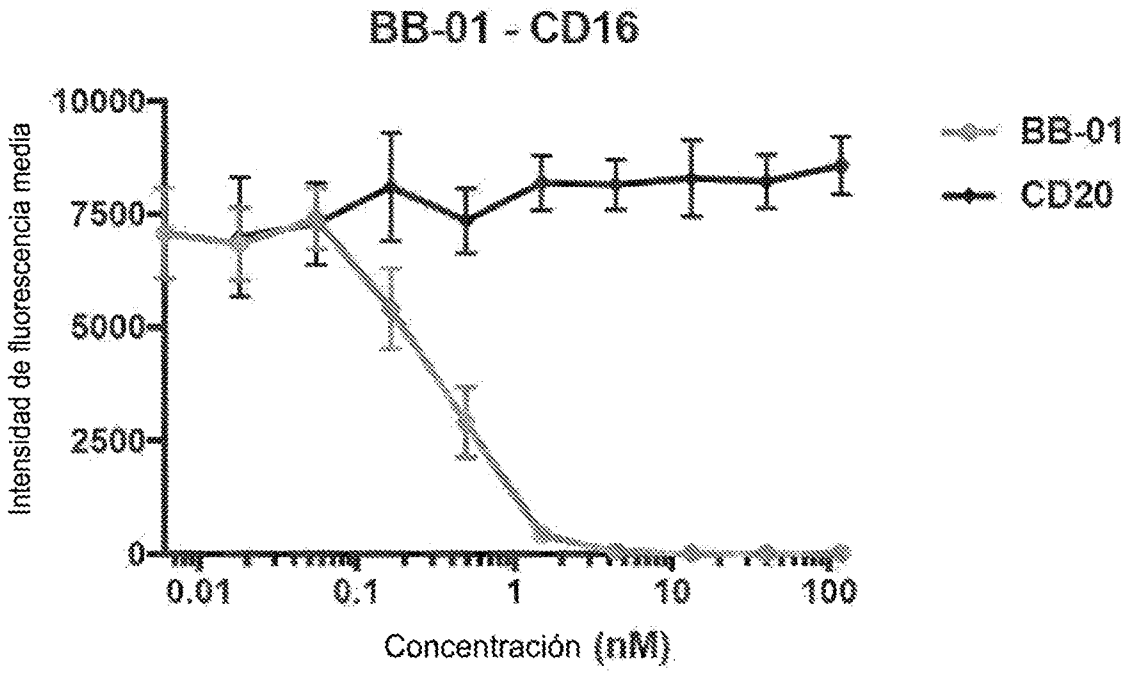


Fig. 71AB

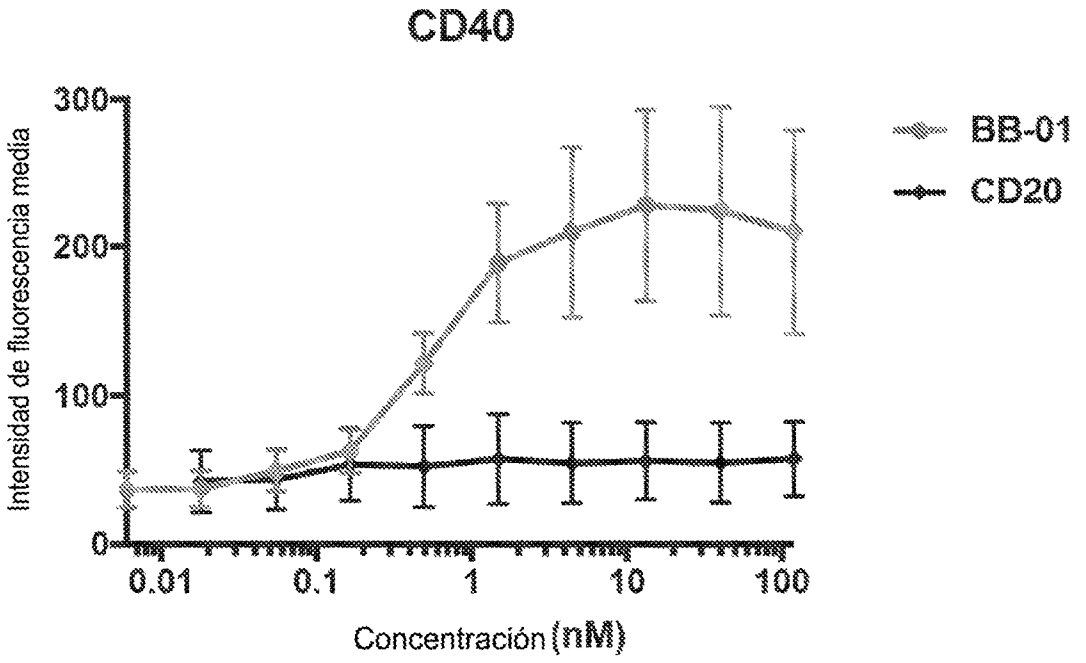


Fig. 71AC

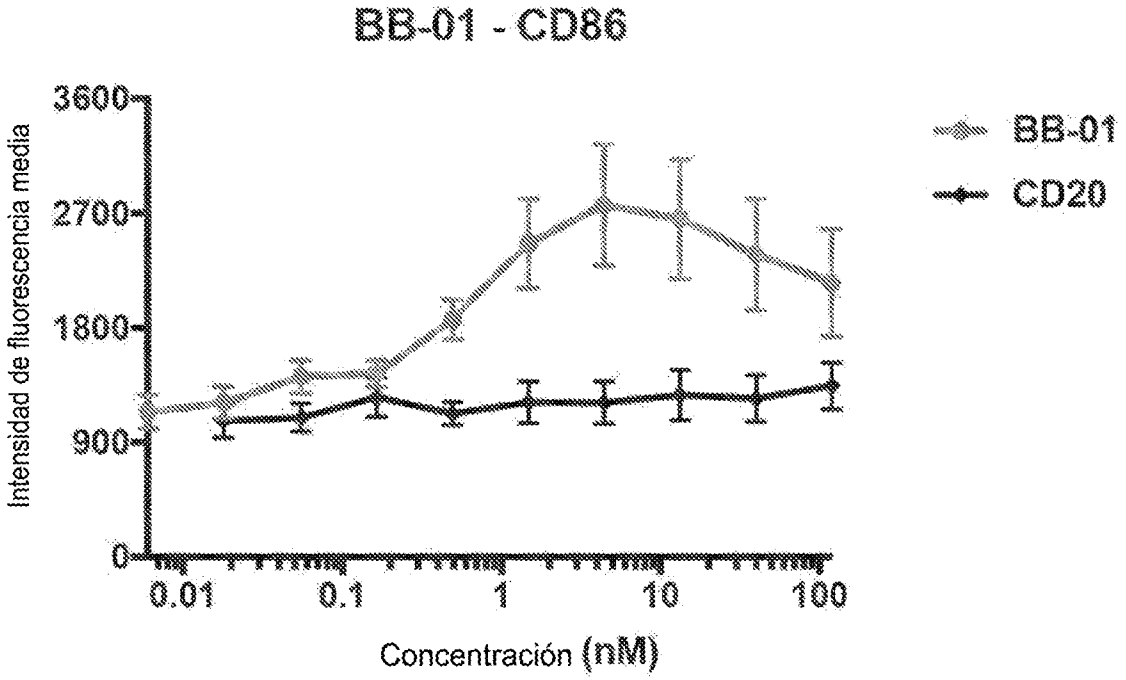


Fig. 71AD

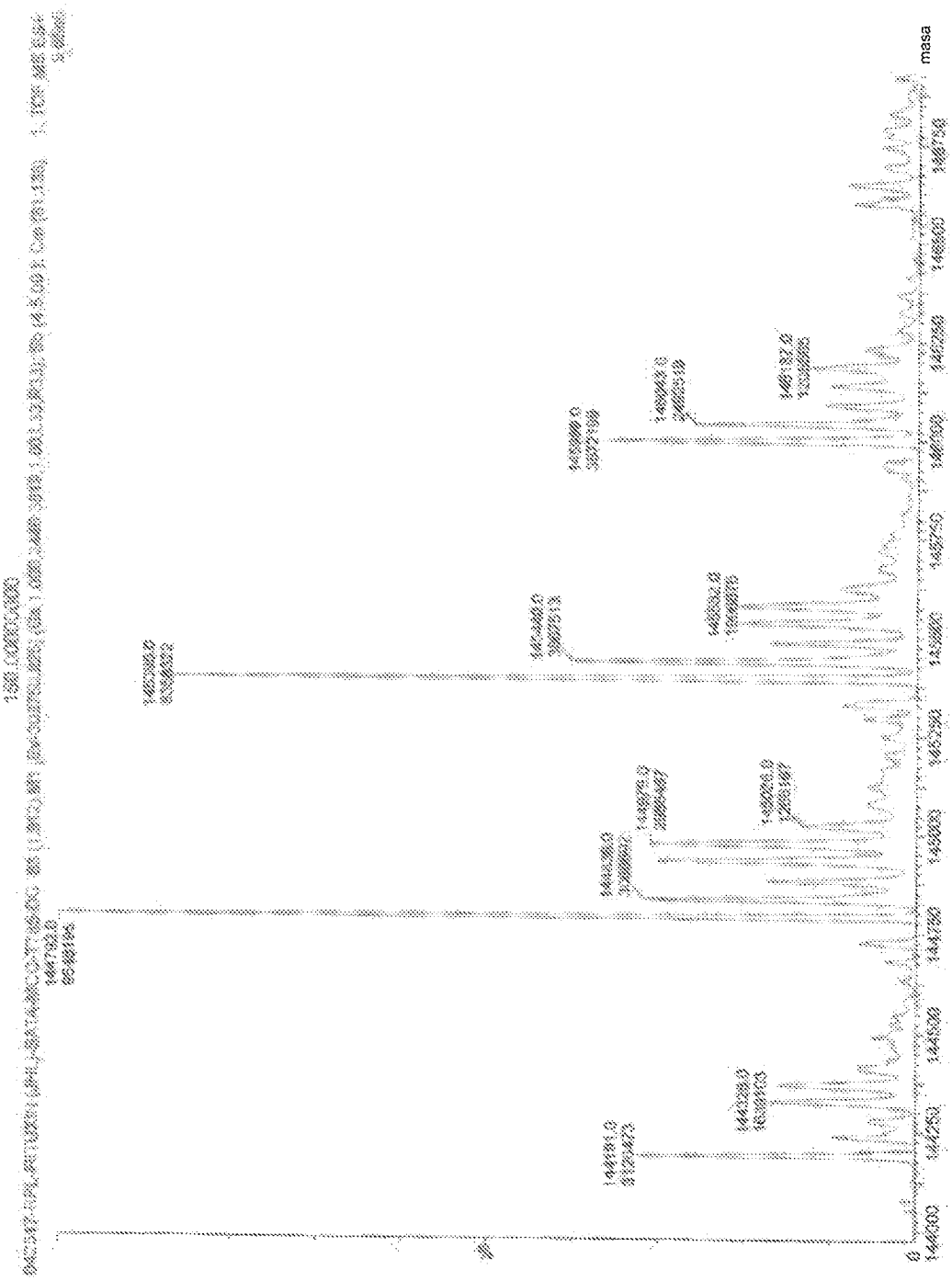


Fig. 71AE

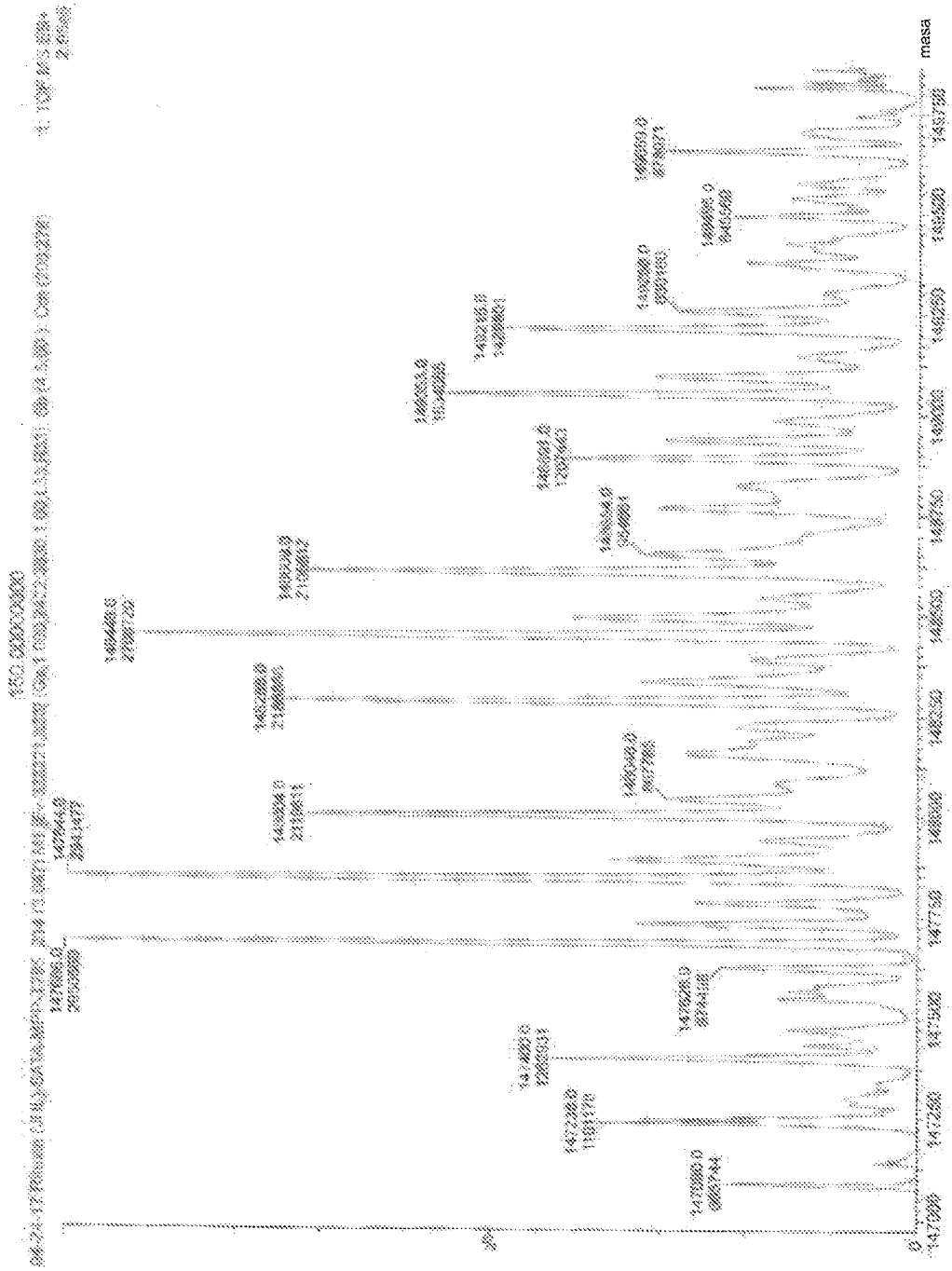


Fig. 71AF

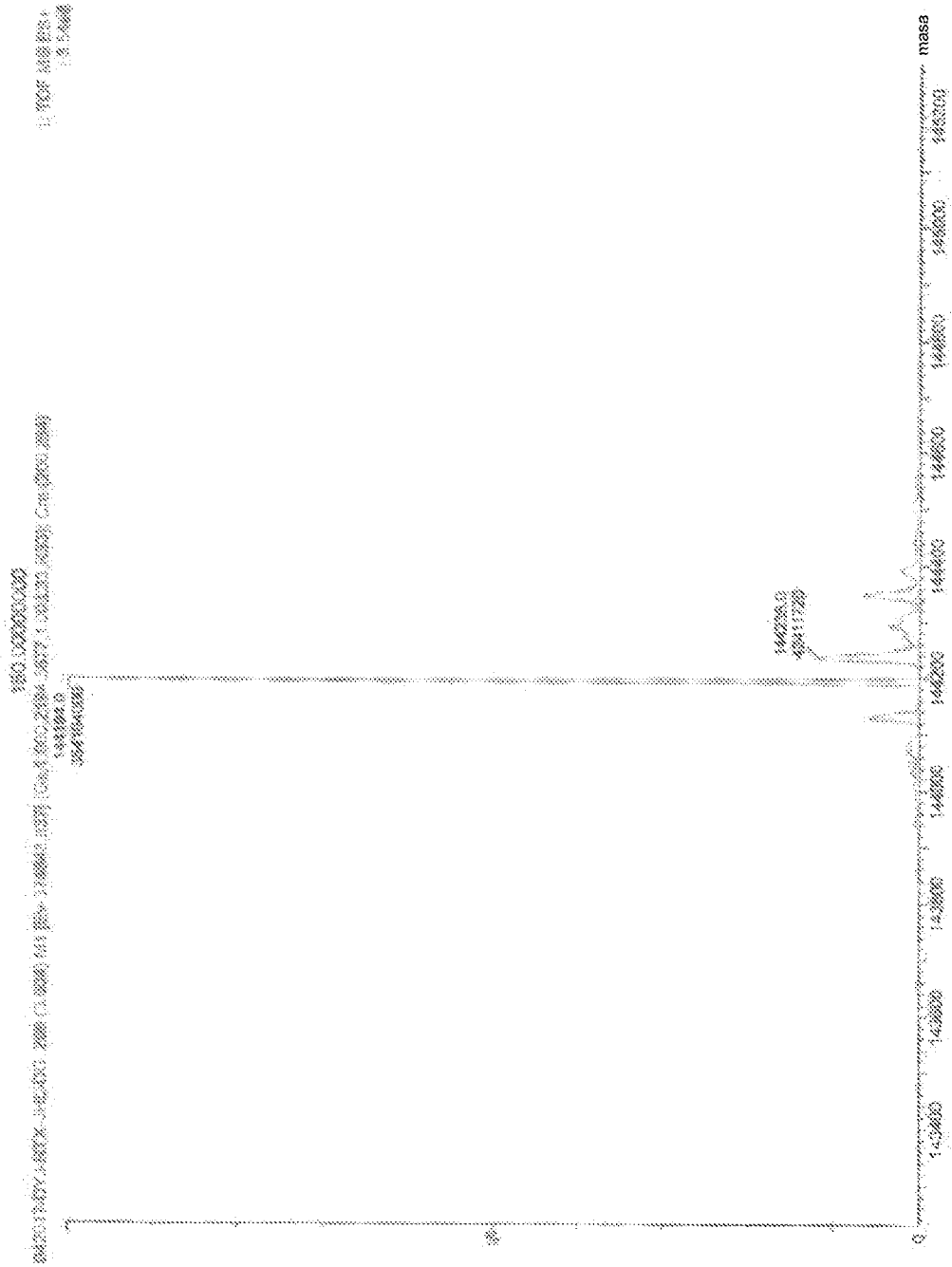


Fig. 71AG

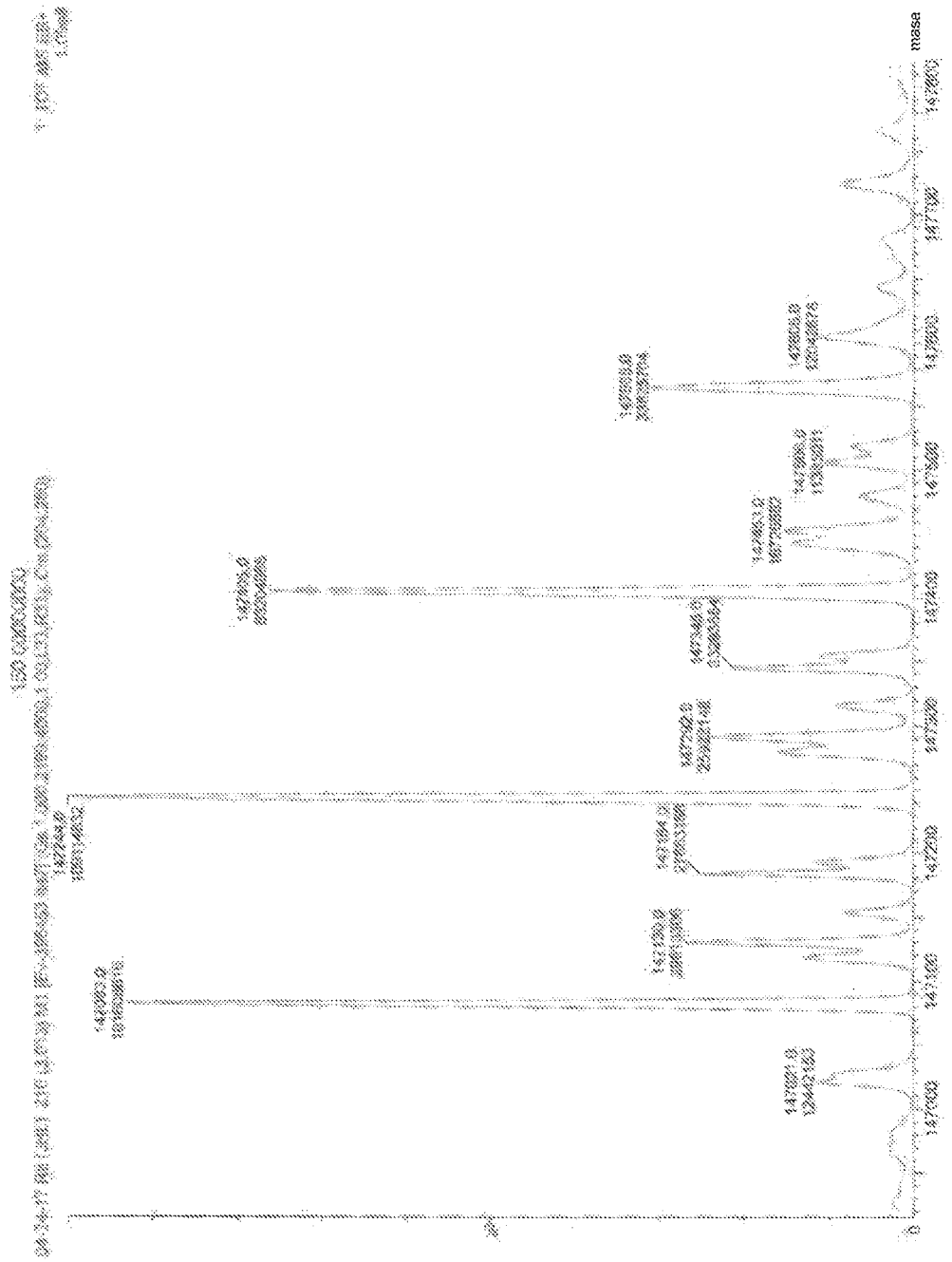


Fig. 71AH

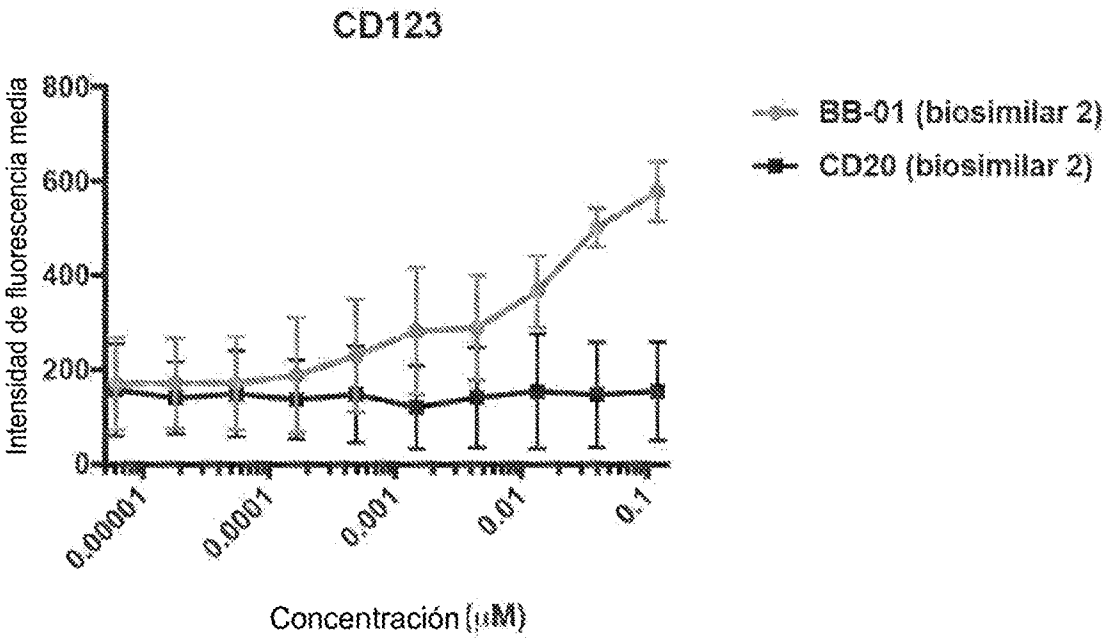


Fig. 71AI

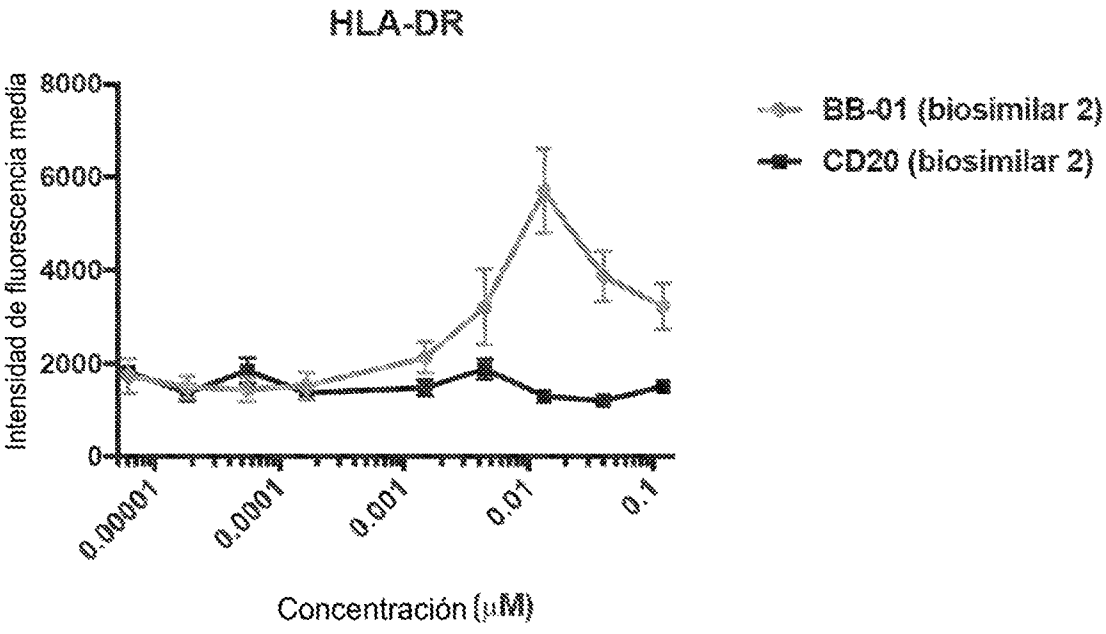


Fig. 71AJ

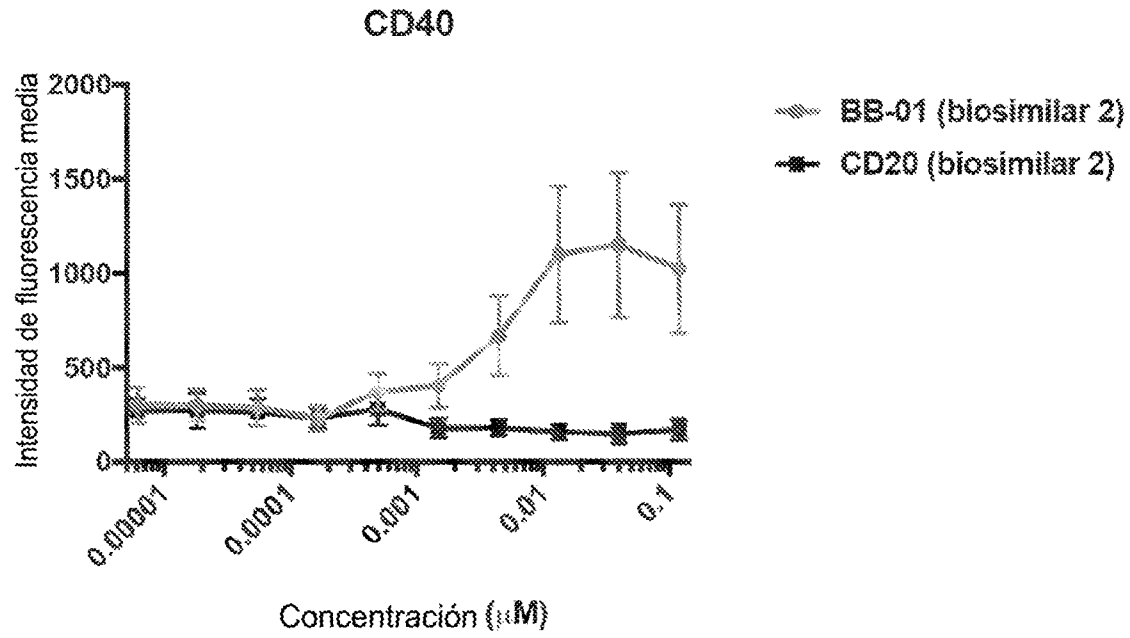


Fig. 71AK

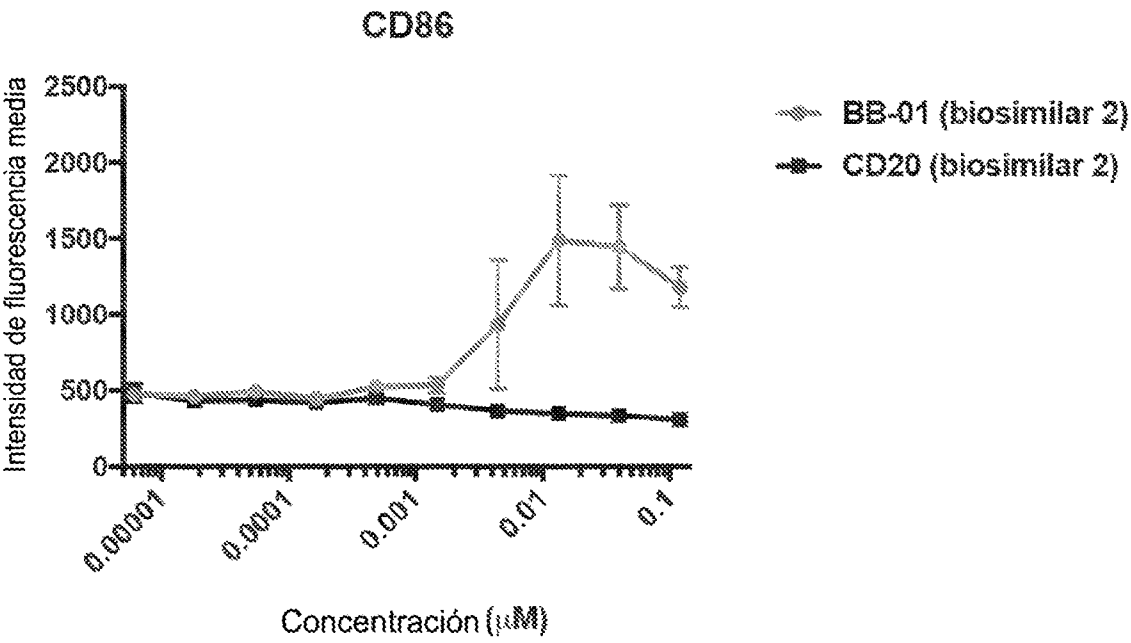


Fig. 71AL

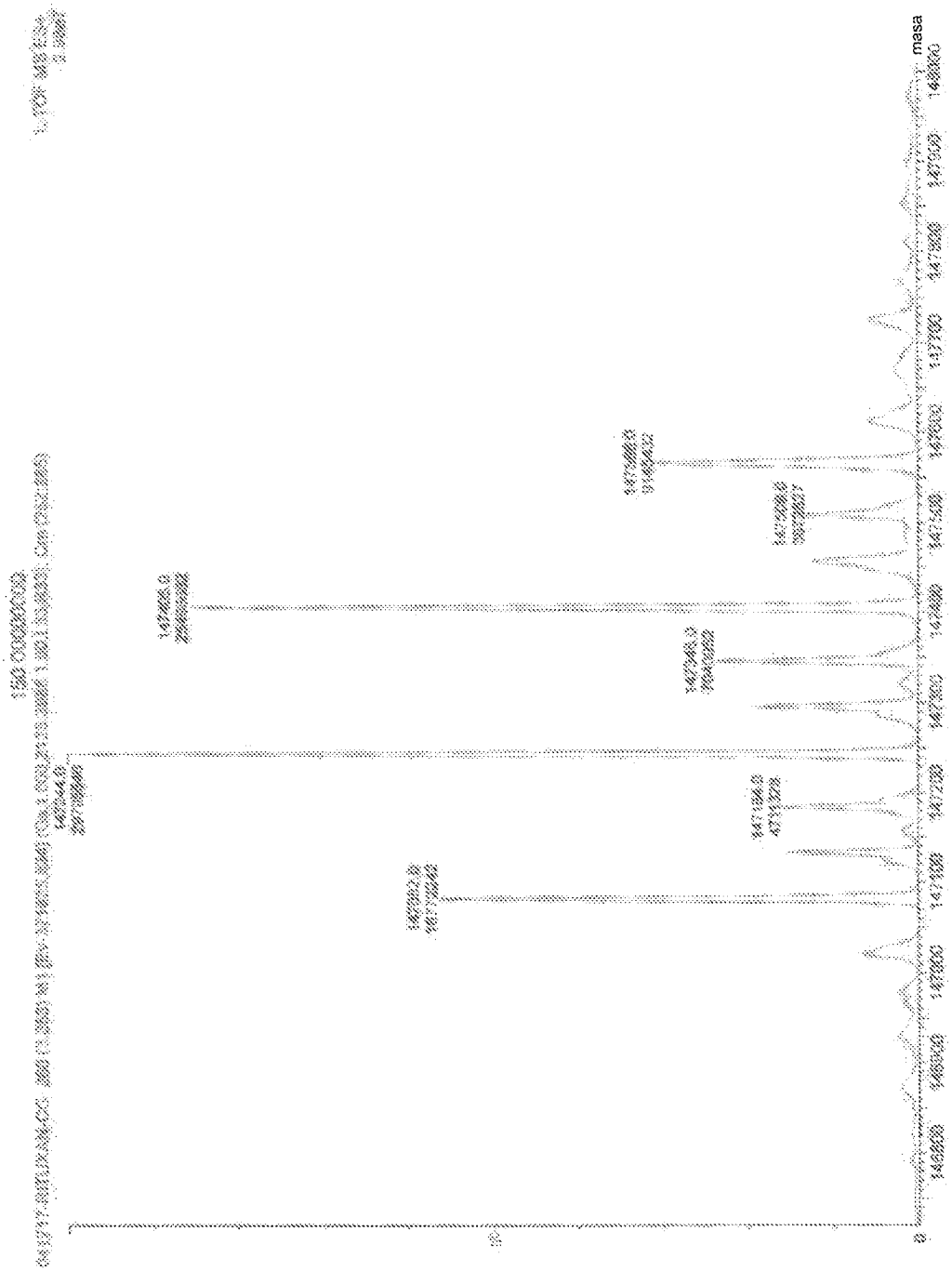


Fig. 71AM

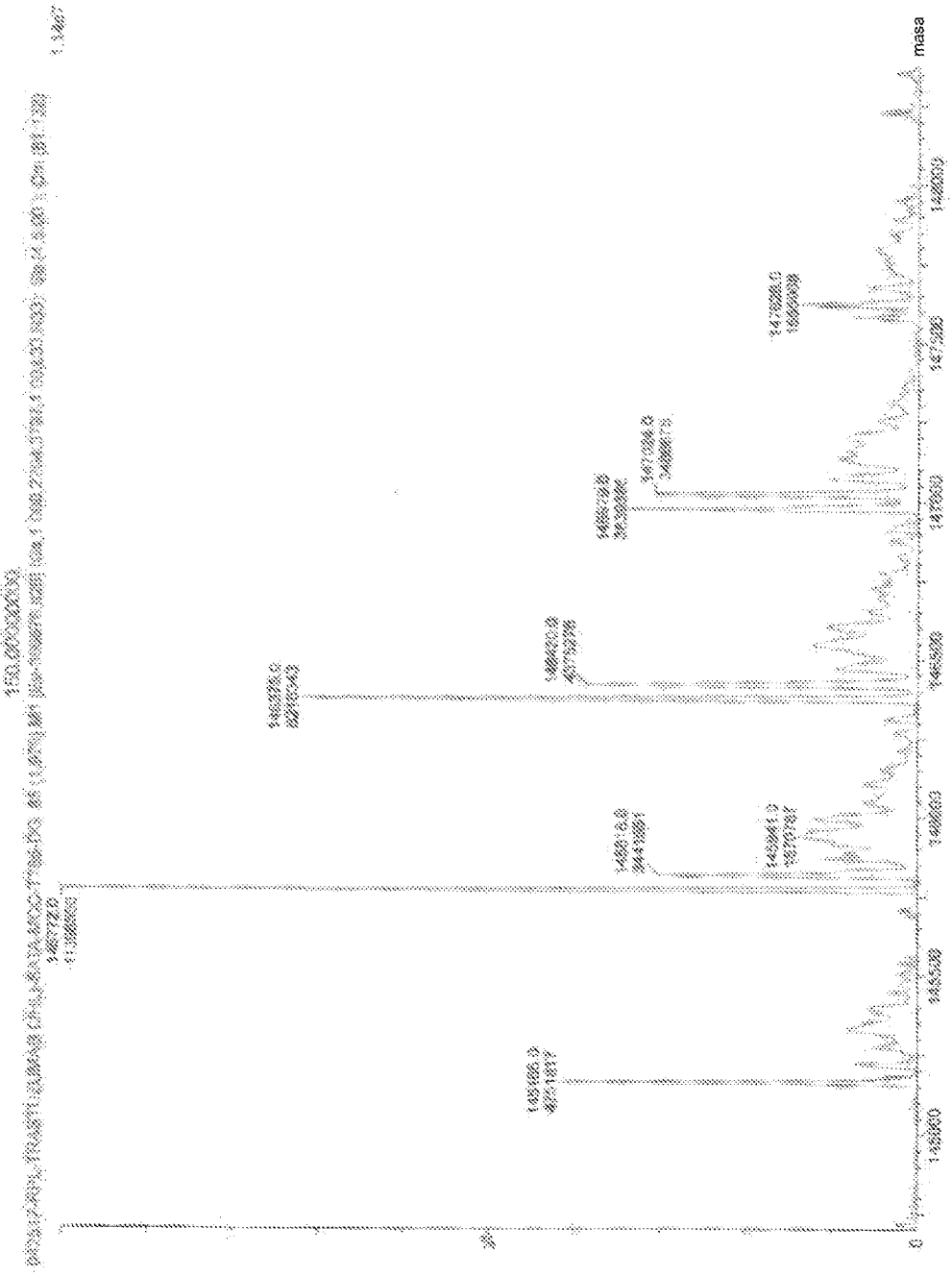


Fig. 71AN

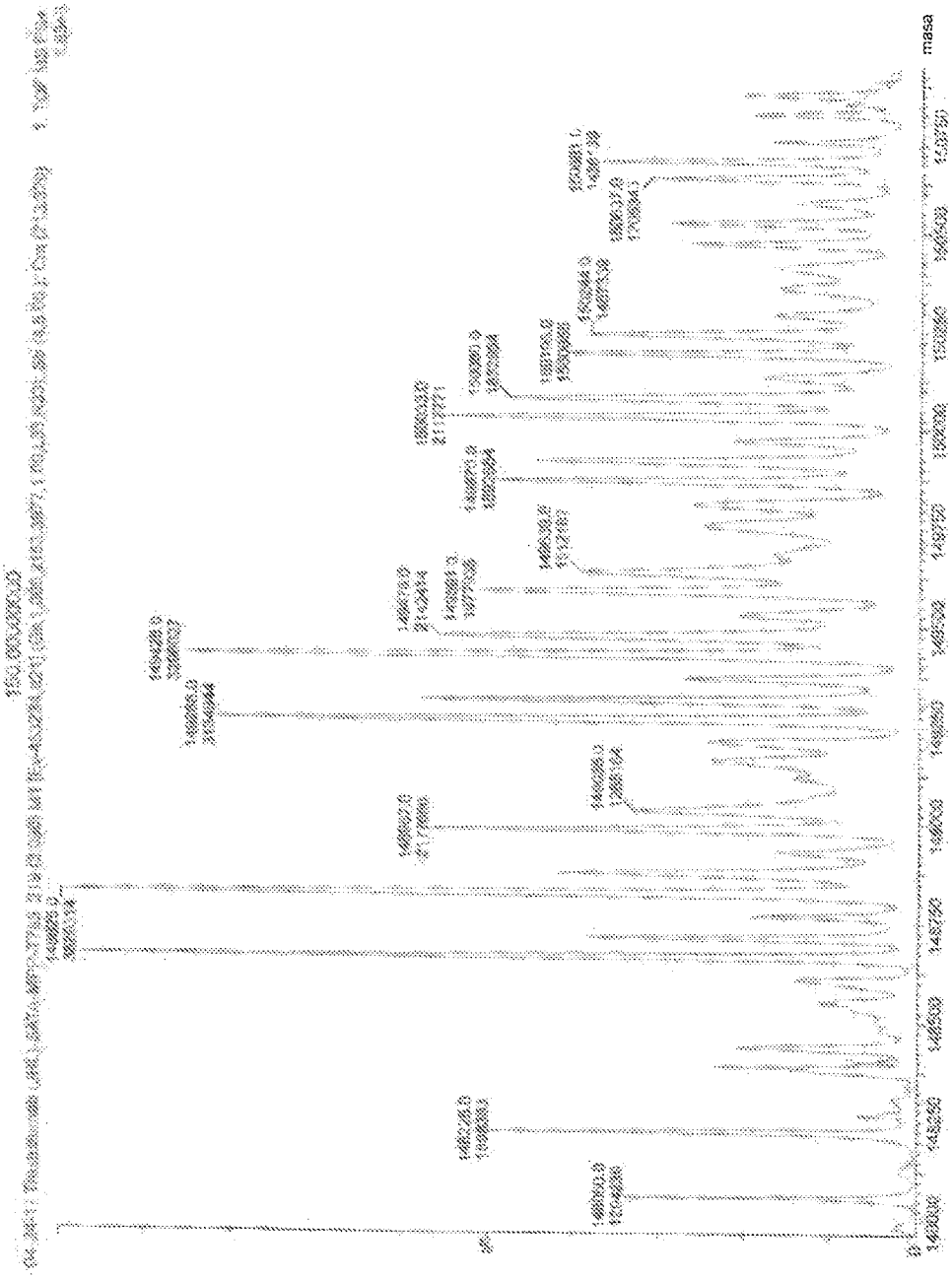


Fig. 71AO

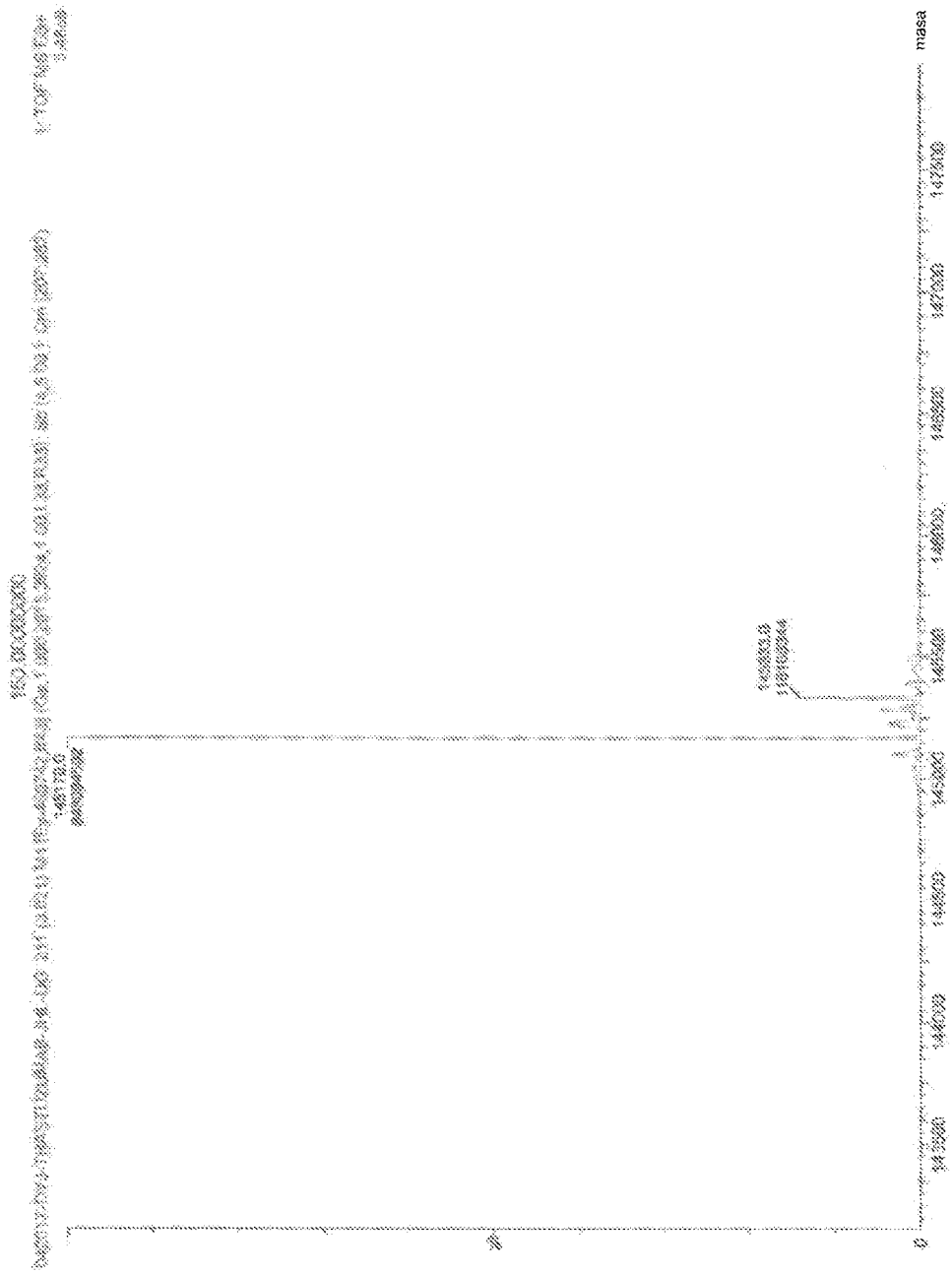


Fig. 71AP

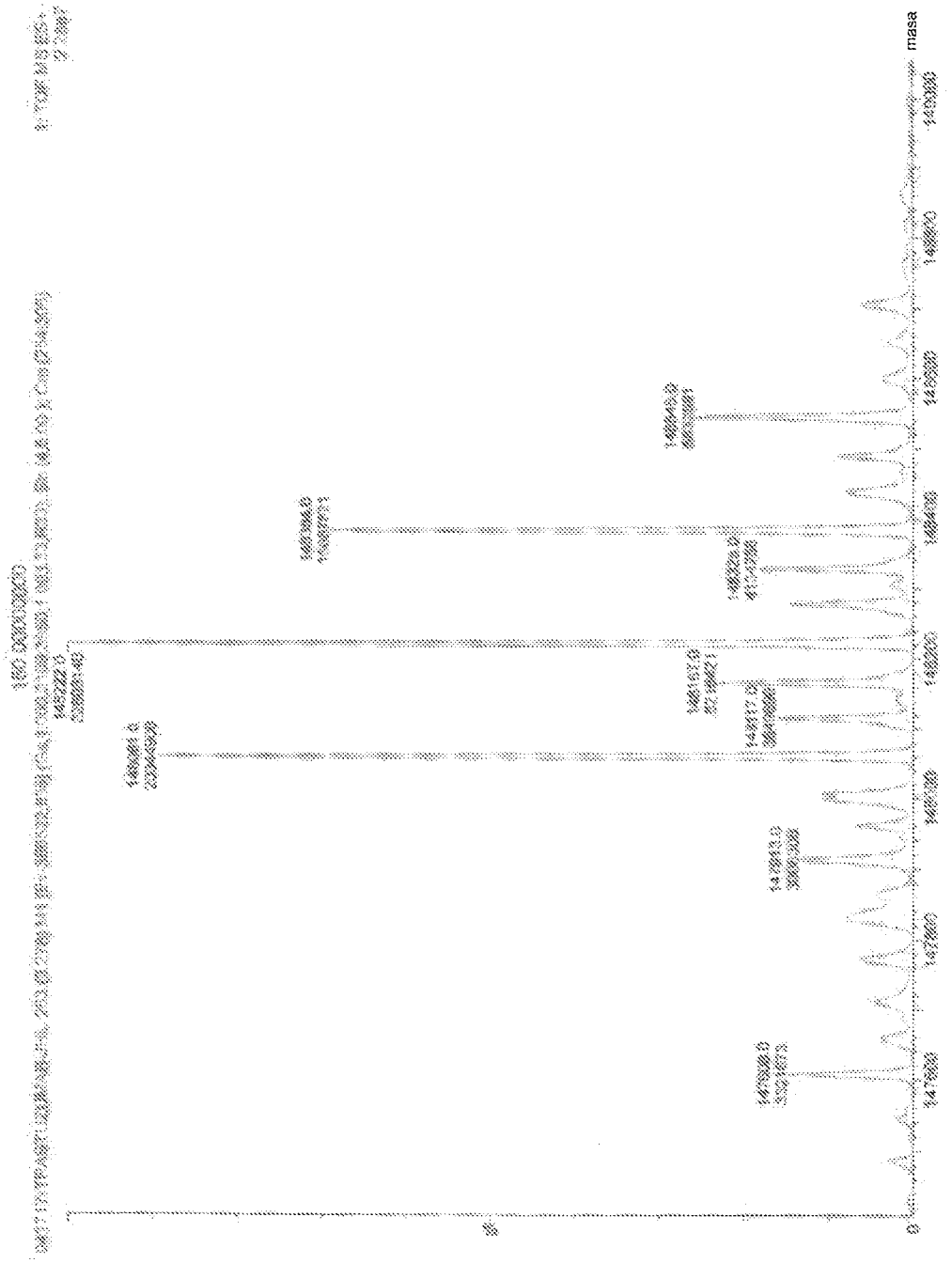


Fig. 71AQ

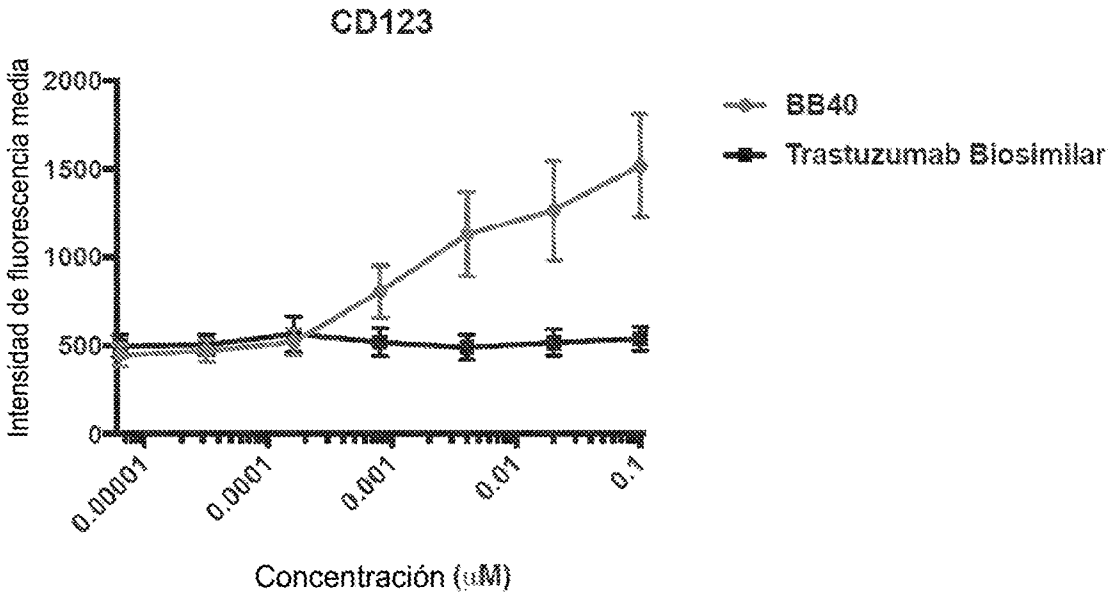


Fig. 71AR

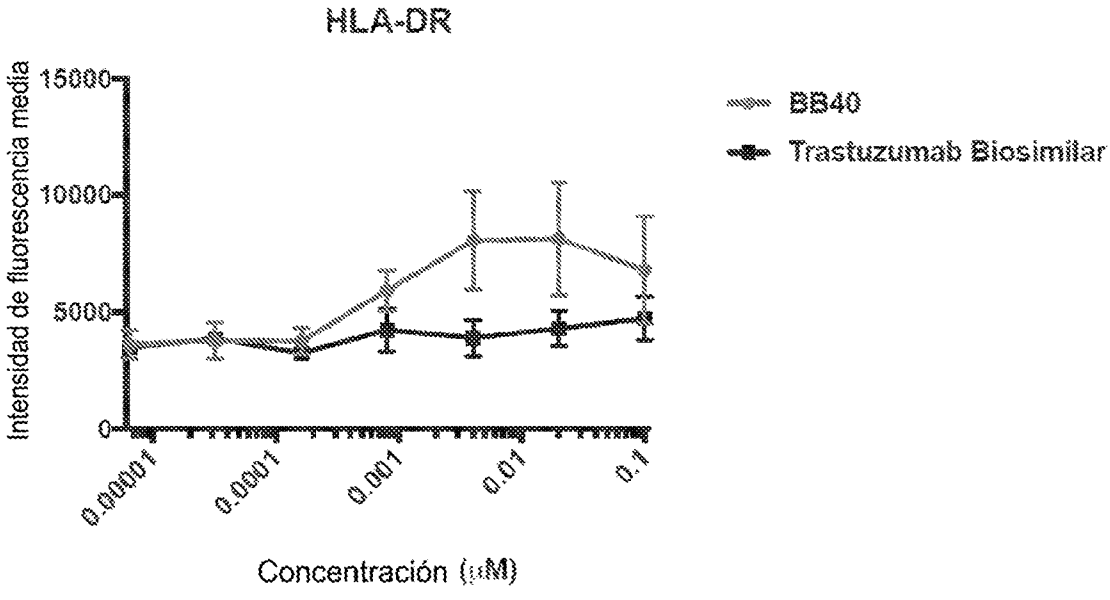


Fig. 71AS

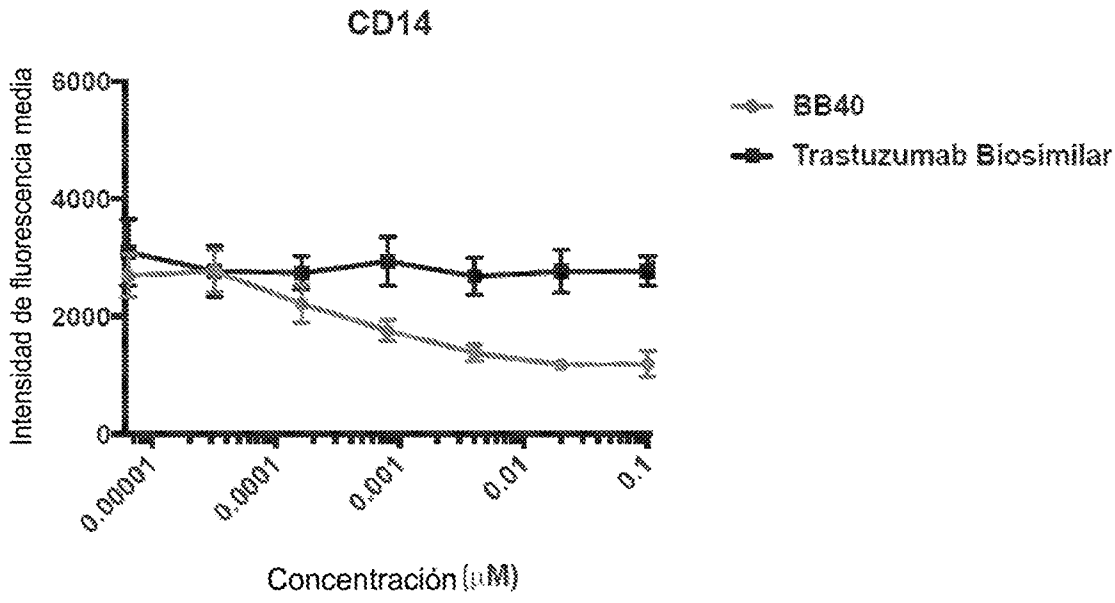


Fig. 71AT

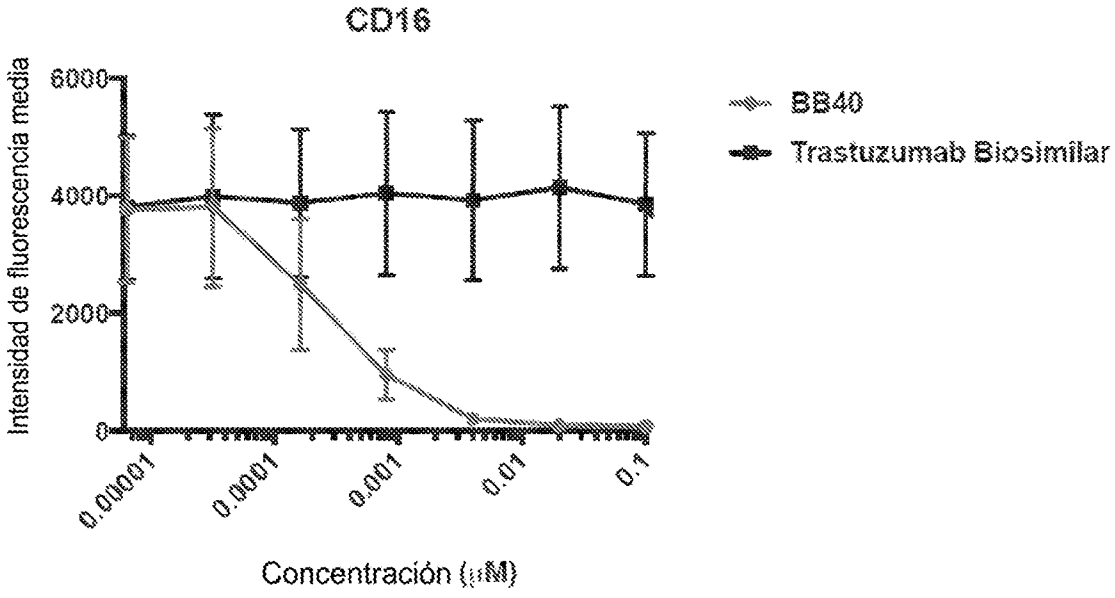


Fig. 71AU

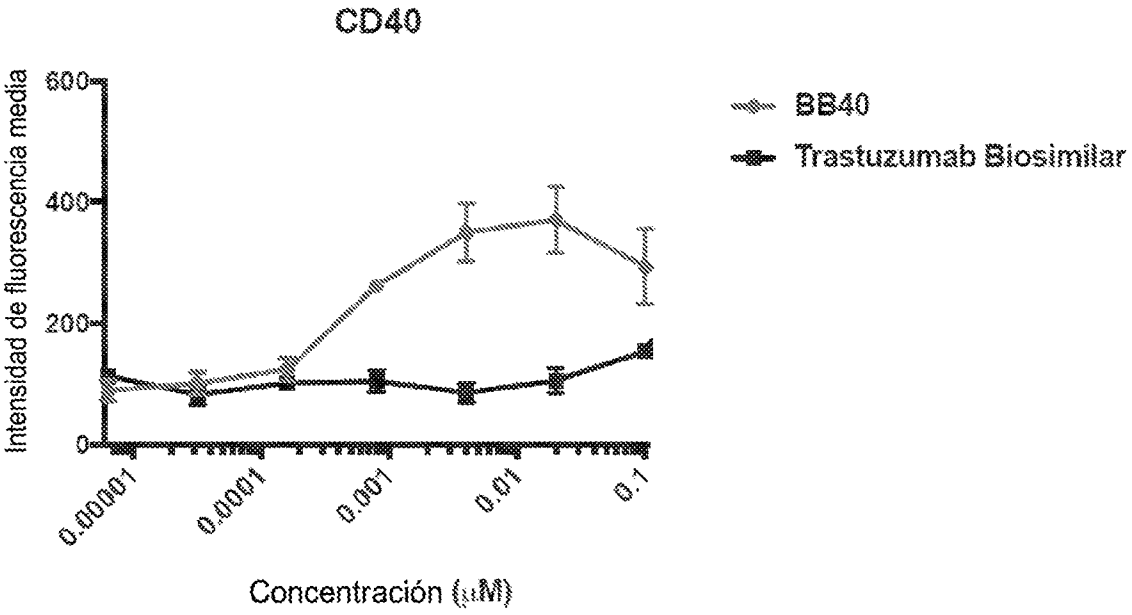


Fig. 71AV

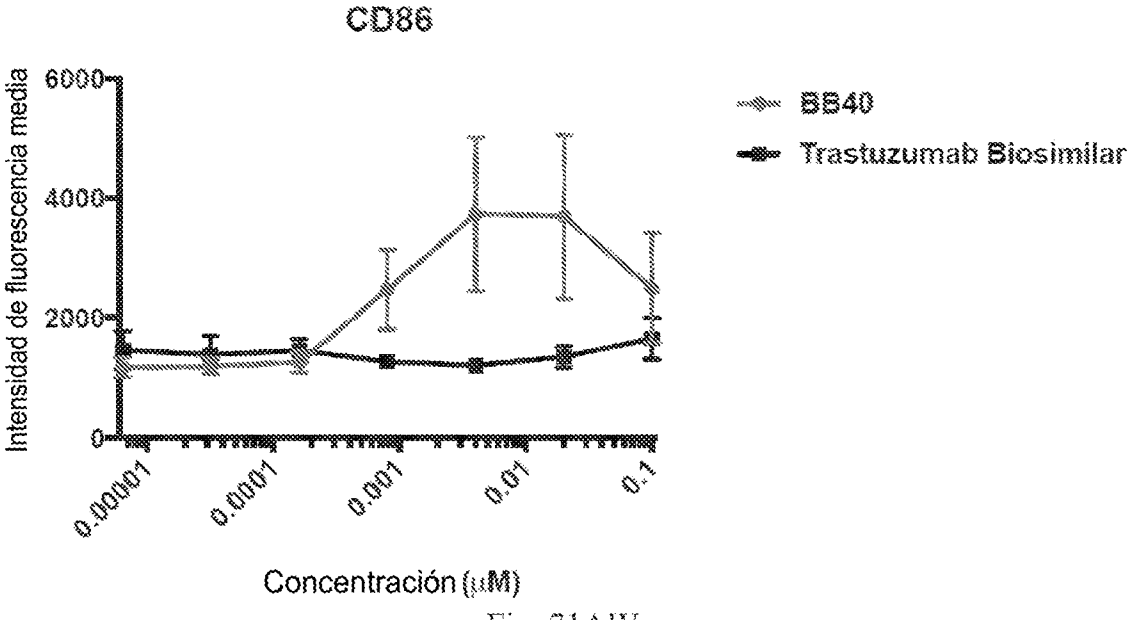


Fig. 71AW

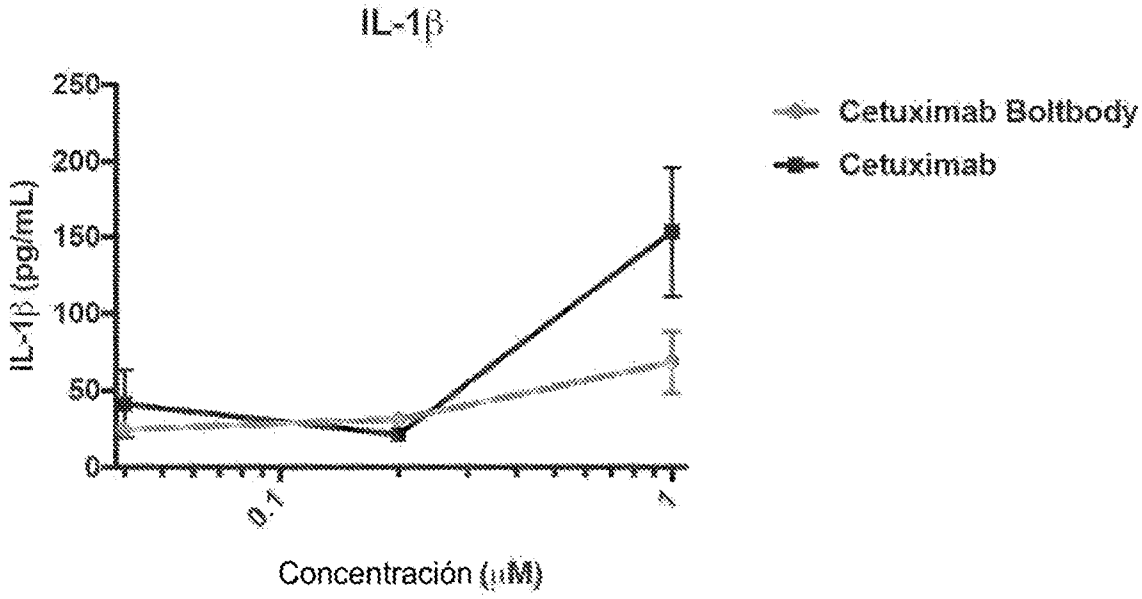


Fig. 72A

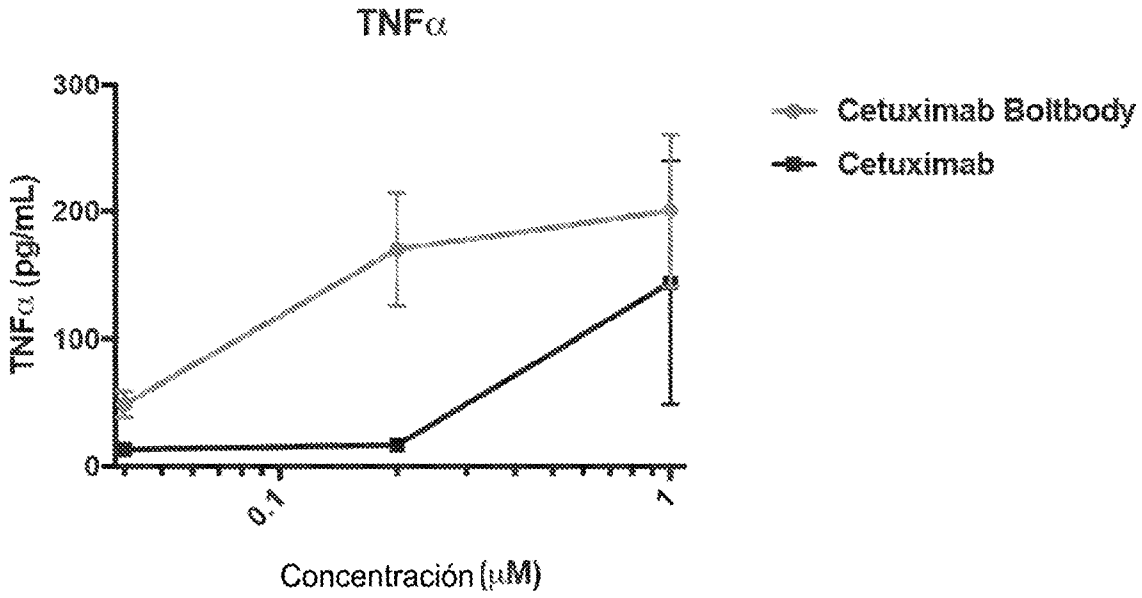


Fig. 72B

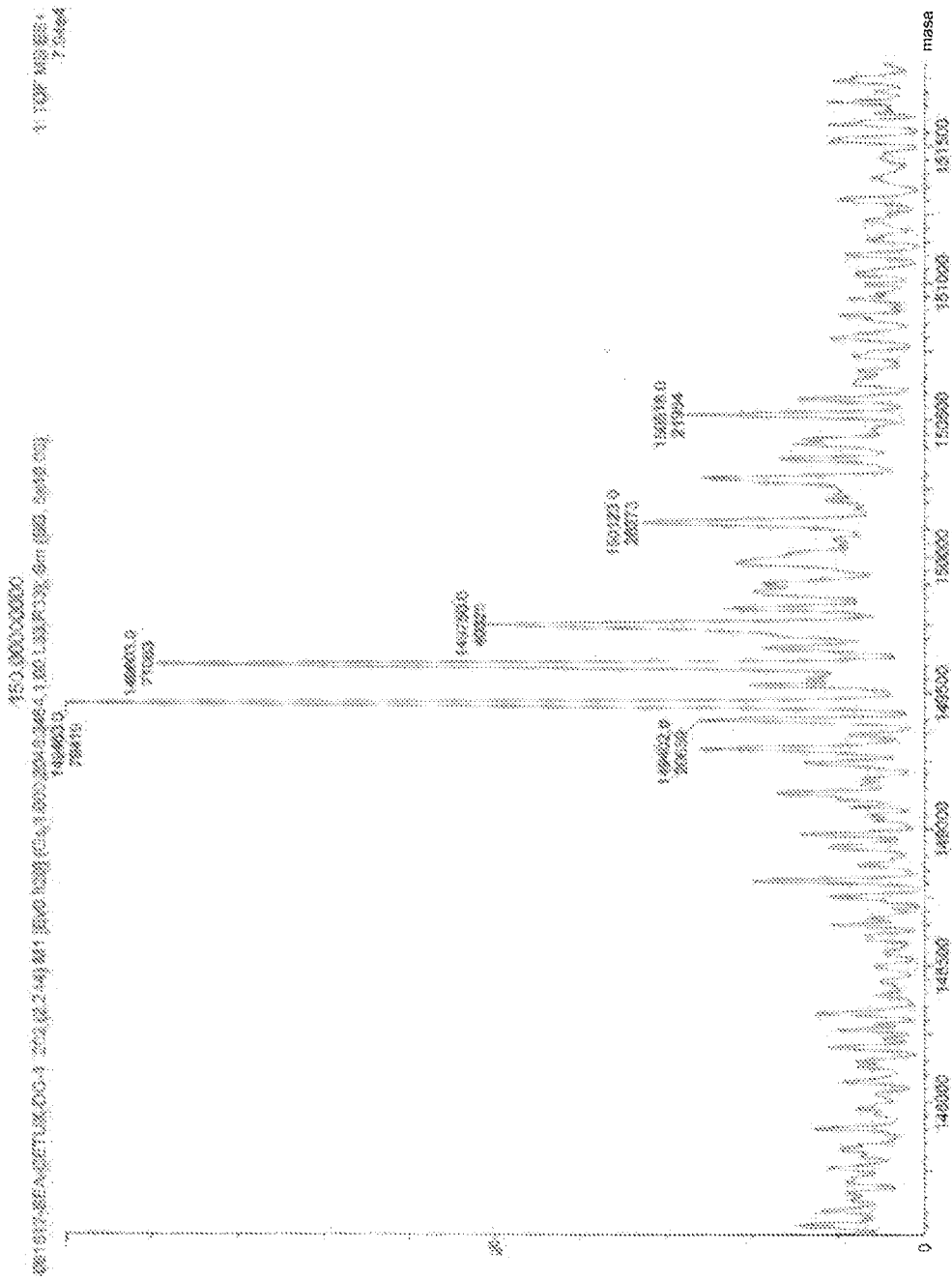


Fig. 72C

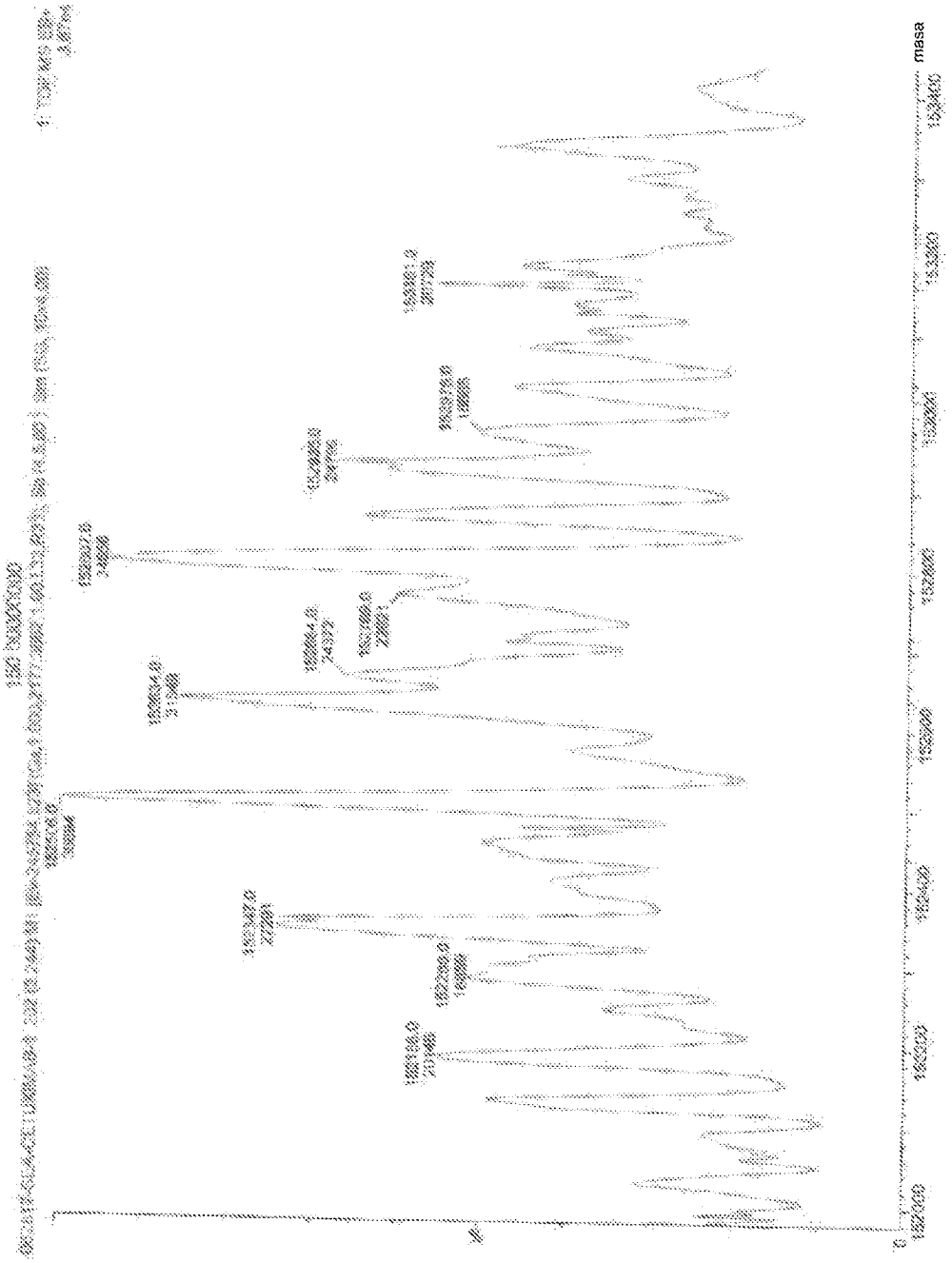


Fig. 72D

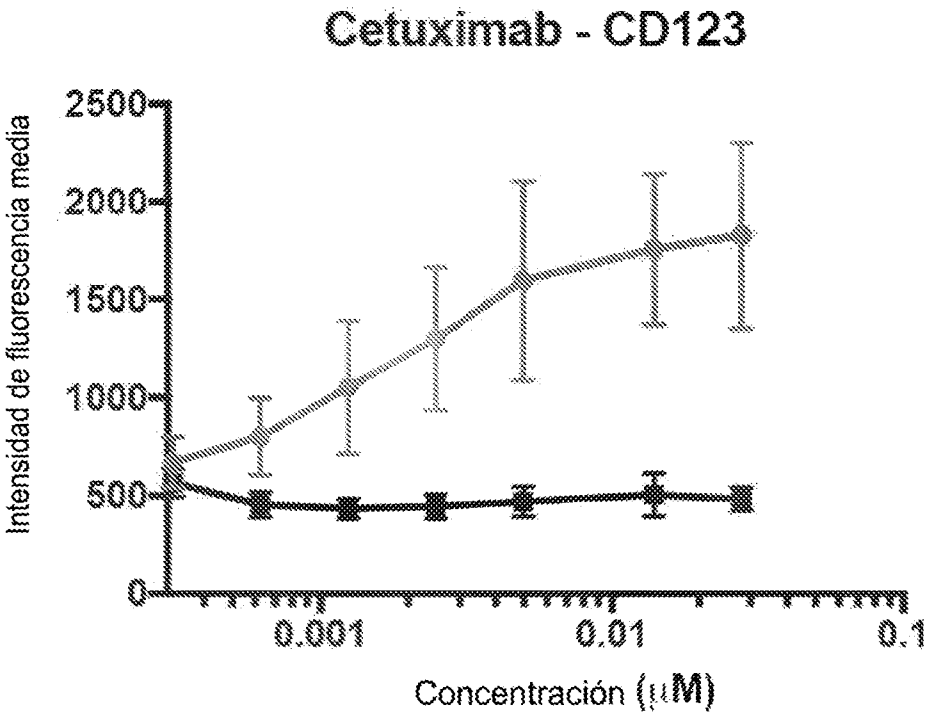


Fig. 72E

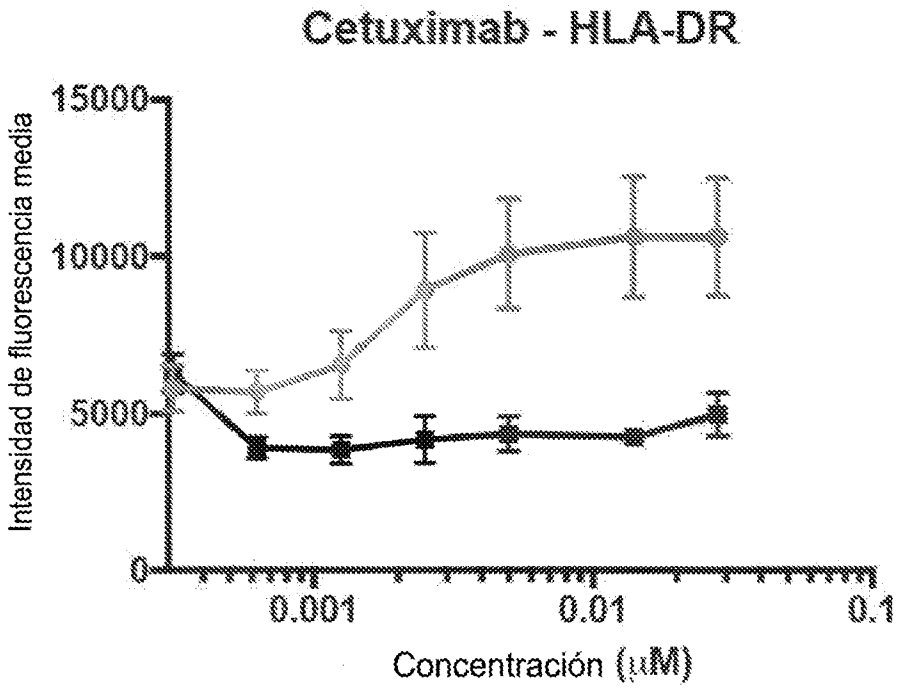


Fig. 72F

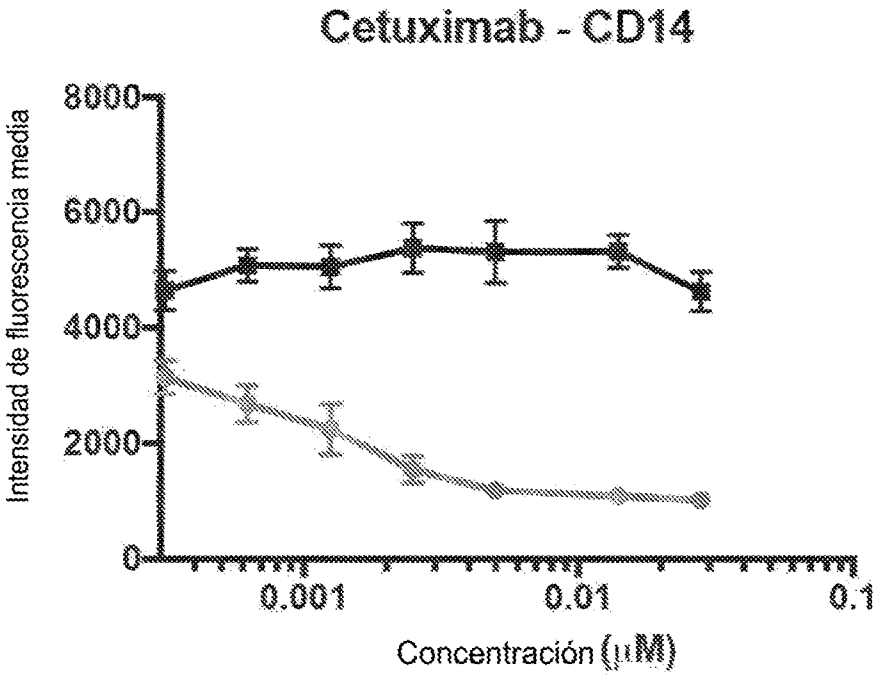


Fig. 72G

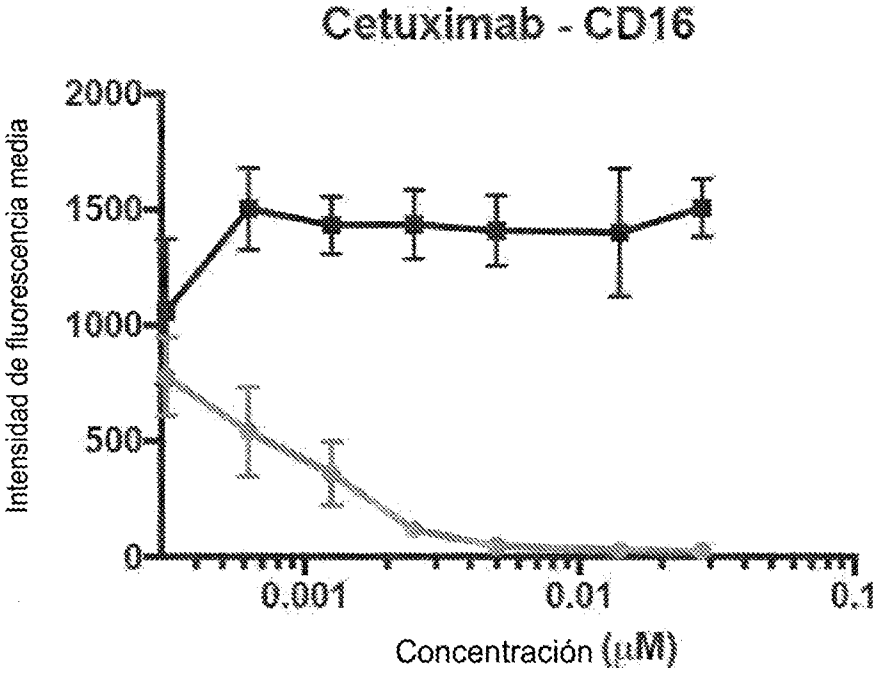


Fig. 72H

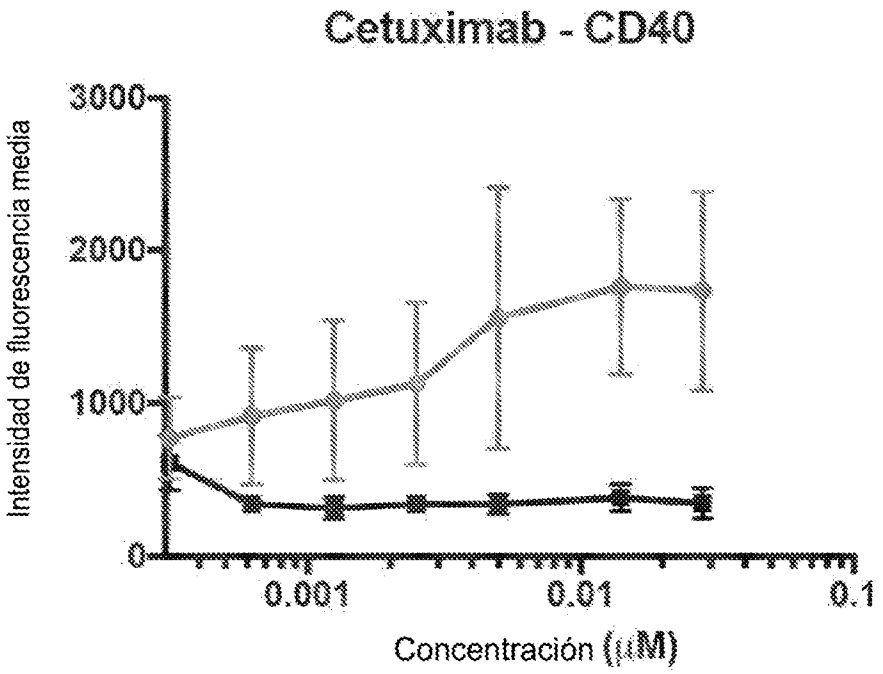


Fig. 72I

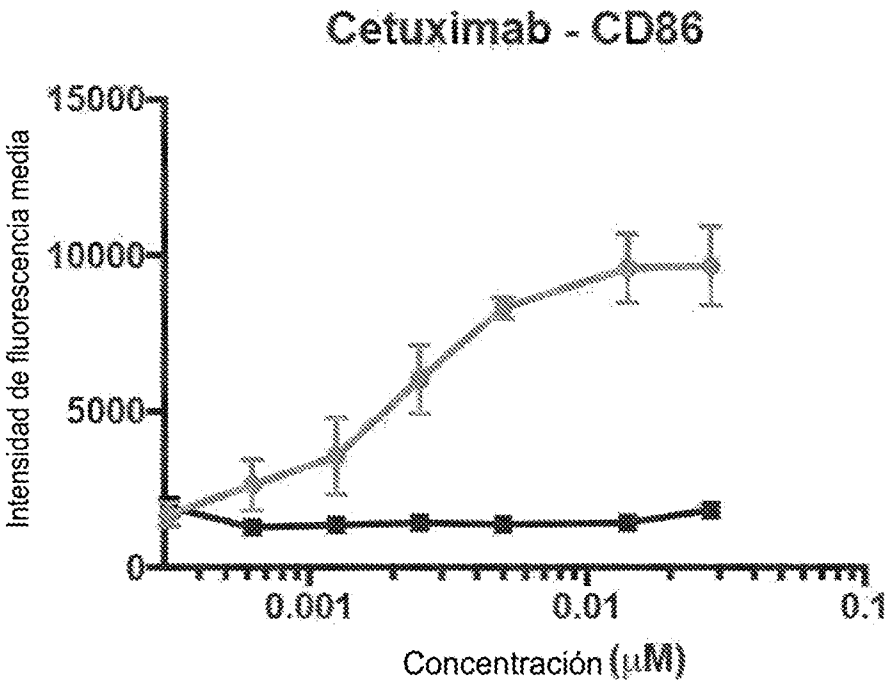


Fig. 72J

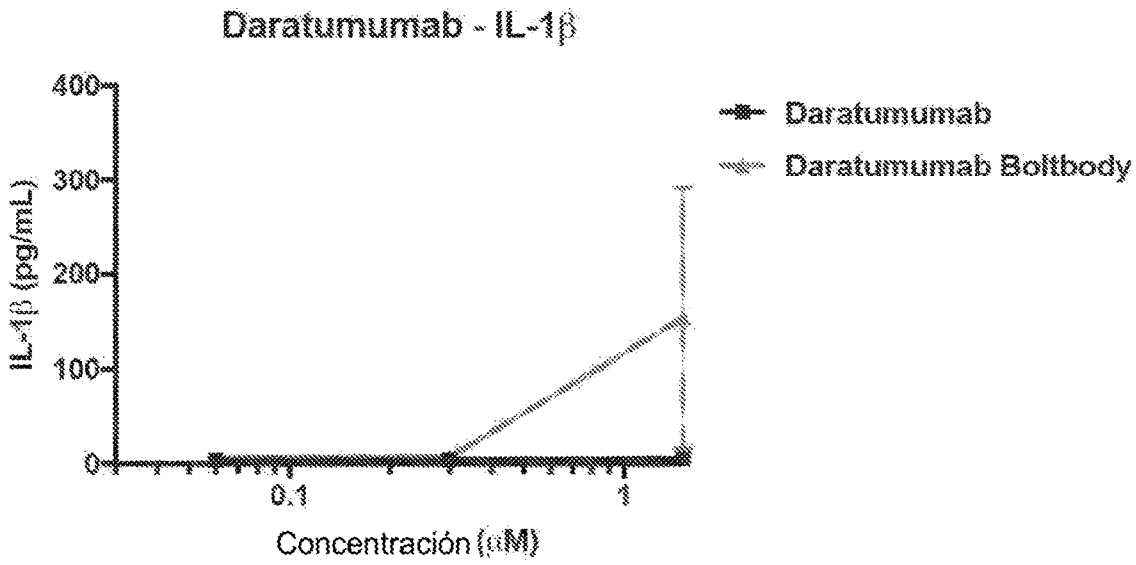


Fig. 73A

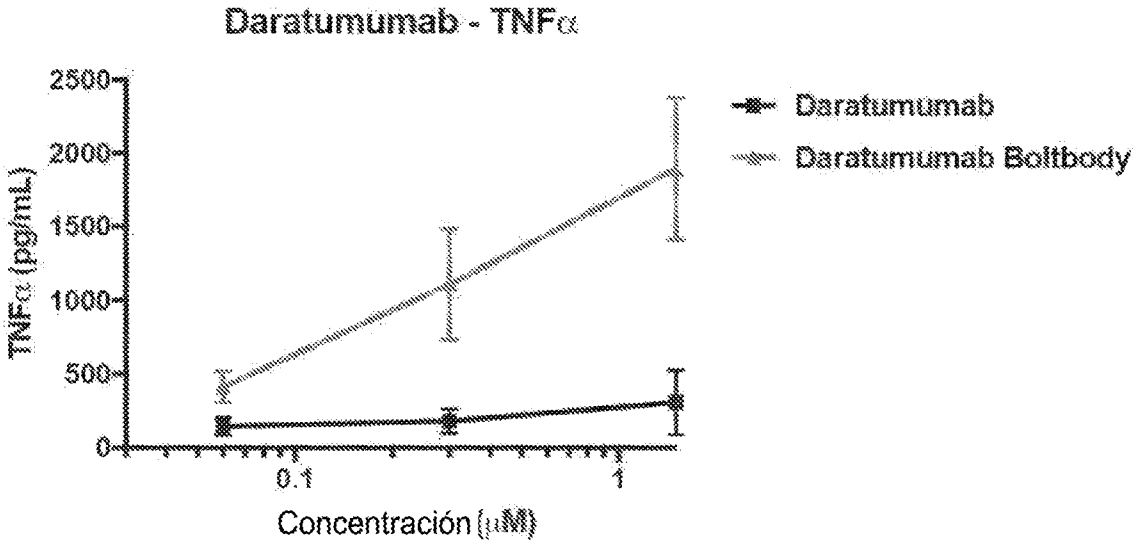


Fig. 73B

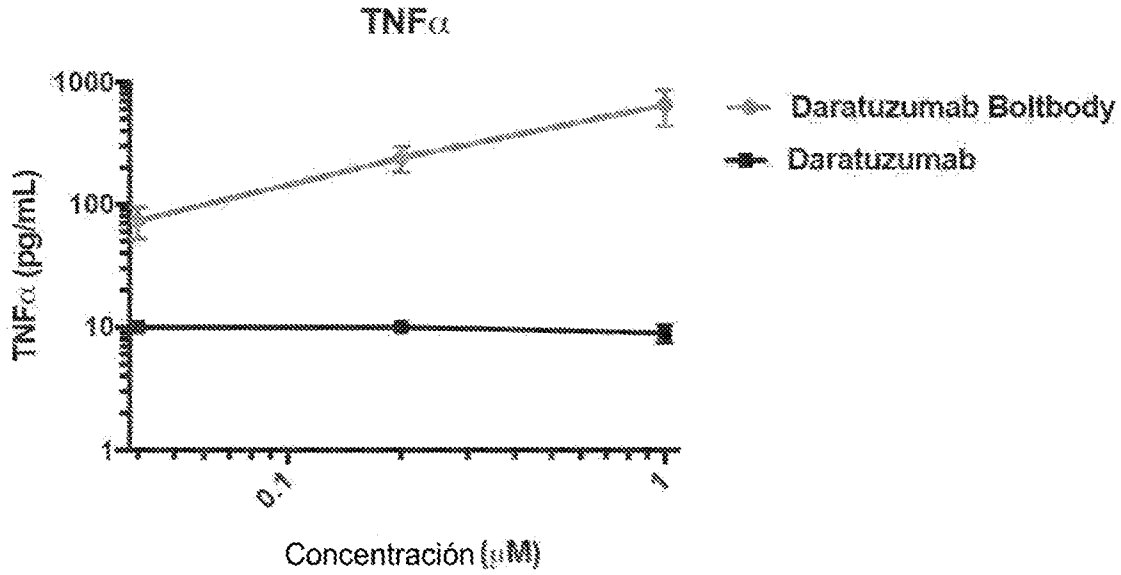


Fig. 73C

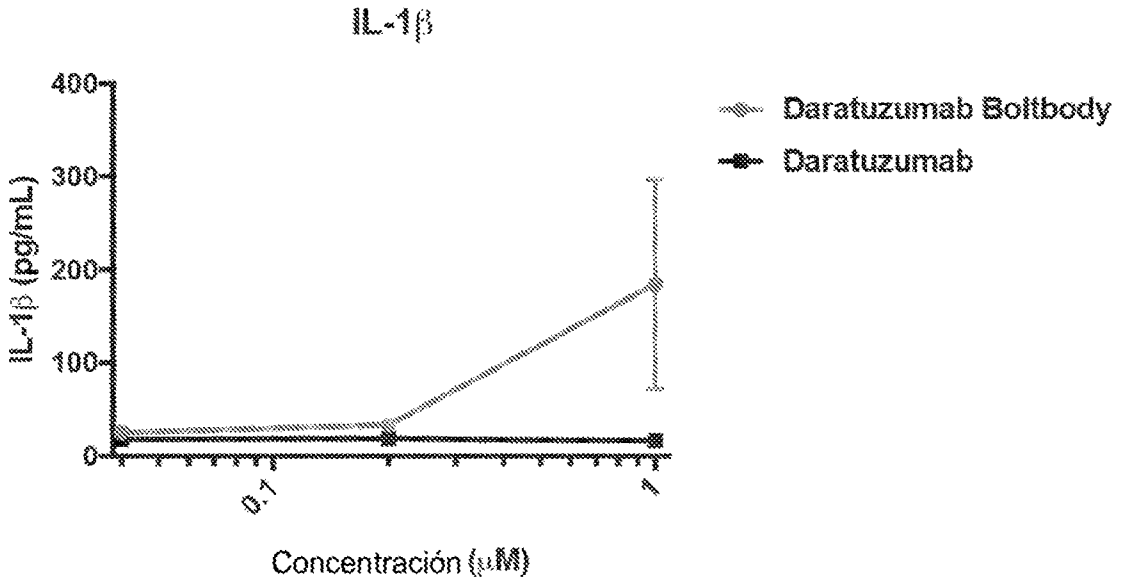


Fig. 73D

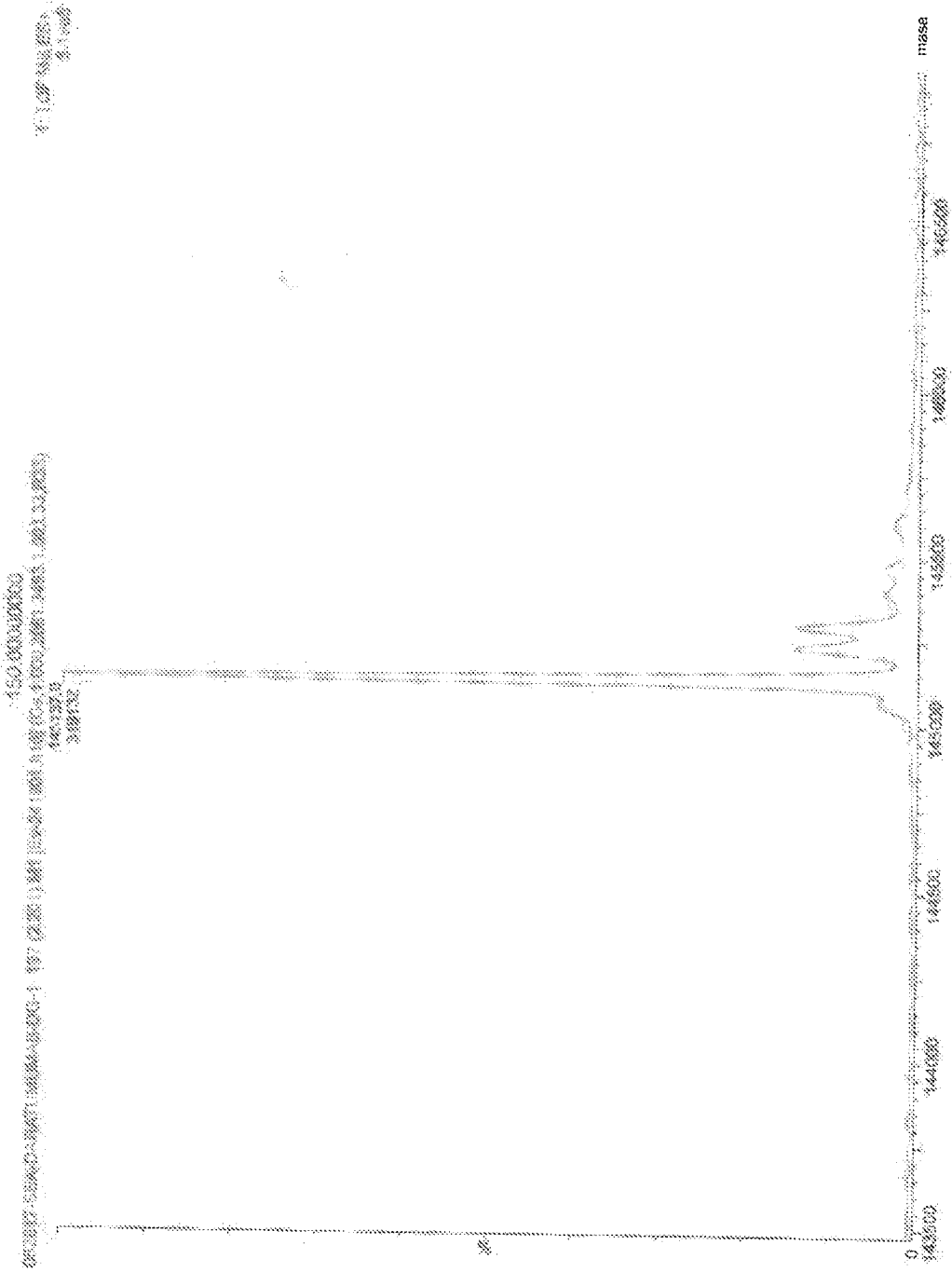

%
masa
145500
144000
146500
147000
147500
148000
148500
149000
149500
150000

Fig. 73E

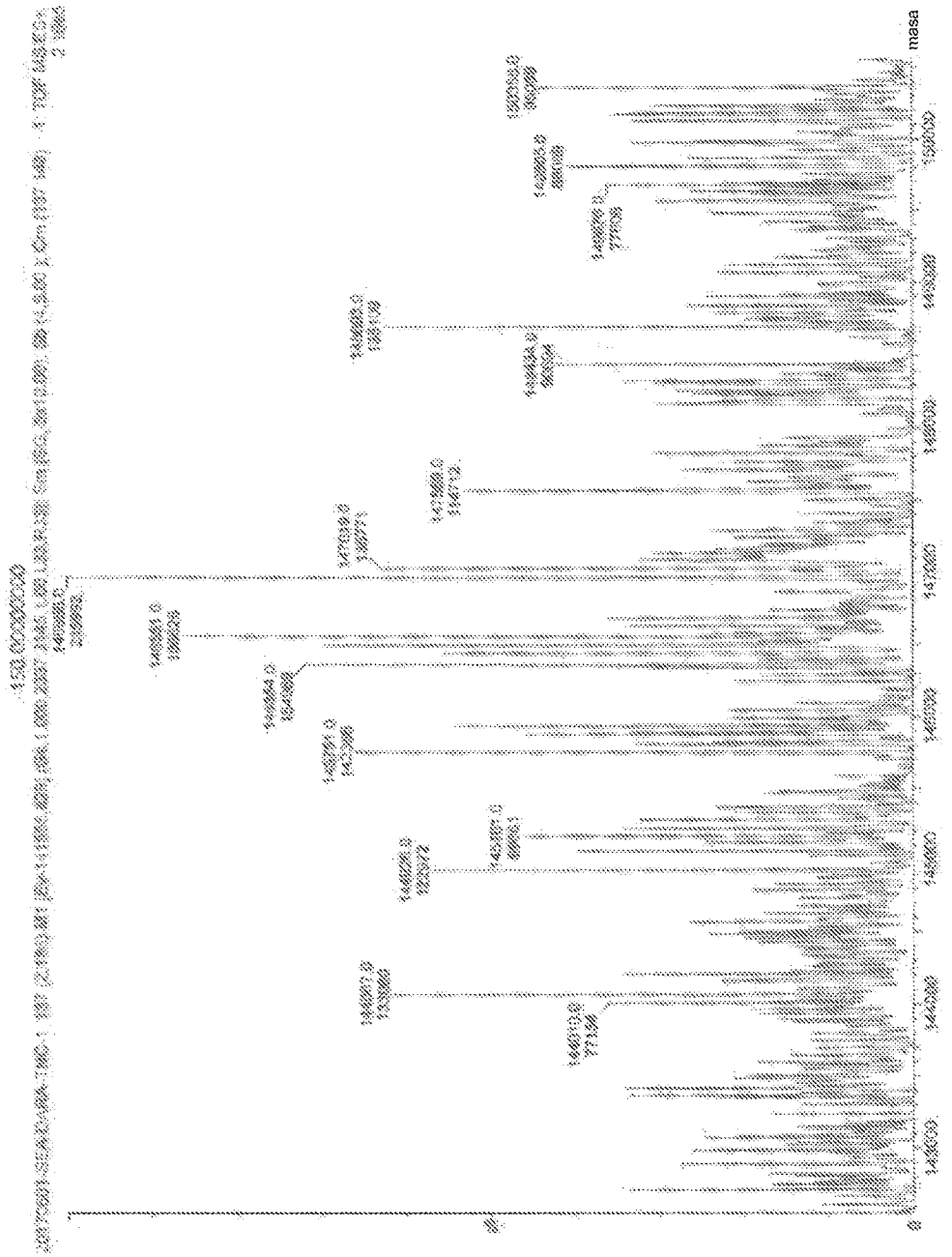


Fig. 73F

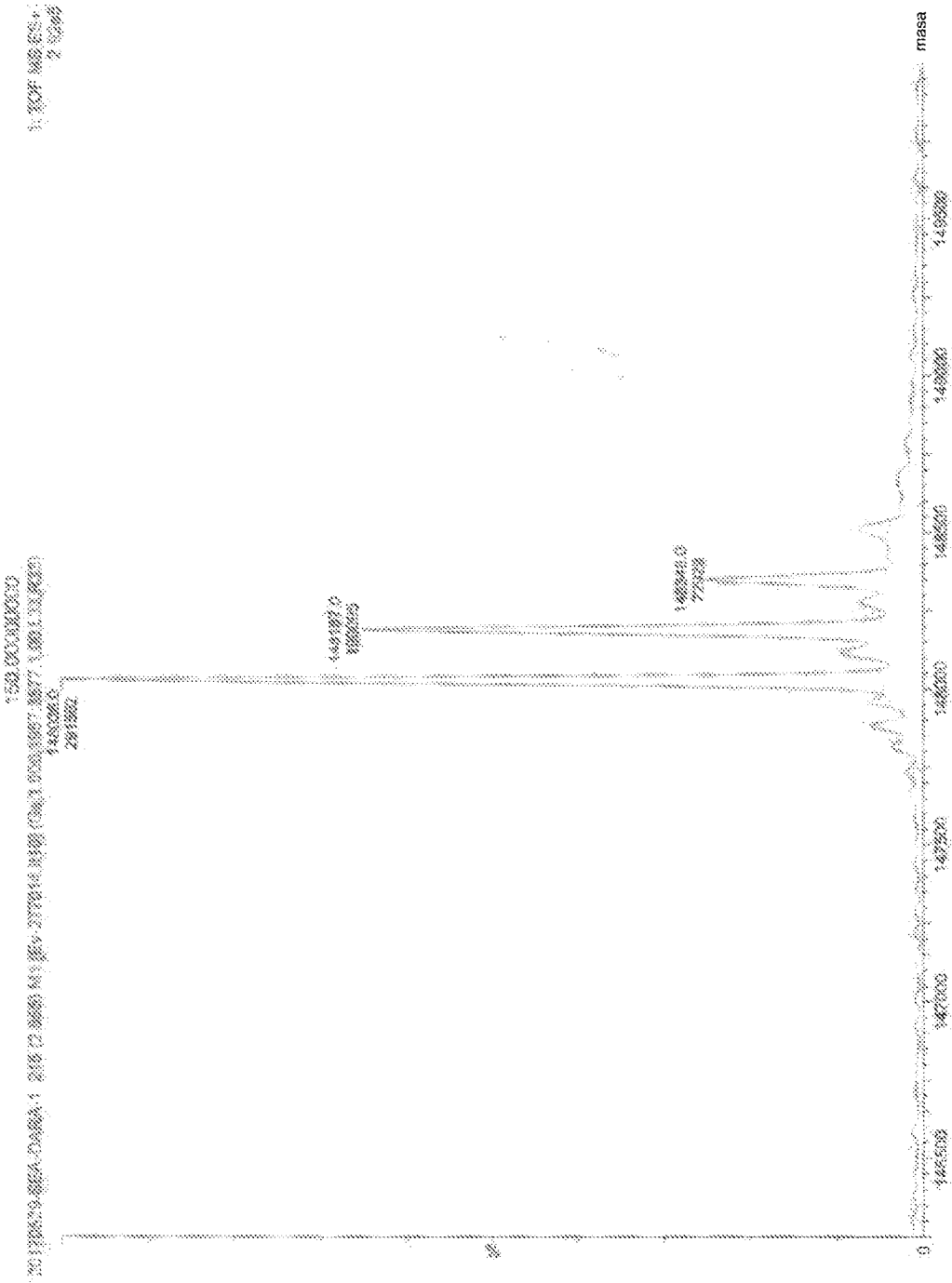

masa
%
0
100
1445.0
1447.0
1449.0
1451.0
1453.0
1455.0
1457.0
1459.0
1461.0
1463.0

Fig. 73G

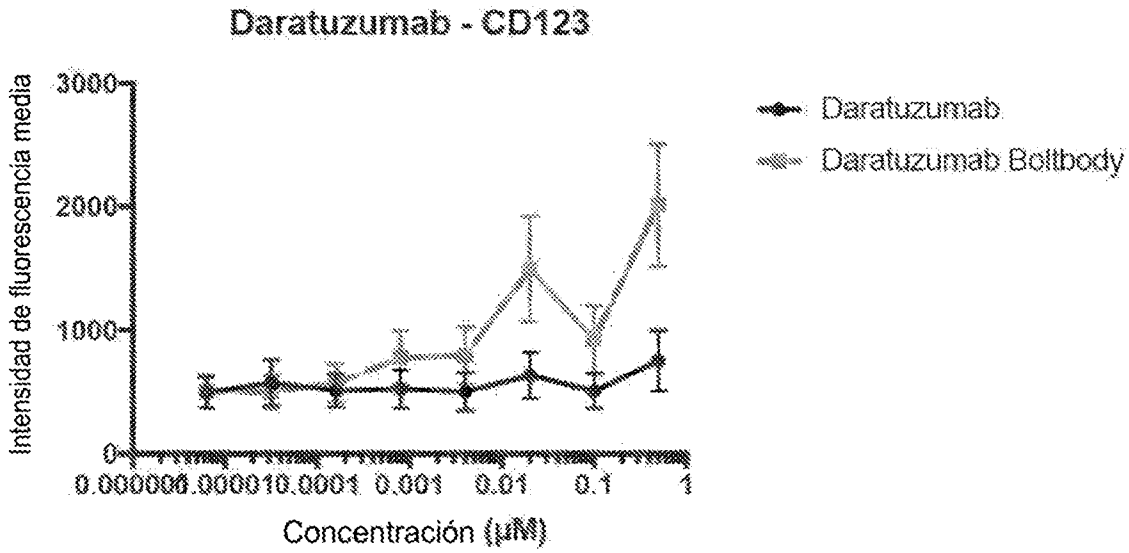


Fig. 73H

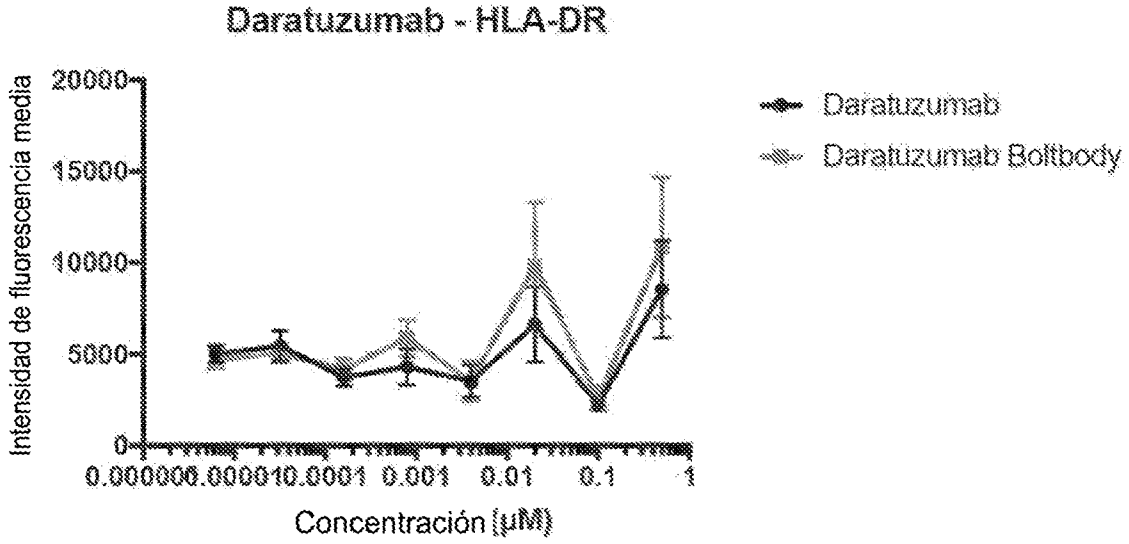


Fig. 73I

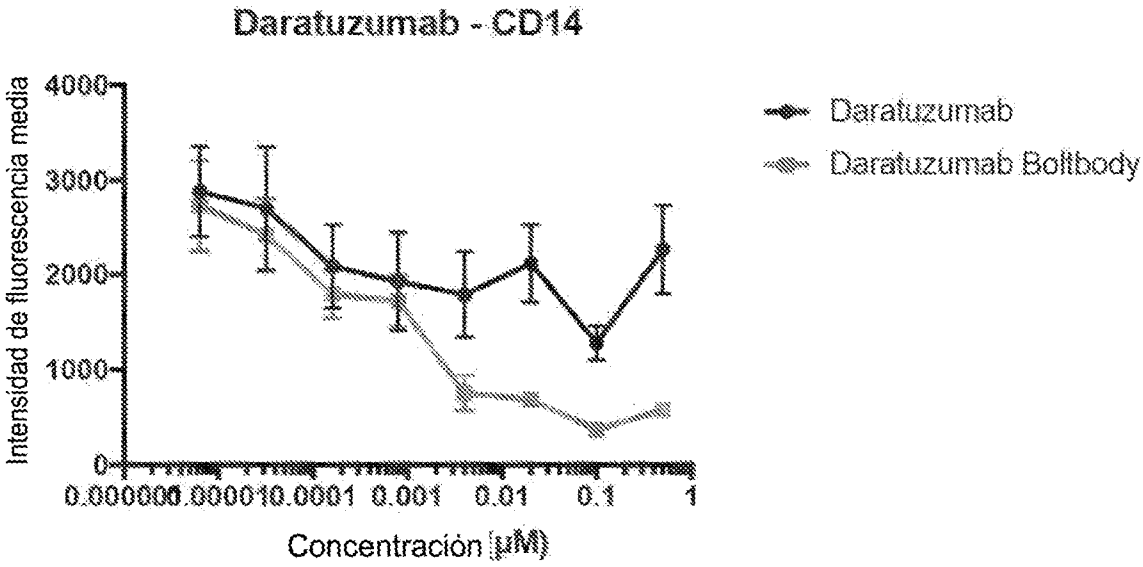


Fig. 73J

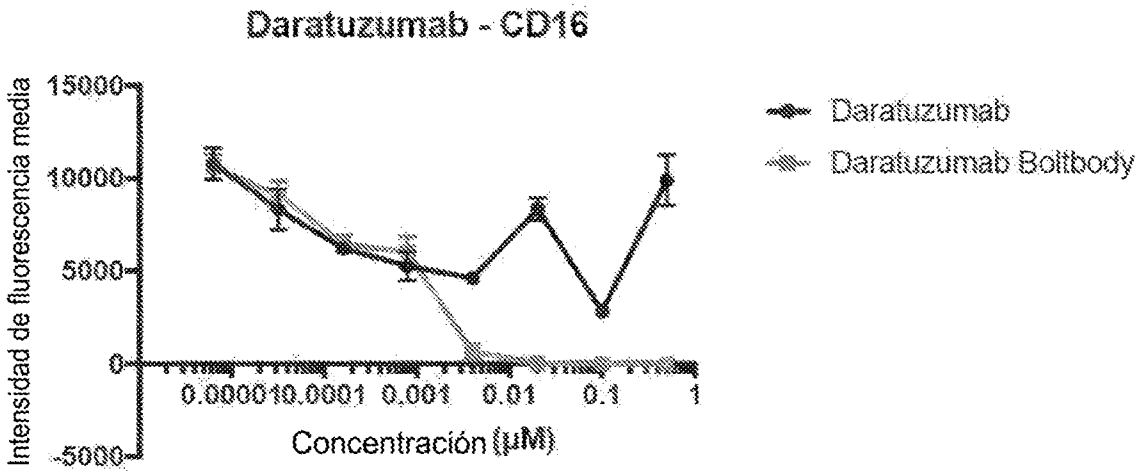


Fig. 73K

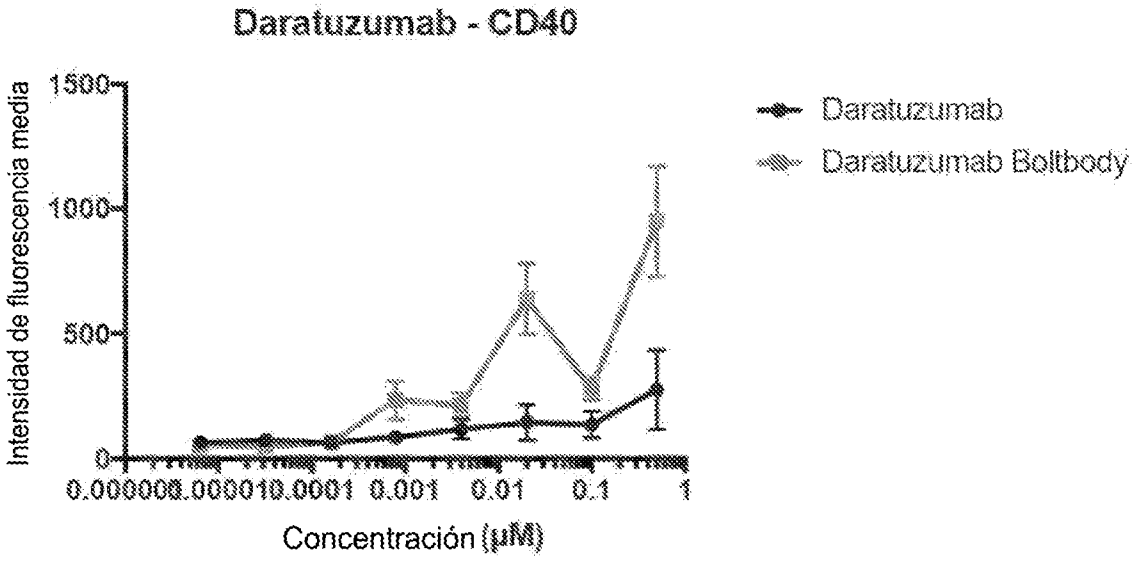


Fig. 73L

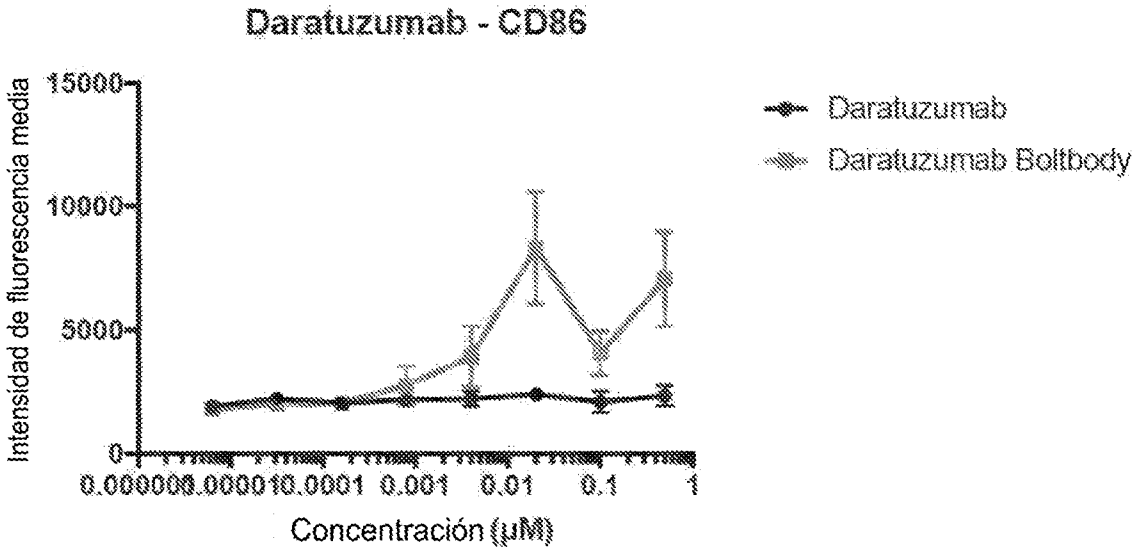


Fig. 73M

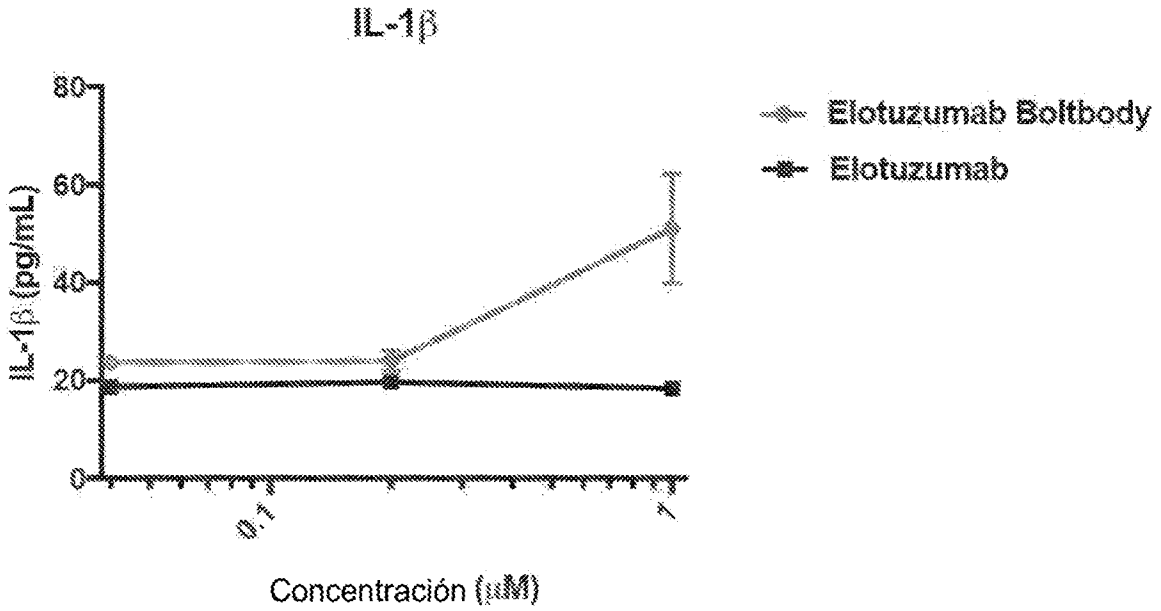


Fig. 74A

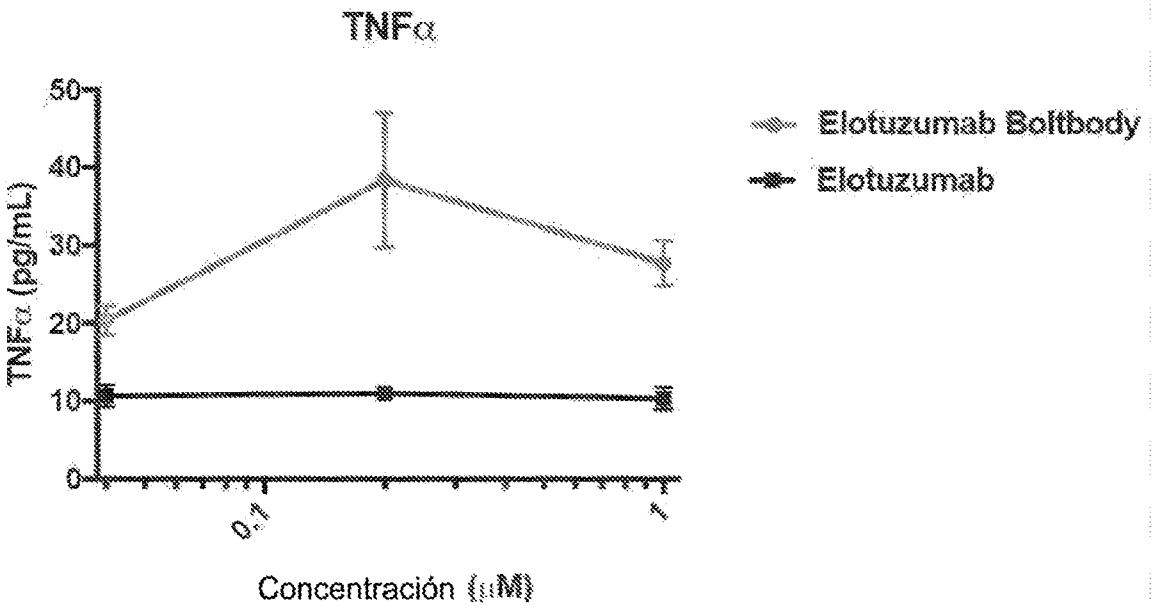


Fig. 74B

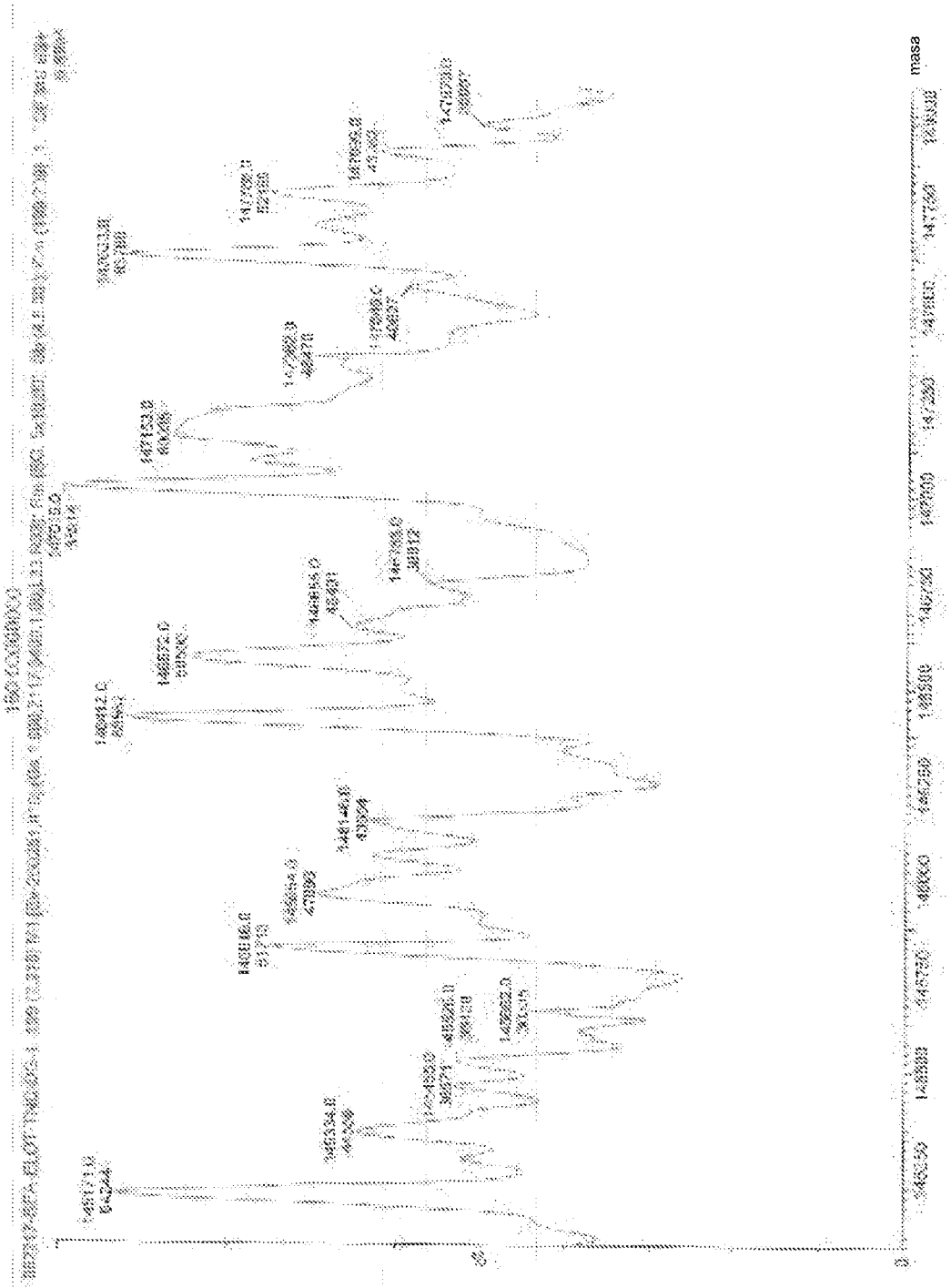


Fig. 74C

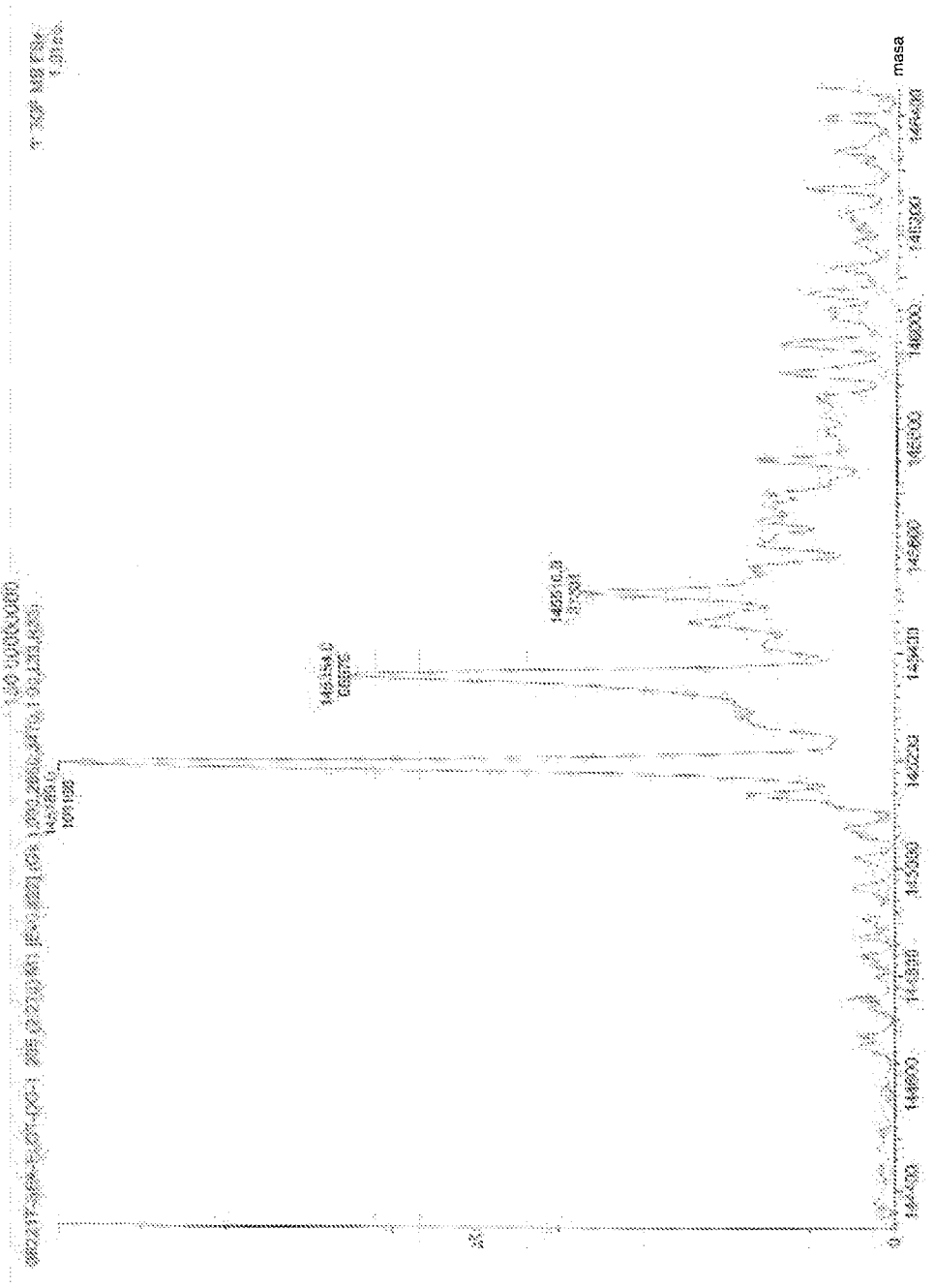


Fig. 74D

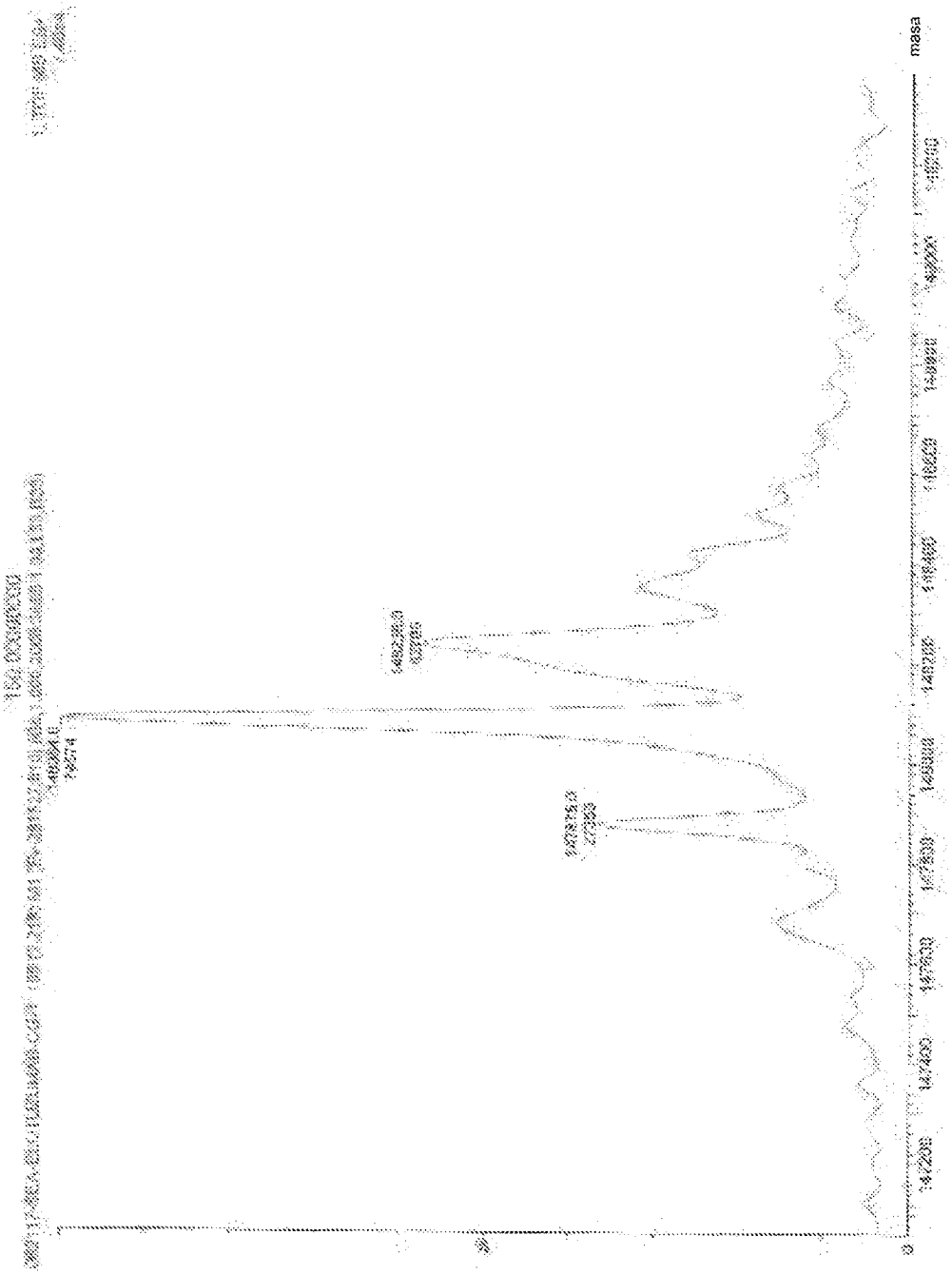


Fig. 74E

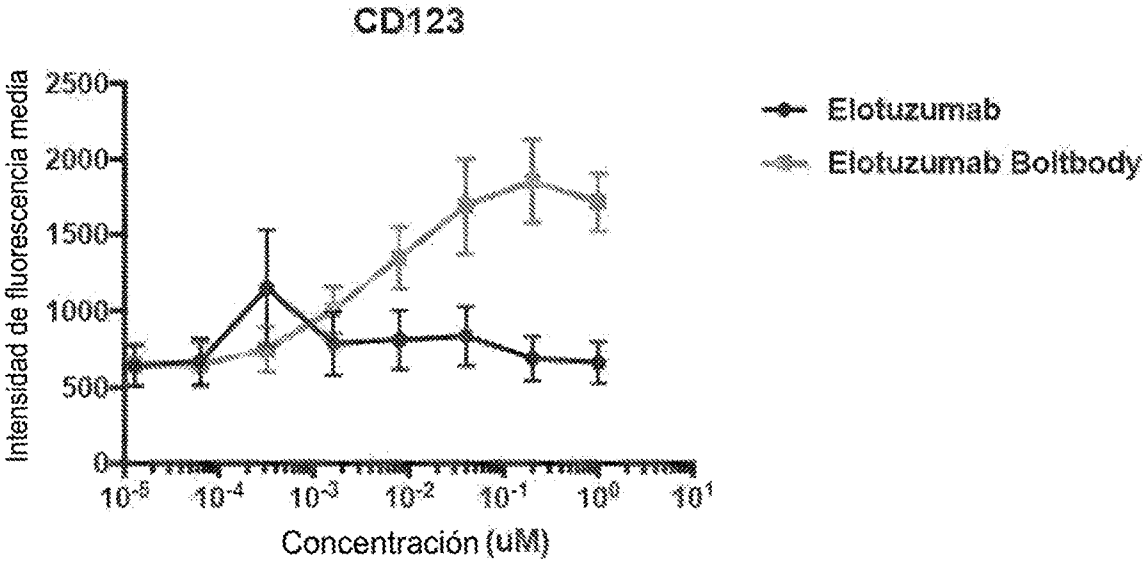


Fig. 74F

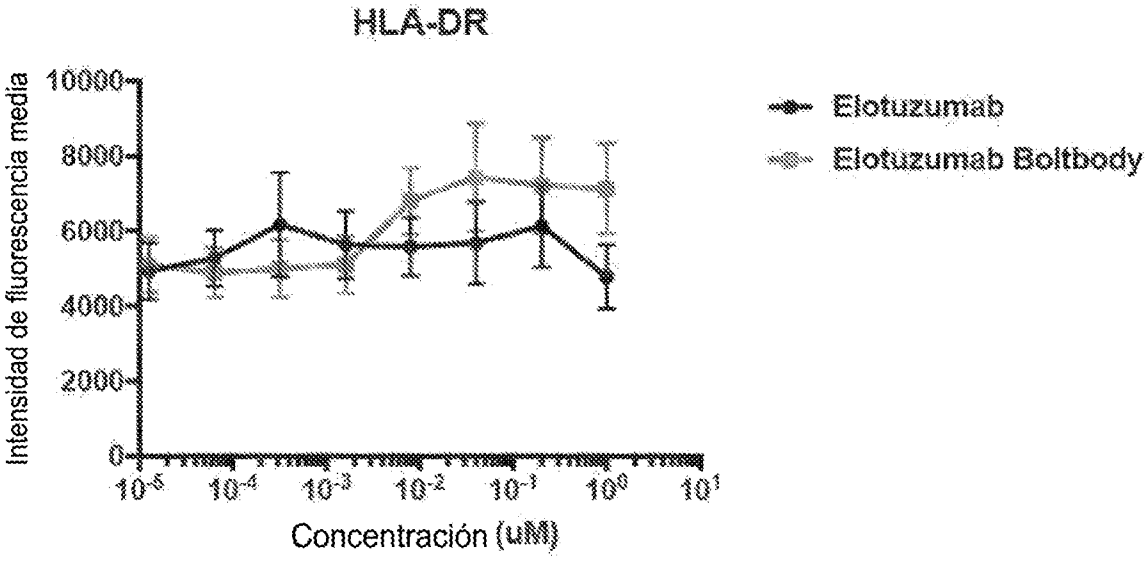


Fig. 74G

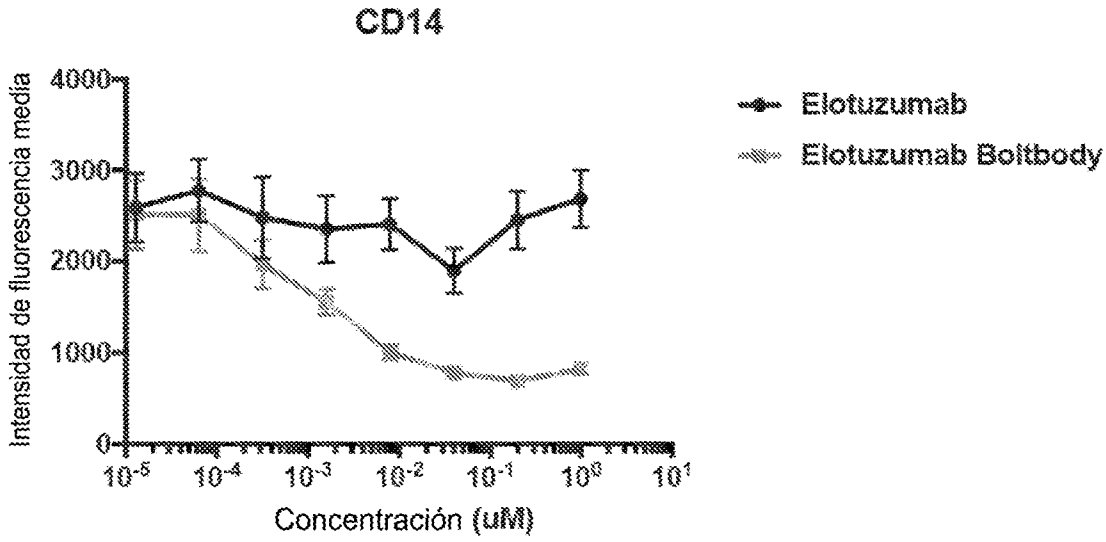


Fig. 74H

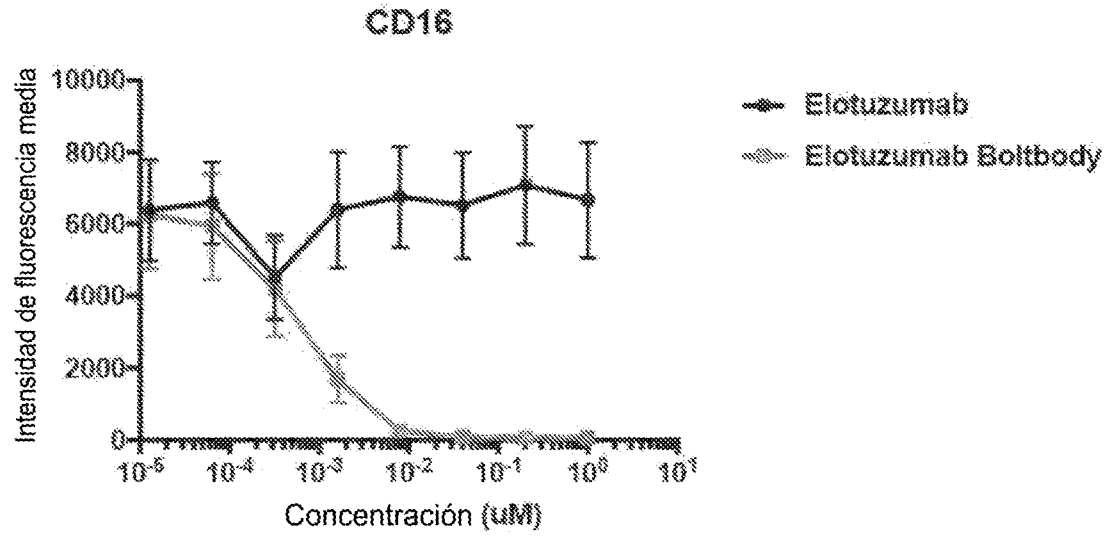


Fig. 74I

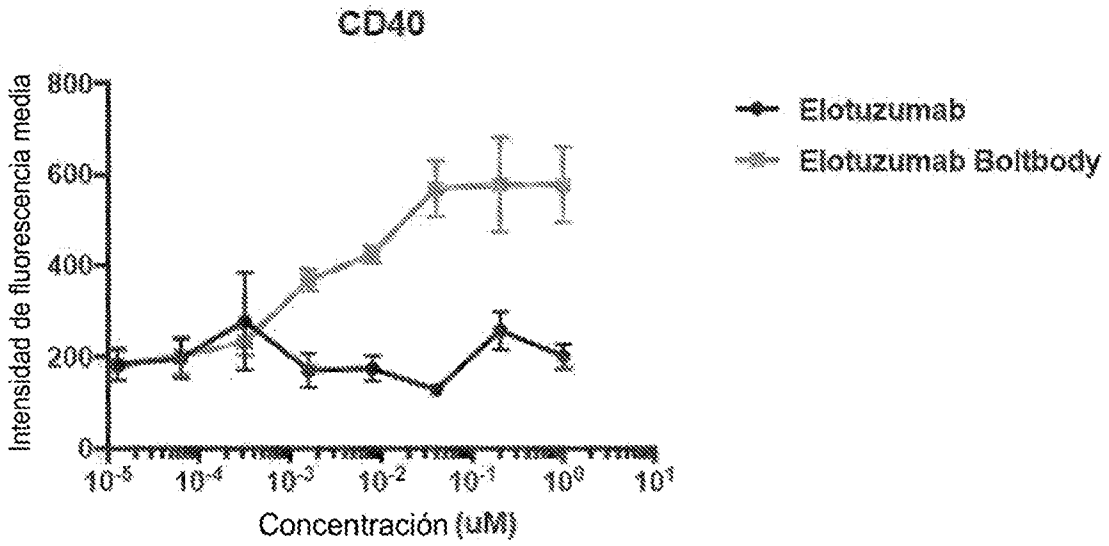


Fig. 74J

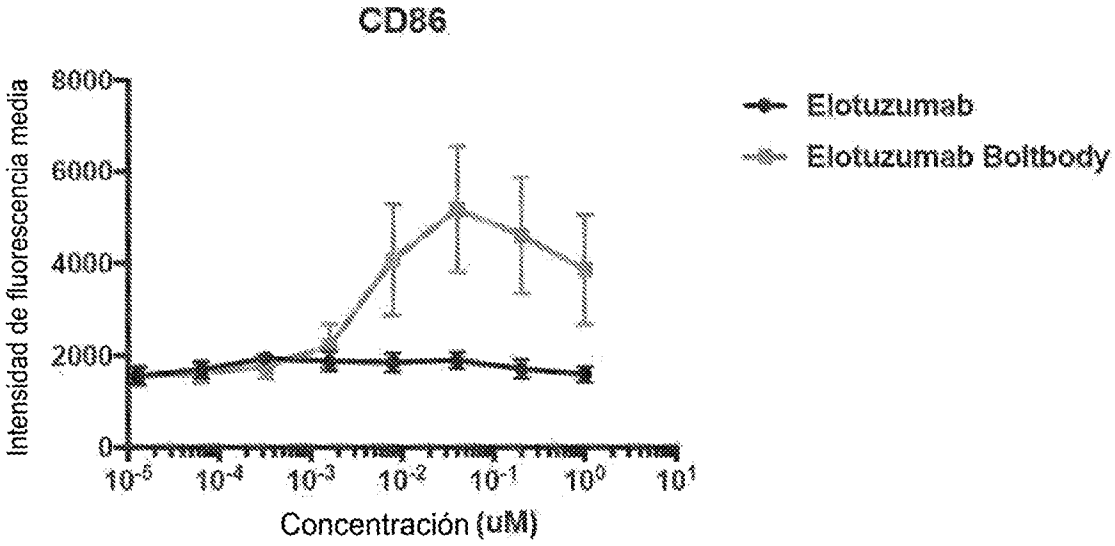


Fig. 74K

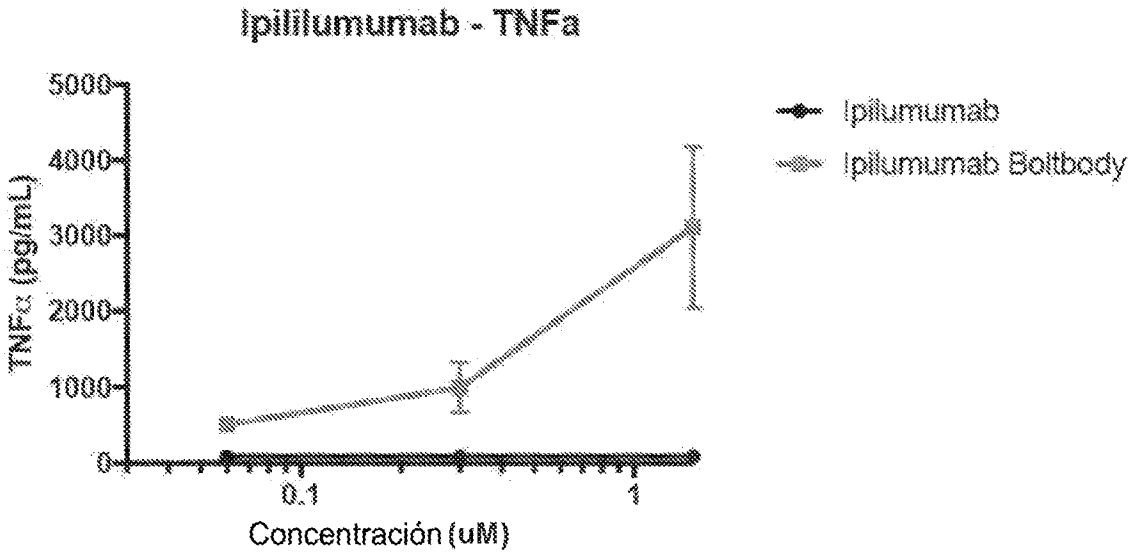

Ipilimumab - TNFa
5000
4000
3000
2000
1000
0
TNFα (pg/mL)
0.1
1
Concentración (uM)
Ipilimumab
Ipilimumab Boltbody

Fig. 75A

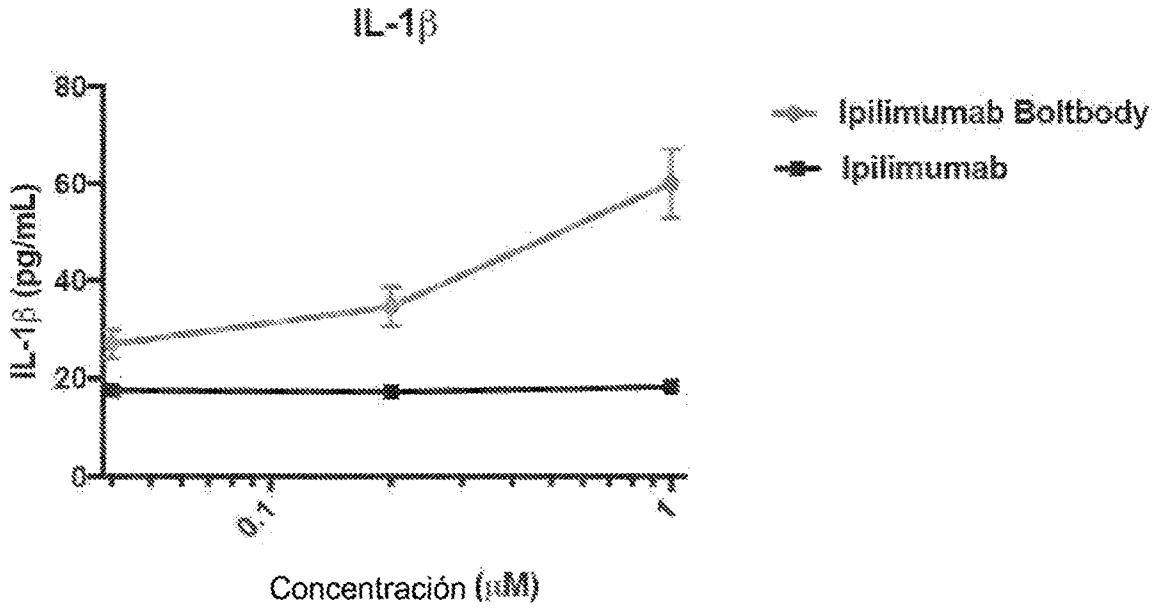


Fig. 75B

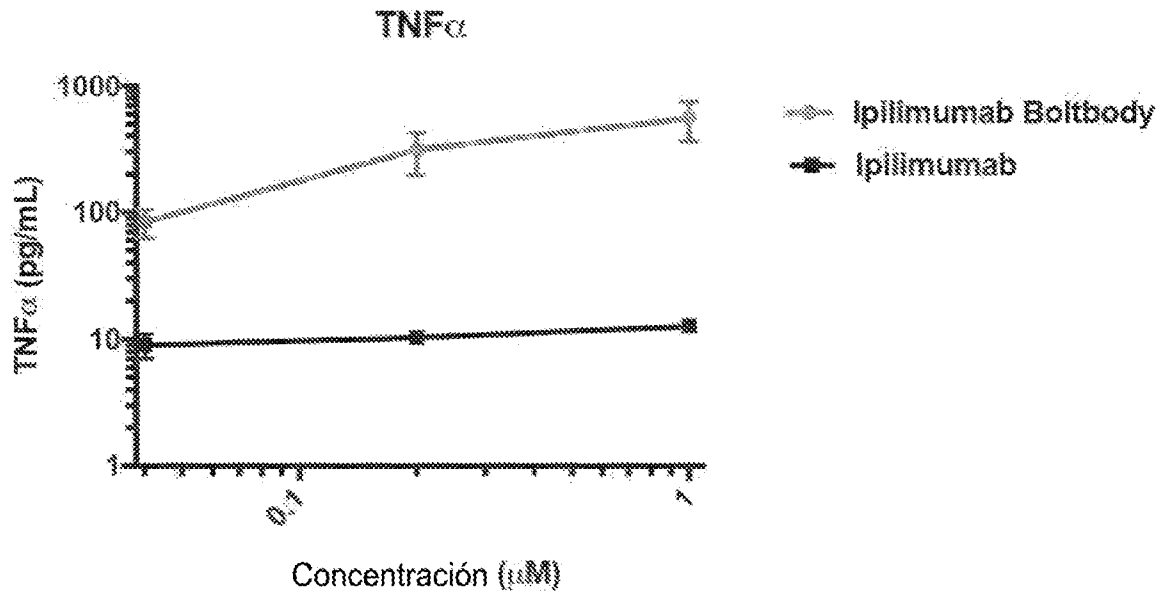


Fig. 75C

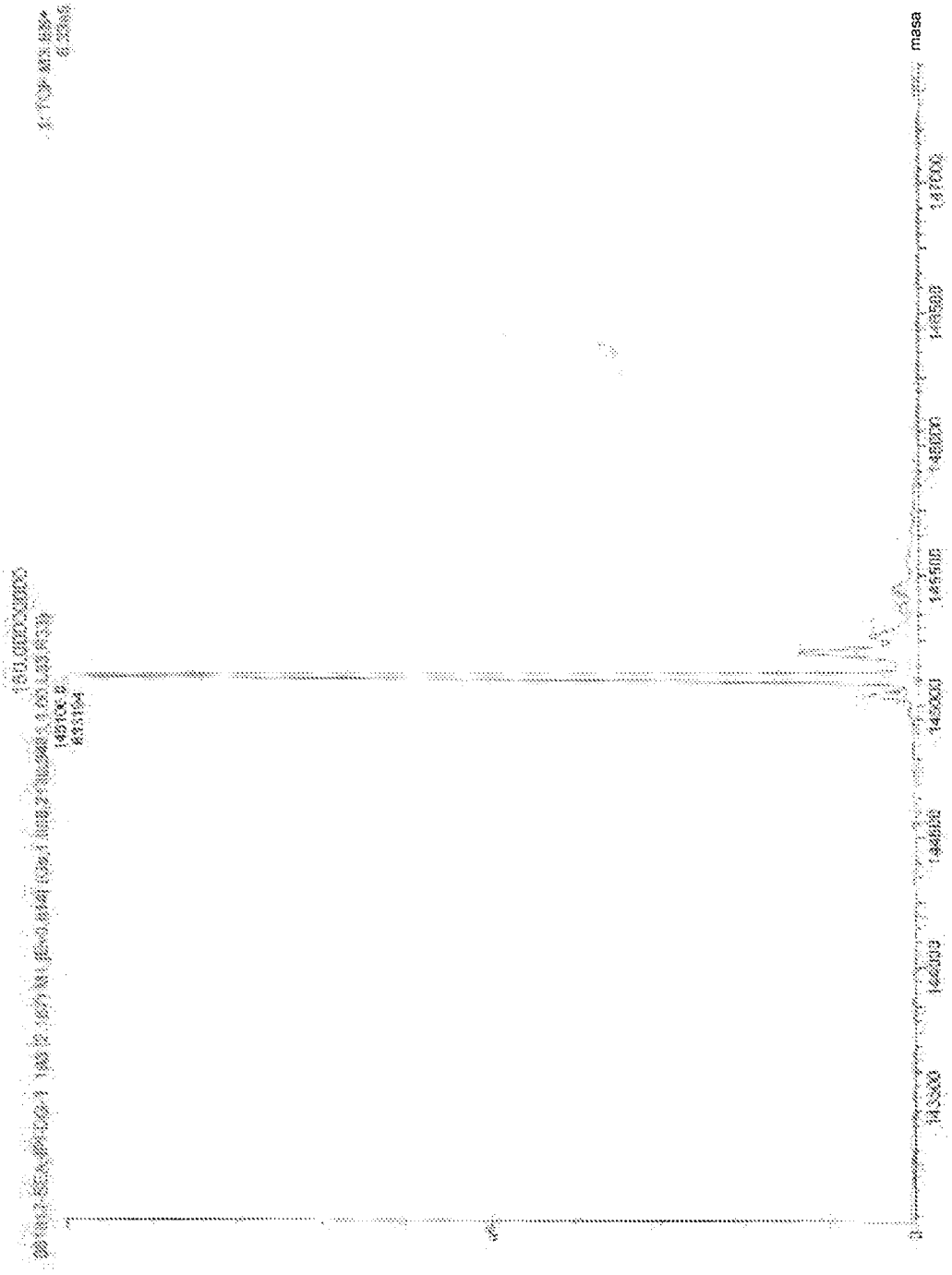


Fig. 75D

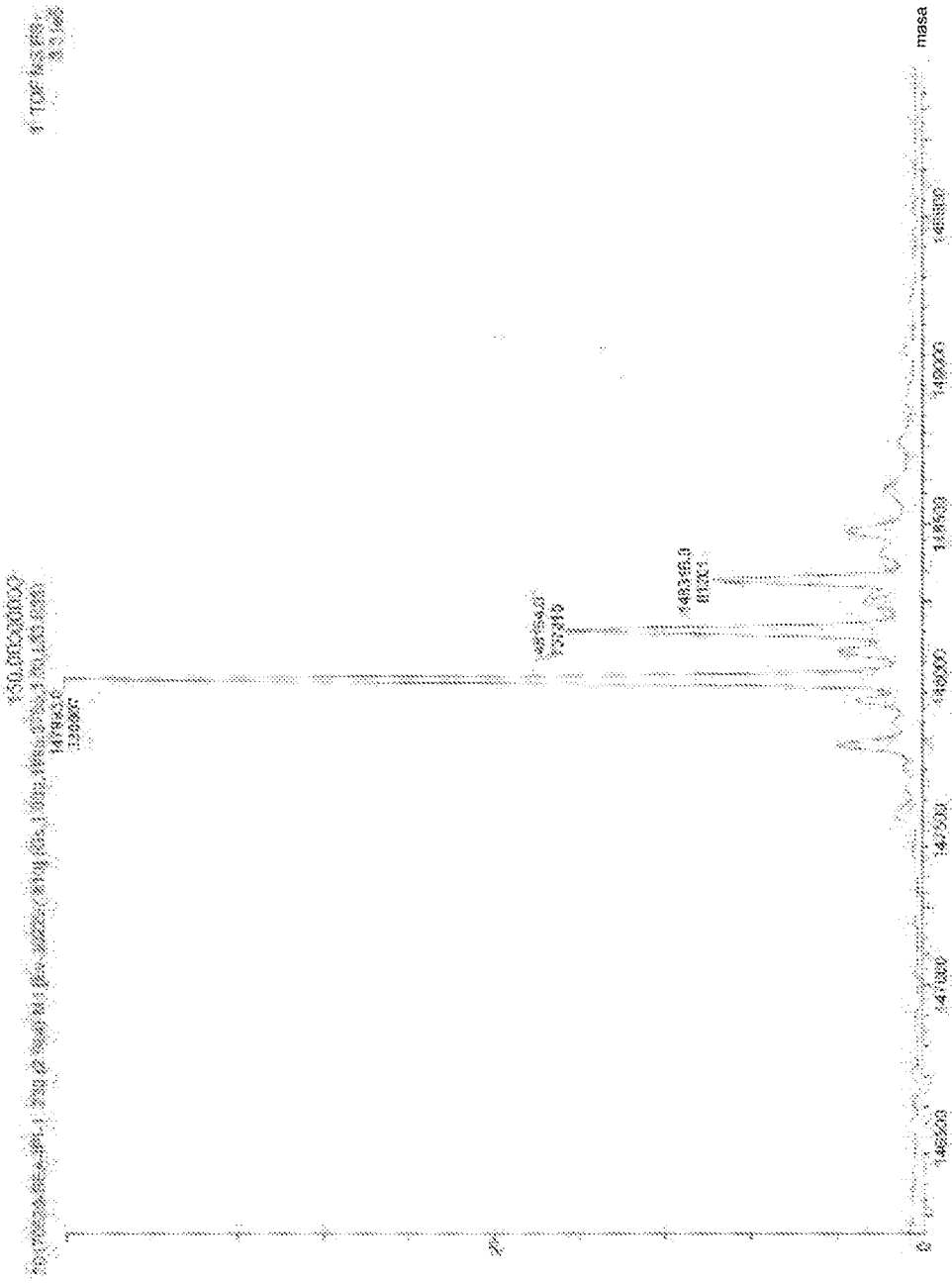


Fig. 75E

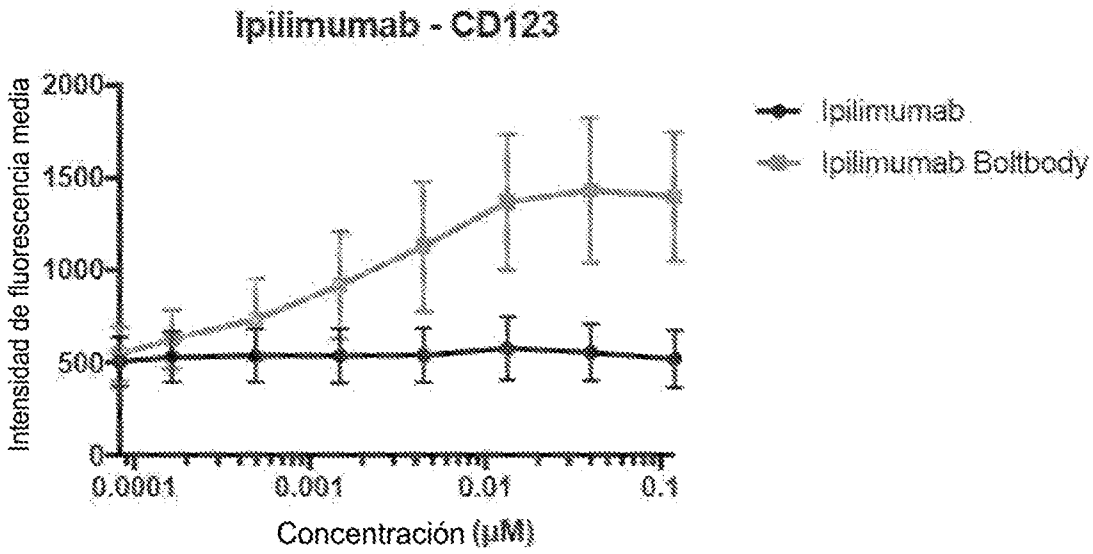


Fig. 75F

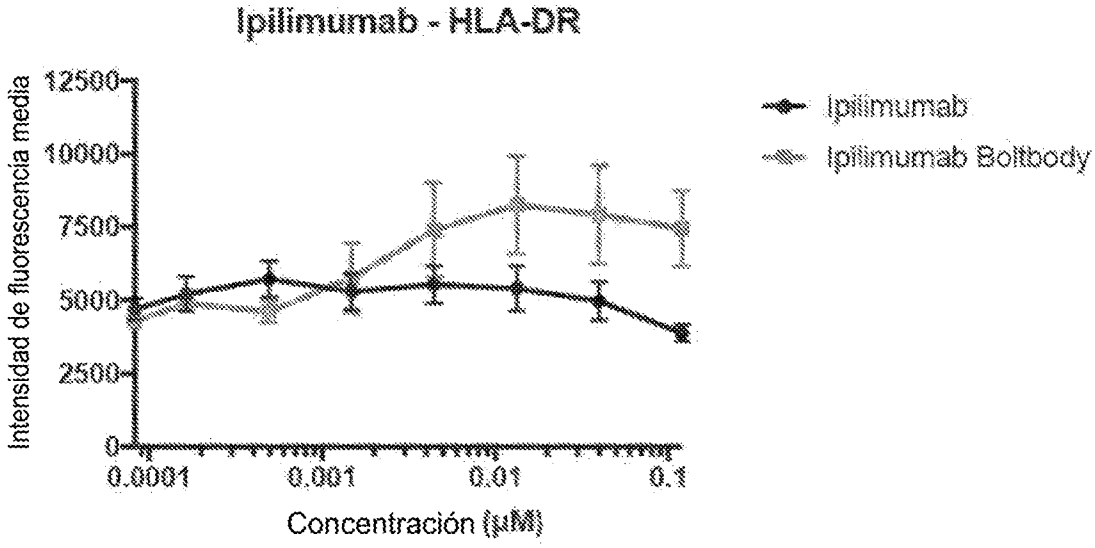


Fig. 75G

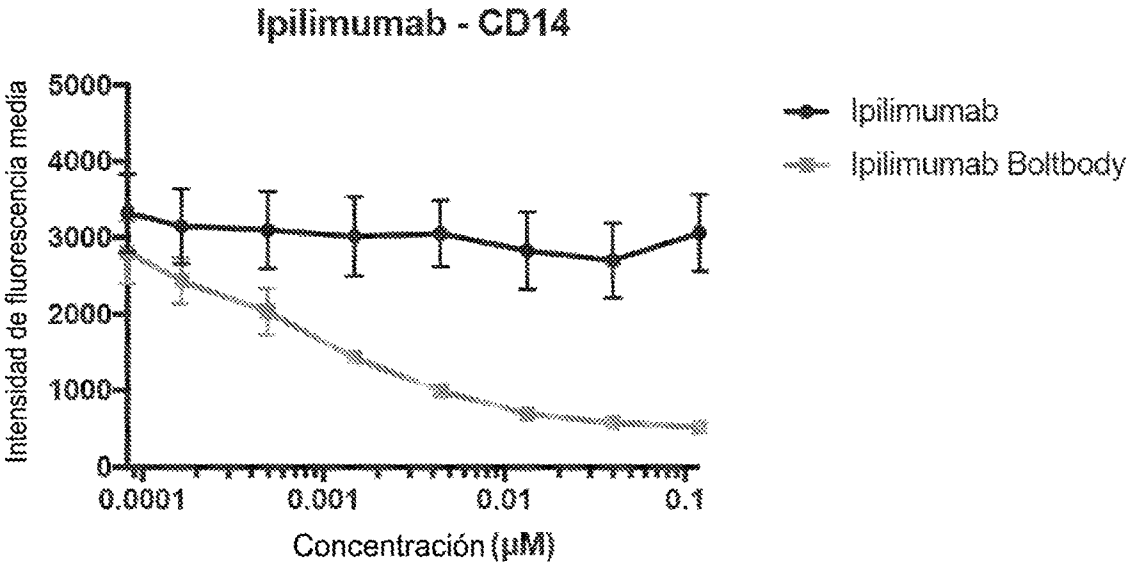


Fig. 75H

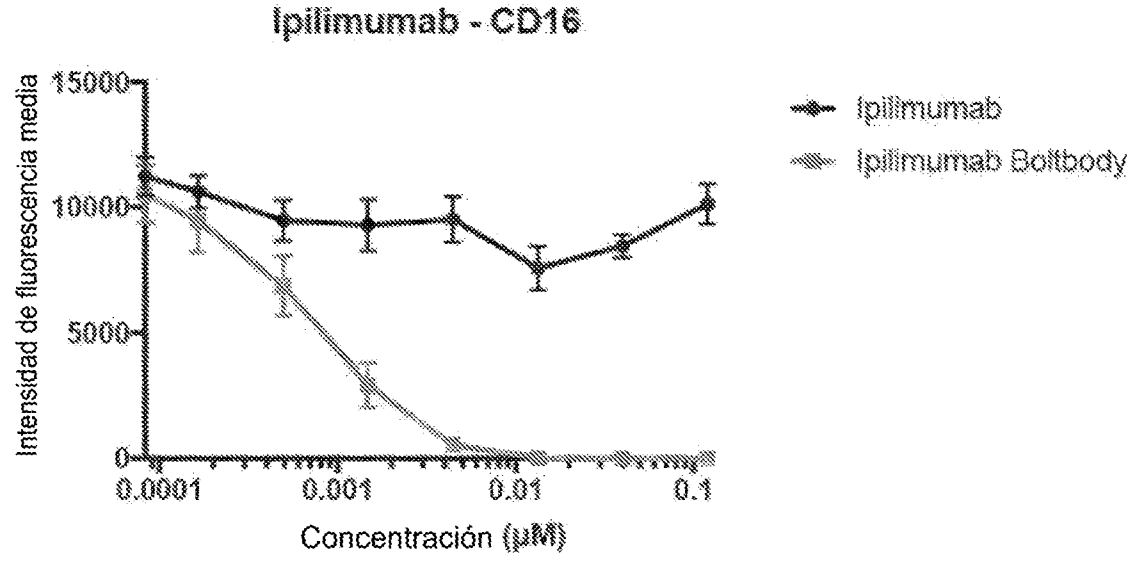


Fig. 75I

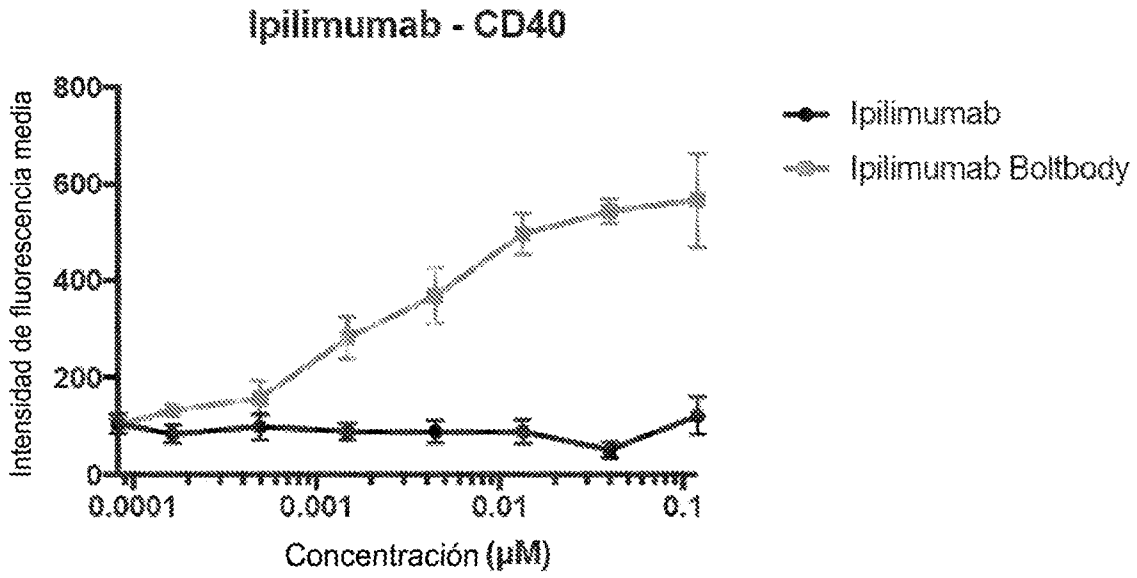


Fig. 75J

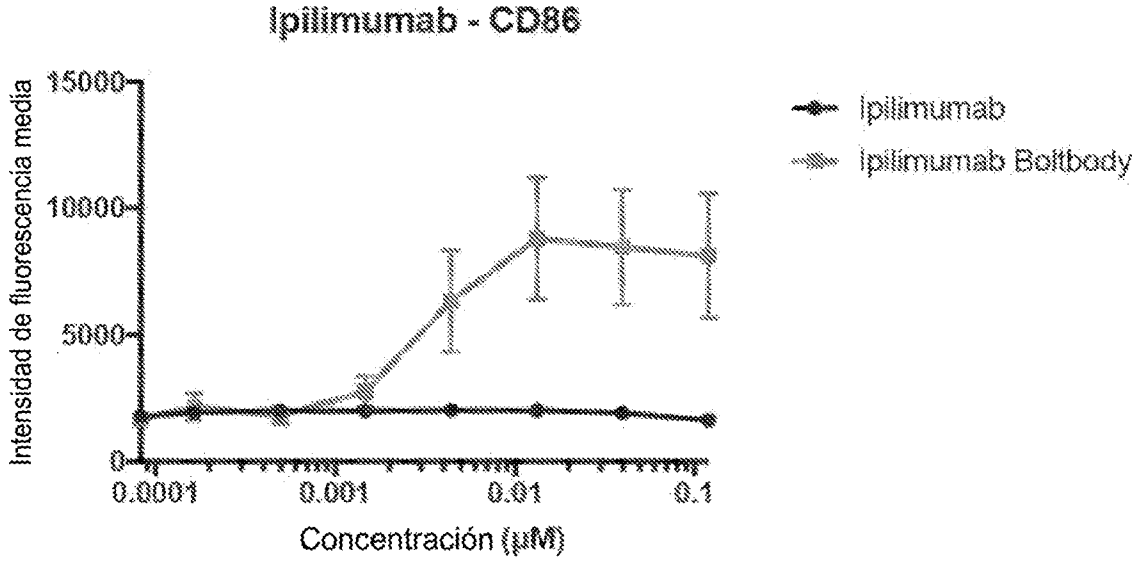


Fig. 75K

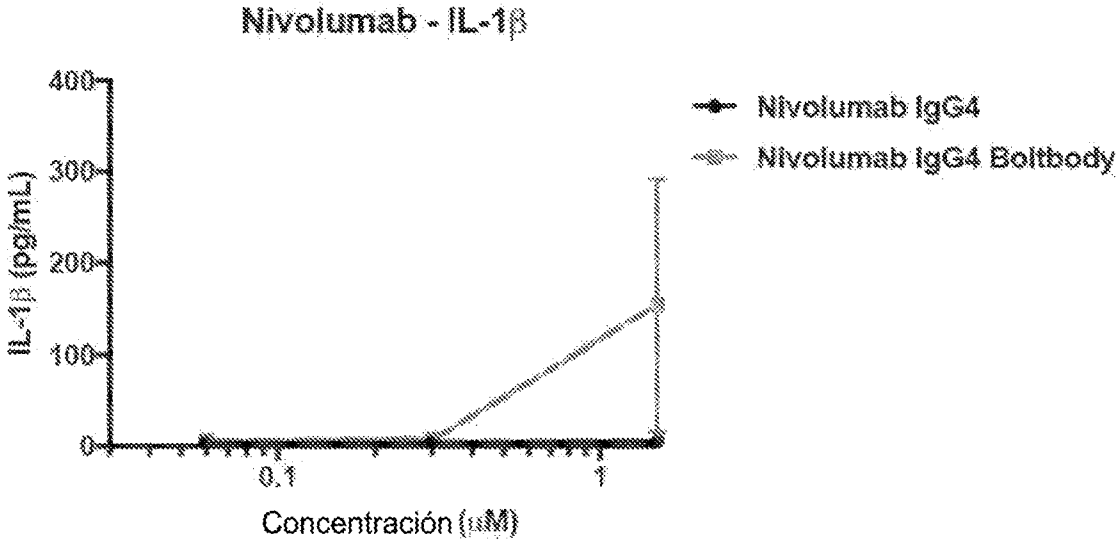


Fig. 76A

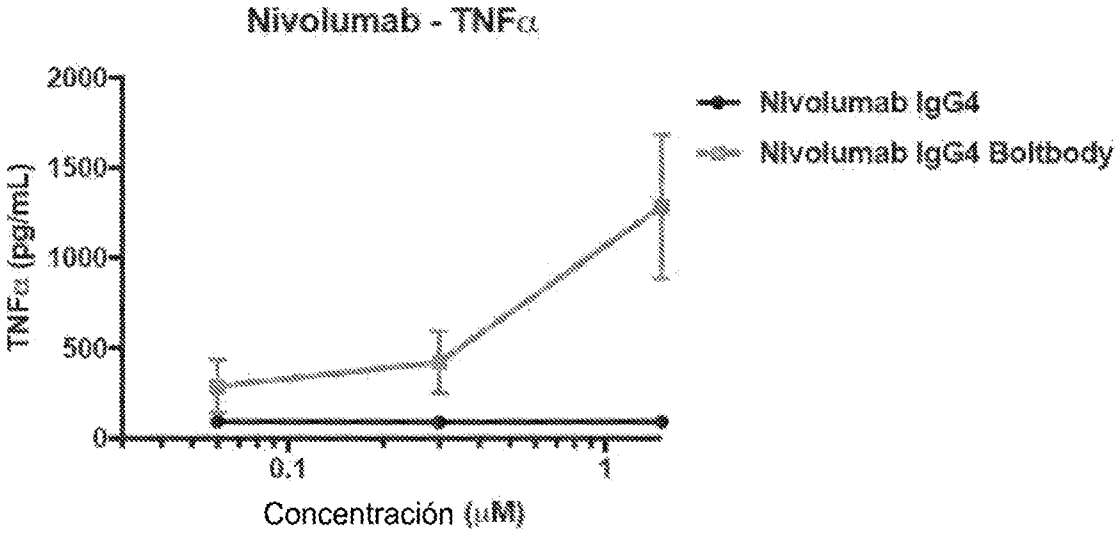


Fig. 76B

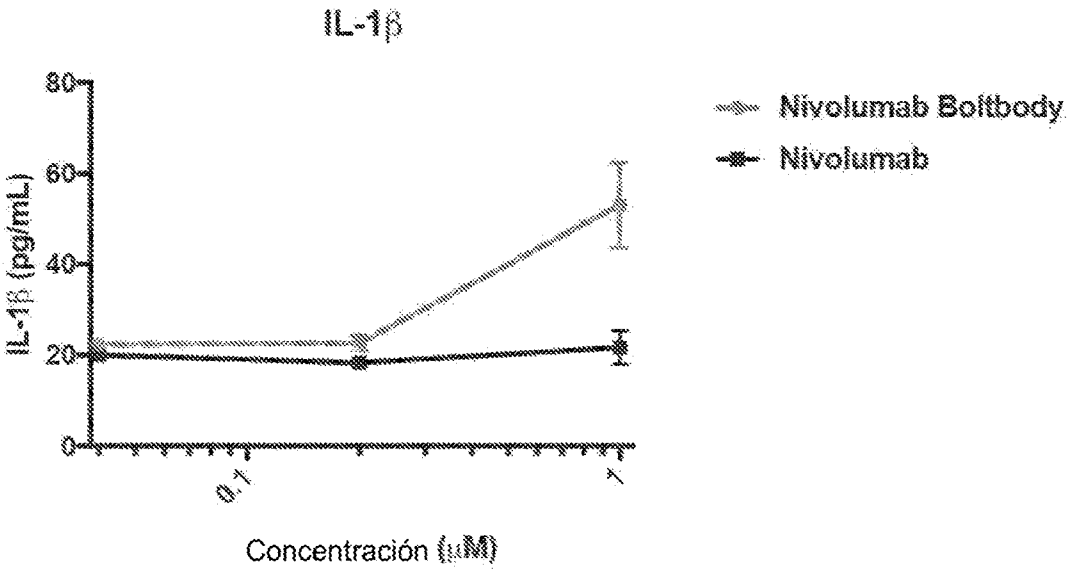


Fig. 76C

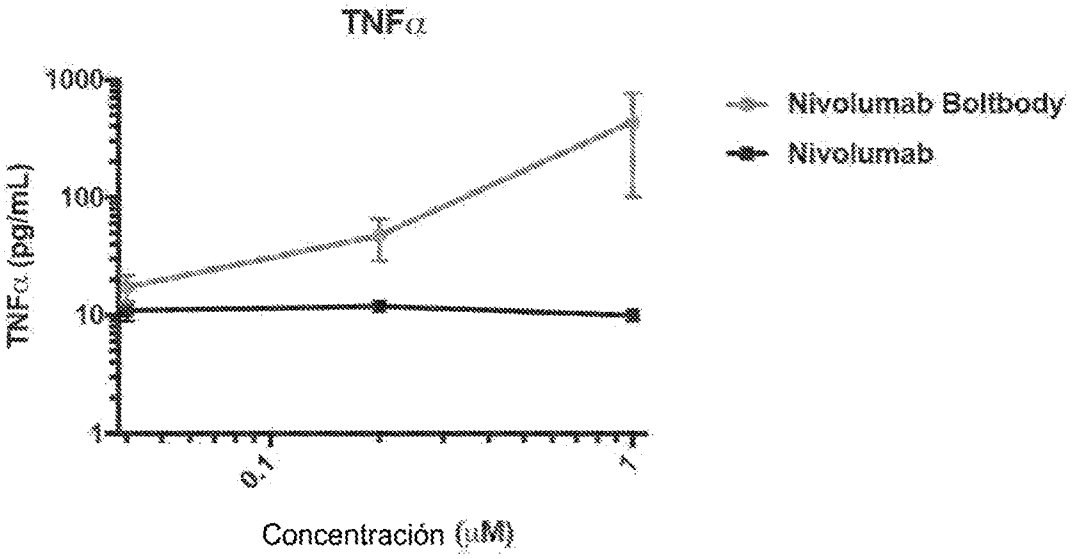


Fig. 76D

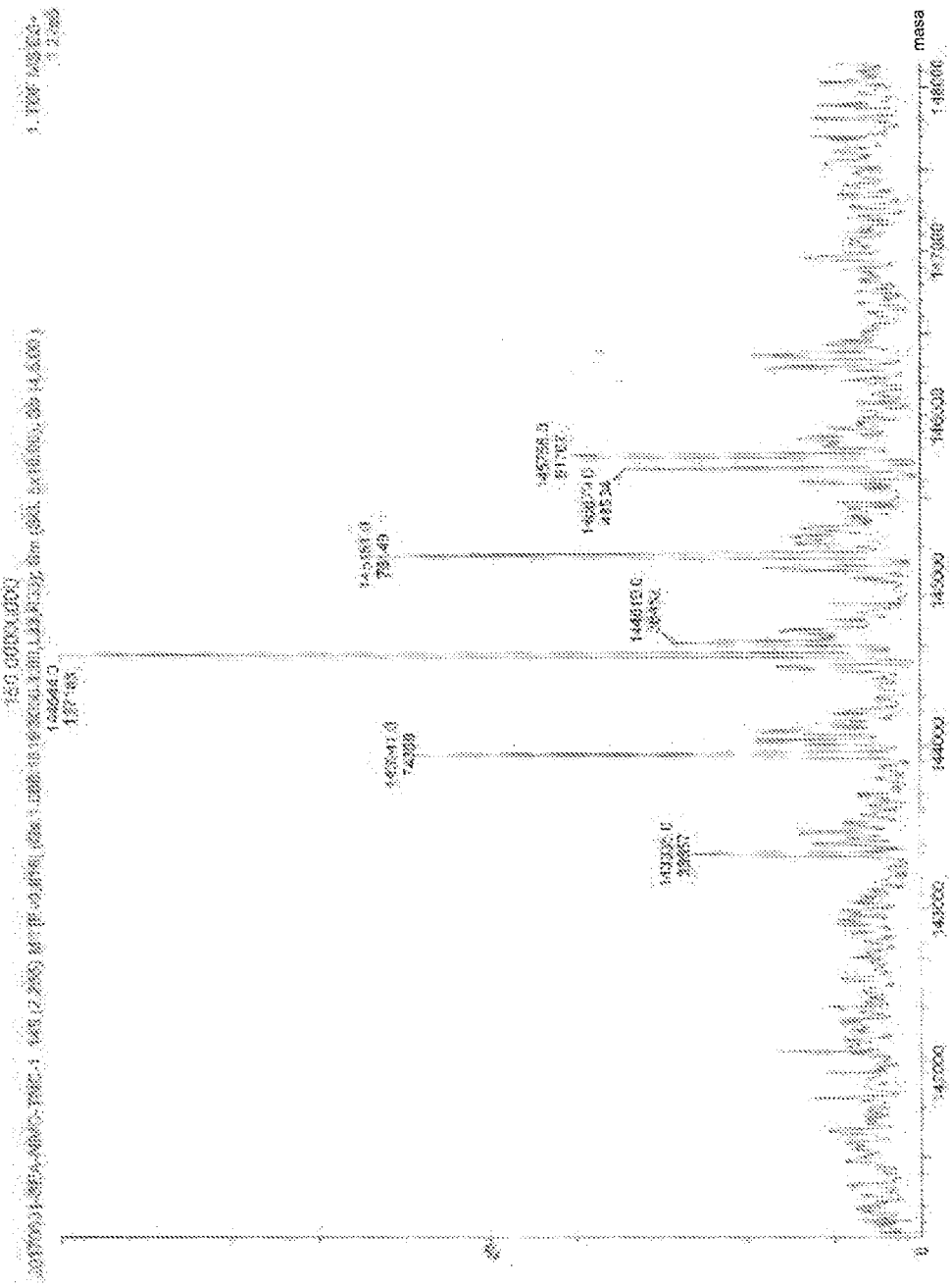


Fig. 76E

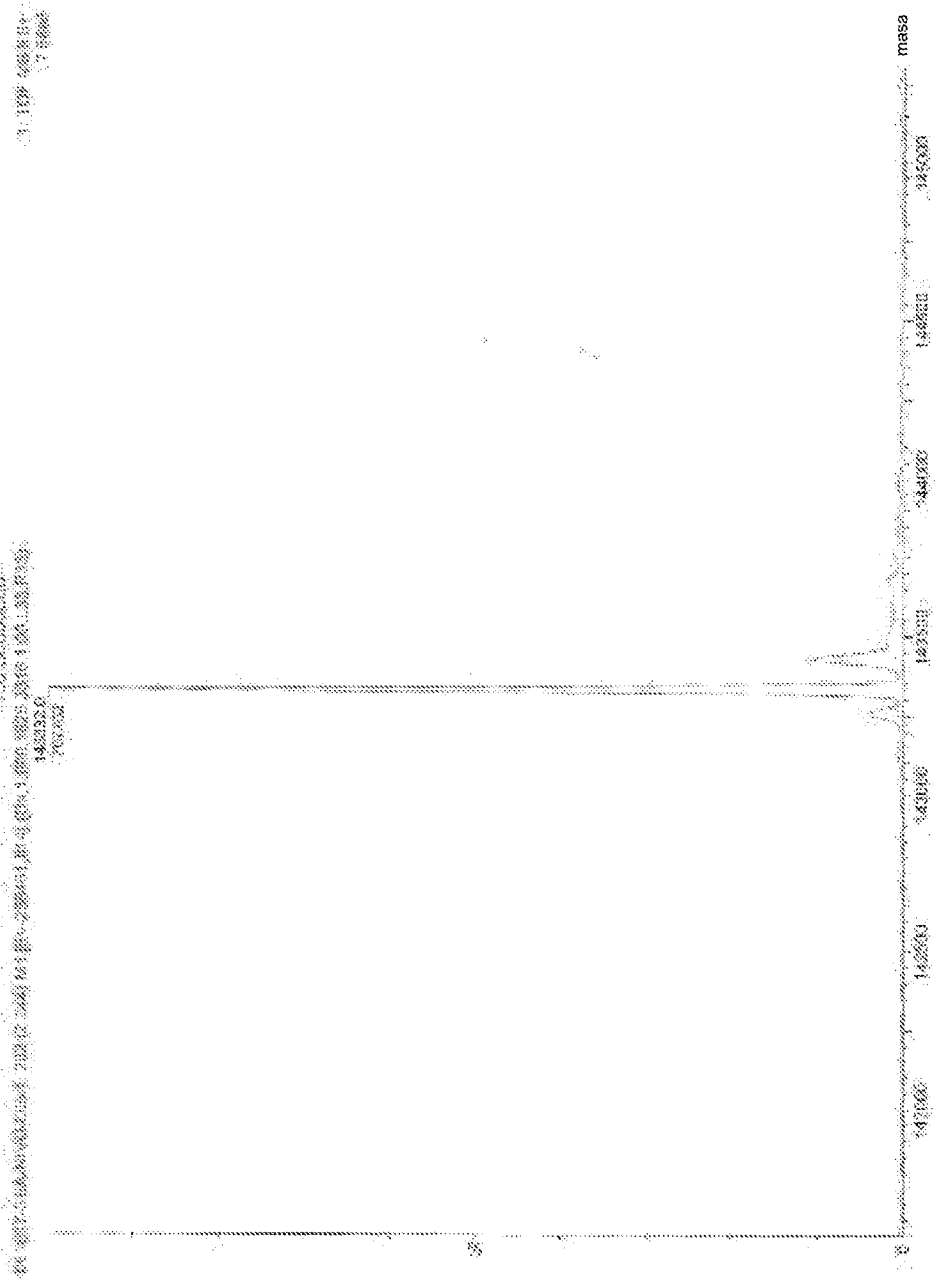


Fig. 76F

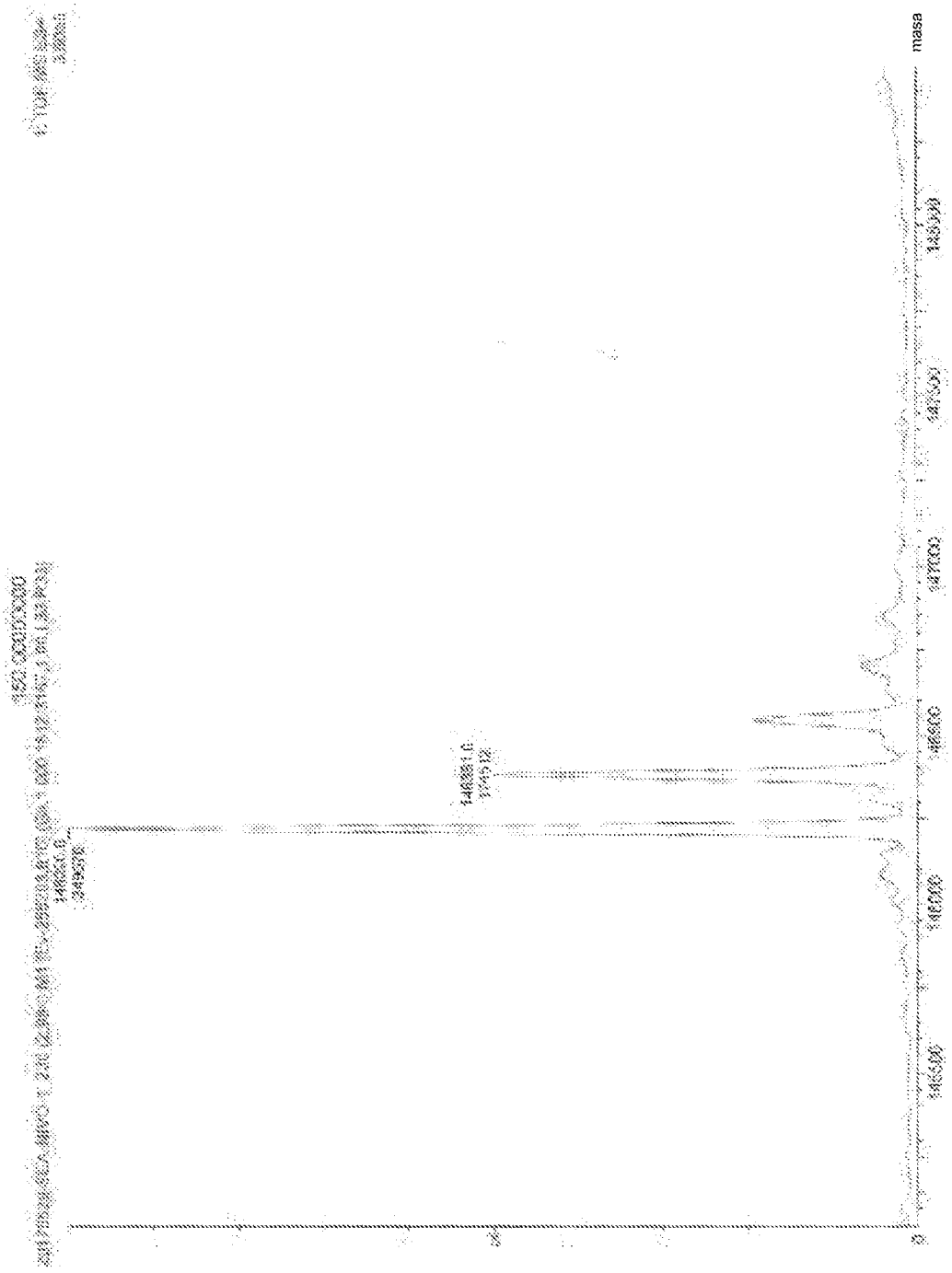


Fig. 76G

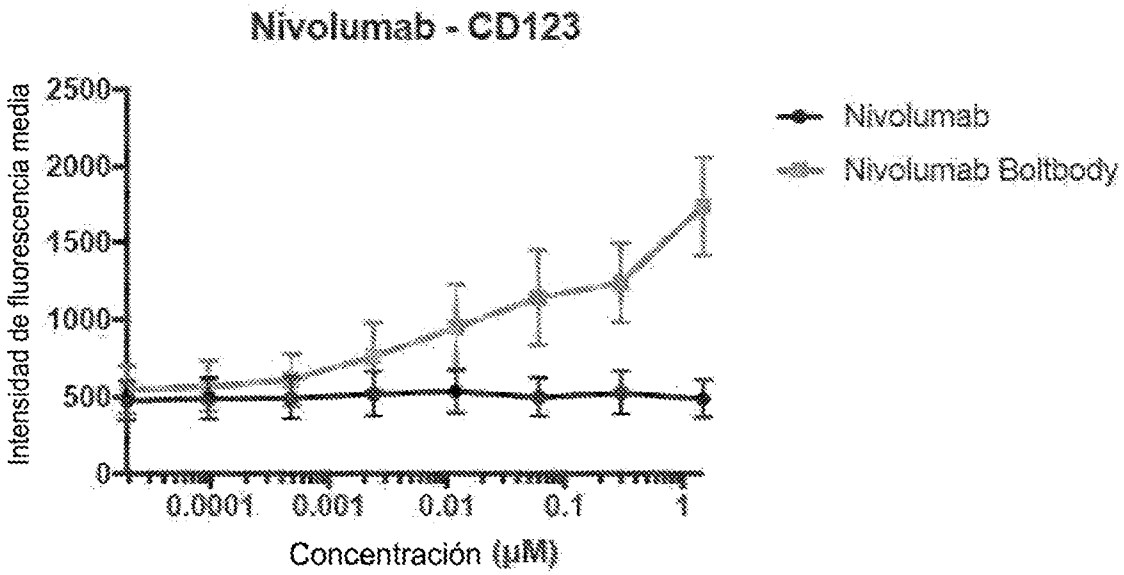


Fig. 76H

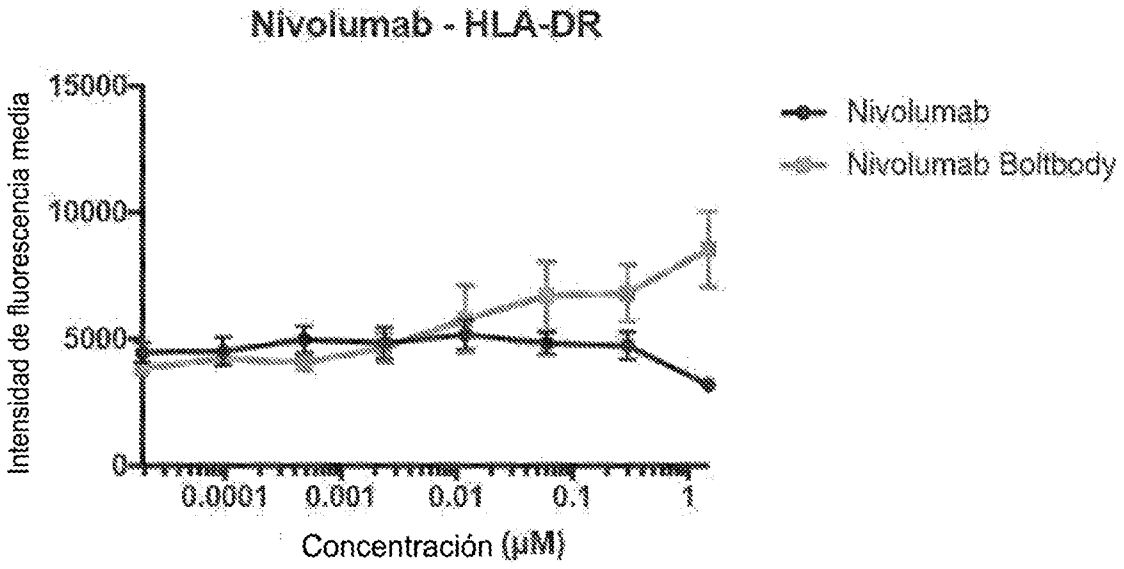


Fig. 76I

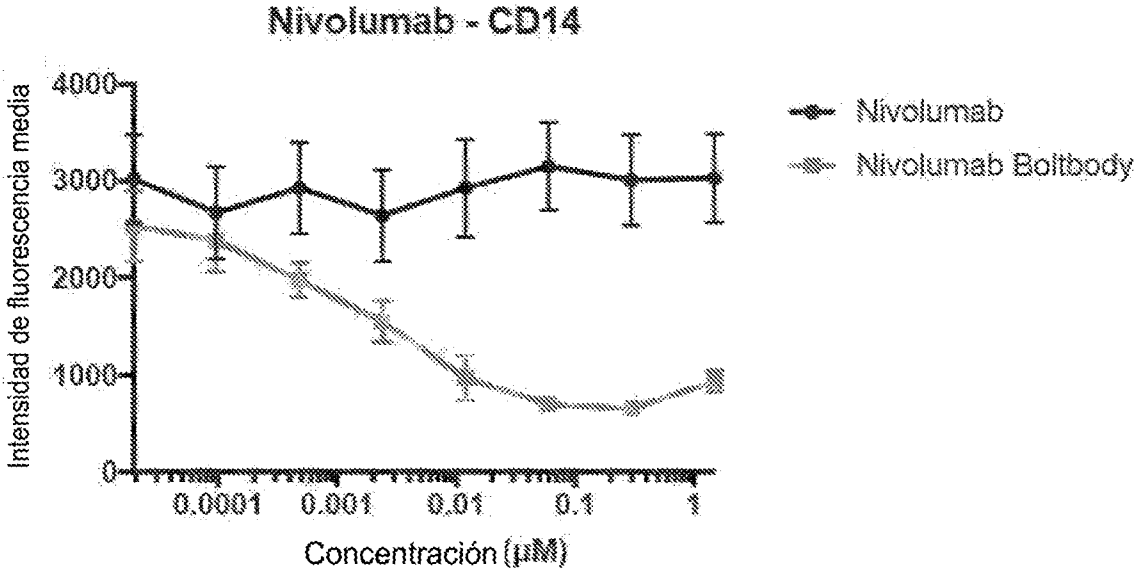


Fig. 76J

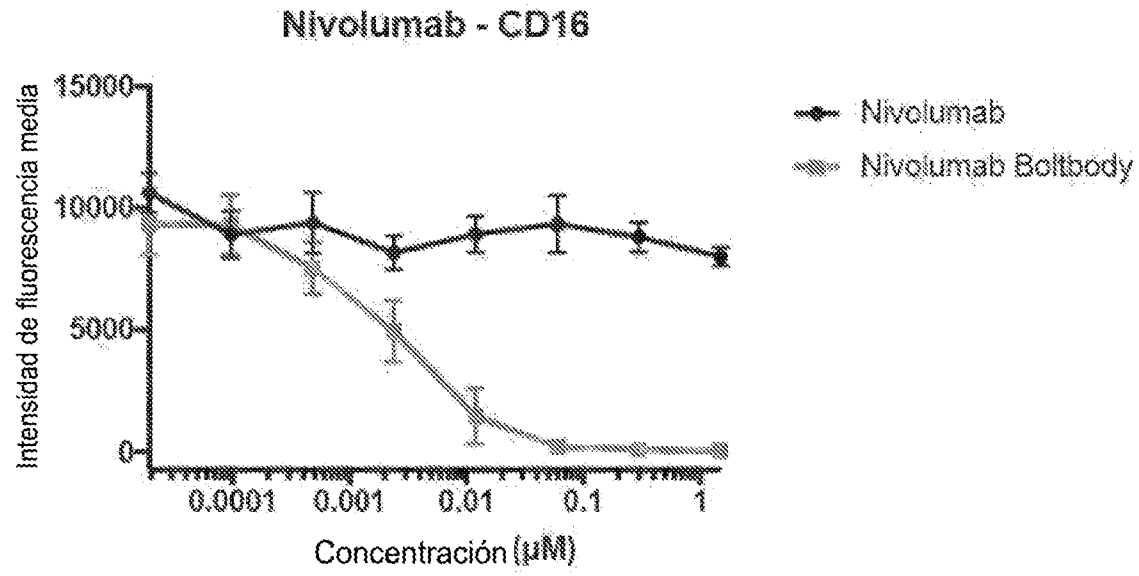


Fig. 76K

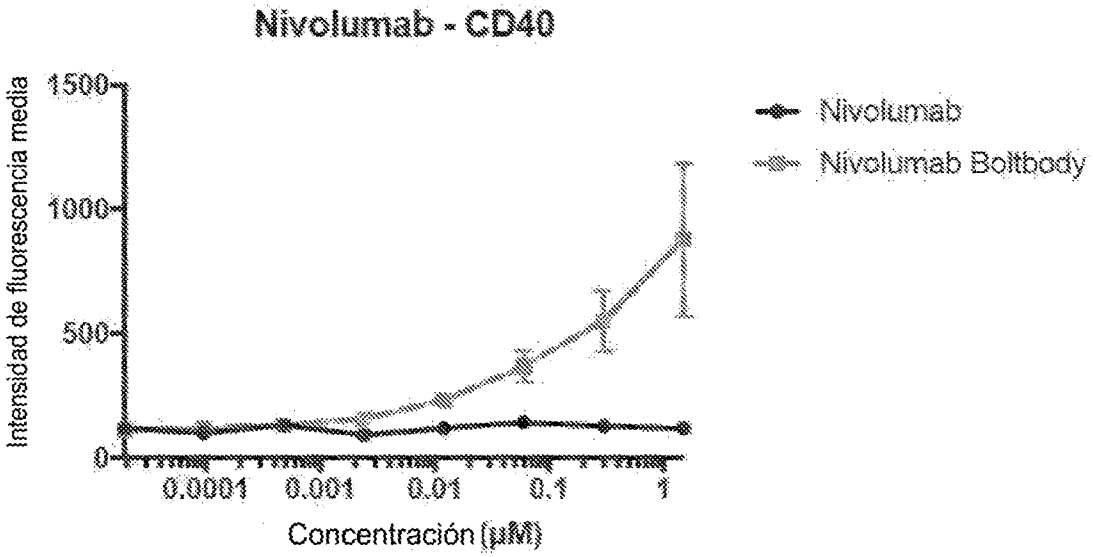


Fig. 76L

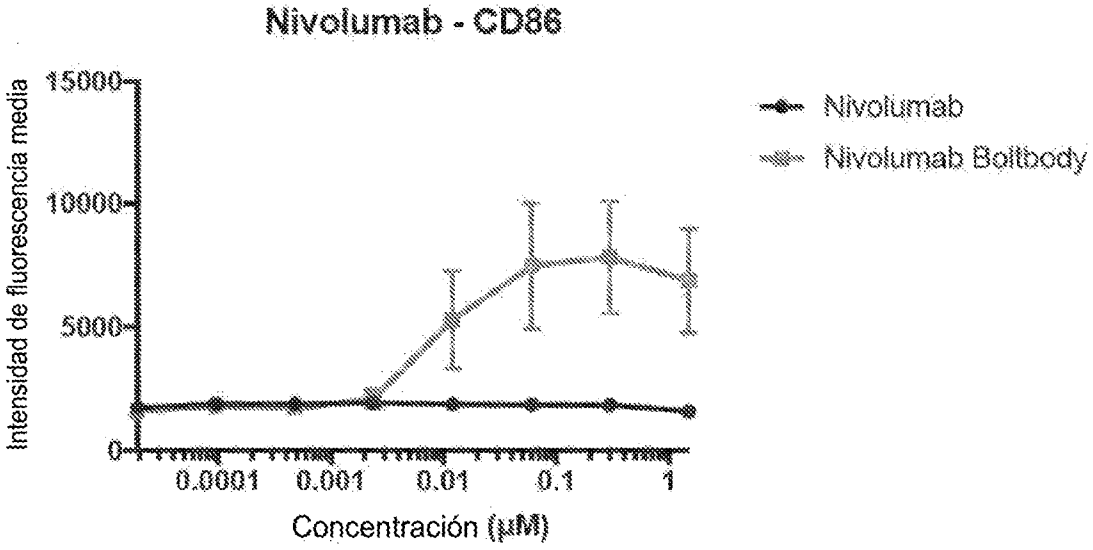


Fig. 76M

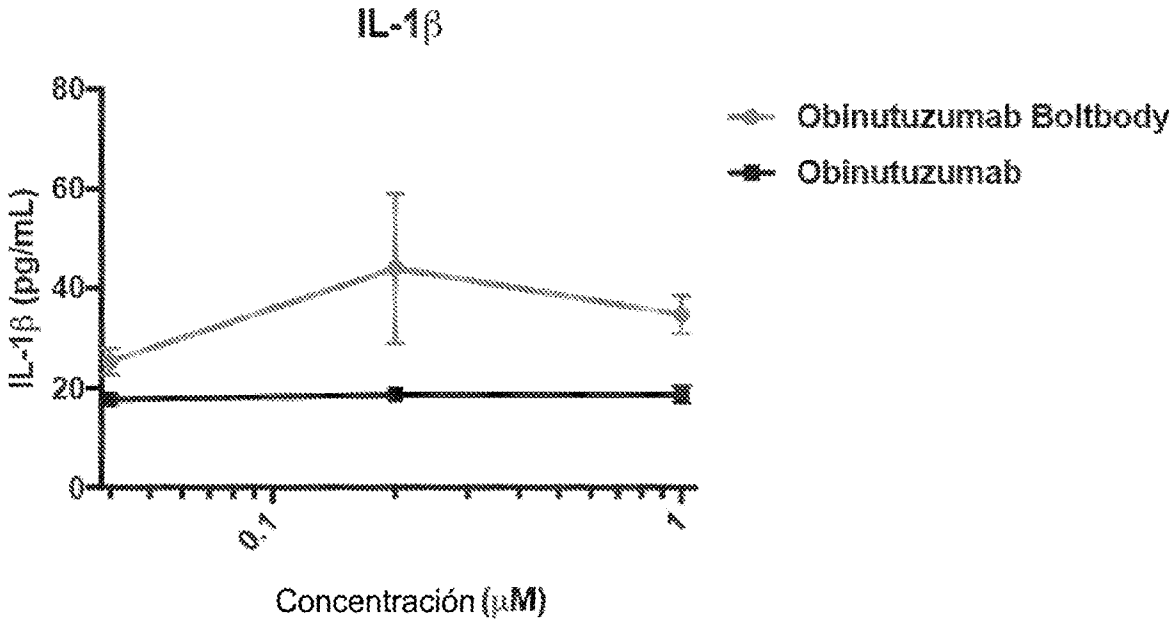


Fig. 77A

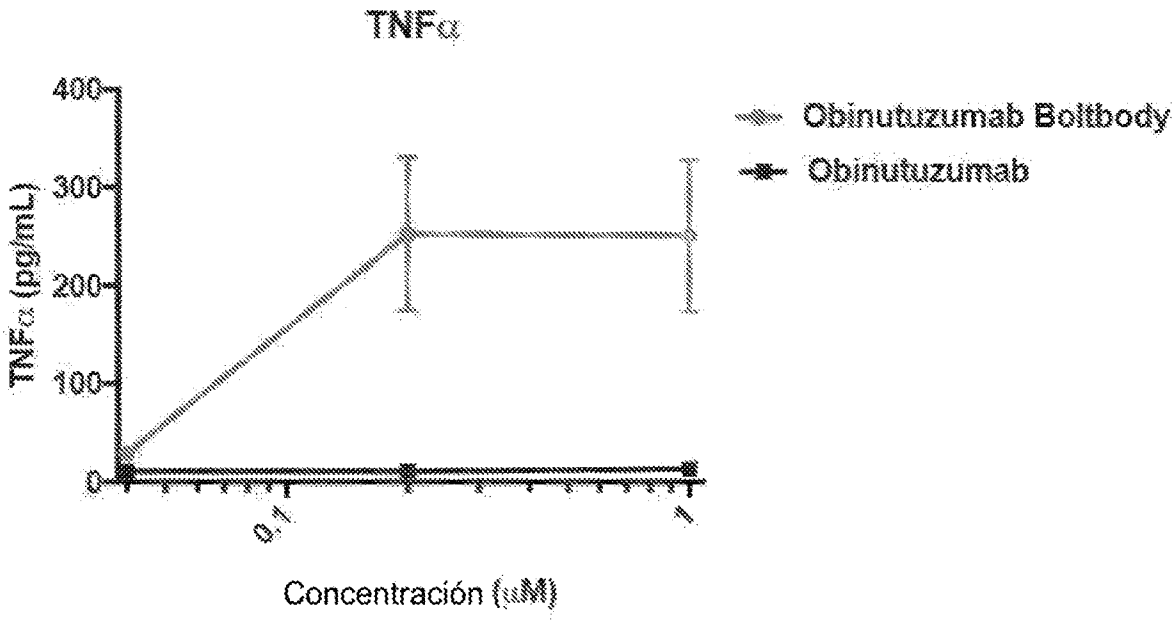


Fig. 77B

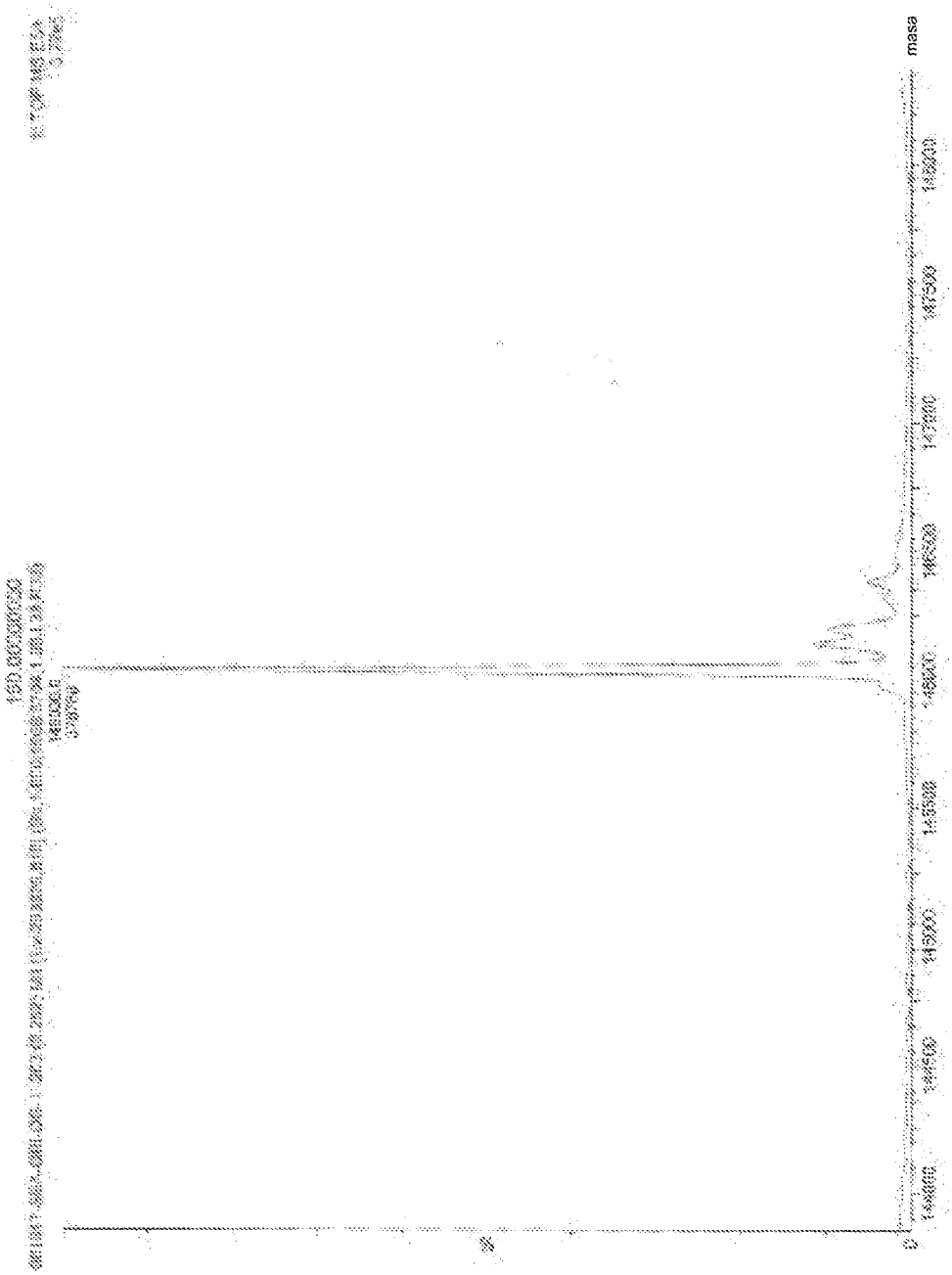


Fig. 77C

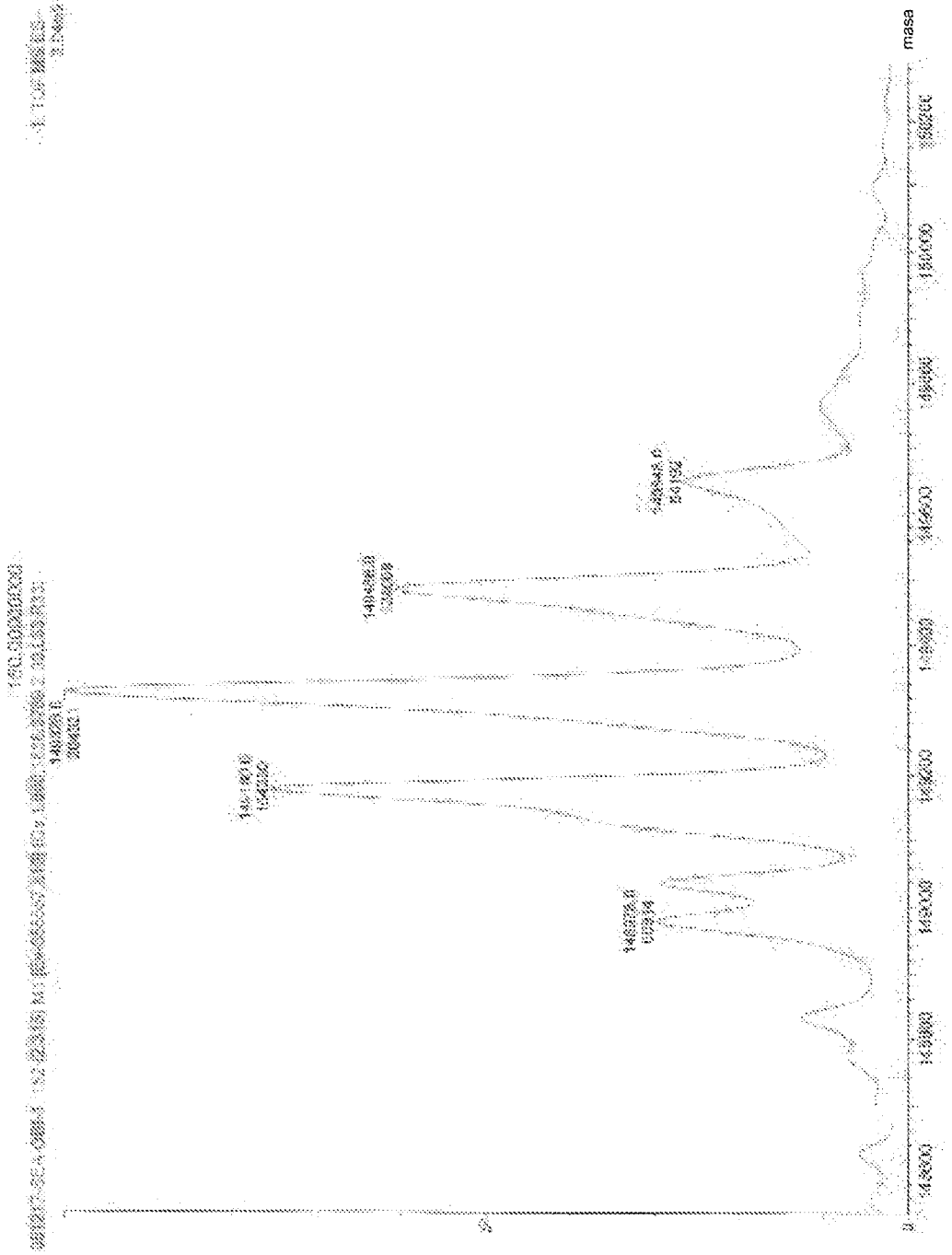


Fig. 77D

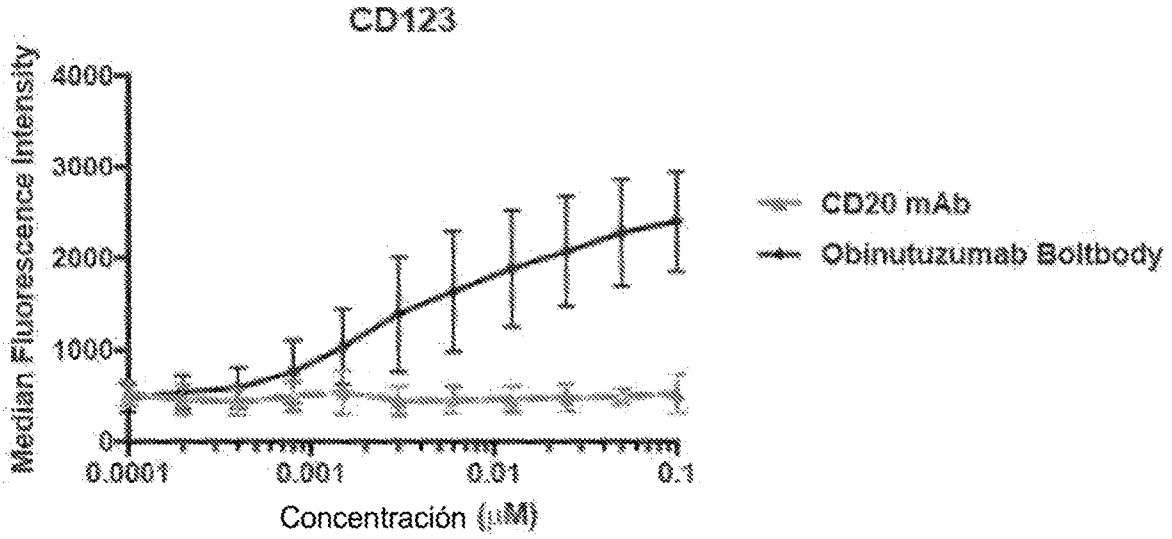


Fig. 77E

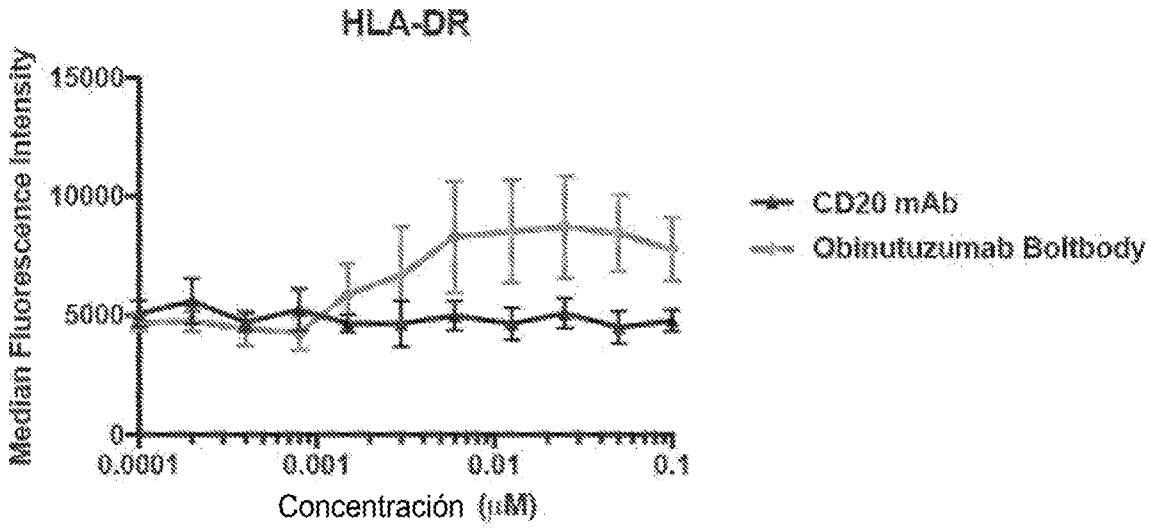


Fig. 77F

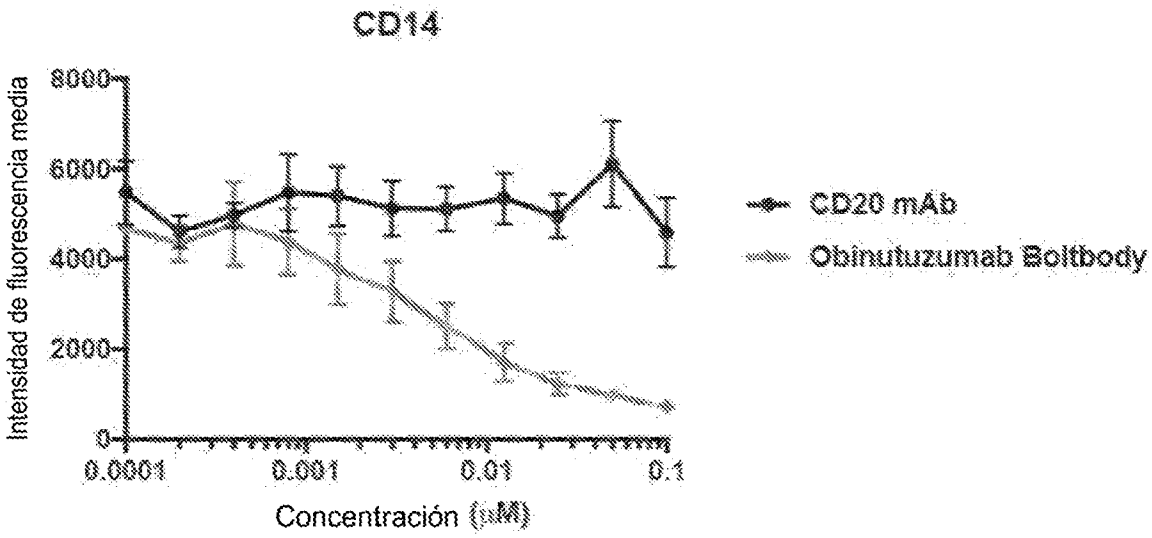


Fig. 77G

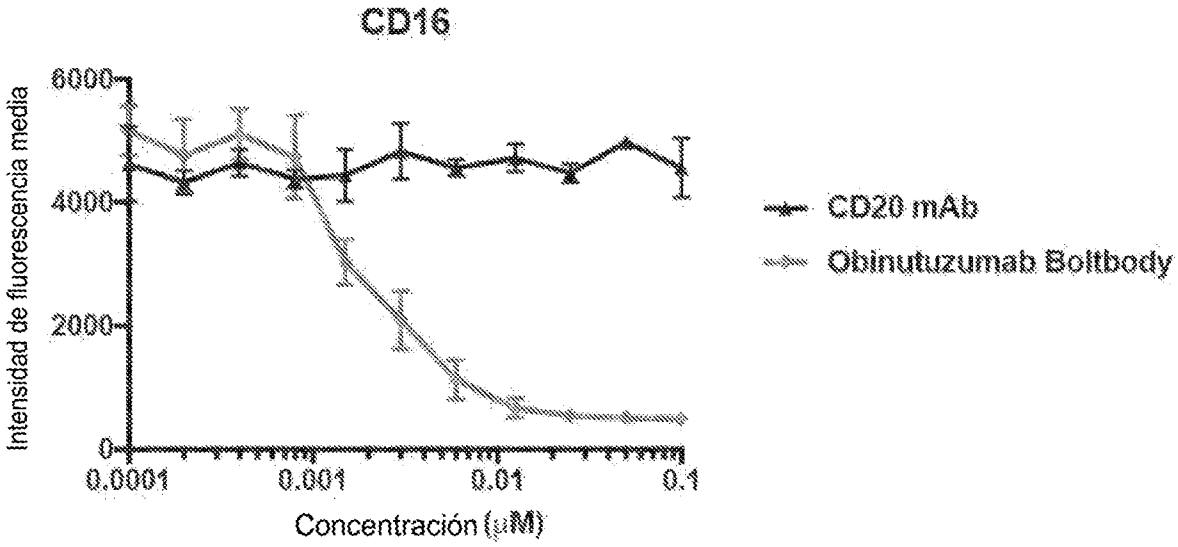


Fig. 77H

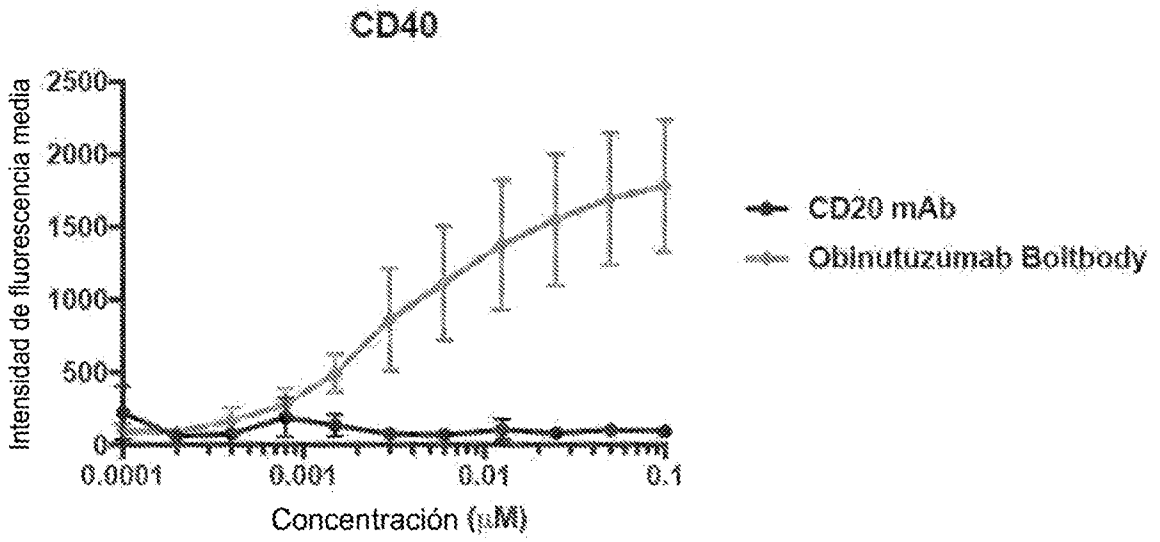


Fig. 77I

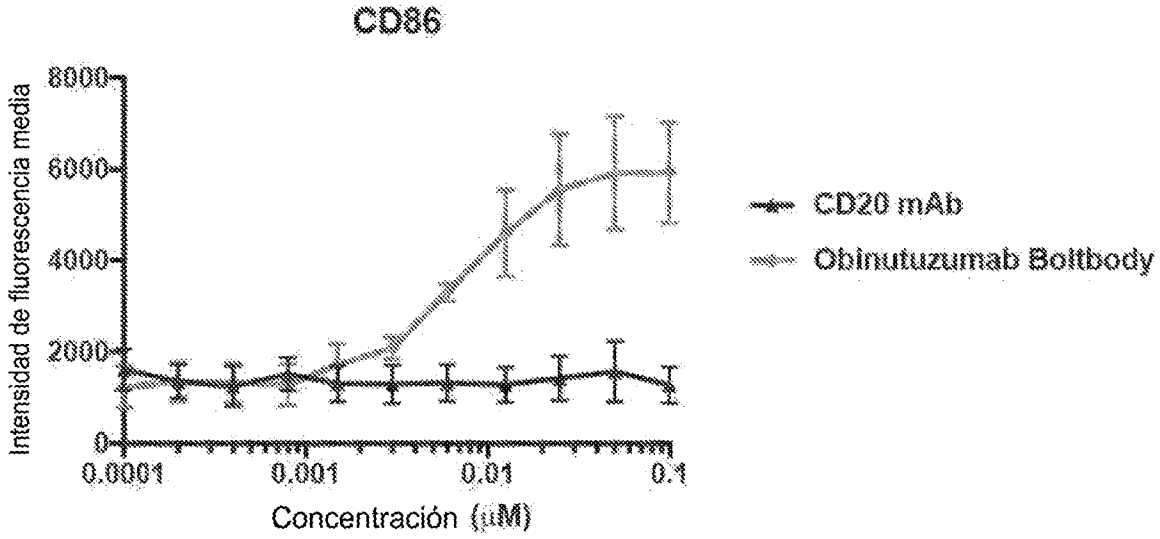


Fig. 77J

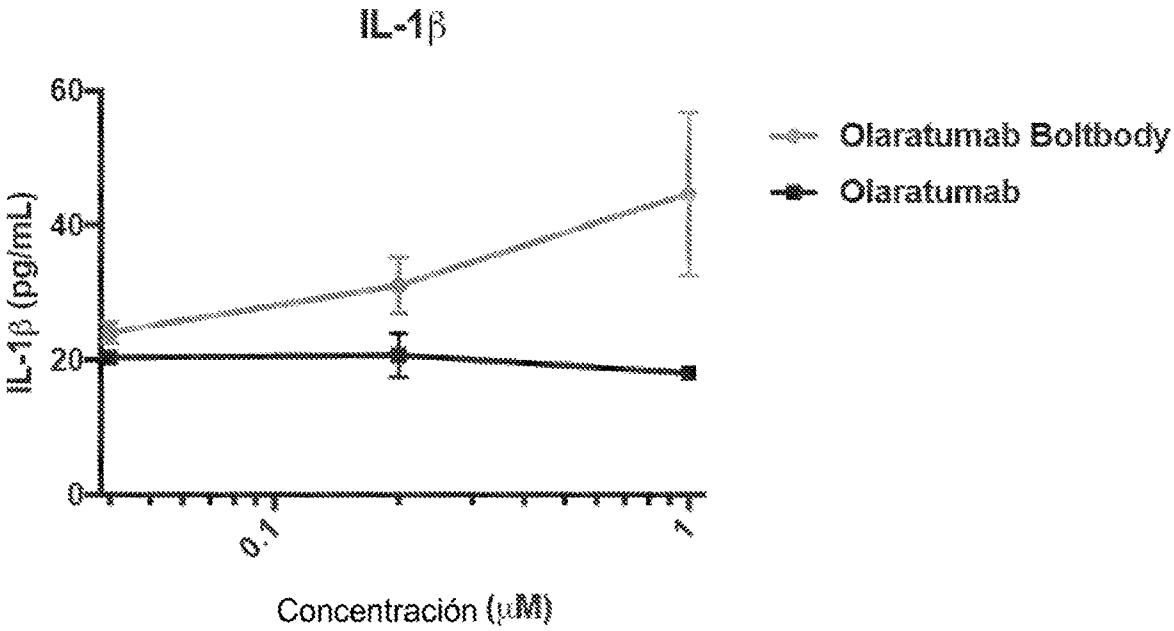


Fig. 78A

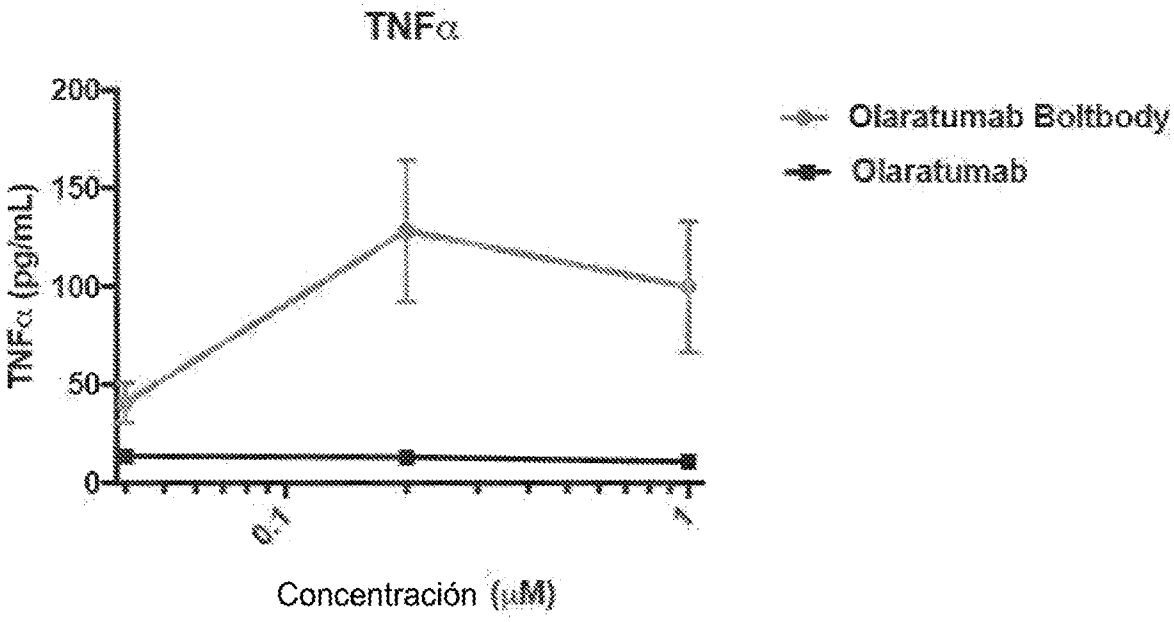


Fig. 78B

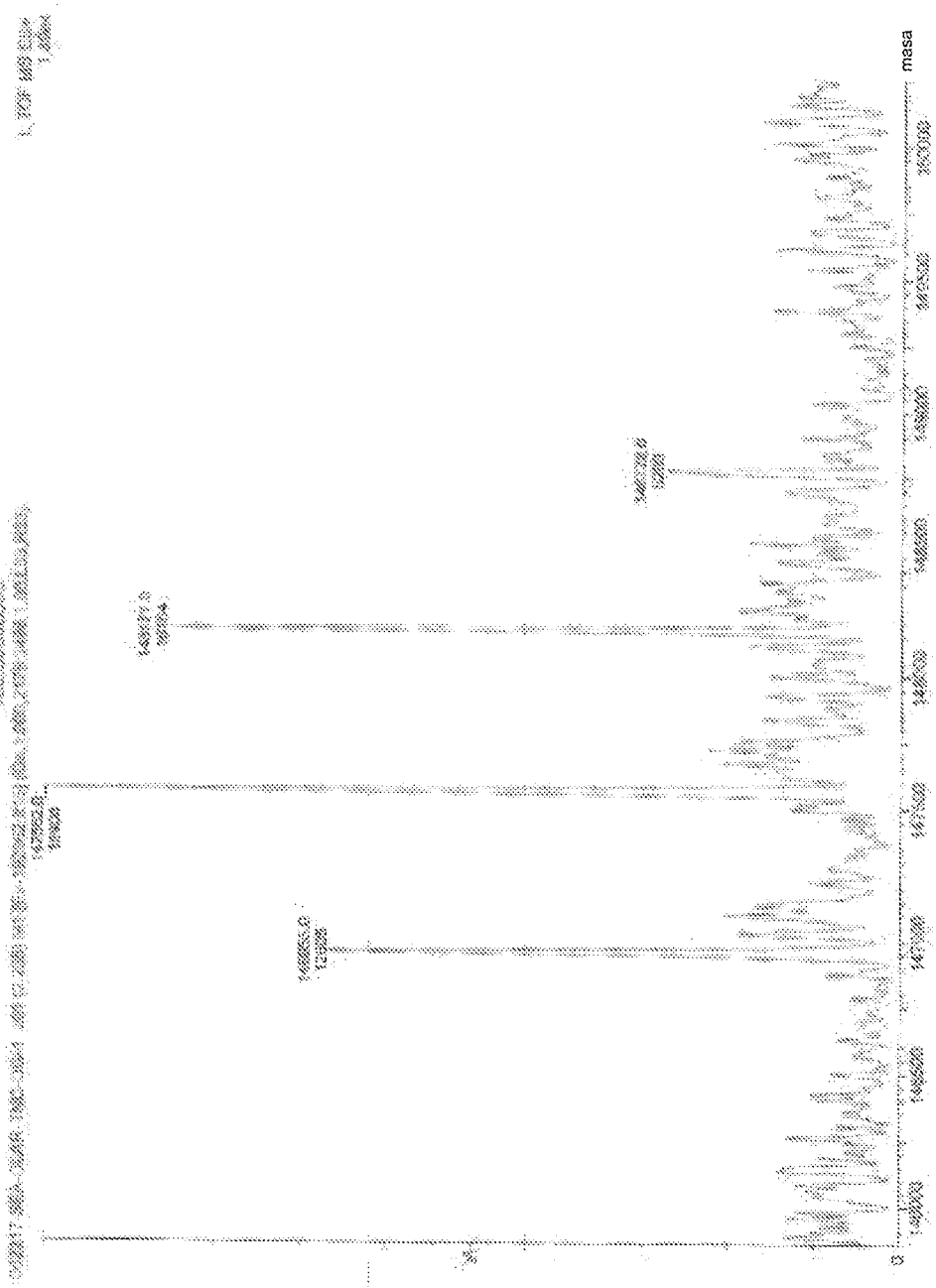


Fig. 78C

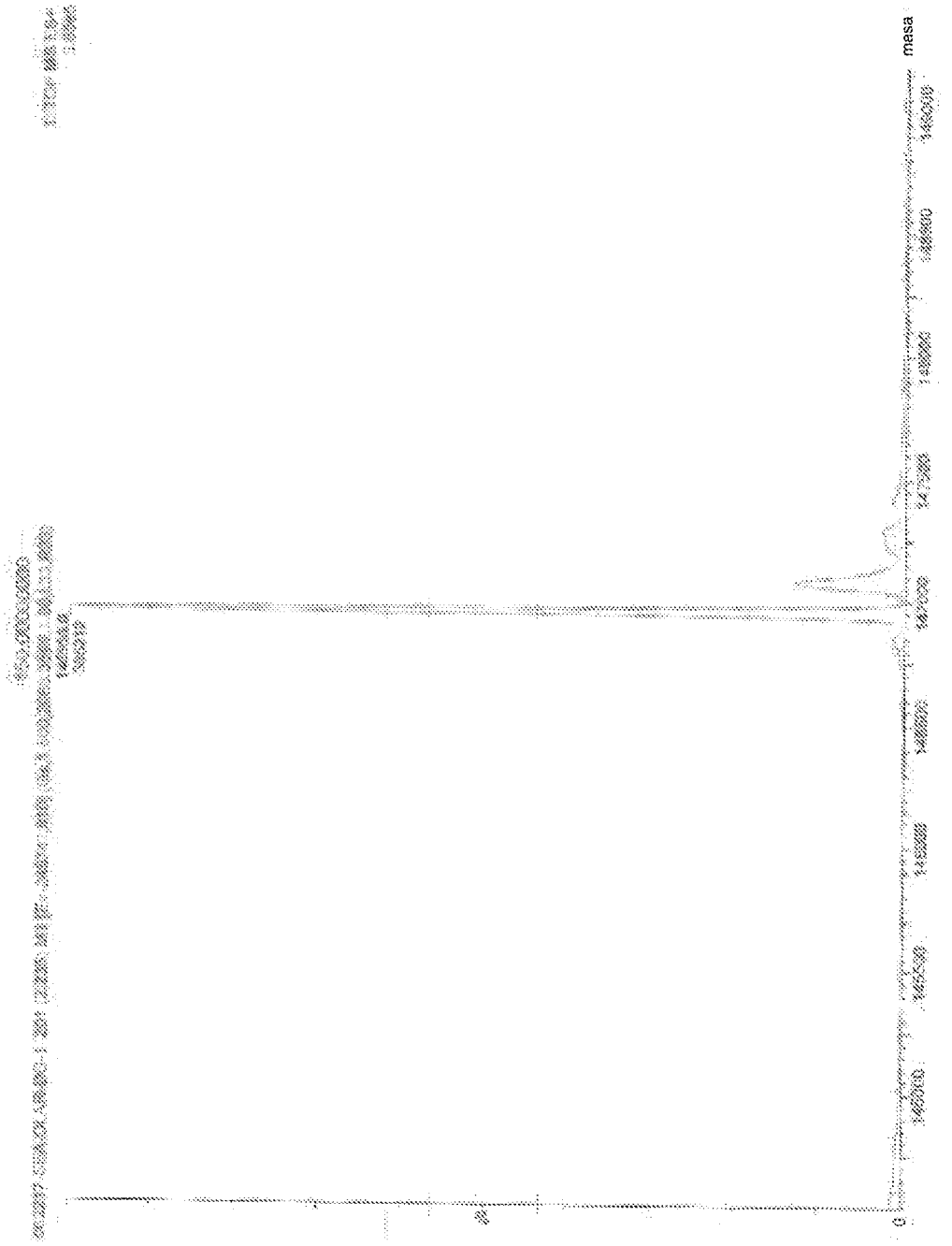


Fig. 78D

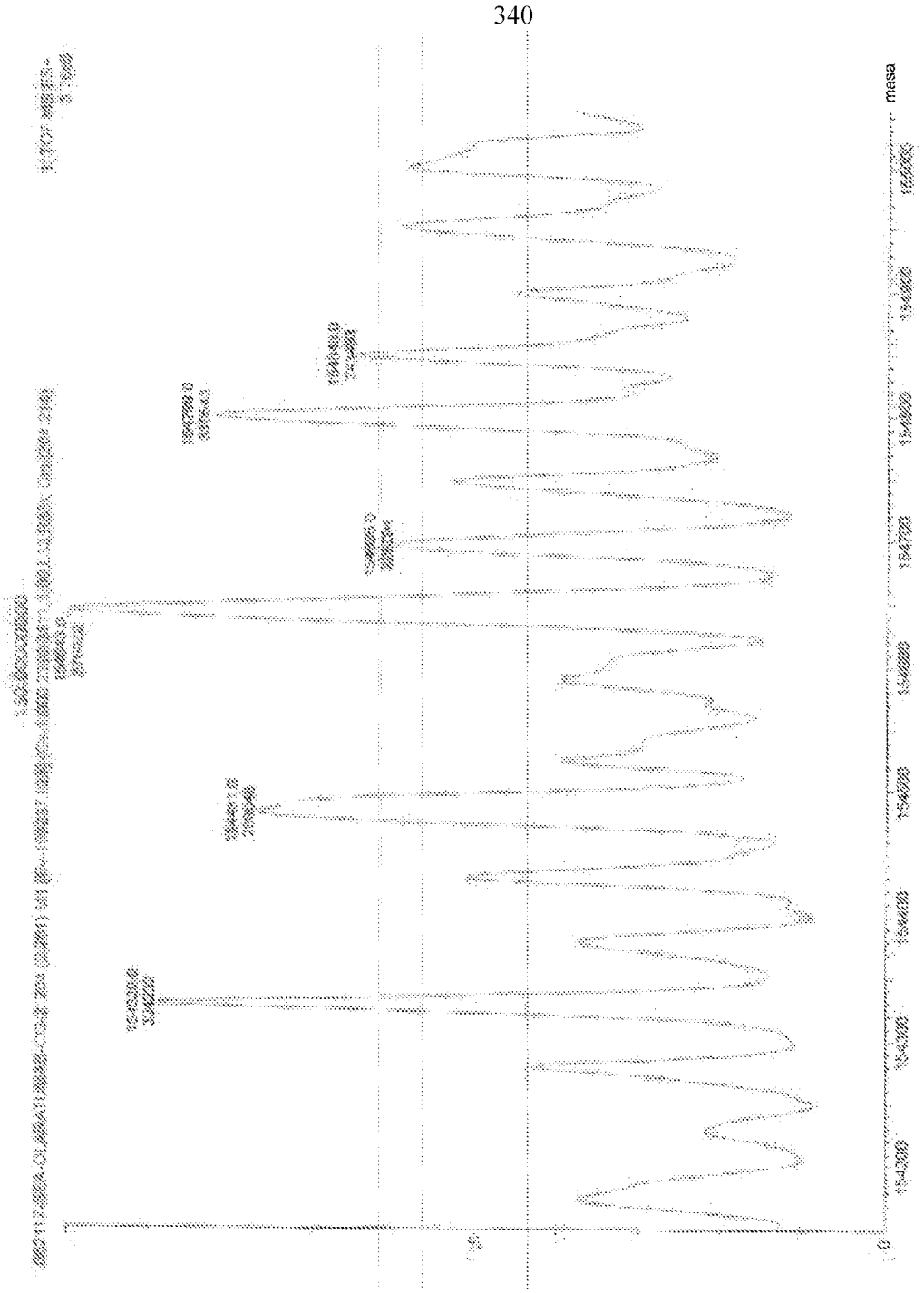


Fig. 78E

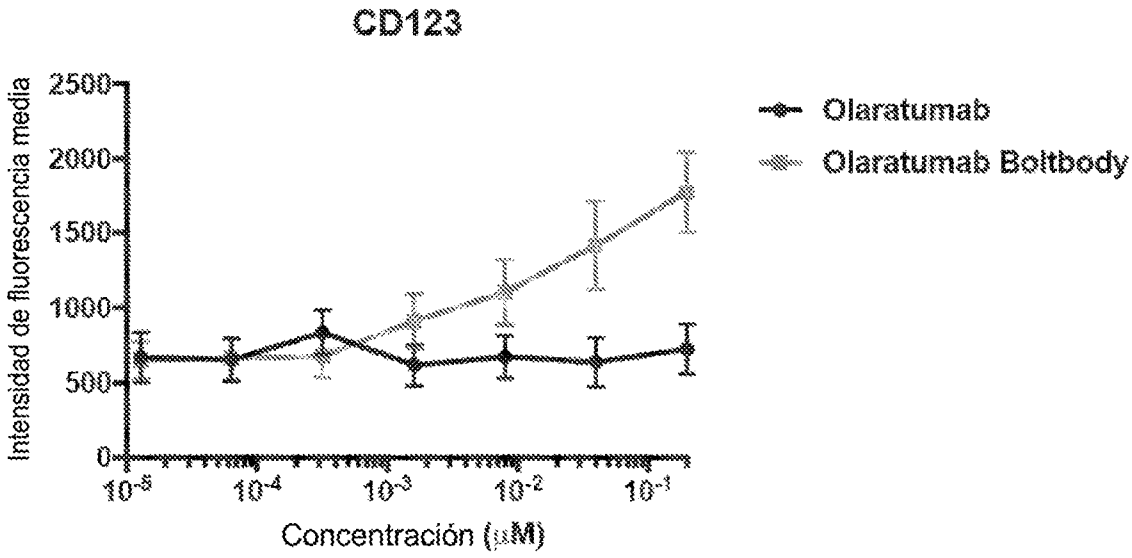


Fig. 78F

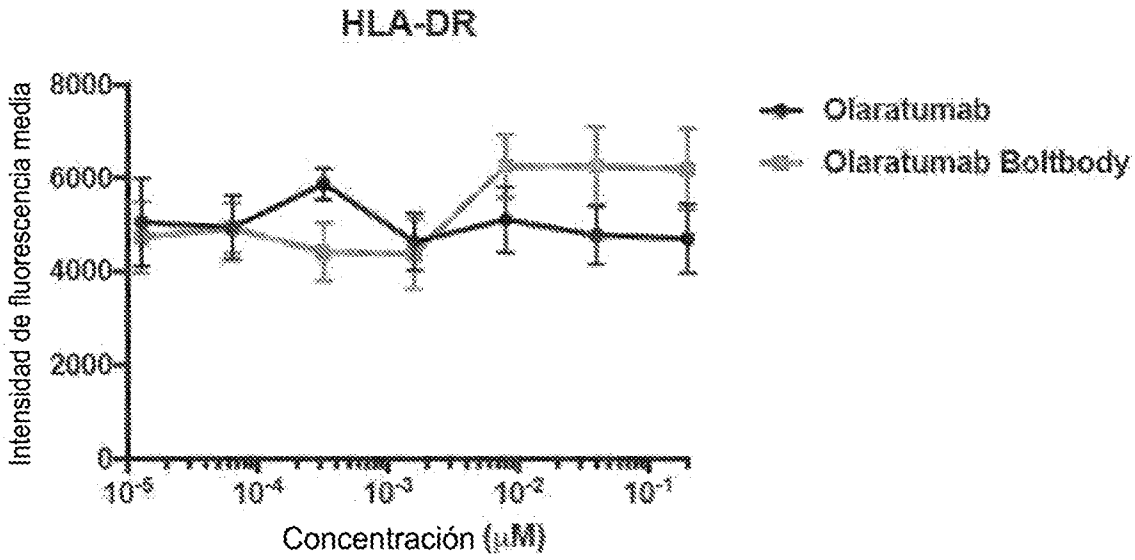


Fig. 78G

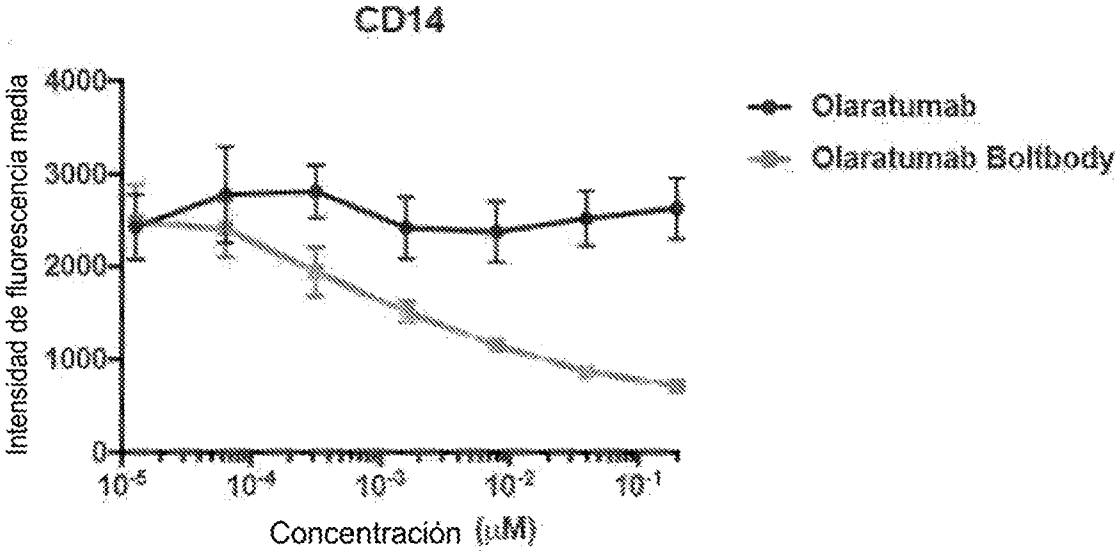


Fig. 78H

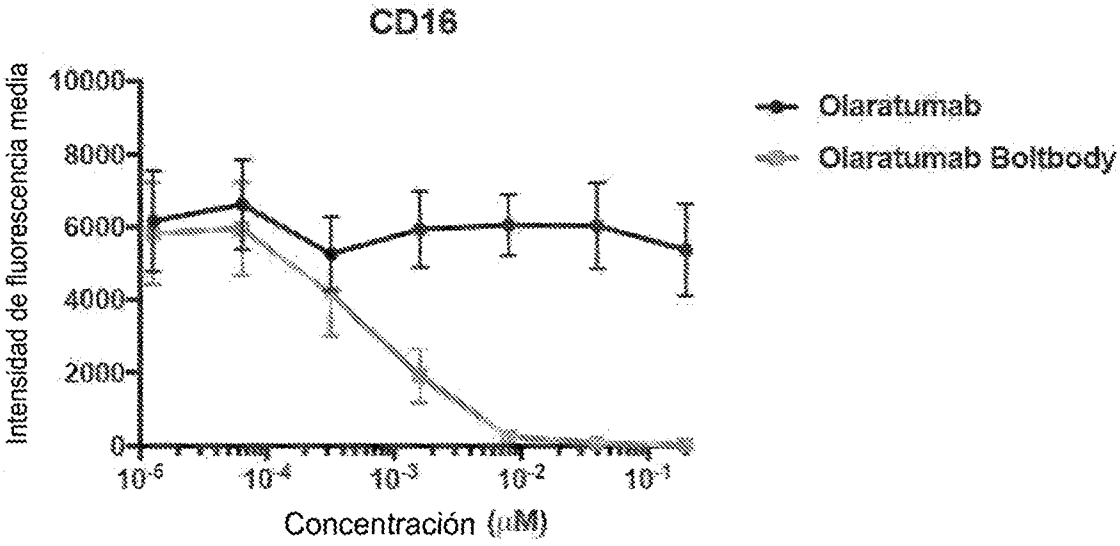


Fig. 78I

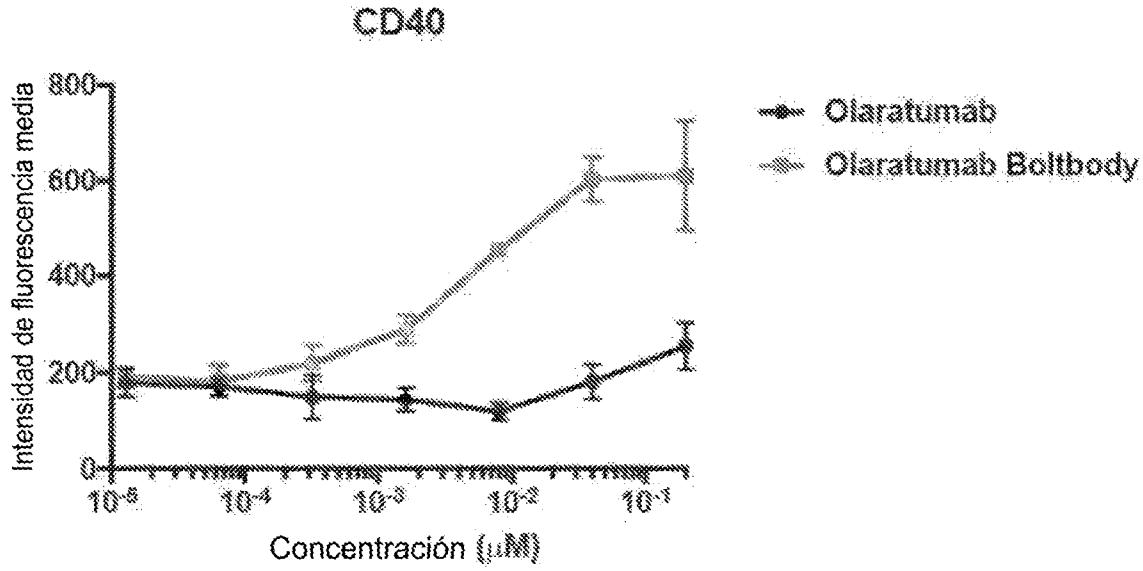


Fig. 78J

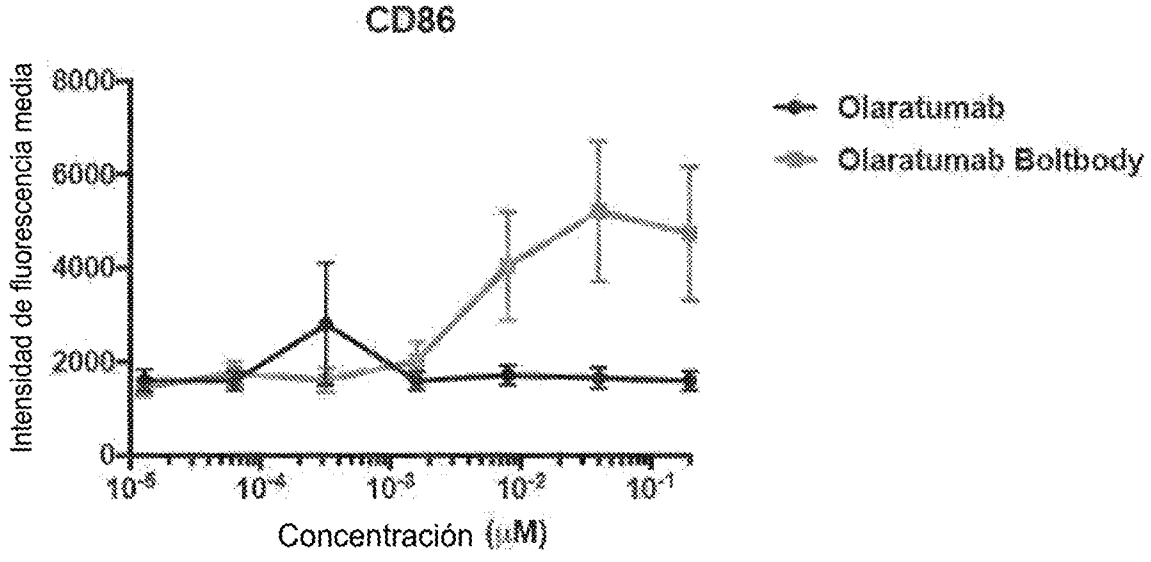


Fig. 78K

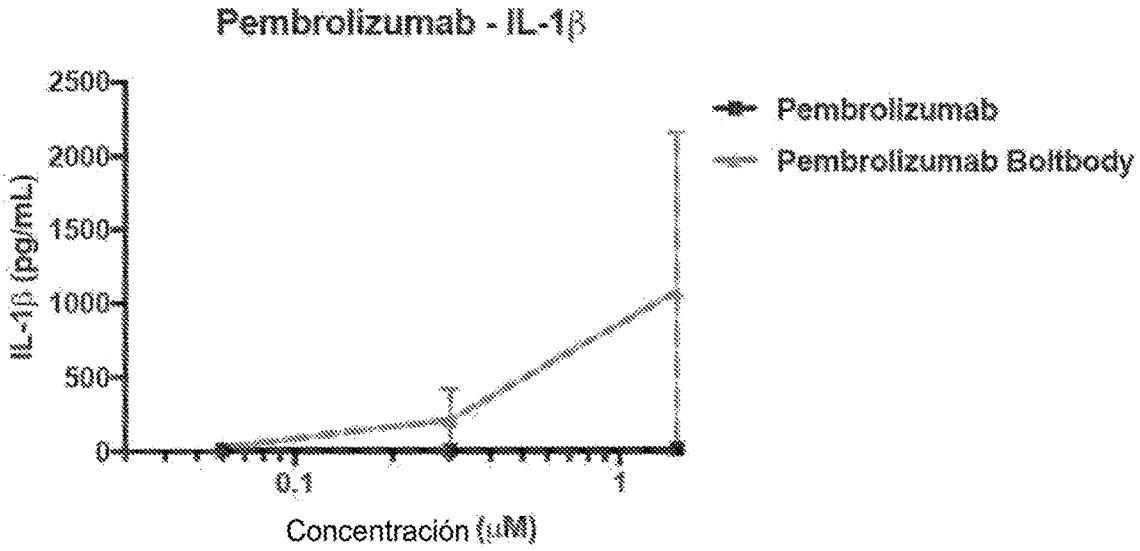


Fig. 79A

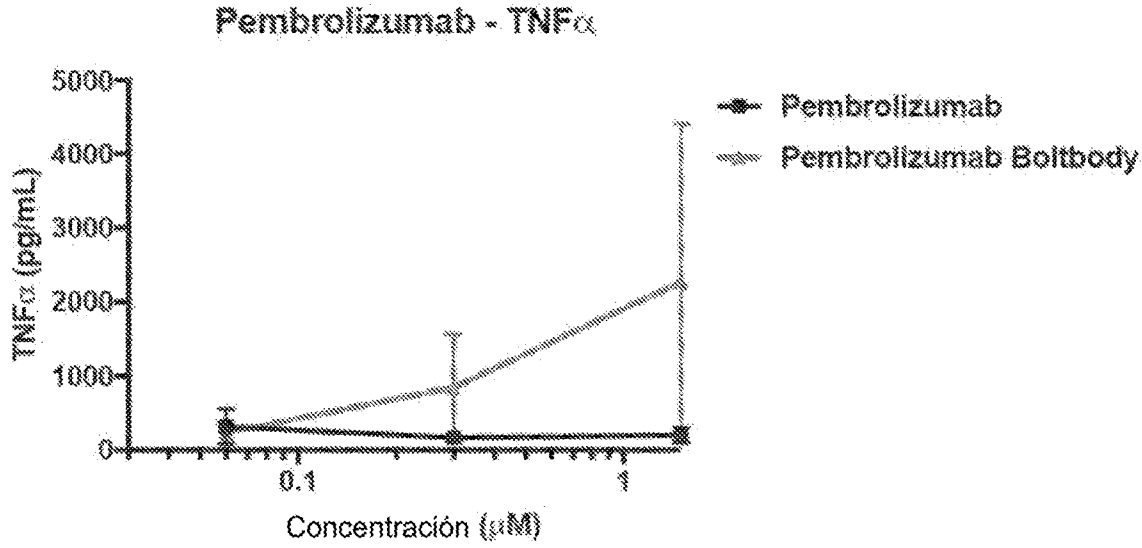


Fig. 79B

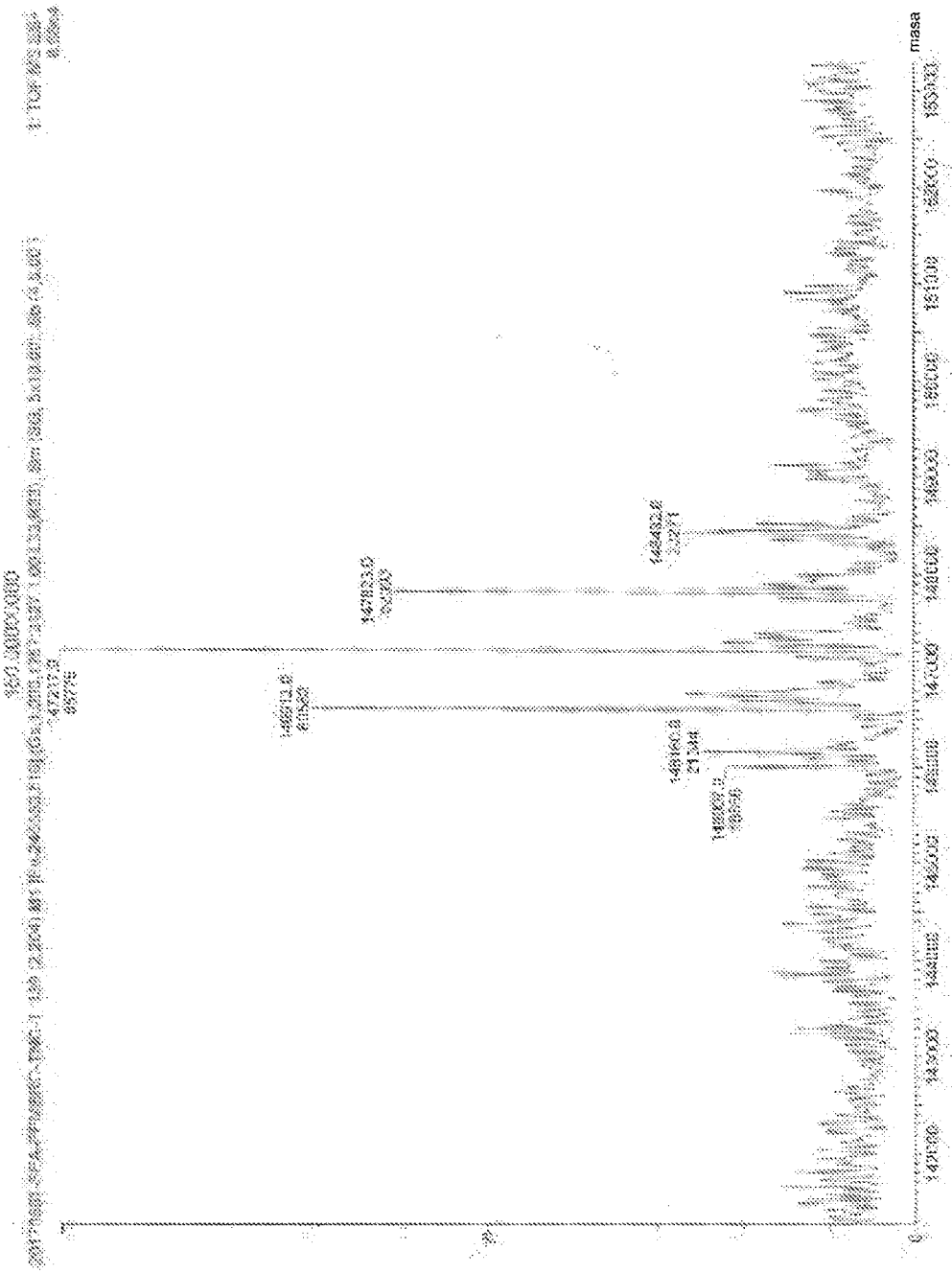


Fig. 79C

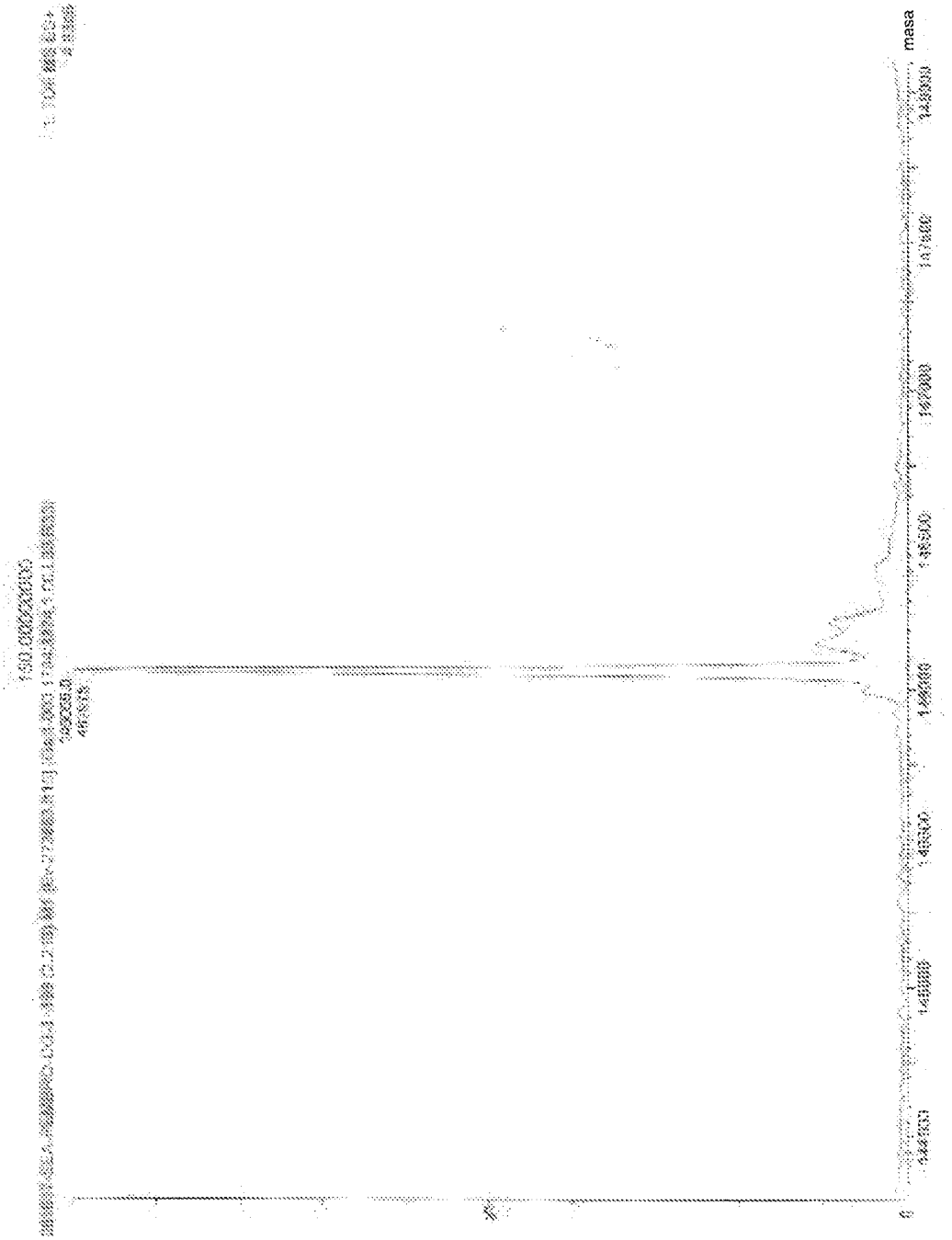


Fig. 79D

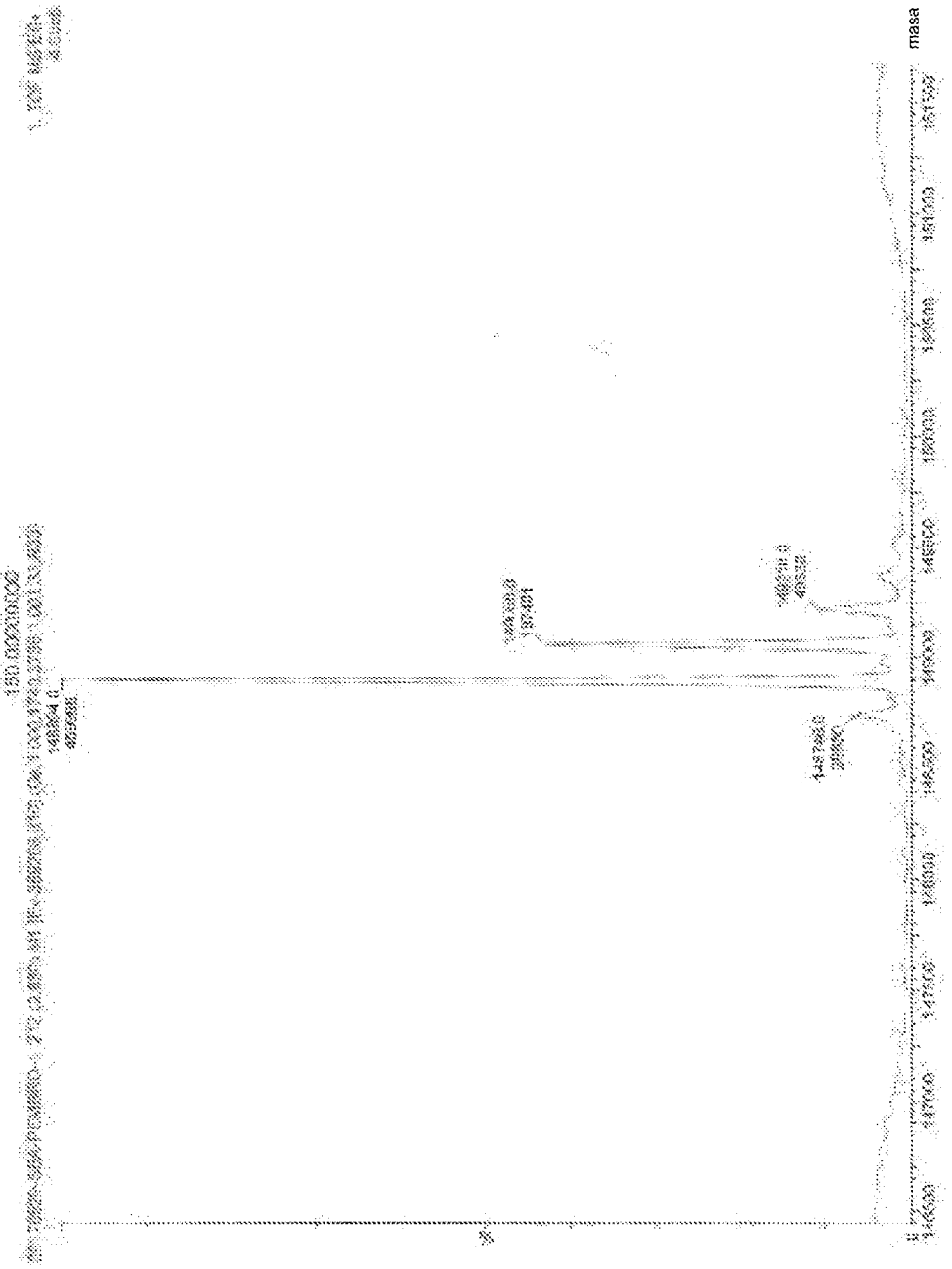


Fig. 79E

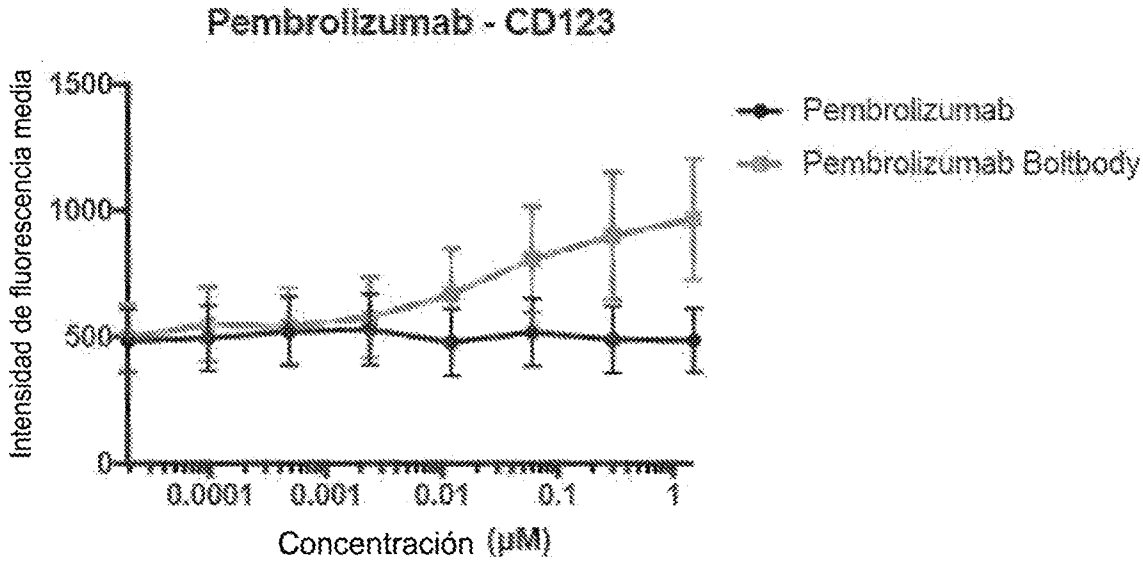


Fig. 79F

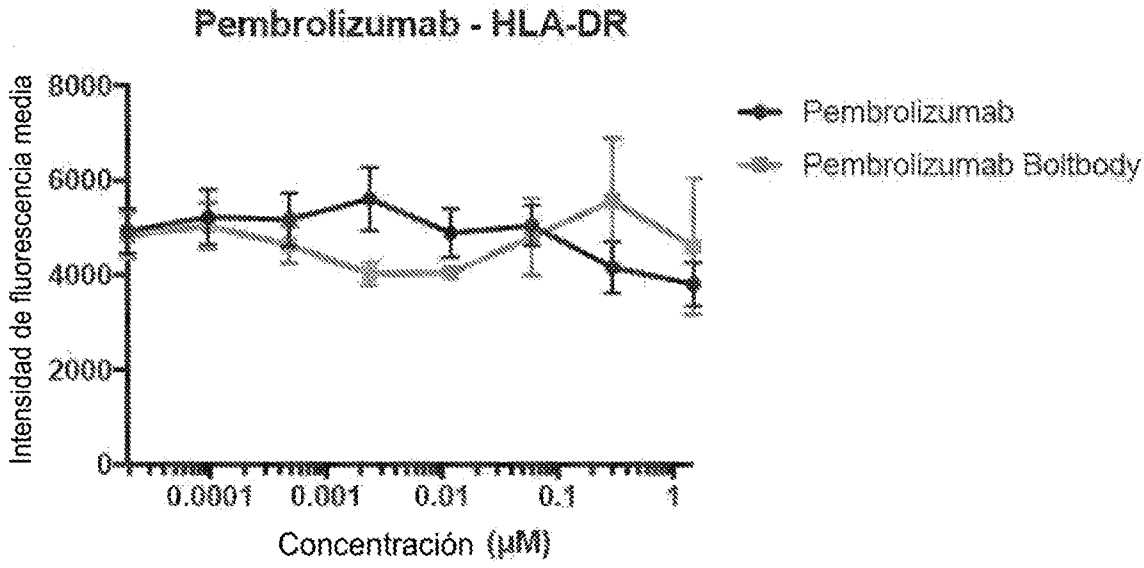


Fig. 79G

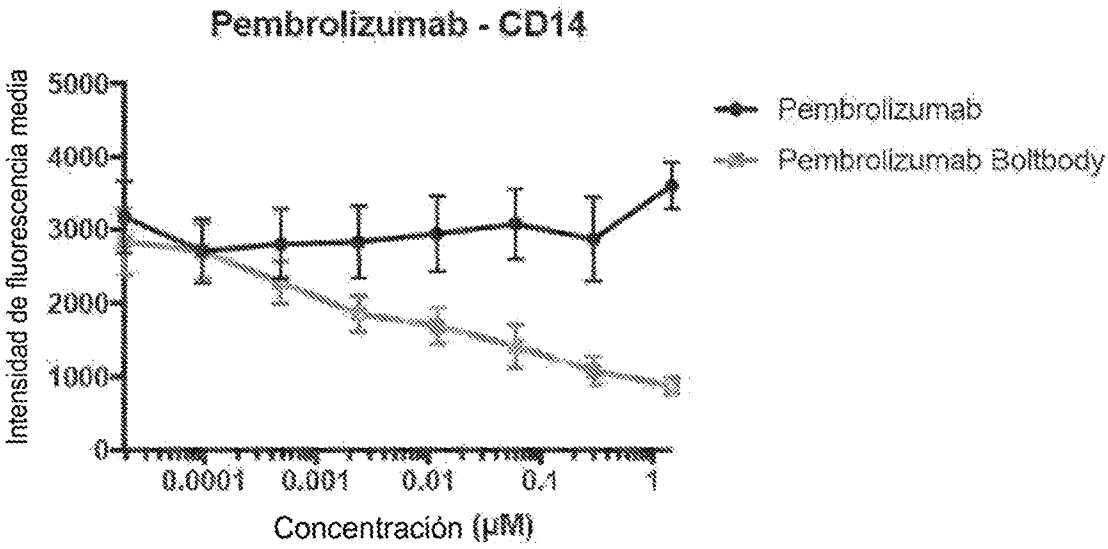


Fig. 79H

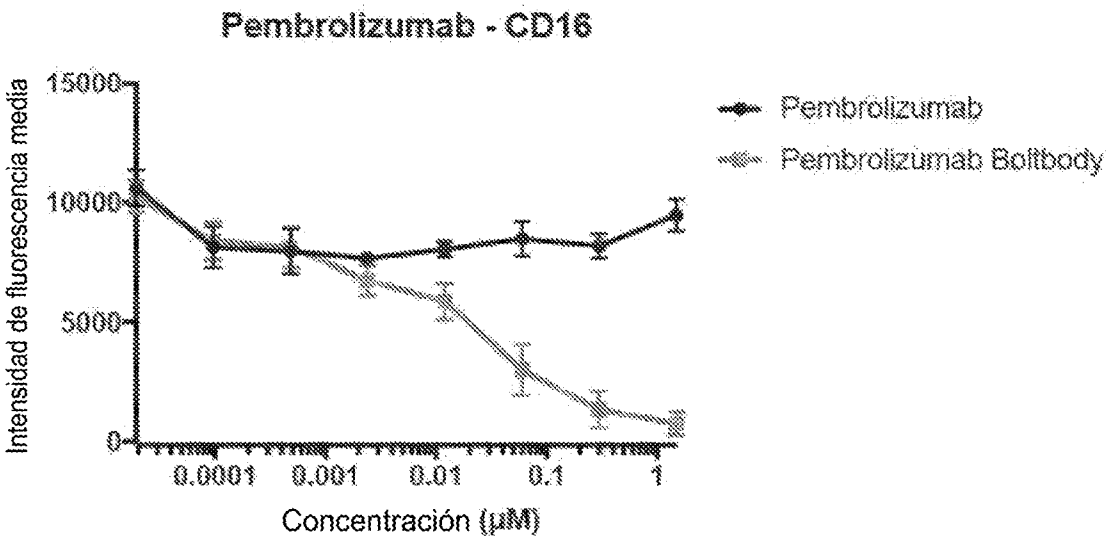


Fig. 79I

350

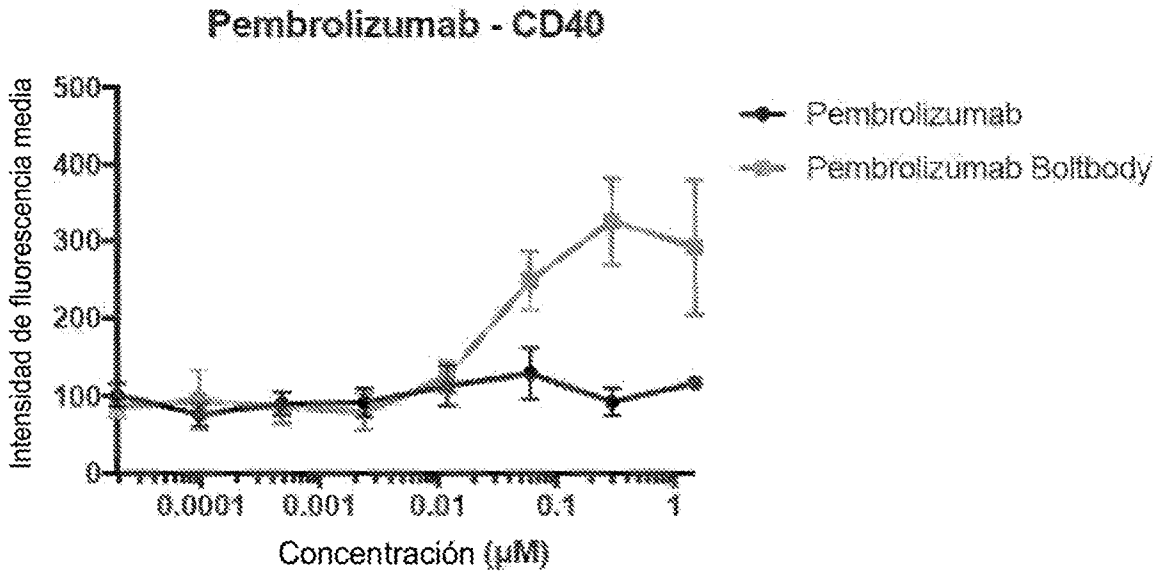


Fig. 79J

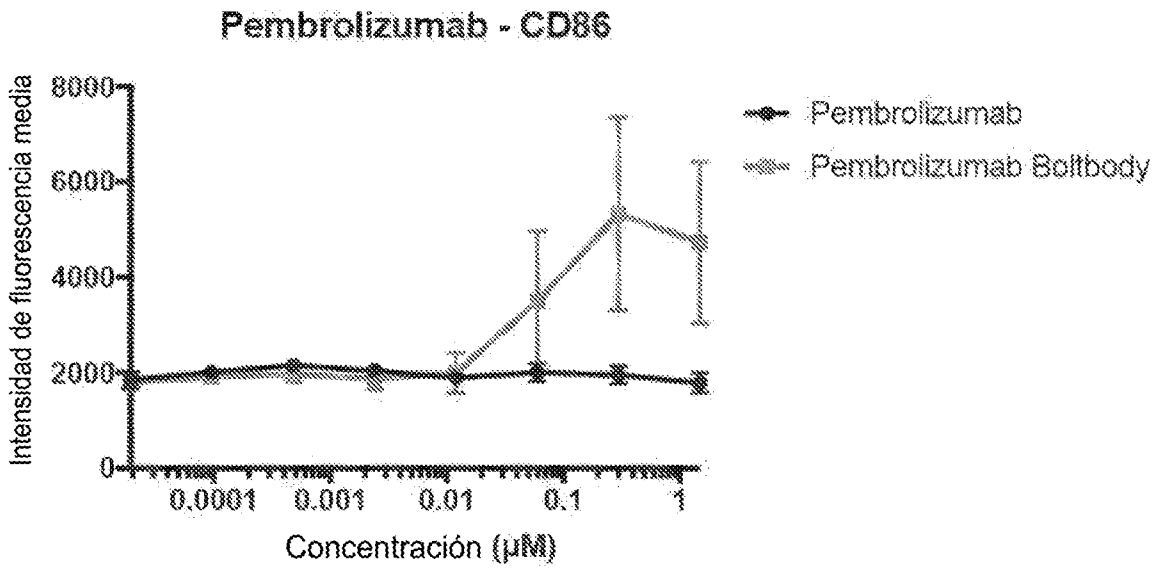


Fig. 79K

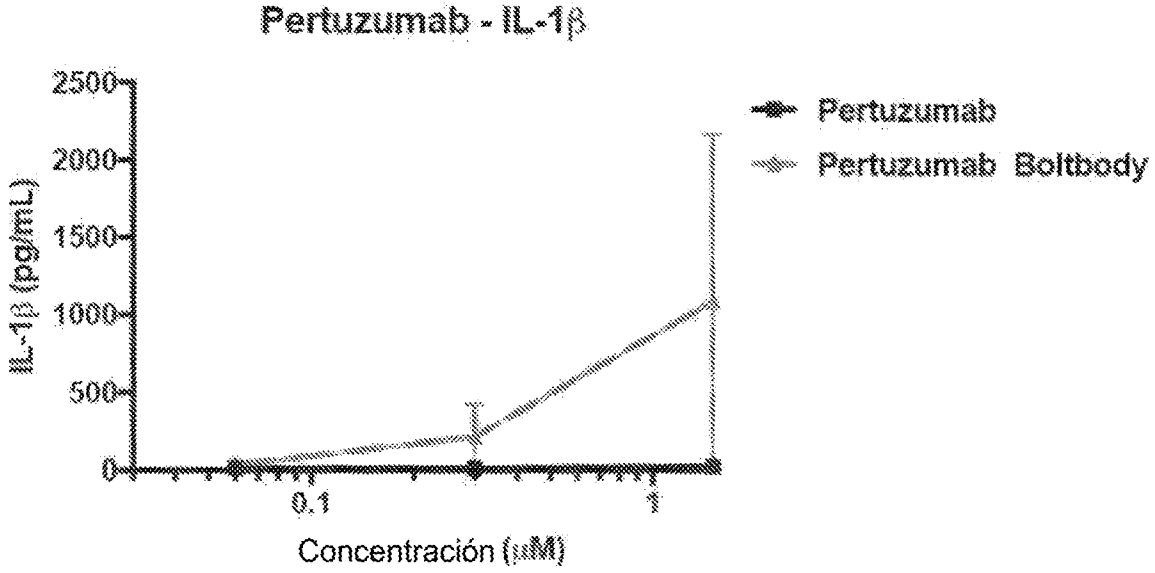


Fig. 80A

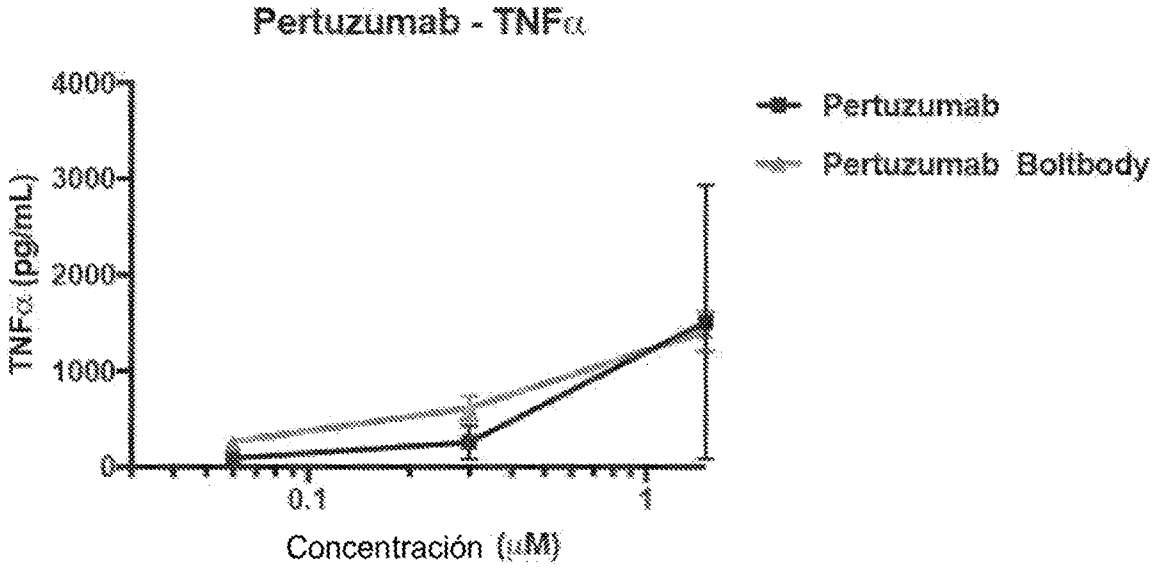


Fig. 80B

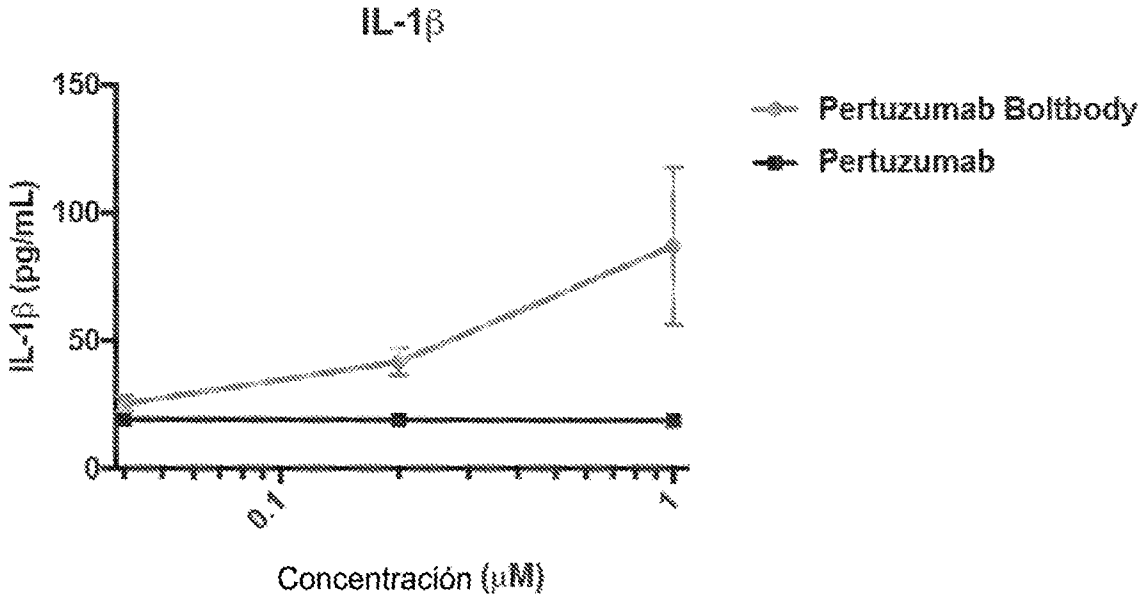


Fig. 80C

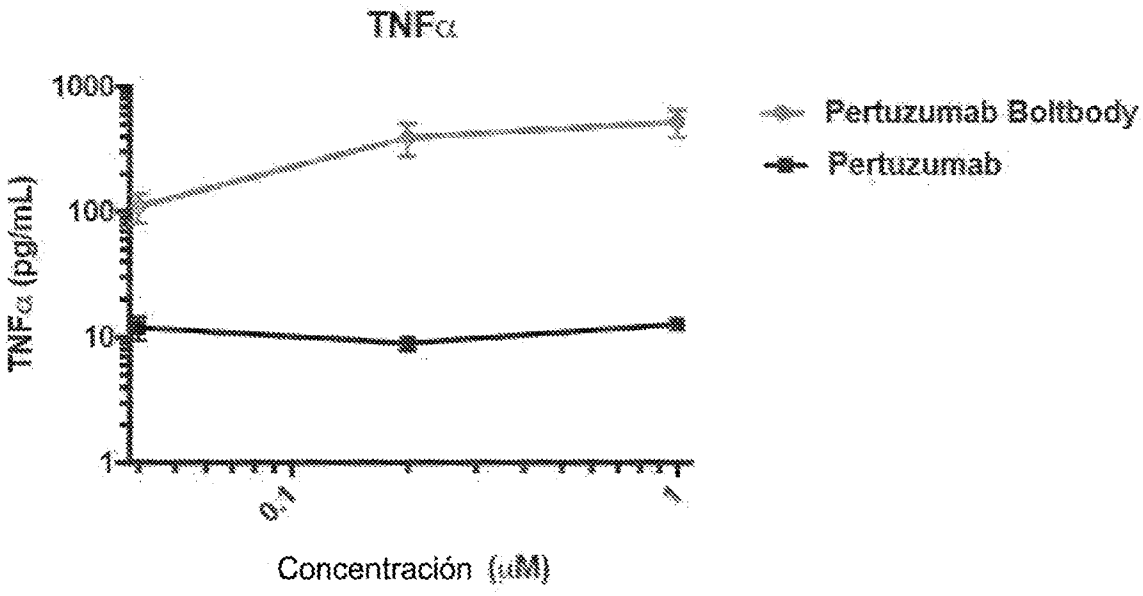


Fig. 80D

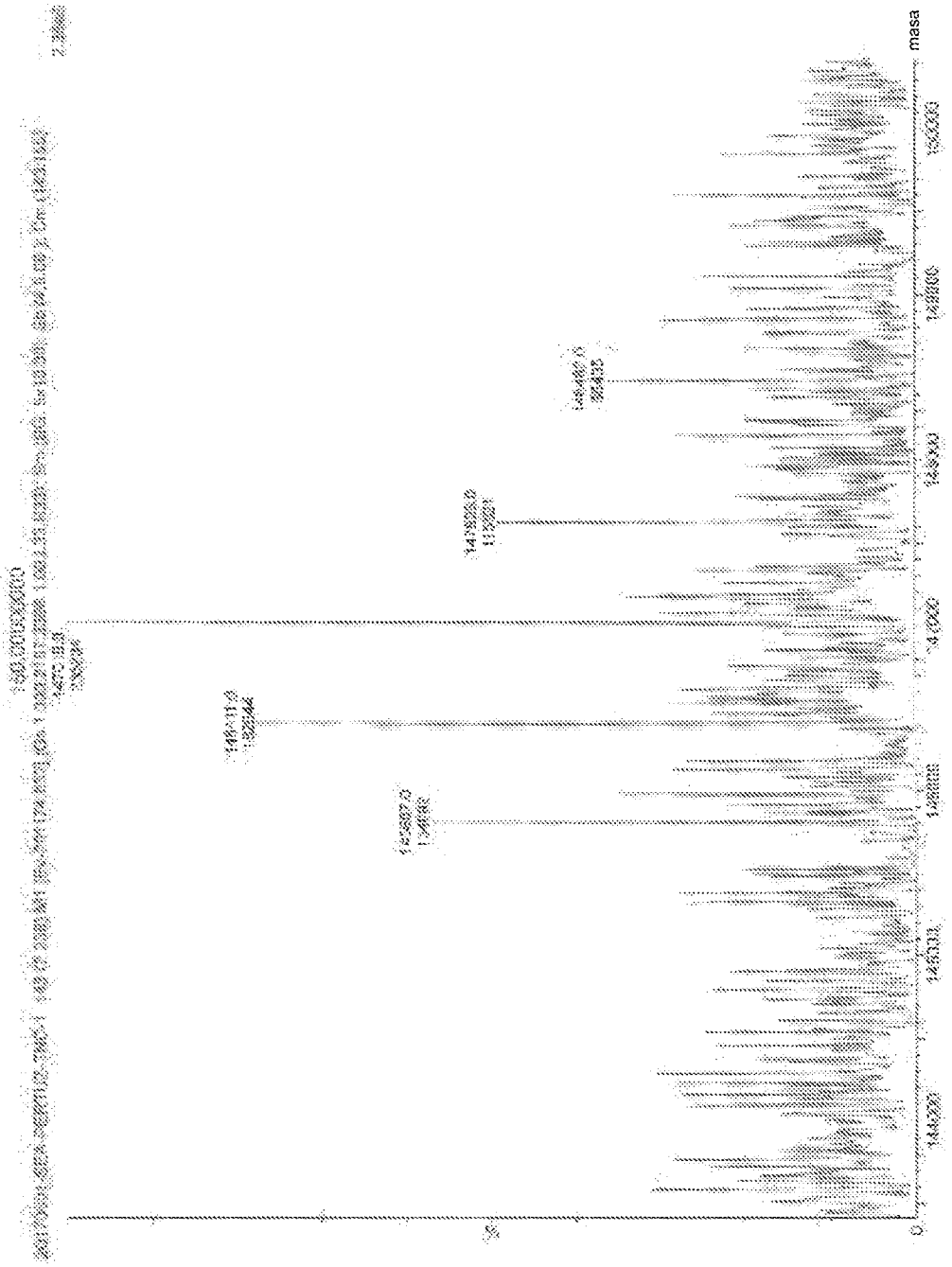


Fig. 80E

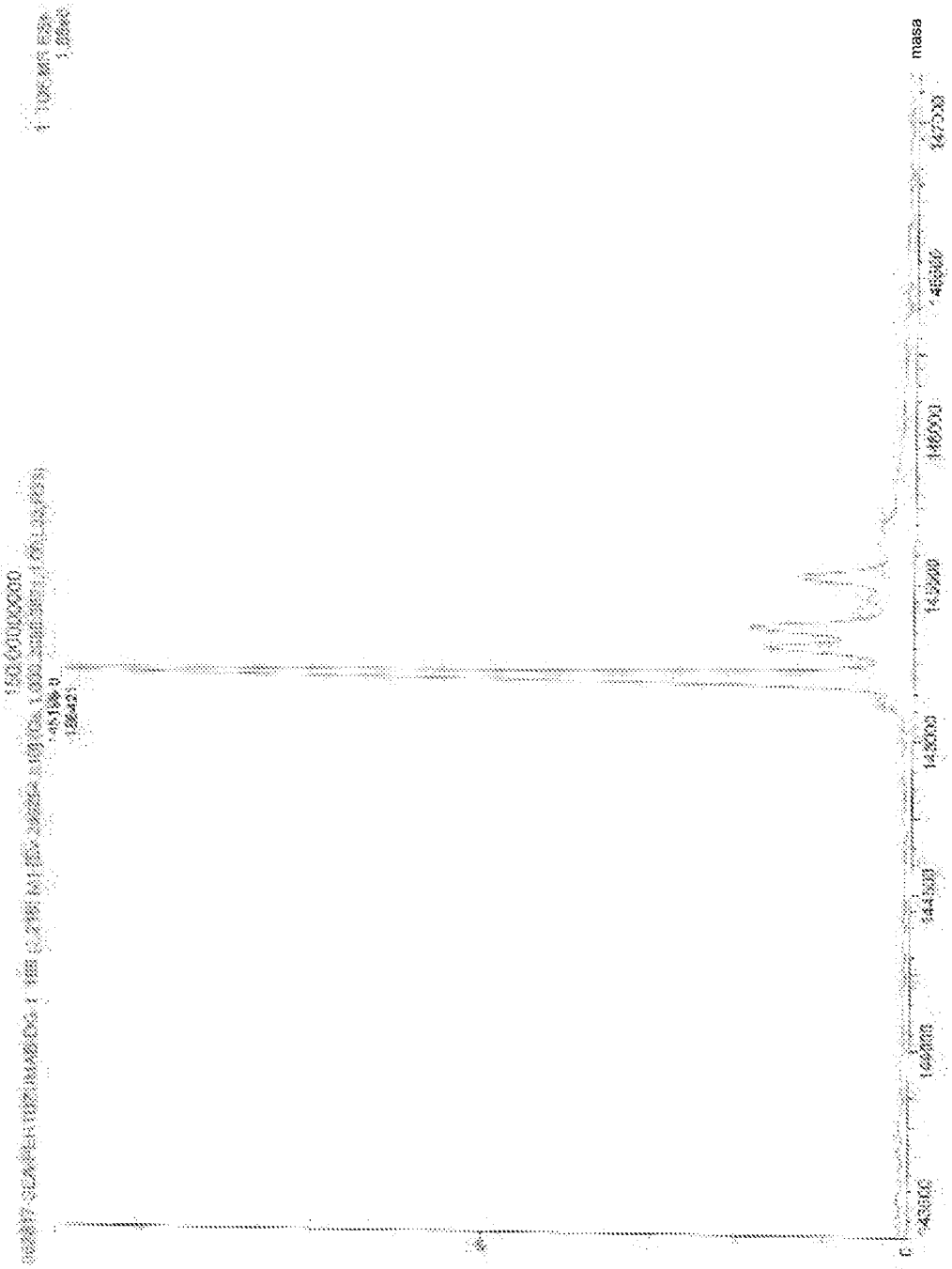


Fig. 80F

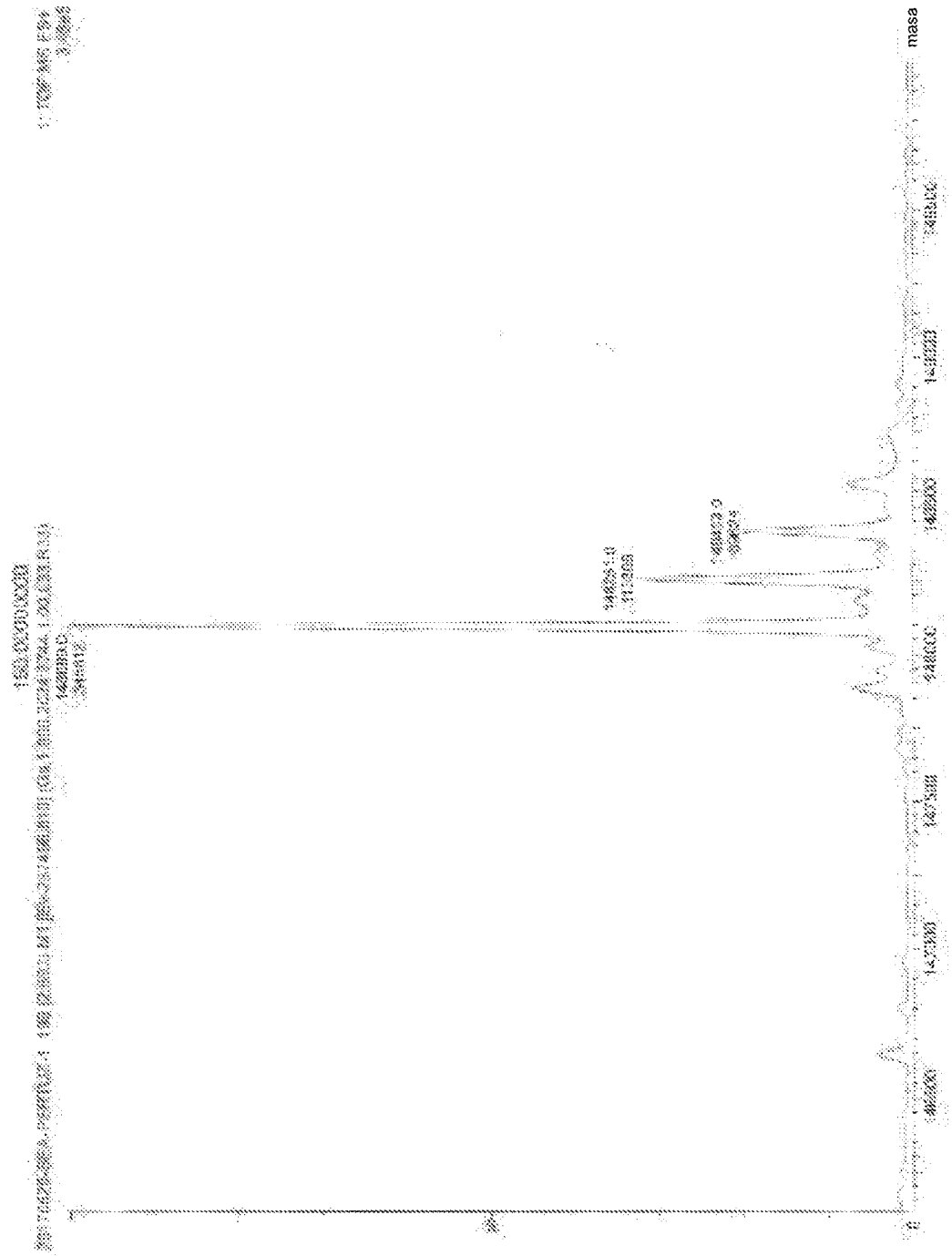


Fig. 80G

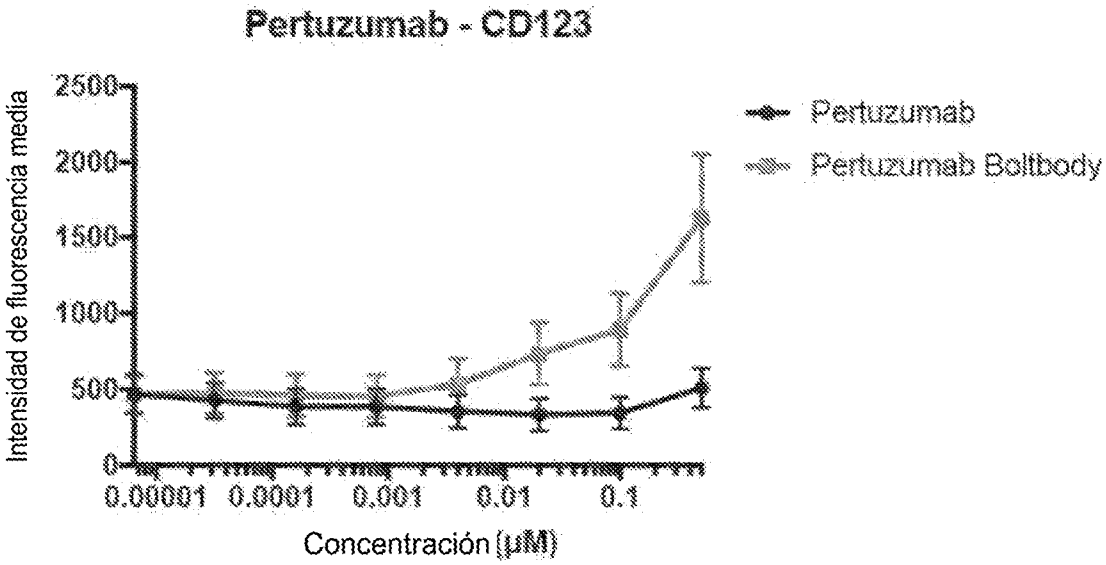


Fig. 80H

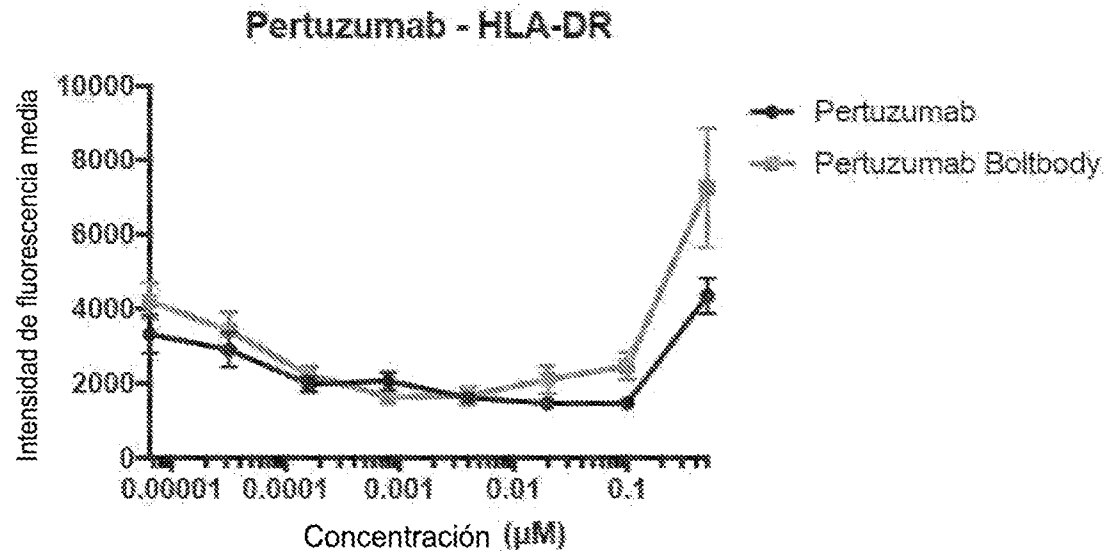


Fig. 80I

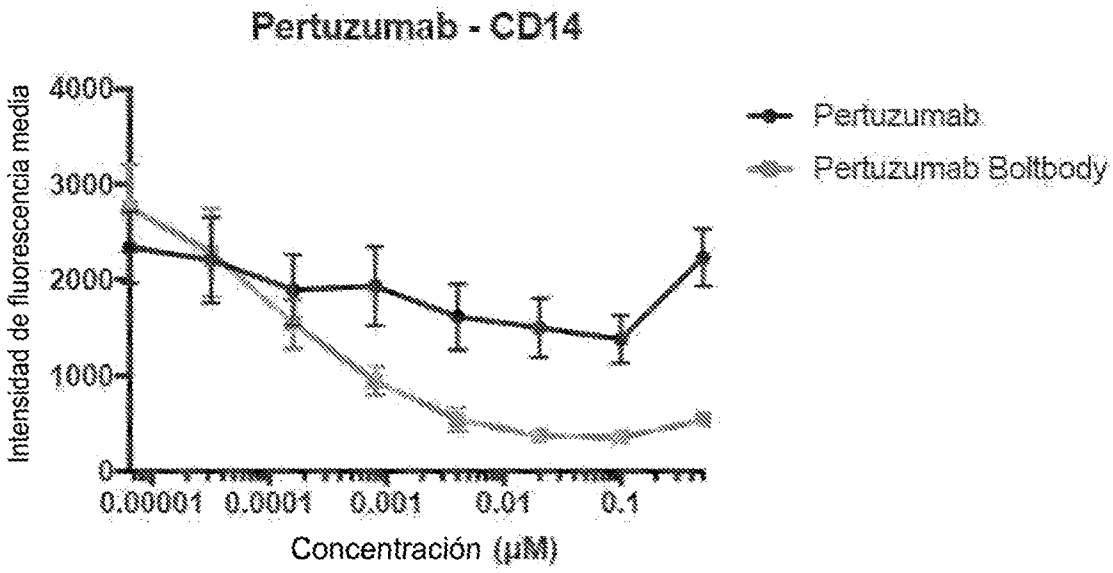


Fig. 80J

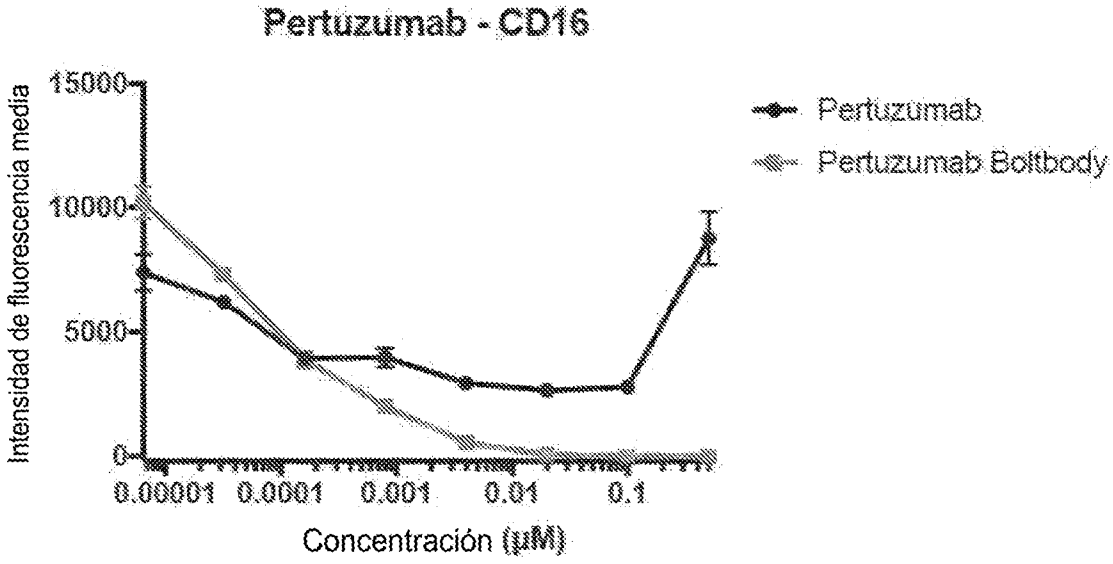


Fig. 80K

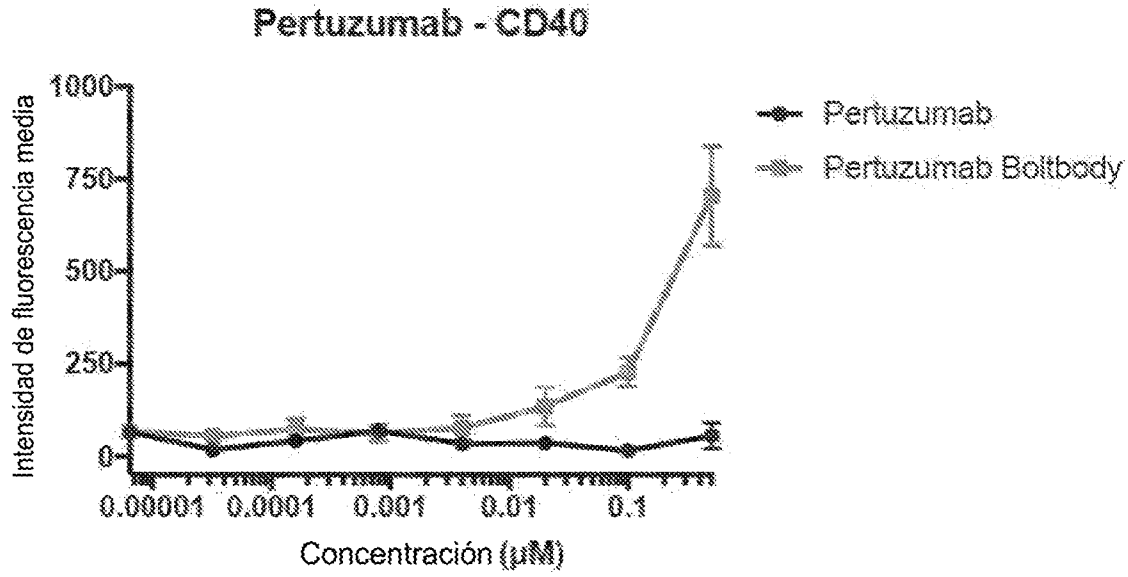


Fig. 80L

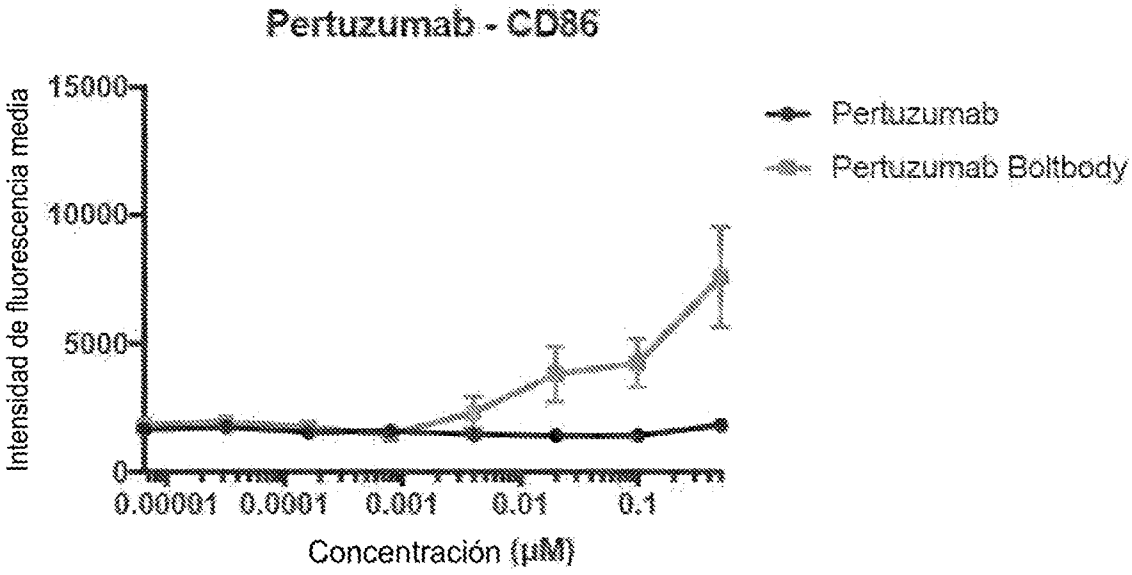


Fig. 80M

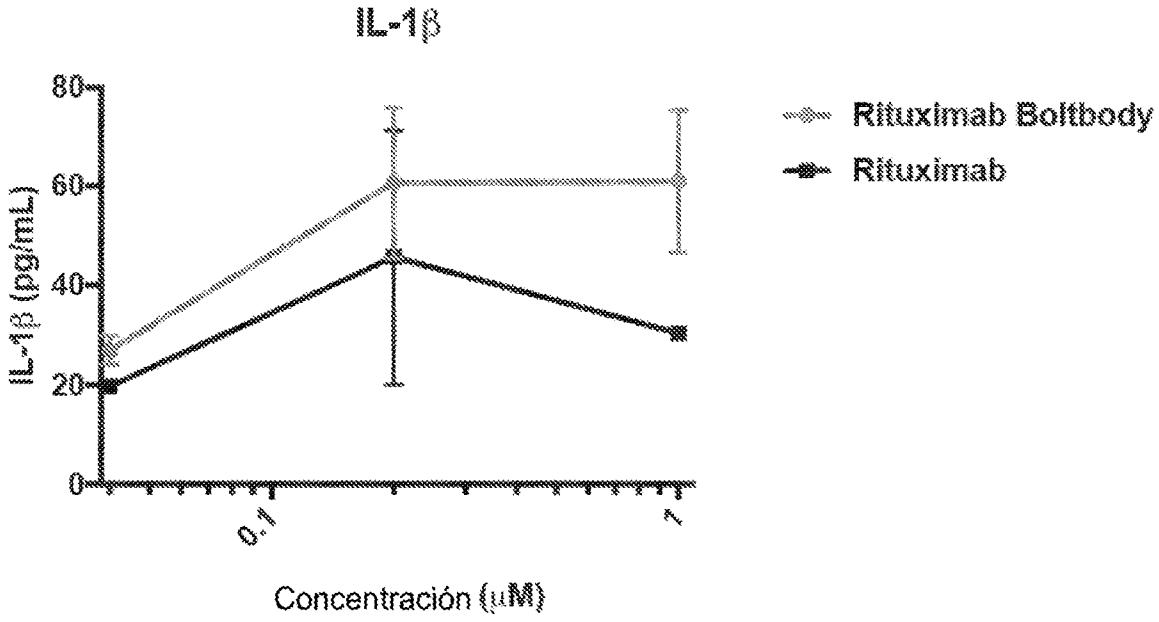


Fig. 81A

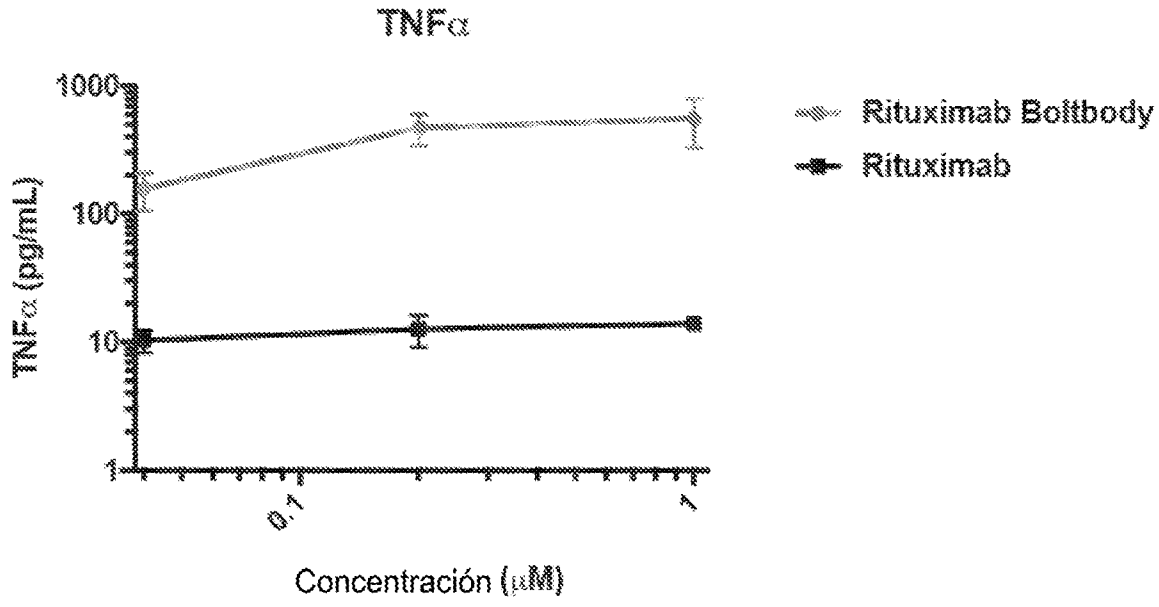


Fig. 81B

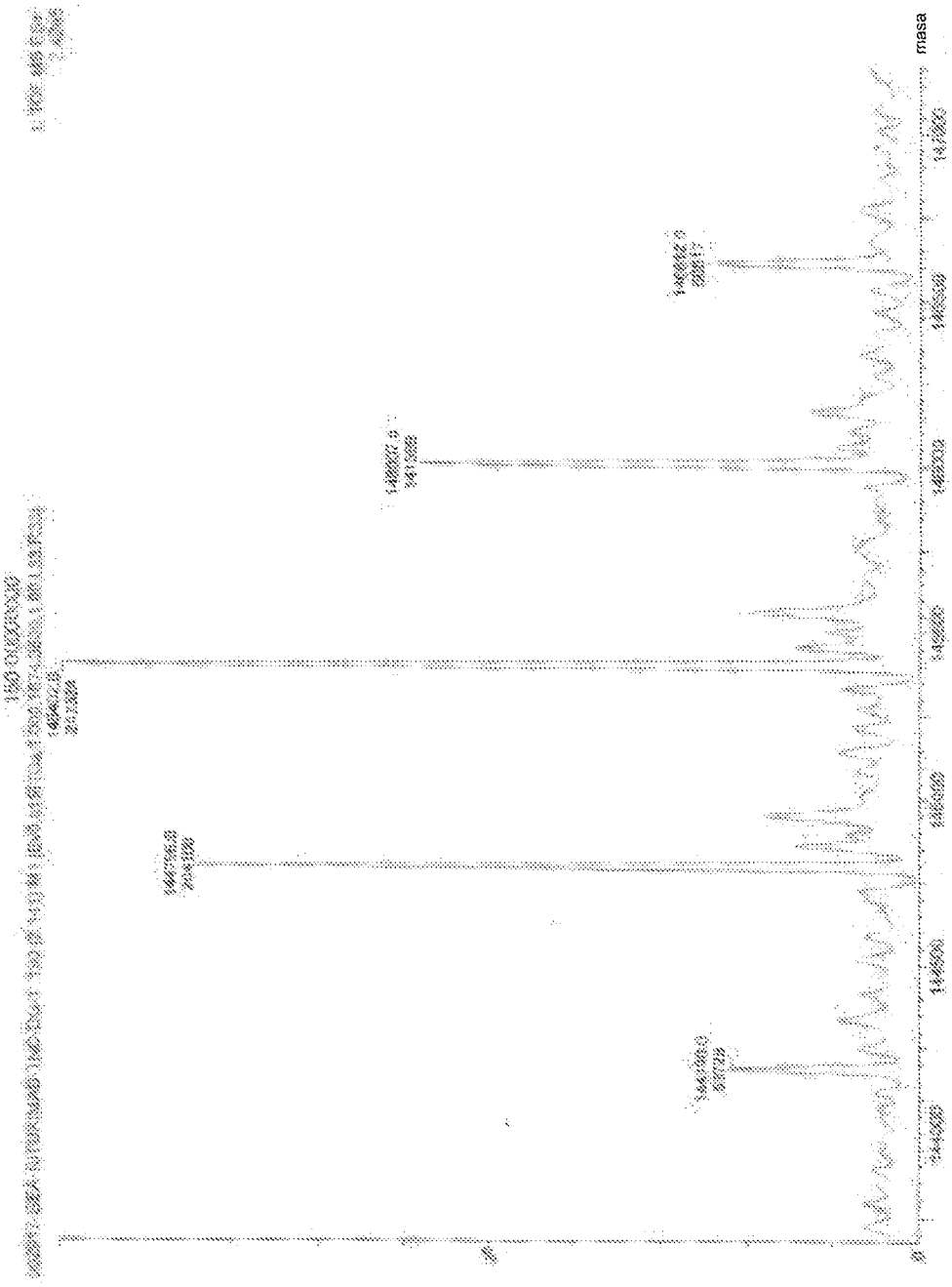


Fig. 81C

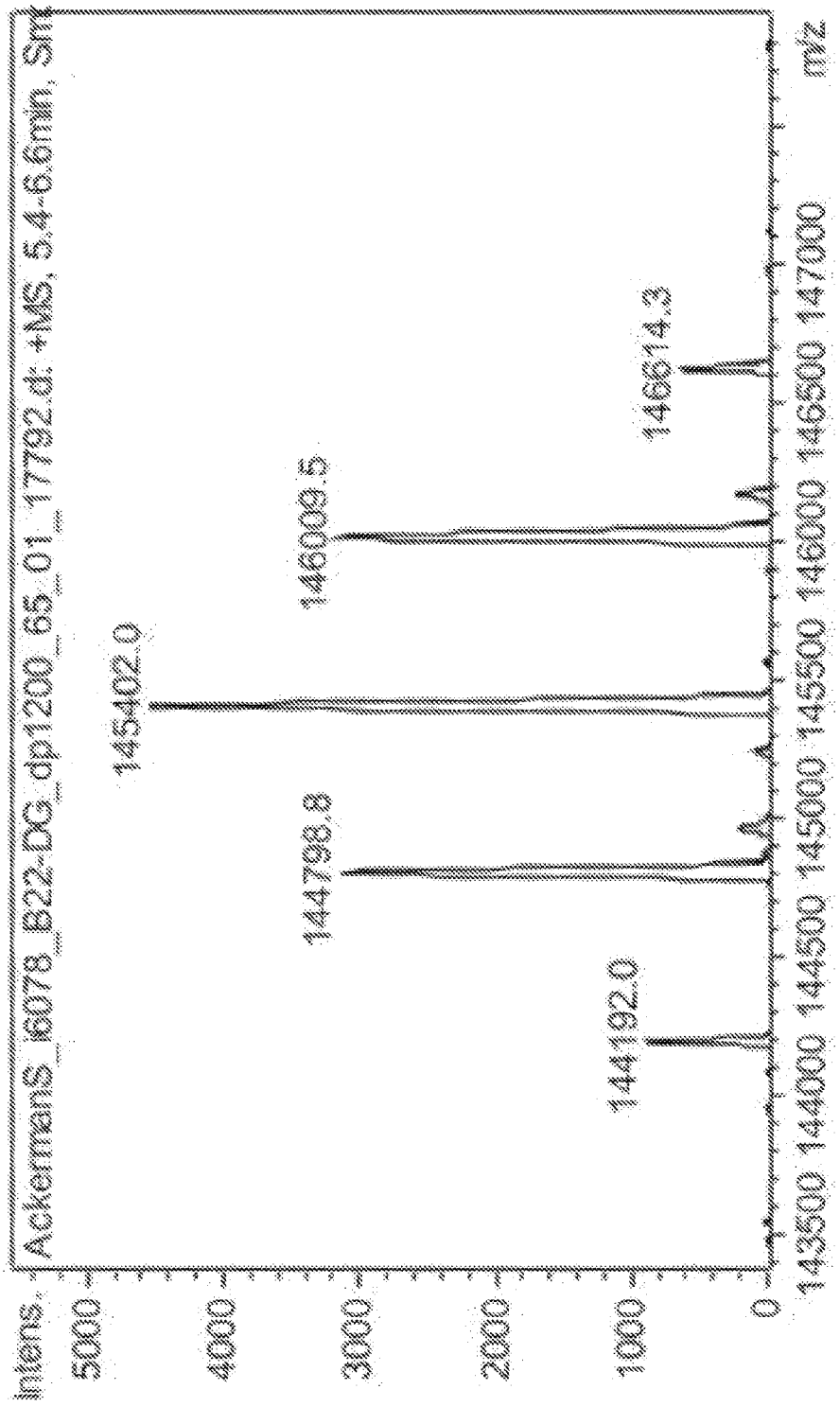

Intens.
AckermanS_i6078_B22-DG_dp1200_65_01_17792.d: +MS, 5.4-6.6min, Sm
5000
4000
3000
2000
1000
0
145402.0
146009.5
146614.3
144798.8
144192.0
143500
144000
144500
145000
145500
146000
146500
147000
m/z

Fig. 81D

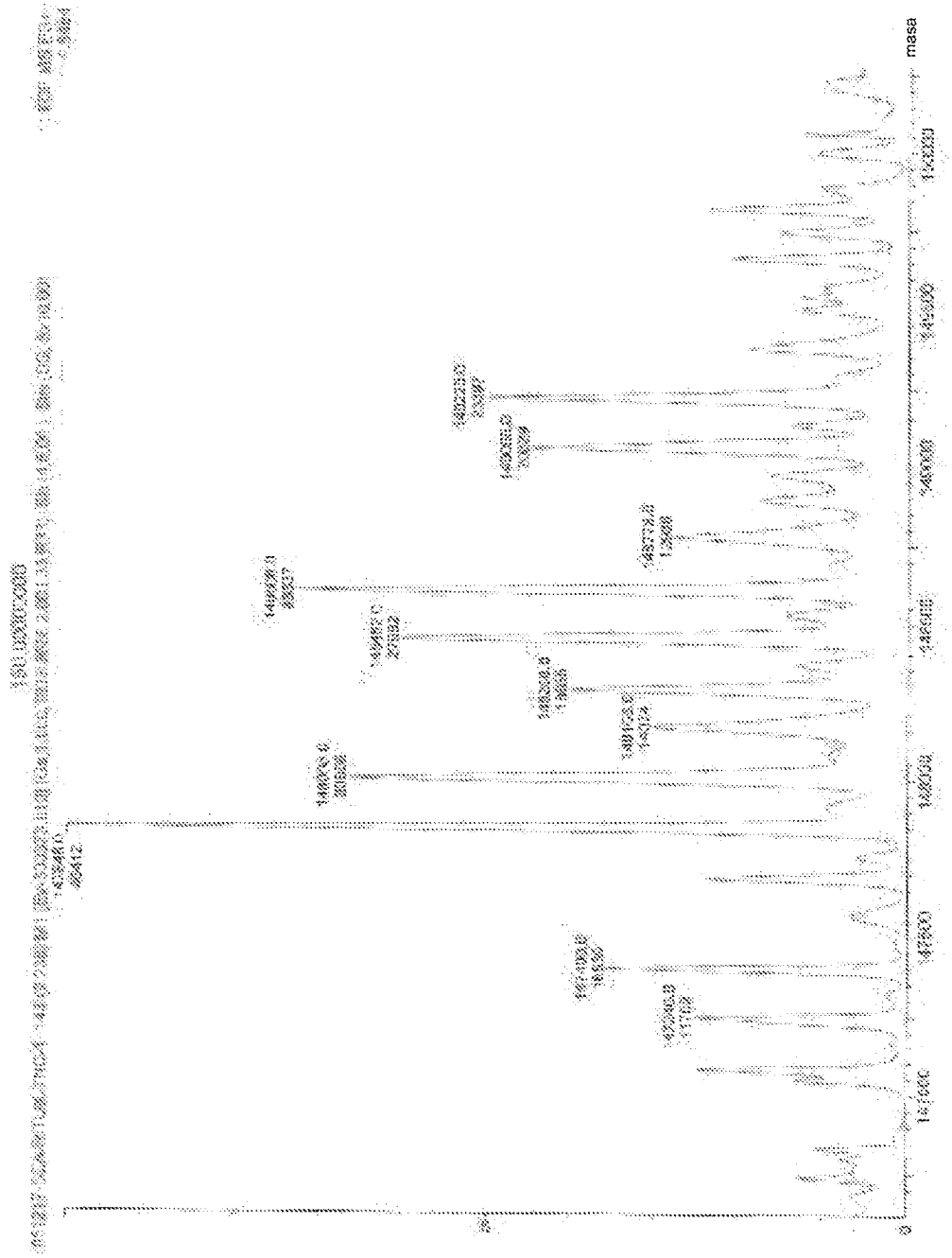


Fig. 81E

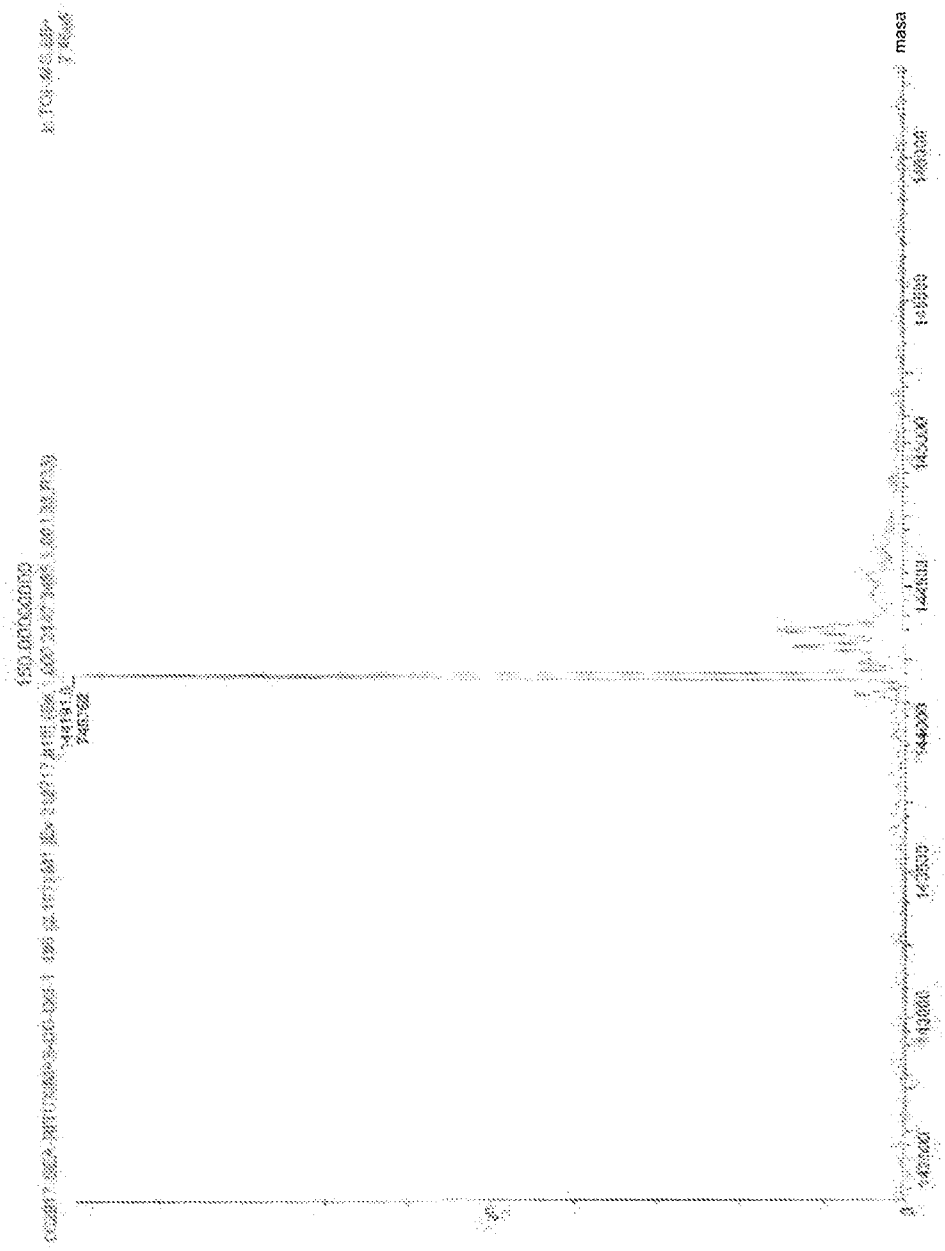


Fig. 81F

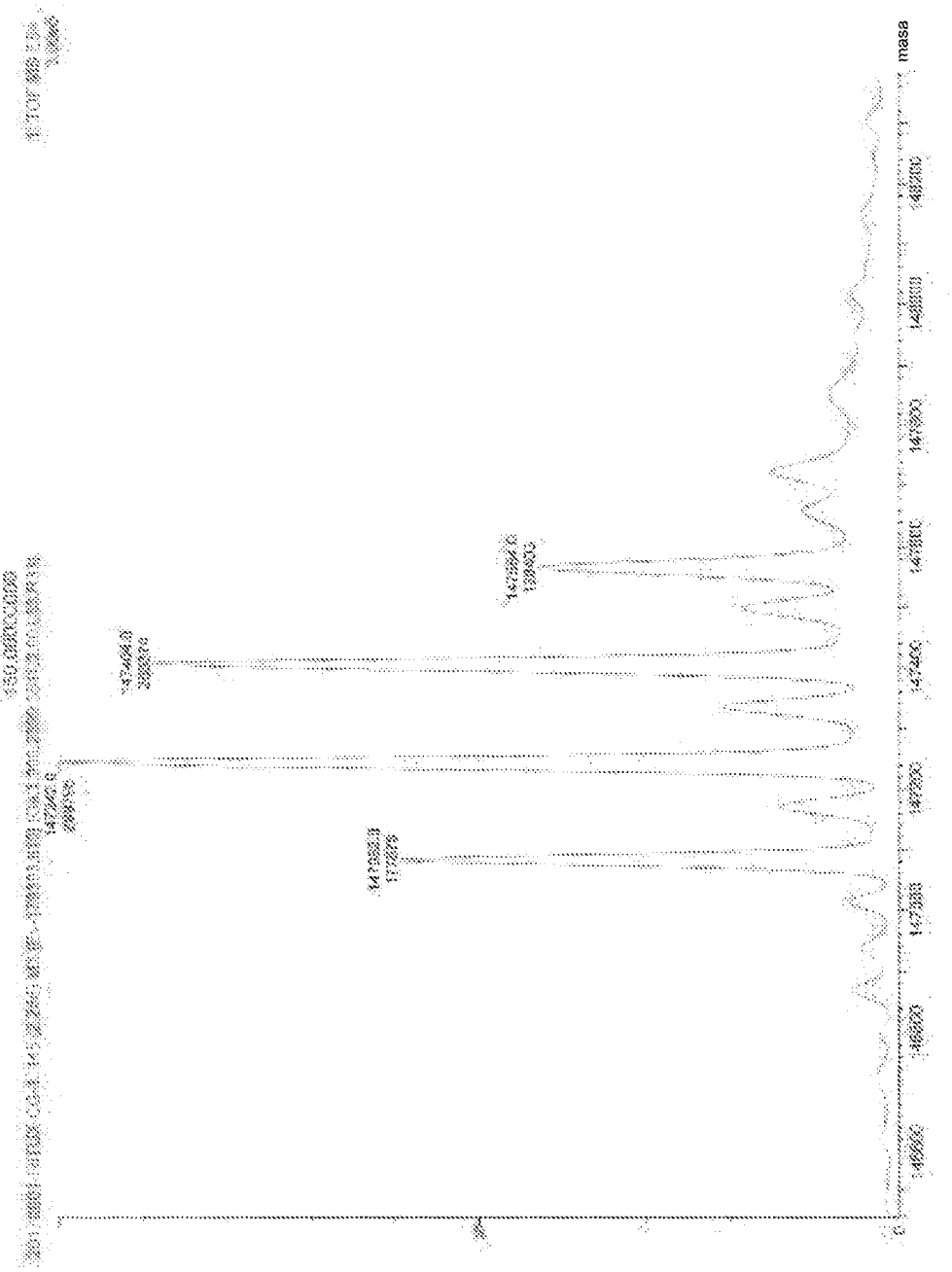


Fig. 81G

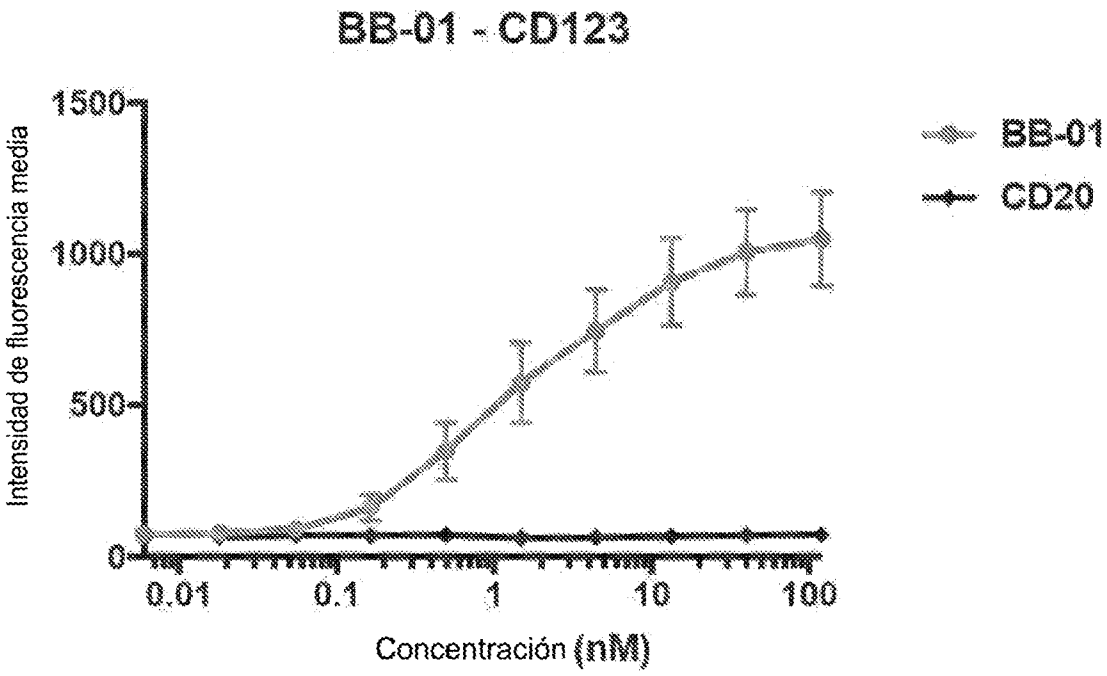


Fig. 81H

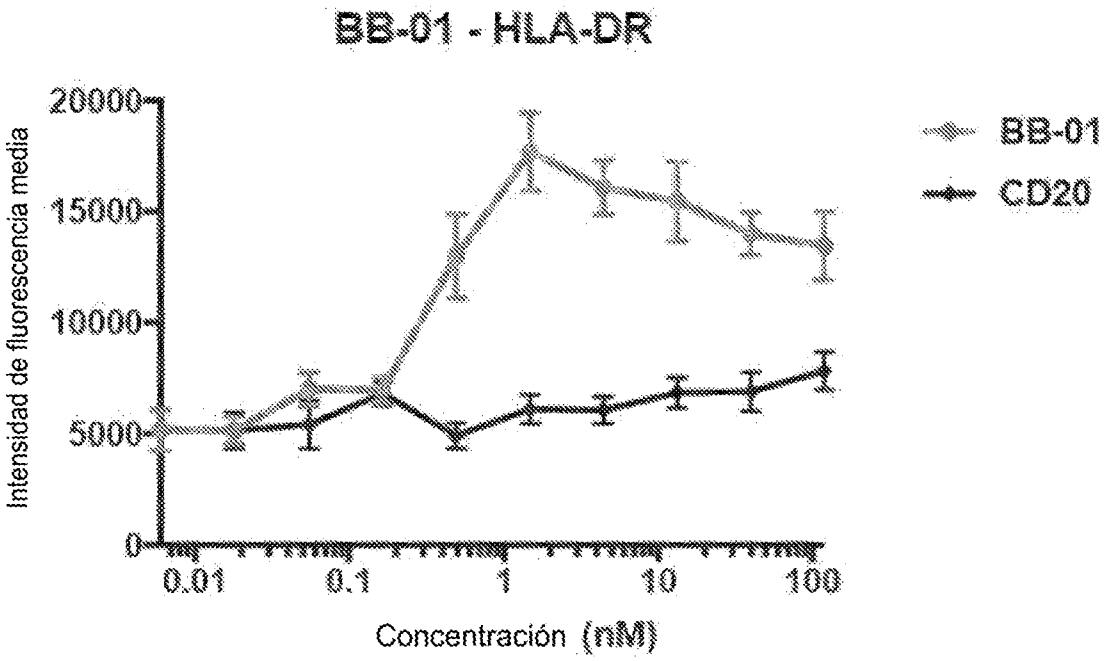


Fig. 81I

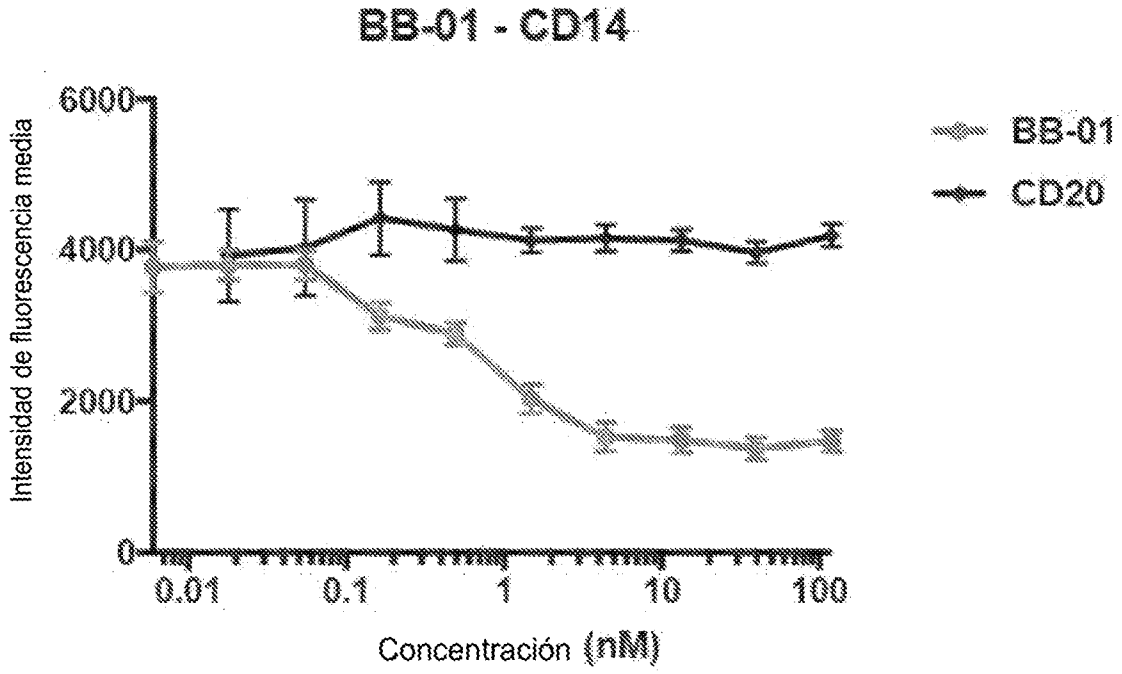


Fig. 81J

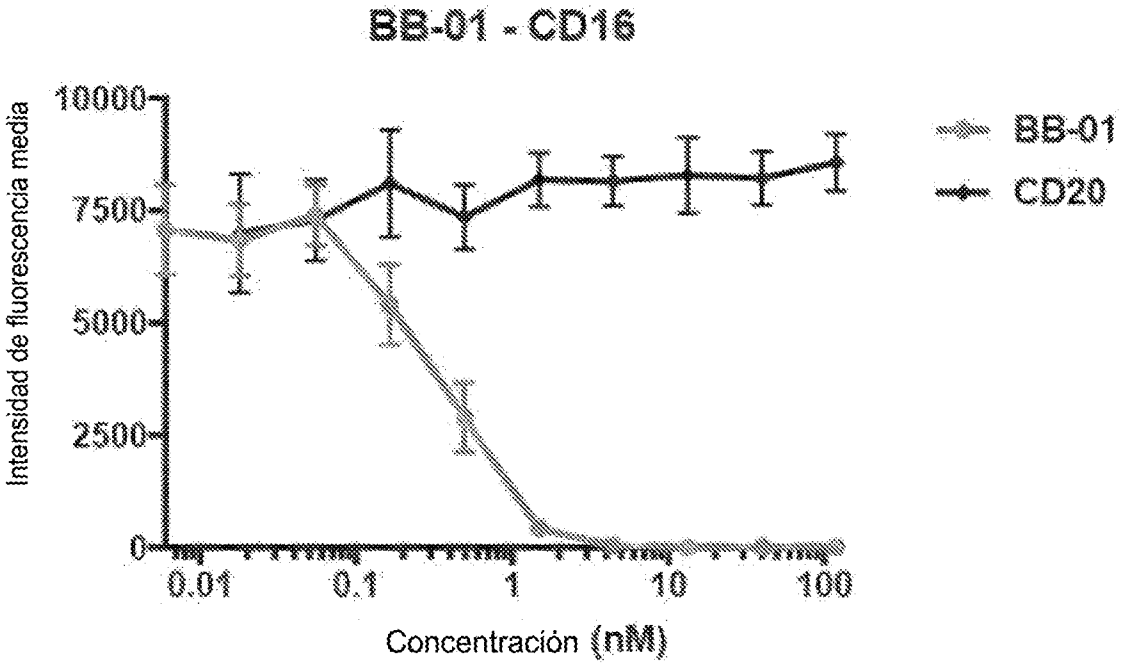


Fig. 81K

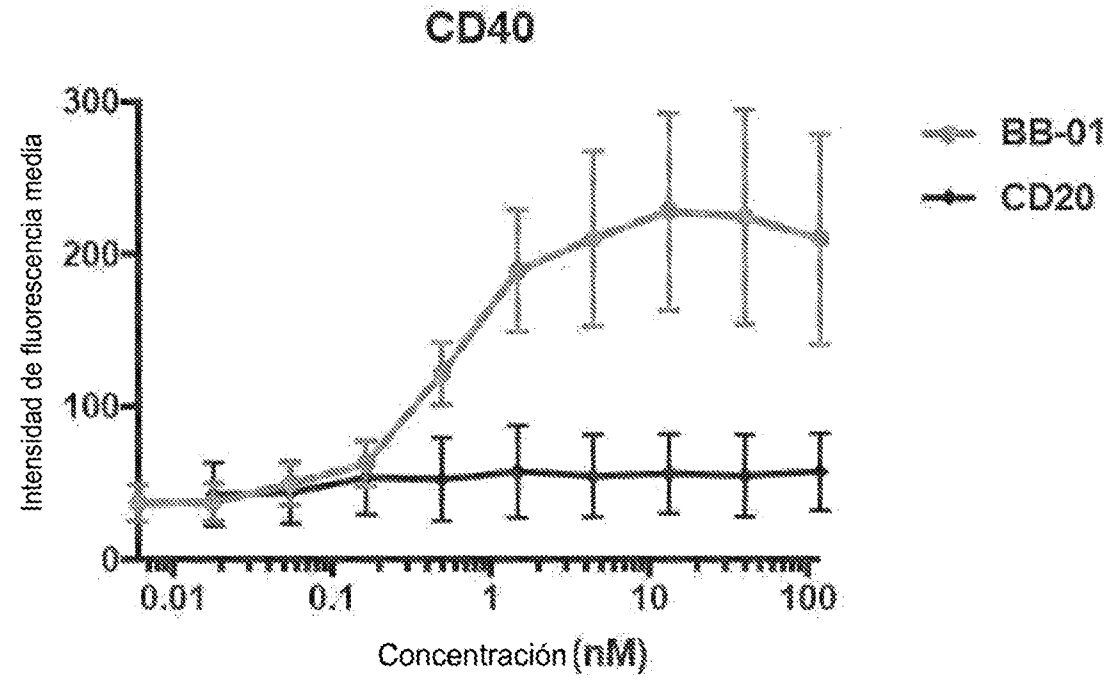


Fig. 81L

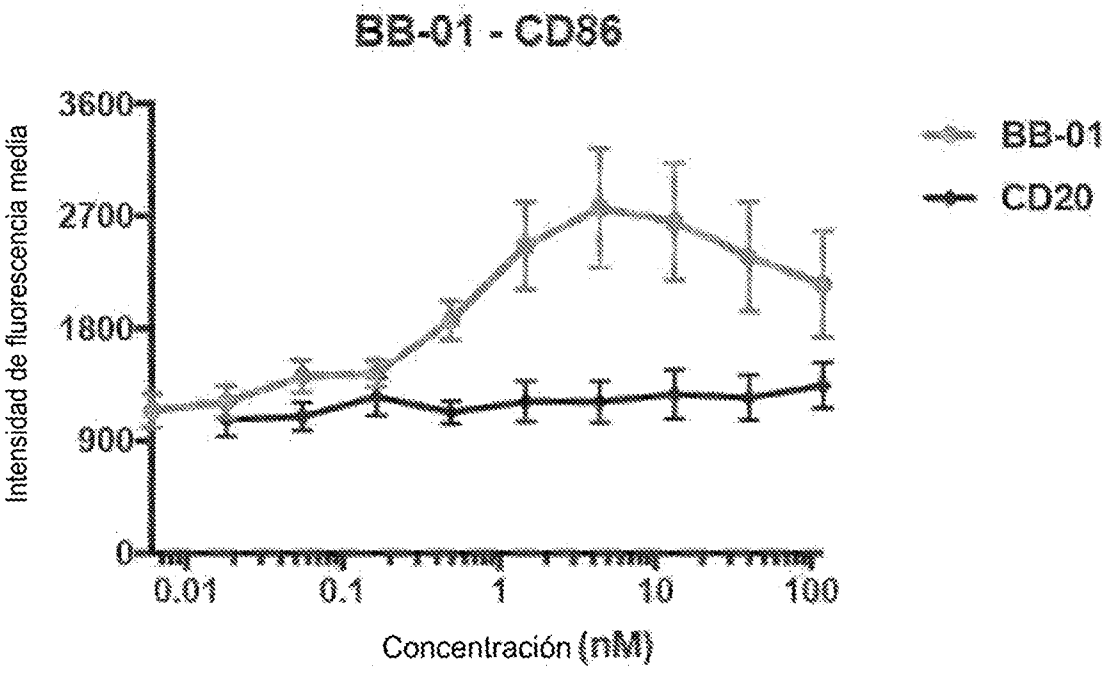


Fig. 81M

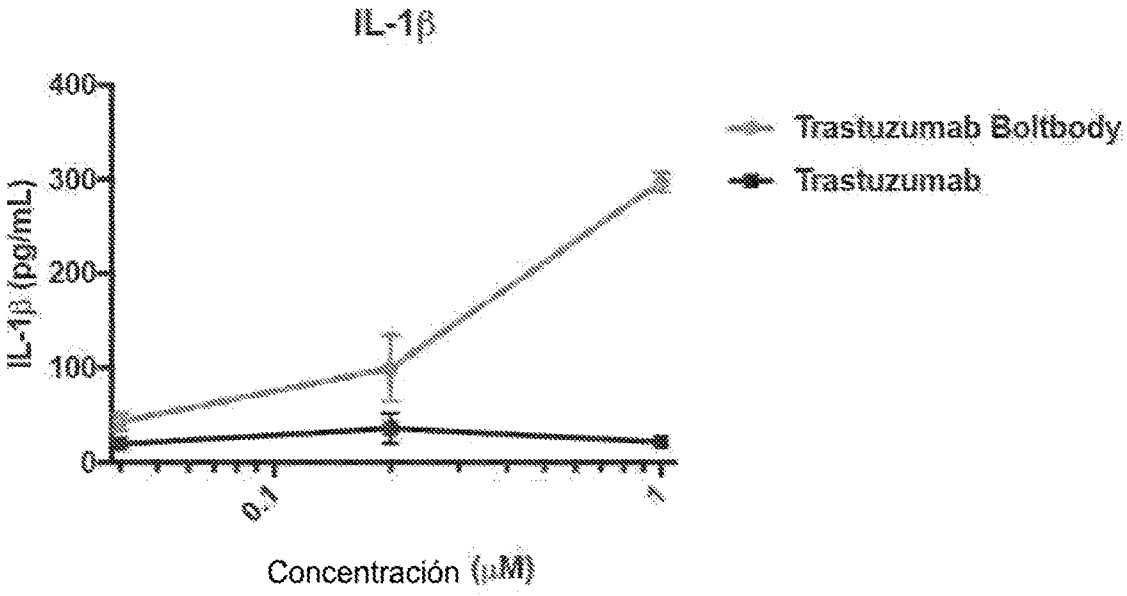


Fig. 82A

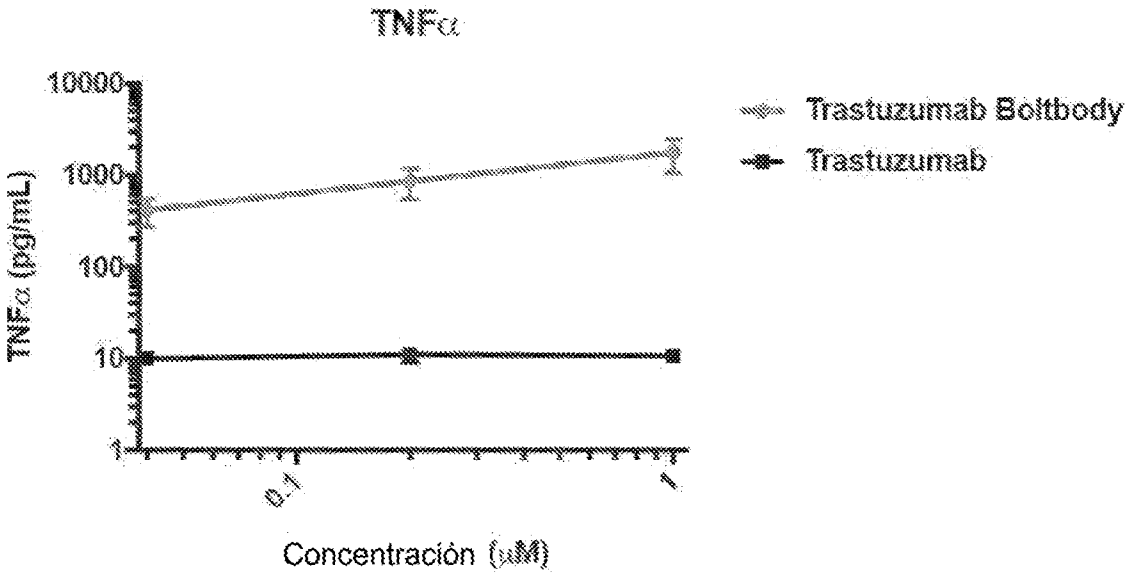


Fig. 82B

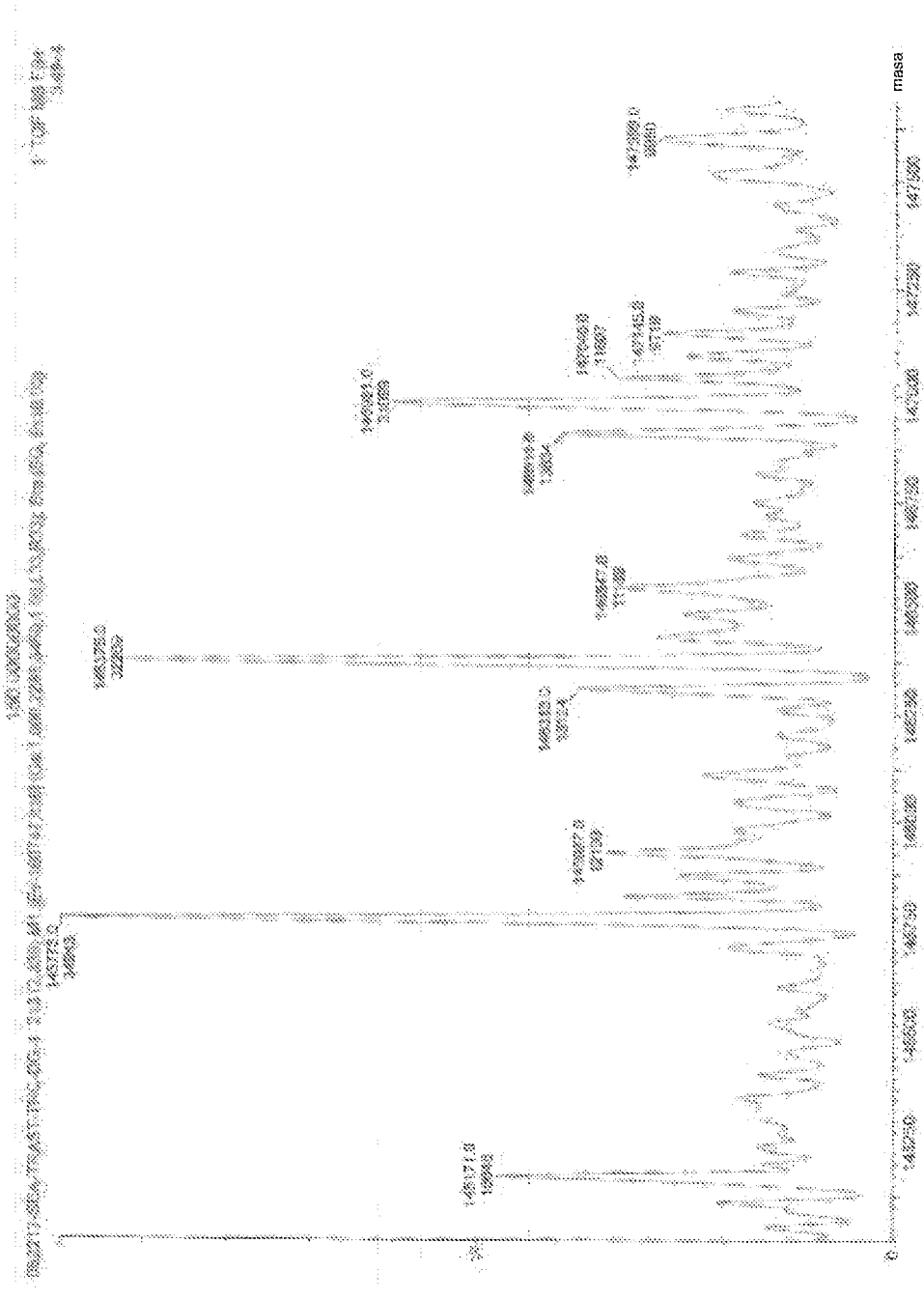


Fig. 82C

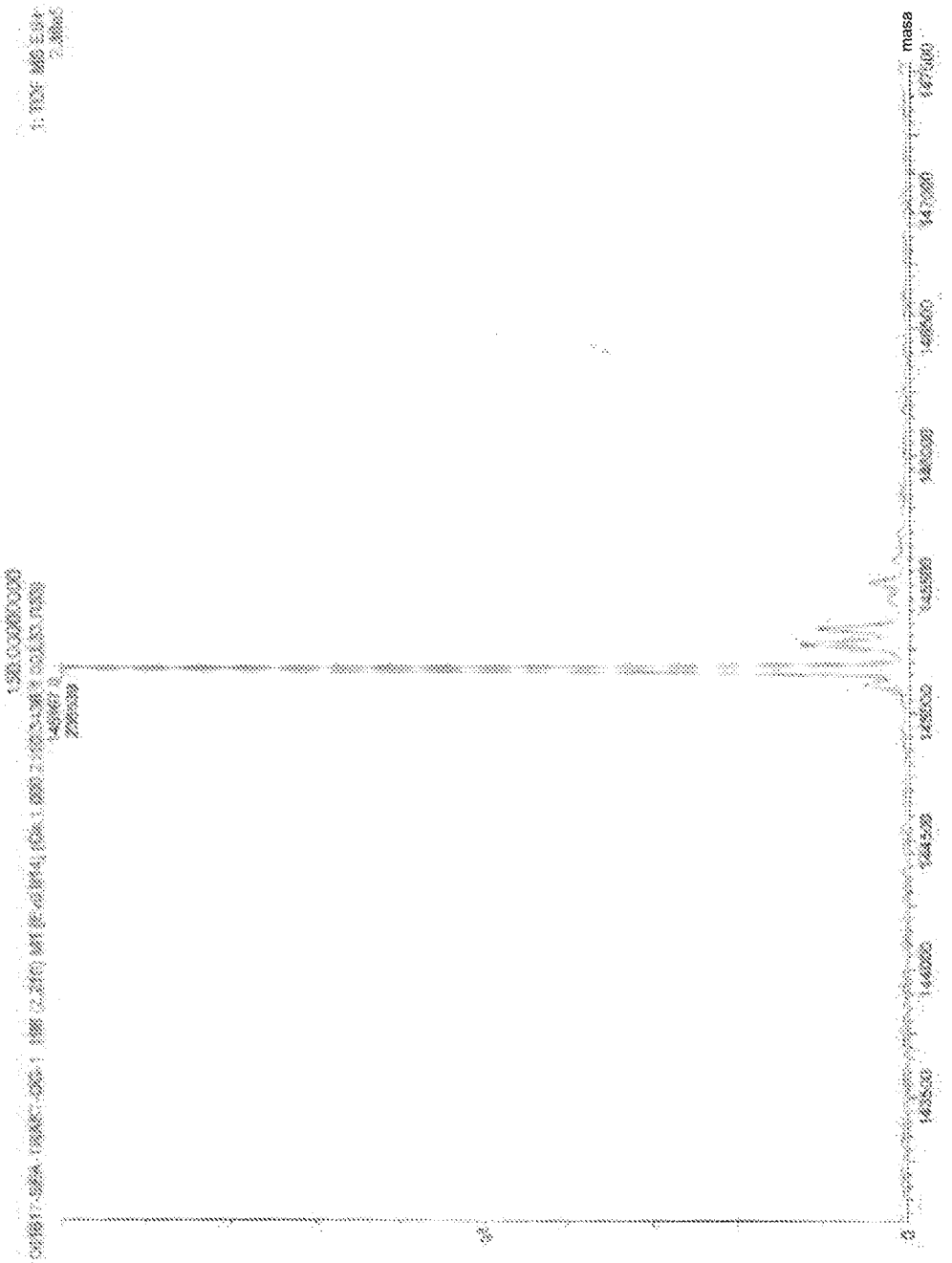


Fig. 82D

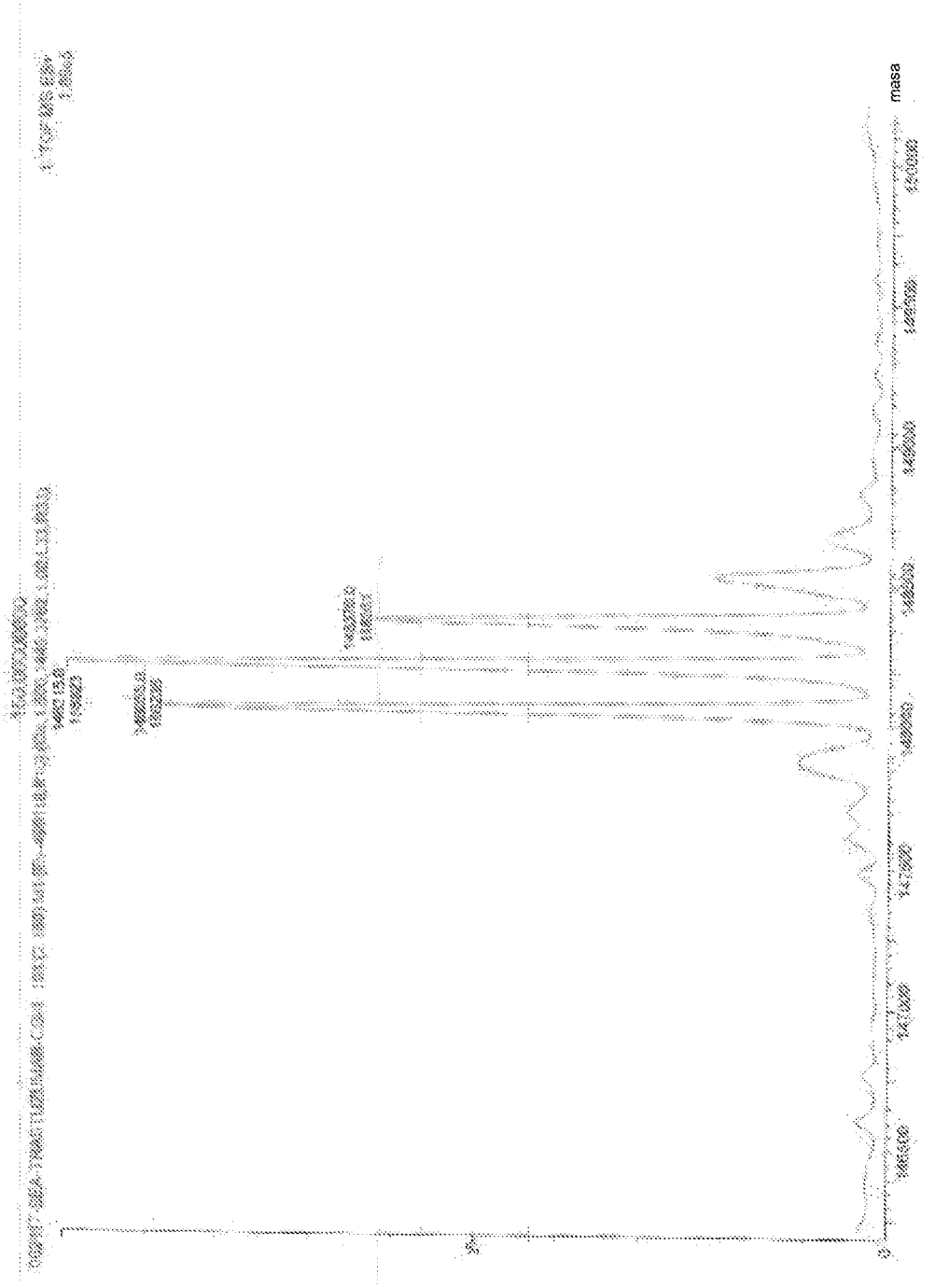


Fig. 82E

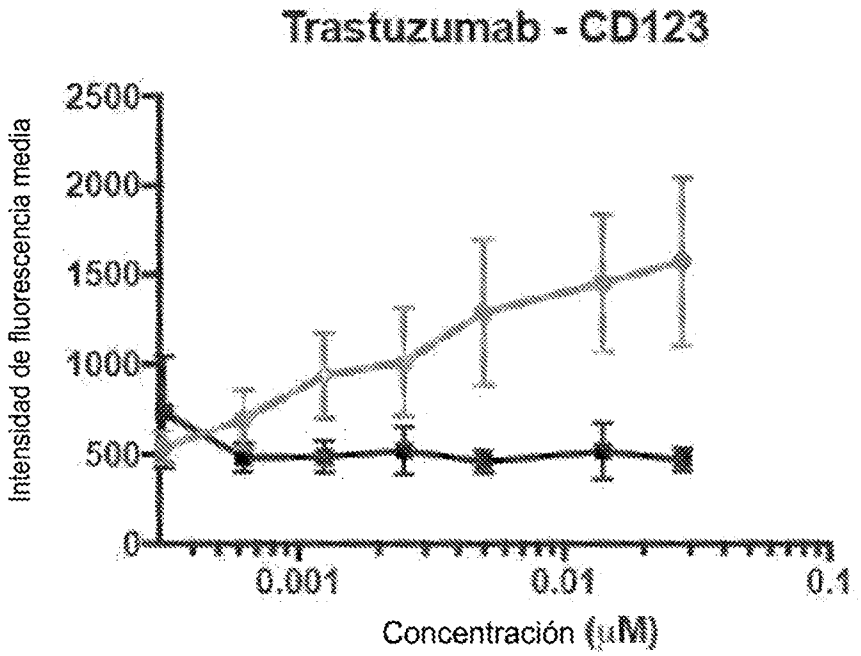


Fig. 82F

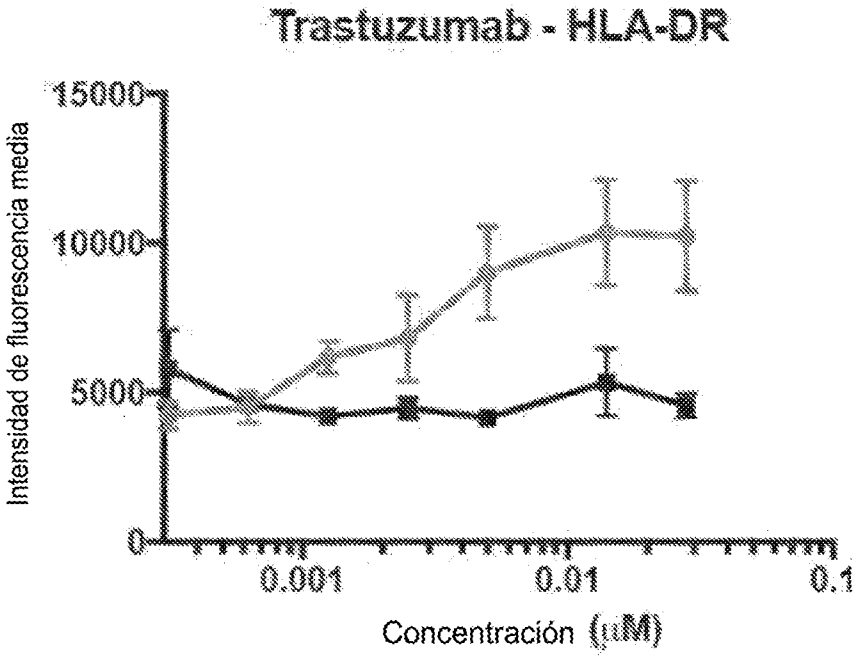


Fig. 82G

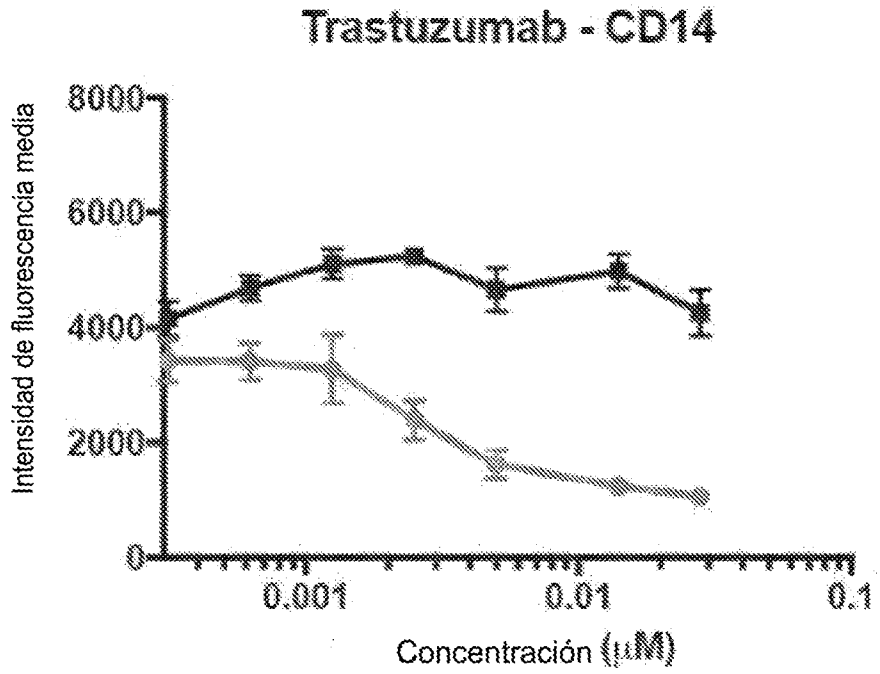


Fig. 82H

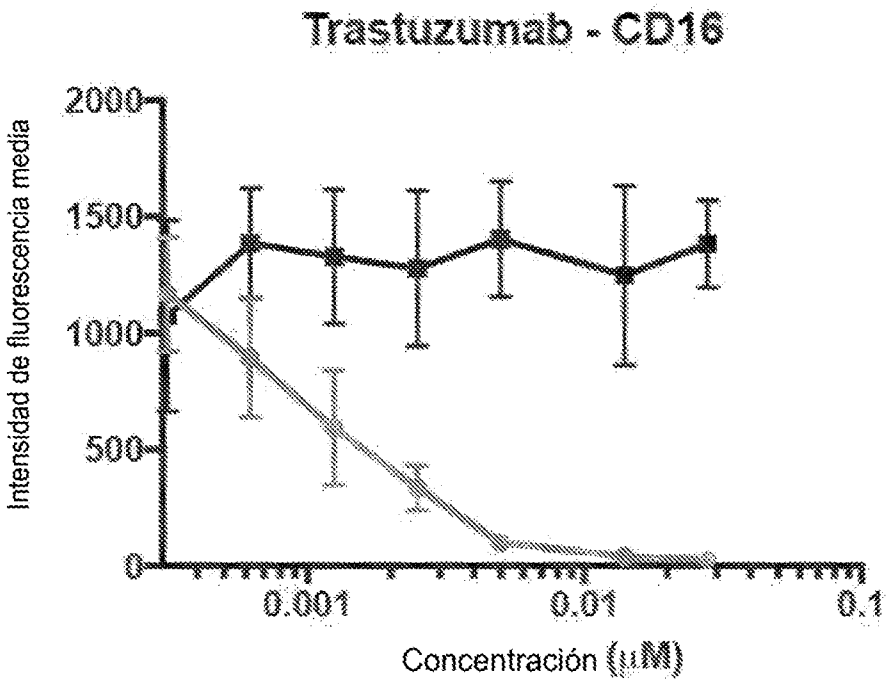


Fig. 82I

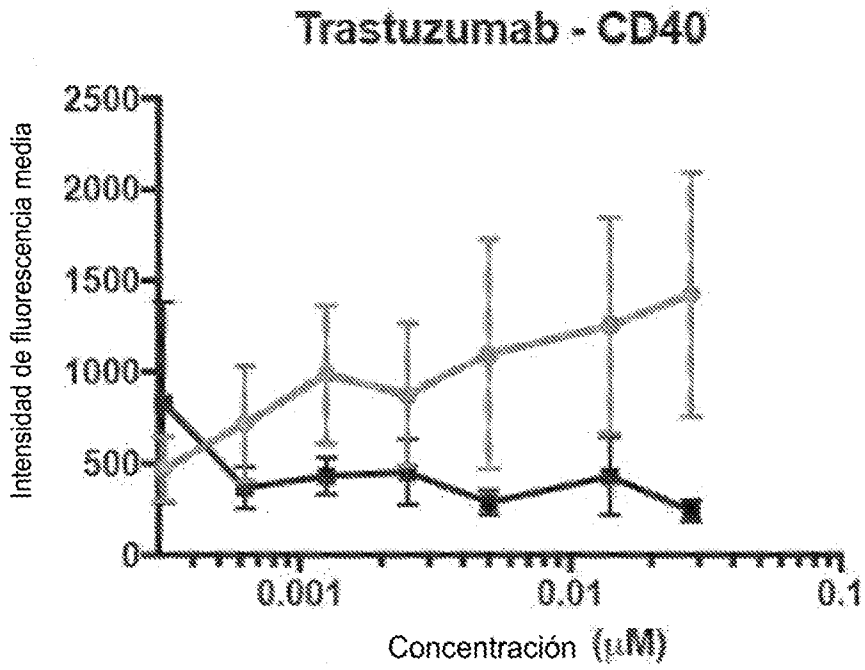


Fig. 82J

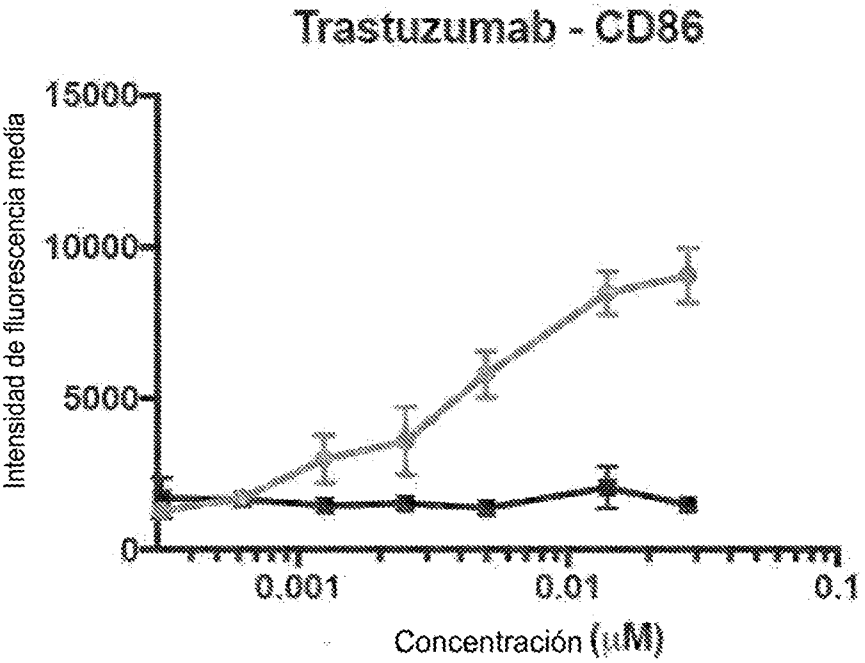


Fig. 82K

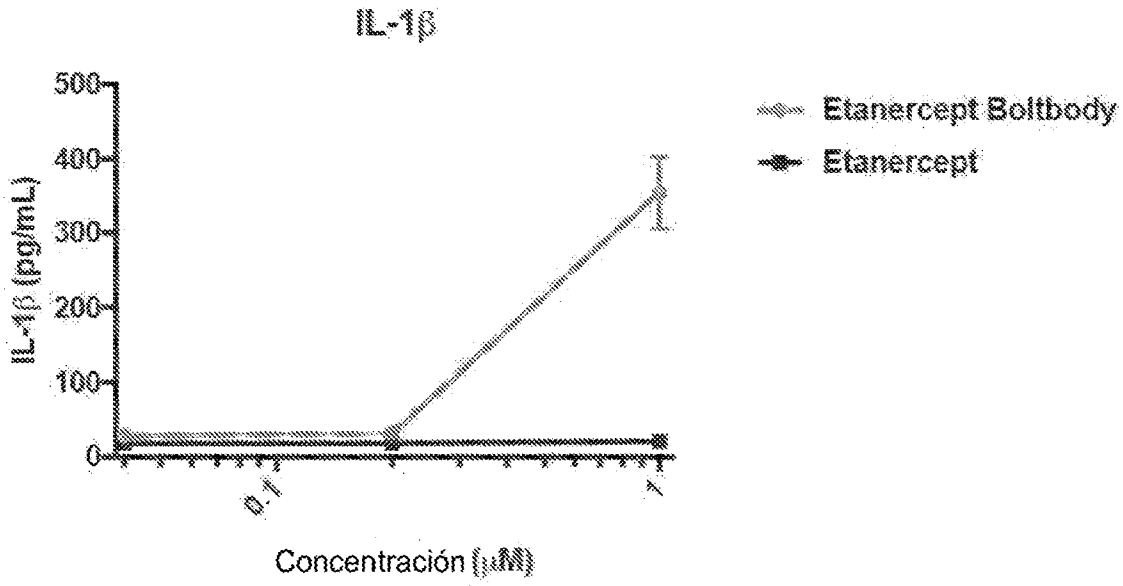


Fig. 83A

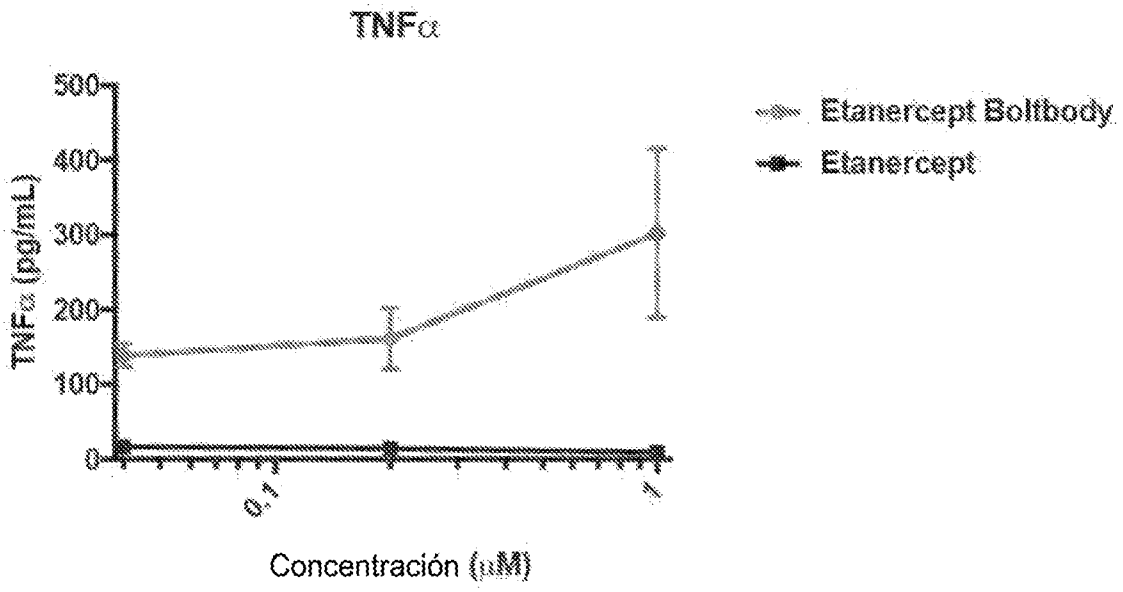


Fig. 83B

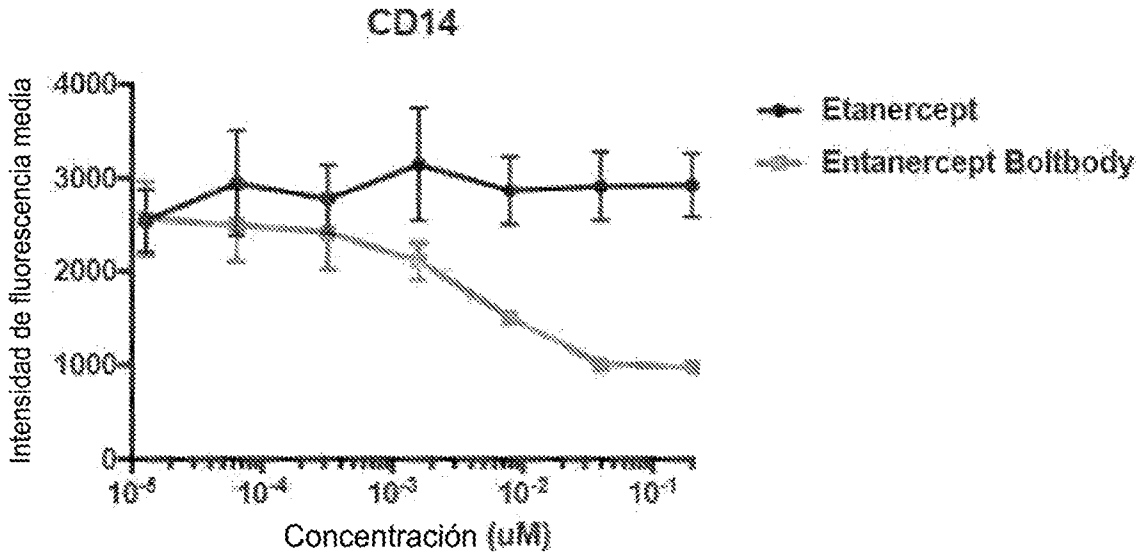


Fig. 83C

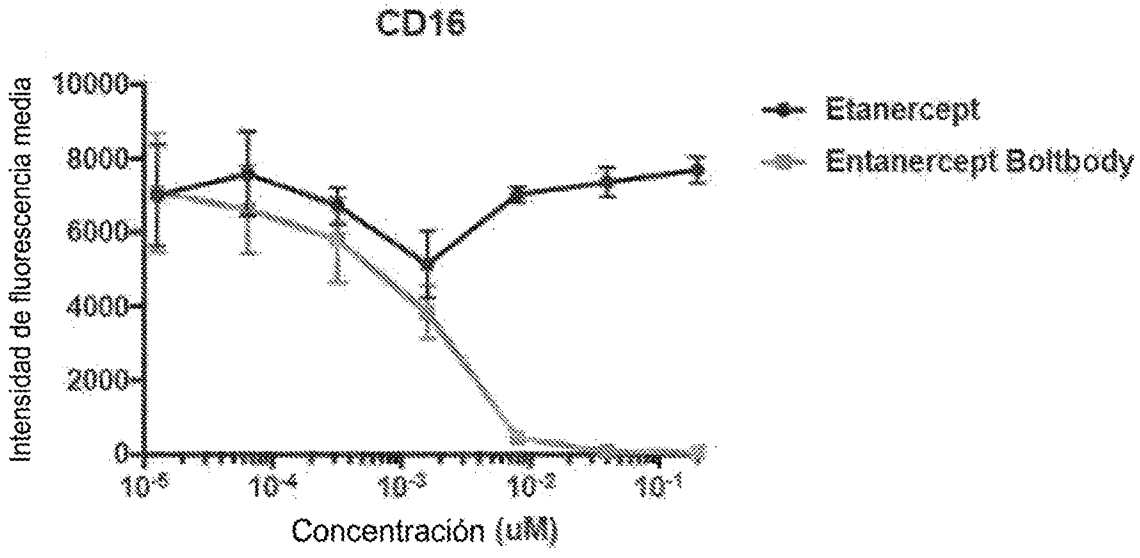


Fig. 83D

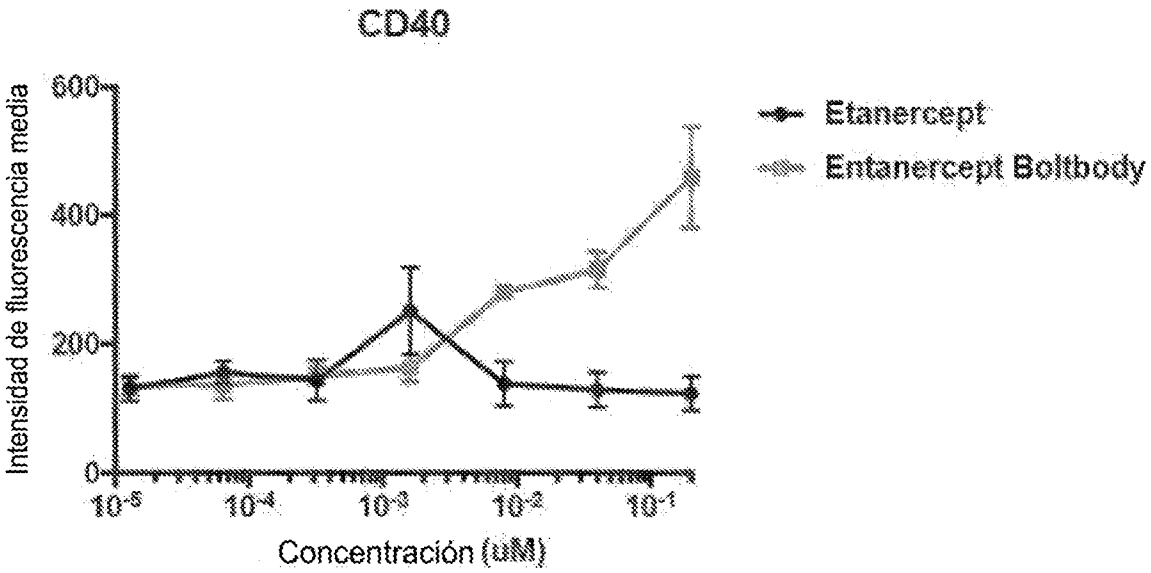


Fig. 83E

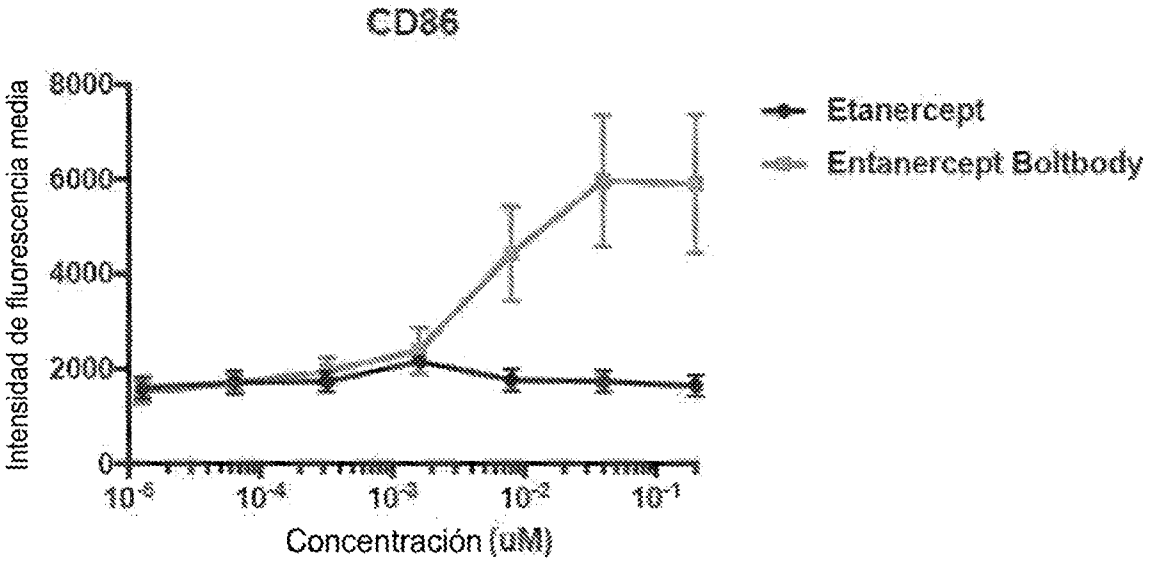


Fig. 83F

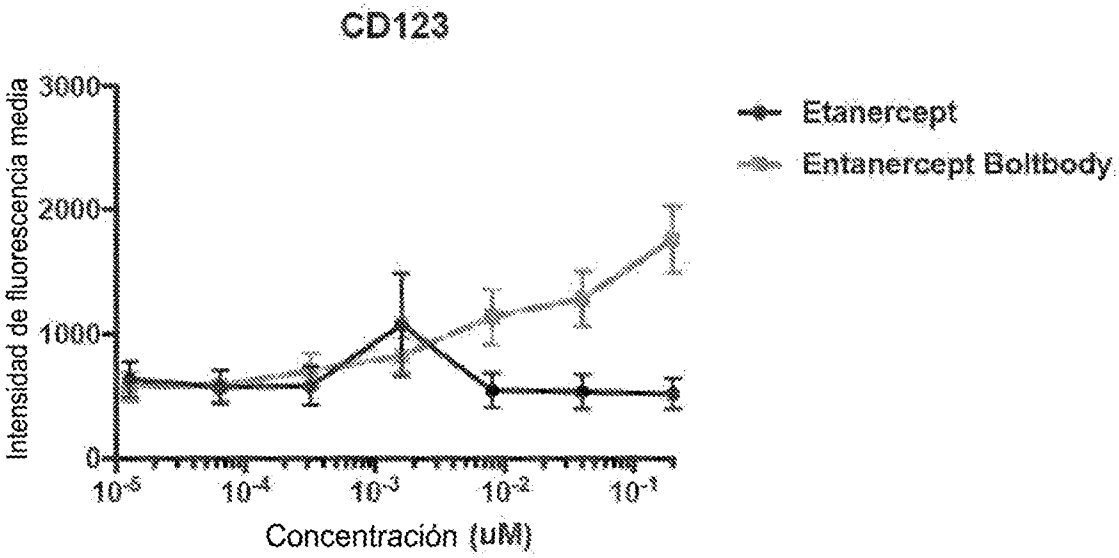


Fig. 83G

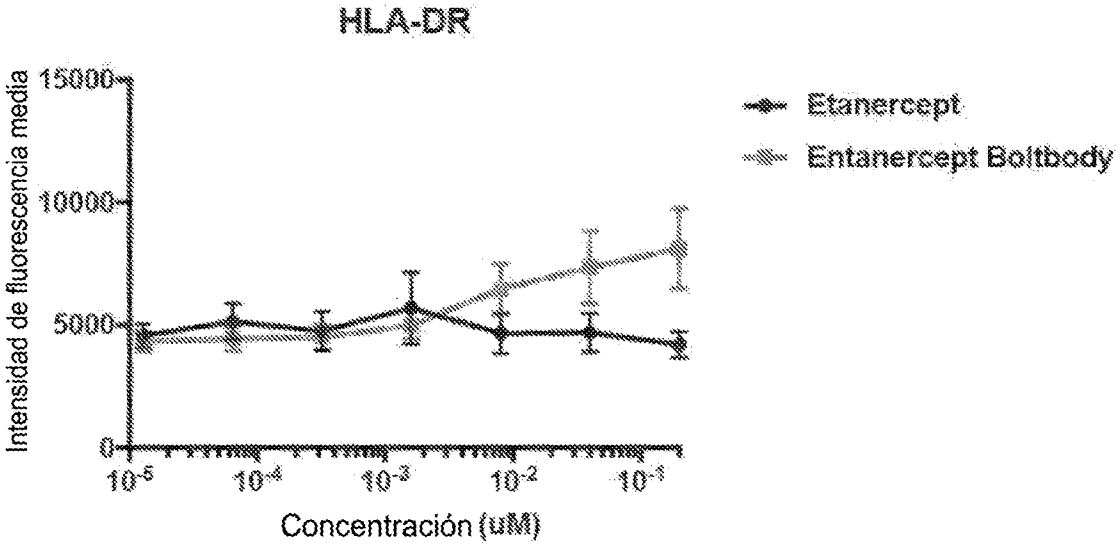


Fig. 83H

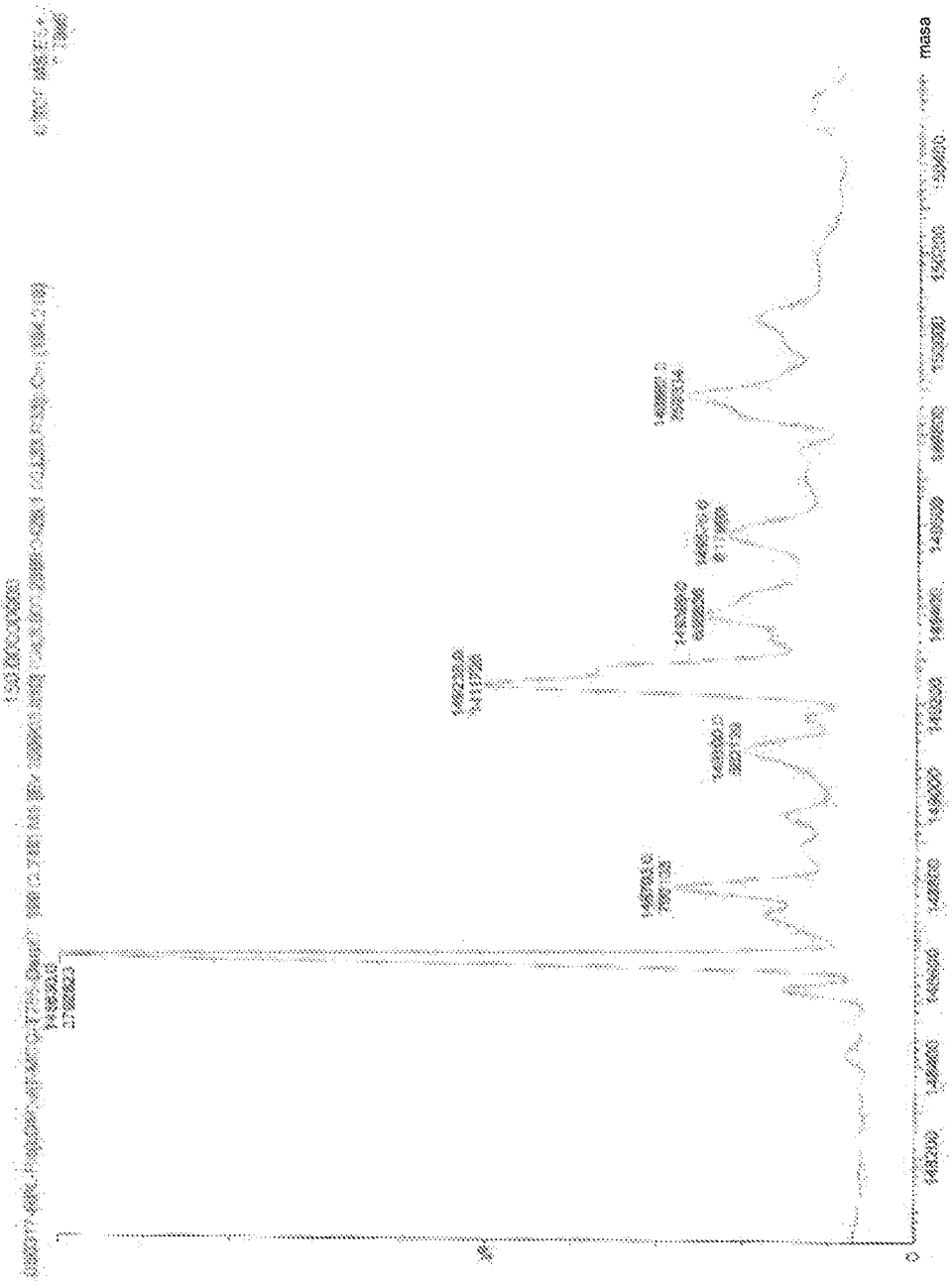


Fig. 84A

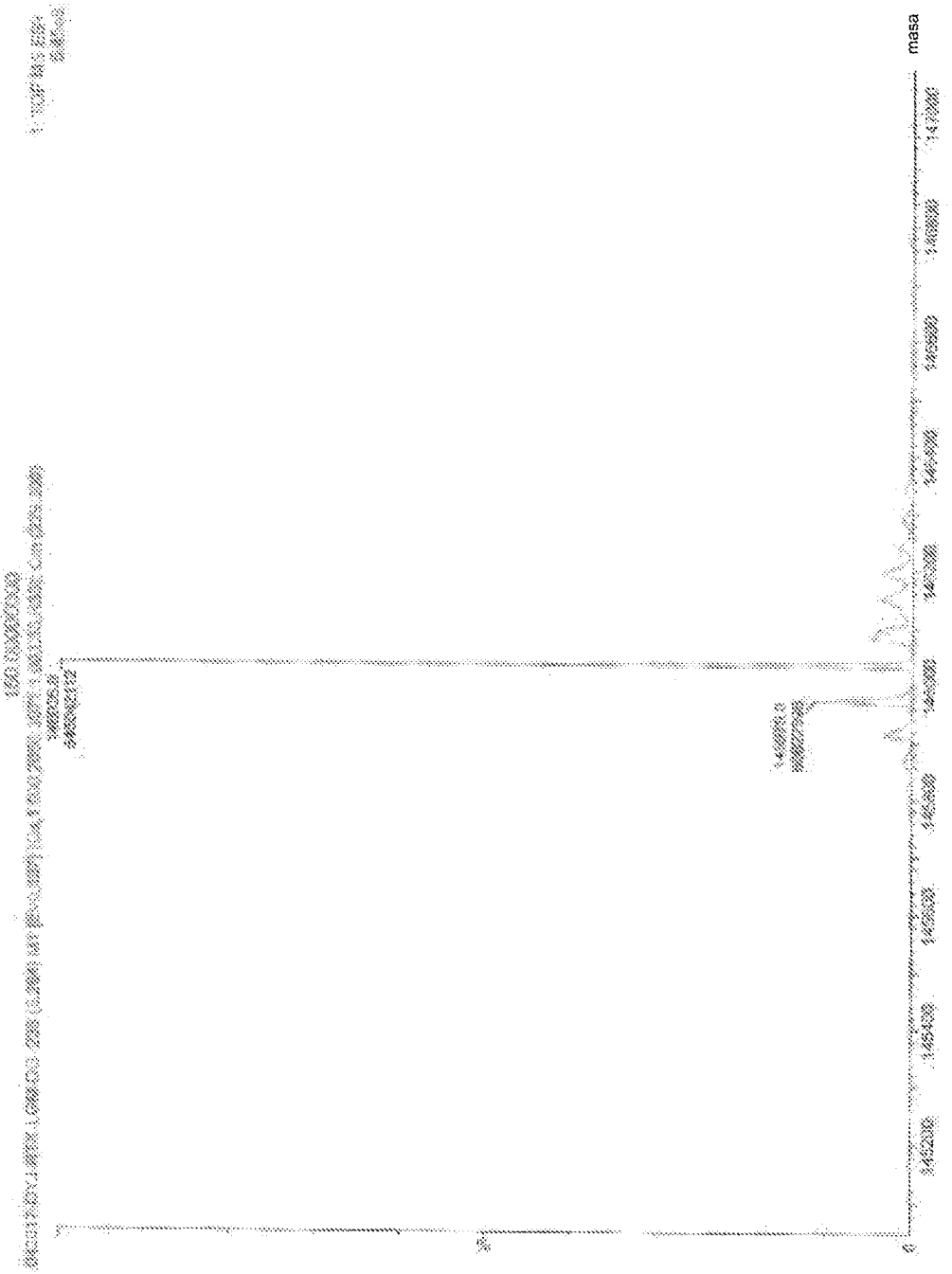


Fig. 84B

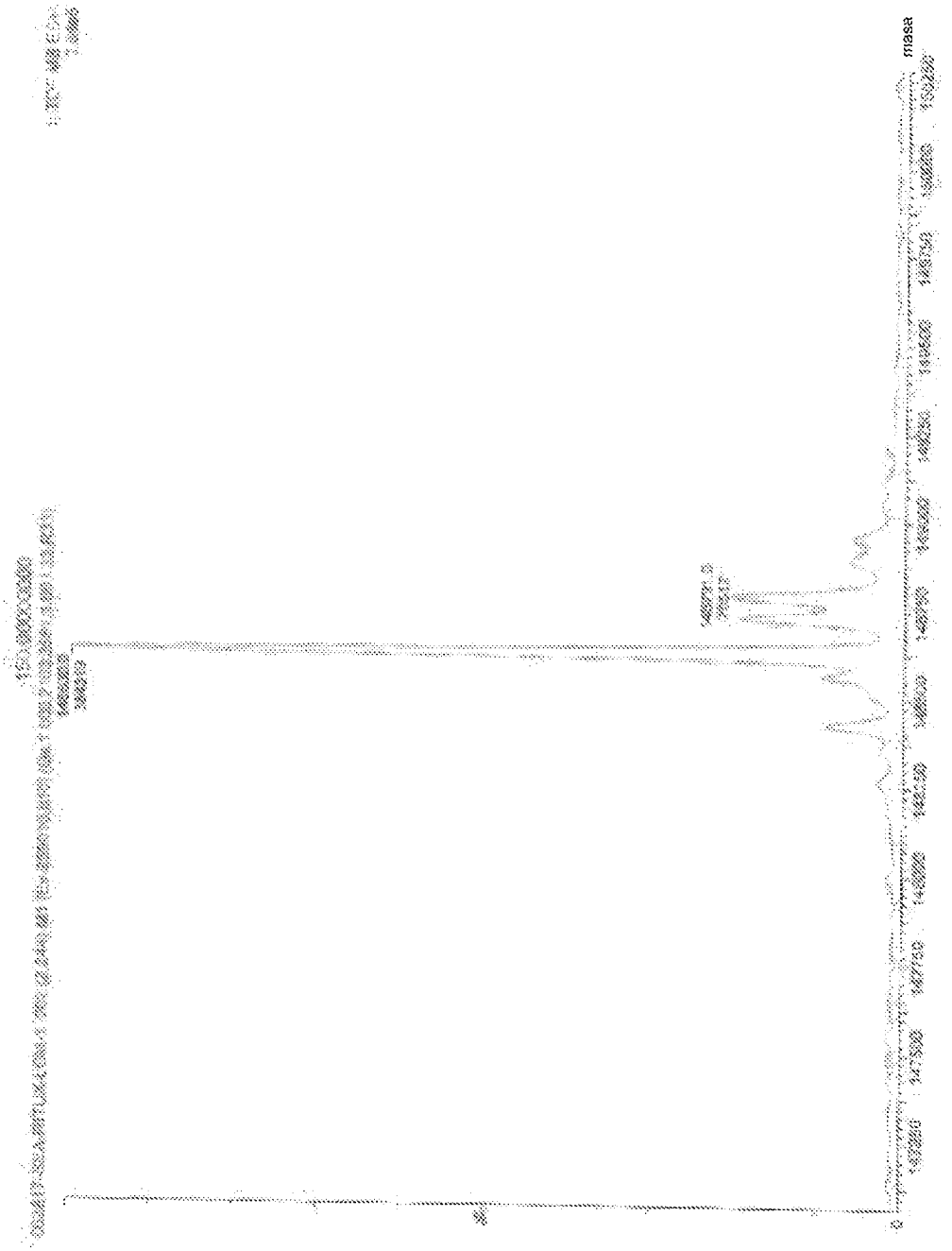


Fig. 84C

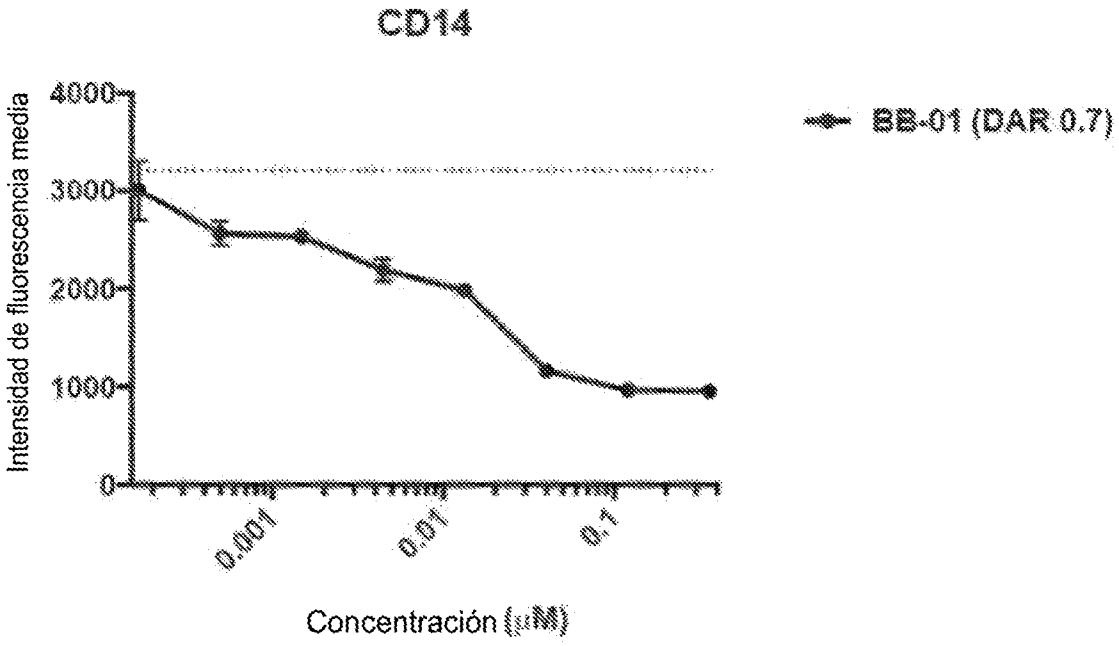


Fig. 84D

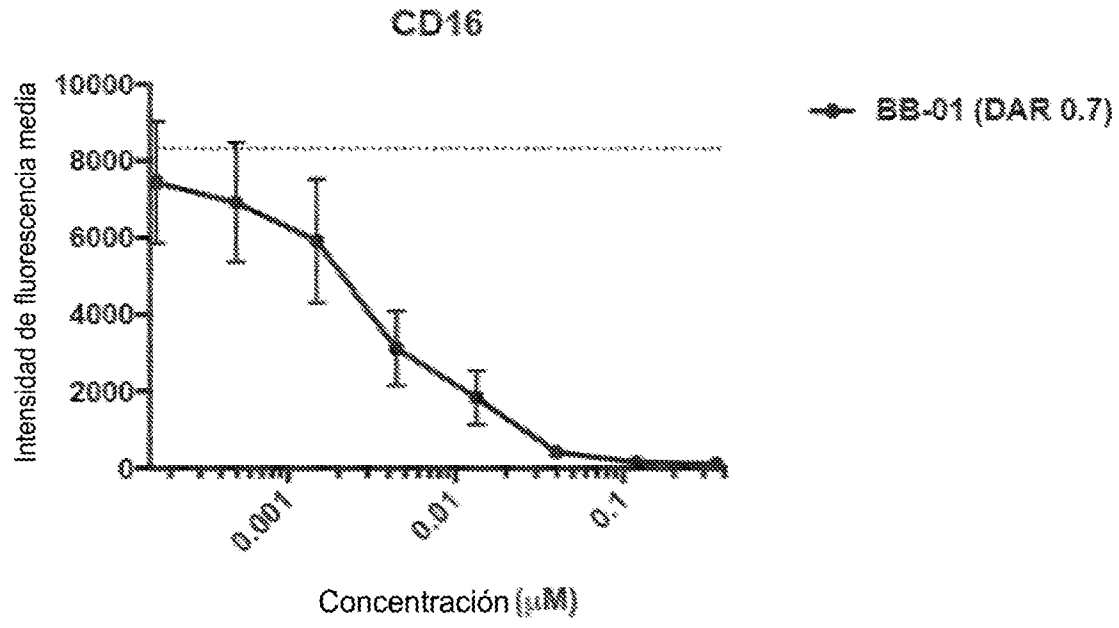


Fig. 84E

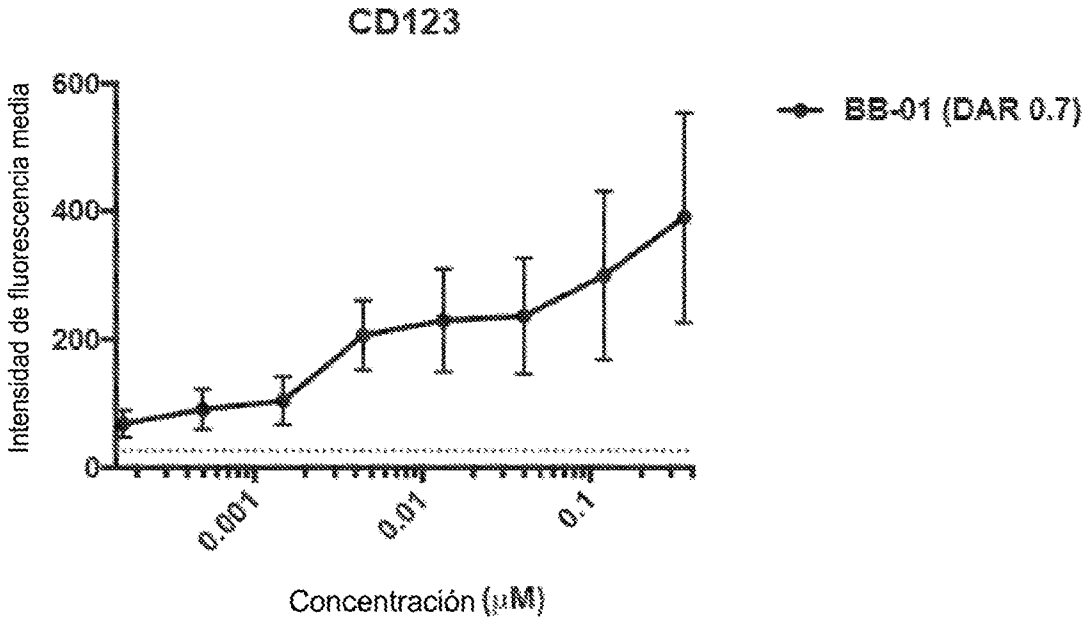


Fig. 84H

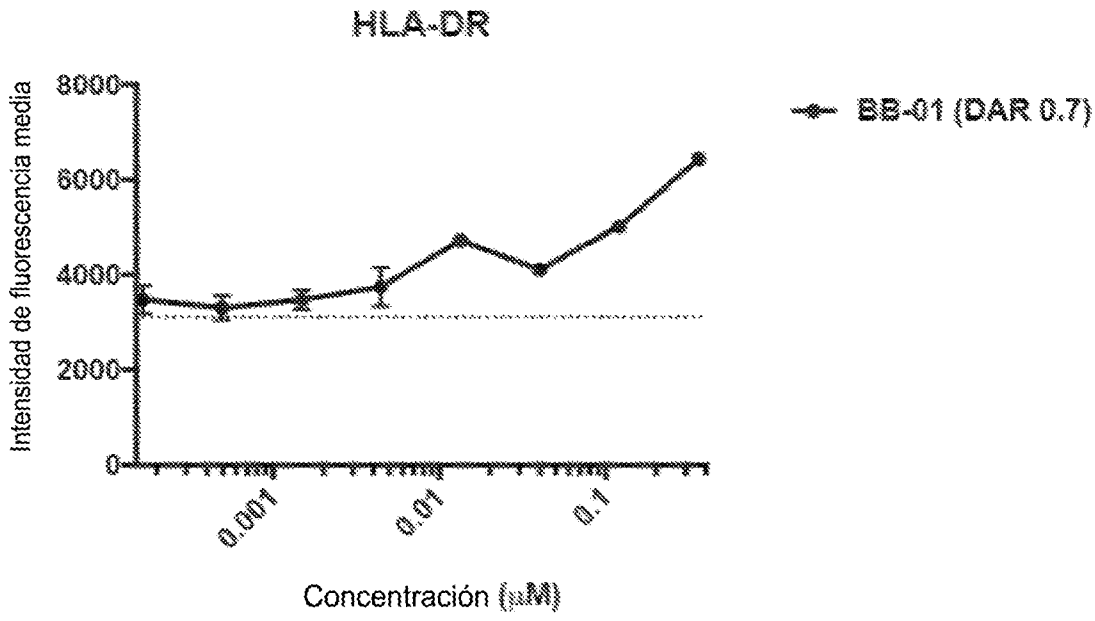


Fig. 84I

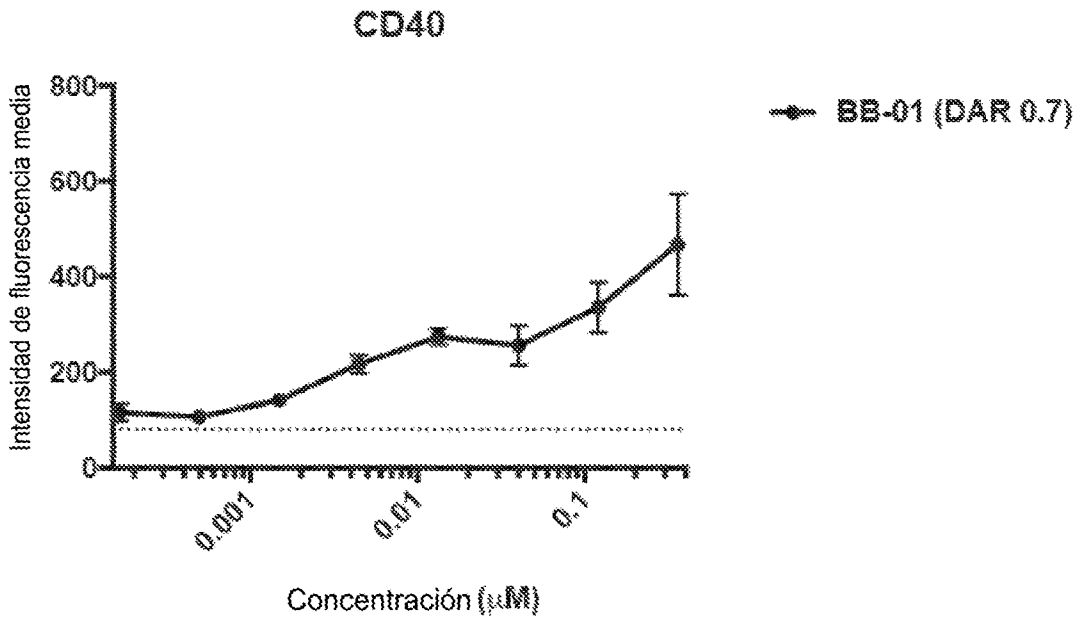


Fig. 84F

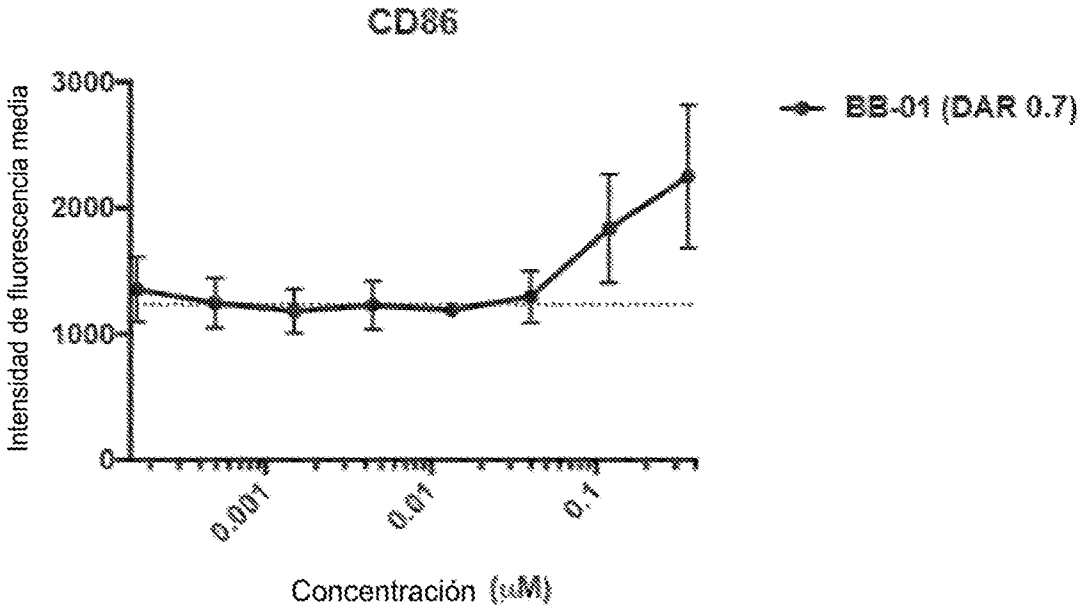


Fig. 84G

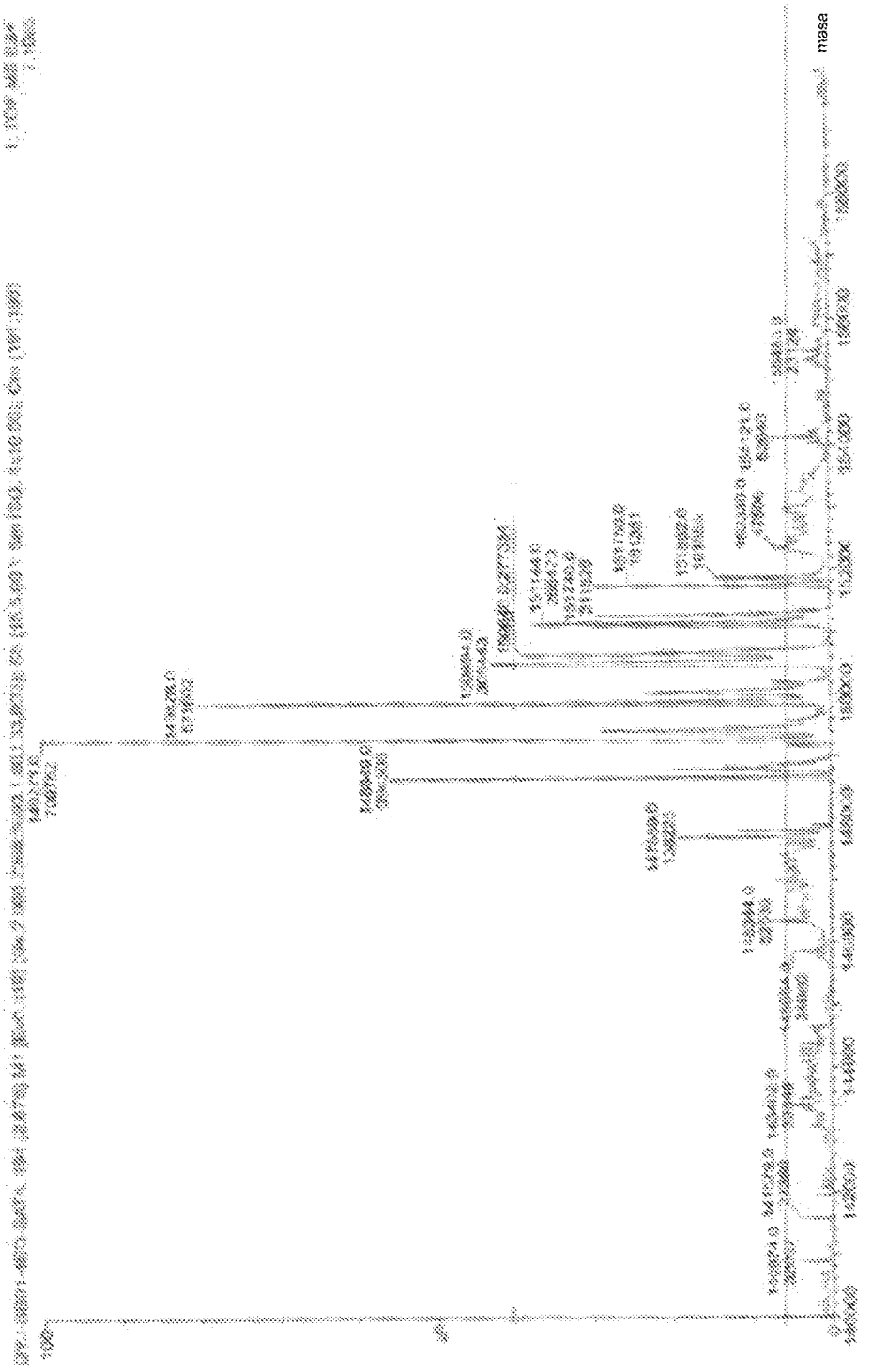


Fig. 85A

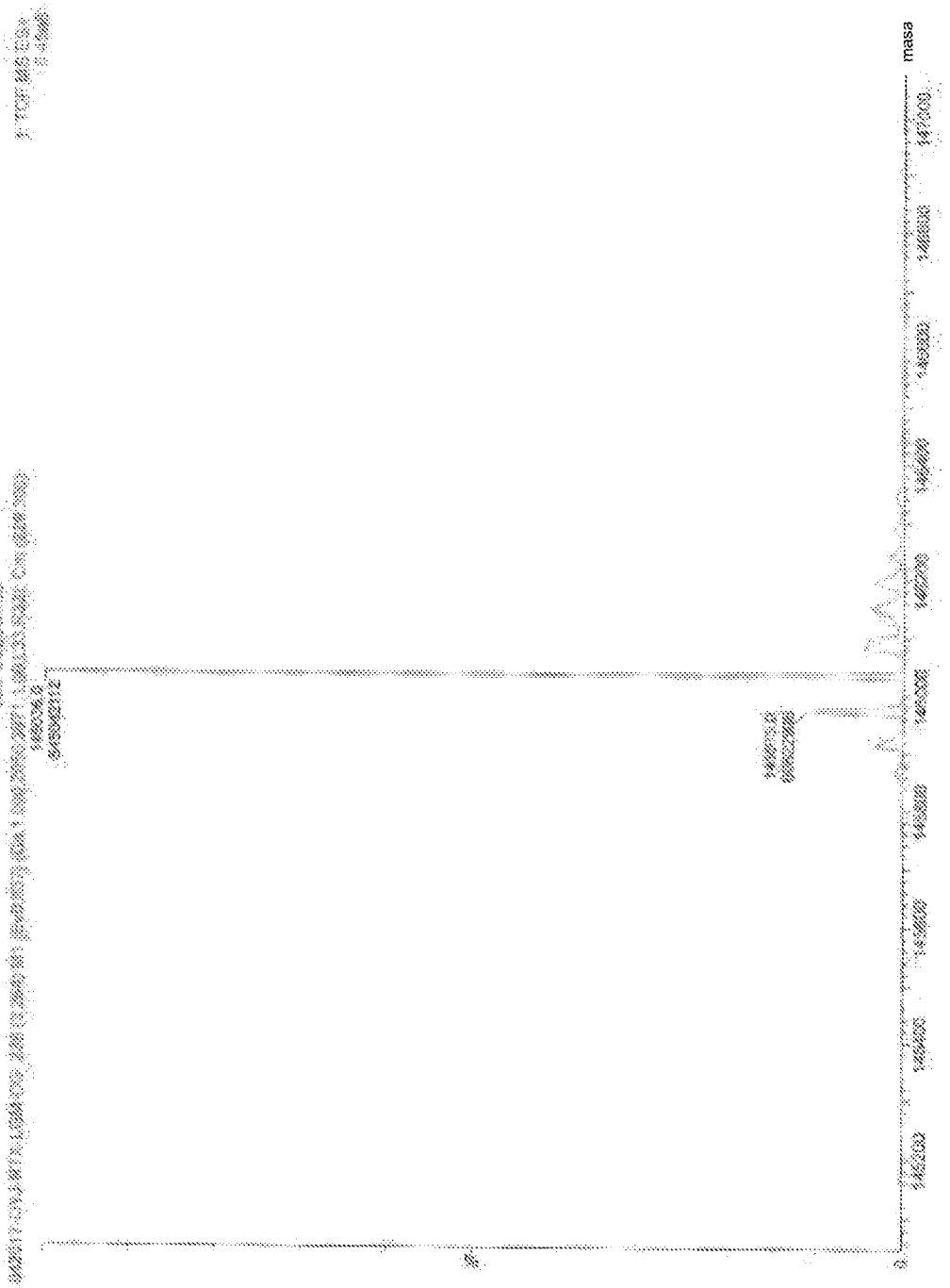


Fig. 85B

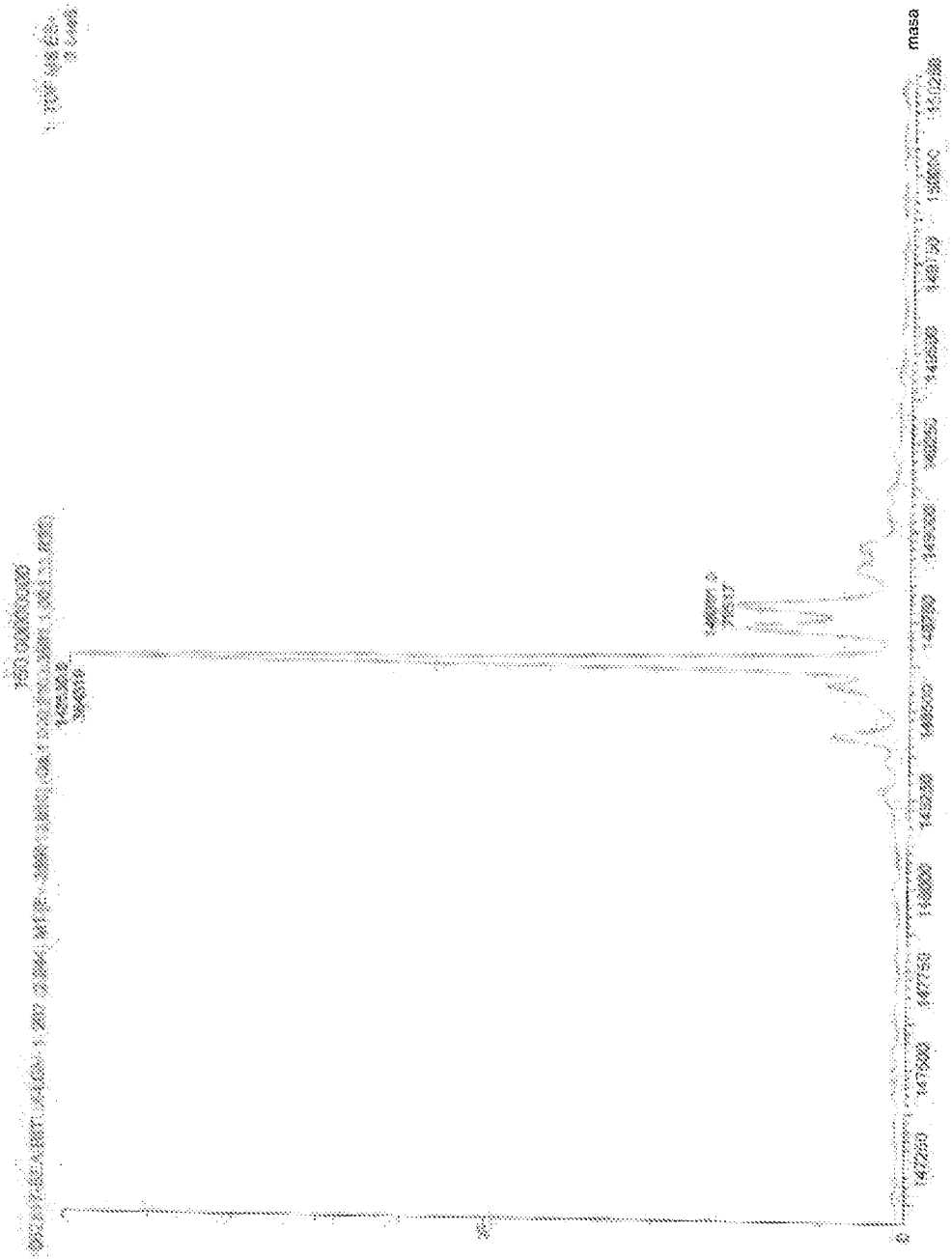


Fig. 85C

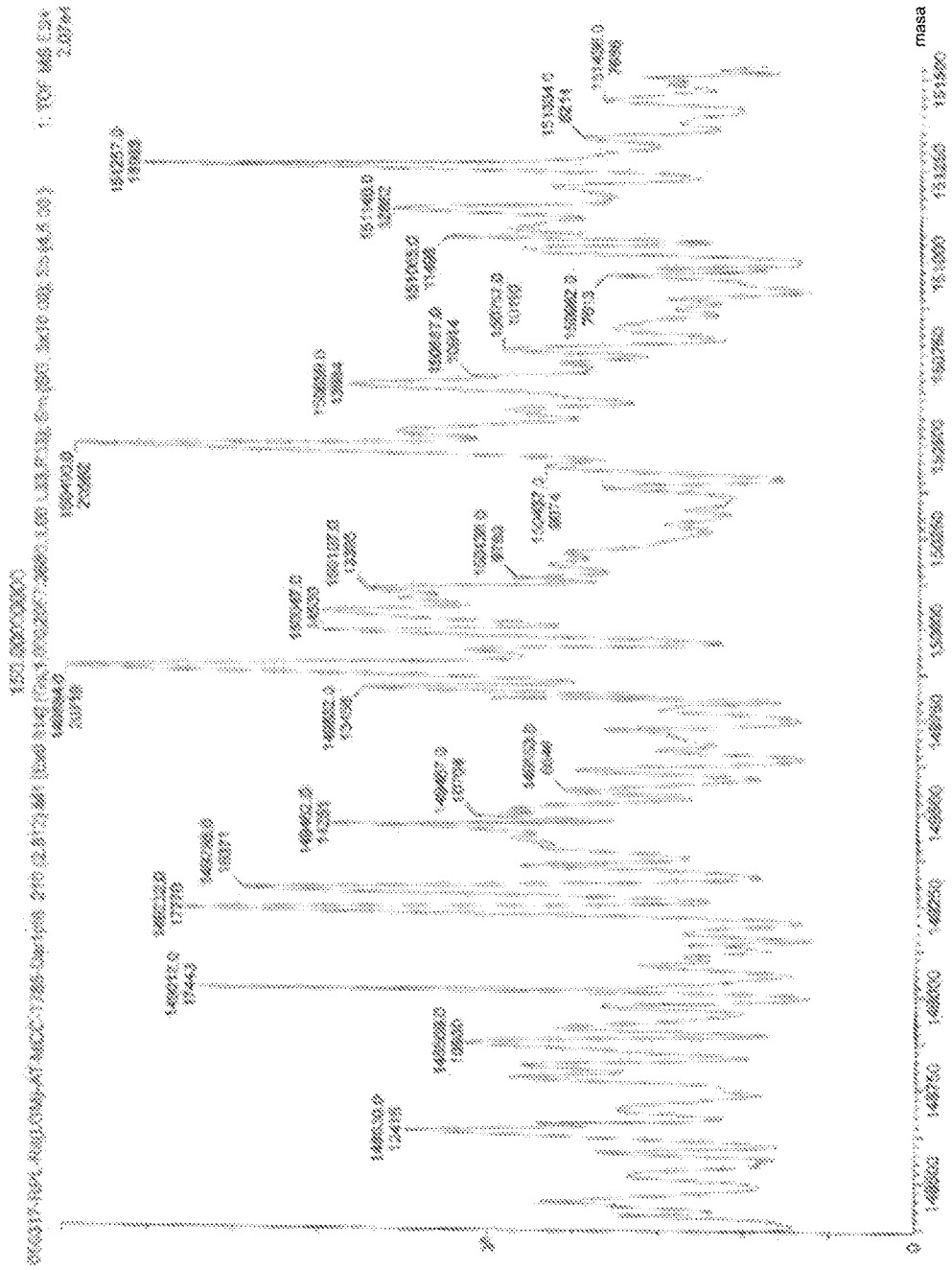


Fig. 85D

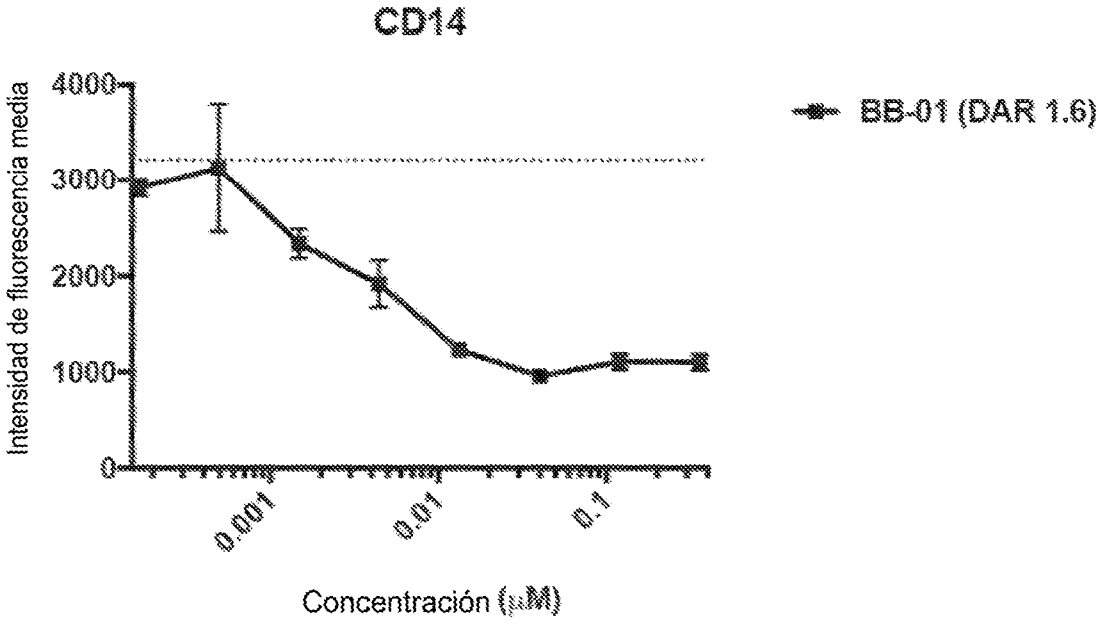


Fig. 85E

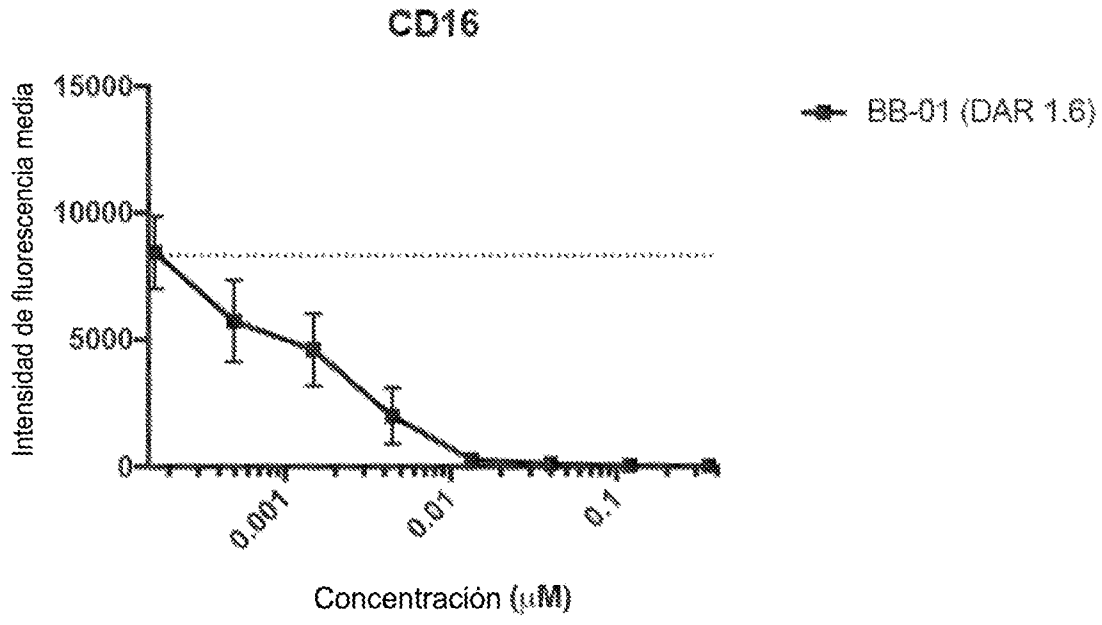


Fig. 85F

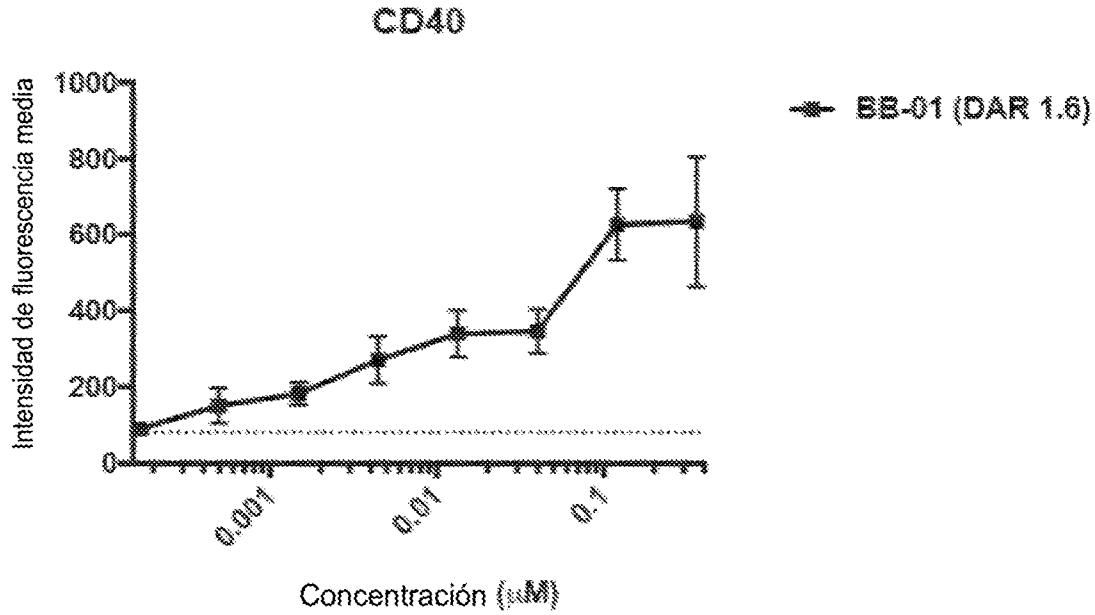


Fig. 85G

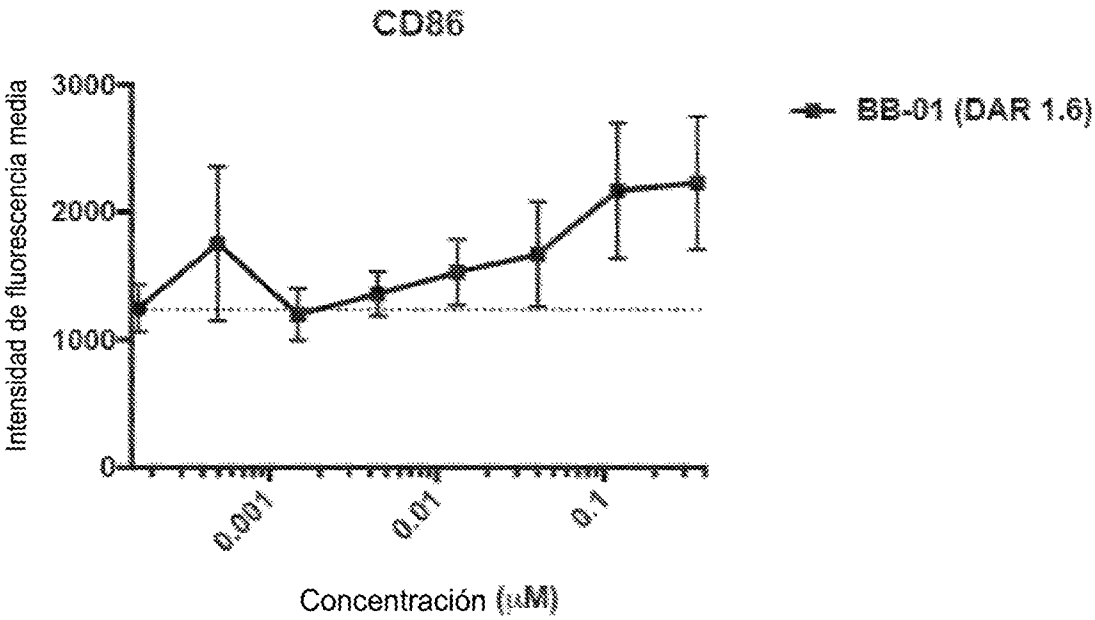


Fig. 85H

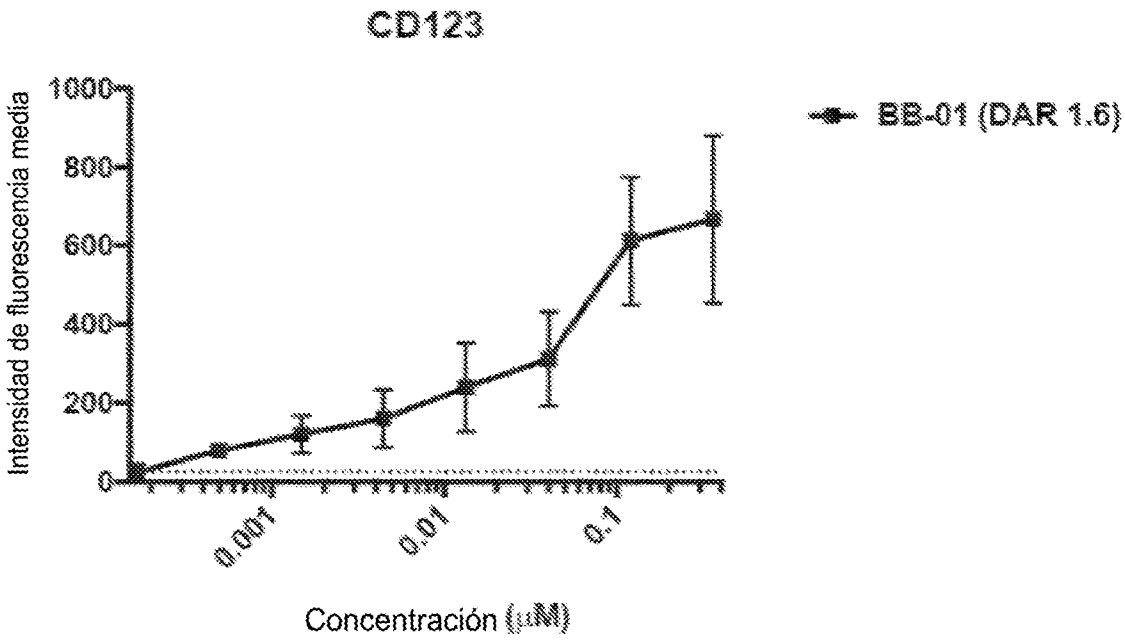


Fig. 85I

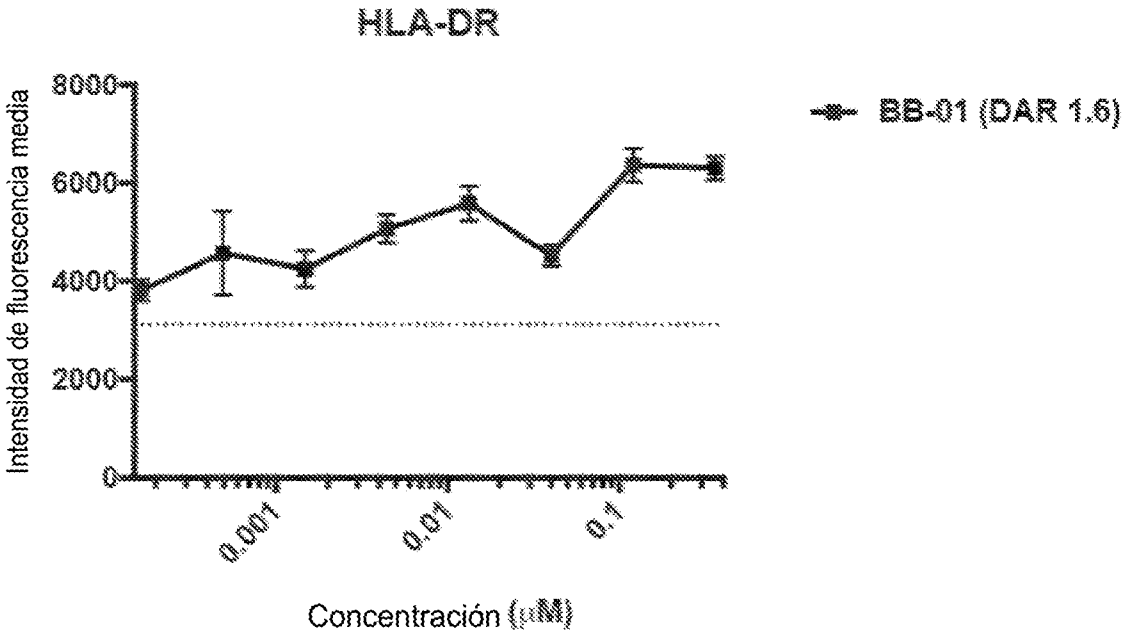


Fig. 85J

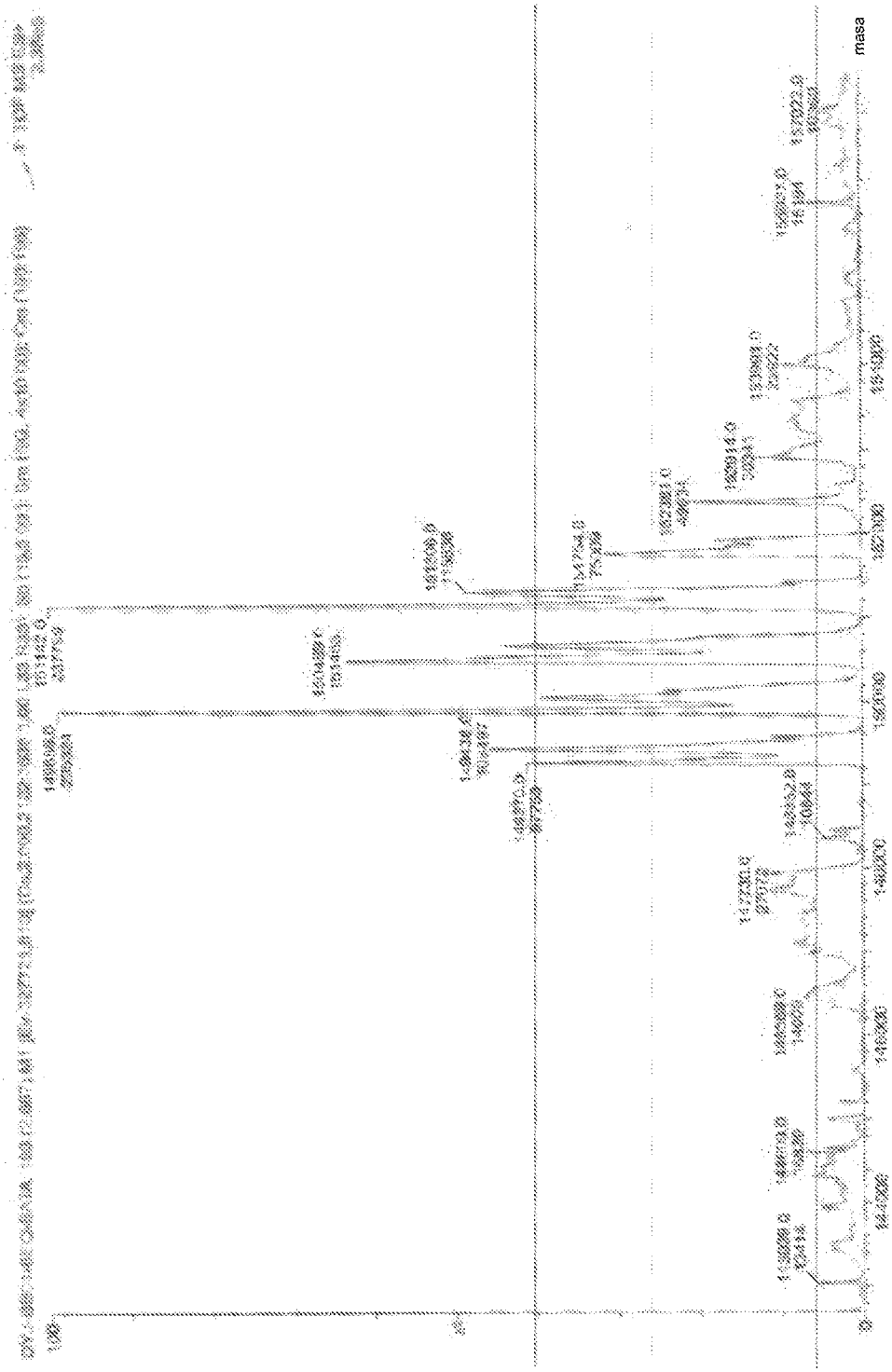


Fig. 86A

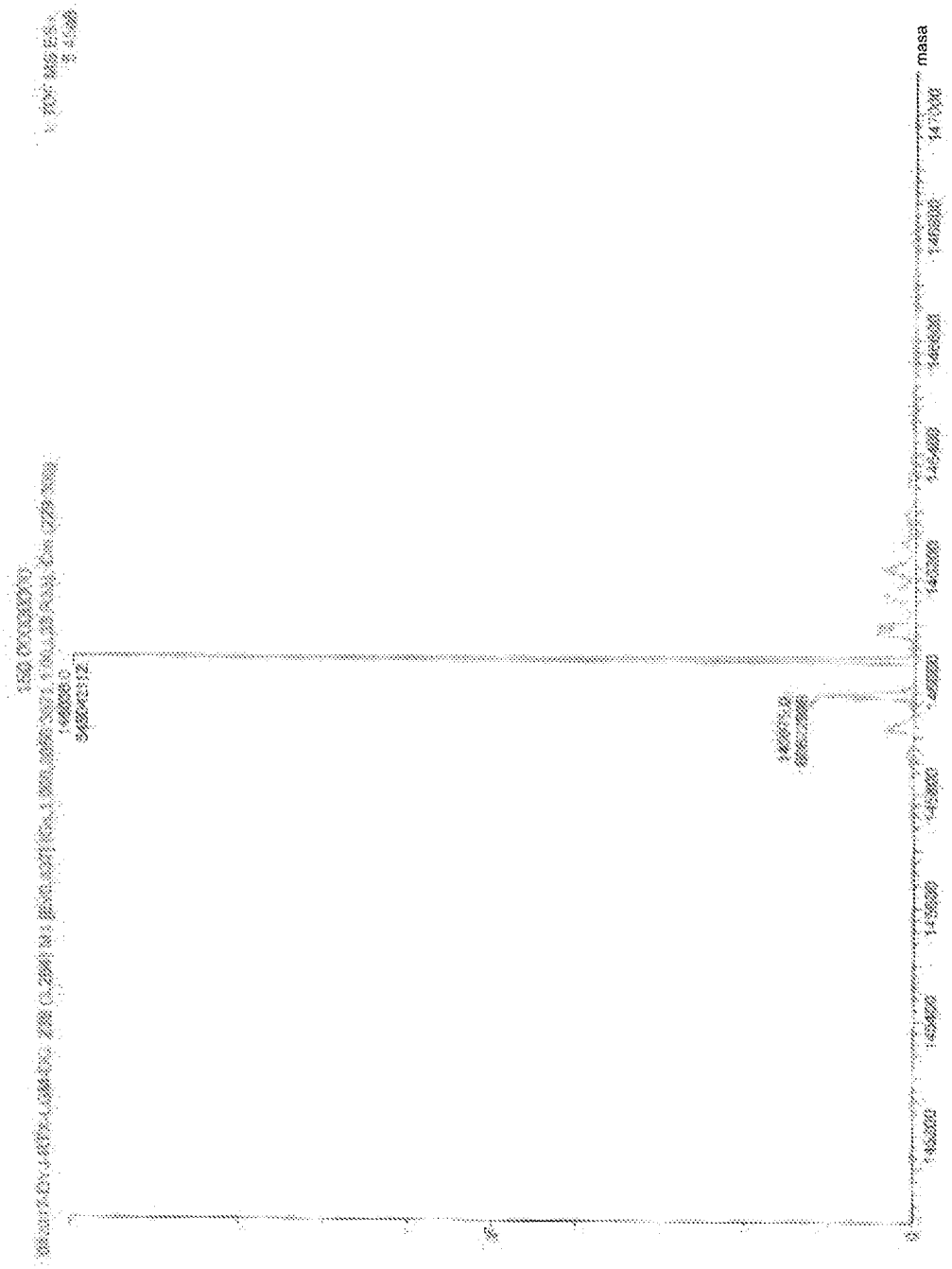


Fig. 86B

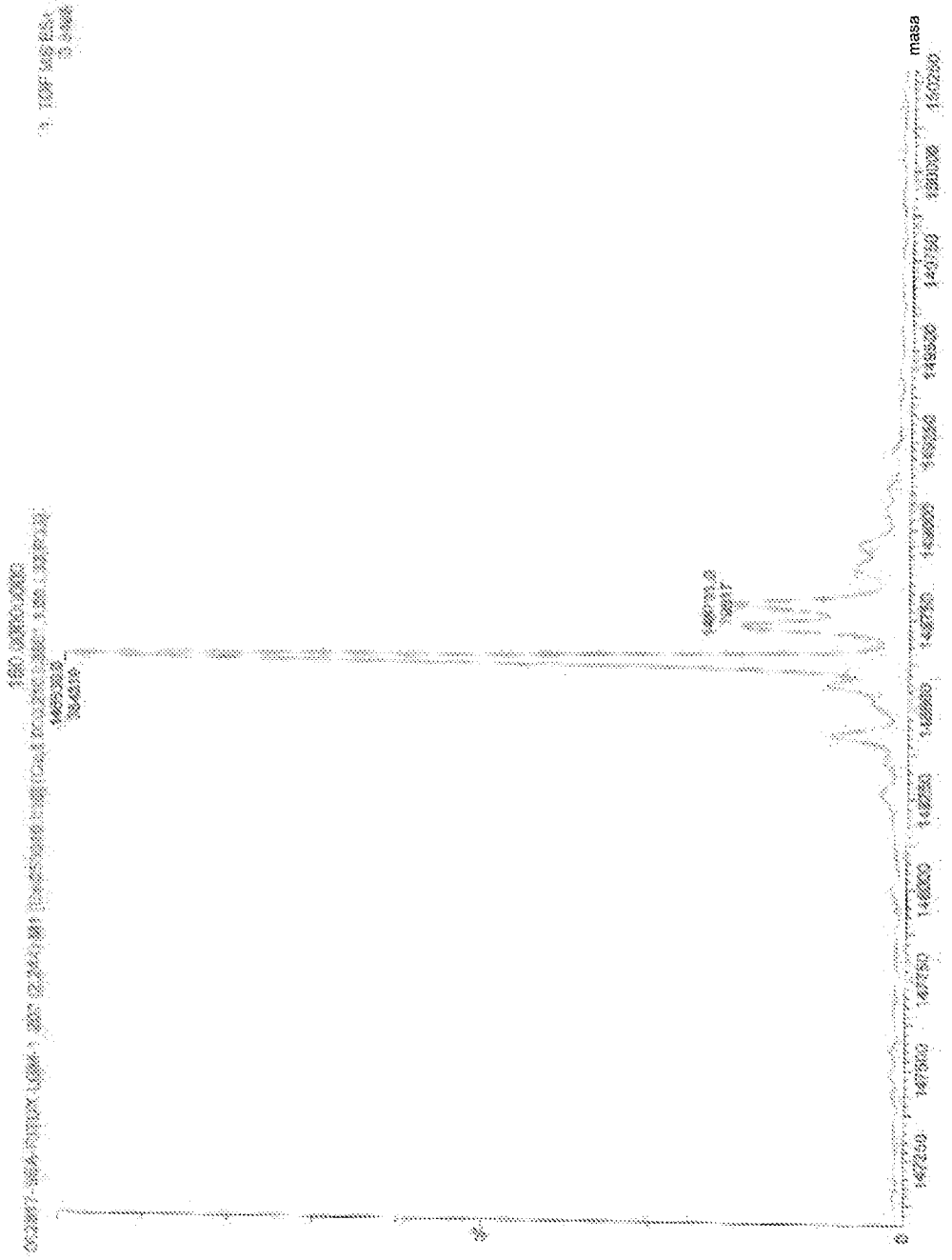


Fig. 86C

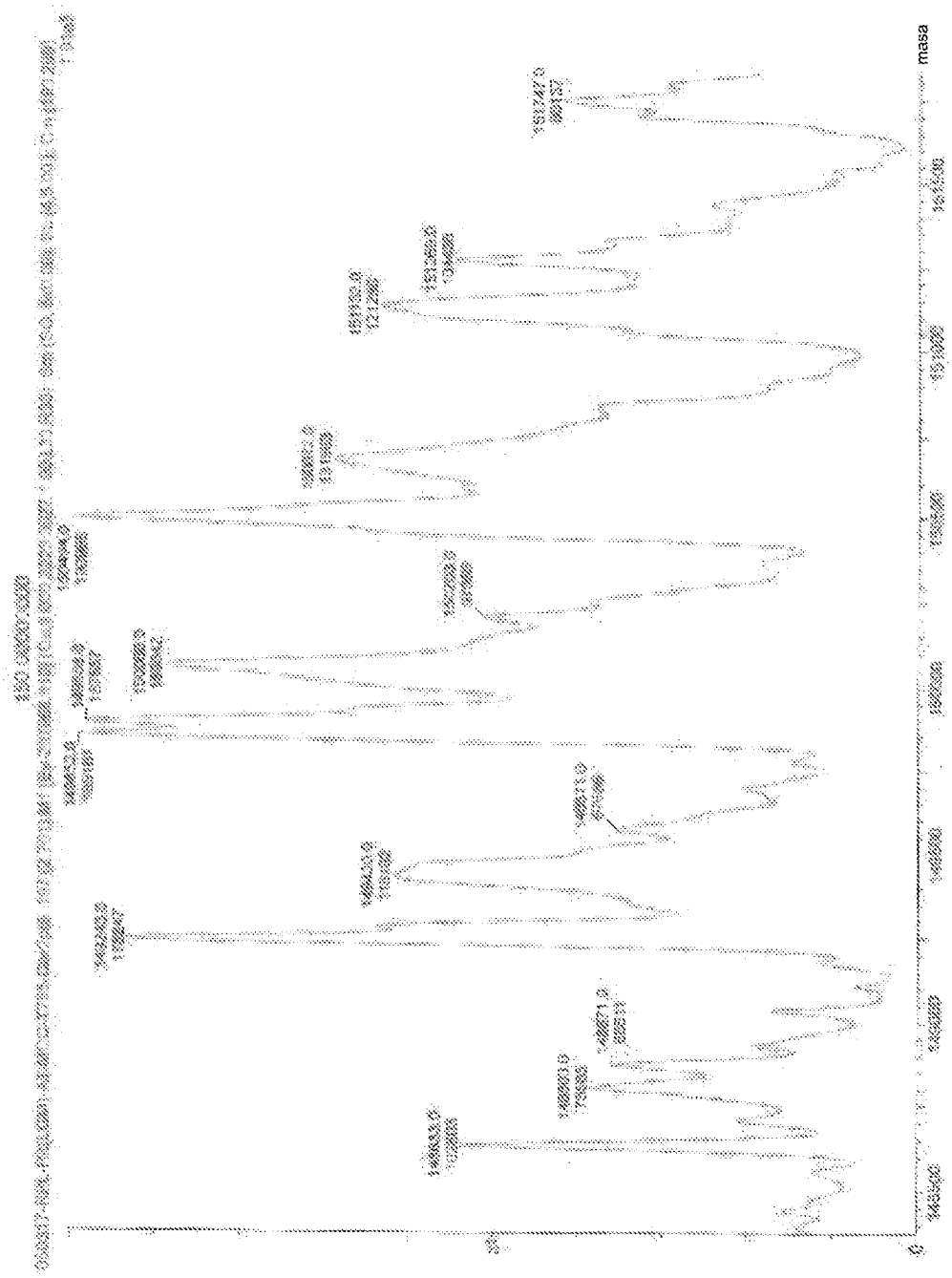


Fig. 86D

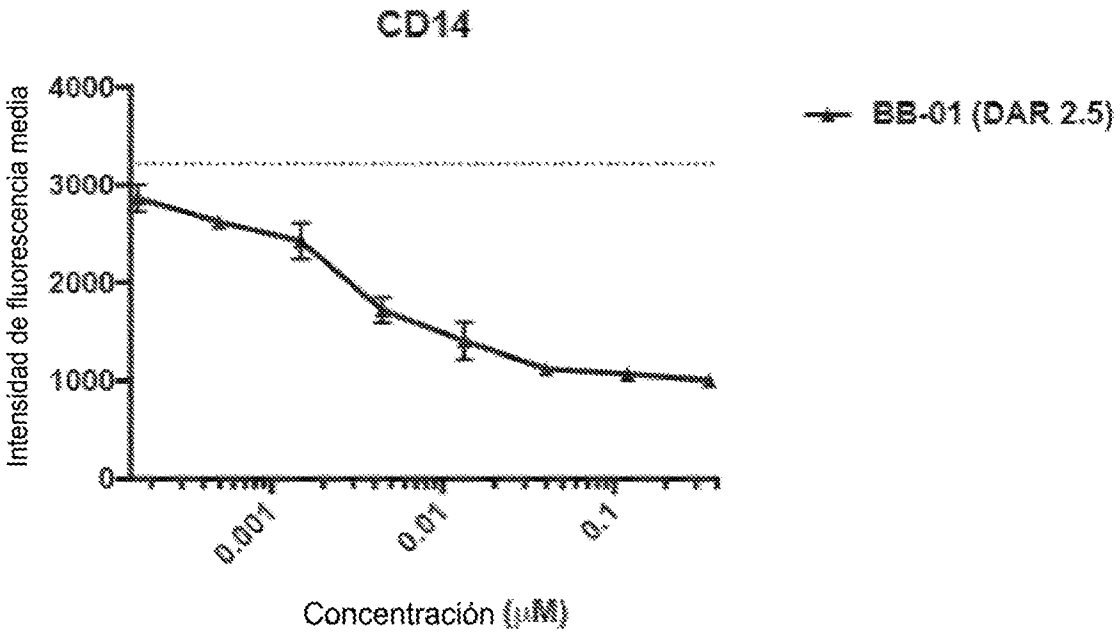


Fig. 86E

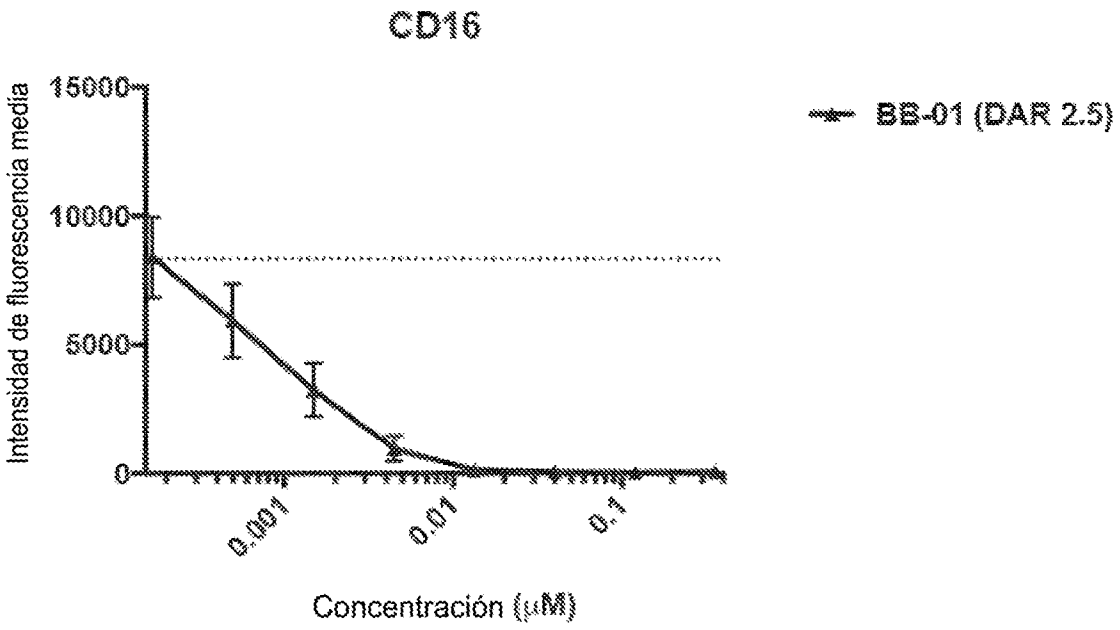


Fig. 86F

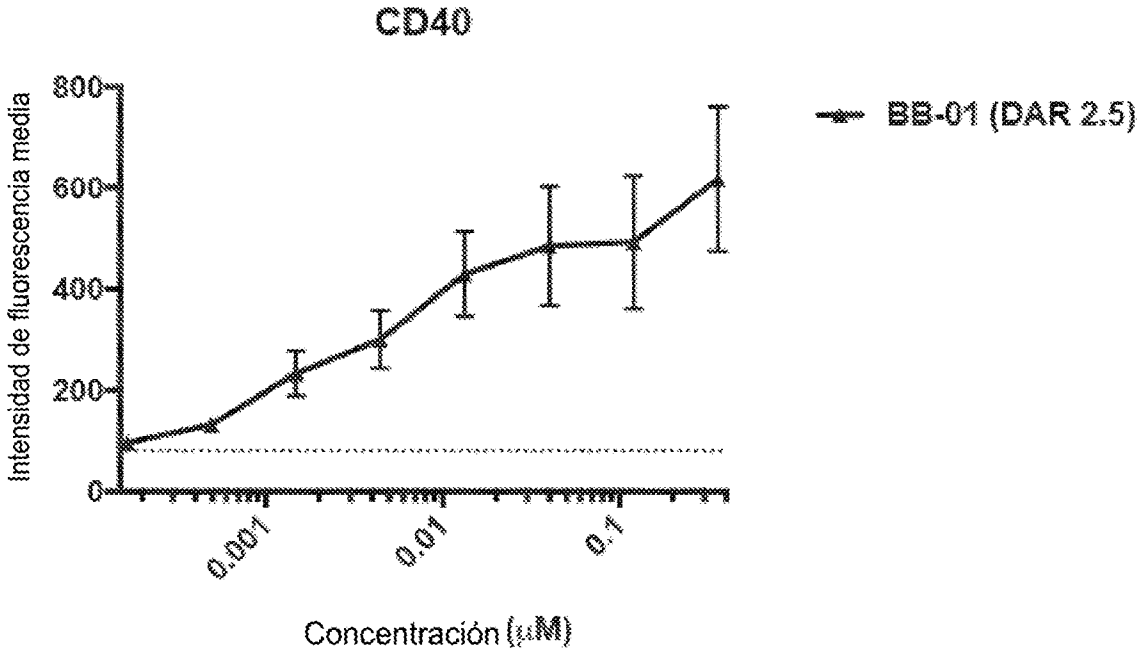


Fig. 86G

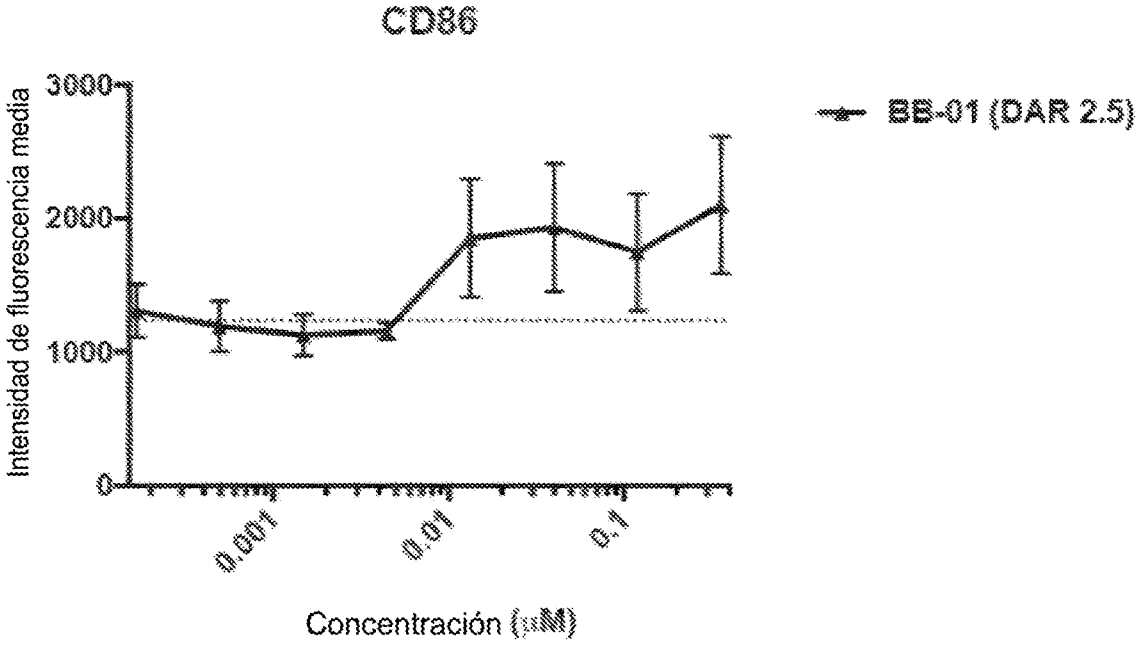


Fig. 86H

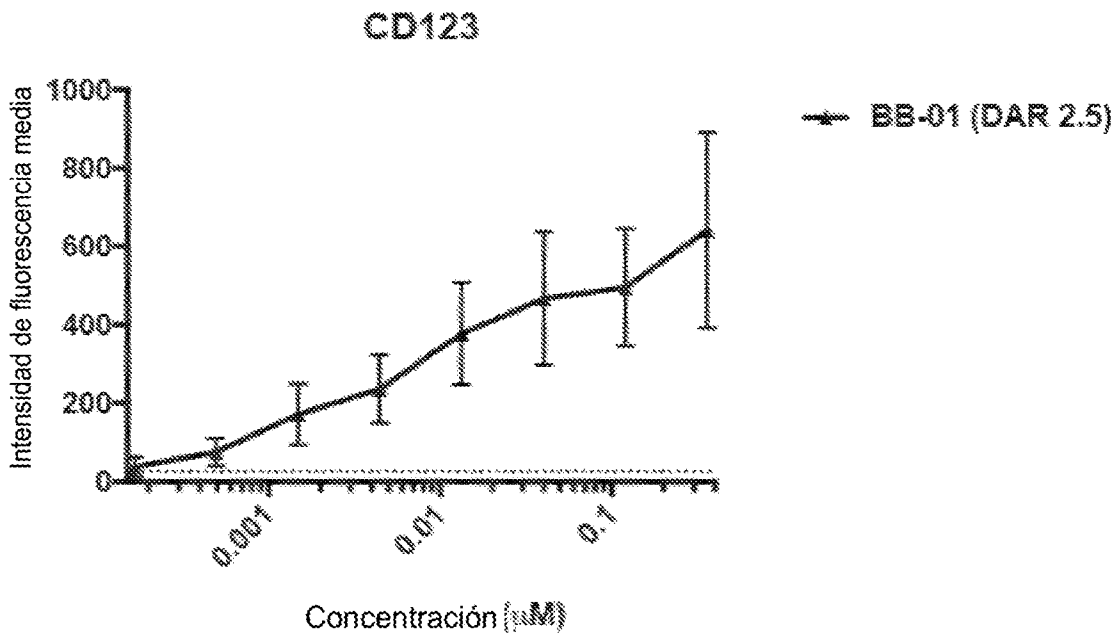


Fig. 86I

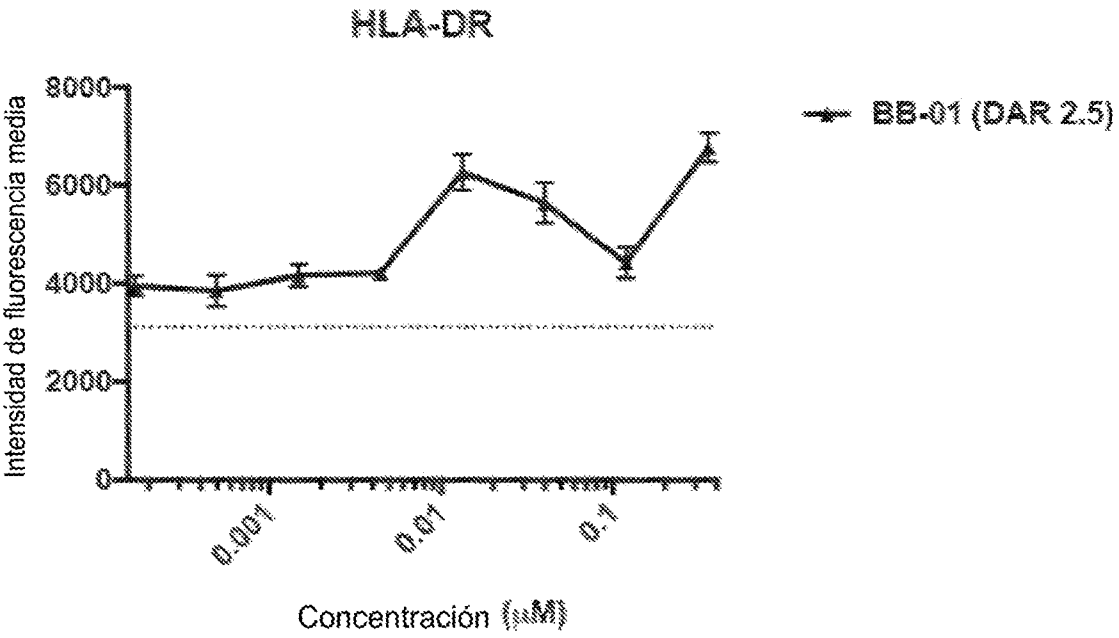


Fig. 86J

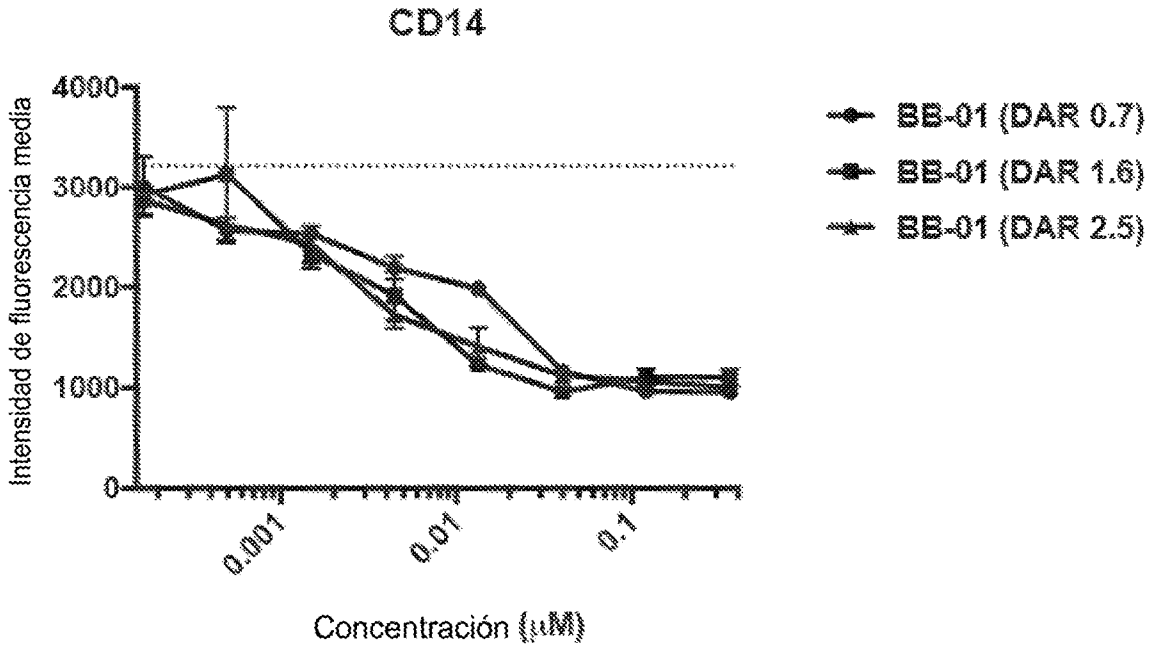


Fig. 87A

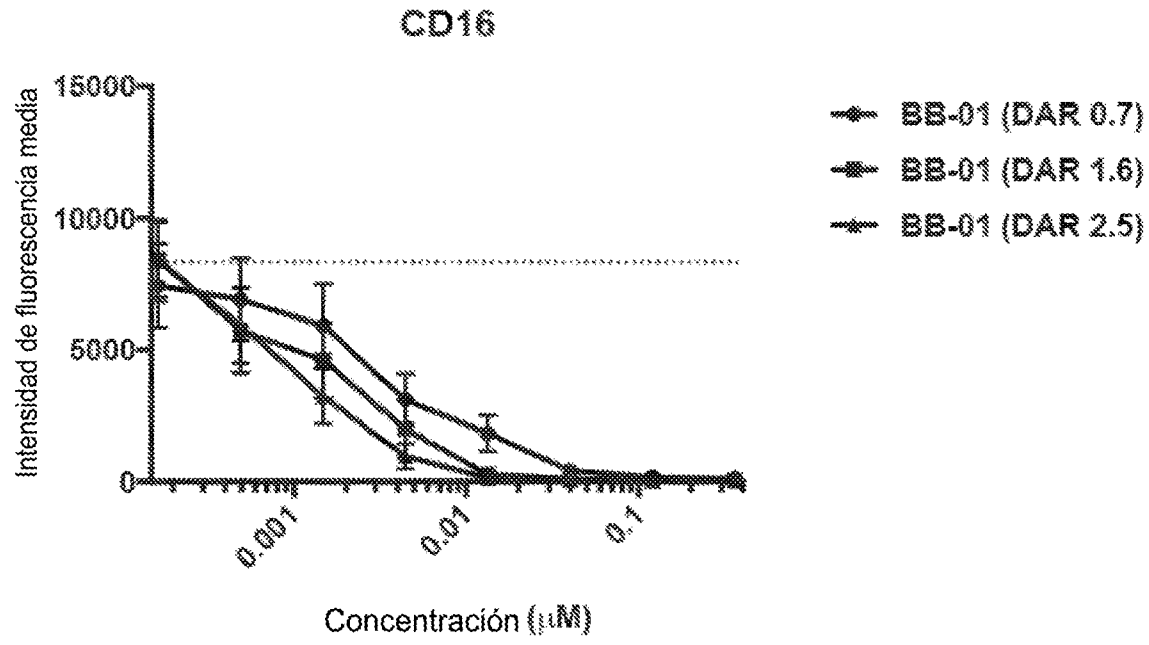


Fig. 87B

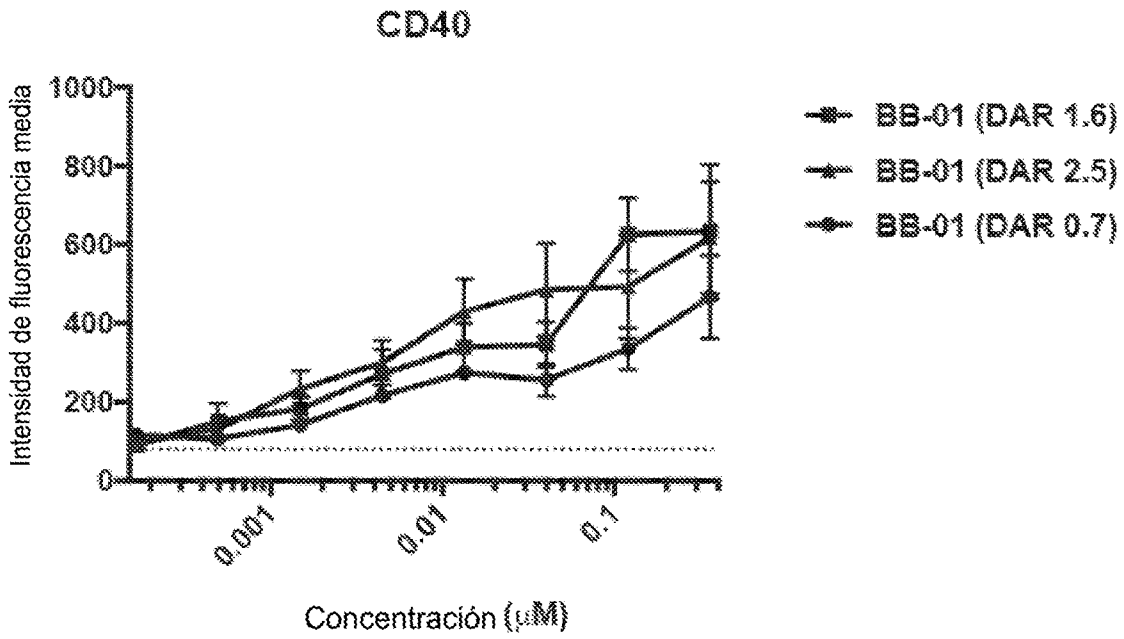


Fig. 87C

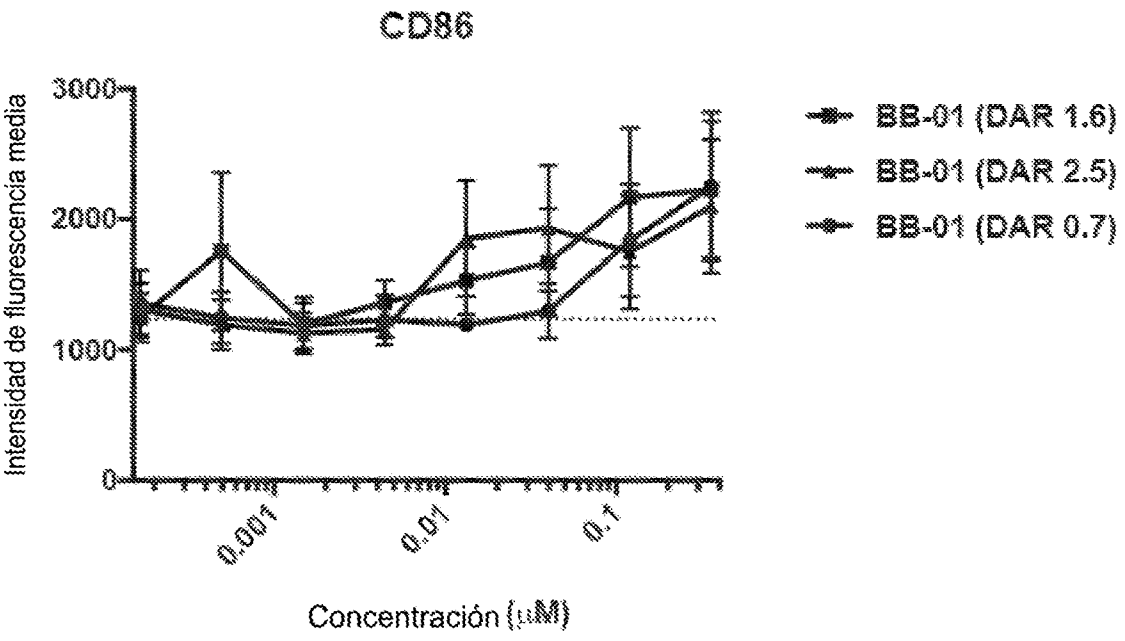


Fig. 87D

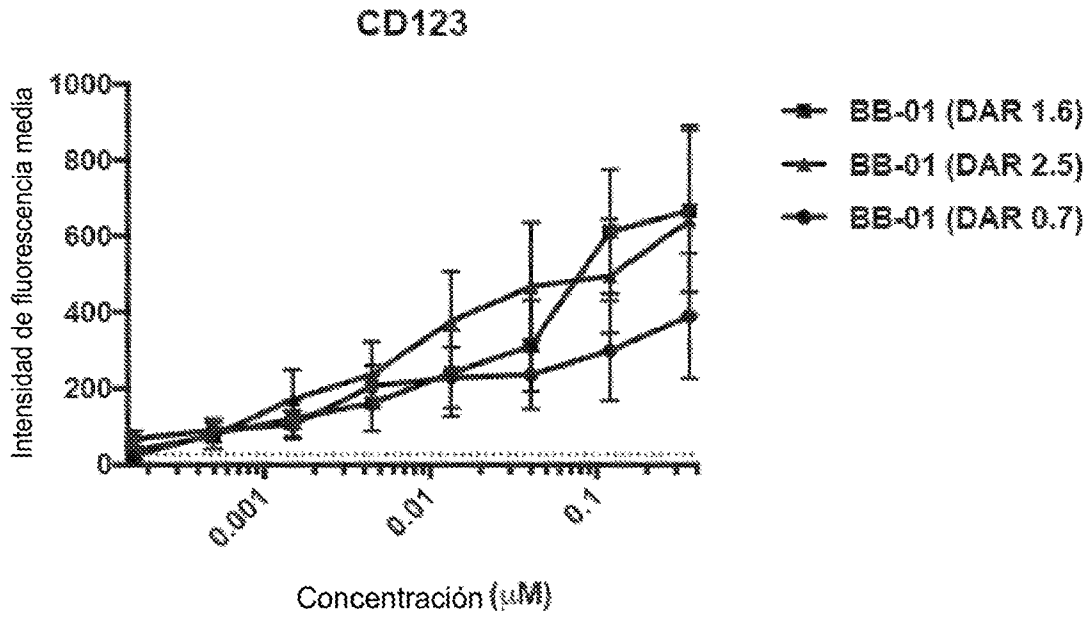


Fig. 87E

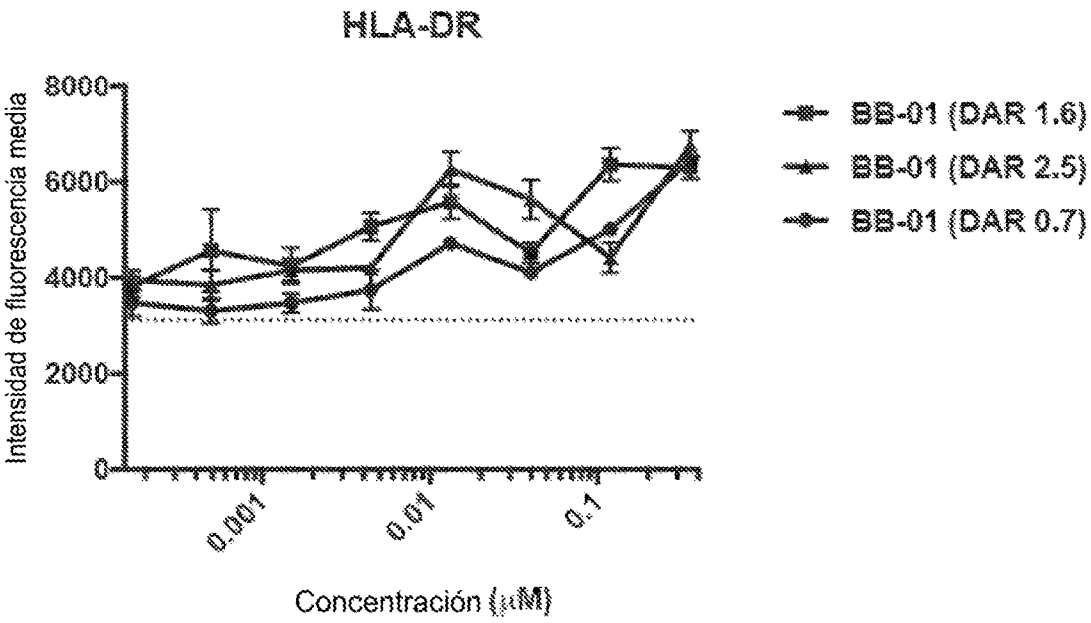


Fig. 87F

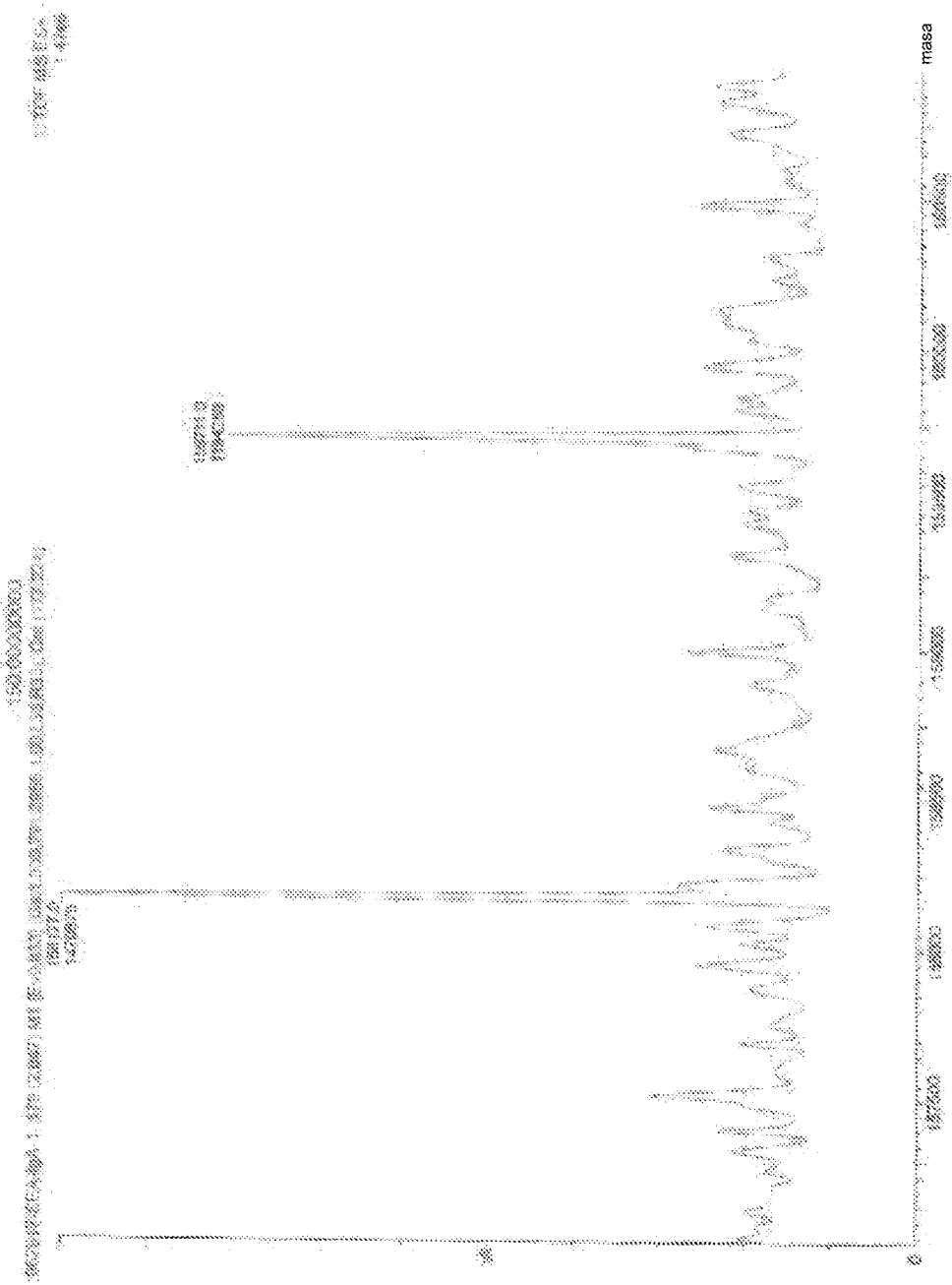


Fig. 88A

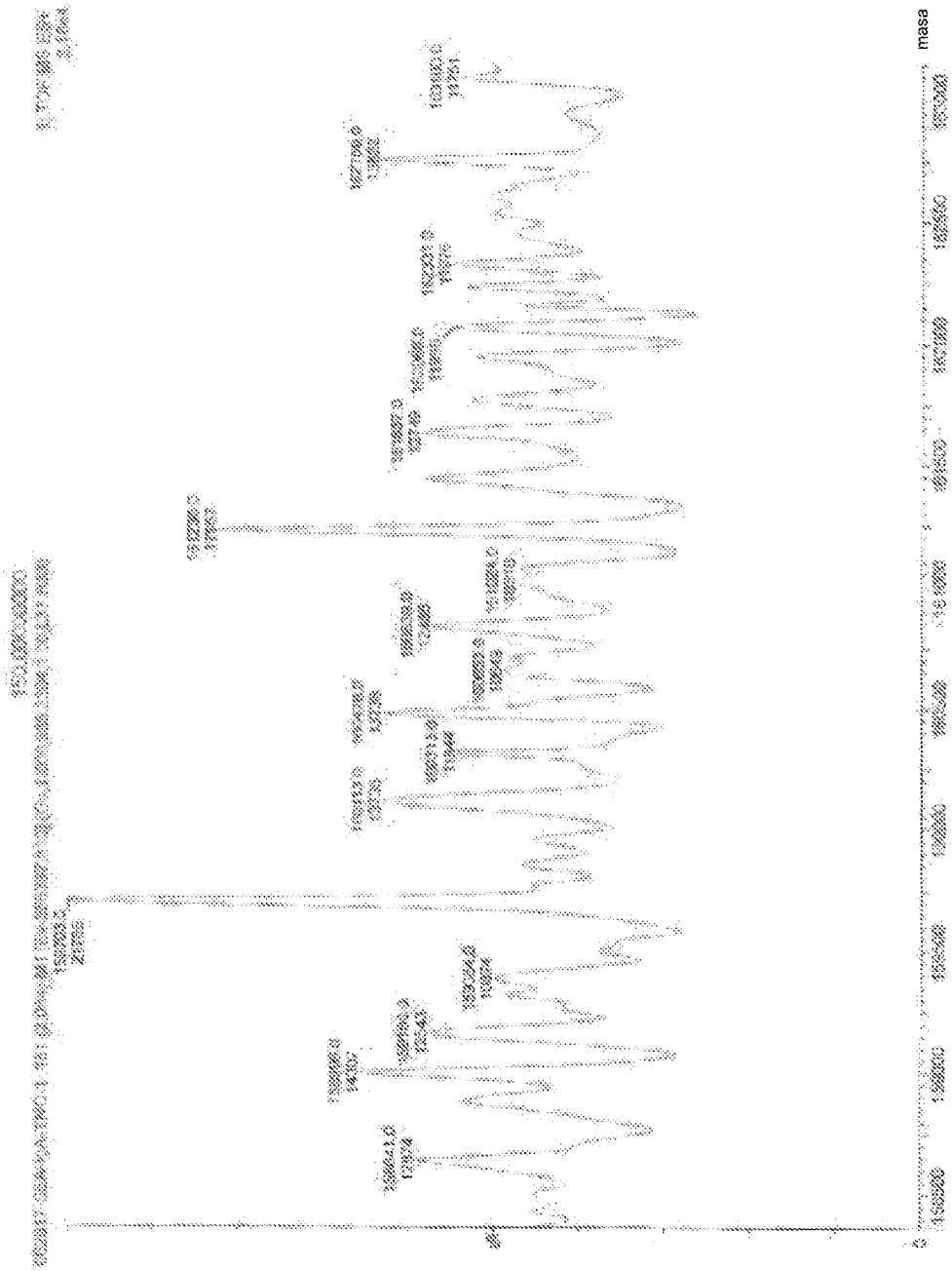


Fig. 88B

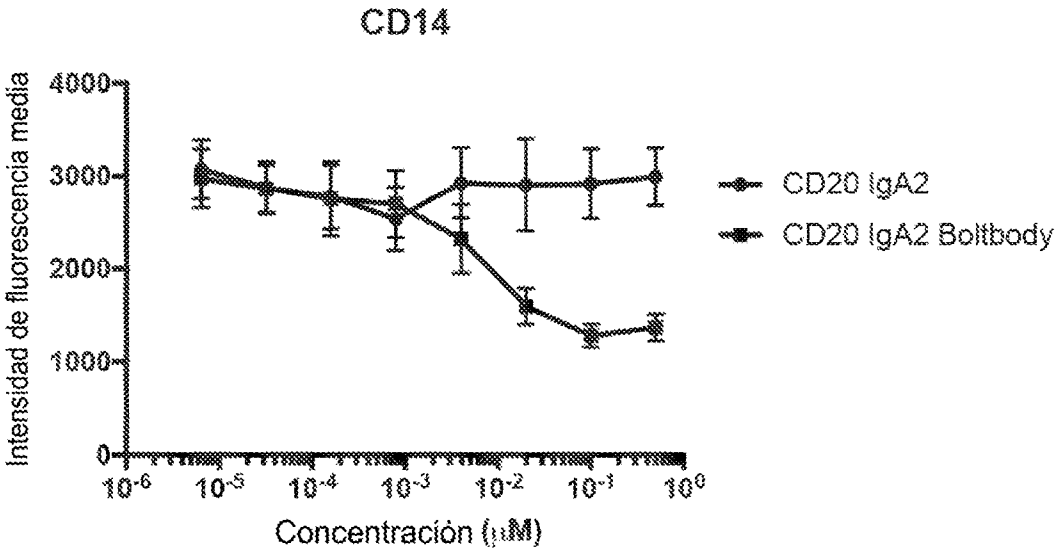


Fig. 88C

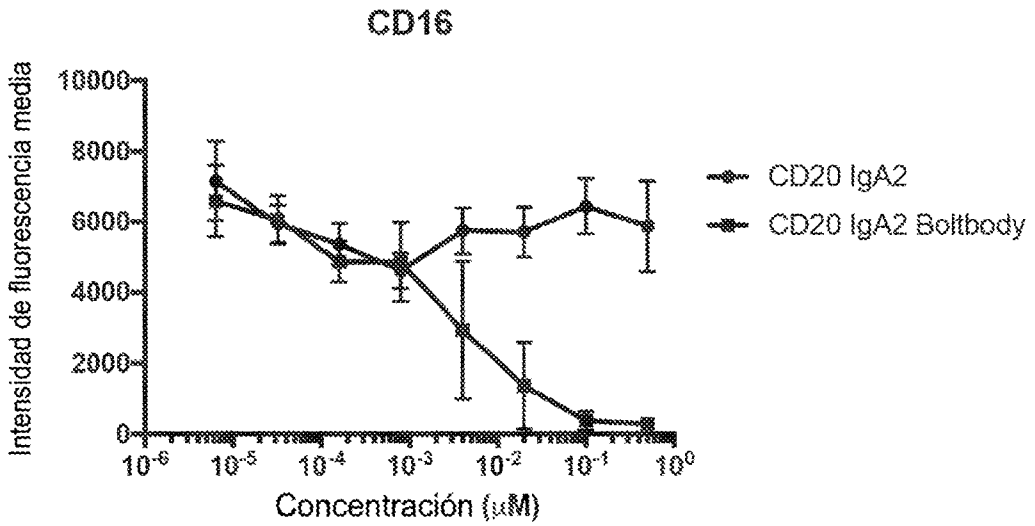


Fig. 88D

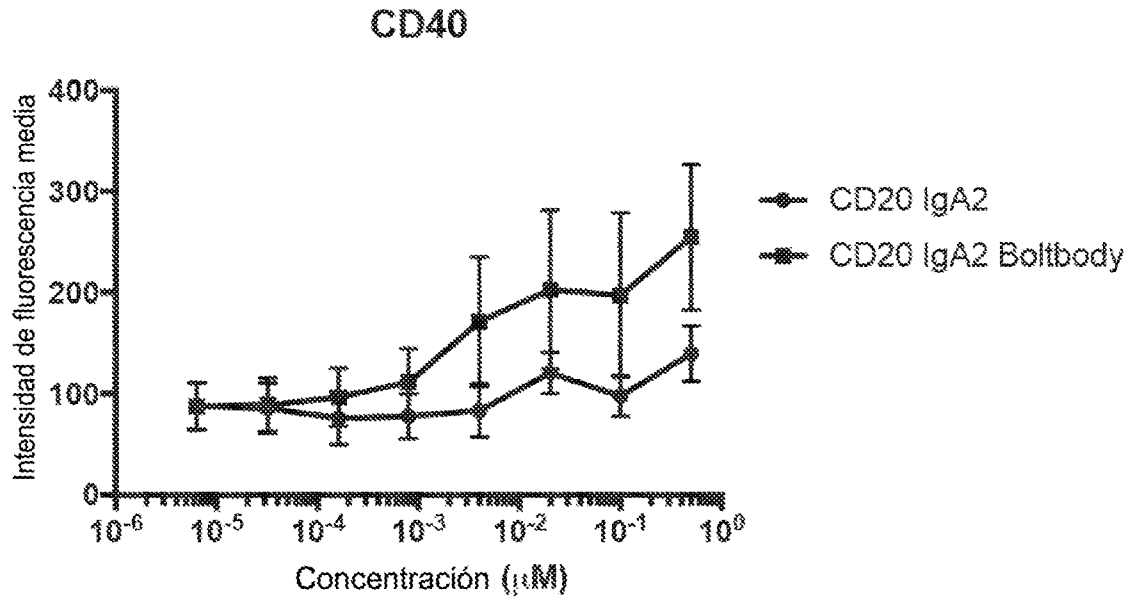


Fig. 88E

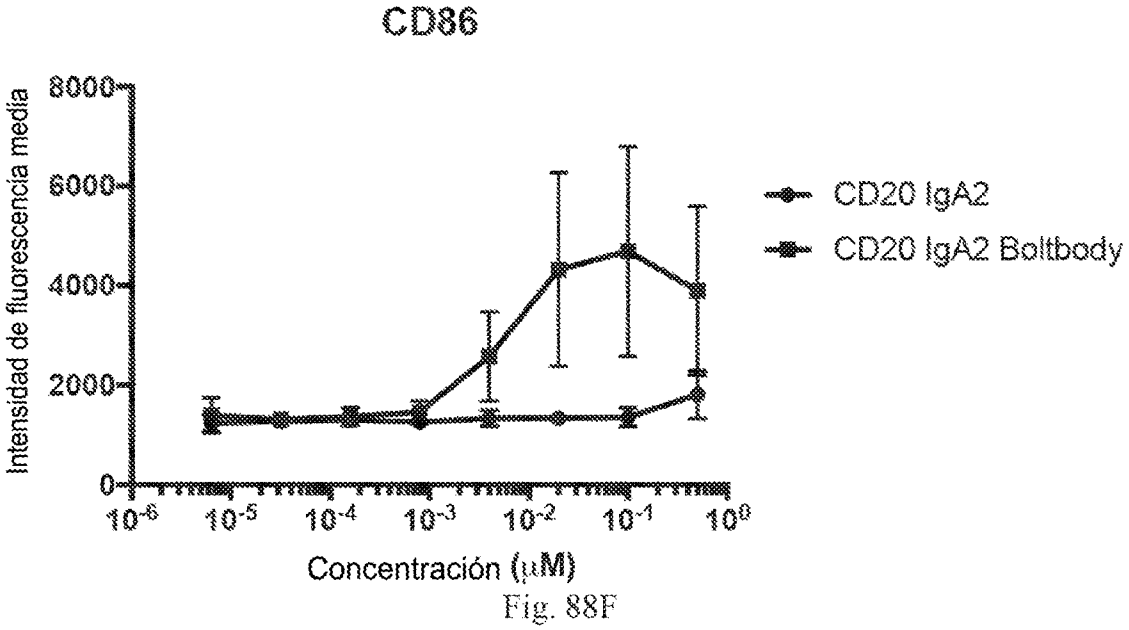


Fig. 88F

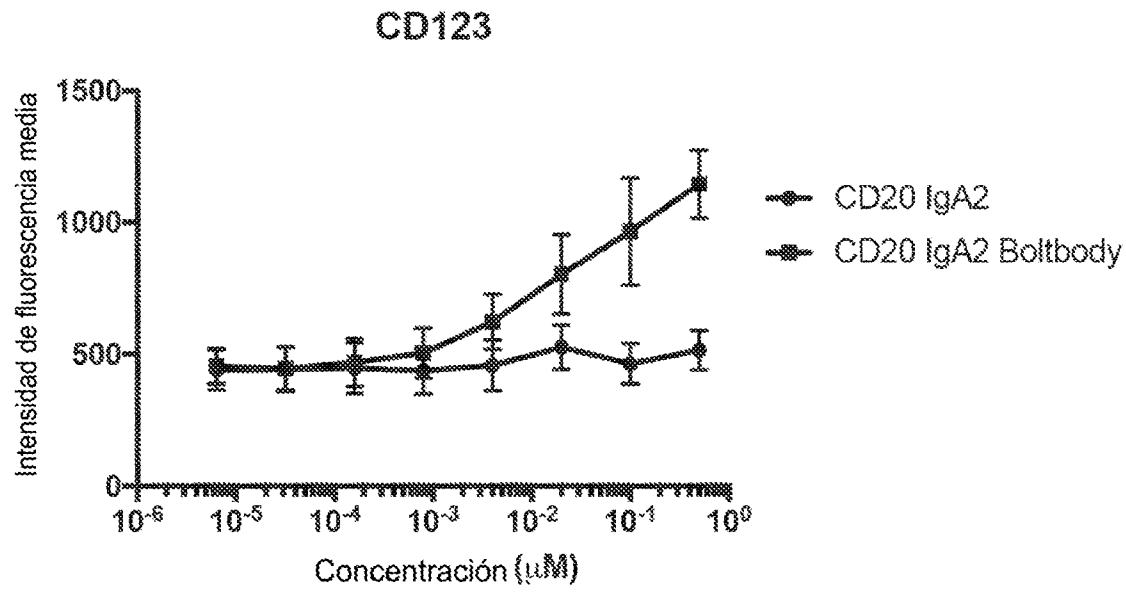


Fig. 88G

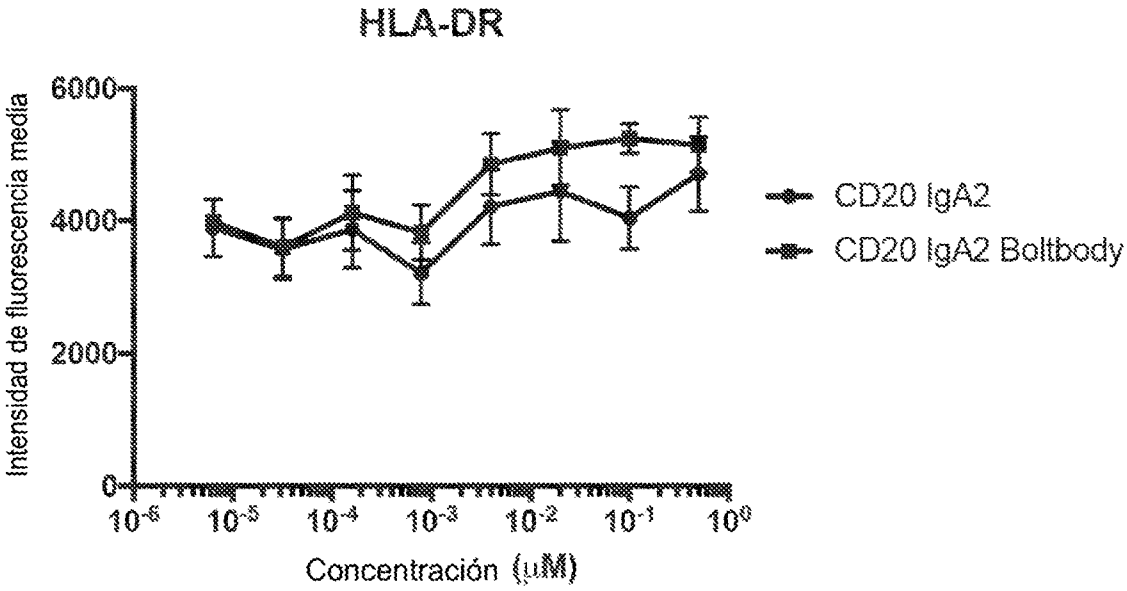


Fig. 88H

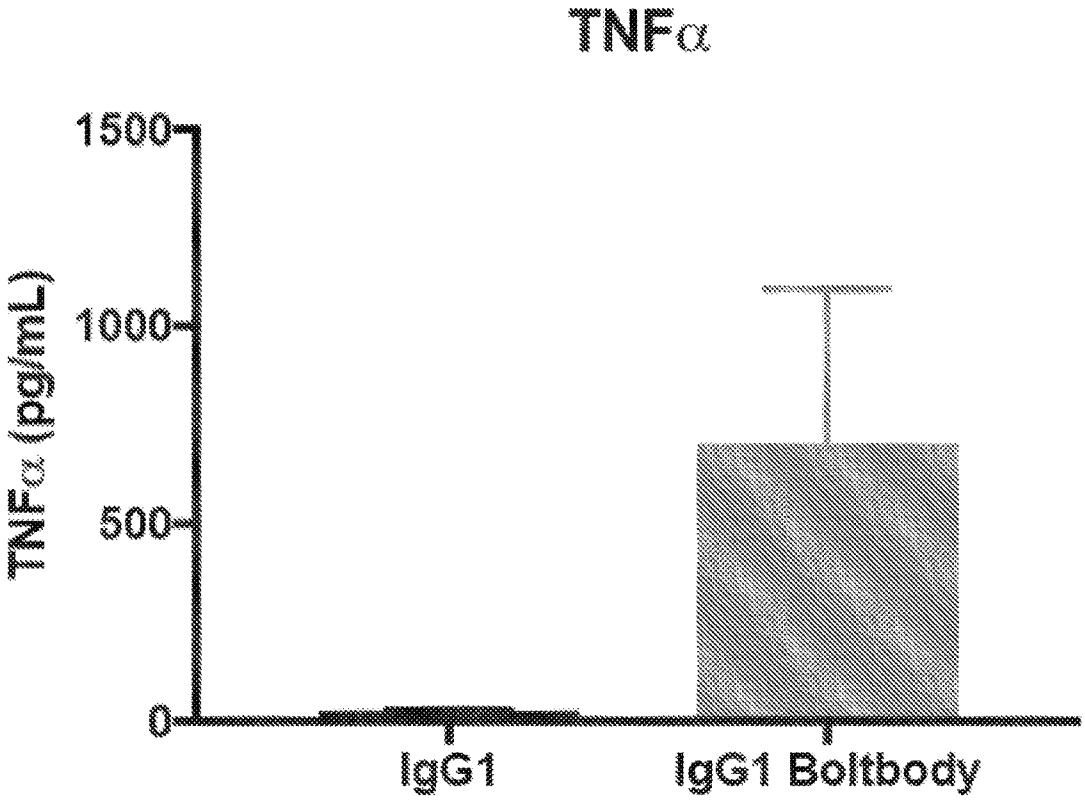


Fig. 89A

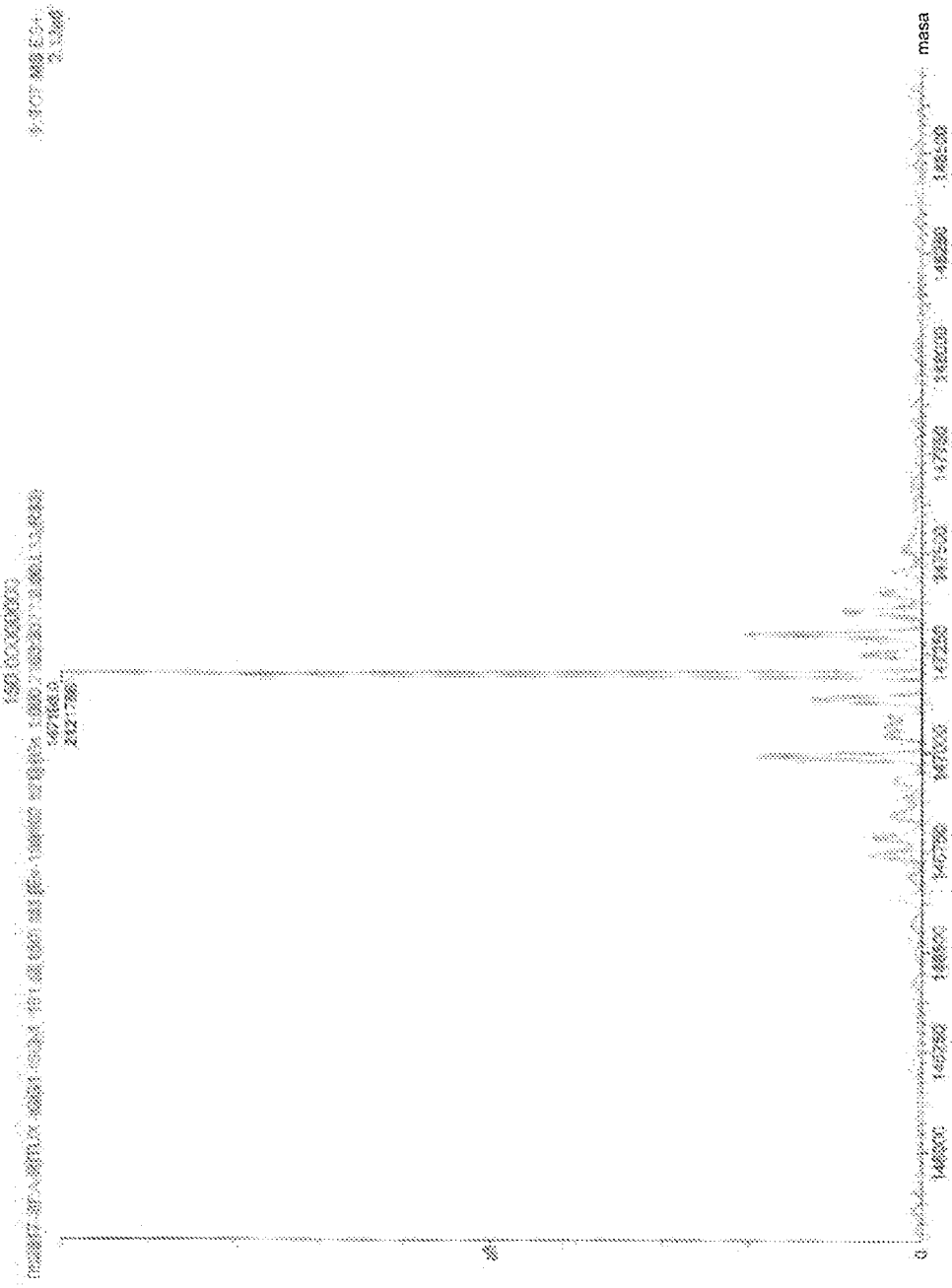


Fig. 89B

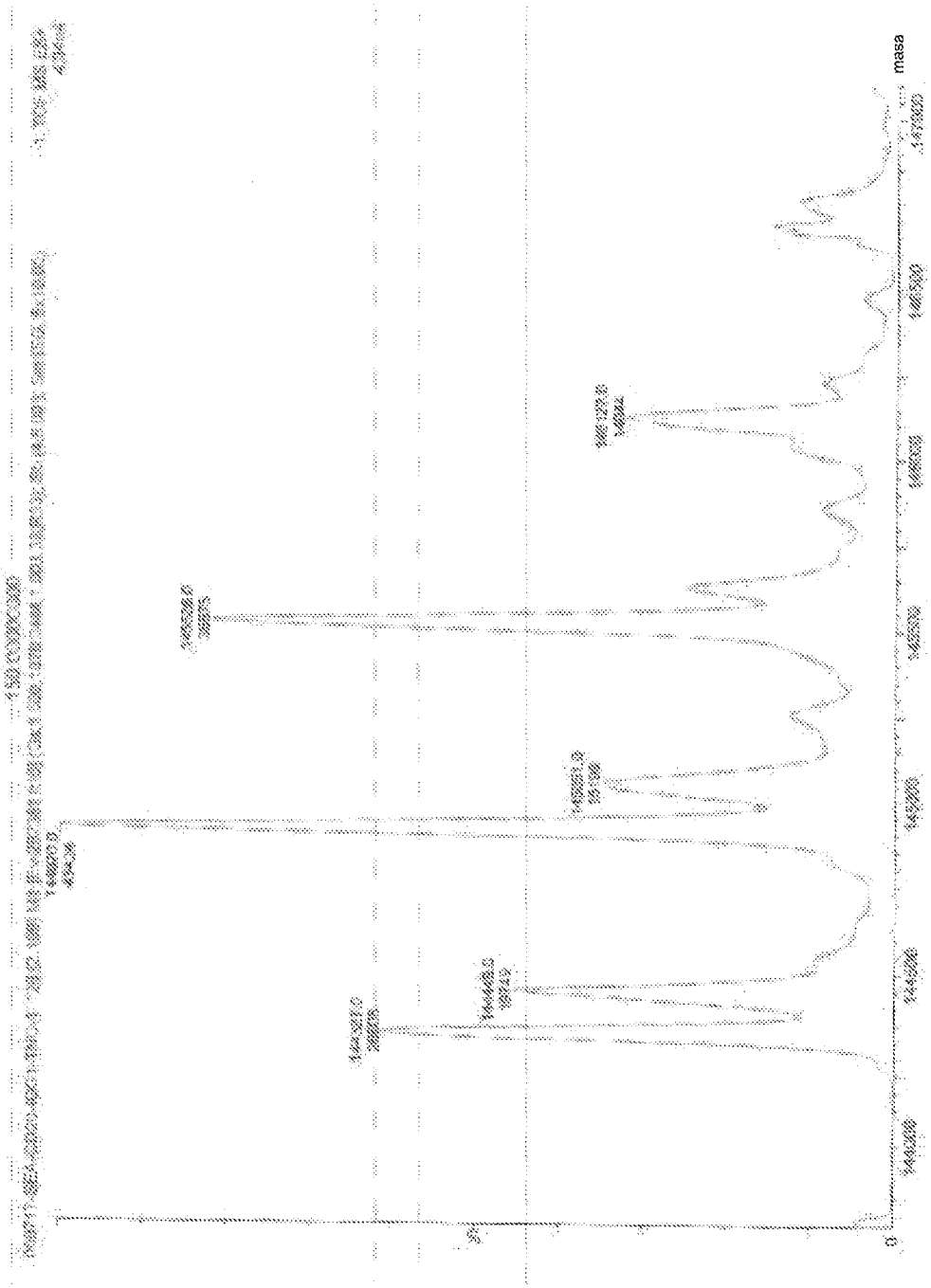


Fig. 89C

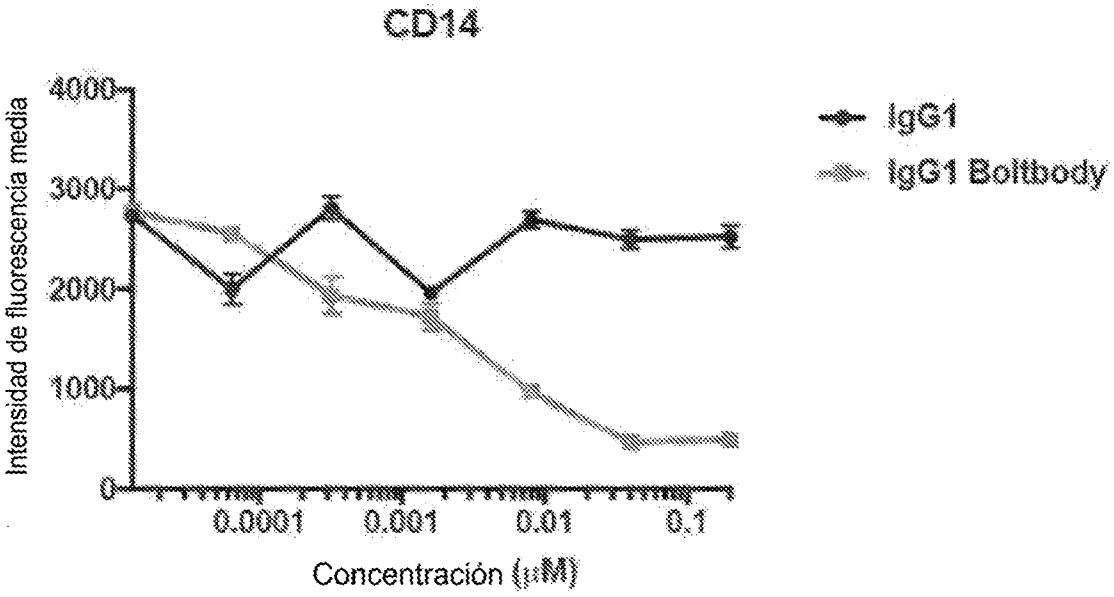


Fig. 89D

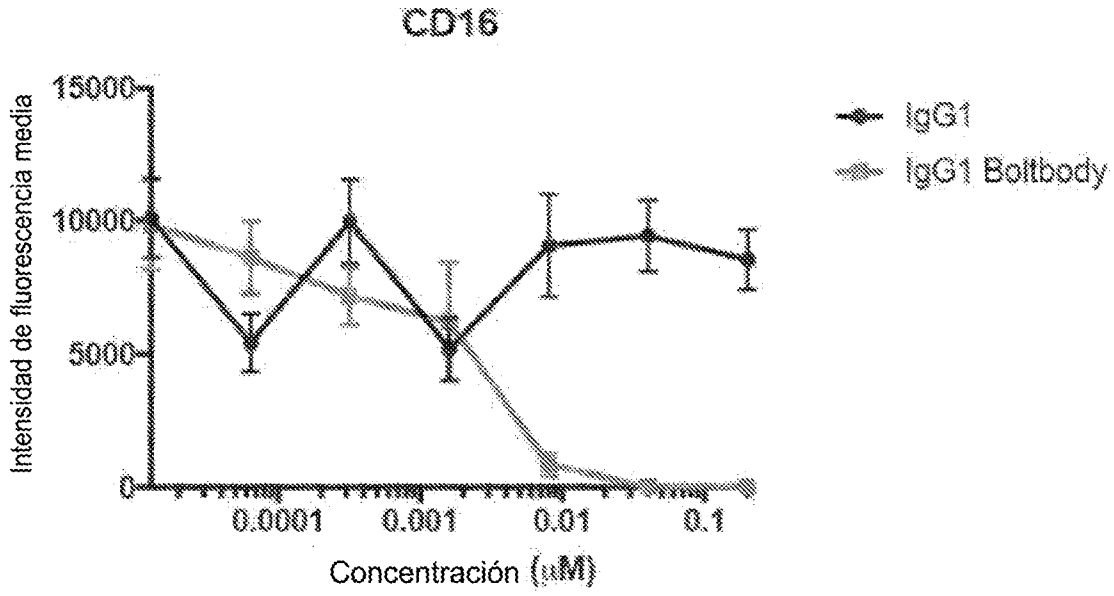


Fig. 89E

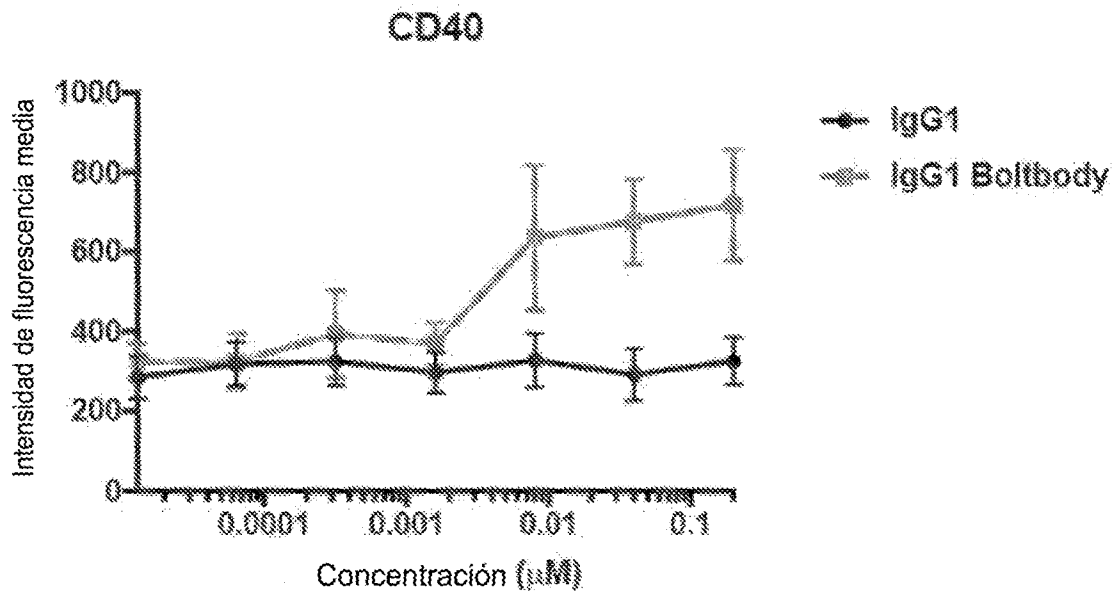


Fig. 89F

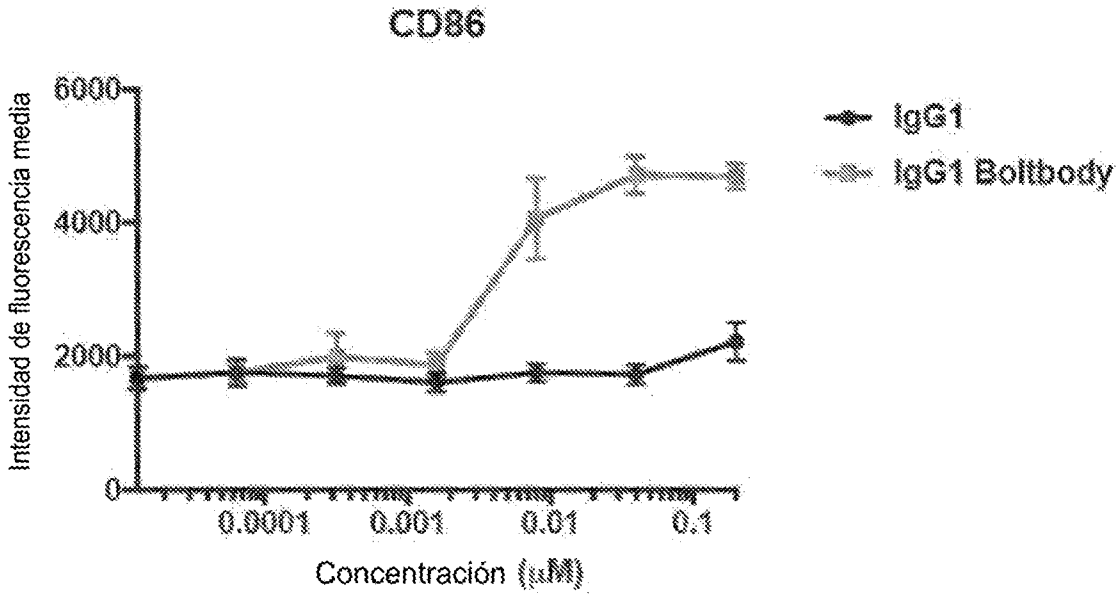


Fig. 89G

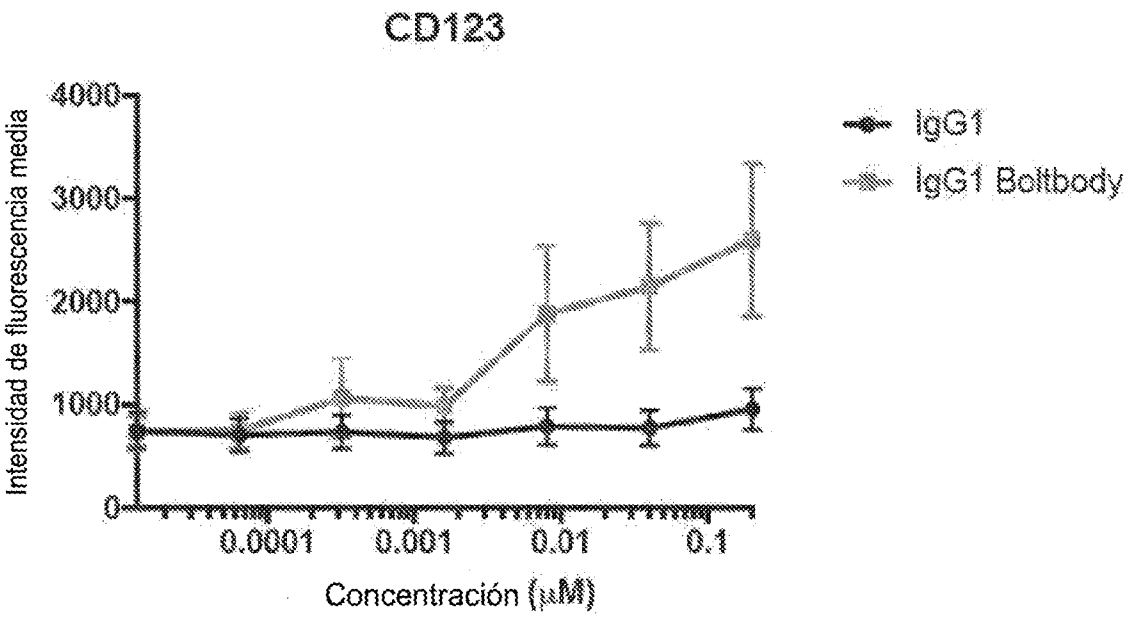


Fig. 89H

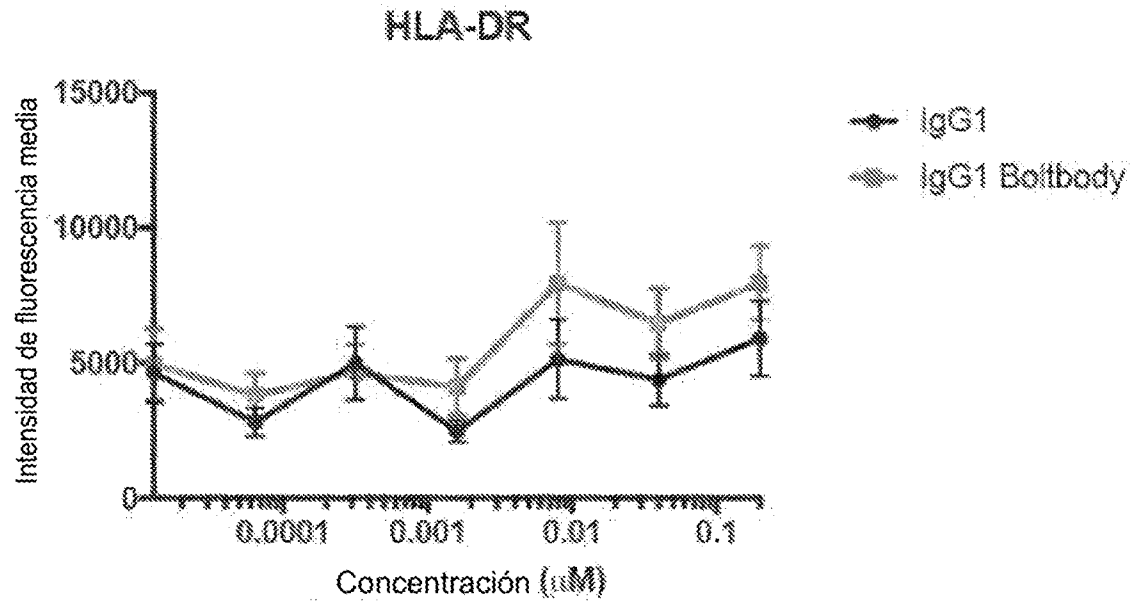


Fig. 89I

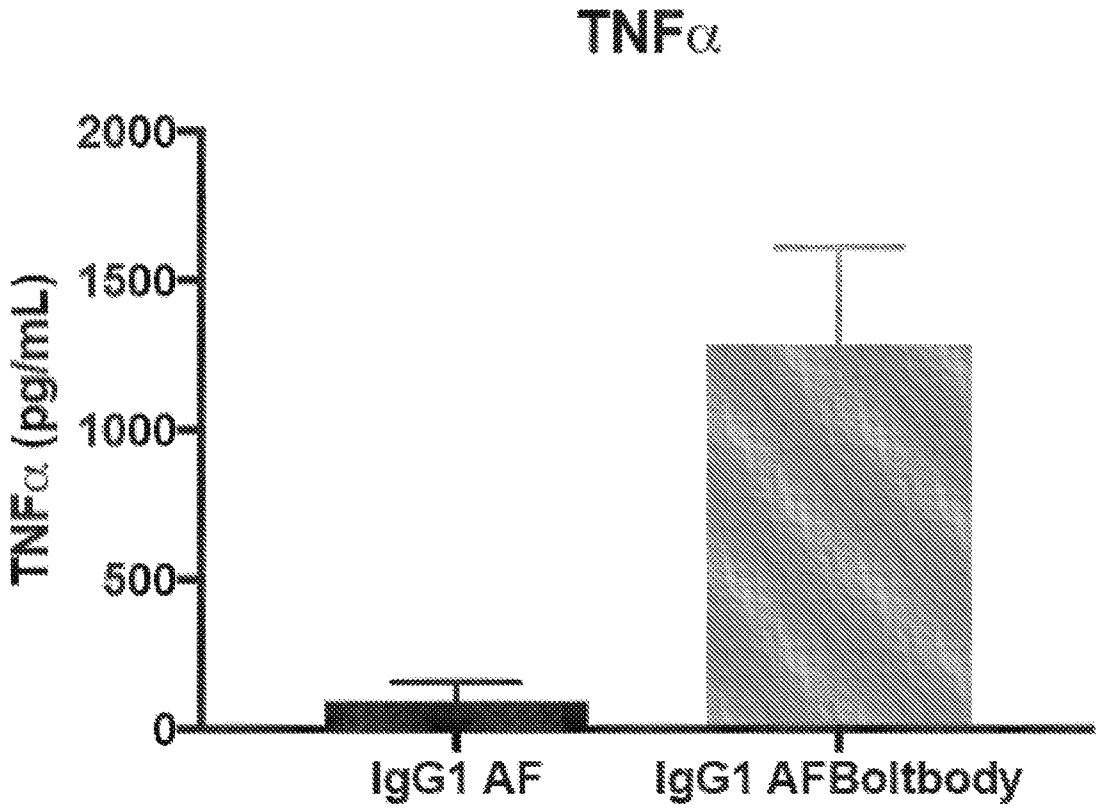


Fig. 90A

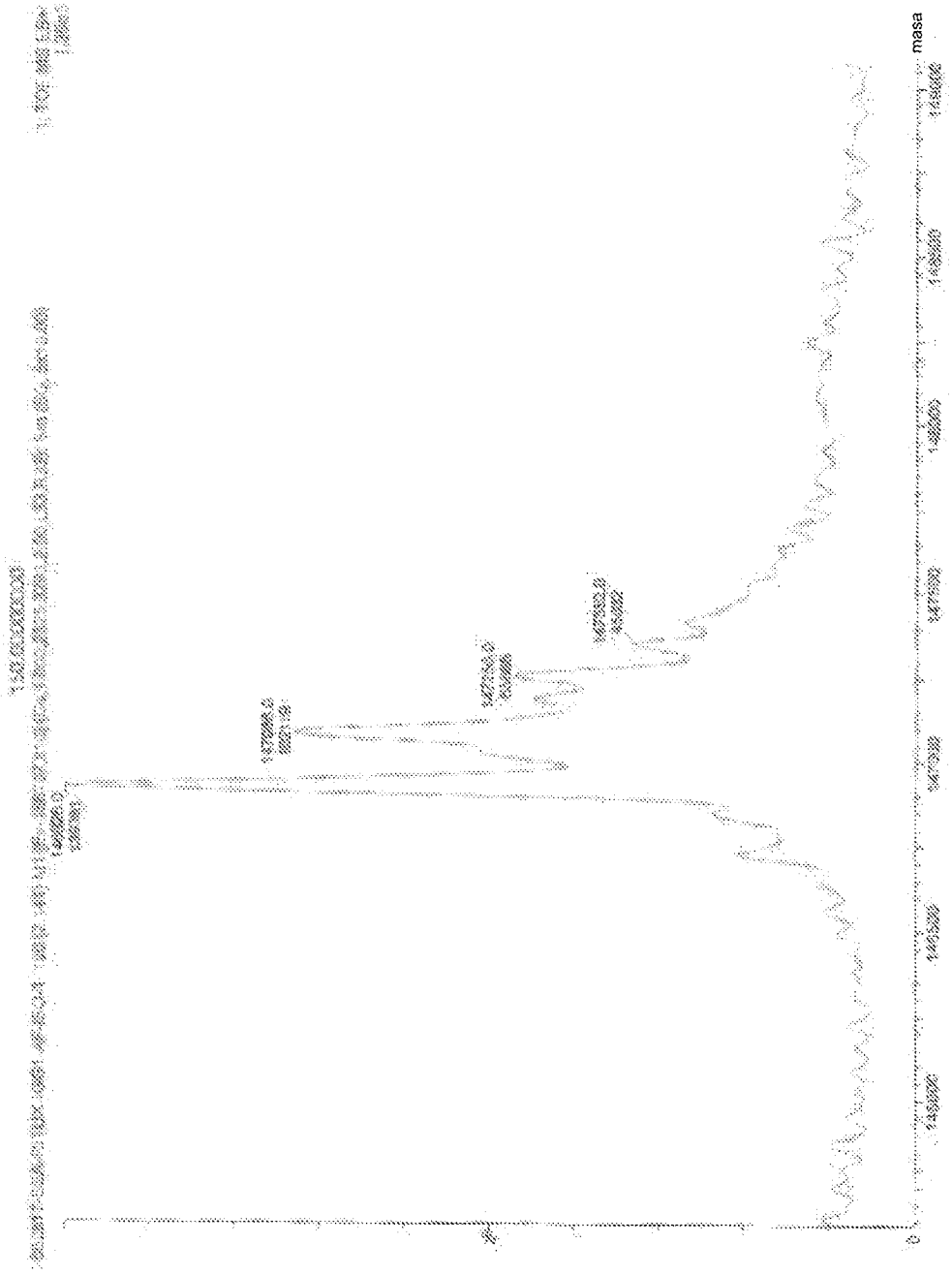


Fig. 90B

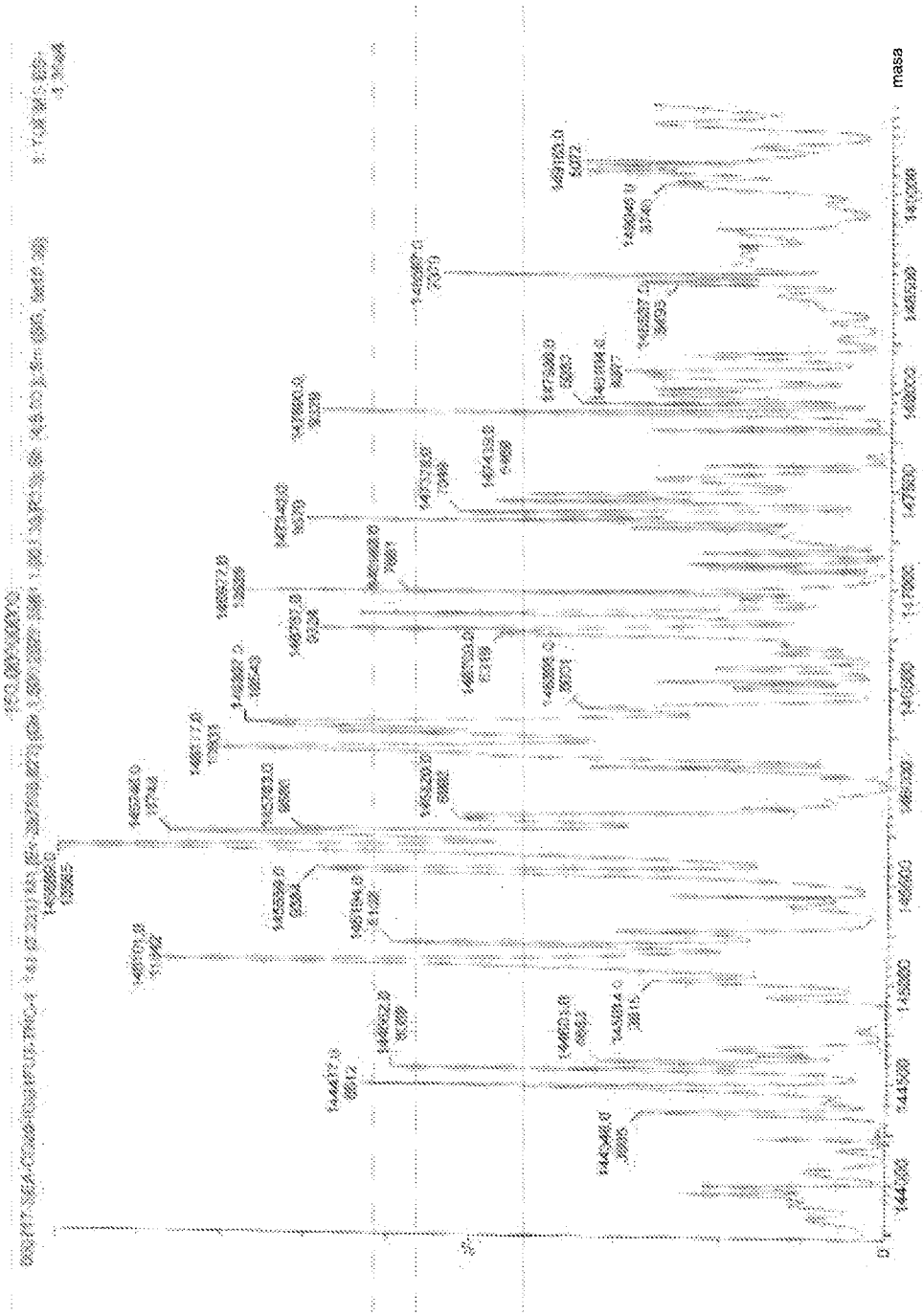


Fig. 90C

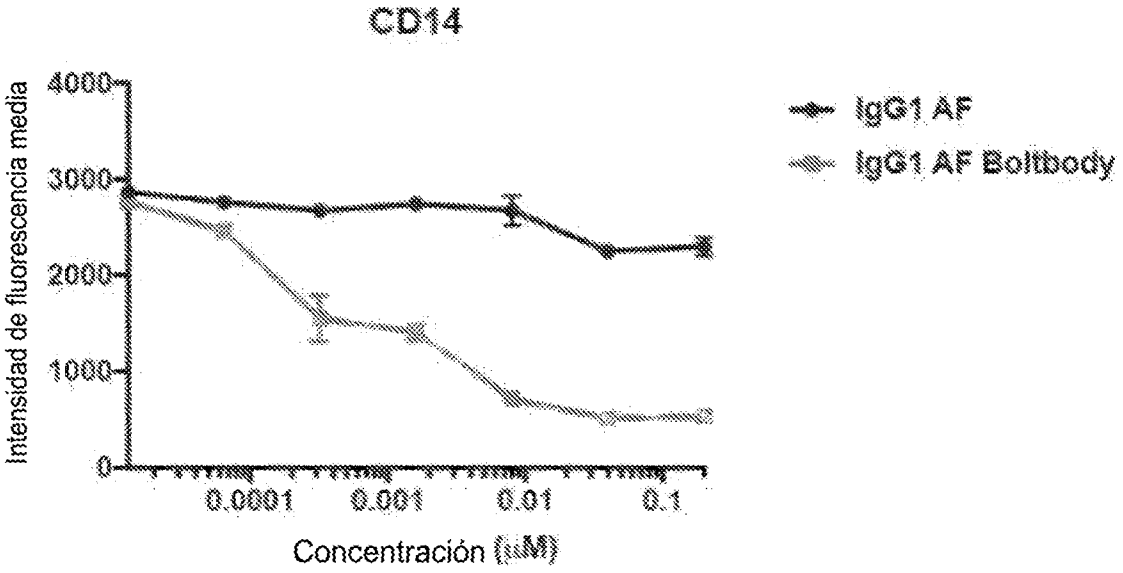


Fig. 90D

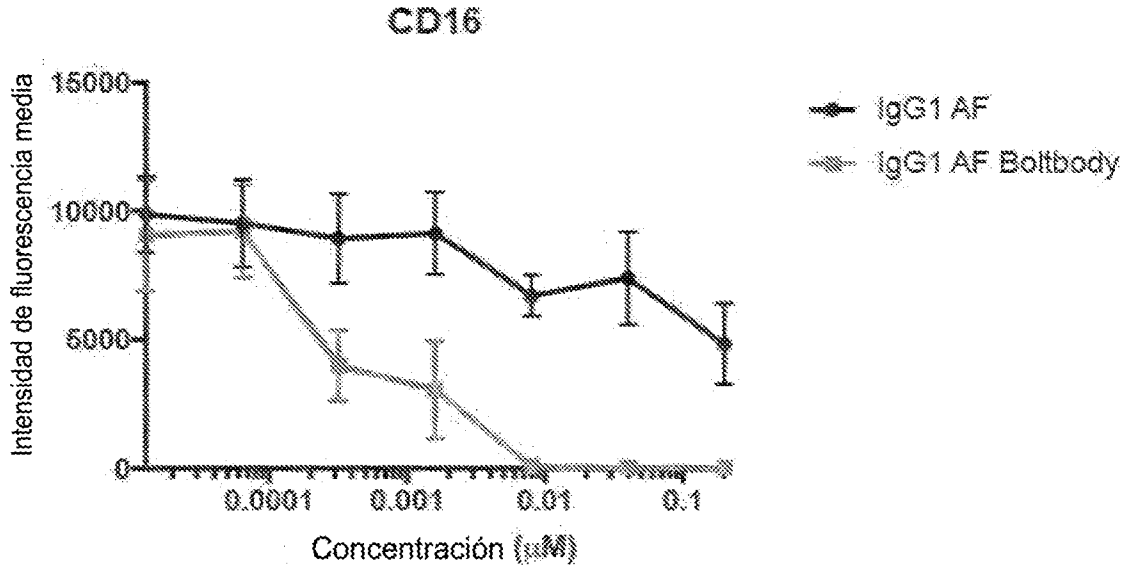


Fig. 90E

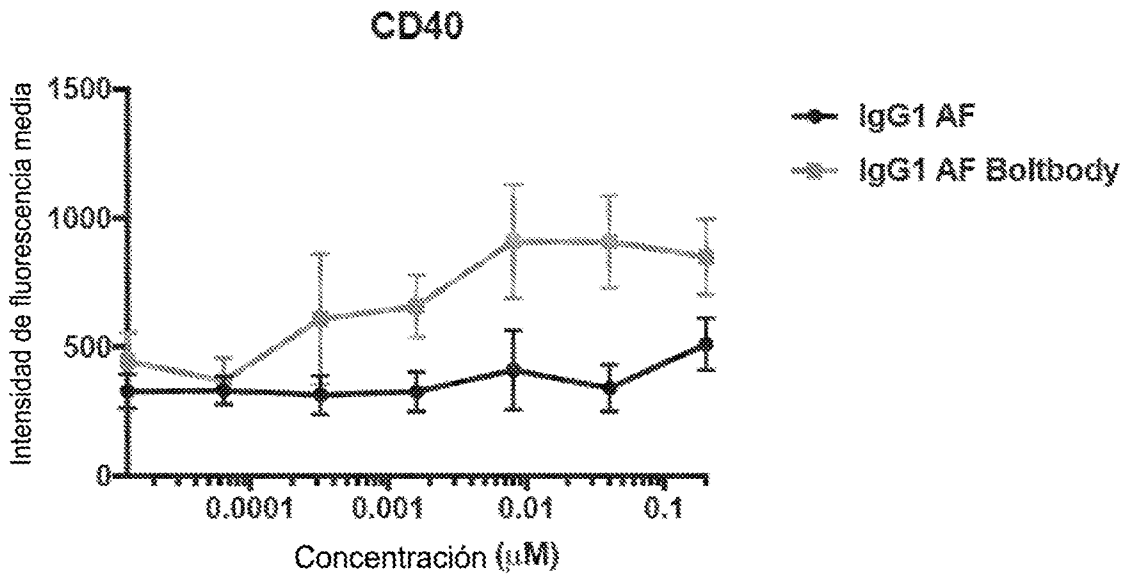


Fig. 90F

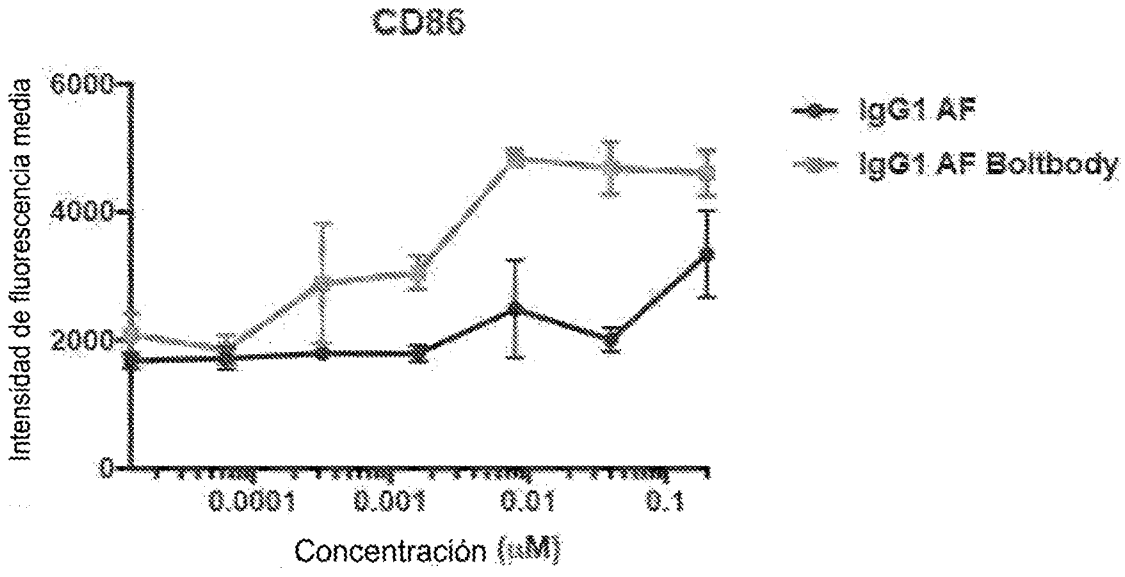


Fig. 90G

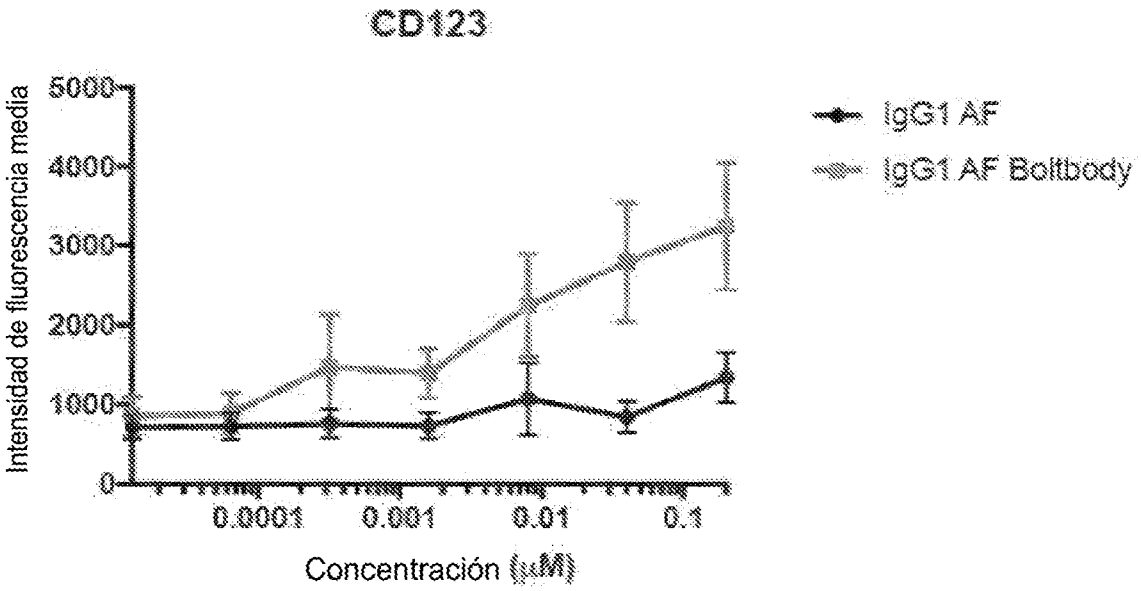


Fig. 90H

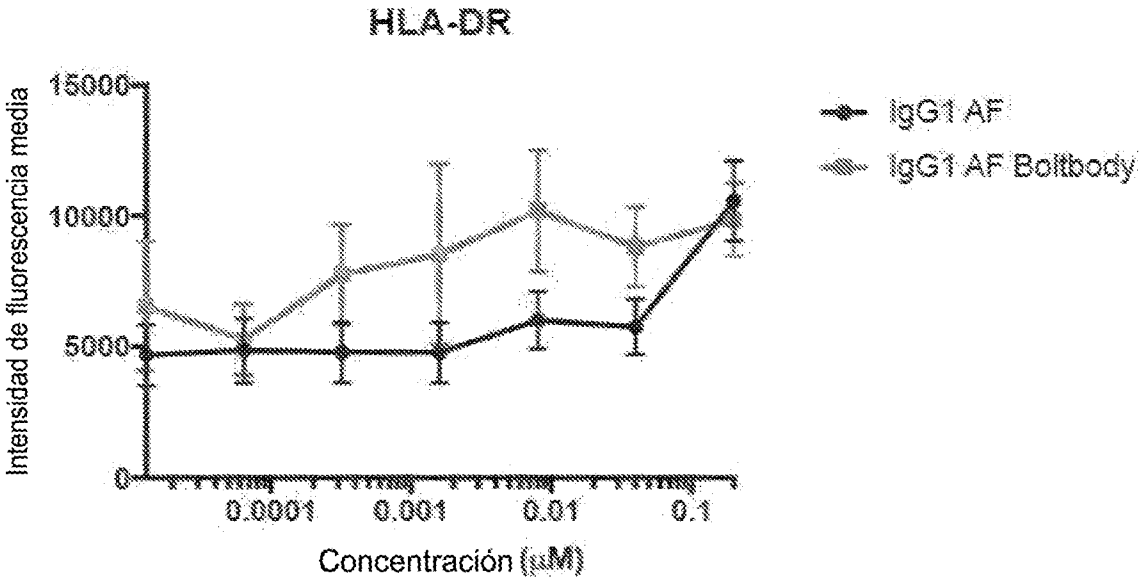


Fig. 90I

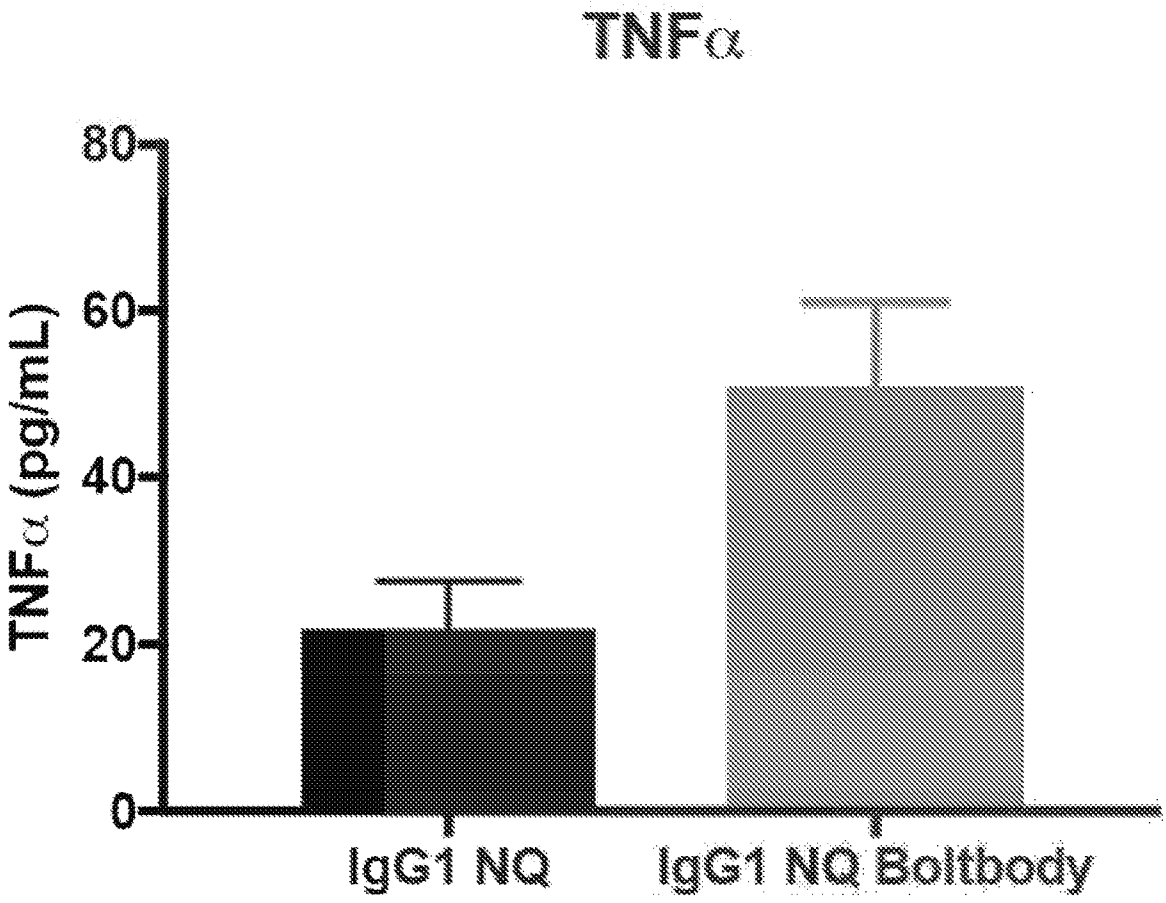


Fig. 91A

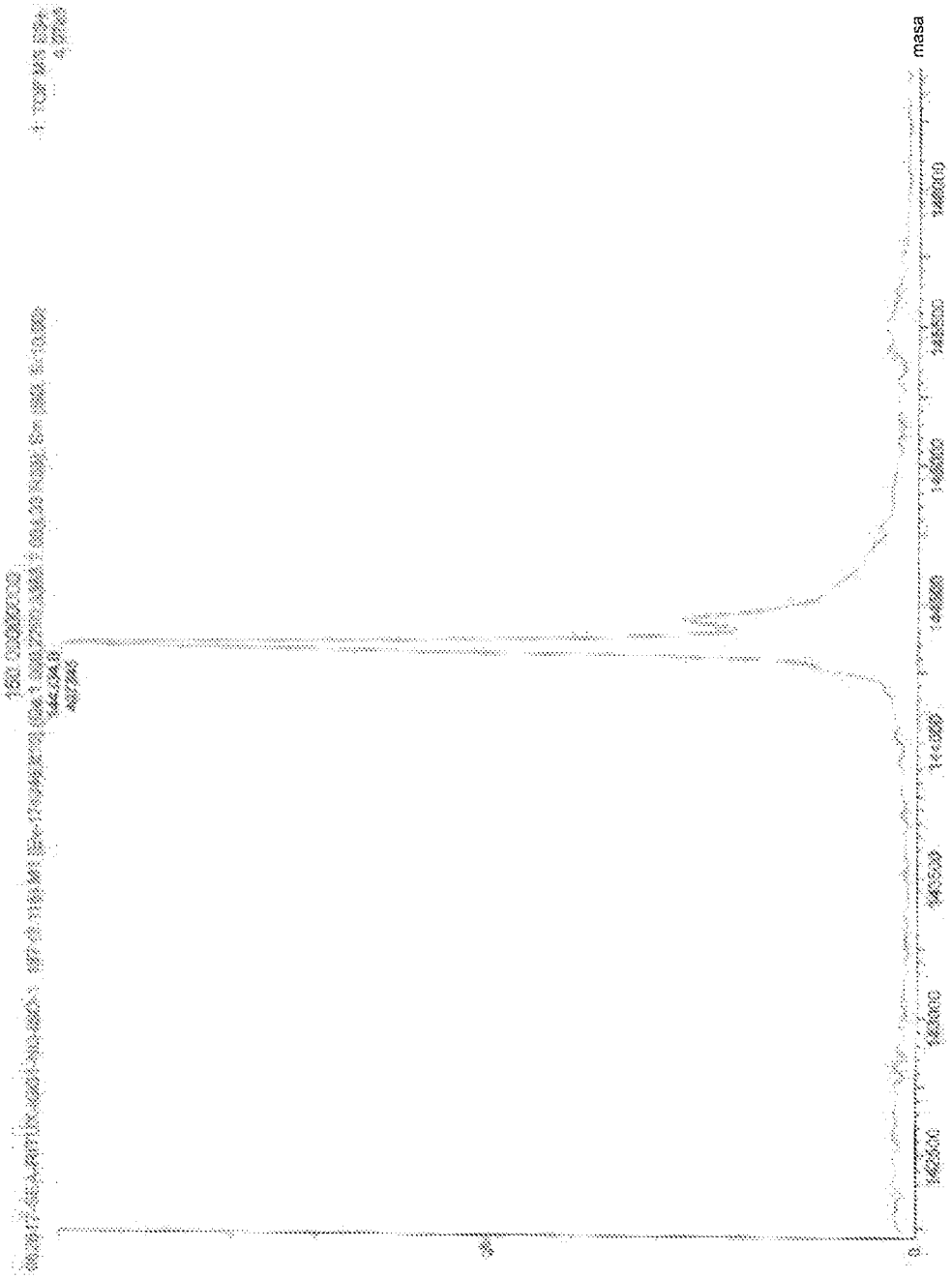


Fig. 91B

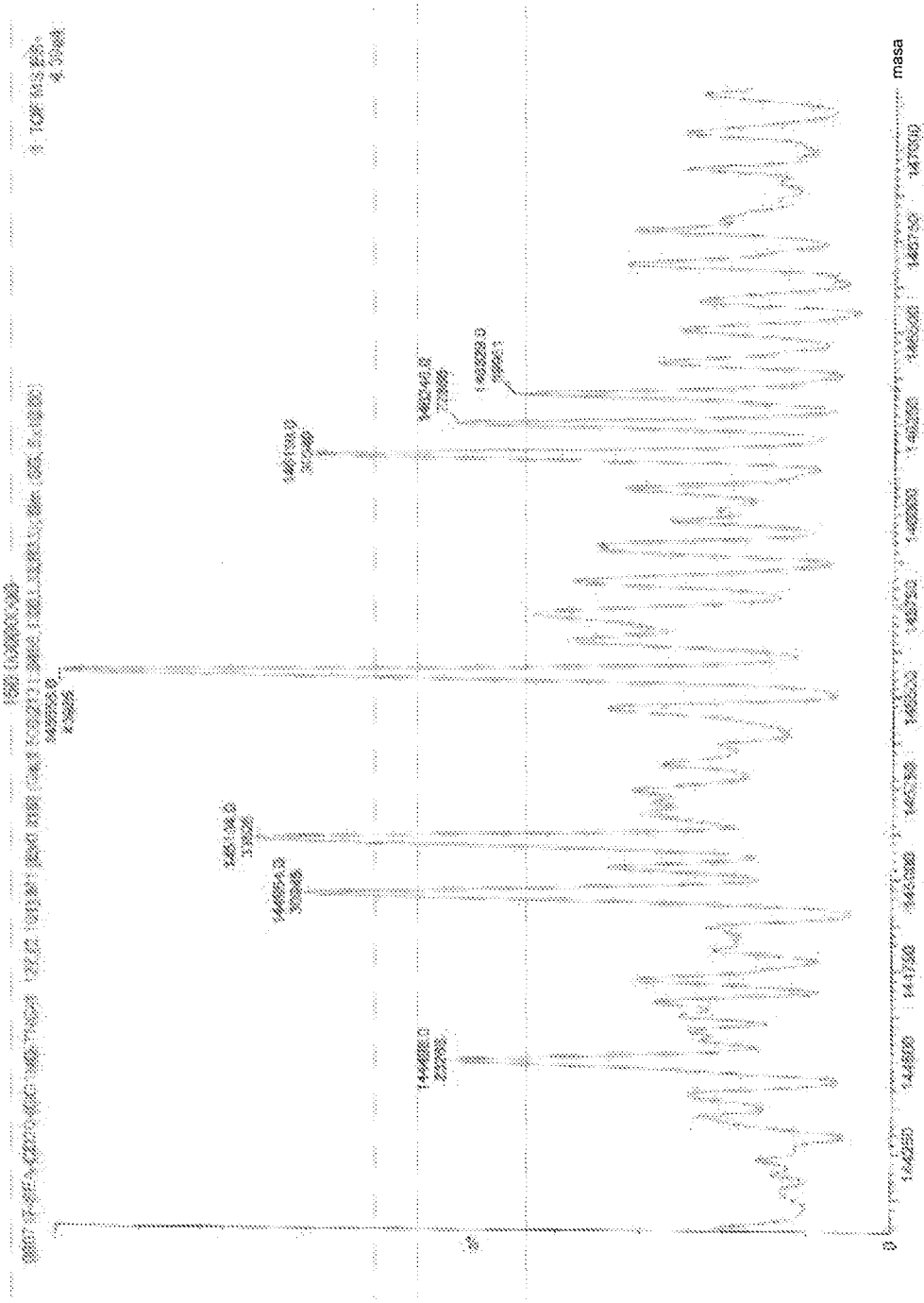


Fig. 91C

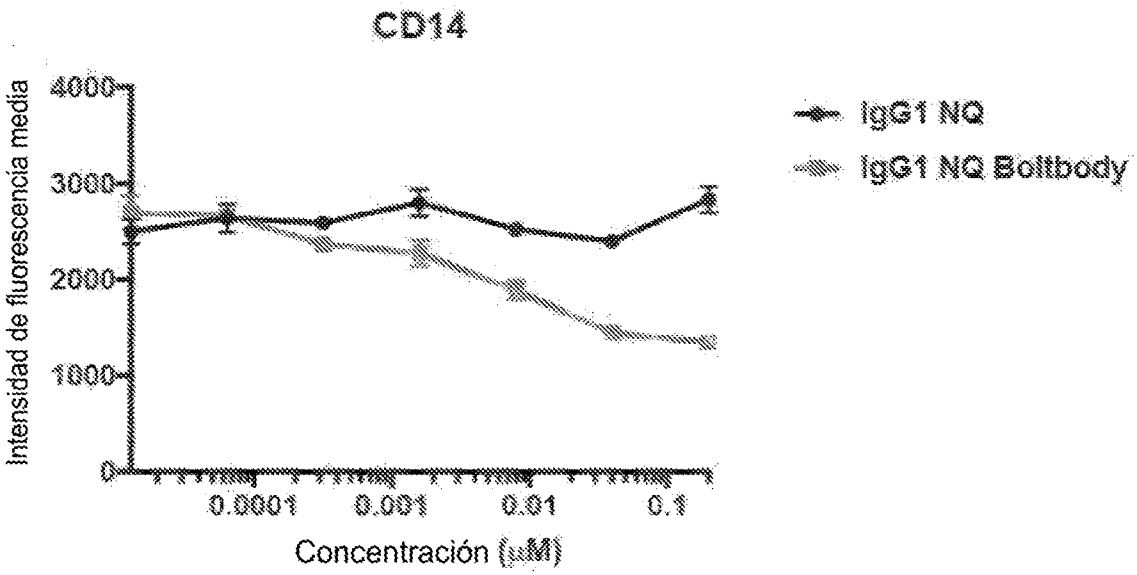


Fig. 91D

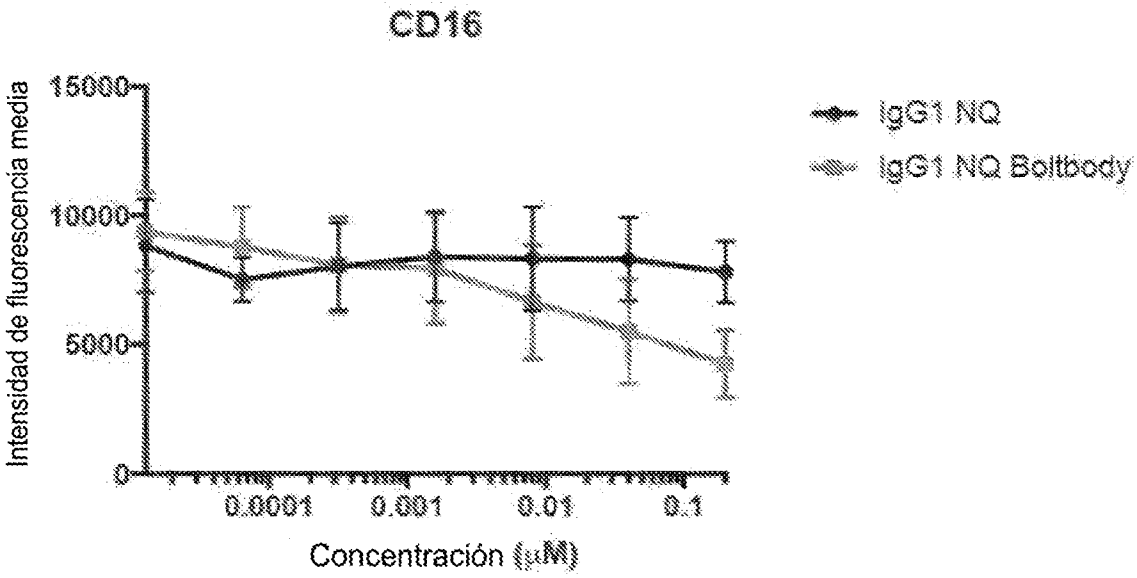


Fig. 91E

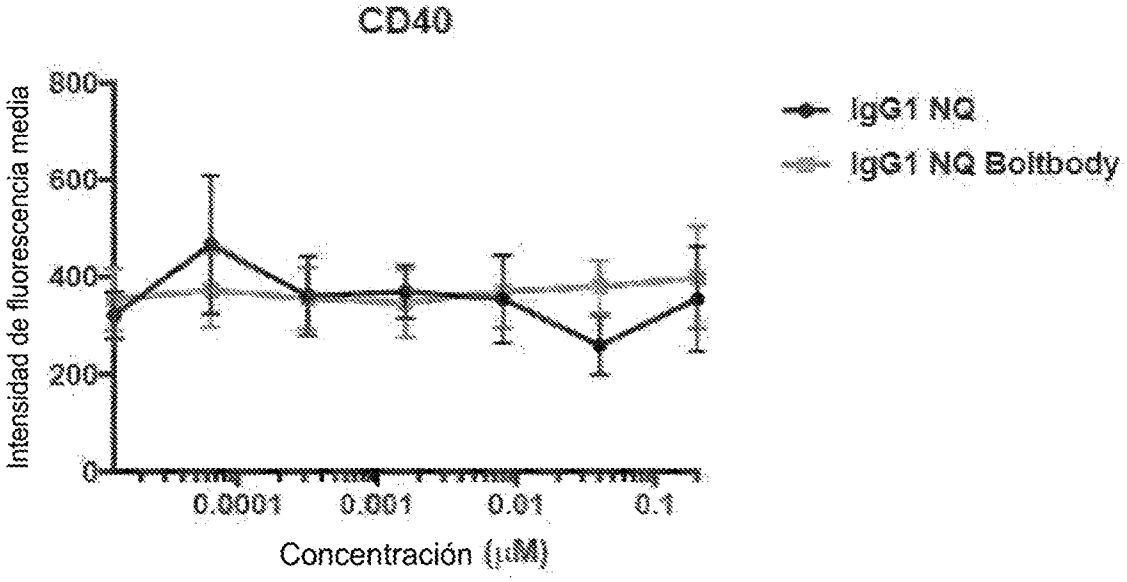


Fig. 91F

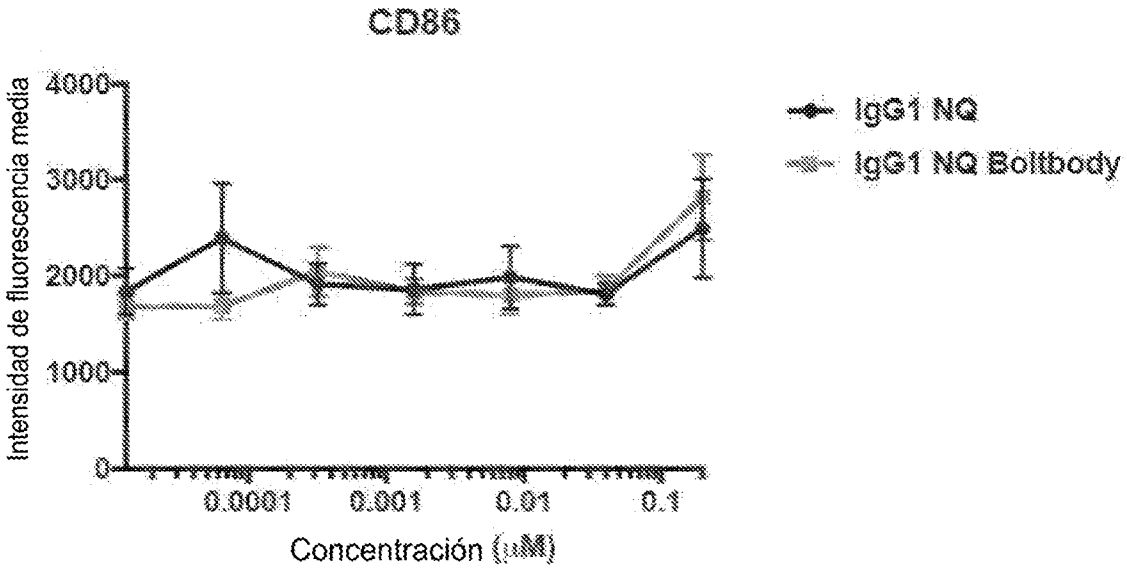


Fig. 91G

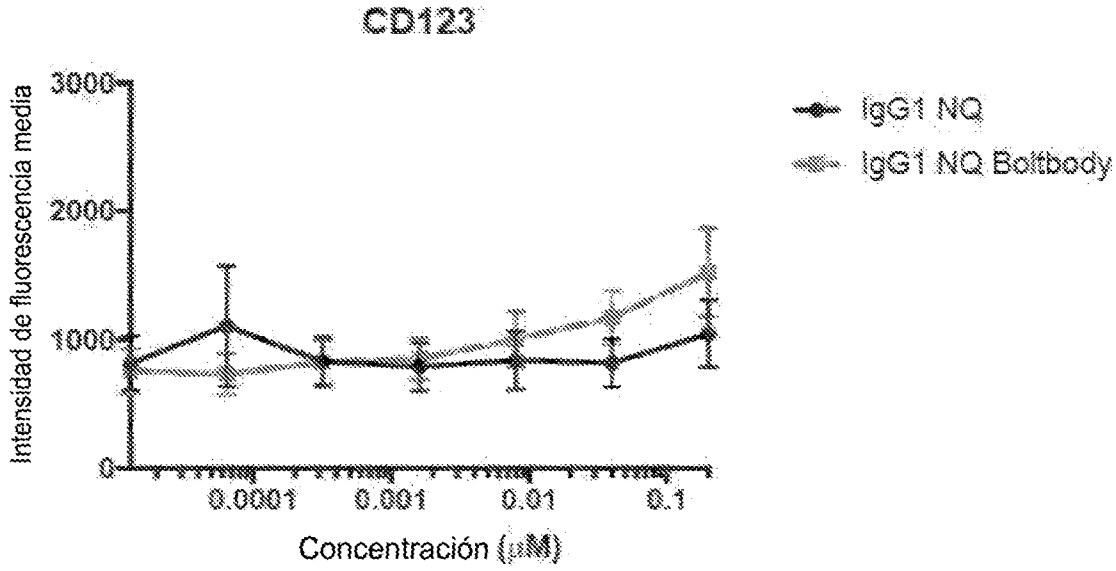


Fig. 91H

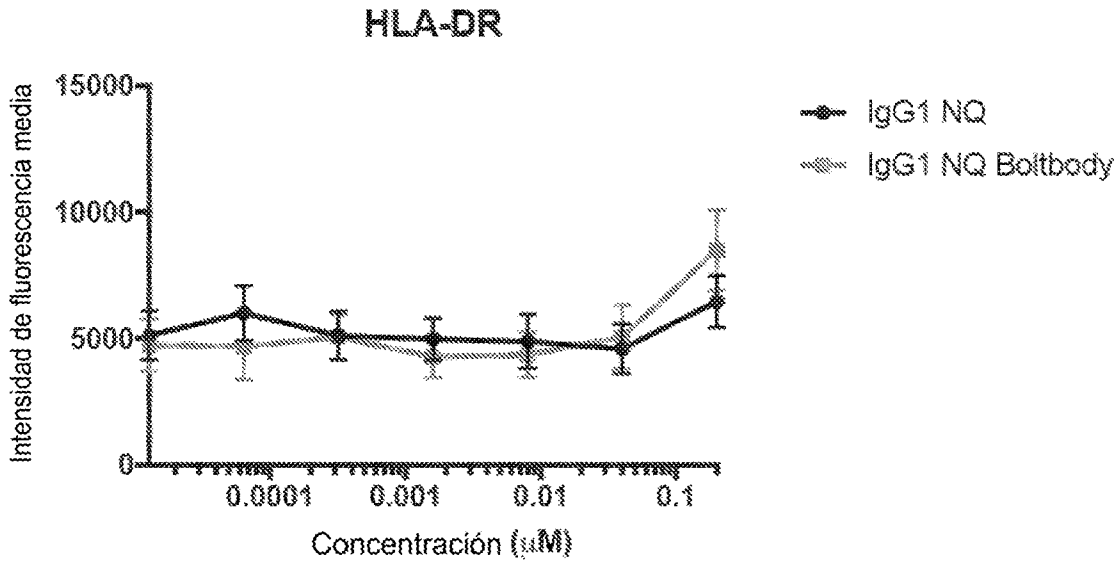


Fig. 91I

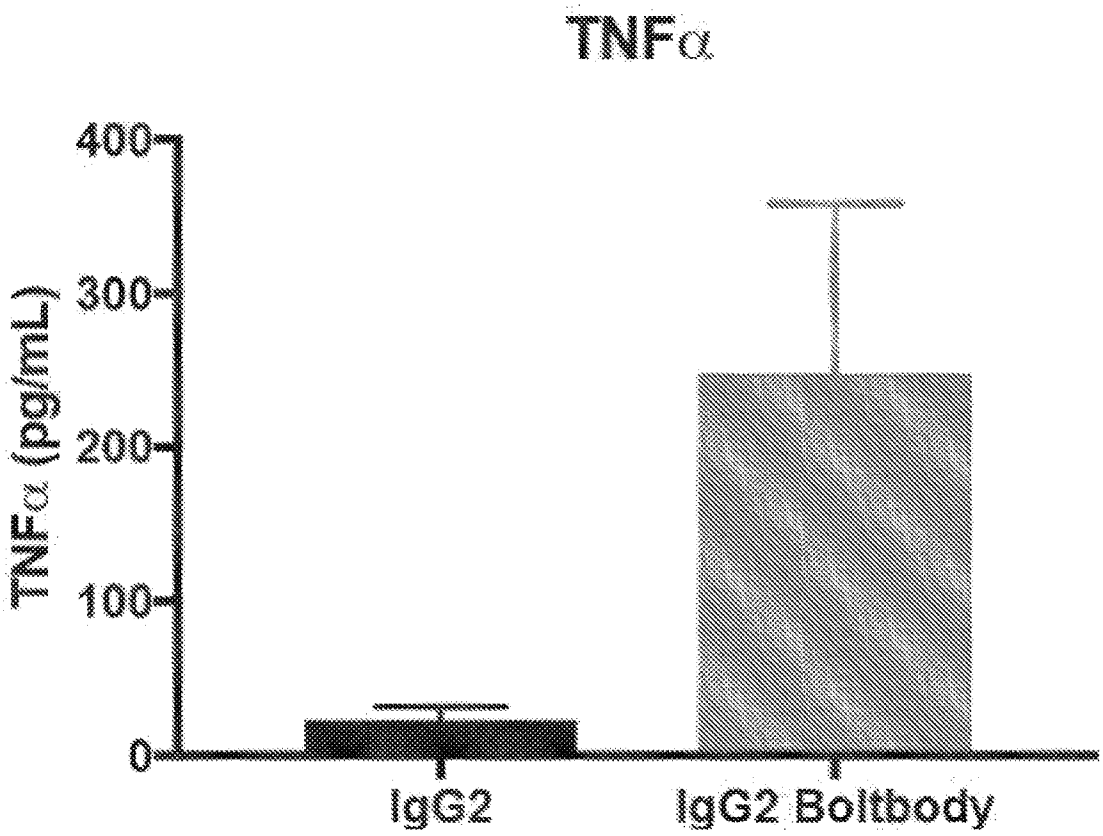


Fig. 92A

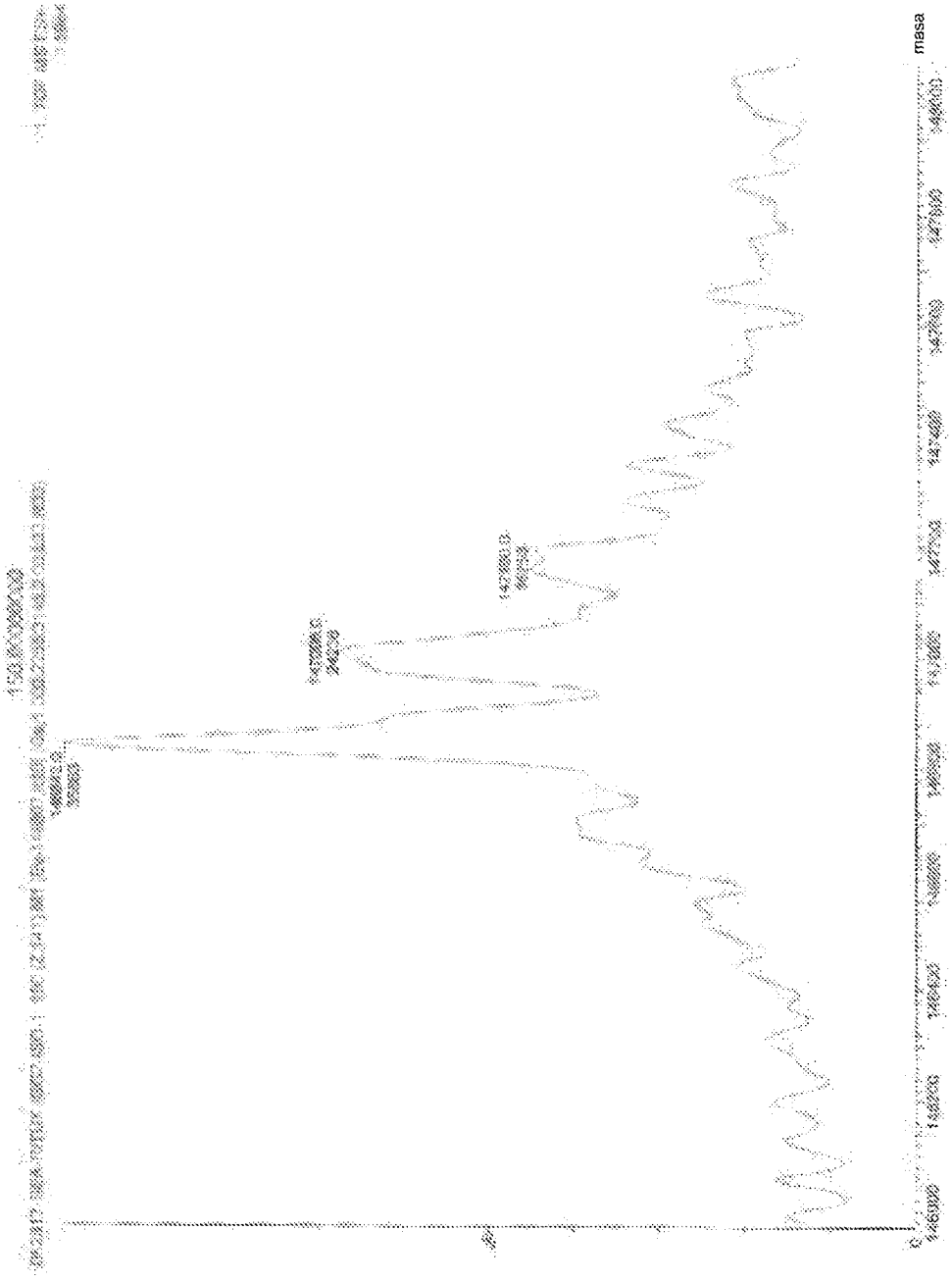


Fig. 92B

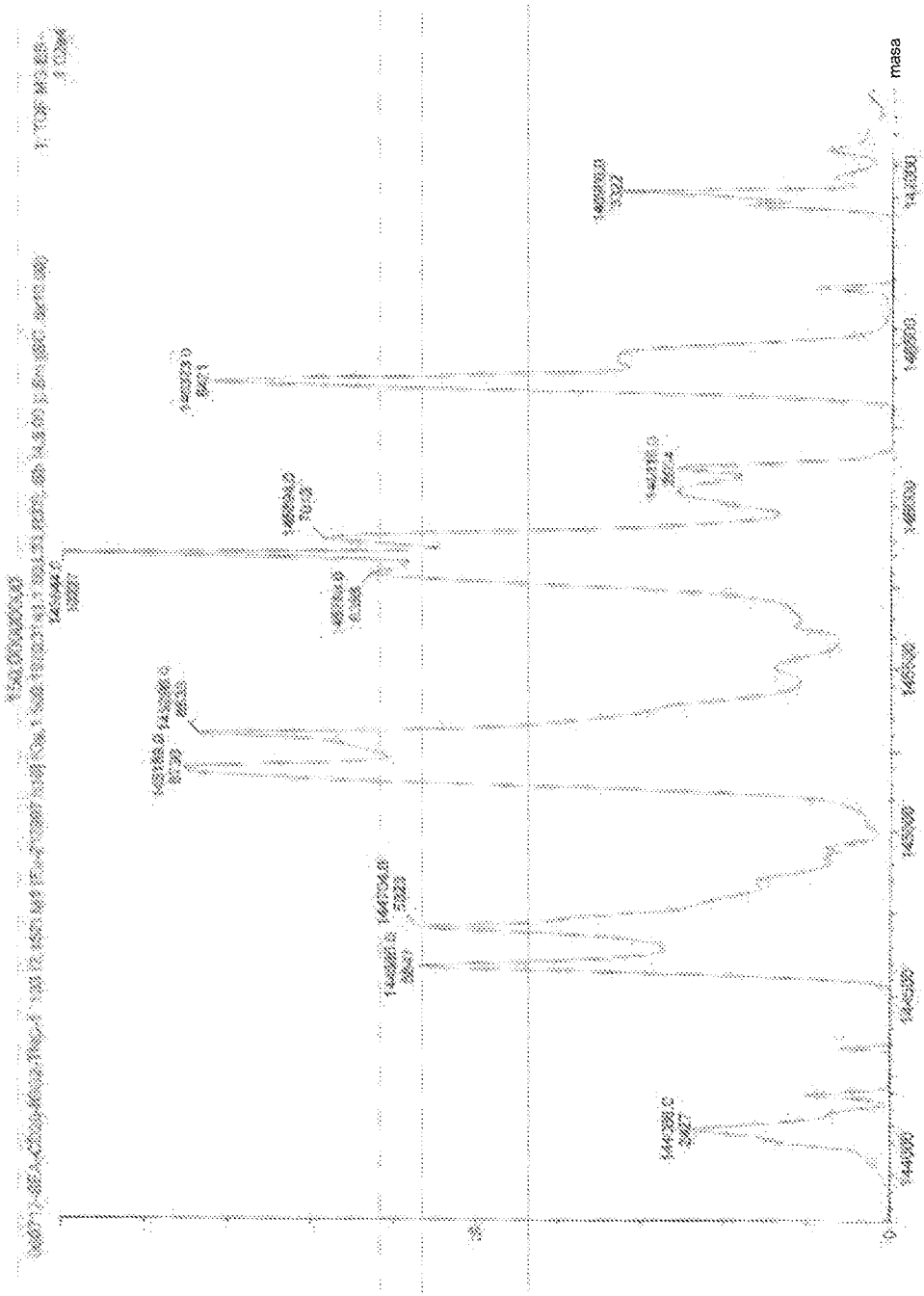


Fig. 92C

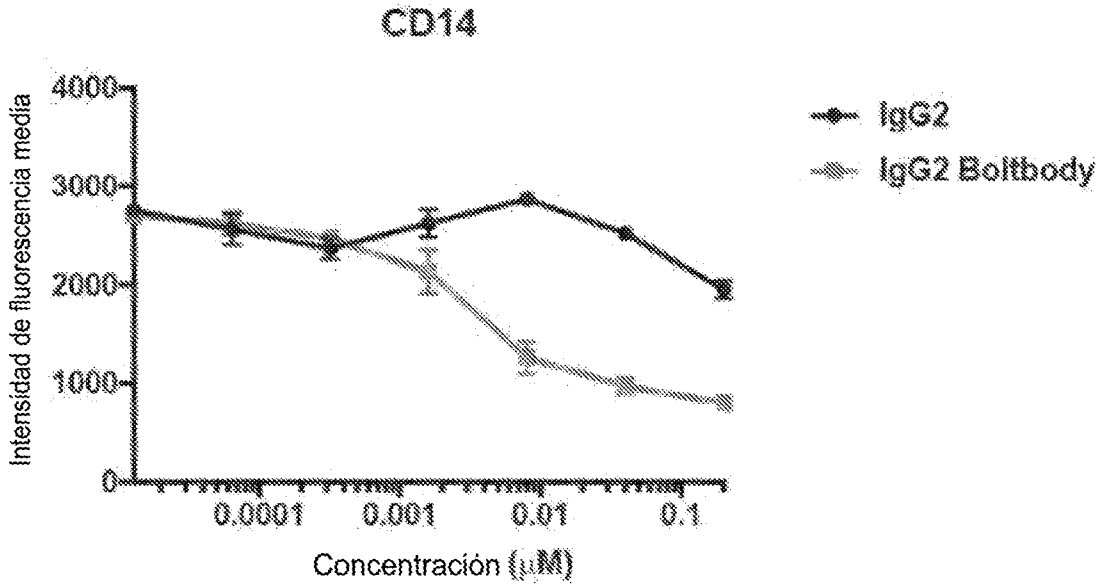


Fig. 92D

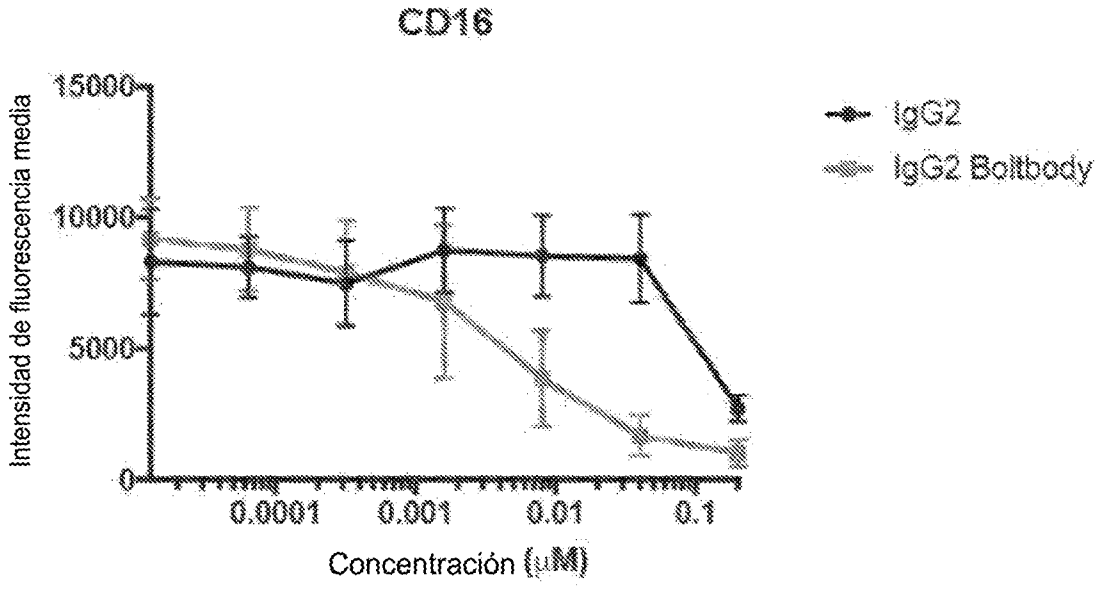


Fig. 92E

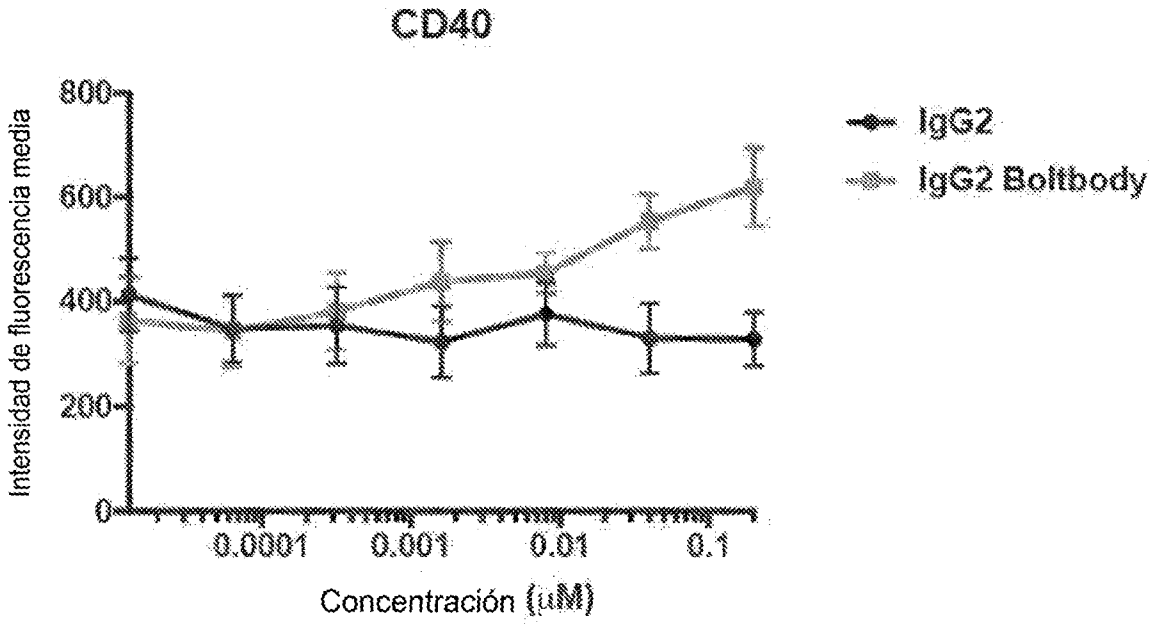


Fig. 92F

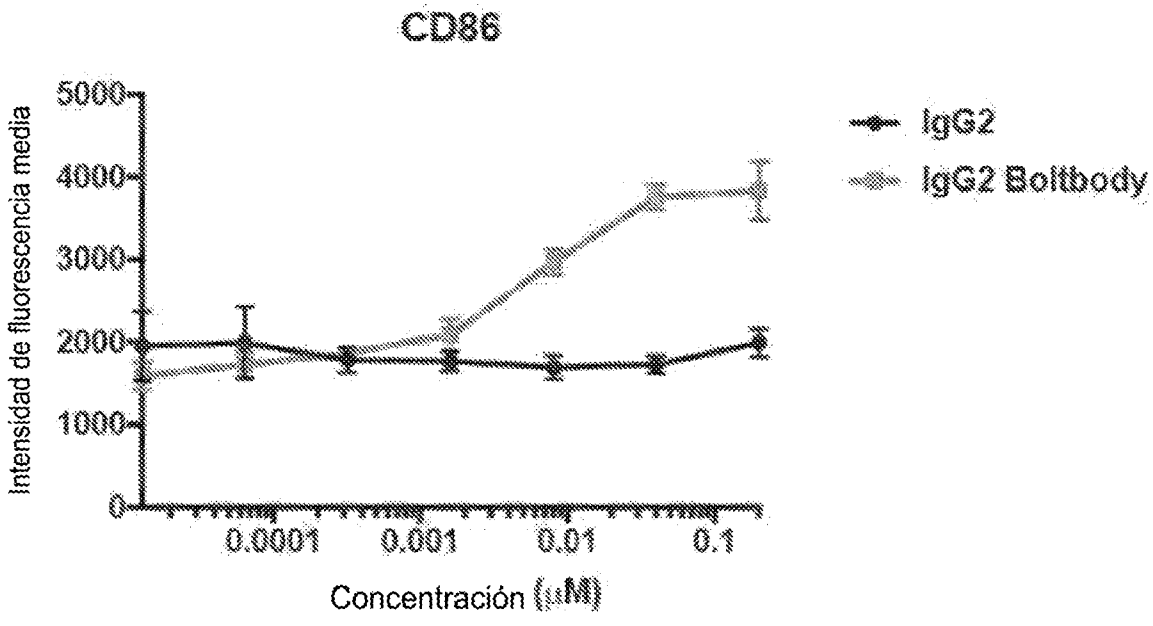


Fig. 92G

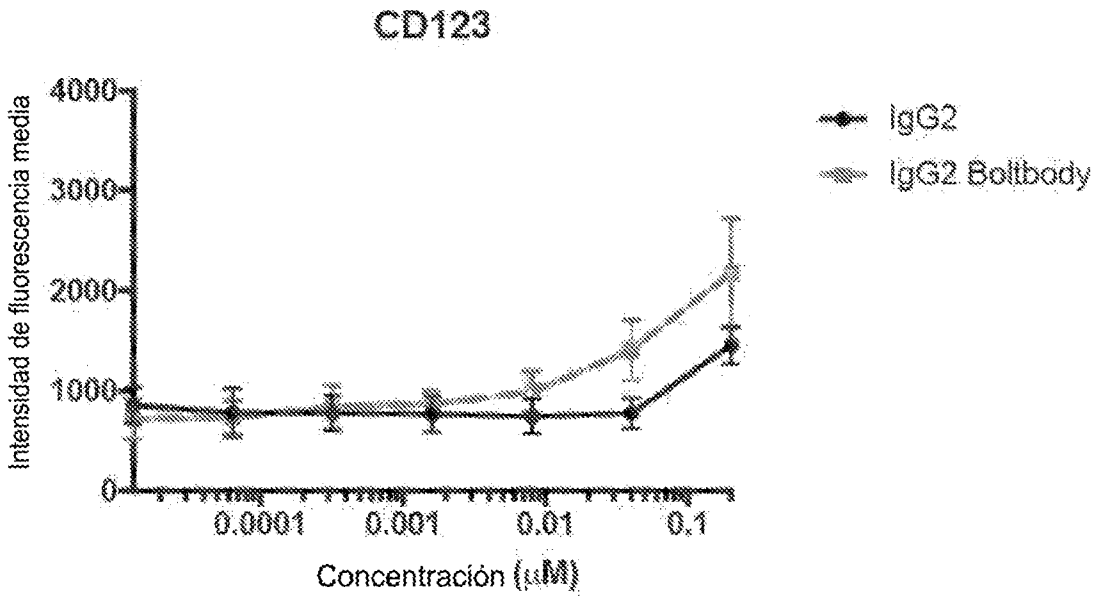


Fig. 92H

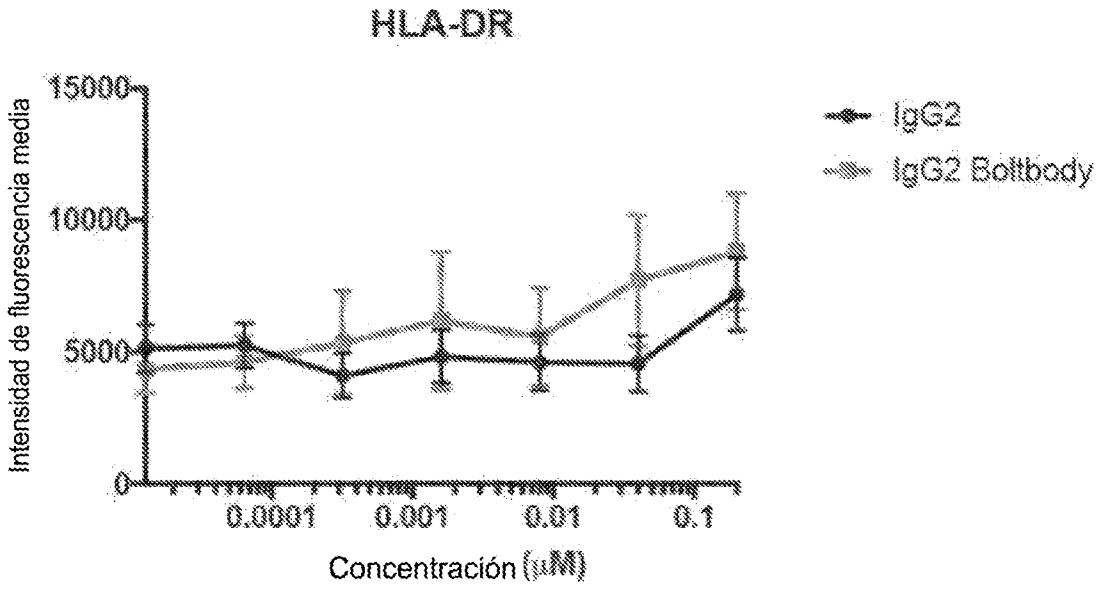


Fig. 92I

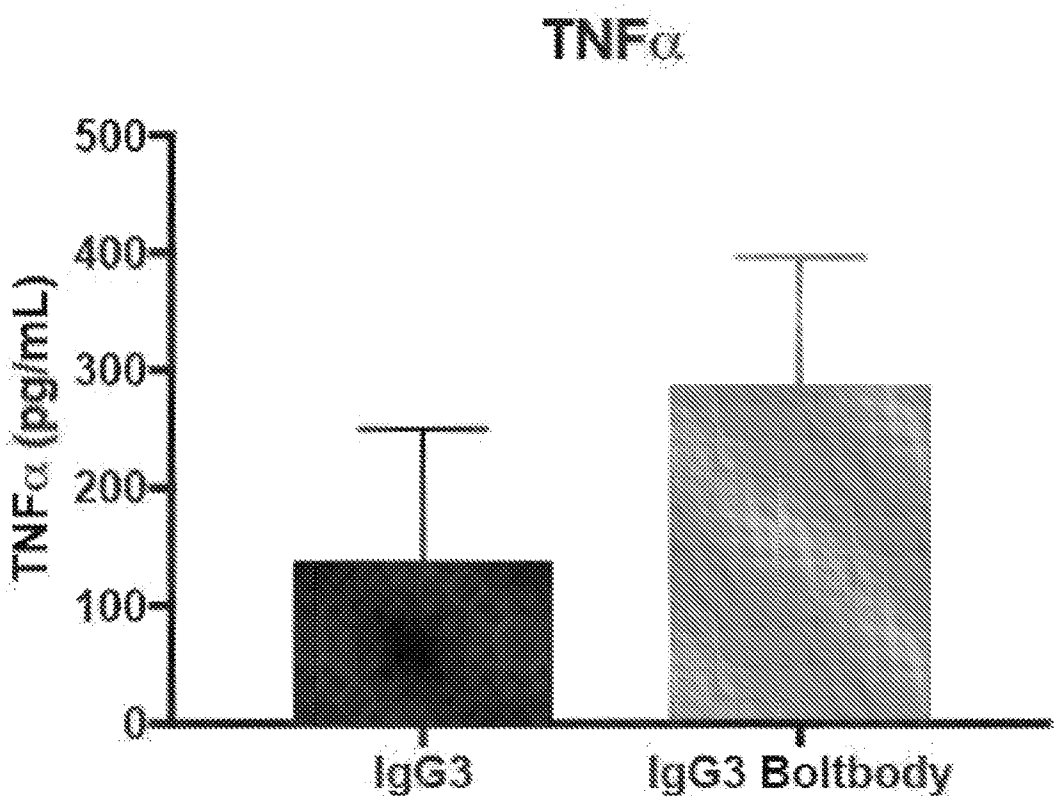


Fig. 93A

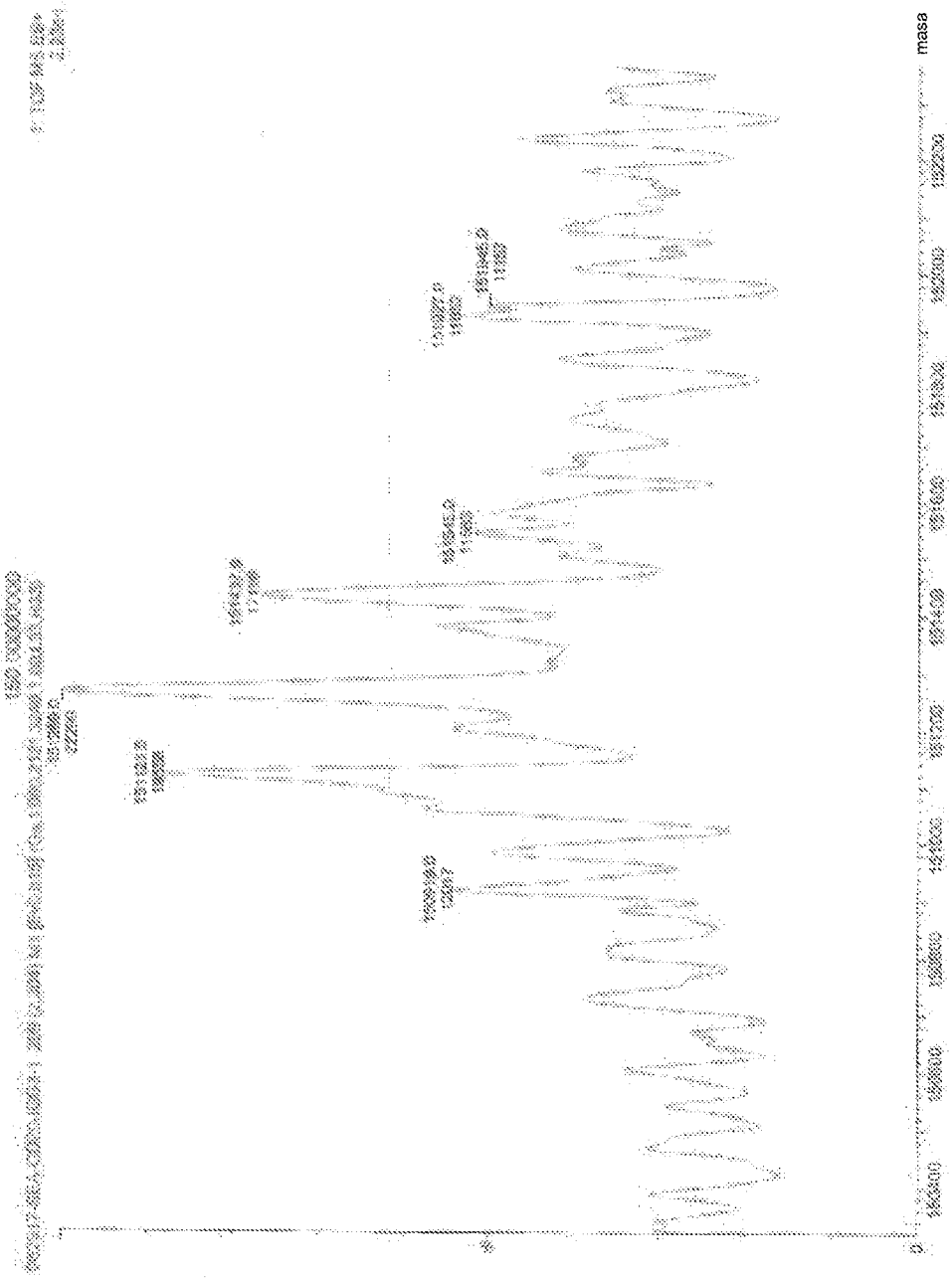


Fig. 93B

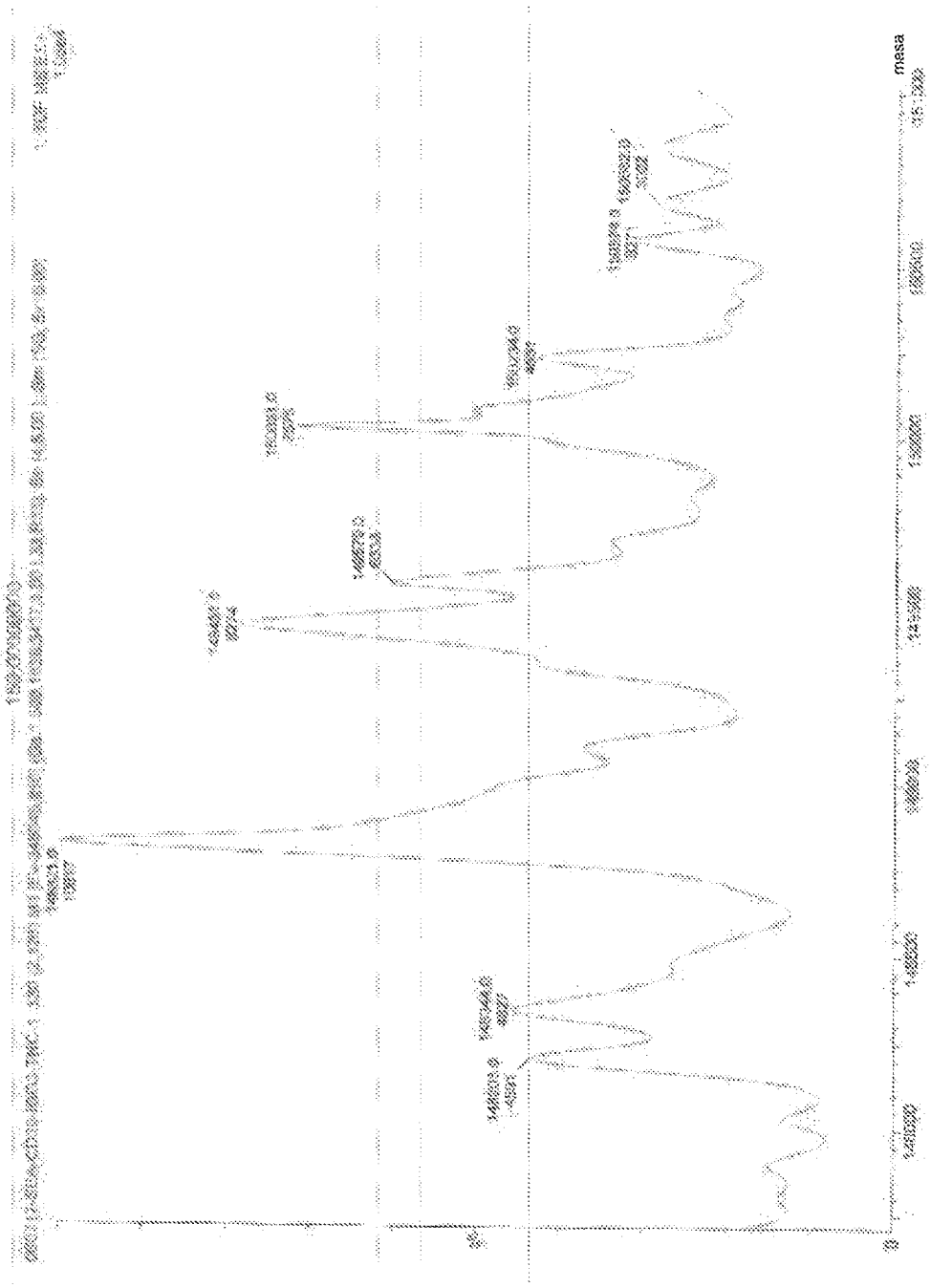


Fig. 93C

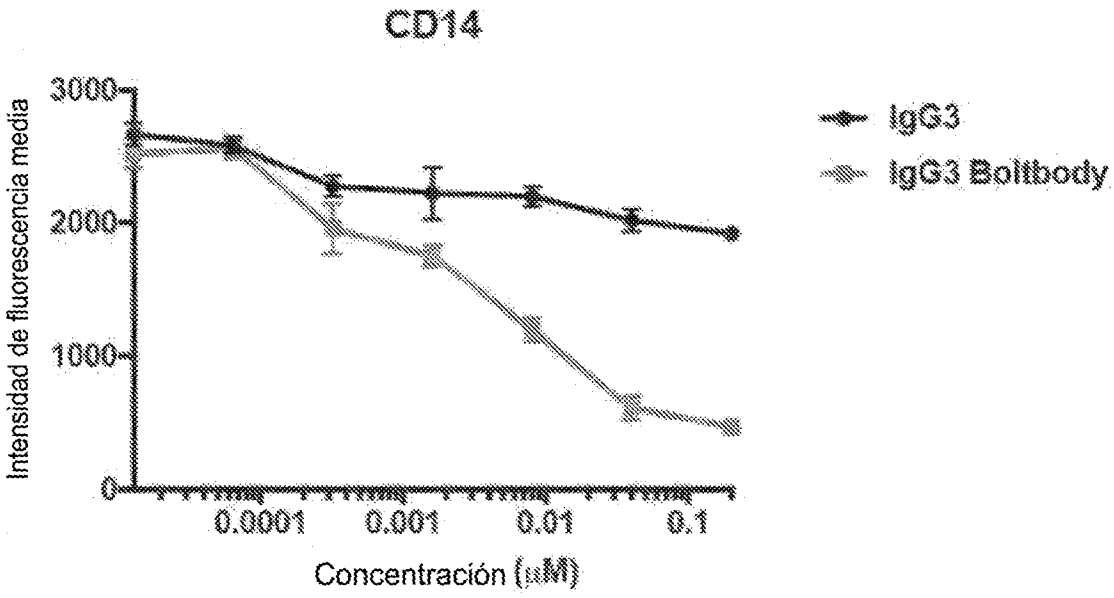


Fig. 93D

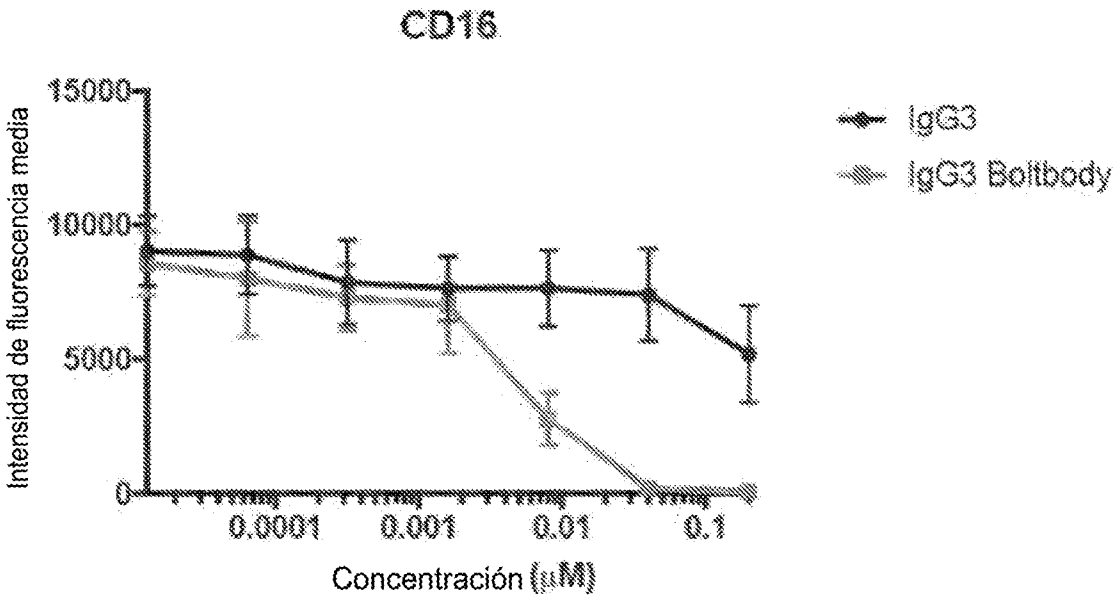


Fig. 93E

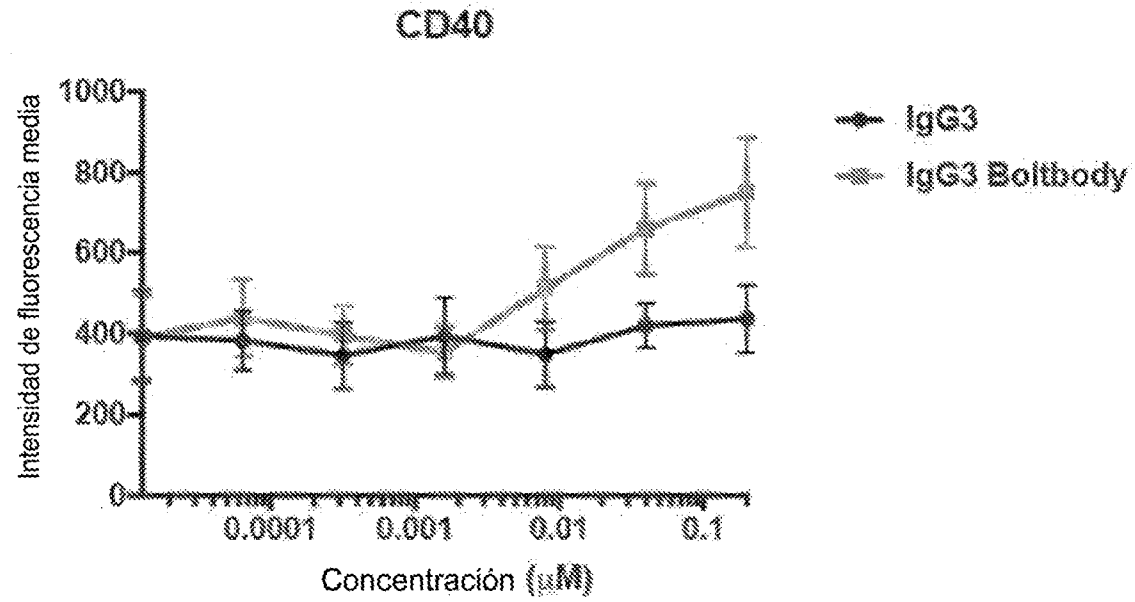


Fig. 93F

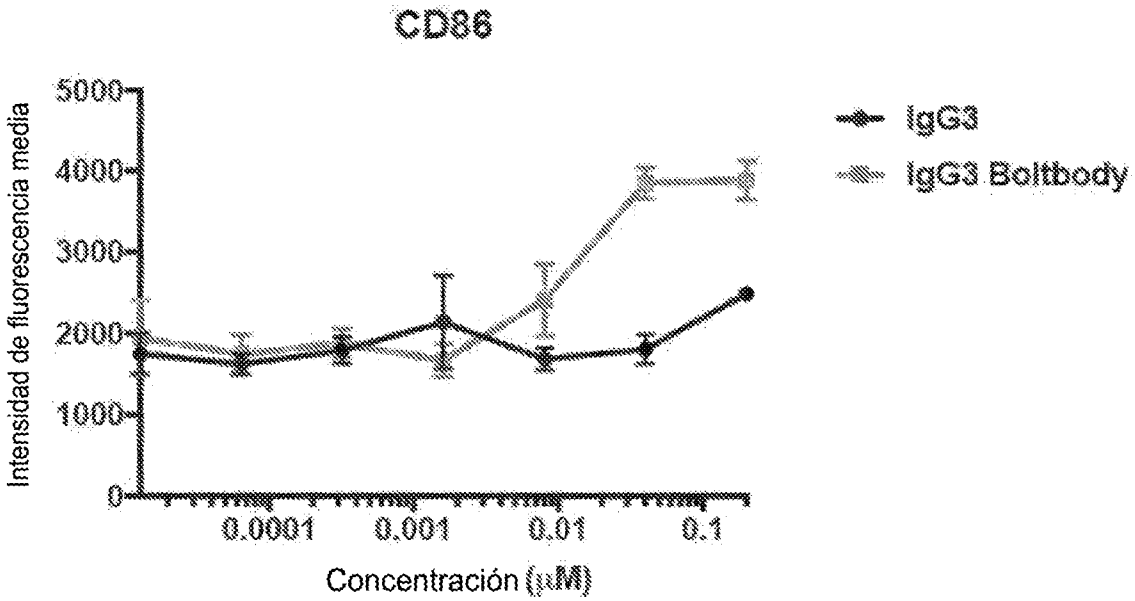


Fig. 93G

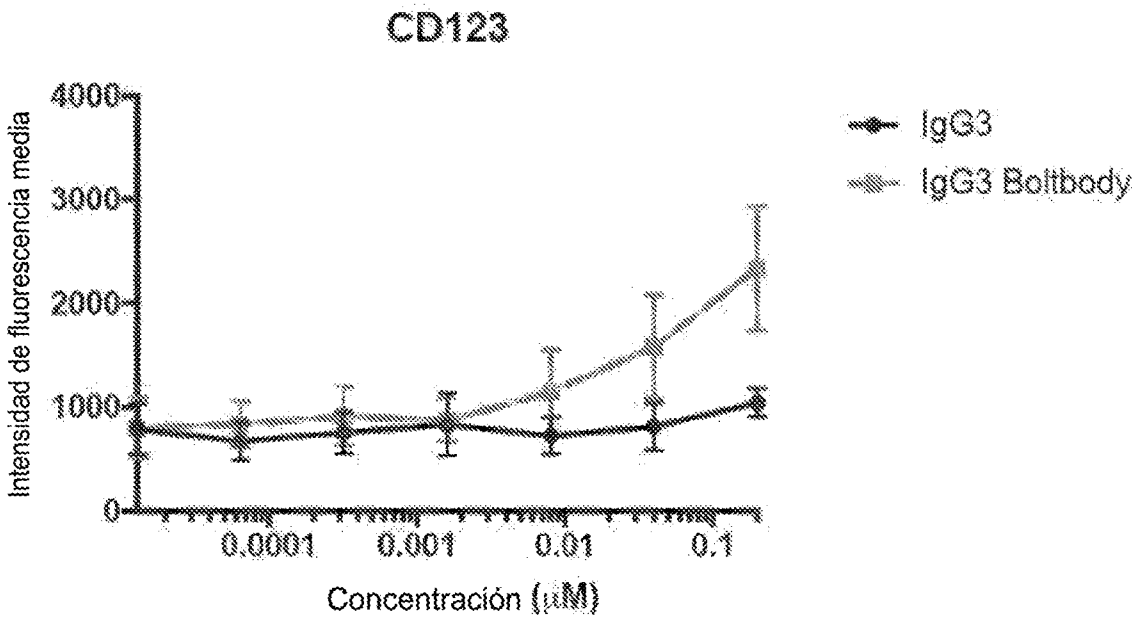


Fig. 93H

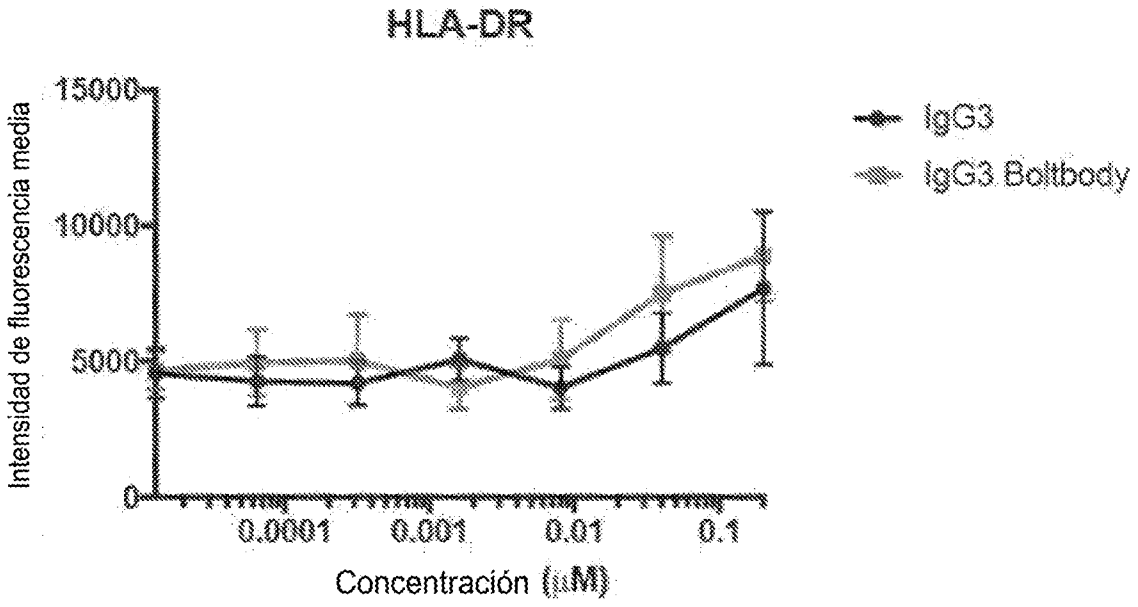


Fig. 93I

437

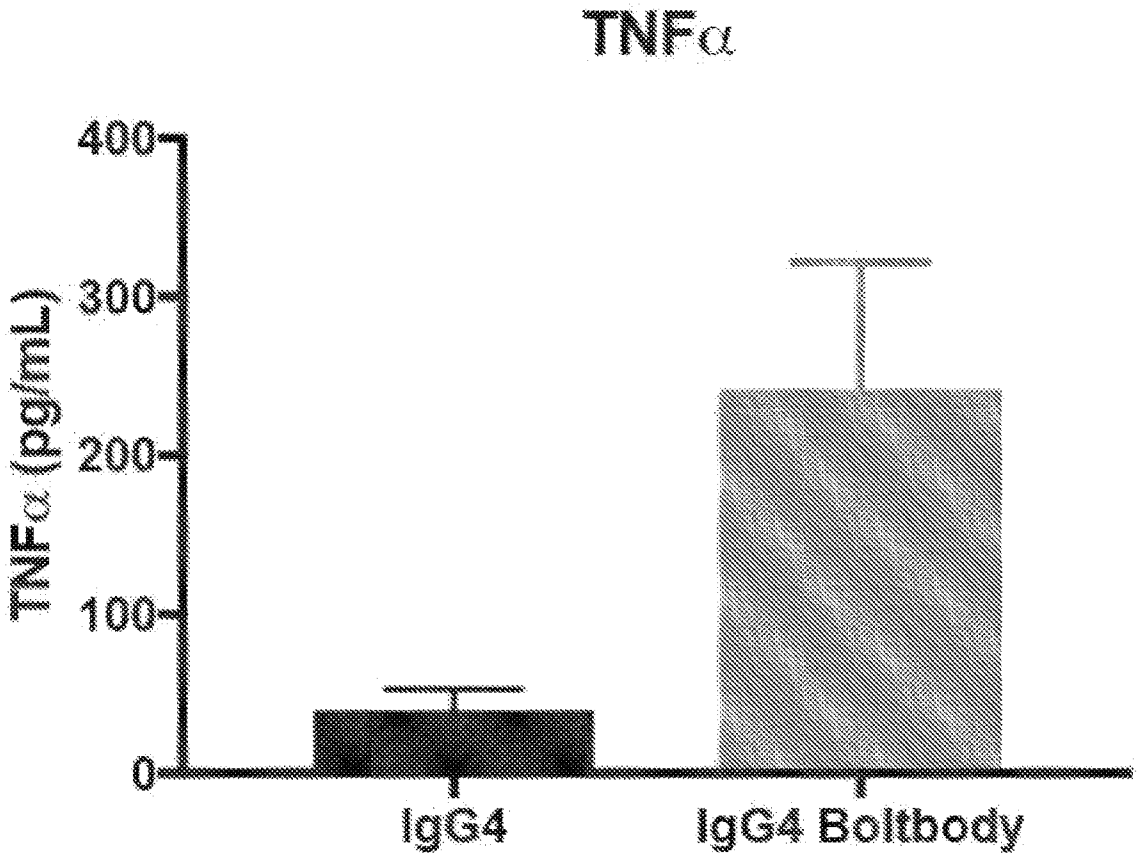


Fig. 94A

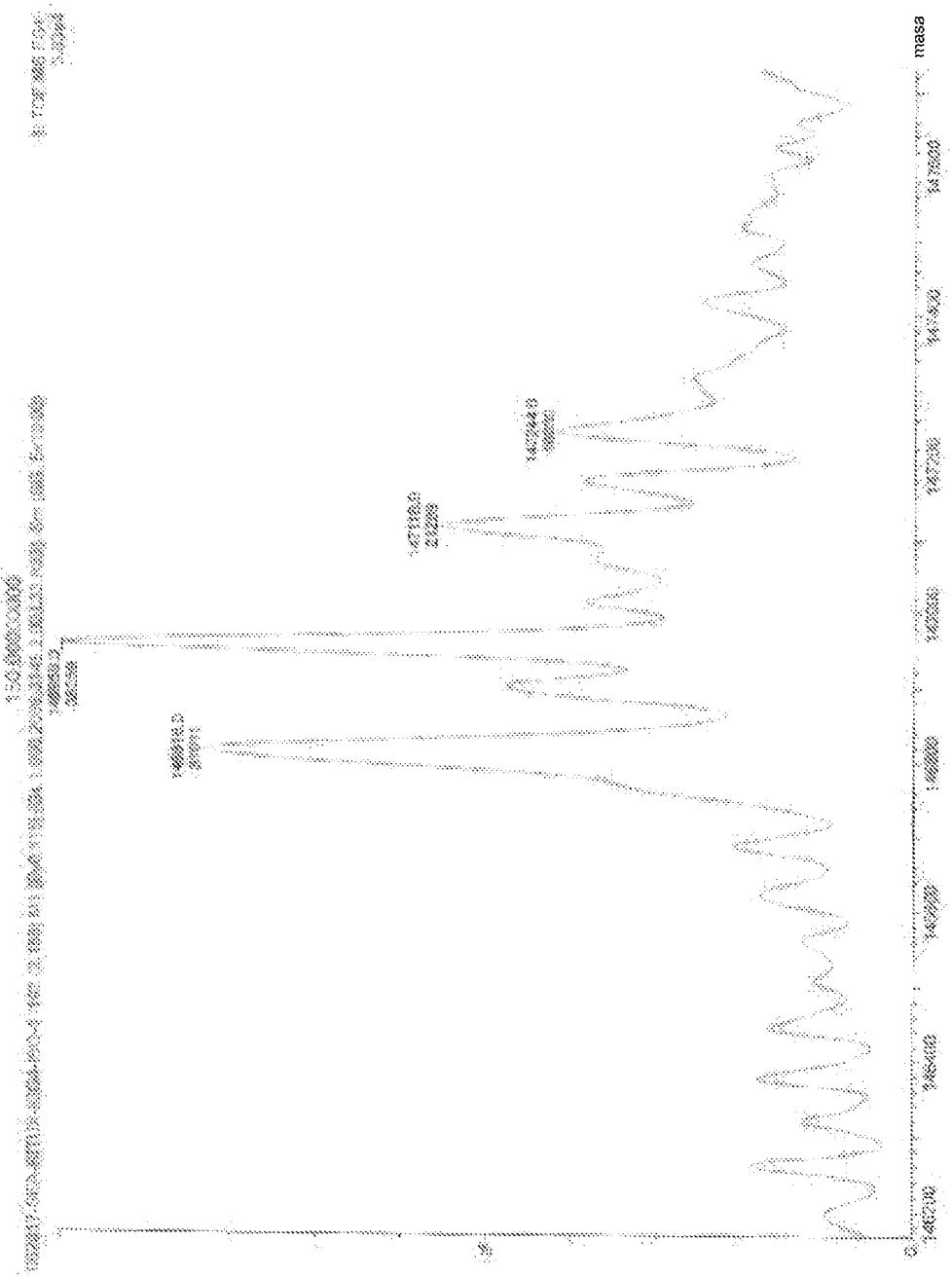


Fig. 94B

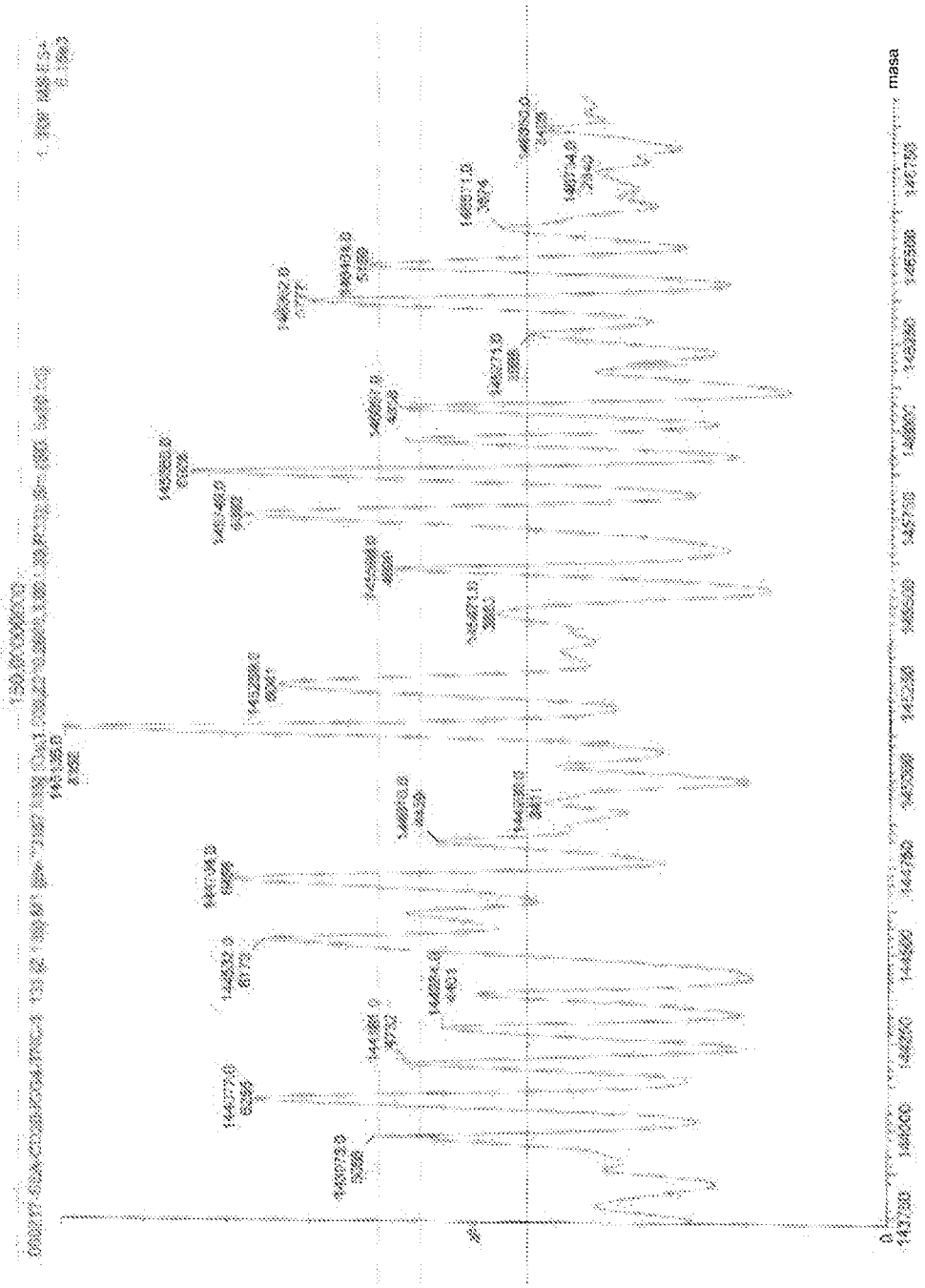


Fig. 94C

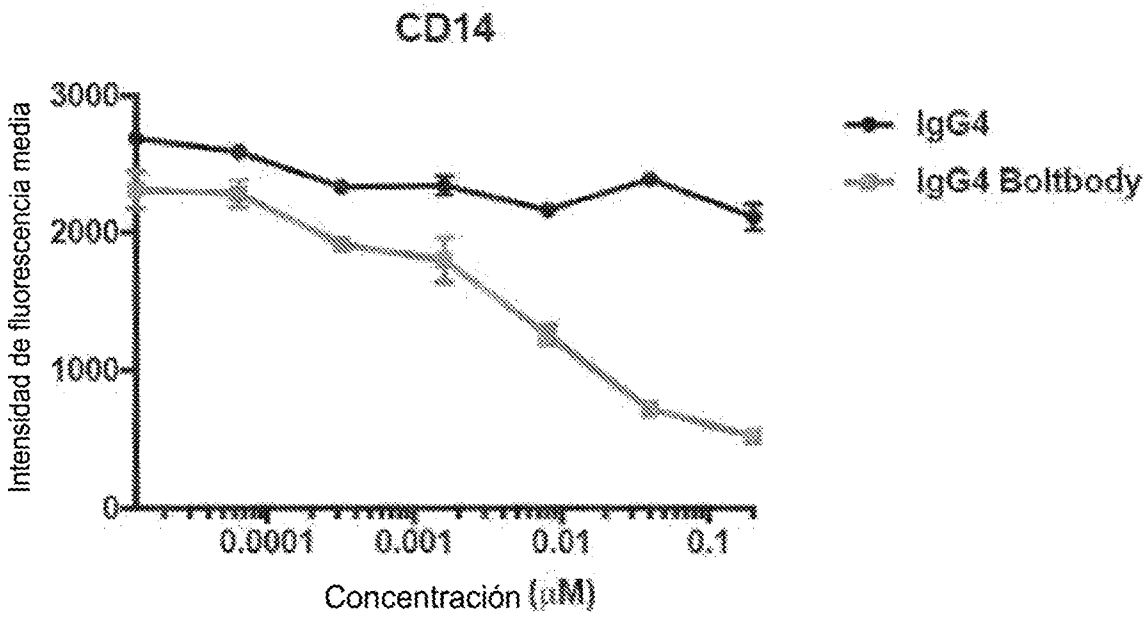


Fig. 94D

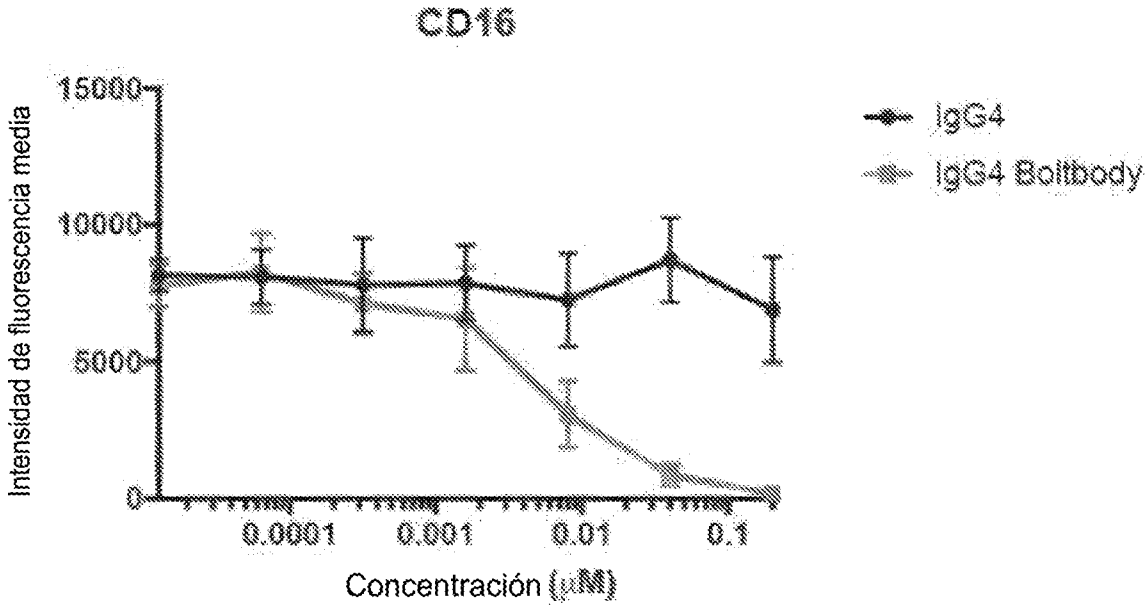


Fig. 94E

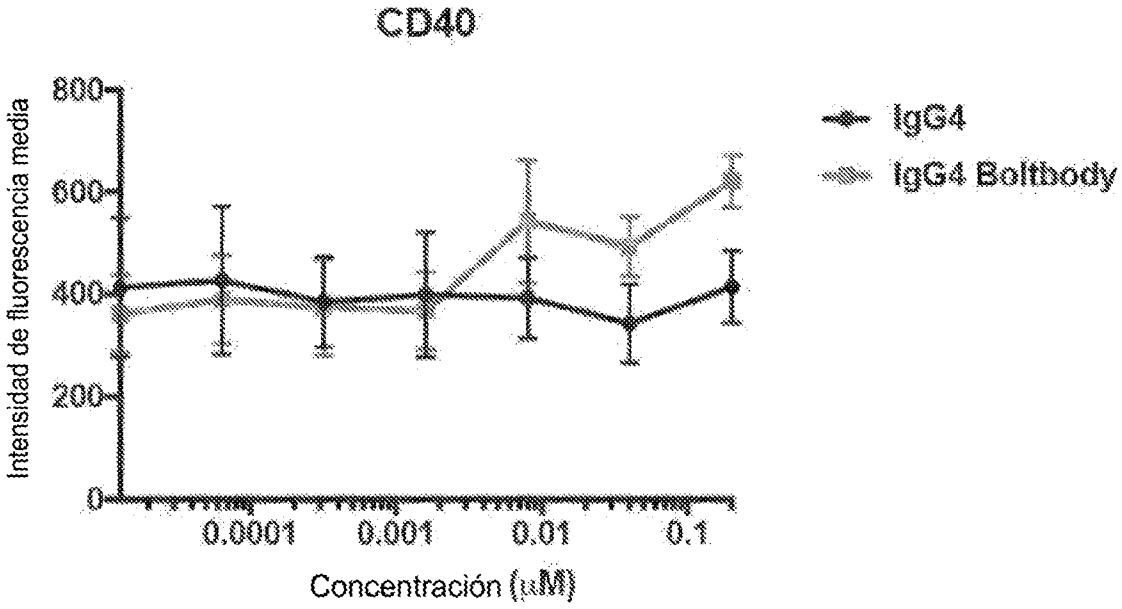


Fig. 94F

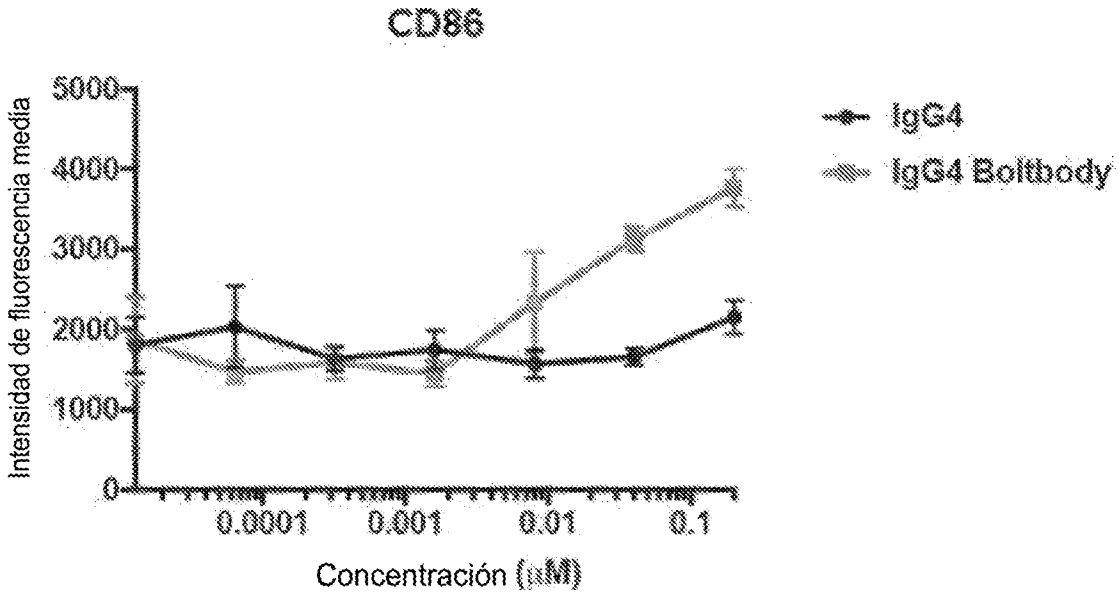


Fig. 94G

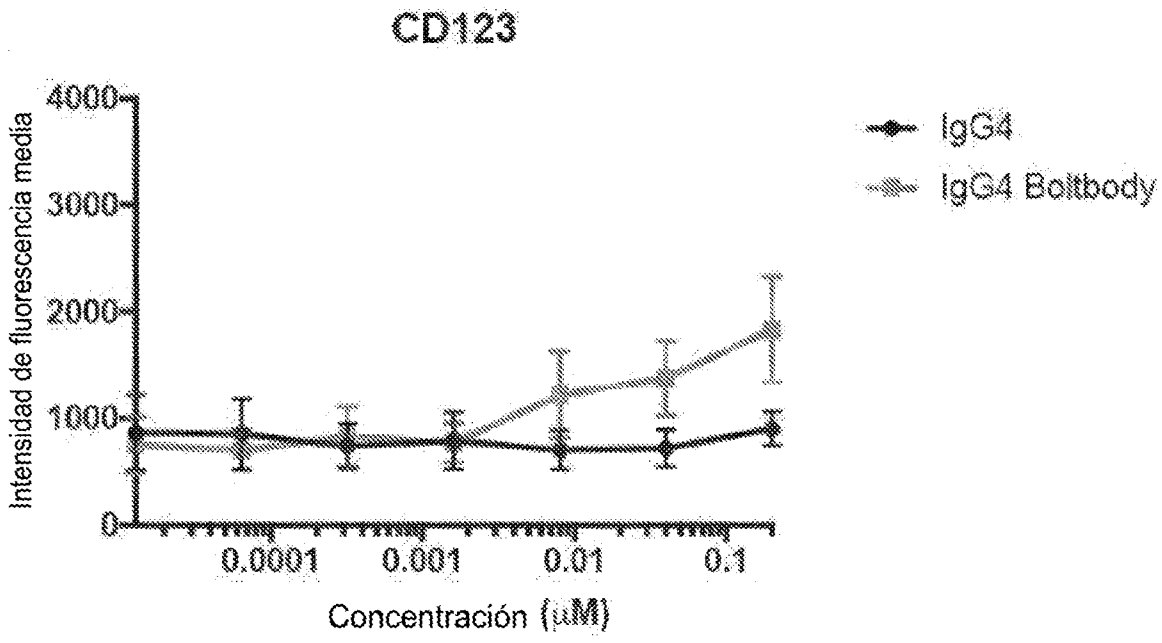


Fig. 94H

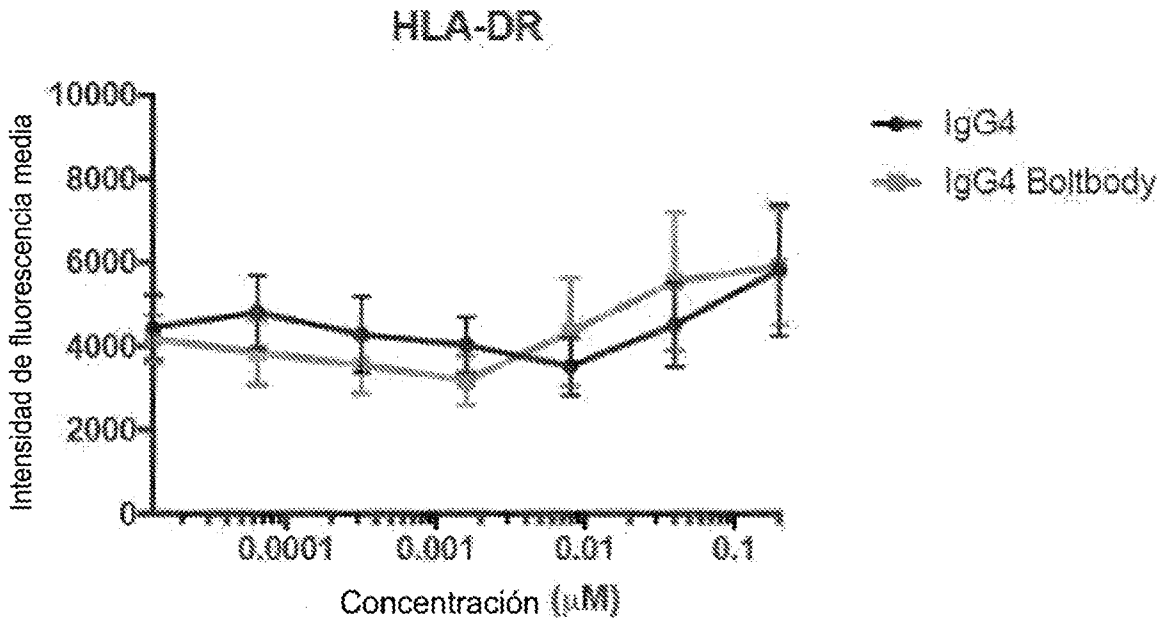


Fig. 94I

	CD14		CD40		CD86	
Nombre	EC50 (nM)	Cambio en veces	EC50 (nM)	Cambio en veces	EC50 (nM)	Cambio en veces
88-IgG1	1.96	5.85	4.41	3.20	4.19	3.11
88-IgG1 AF	8.40	4.31	0.86	1.66	1.01	1.38
88-IgG2	3.54	2.43	13.93	1.89	4.55	1.93
88-IgG3	3.20	4.07	21.81	1.72	11.58	1.56
88-IgG4	4.65	4.05	6.61	1.50	15.63	1.75

*Valores con Rituximab con dilución seriada 1:5

*Cambio en veces calculado a 200 nM en relación con el anticuerpo desnudo

Fig. 95

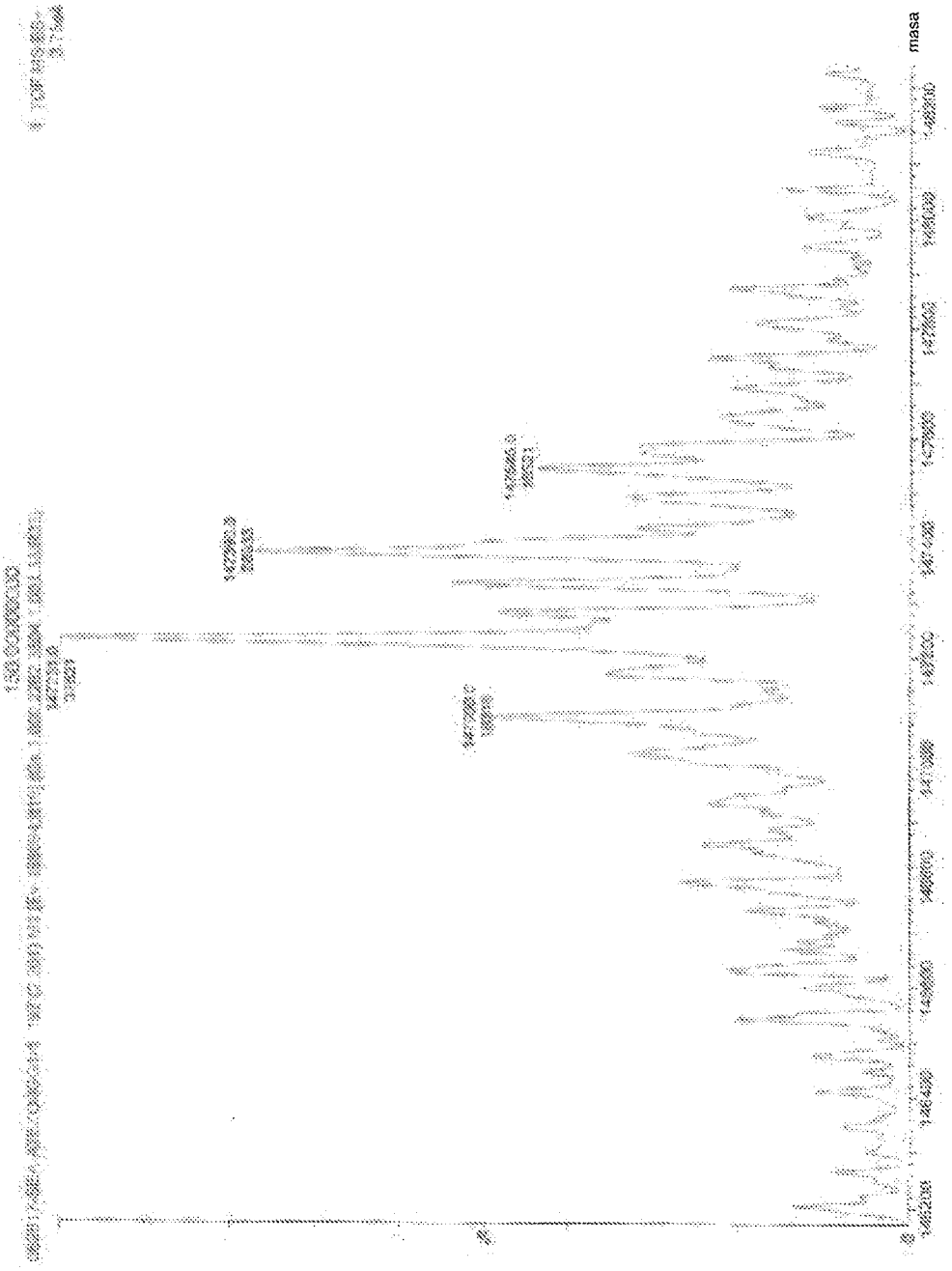


Fig. 96A

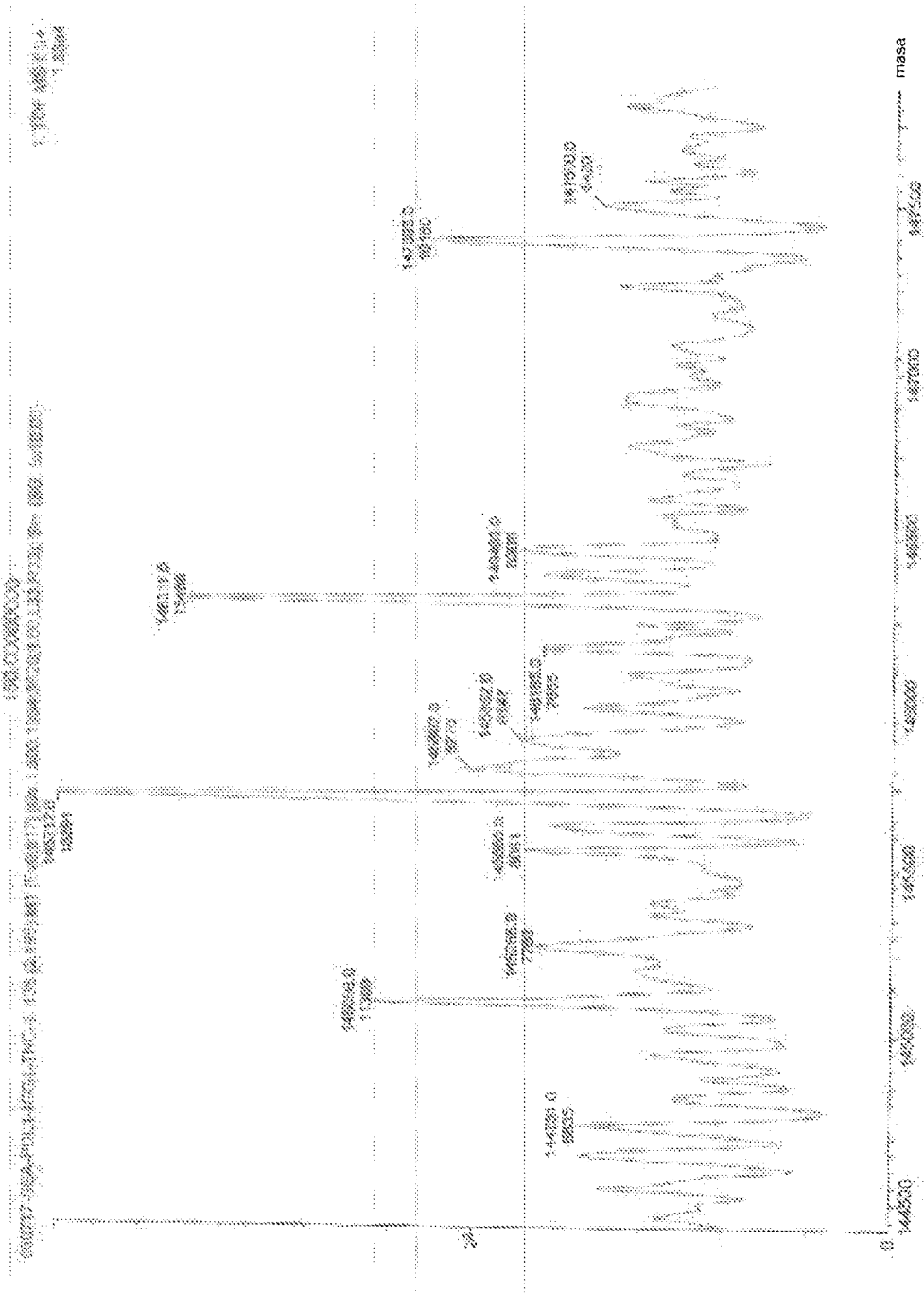


Fig. 96B

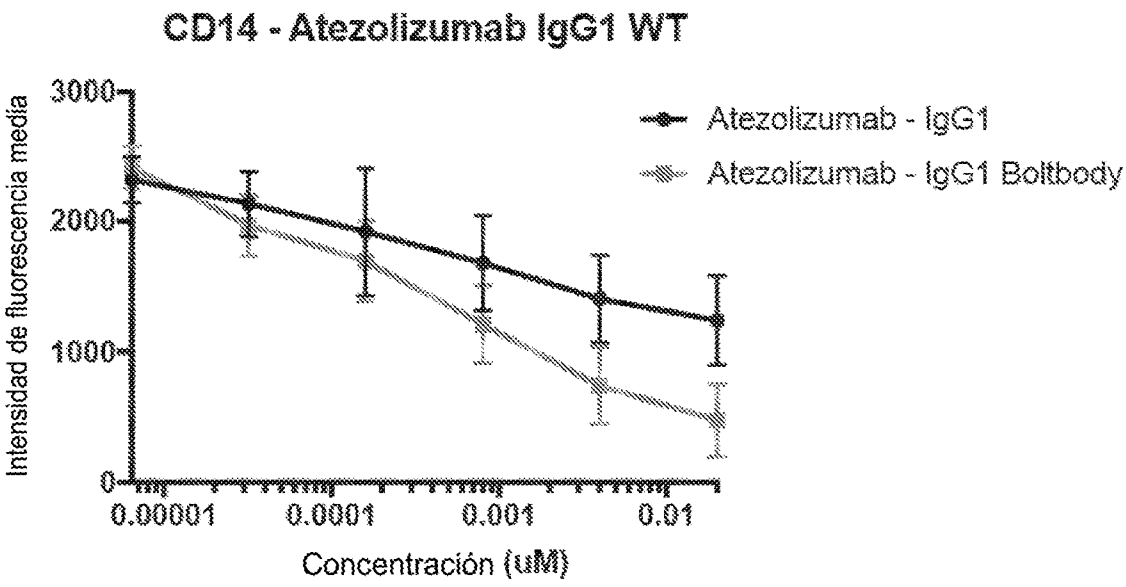


Fig. 96C

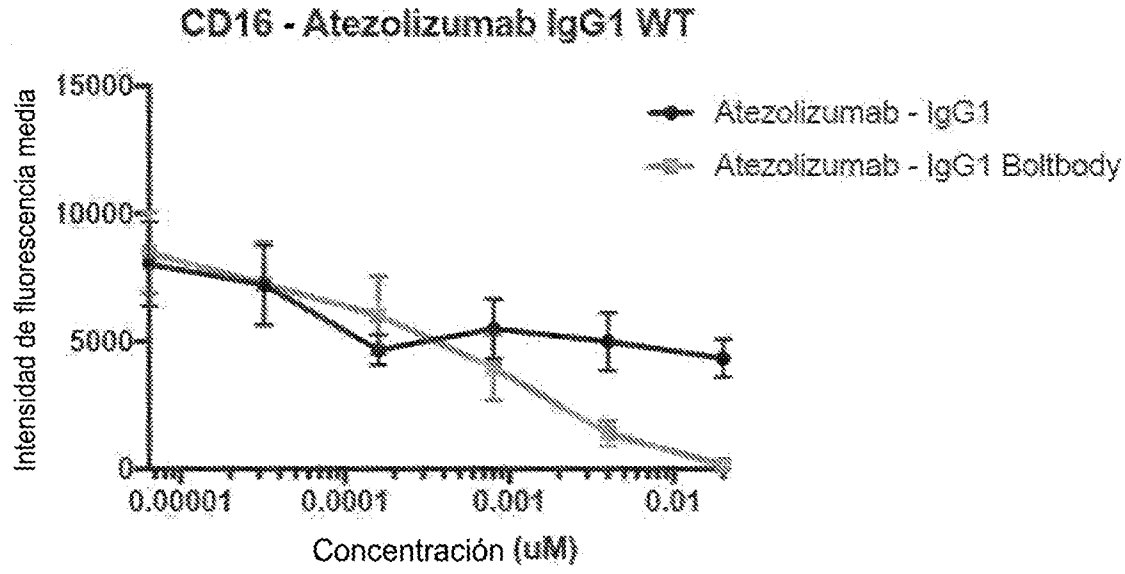


Fig. 96D

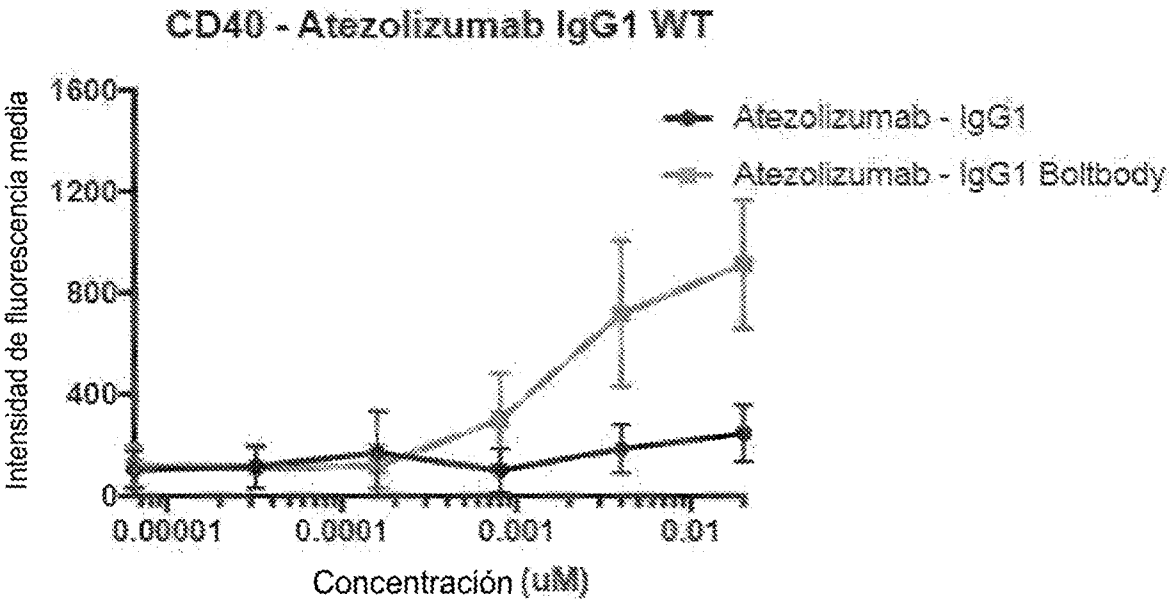


Fig. 96E

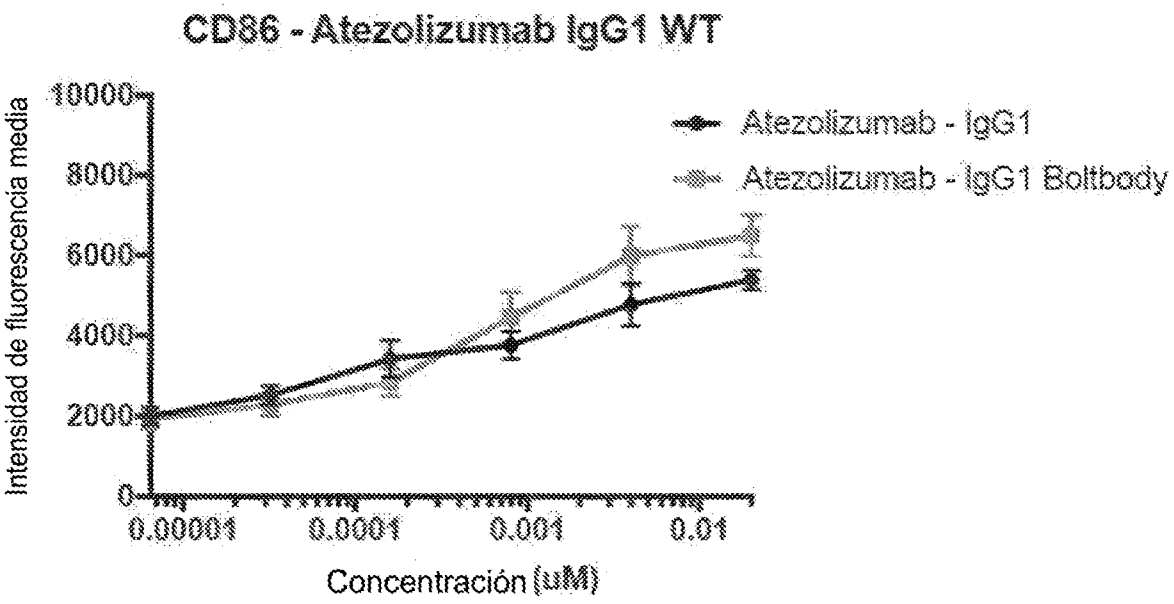


Fig. 96F

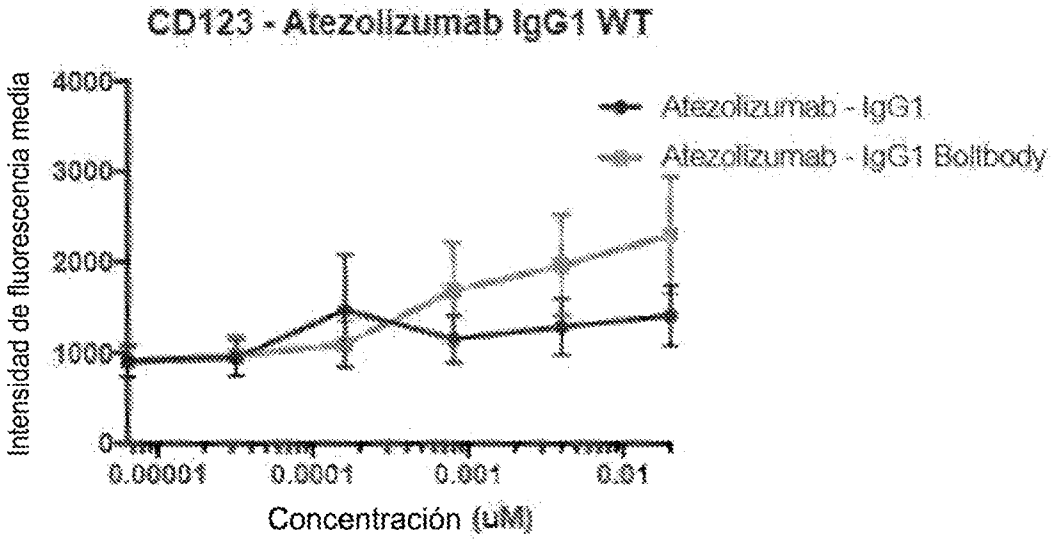


Fig. 96G

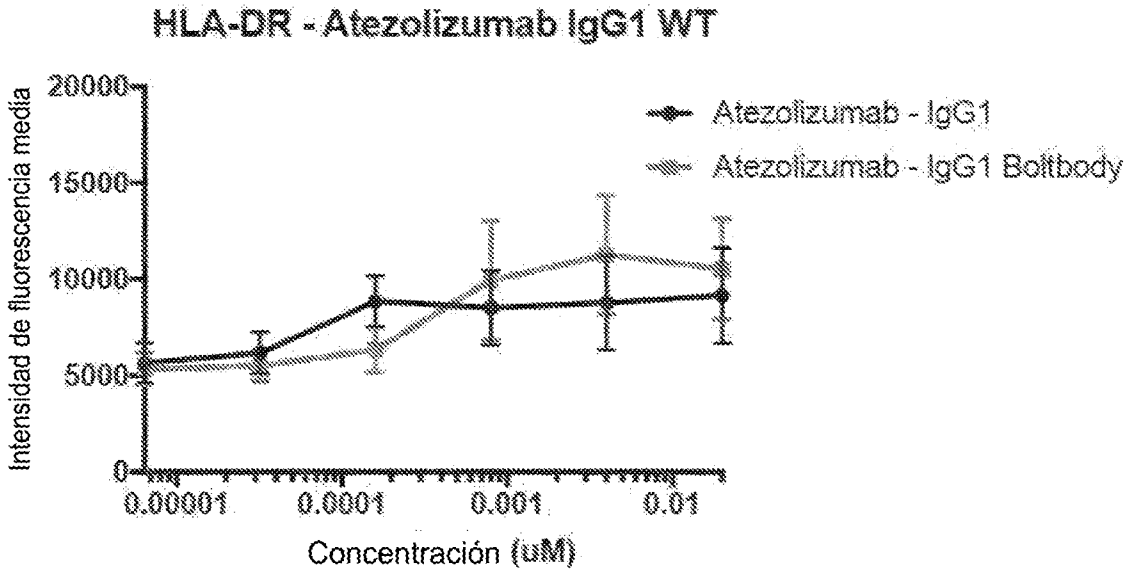


Fig. 96H

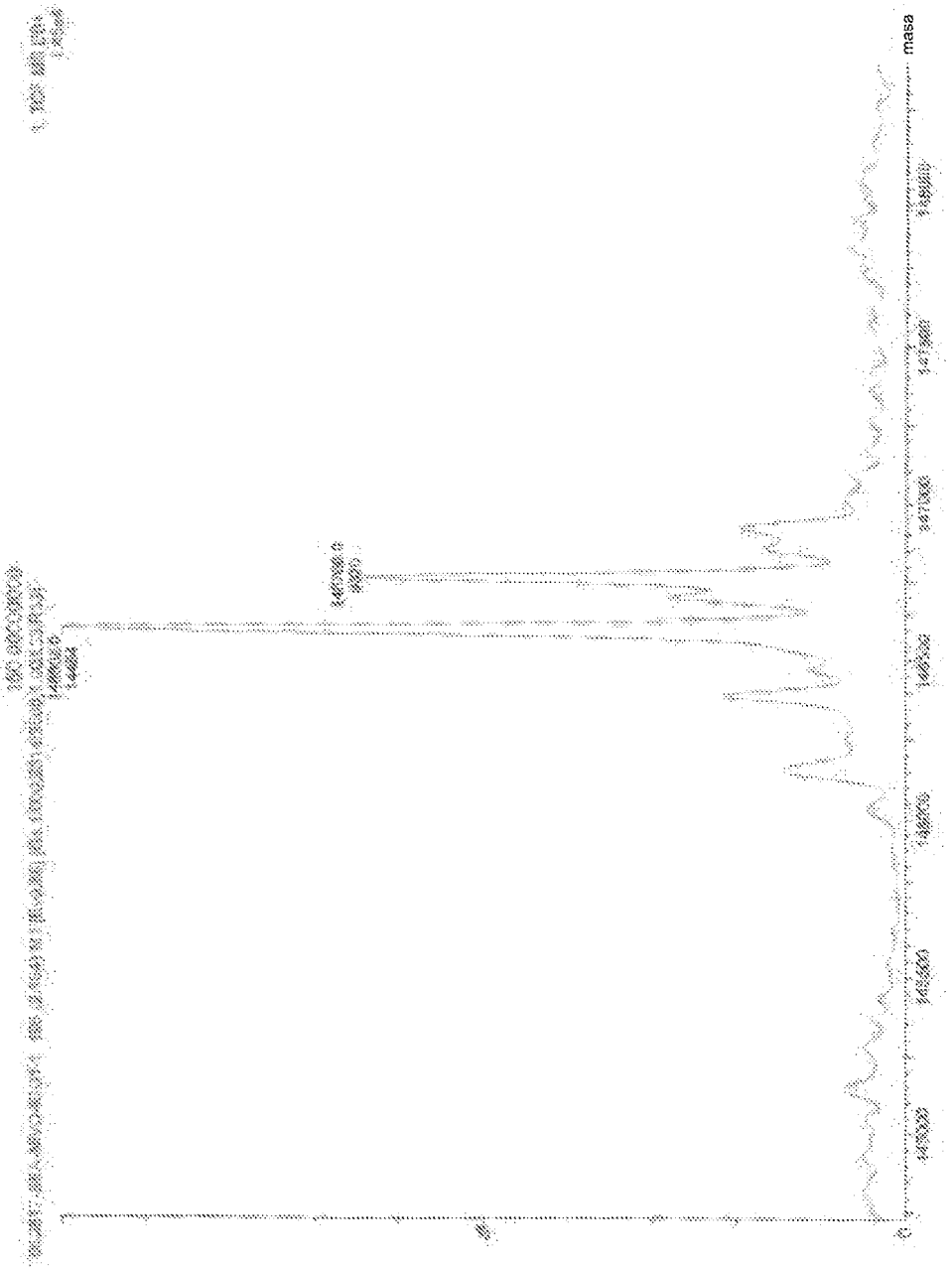


Fig. 97A

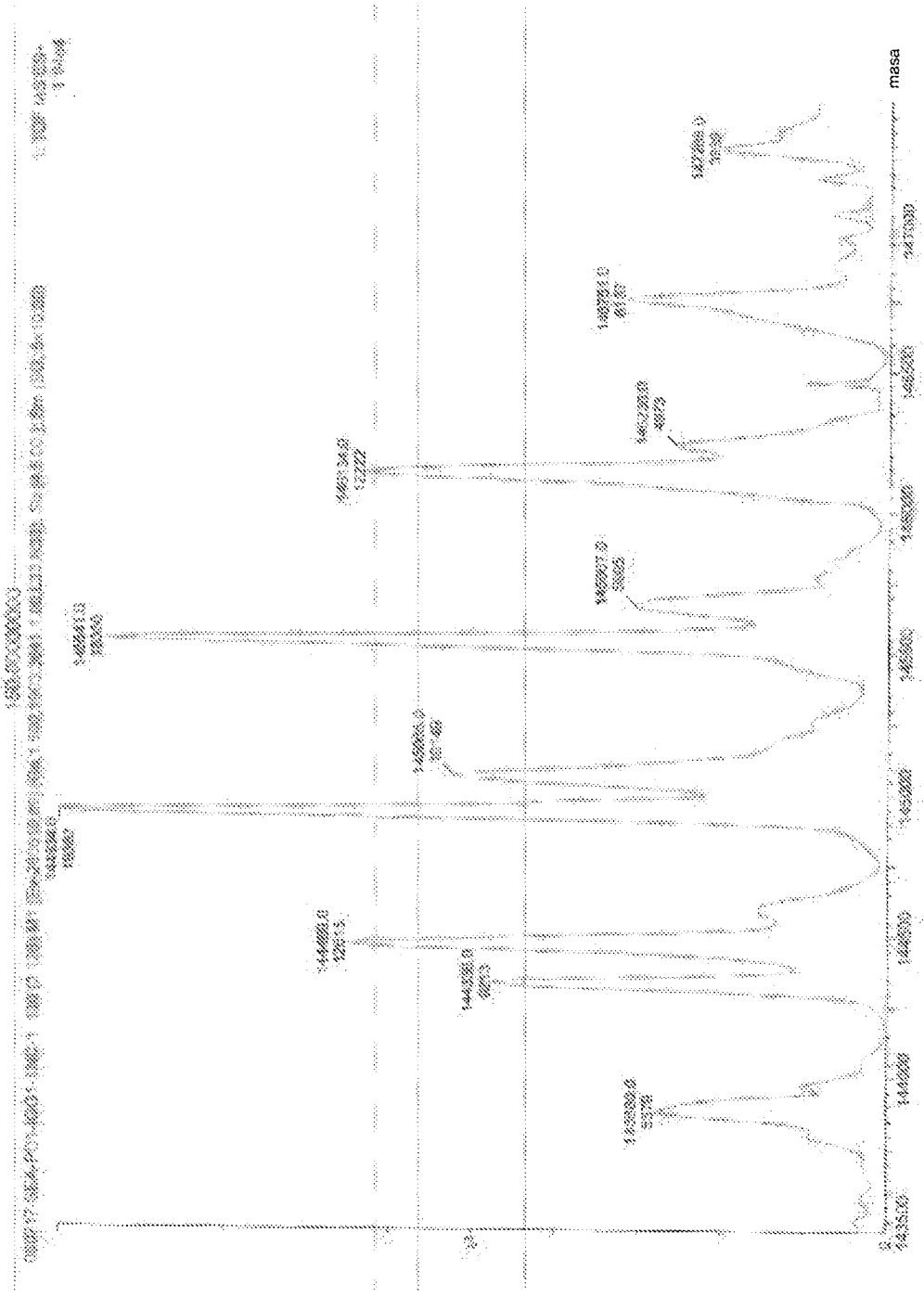


Fig. 97B

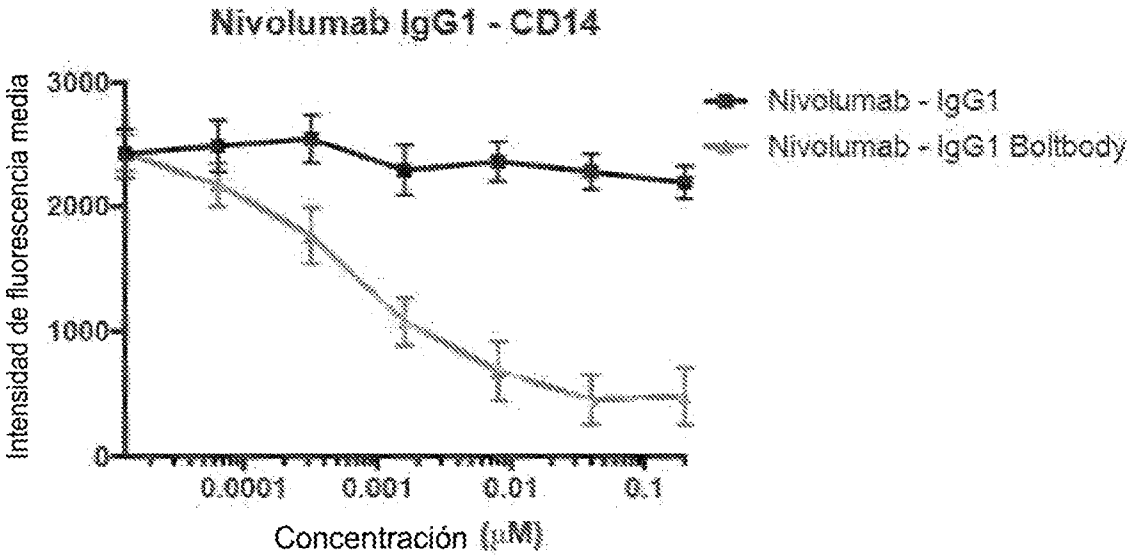


Fig. 97C

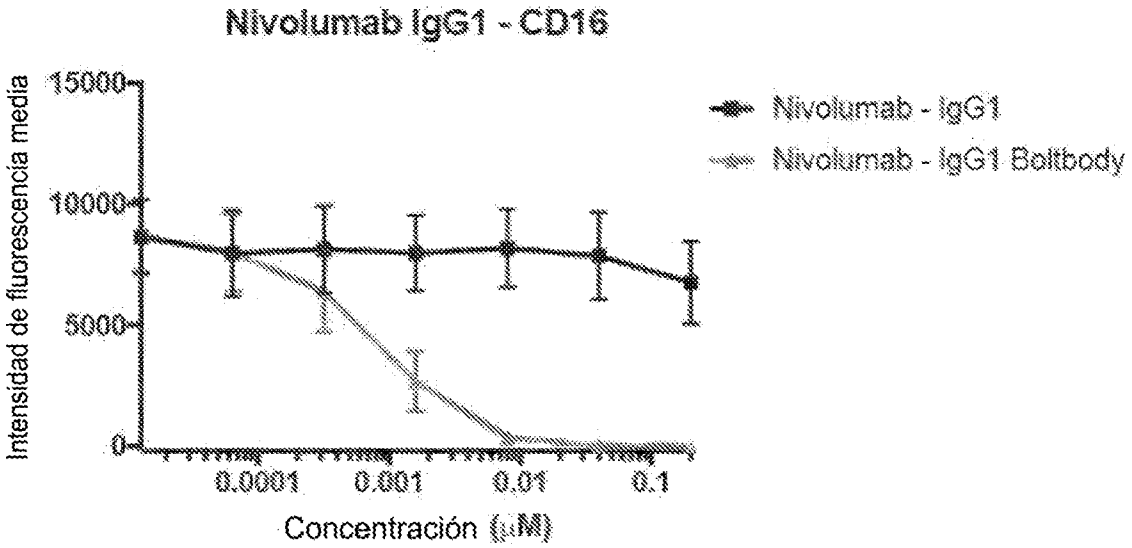


Fig. 97D

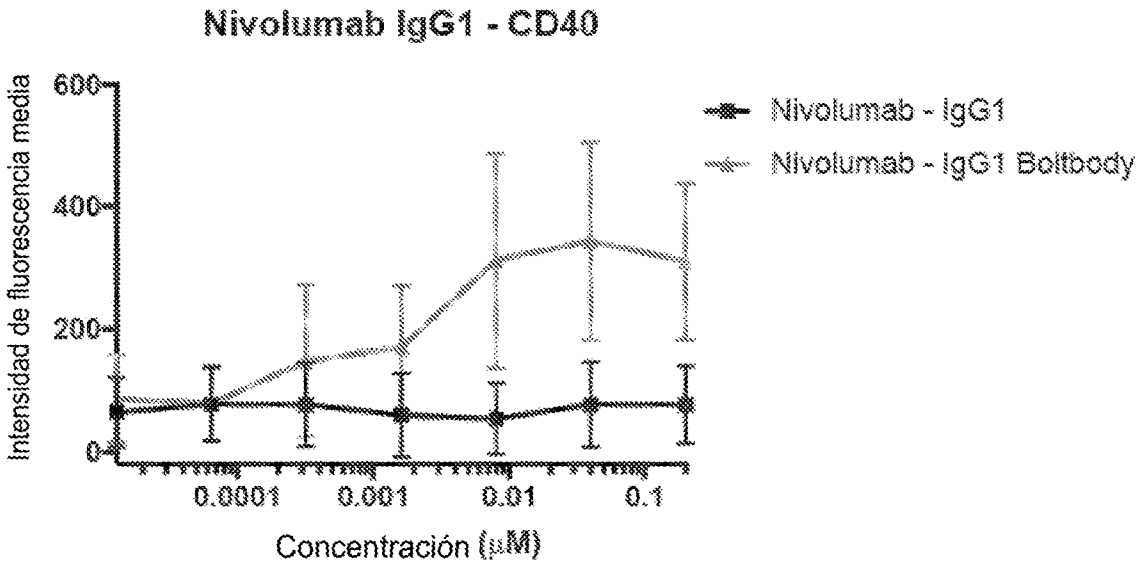


Fig. 97E

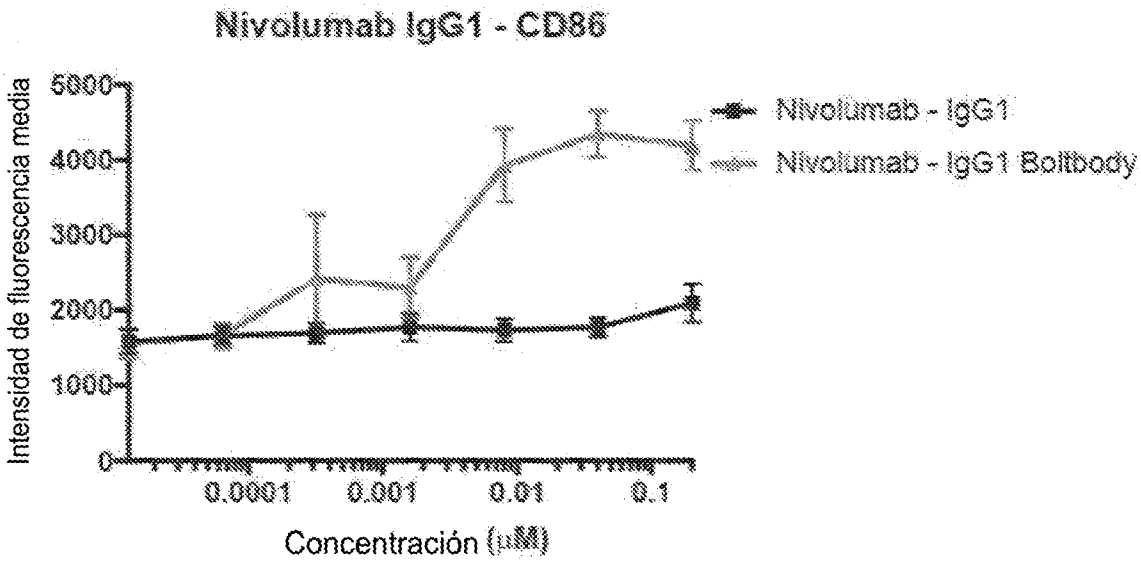


Fig. 97F

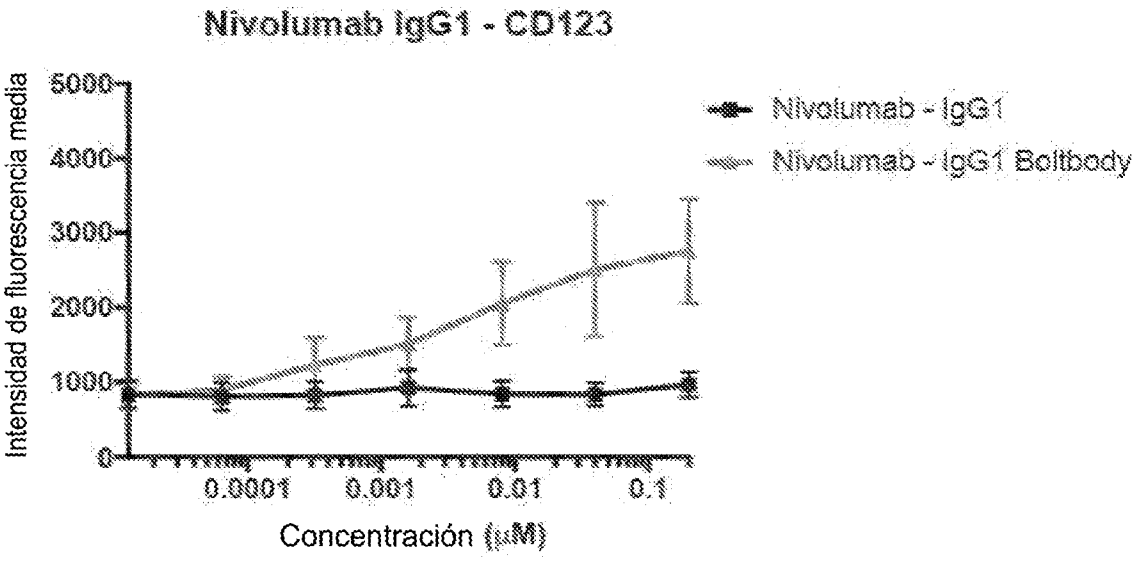


Fig. 97G

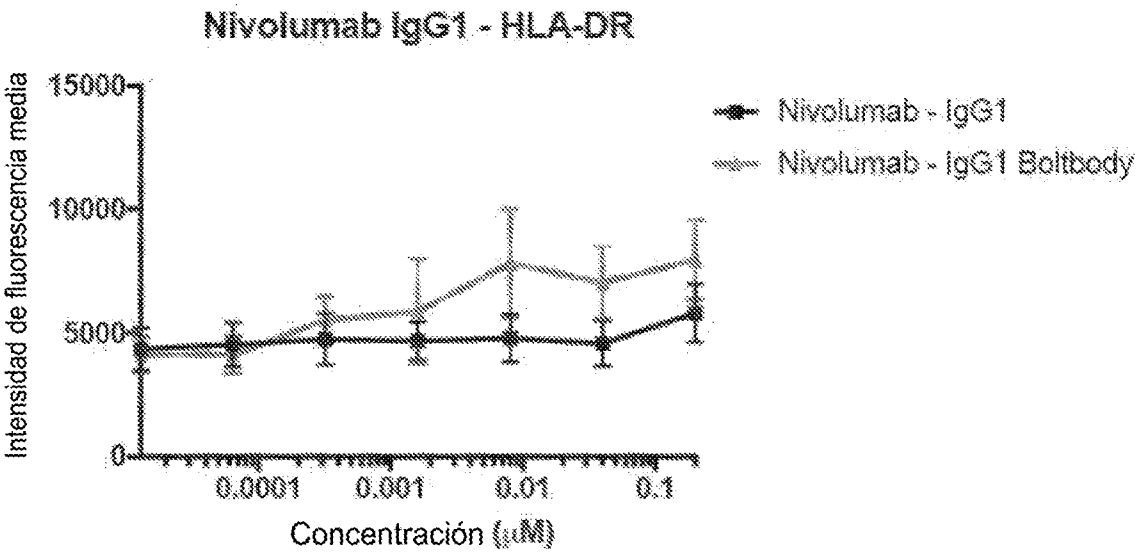


Fig. 97H

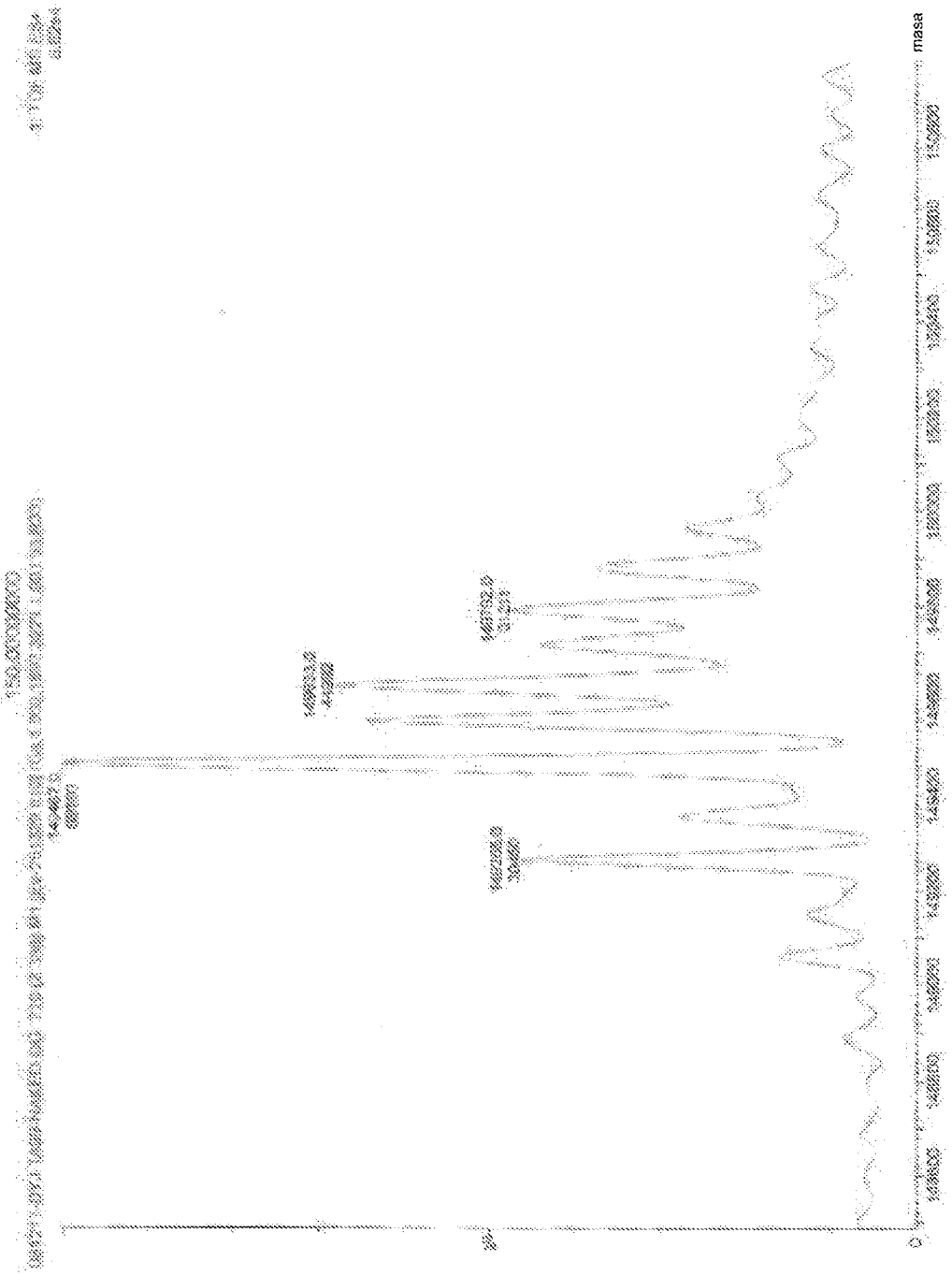


Fig. 98A

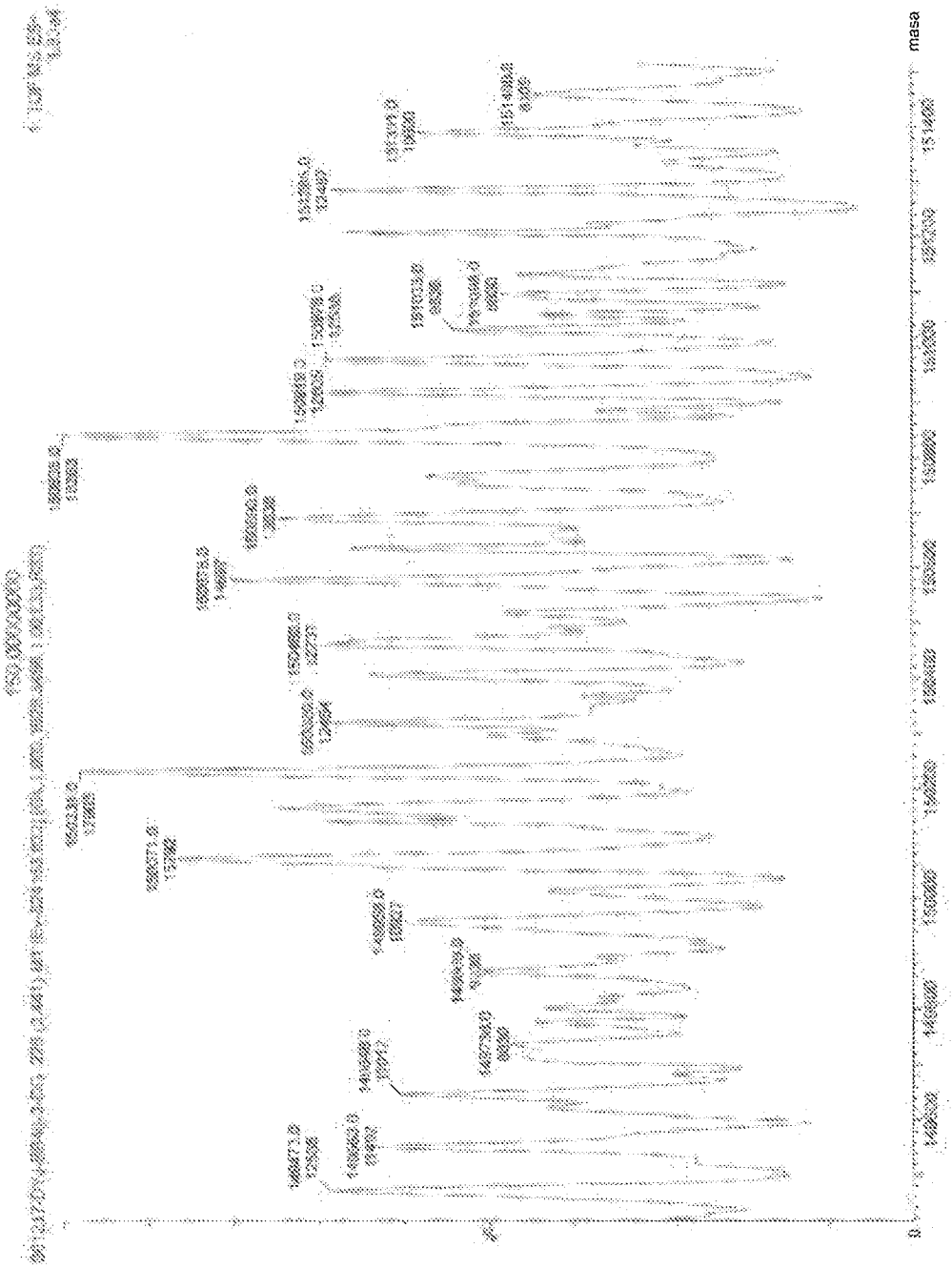


Fig. 98B

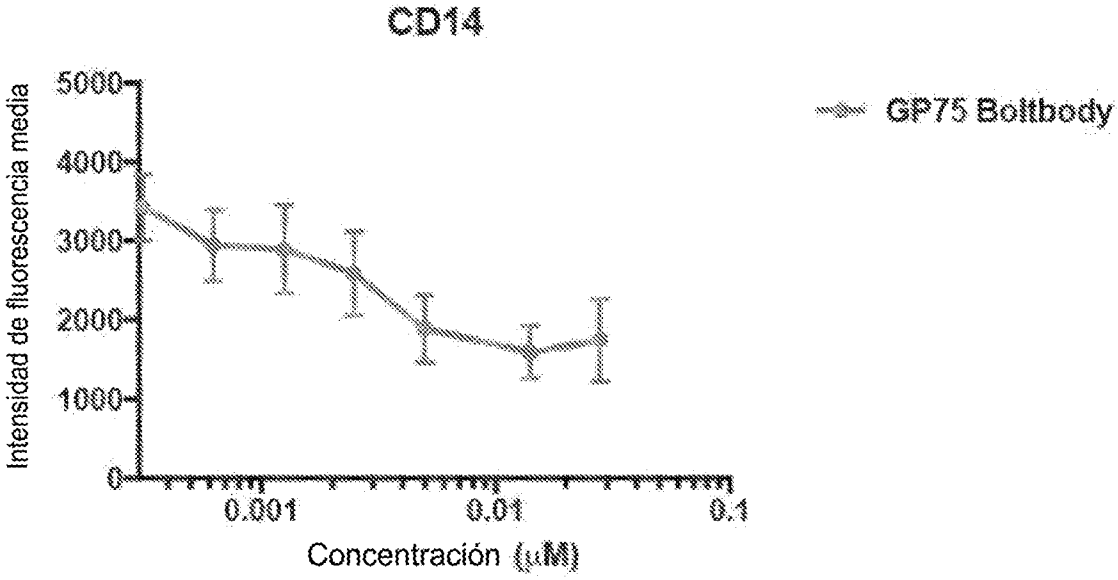


Fig. 98C

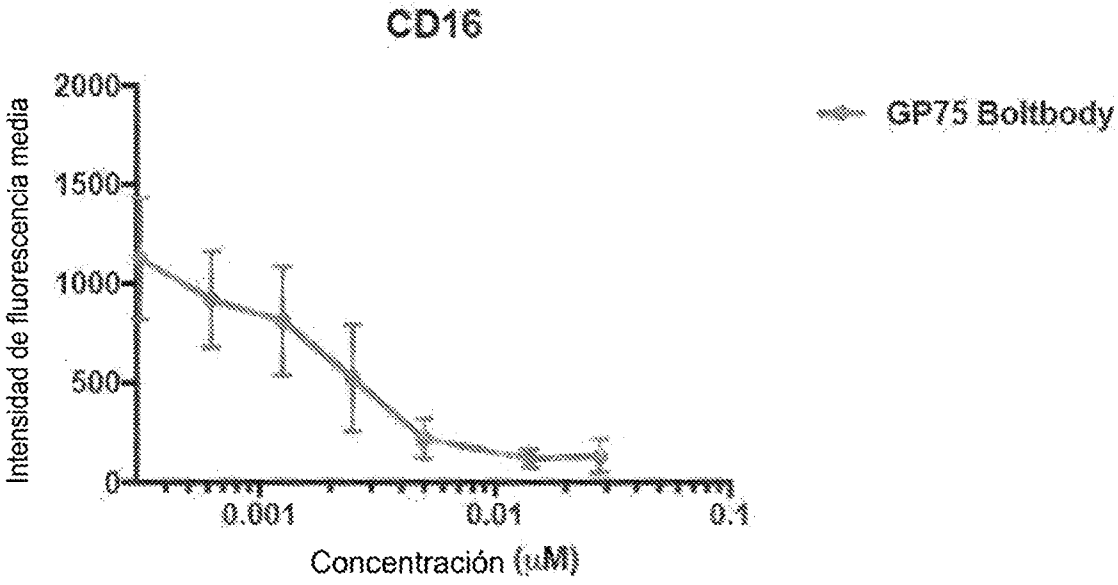


Fig. 98D

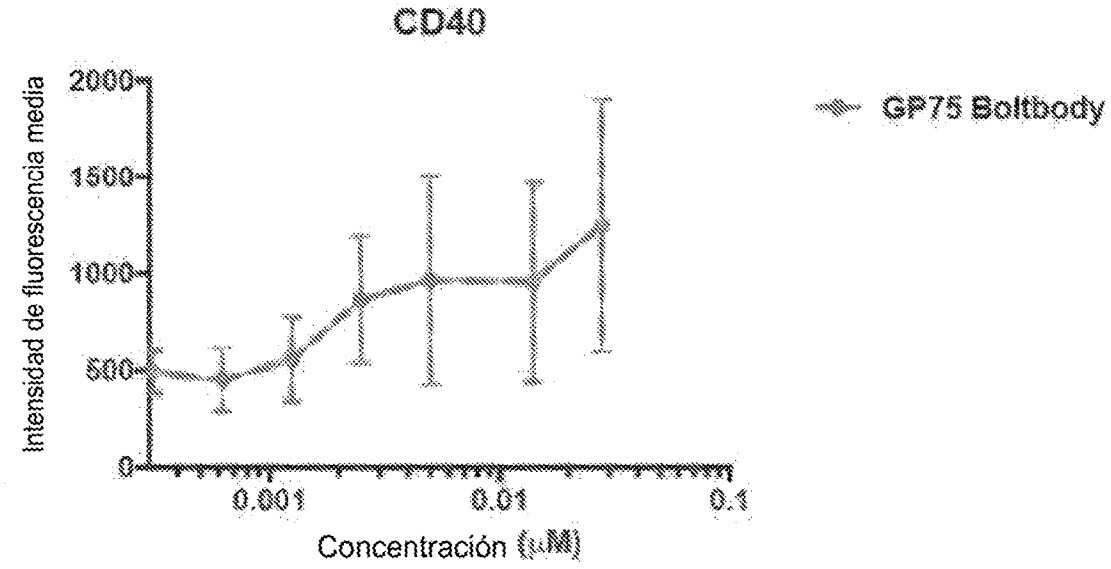


Fig. 98E

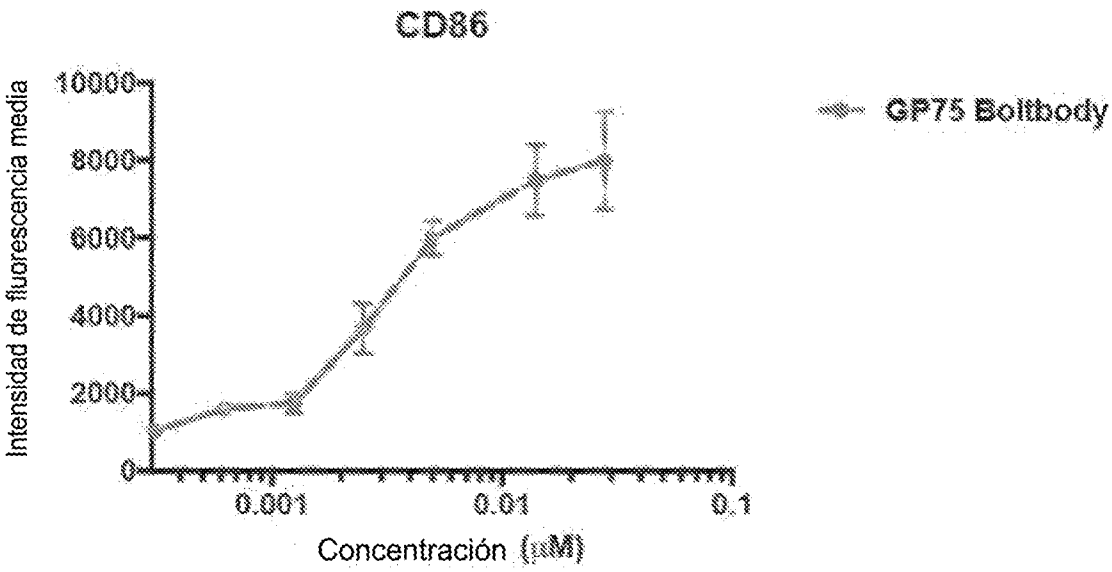


Fig. 98F

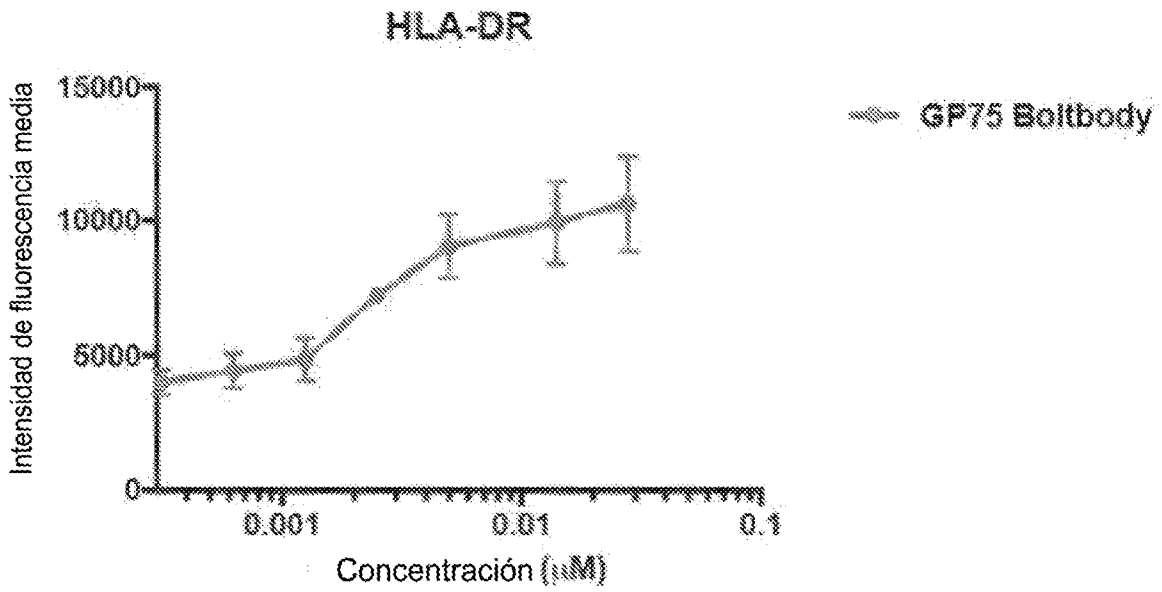

HLA-DR
Intensidad de fluorescencia media
15000
10000
5000
0
0.001
0.01
0.1
Concentración (μM)
GP75 Boltbody

Fig. 98G

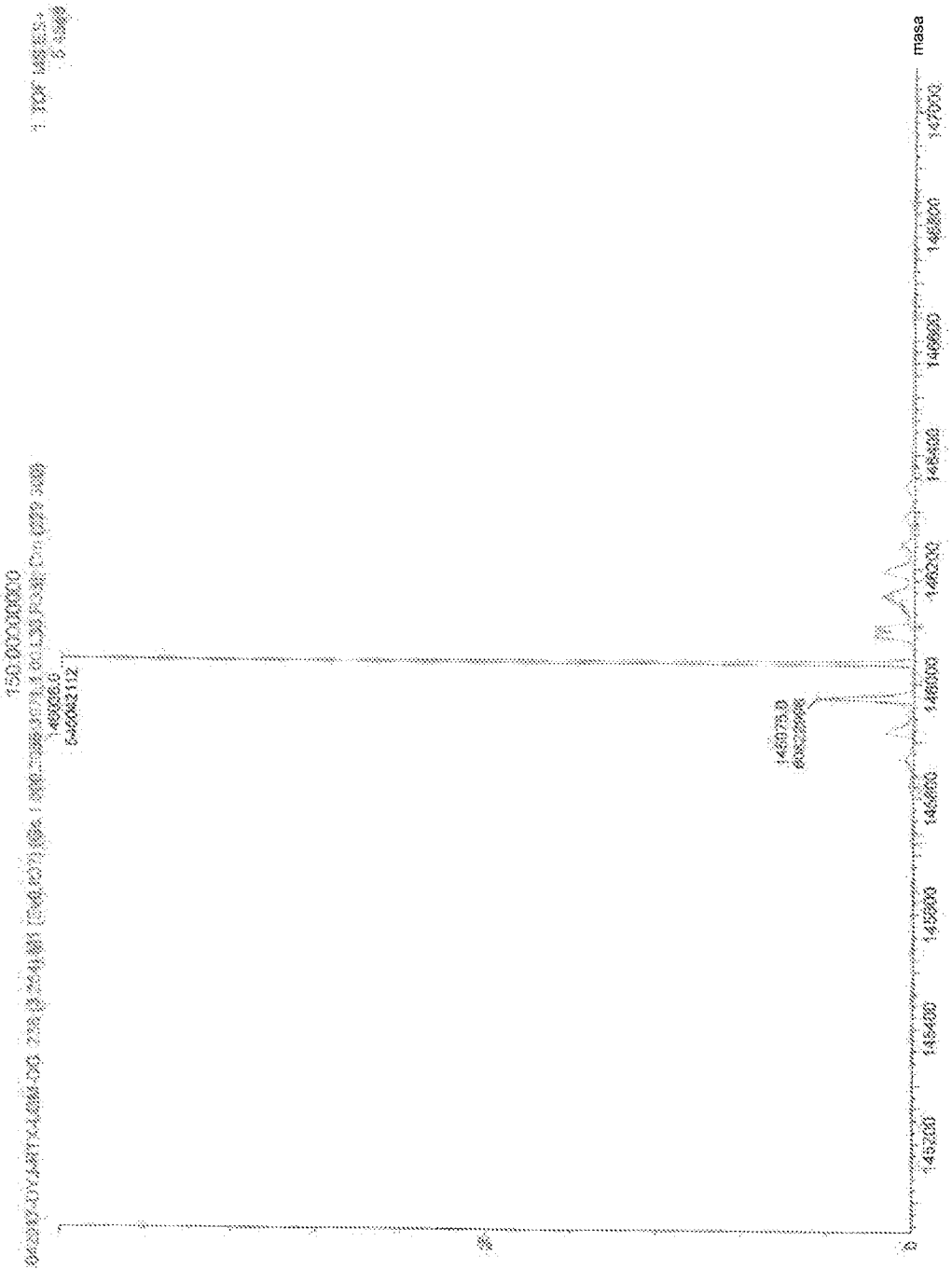


Fig. 99A

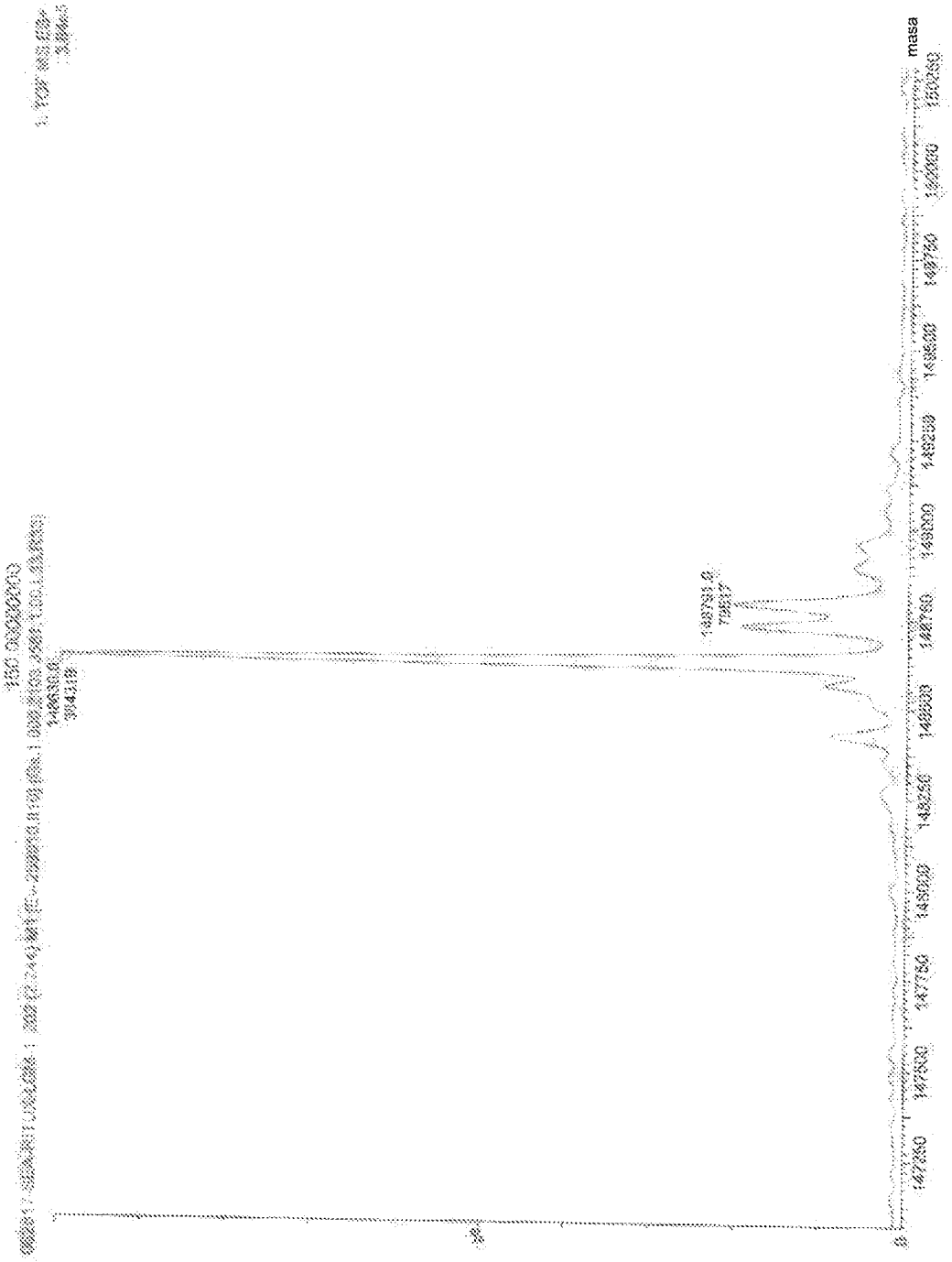


Fig. 99B

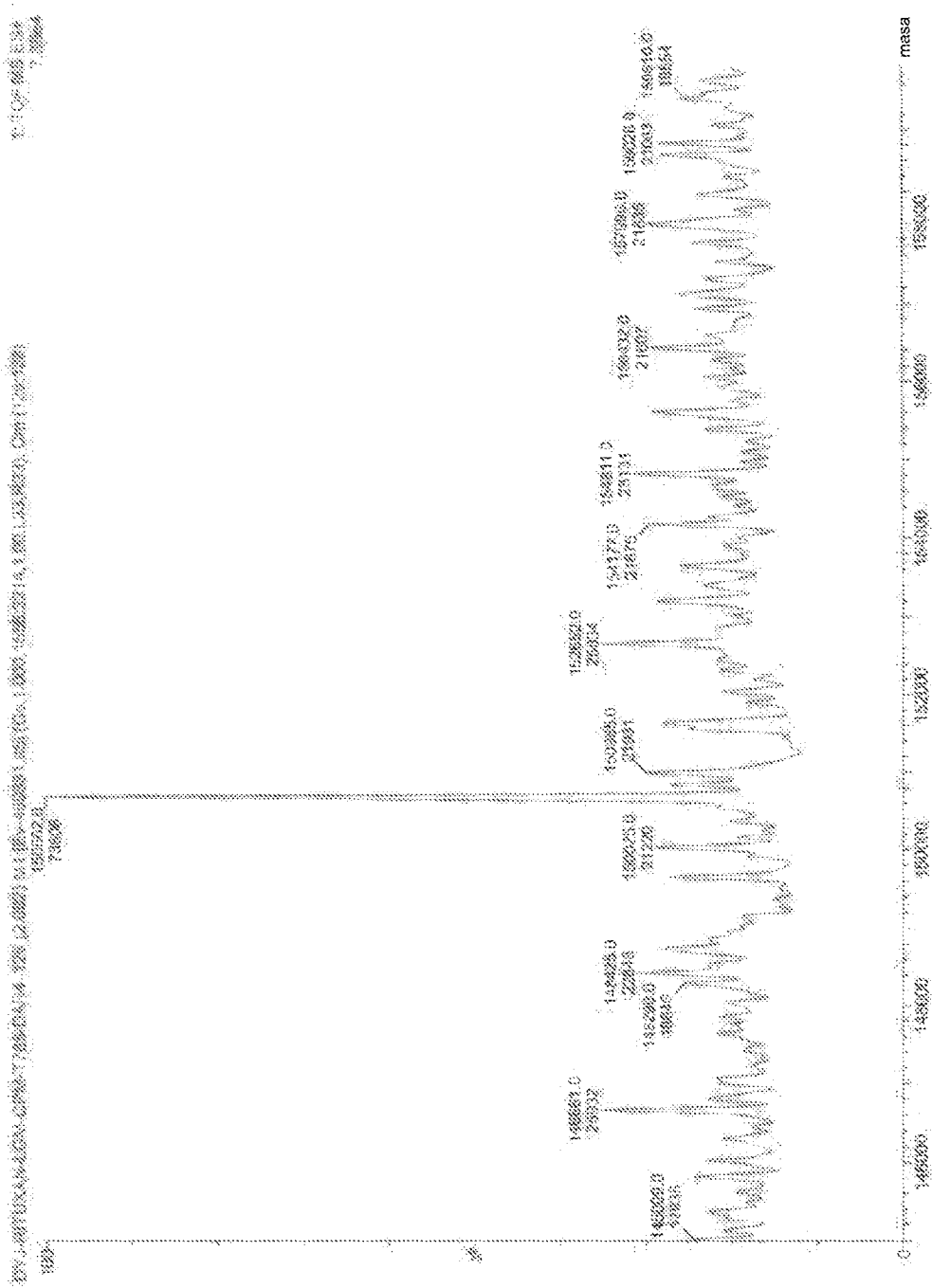


Fig. 99C

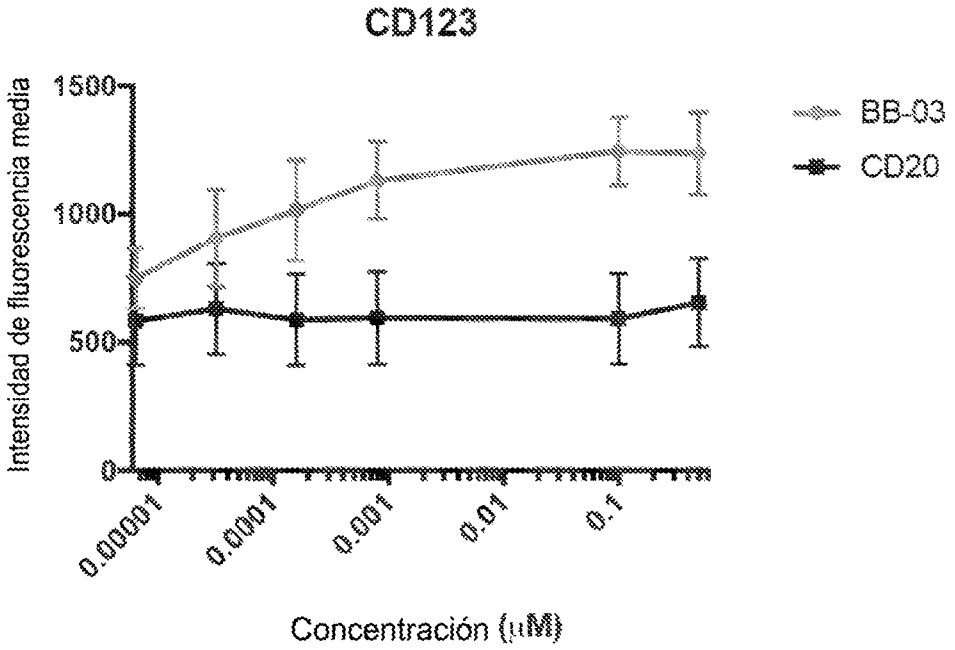


Fig. 99D

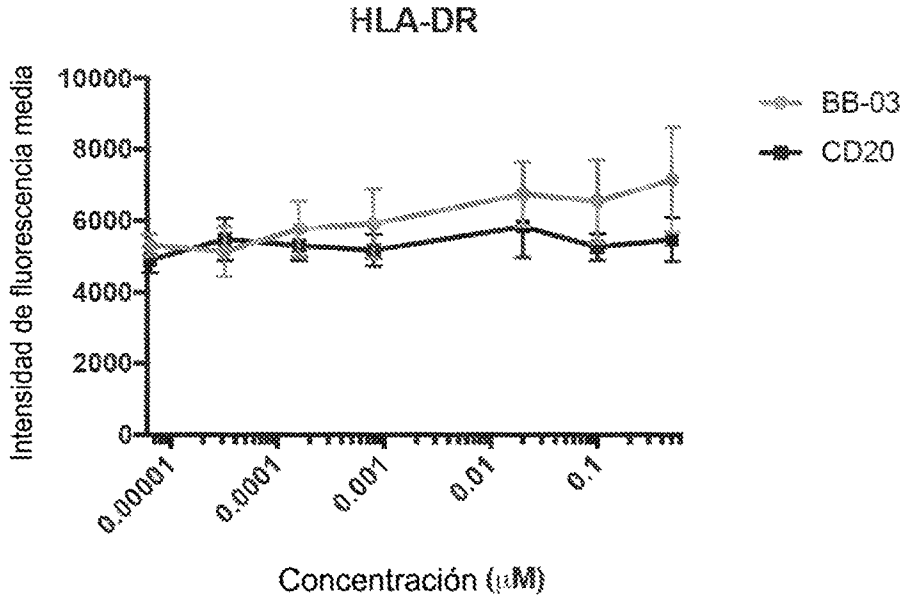


Fig. 99E

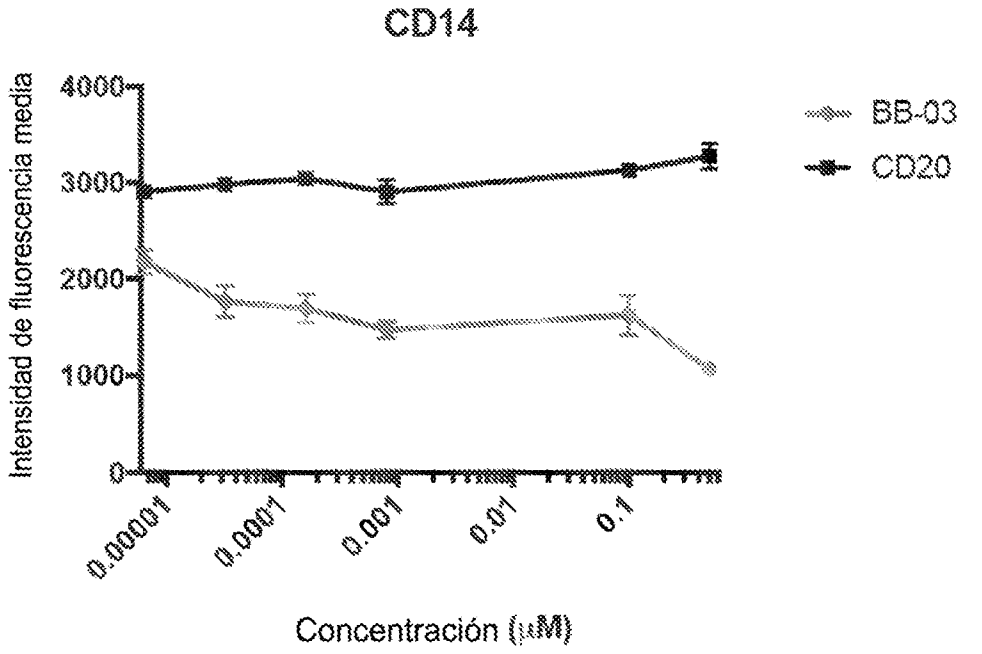


Fig. 99F

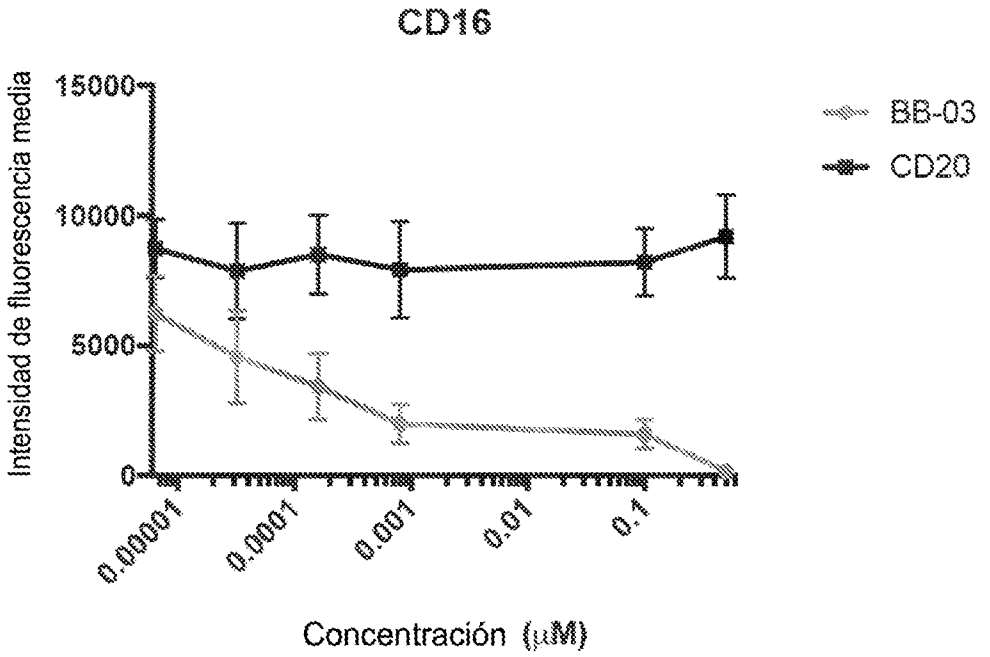


Fig. 99G

464

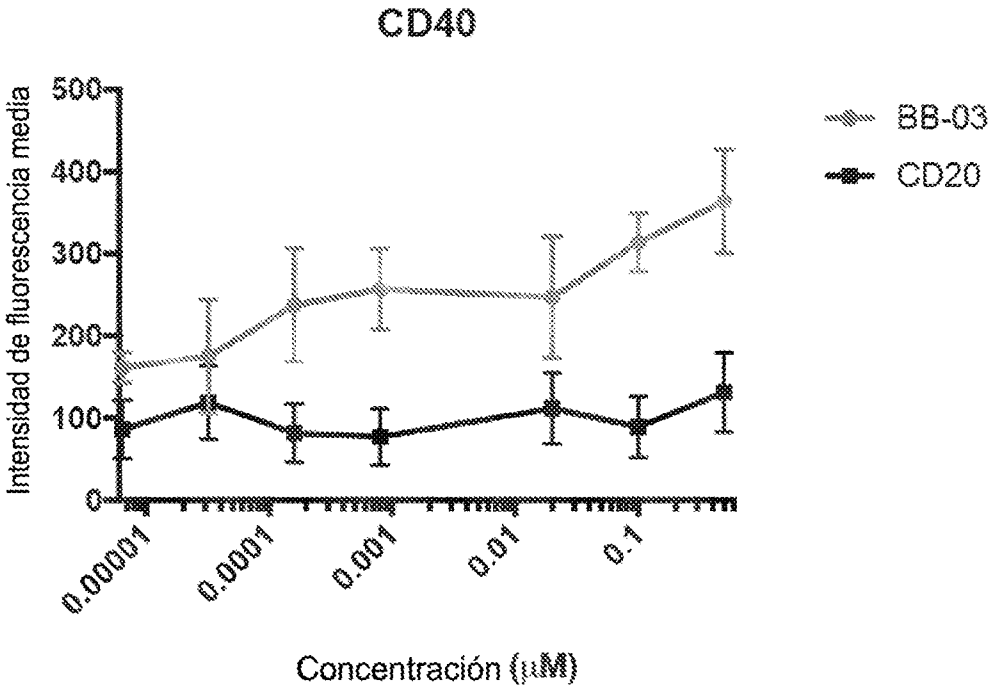


Fig. 99H

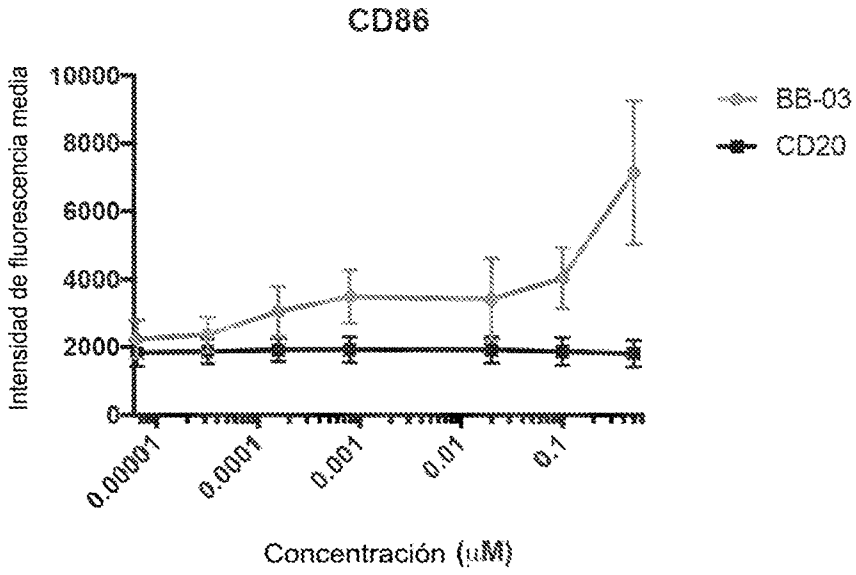


Fig. 99I

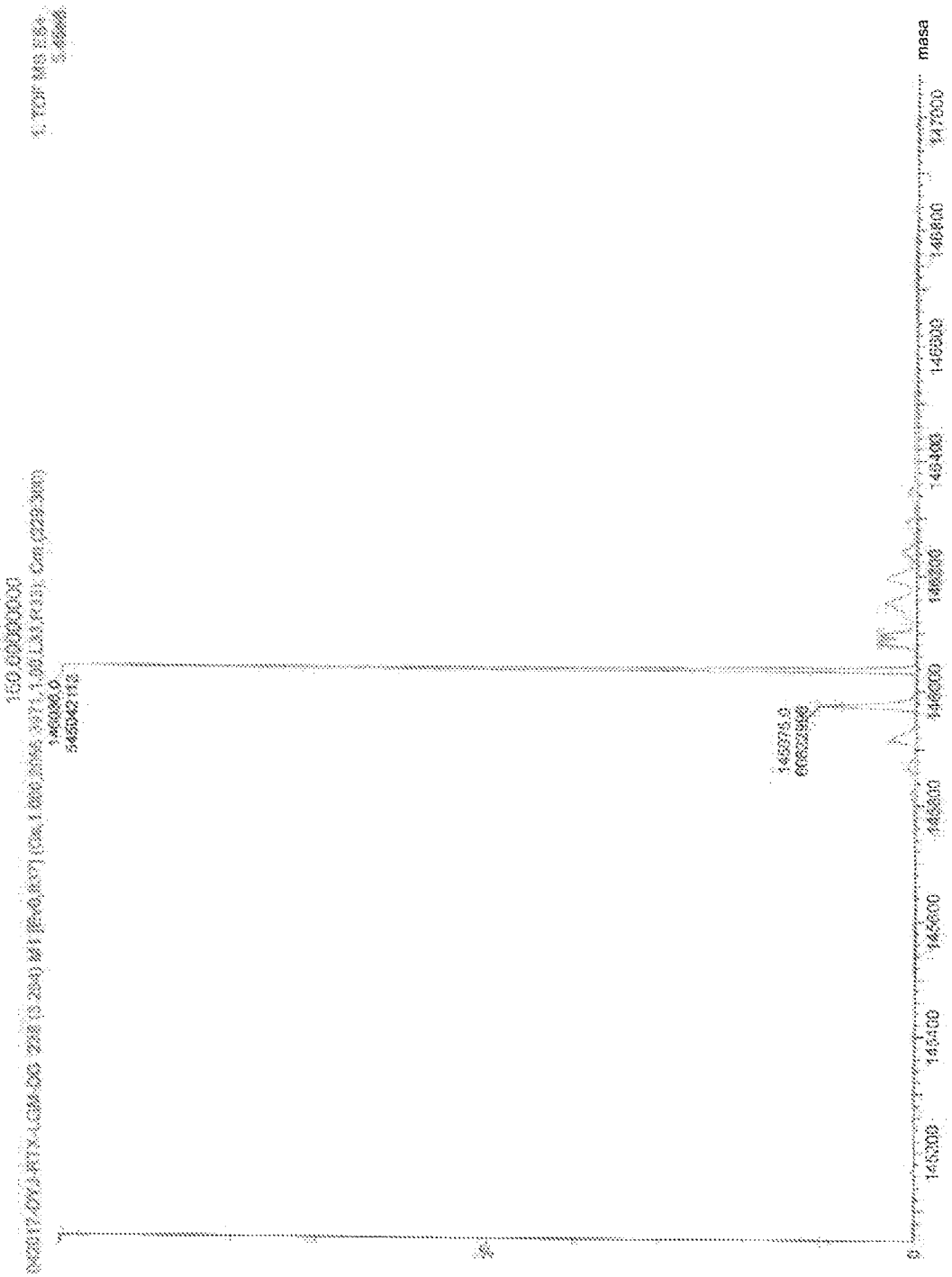


Fig. 100A

BB05-LC/MS

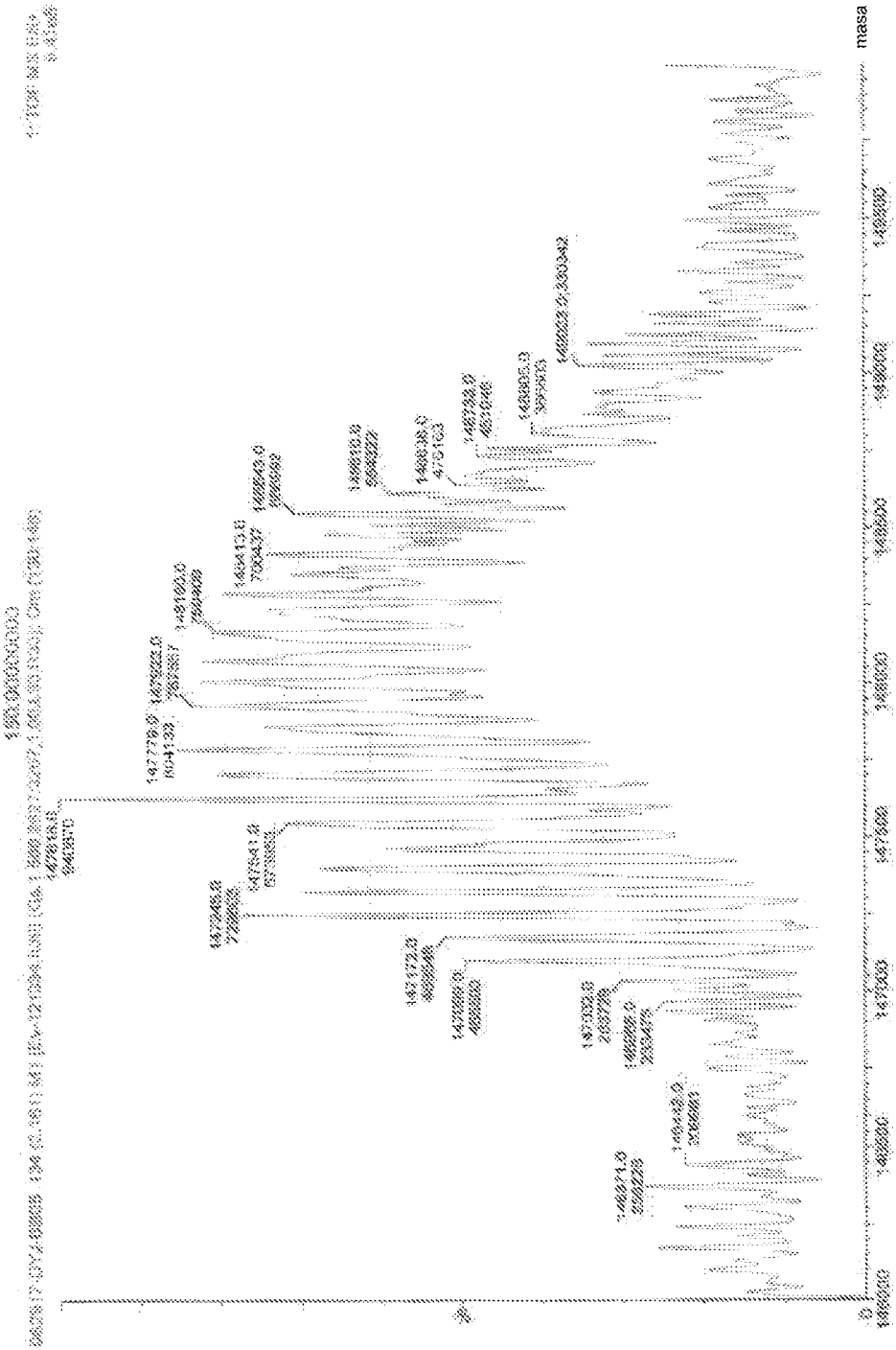


Fig. 100B

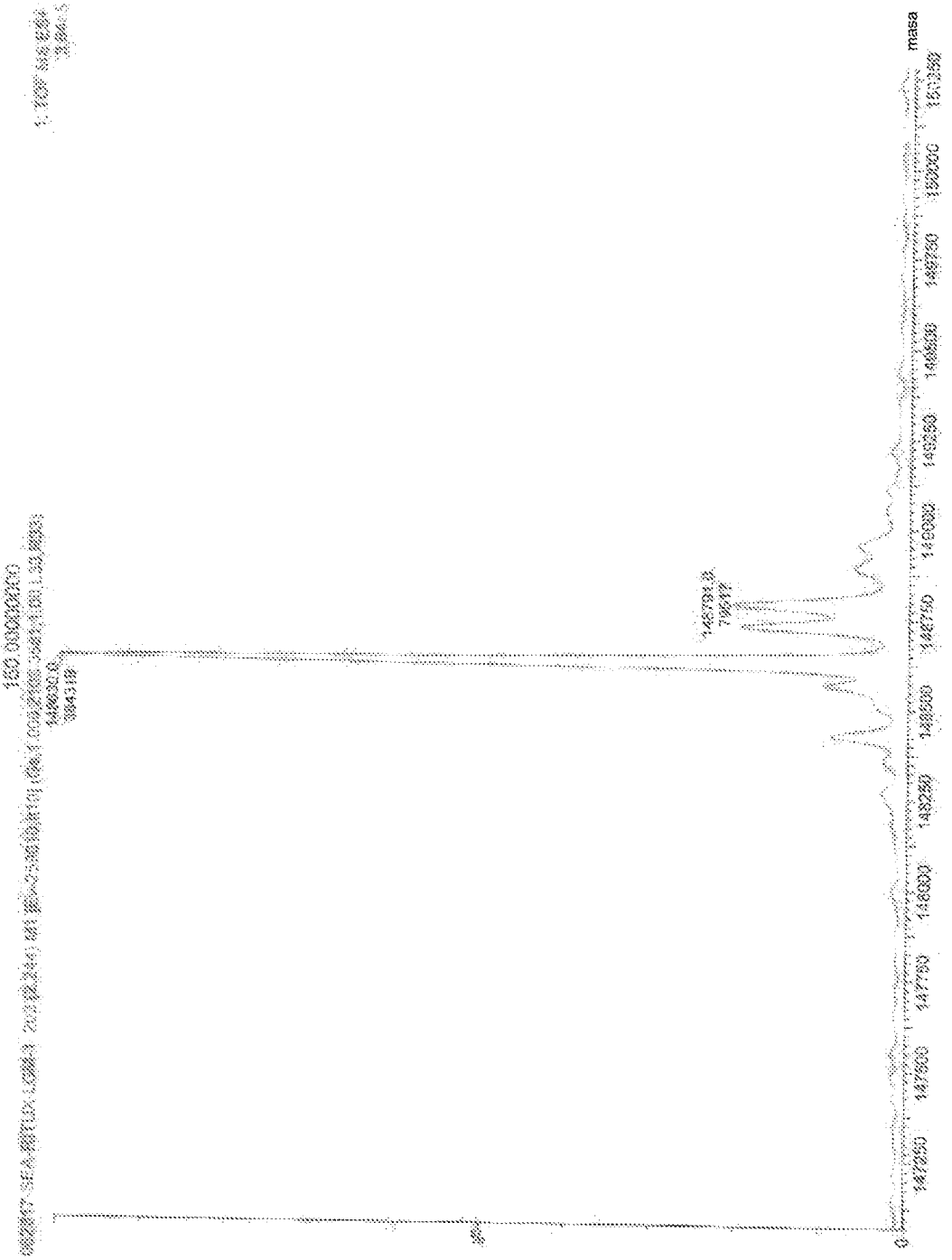


Fig. 100C

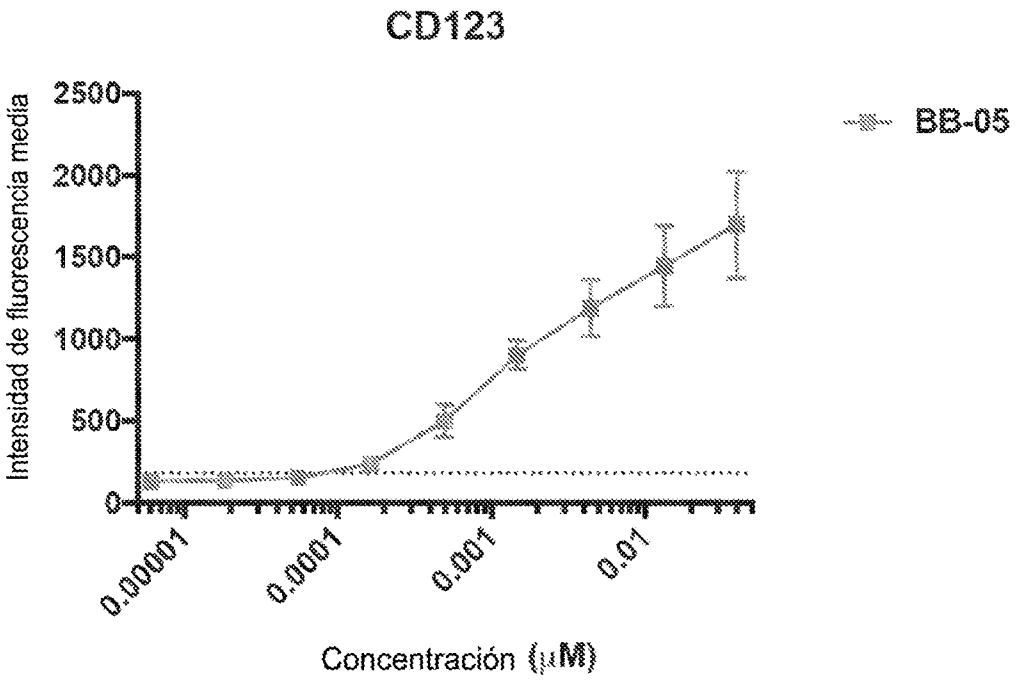


Fig. 100D

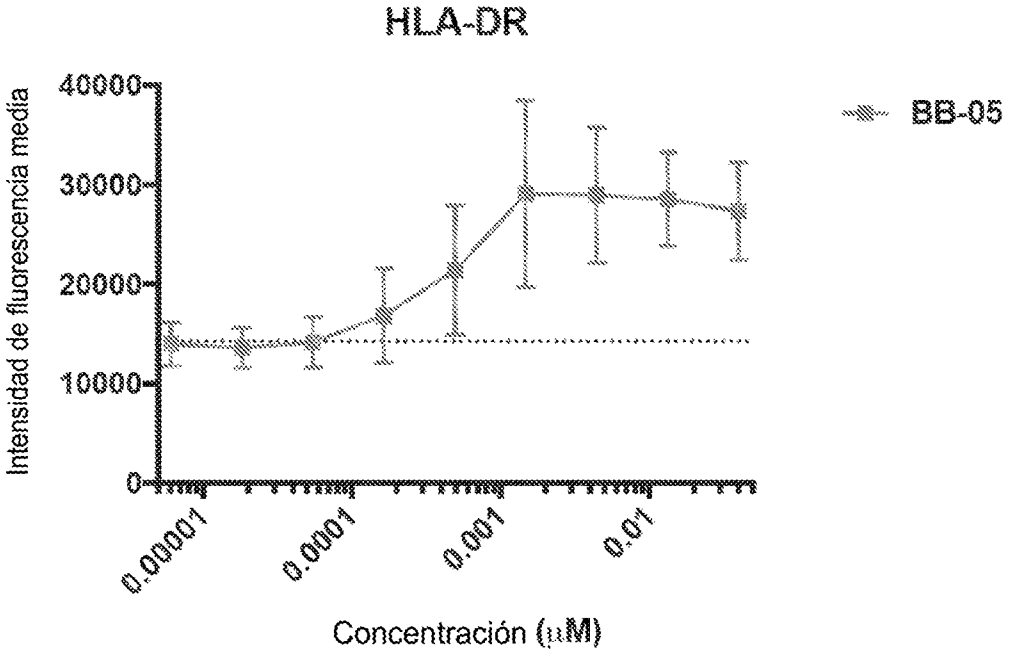


Fig. 100E

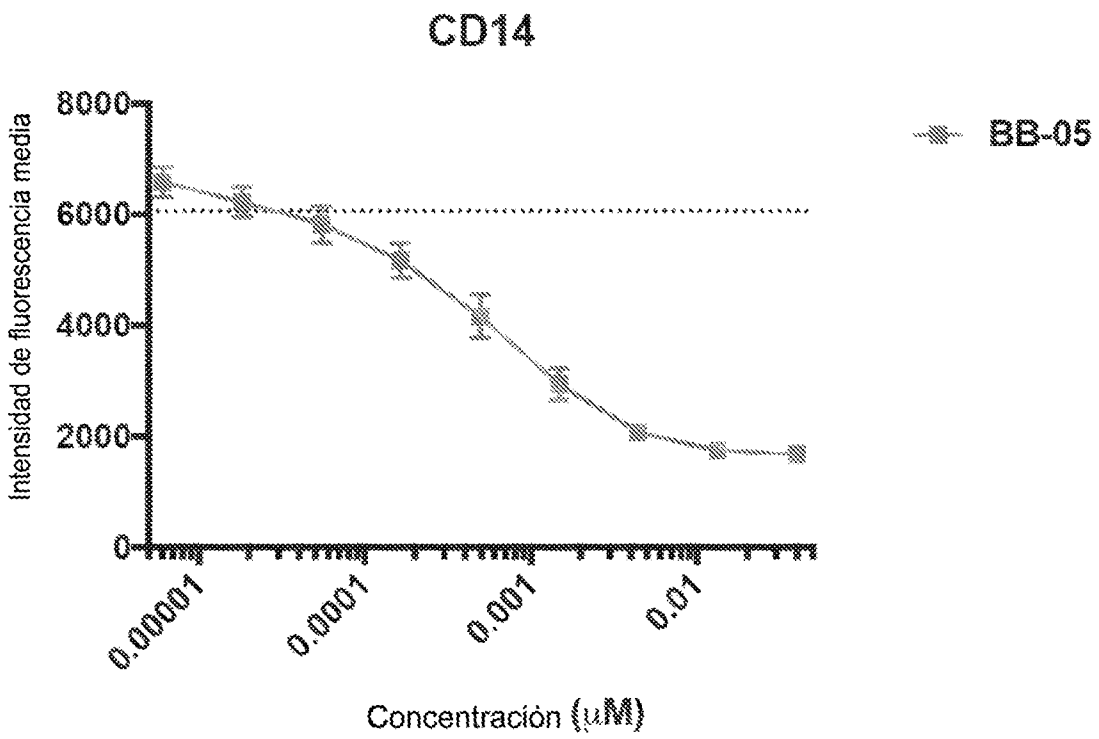


Fig. 100F

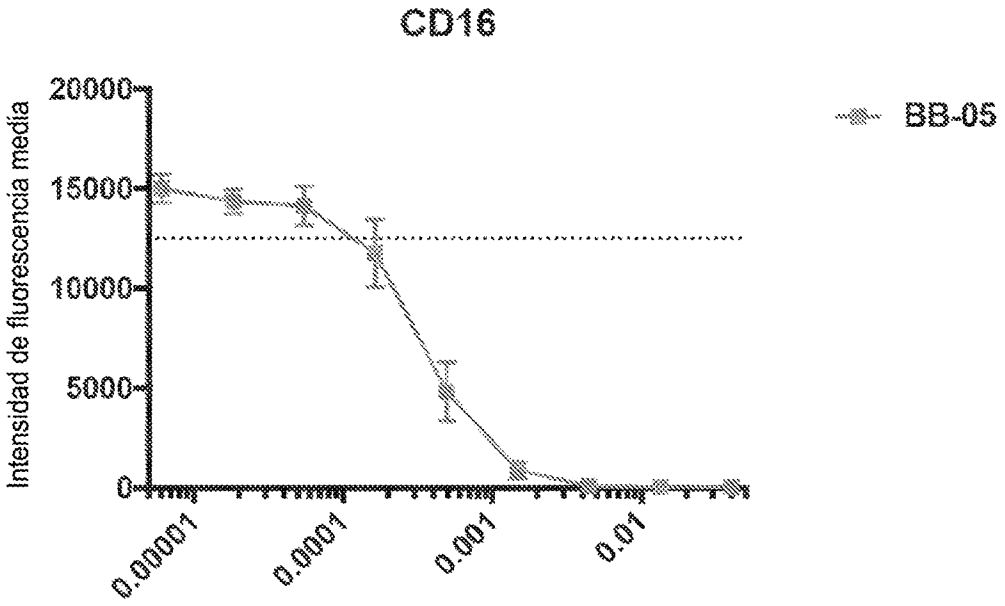


Fig. 100G

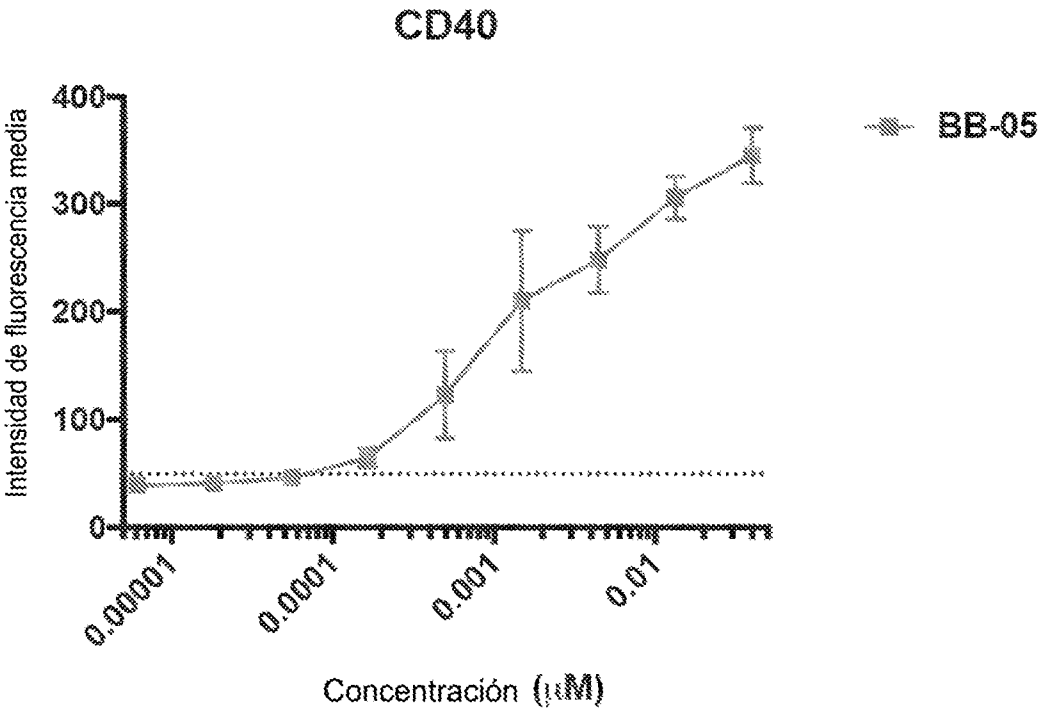


Fig. 100H

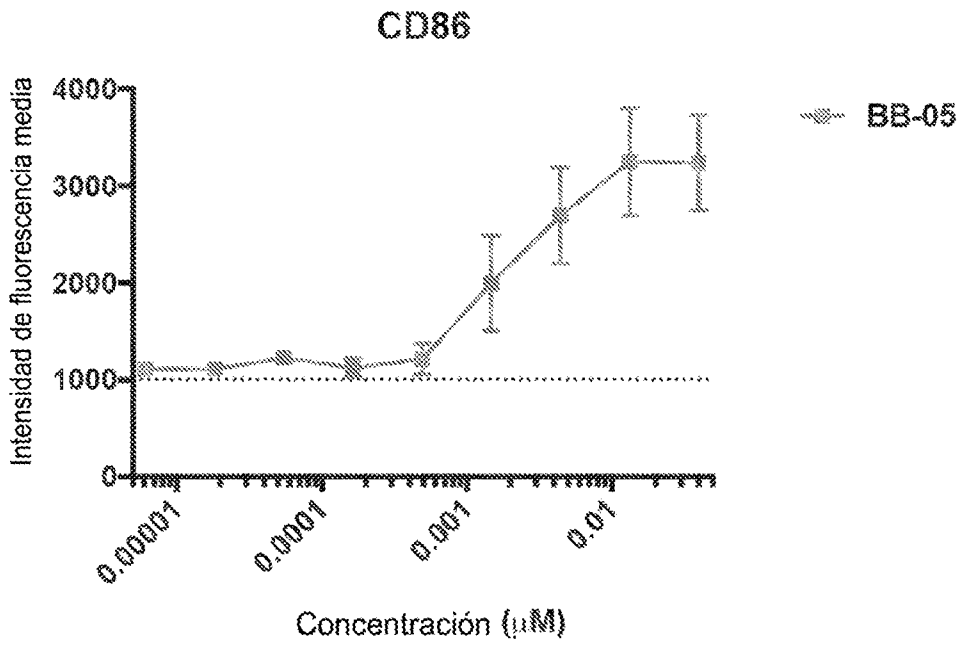


Fig. 100I

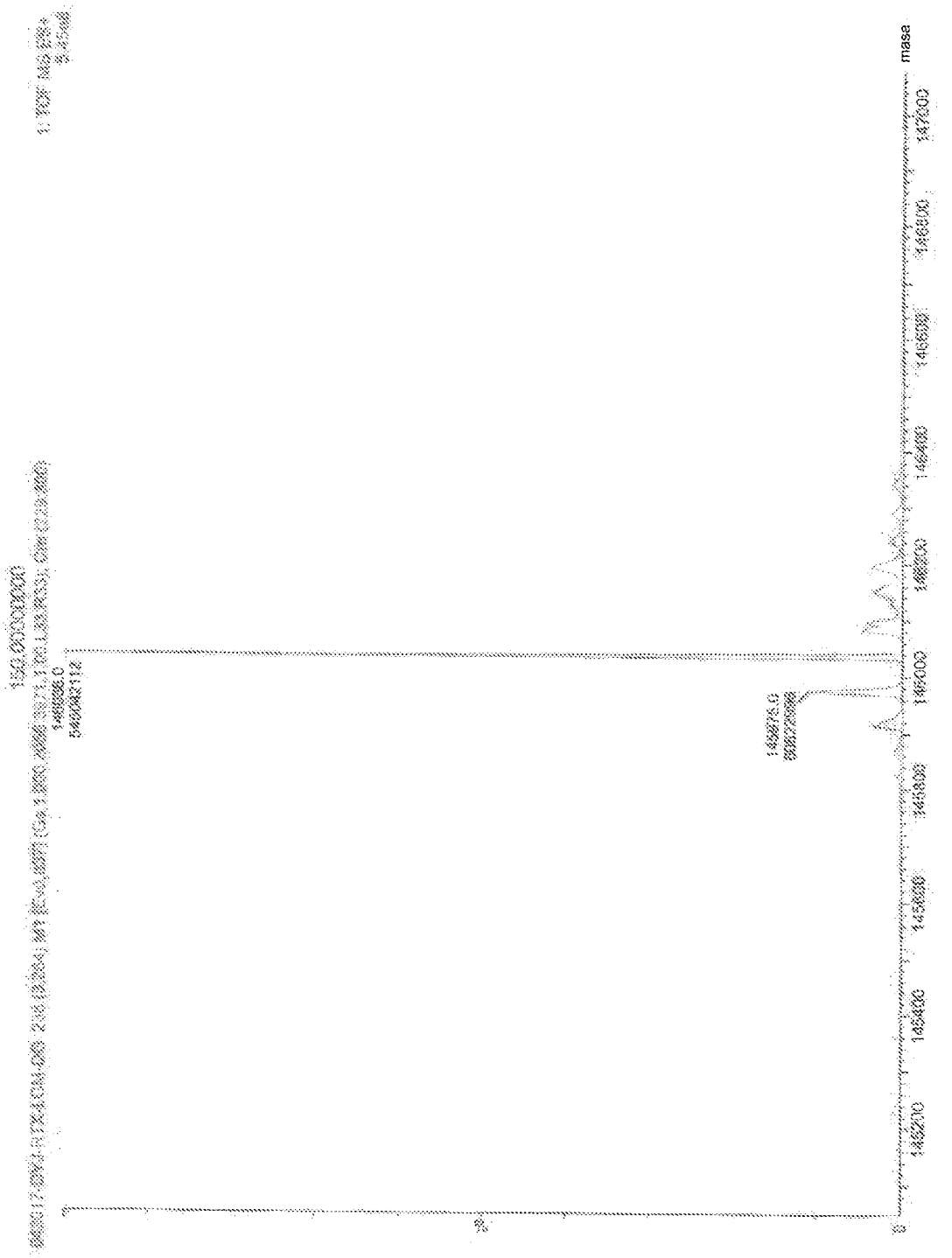

%
0
100
1452700
1454400
1456100
1457800
1459500
1461200
1462900
1464600
1466300
1468000
1469700
1471400
1473100
masa

Fig. 101A

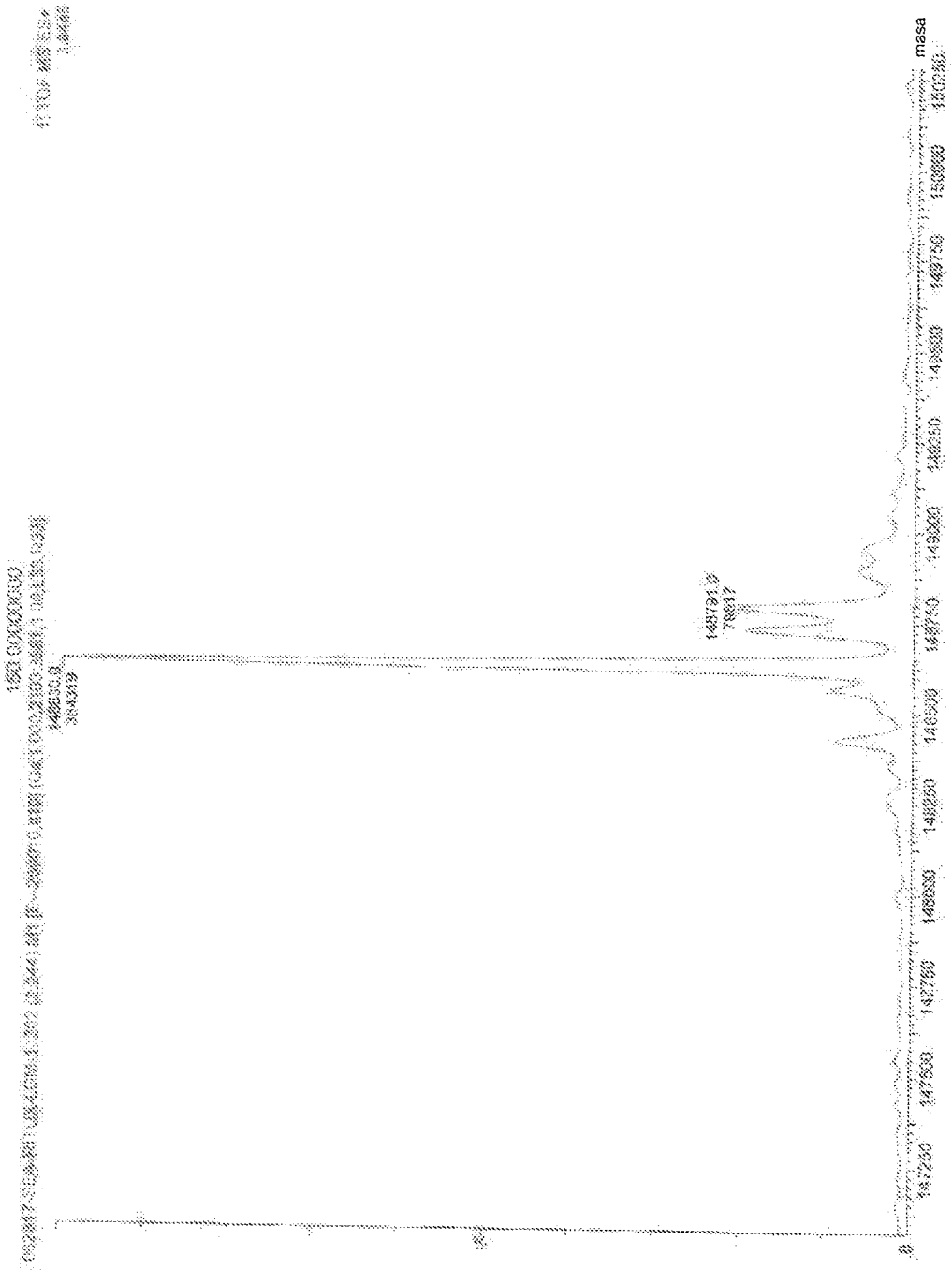


Fig. 101B

BB06 LC-MS DAR 1.1

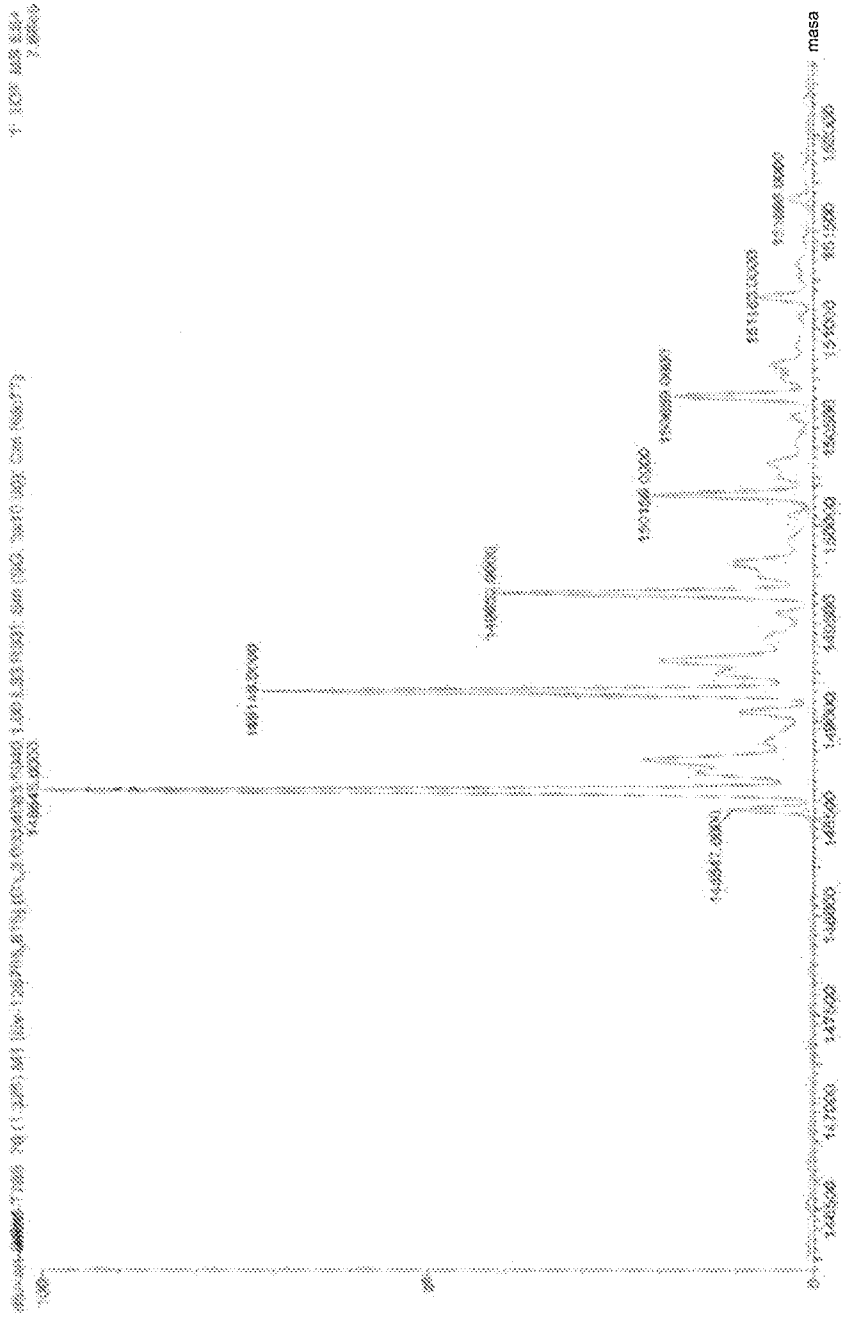


Fig. 101C

BB07 LC-MS

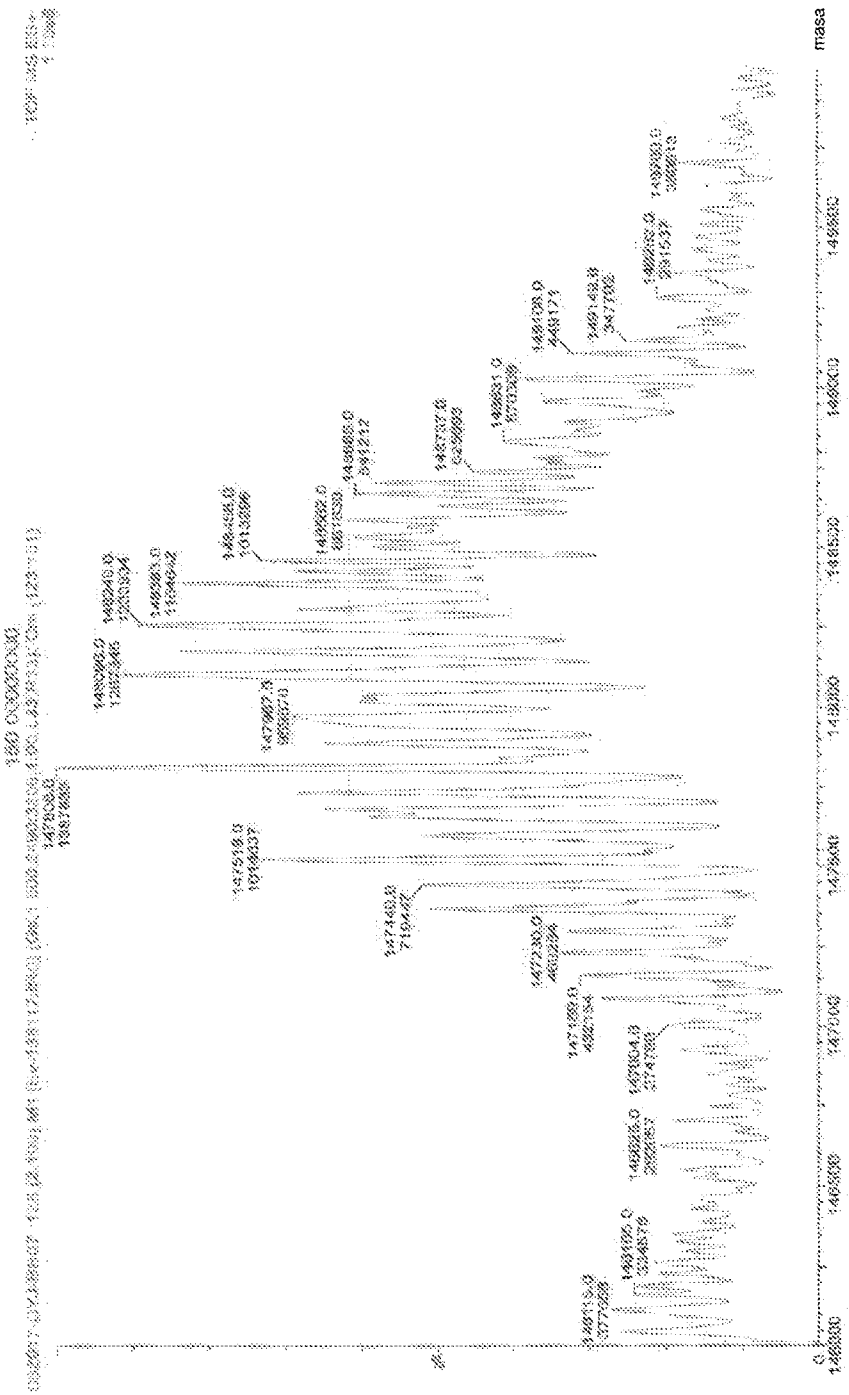


Fig. 102A

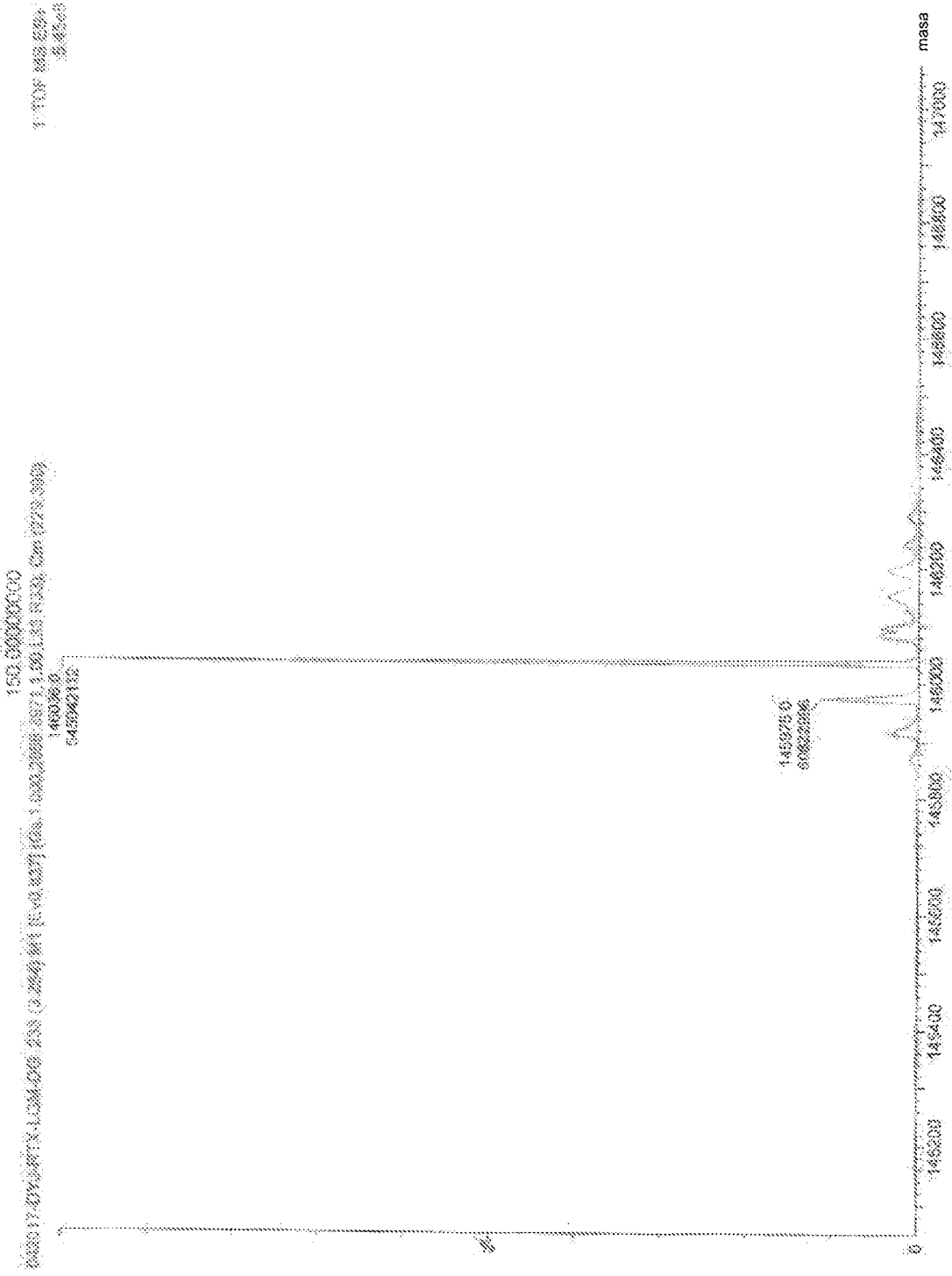

masa
1460000
1460400
1460800
1461200
1461600
1462000
1462400
1462800
1463200
1463600
1464000
1464400
1464800
1465200
%
0

Fig. 102B

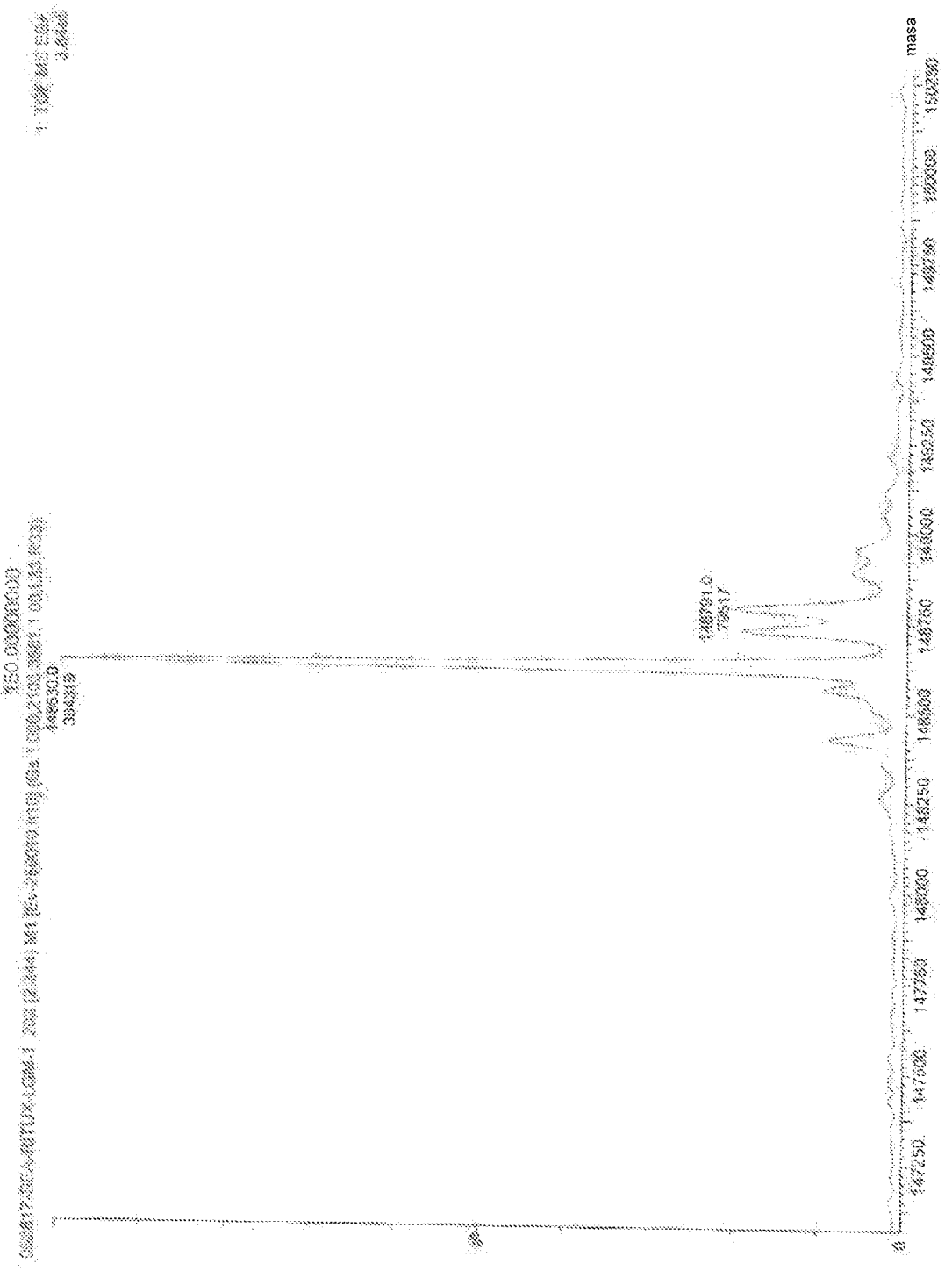

masa
1502500
1500000
1497500
1495000
1492500
1490000
1487500
1485000
1482500
1480000
1477500
1475000
1472500
%
0
1486530.0
394349
1485731.0
79617

Fig. 102C

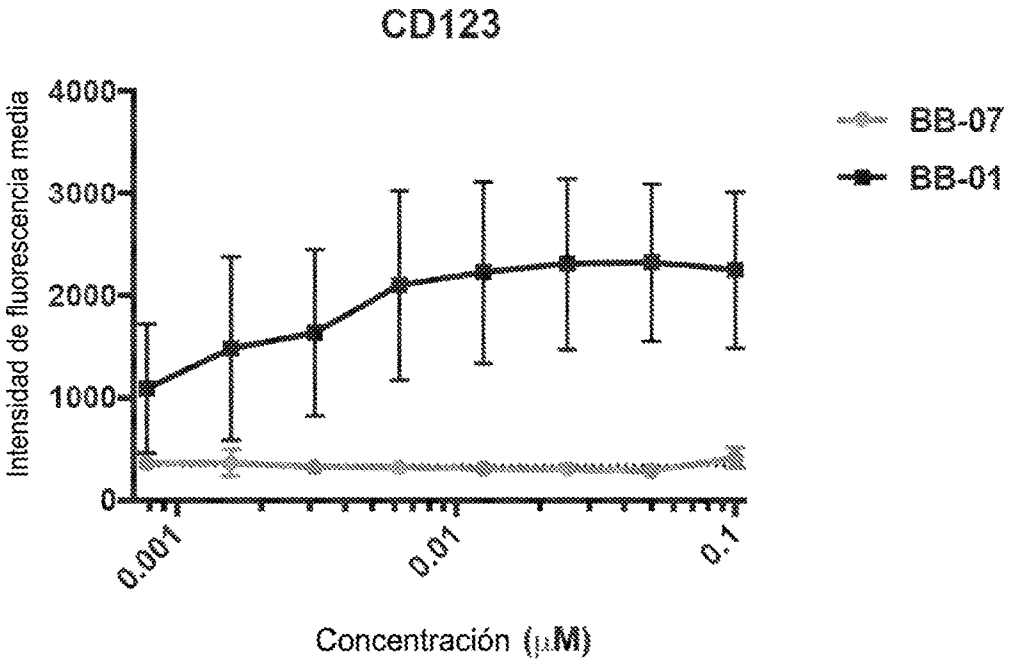


Fig. 102D

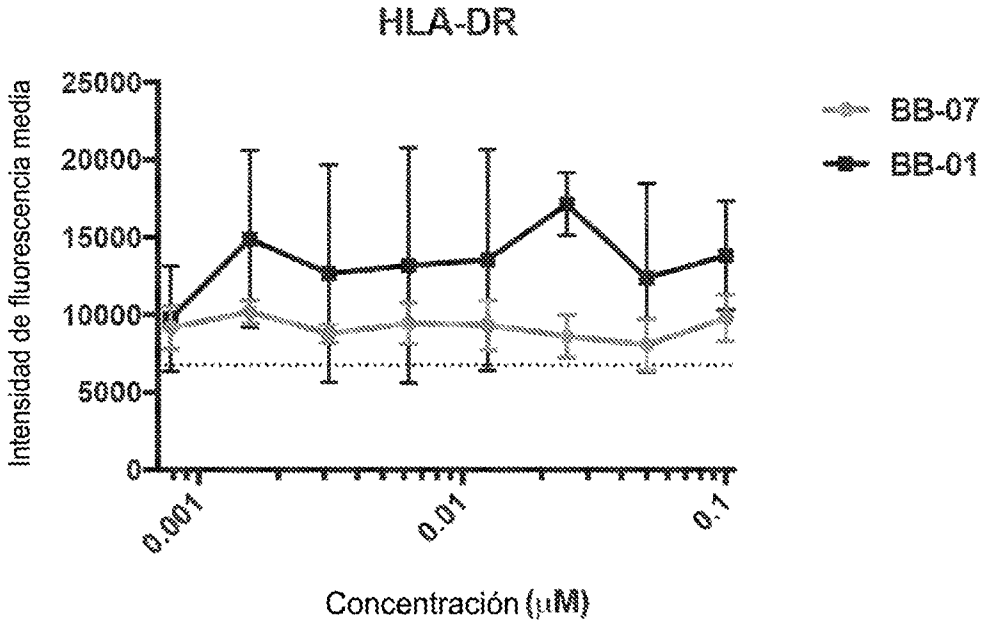


Fig. 102E

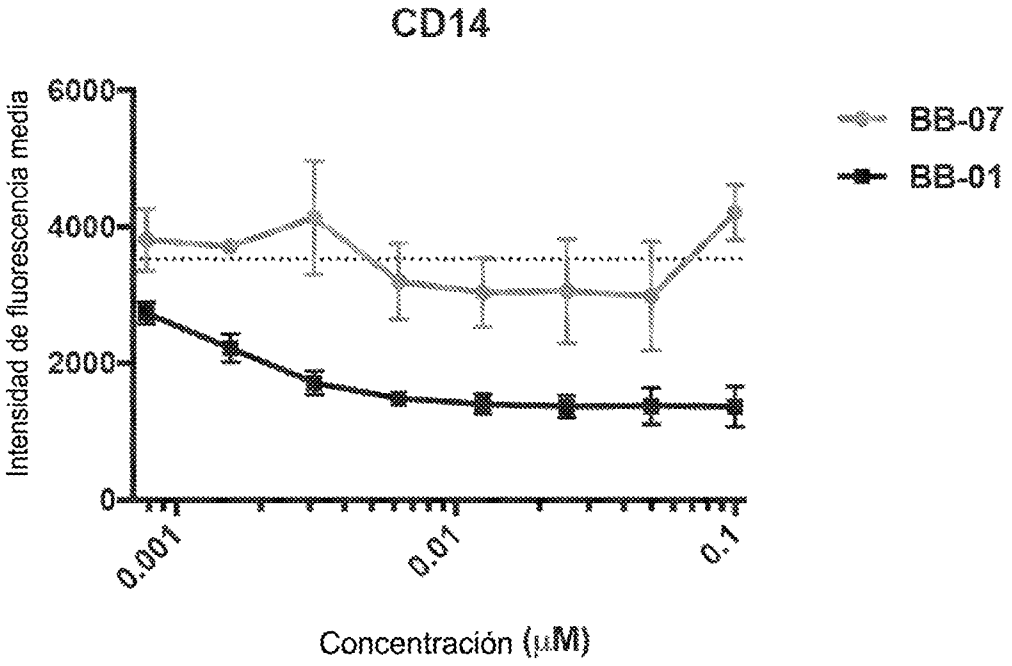


Fig. 102F

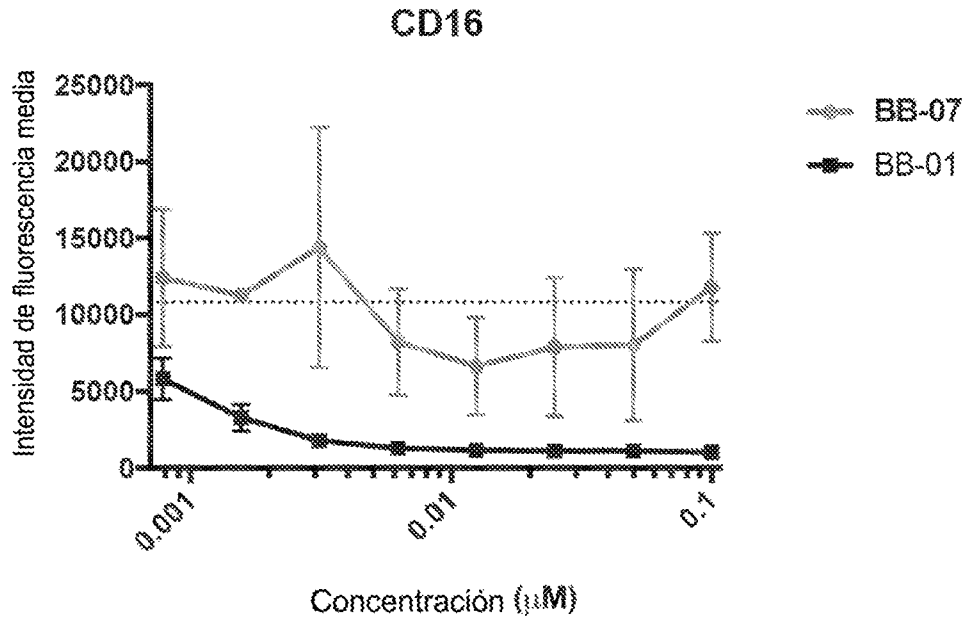


Fig. 102G

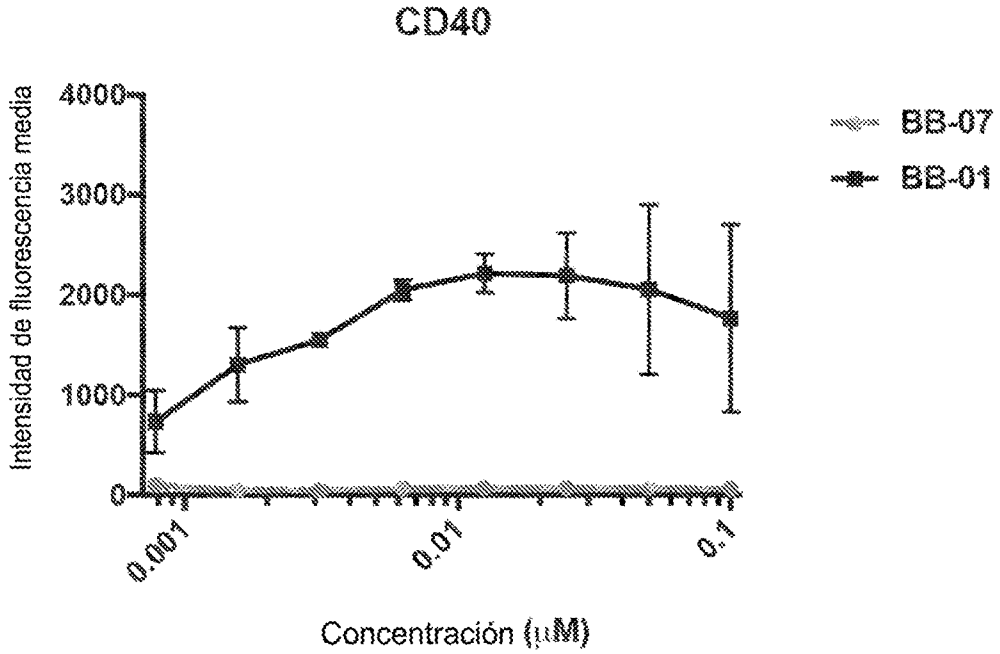


Fig. 102H

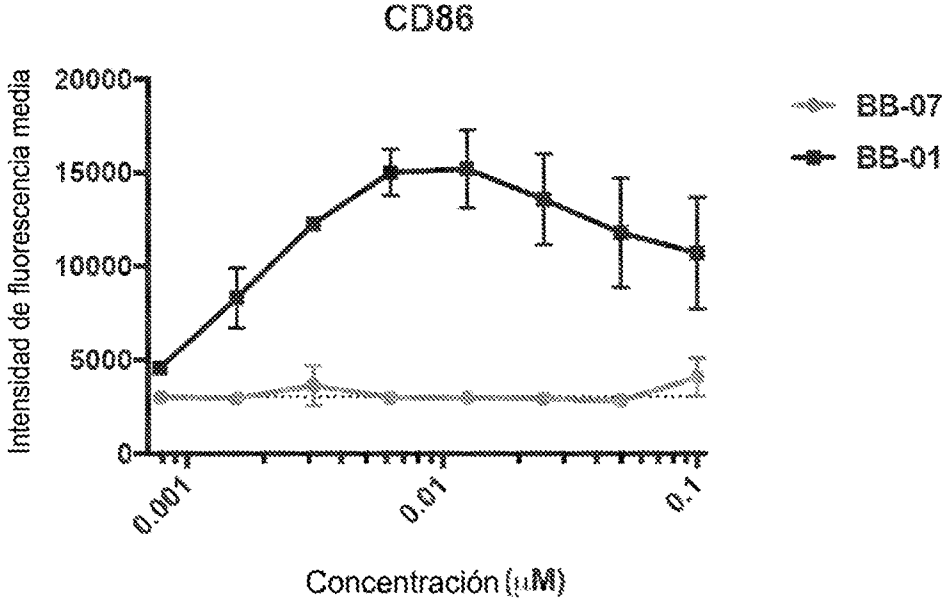


Fig. 102I

480

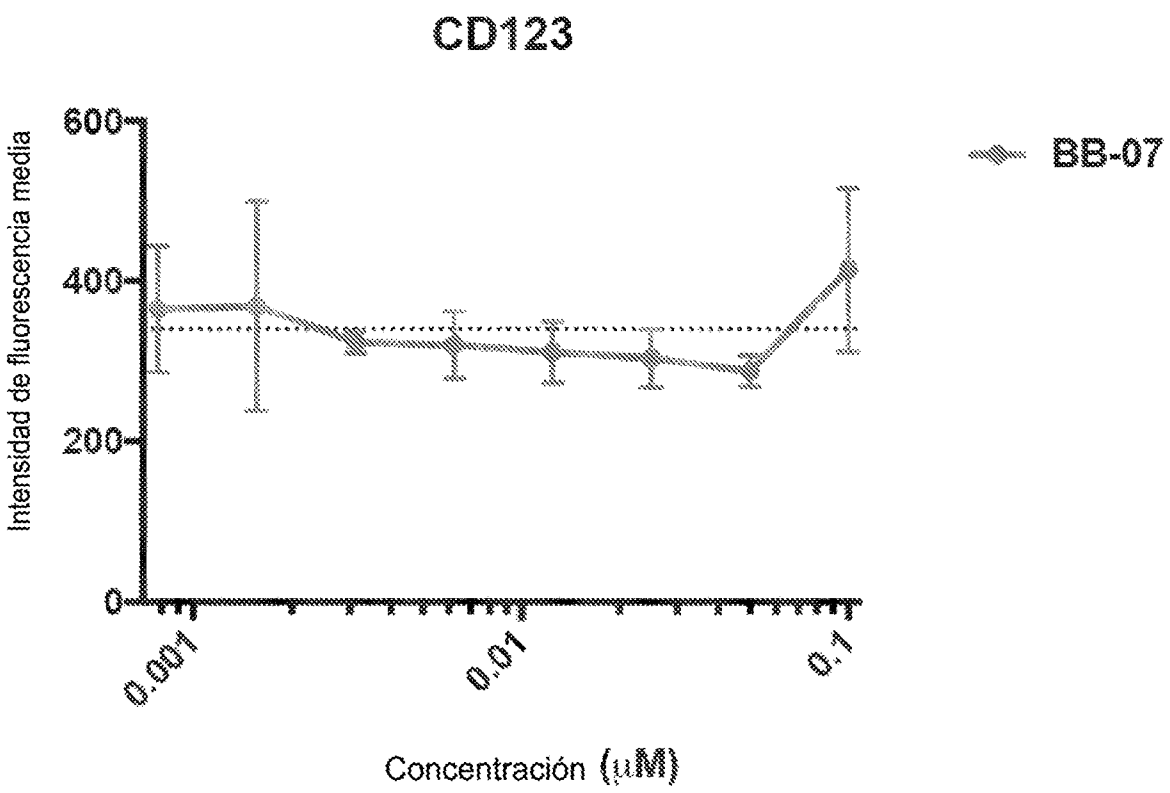

CD123
600
400
200
0
Intensidad de fluorescencia media
0.001
0.01
0.1
Concentración (µM)
BB-07

Fig. 102J

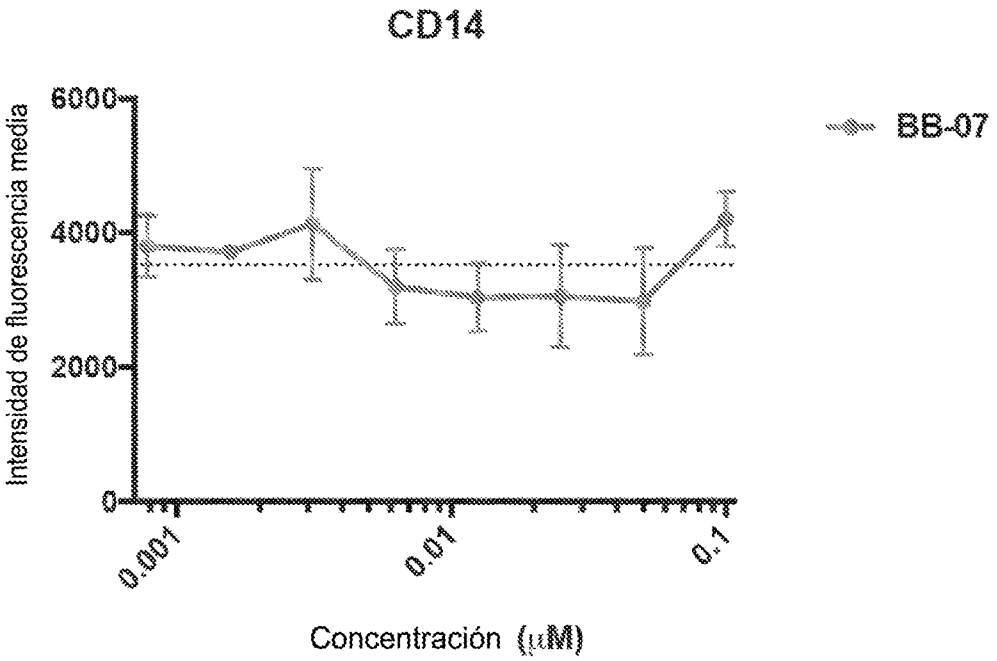


Fig. 102K

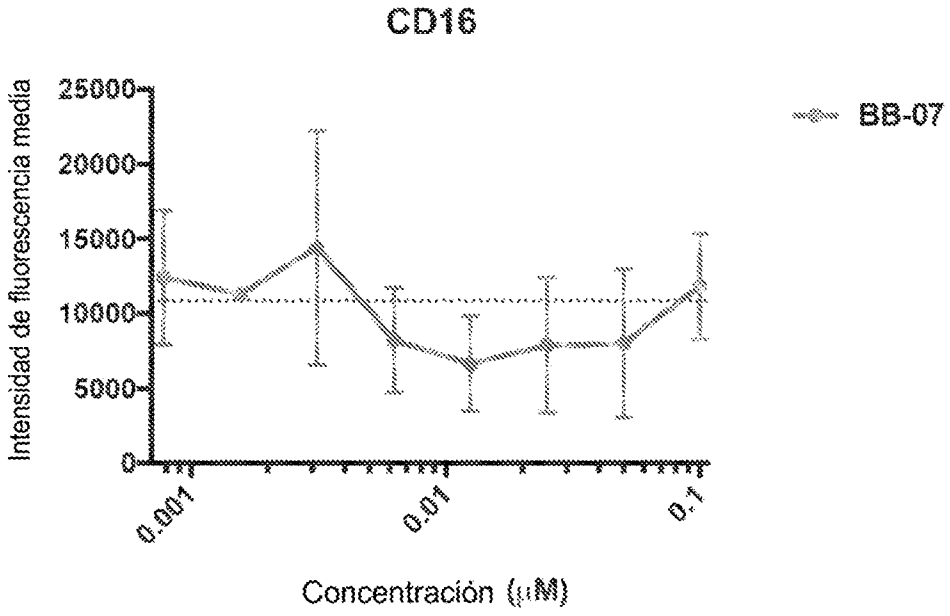


Fig. 102L

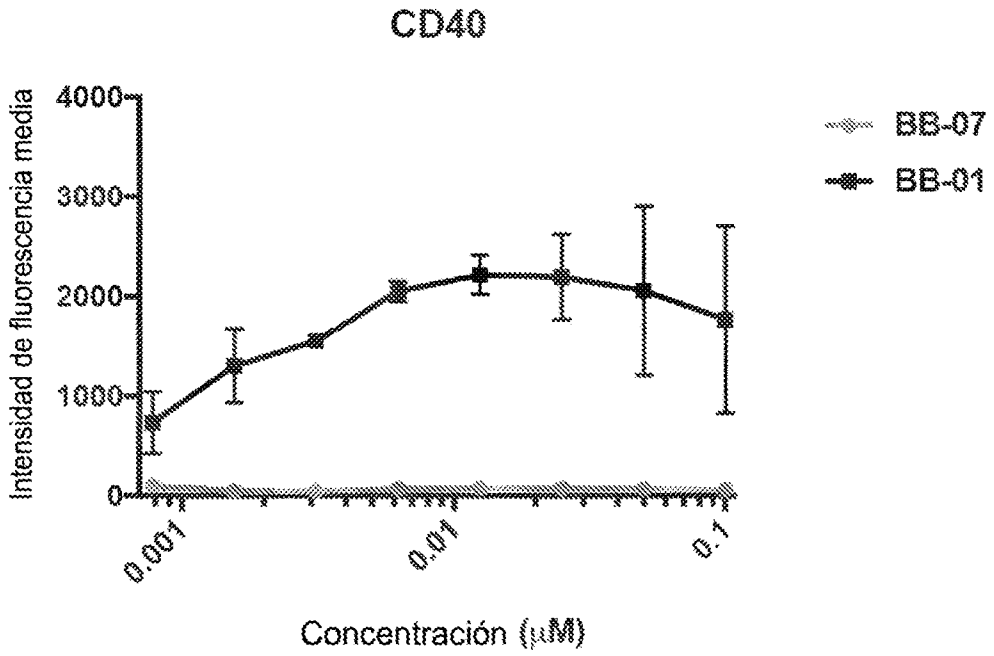


Fig. 102M

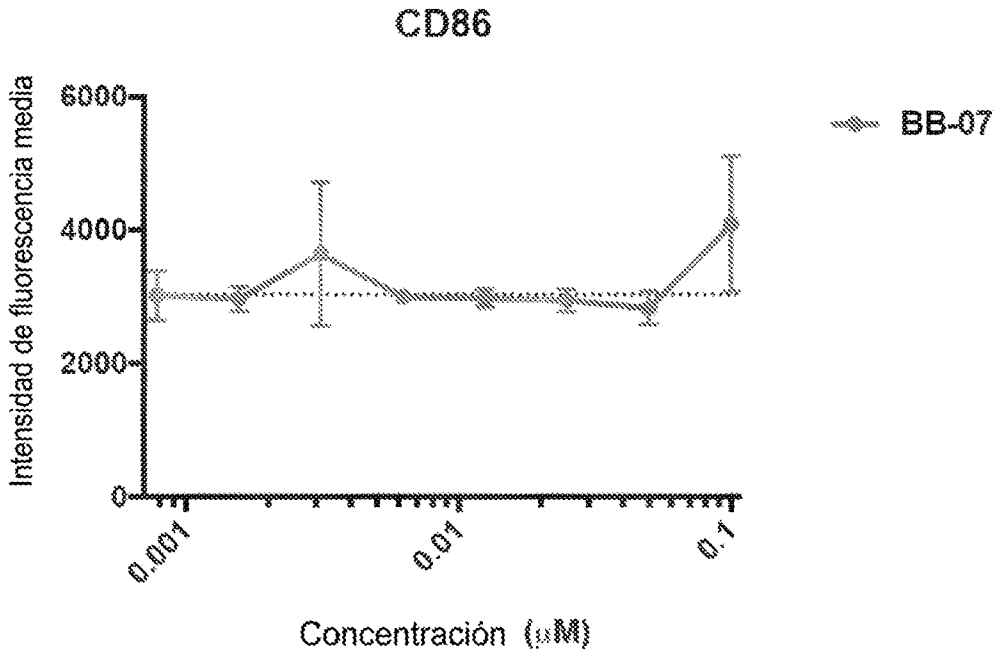


Fig. 102N

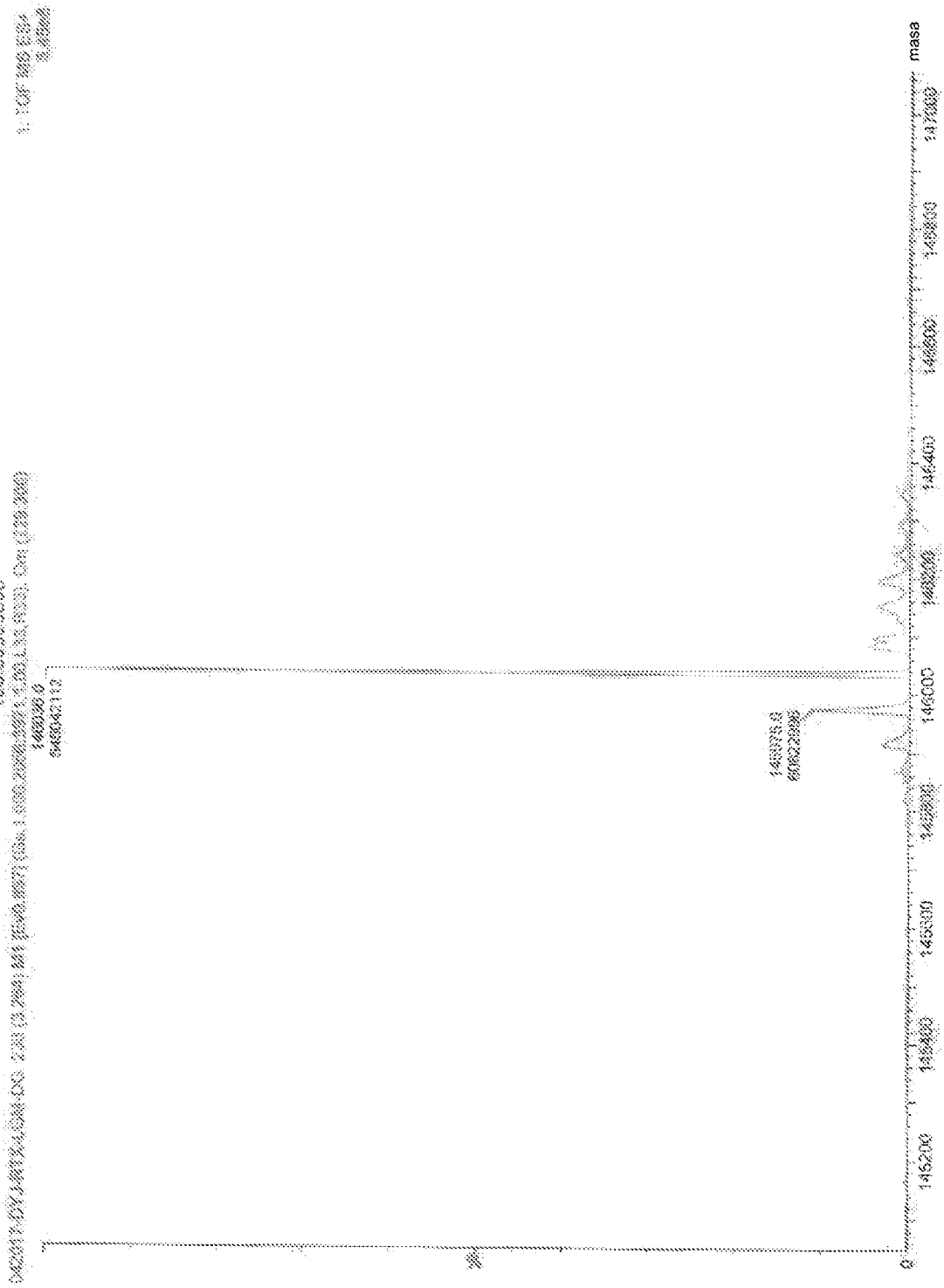

masa
146000
146400
146800
147200
147600
148000
148400
148800
149200
149600
150000
%
0
100

Fig. 103A

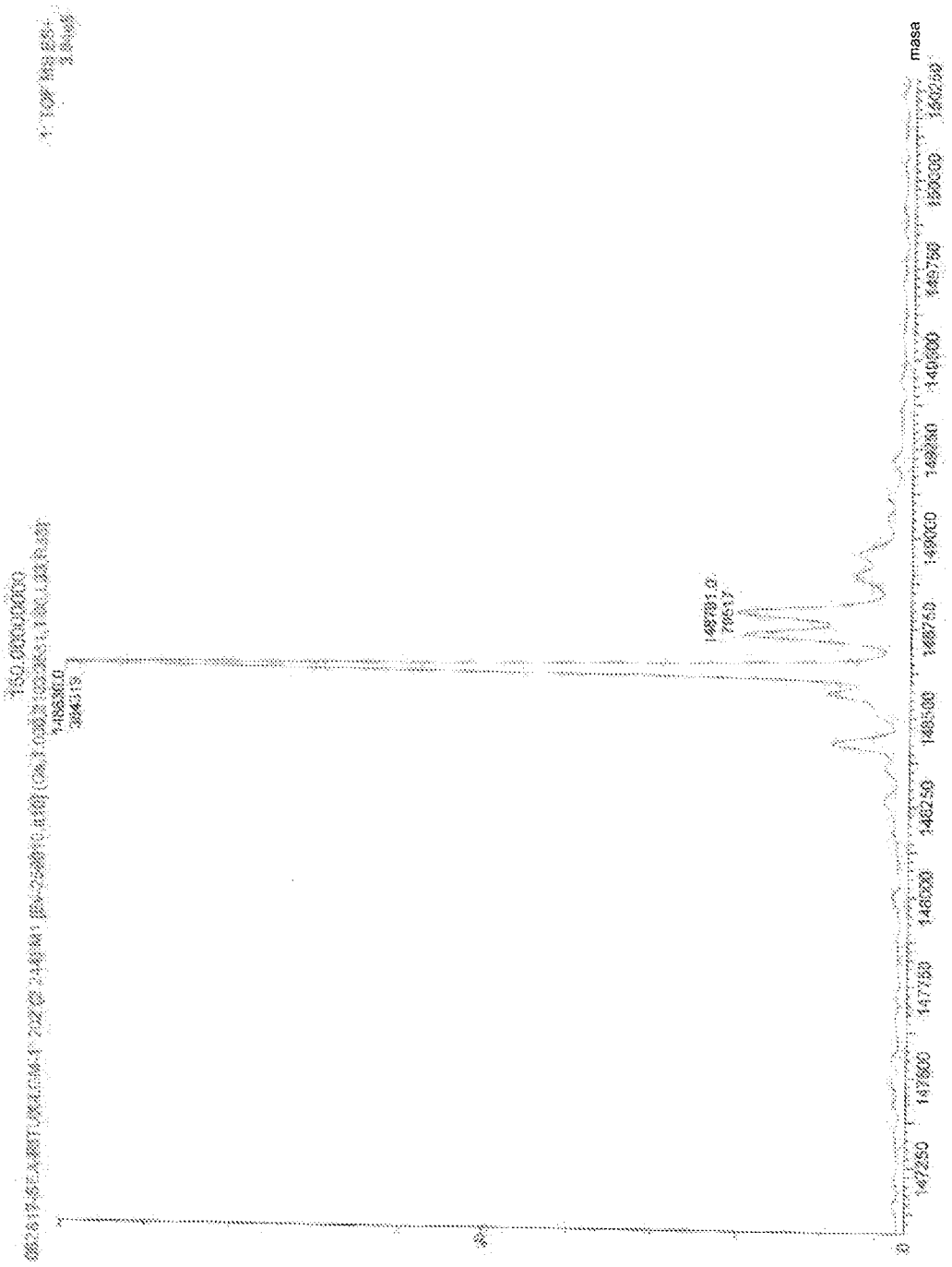


Fig. 103B

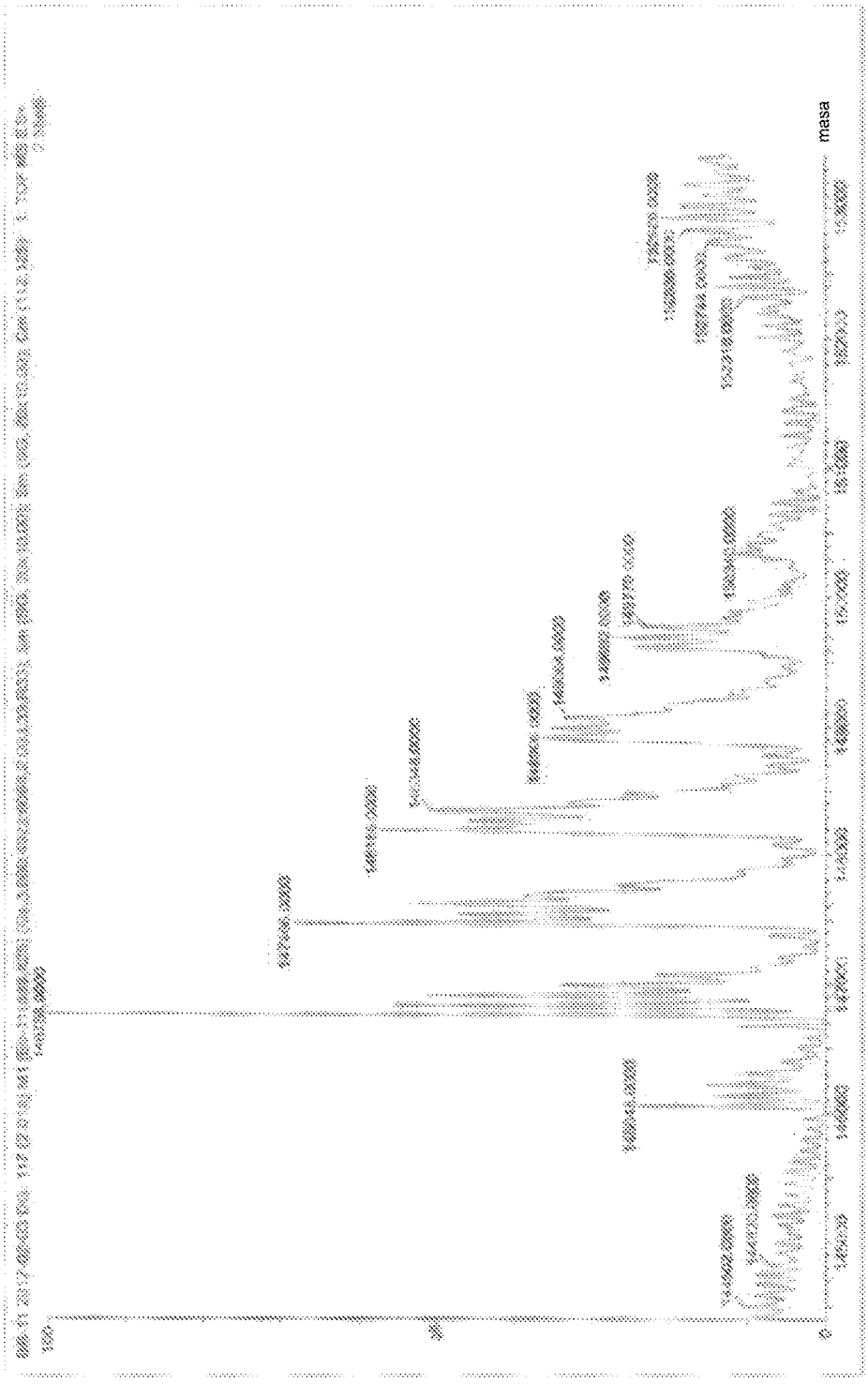


Fig. 103C

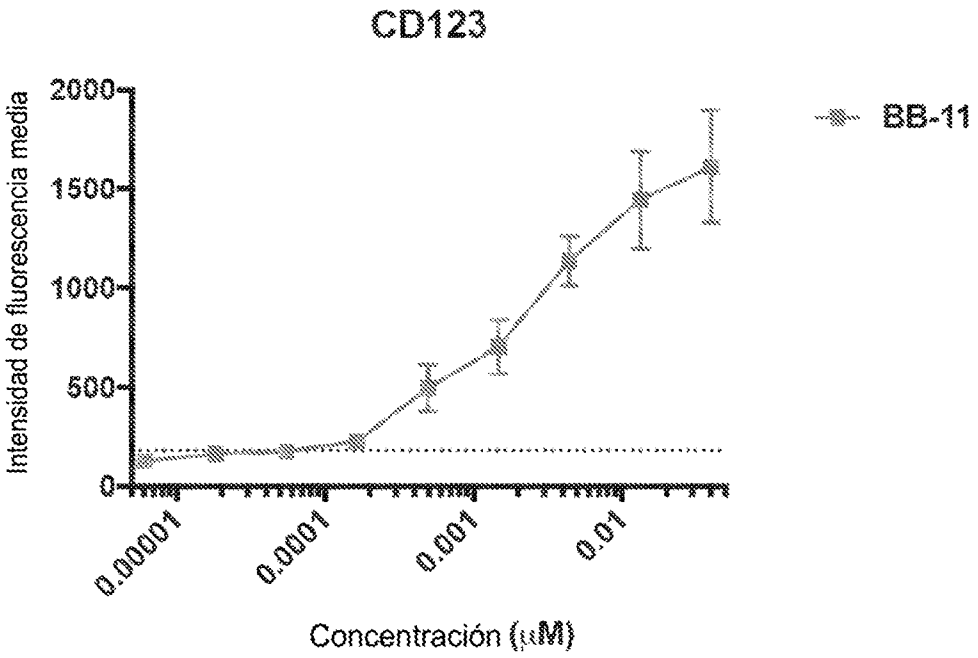


Fig. 103D

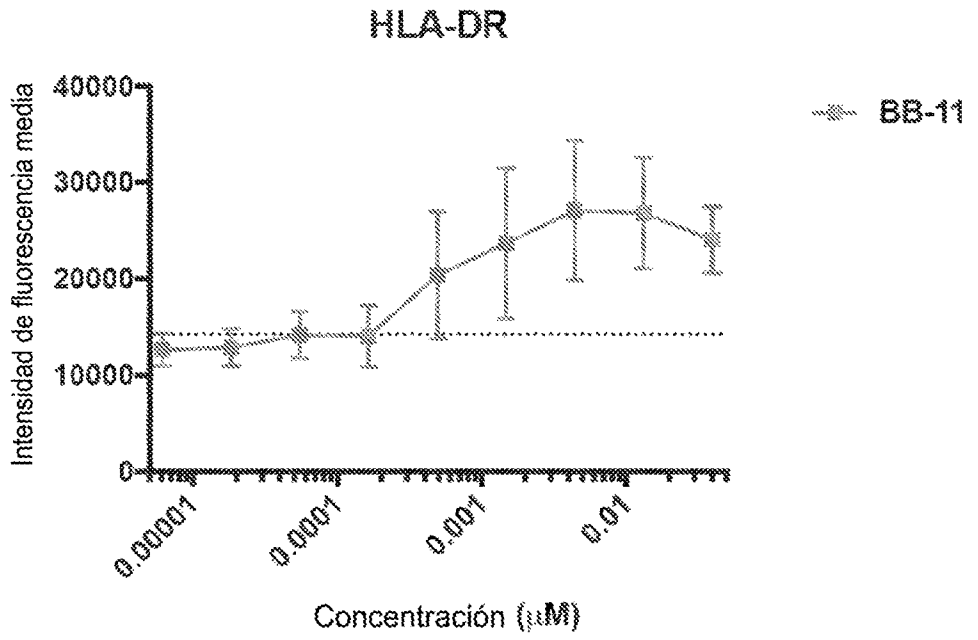


Fig. 103E

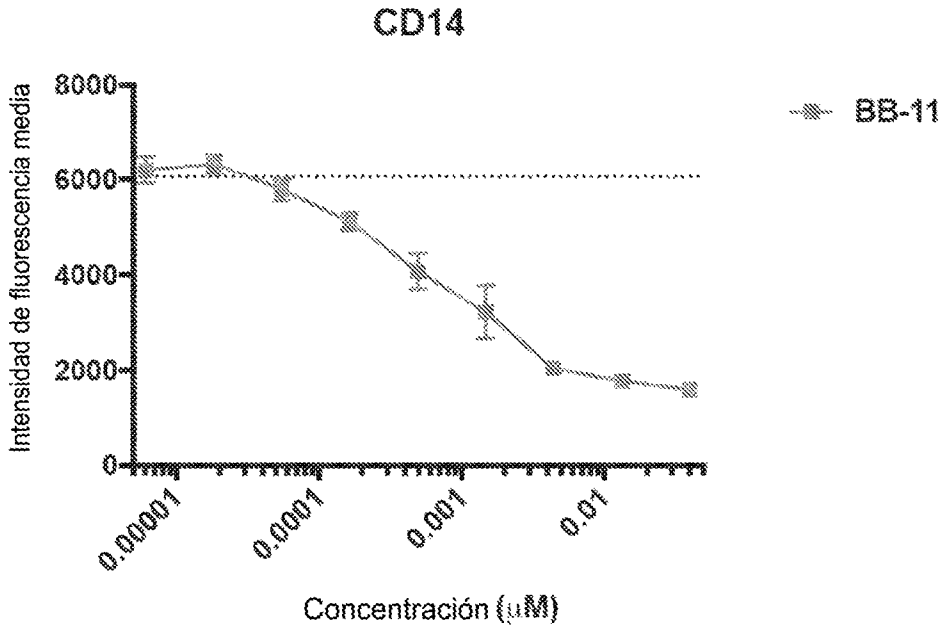


Fig. 103F

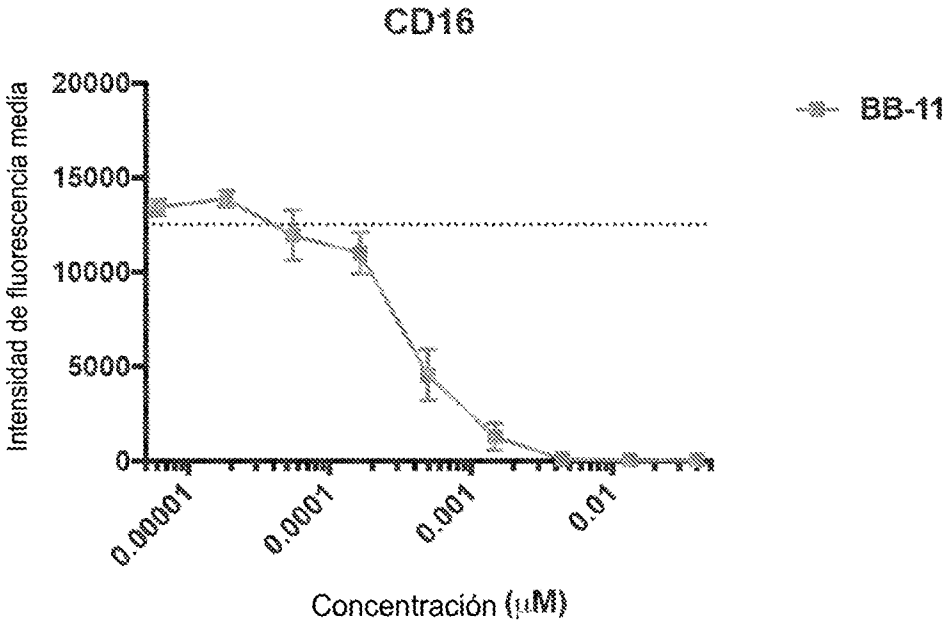


Fig. 103G

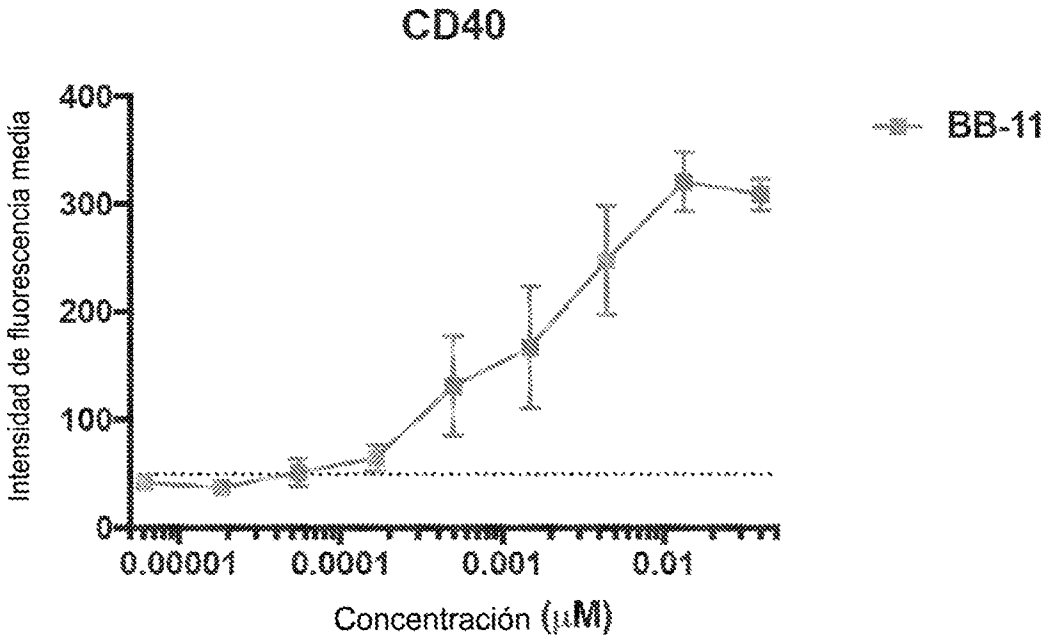


Fig. 103H

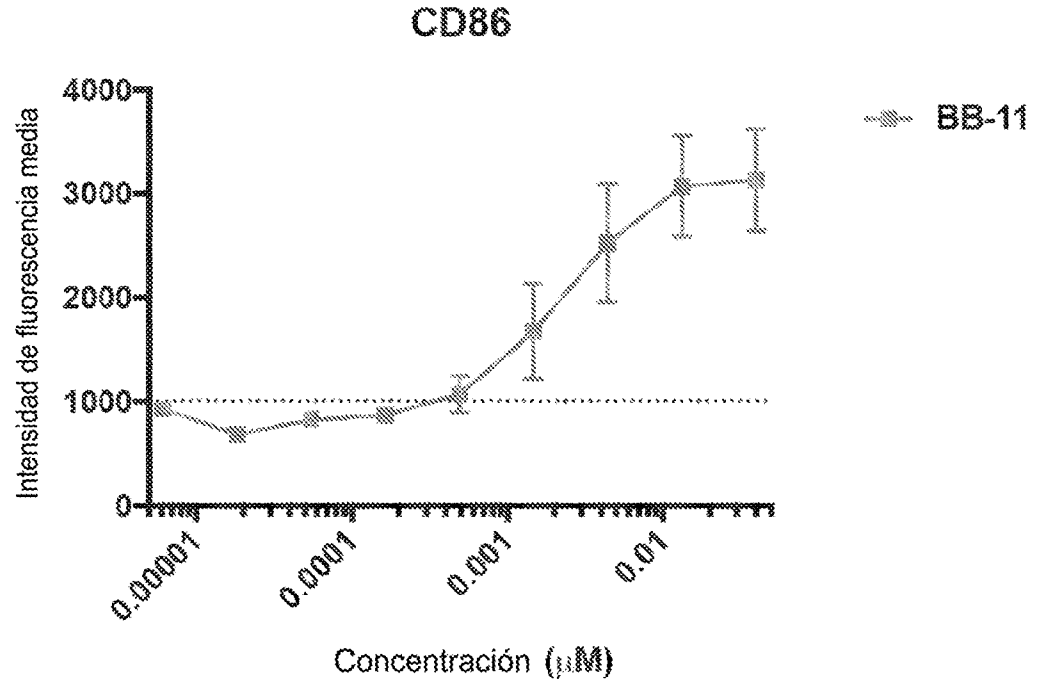
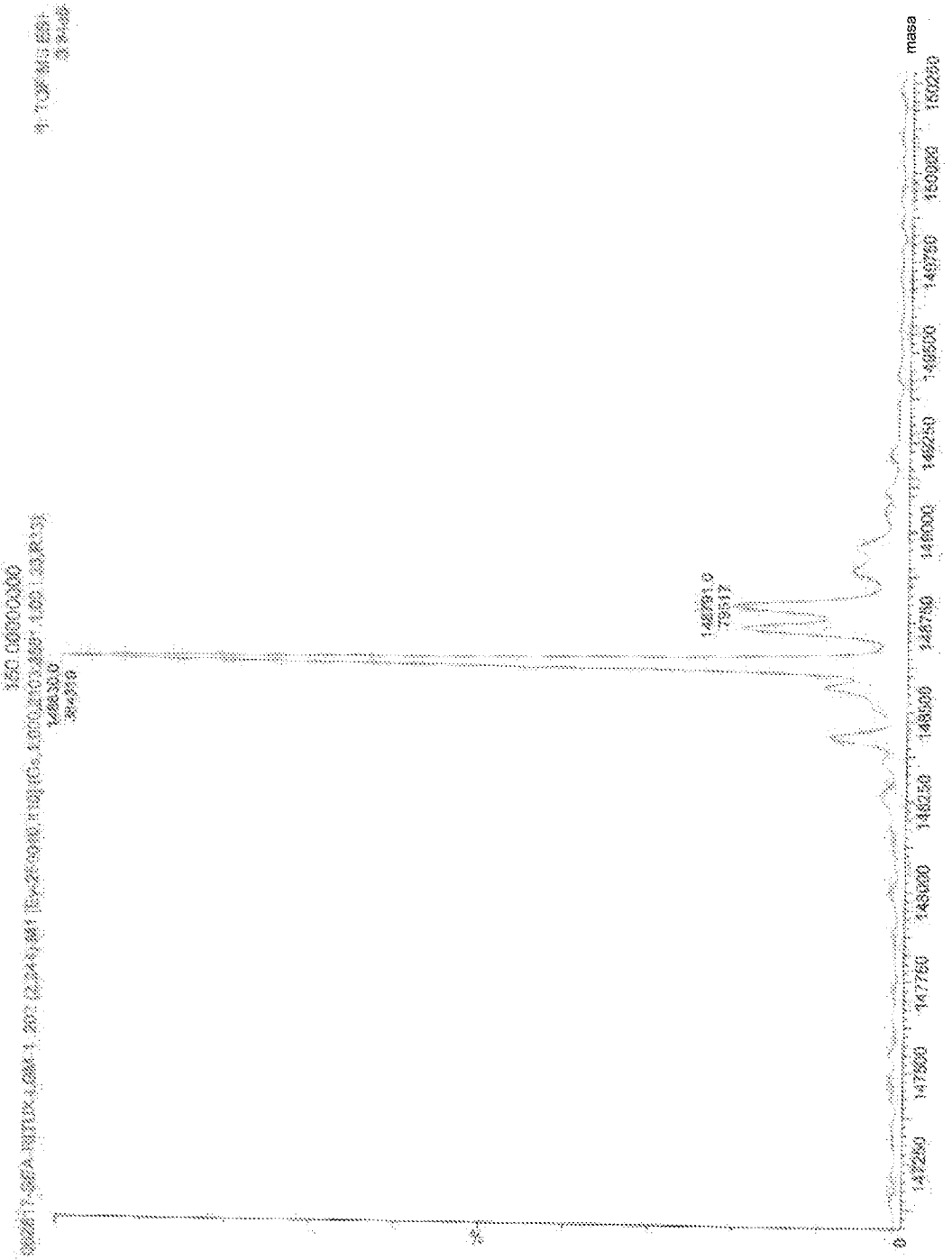


Fig. 103I


masa
1482250
1477500
1472750
1468000
1463250
1458500
1453750
1449000
1444250
1439500
1434750
1430000
1425250
1420500
1415750
1411000
1406250
1401500
1396750
1392000
1387250
1382500
1377750
1373000
1368250
1363500
1358750
1354000
1349250
1344500
1339750
1335000
1330250
1325500
1320750
1316000
1311250
1306500
1301750
1297000
1292250
1287500
1282750
1278000
1273250
1268500
1263750
1259000
1254250
1249500
1244750
1240000
1235250
1230500
1225750
1221000
1216250
1211500
1206750
1202000
1197250
1192500
1187750
1183000
1178250
1173500
1168750
1164000
1159250
1154500
1149750
1145000
1140250
1135500
1130750
1126000
1121250
1116500
1111750
1107000
1102250
1097500
1092750
1088000
1083250
1078500
1073750
1069000
1064250
1059500
1054750
1050000
1045250
1040500
1035750
1031000
1026250
1021500
1016750
1012000
1007250
1002500
997750
993000
988250
983500
978750
974000
969250
964500
959750
955000
950250
945500
940750
936000
931250
926500
921750
917000
912250
907500
902750
898000
893250
888500
883750
879000
874250
869500
864750
860000
855250
850500
845750
841000
836250
831500
826750
822000
817250
812500
807750
803000
798250
793500
788750
784000
779250
774500
769750
765000
760250
755500
750750
746000
741250
736500
731750
727000
722250
717500
712750
708000
703250
698500
693750
689000
684250
679500
674750
670000
665250
660500
655750
651000
646250
641500
636750
632000
627250
622500
617750
613000
608250
603500
598750
594000
589250
584500
579750
575000
570250
565500
560750
556000
551250
546500
541750
537000
532250
527500
522750
518000
513250
508500
503750
499000
494250
489500
484750
480000
475250
470500
465750
461000
456250
451500
446750
442000
437250
432500
427750
423000
418250
413500
408750
404000
399250
394500
389750
385000
380250
375500
370750
366000
361250
356500
351750
347000
342250
337500
332750
328000
323250
318500
313750
309000
304250
299500
294750
290000
285250
280500
275750
271000
266250
261500
256750
252000
247250
242500
237750
233000
228250
223500
218750
214000
209250
204500
199750
195000
190250
185500
180750
176000
171250
166500
161750
157000
152250
147500
142750
138000
133250
128500
123750
119000
114250
109500
104750
100000
95250
90500
85750
81000
76250
71500
66750
62000
57250
52500
47750
43000
38250
33500
28750
24000
19250
14500
9750
5000
250
0
%
1482250
79517
Fig. 104A

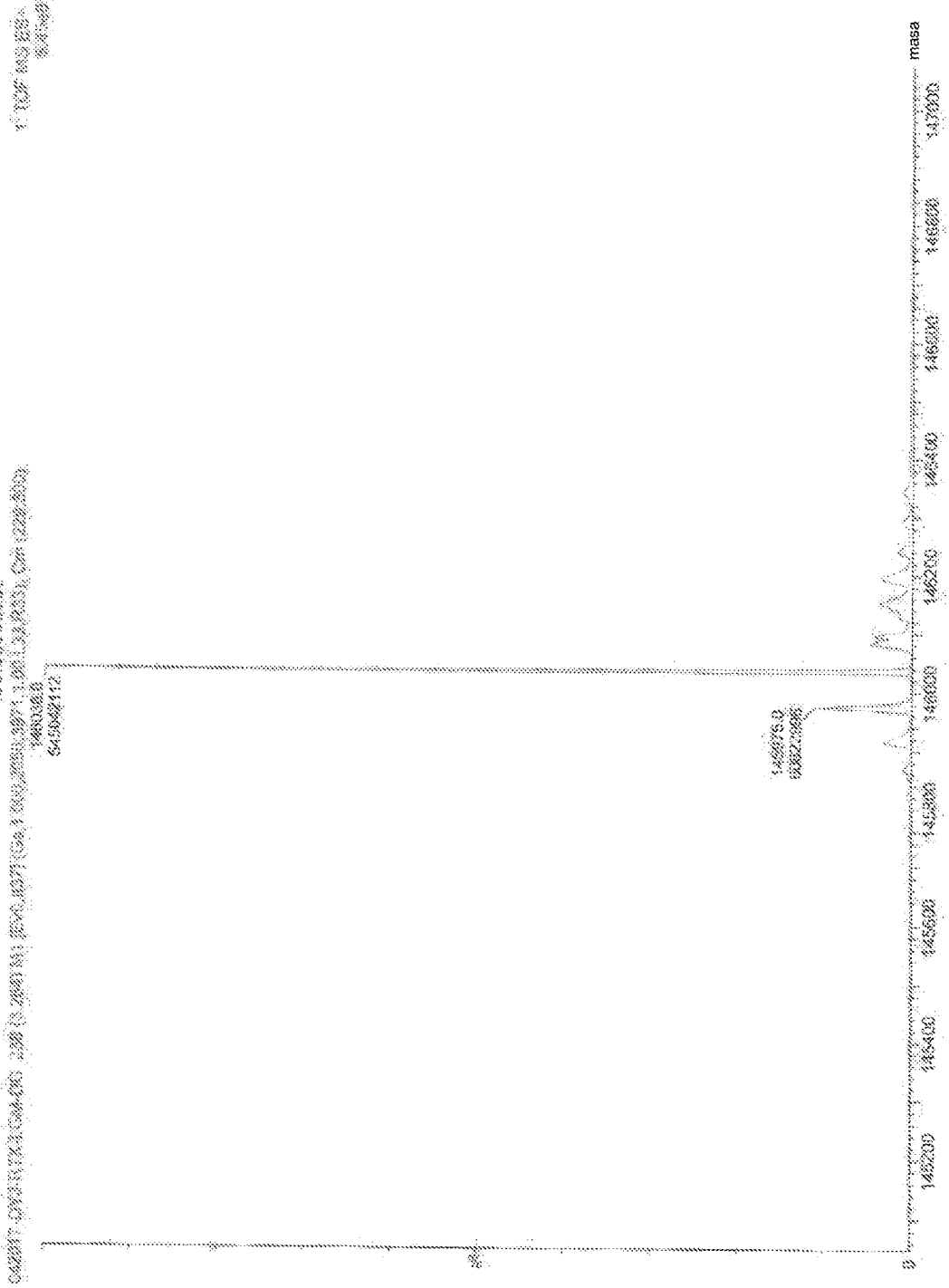

masa
1462200
1464400
1465600
1466800
1468000
1469200
1470400
1471600
1472800
1474000
1475200
1476400
1477600
1478800
1480000
1481200
1482400
1483600
1484800
1486000
1487200

Fig. 104B

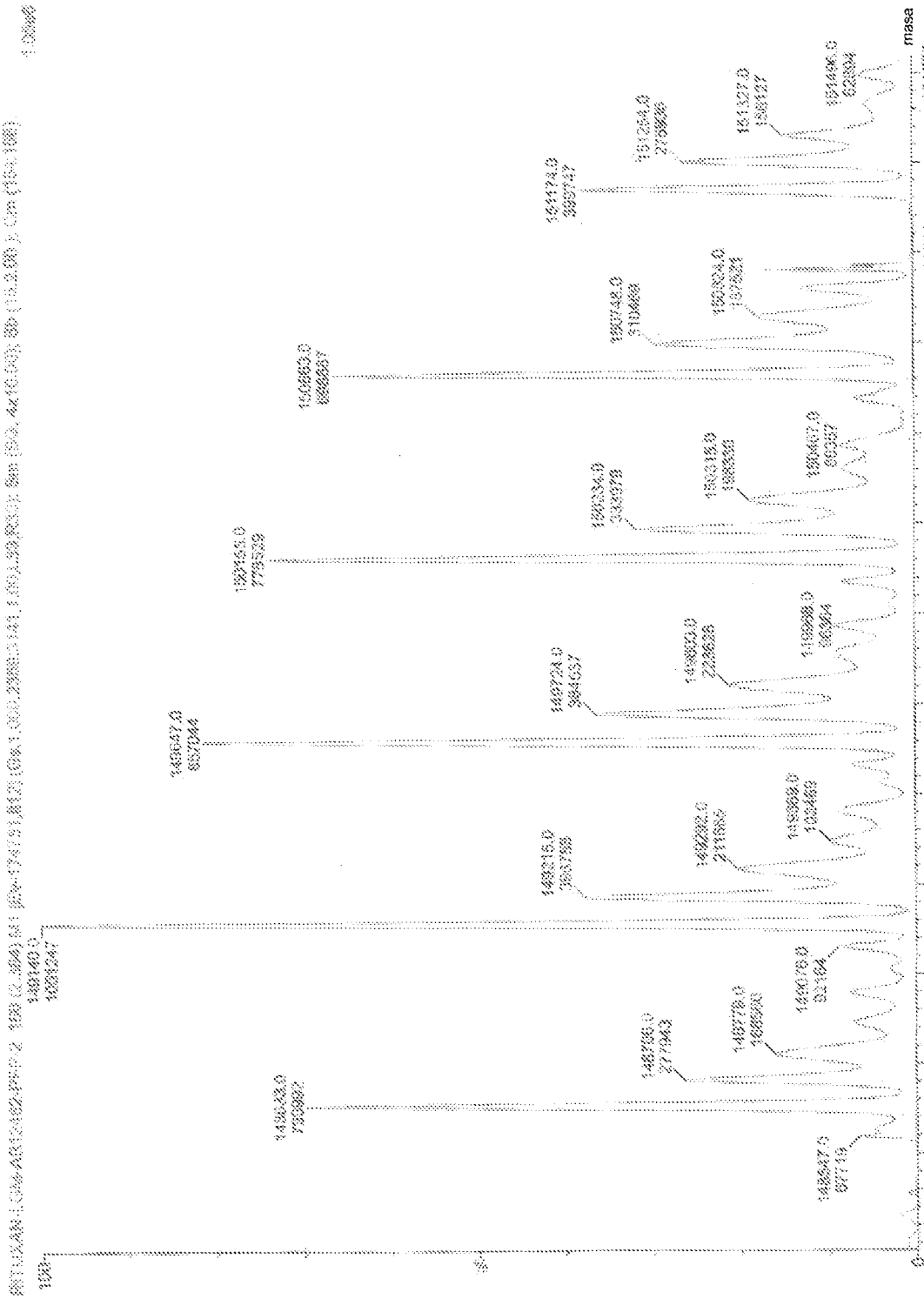

masa
1511920
1511600
1511280
1510960
1510640
1510320
1510000
1509680
1509360
1509040
1508720
1508400
1508080
1507760
1507440
1507120
1506800
1506480
1506160
1505840
1505520
1505200
1504880
1504560
1504240
1503920
1503600
1503280
1502960
1502640
1502320
1502000
1501680
1501360
1501040
1500720
1500400
1500080
1499760
1499440
1499120
1498800
1498480
1498160
1497840
1497520
1497200
1496880
1496560
1496240
1495920
1495600
1495280
1494960
1494640
1494320
1494000
1493680
1493360
1493040
1492720
1492400
1492080
1491760
1491440
1491120
1490800
1490480
1490160
1489840
1489520
1489200
1488880
1488560
1488240
1487920
1487600
1487280
1486960
1486640
1486320
1486000
1485680
1485360
1485040
1484720
1484400
1484080
1483760
1483440
1483120
1482800
1482480
1482160
1481840
1481520
1481200
1480880
1480560
1480240
1479920
1479600
1479280
1478960
1478640
1478320
1478000
1477680
1477360
1477040
1476720
1476400
1476080
1475760
1475440
1475120
1474800
1474480
1474160
1473840
1473520
1473200
1472880
1472560
1472240
1471920
1471600
1471280
1470960
1470640
1470320
1470000
1469680
1469360
1469040
1468720
1468400
1468080
1467760
1467440
1467120
1466800
1466480
1466160
1465840
1465520
1465200
1464880
1464560
1464240
1463920
1463600
1463280
1462960
1462640
1462320
1462000
1461680
1461360
1461040
1460720
1460400
1460080
1459760
1459440
1459120
1458800
1458480
1458160
1457840
1457520
1457200
1456880
1456560
1456240
1455920
1455600
1455280
1454960
1454640
1454320
1454000
1453680
1453360
1453040
1452720
1452400
1452080
1451760
1451440
1451120
1450800
1450480
1450160
1449840
1449520
1449200
1448880
1448560
1448240
1447920
1447600
1447280
1446960
1446640
1446320
1446000
1445680
1445360
1445040
1444720
1444400
1444080
1443760
1443440
1443120
1442800
1442480
1442160
1441840
1441520
1441200
1440880
1440560
1440240
1439920
1439600
1439280
1438960
1438640
1438320
1438000
1437680
1437360
1437040
1436720
1436400
1436080
1435760
1435440
1435120
1434800
1434480
1434160
1433840
1433520
1433200
1432880
1432560
1432240
1431920
1431600
1431280
1430960
1430640
1430320
1430000
1429680
1429360
1429040
1428720
1428400
1428080
1427760
1427440
1427120
1426800
1426480
1426160
1425840
1425520
1425200
1424880
1424560
1424240
1423920
1423600
1423280
1422960
1422640
1422320
1422000
1421680
1421360
1421040
1420720
1420400
1420080
1419760
1419440
1419120
1418800
1418480
1418160
1417840
1417520
1417200
1416880
1416560
1416240
1415920
1415600
1415280
1414960
1414640
1414320
1414000
1413680
1413360
1413040
1412720
1412400
1412080
1411760
1411440
1411120
1410800
1410480
1410160
1409840
1409520
1409200
1408880
1408560
1408240
1407920
1407600
1407280
1406960
1406640
1406320
1406000
1405680
1405360
1405040
1404720
1404400
1404080
1403760
1403440
1403120
1402800
1402480
1402160
1401840
1401520
1401200
1400880
1400560
1400240
1399920
1399600
1399280
1398960
1398640
1398320
1398000
1397680
1397360
1397040
1396720
1396400
1396080
1395760
1395440
1395120
1394800
1394480
1394160
1393840
1393520
1393200
1392880
1392560
1392240
1391920
1391600
1391280
1390960
1390640
1390320
1390000
1389680
1389360
1389040
1388720
1388400
1388080
1387760
1387440
1387120
1386800
1386480
1386160
1385840
1385520
1385200
1384880
1384560
1384240
1383920
1383600
1383280
1382960
1382640
1382320
1382000
1381680
1381360
1381040
1380720
1380400
1380080
1379760
1379440
1379120
1378800
1378480
1378160
1377840
1377520
1377200
1376880
1376560
1376240
1375920
1375600
1375280
1374960
1374640
1374320
1374000
1373680
1373360
1373040
1372720
1372400
1372080
1371760
1371440
1371120
1370800
1370480
1370160
1369840
1369520
1369200
1368880
1368560
1368240
1367920
1367600
1367280
1366960
1366640
1366320
1366000
1365680
1365360
1365040
1364720
1364400
1364080
1363760
1363440
1363120
1362800
1362480
1362160
1361840
1361520
1361200
1360880
1360560
1360240
1359920
1359600
1359280
1358960
1358640
1358320
1358000
1357680
1357360
1357040
1356720
1356400
1356080
1355760
1355440
1355120
1354800
1354480
1354160
1353840
1353520
1353200
1352880
1352560
1352240
1351920
1351600
1351280
1350960
1350640
1350320
1350000
1349680
1349360
1349040
1348720
1348400
1348080
1347760
1347440
1347120
1346800
1346480
1346160
1345840
1345520
1345200
1344880
1344560
1344240
1343920
1343600
1343280
1342960
1342640
1342320
1342000
1341680
1341360
1341040
1340720
1340400
1340080
1339760
1339440
1339120
1338800
1338480
1338160
1337840
1337520
1337200
1336880
1336560
1336240
1335920
1335600
1335280
1334960
1334640
1334320
1334000
1333680
1333360
1333040
1332720
1332400
1332080
1331760
1331440
1331120
1330800
1330480
1330160
1329840
1329520
1329200
1328880
1328560
1328240
1327920
1327600
1327280
1326960
1326640
1326320
1326000
1325680
1325360
1325040
1324720
1324400
1324080
1323760
1323440
1323120
1322800
1322480
1322160
1321840
1321520
1321200
1320880
1320560
1320240
1319920
1319600
1319280
1318960
1318640
1318320
1318000
1317680
1317360
1317040
1316720
1316400
1316080
1315760
1315440
1315120
1314800
1314480
1314160
1313840
1313520
1313200
1312880
1312560
1312240
1311920
1311600
1311280
1310960
1310640
1310320
1310000
1309680
1309360
1309040
1308720
1308400
1308080
1307760
1307440
1307120
1306800
1306480
1306160
1305840
1305520
1305200
1304880
1304560
1304240
1303920
1303600
1303280
1302960
1302640
1302320
1302000
1301680
1301360
1301040
1300720
1300400
1300080
1299760
1299440
1299120
1298800
1298480
1298160
1297840
1297520
1297200
1296880
1296560
1296240
1295920
1295600
1295280
1294960
1294640
1294320
1294000
1293680
1293360
1293040
1292720
1292400
1292080
1291760
1291440
1291120
1290800
1290480
1290160
1289840
1289520
1289200
1288880
1288560
1288240
1287920
1287600
1287280
1286960
1286640
1286320
1286000
1285680
1285360
1285040
1284720
1284400
1284080
1283760
1283440
1283120
1282800
1282480
1282160
1281840
1281520
1281200
1280880
1280560
1280240
1279920
1279600
1279280
1278960
1278640
1278320
1278000
1277680
1277360
1277040
1276720
1276400
1276080
1275760
1275440
1275120
1274800
1274480
1274160
1273840
1273520
1273200
1272880
1272560
1272240
1271920
1271600
1271280
1270960
1270640
1270320
1270000
1269680
1269360
1269040
1268720
1268400
1268080
1267760
1267440
1267120
1266800
1266480
1266160
1265840
1265520
1265200
1264880
1264560
1264240
1263920
1263600
1263280
1262960
1262640
1262320
1262000
1261680
1261360
1261040
1260720
1260400
1260080
1259760
1259440
1259120
1258800
1258480
1258160
1257840
1257520
1257200
1256880
1256560
1256240
1255920
1255600
1255280
1254960
1254640
1254320
1254000
1253680
1253360
1253040
1252720
1252400
1252080
1251760
1251440
1251120
1250800
1250480
1250160
1249840
1249520
1249200
1248880
1248560
1248240
1247920
1247600
1247280
1246960
1246640
1246320
1246000
1245680
1245360
1245040
1244720
1244400
1244080
1243760
1243440
1243120
1242800
1242480
1242160
1241840
1241520
1241200
1240880
1240560
1240240
1239920
1239600
1239280
1238960
1238640
1238320
1238000
1237680
1237360
1237040
1236720
1236400
1236080
1235760
1235440
1235120
1234800
1234480
1234160
1233840
1233520
1233200
1232880
1232560
1232240
1231920
1231600
1231280
1230960
1230640
1230320
1230000
1229680
1229360
1229040
1228720
1228400
1228080
1227760
1227440
1227120
1226800
1226480
1226160
1225840
1225520
1225200
1224880
1224560
1224240
1223920
1223600
1223280
1222960
1222640
1222320
1222000
1221680
1221360
1221040
1220720
1220400
1220080
1219760
1219440
1219120
1218800
1218480
1218160
1217840
1217520
1217200
1216880
1216560
1216240
1215920
1215600
1215280
1214960
1214640
1214320
1214000
1213680
1213360
1213040
1212720
1212400
1212080
1211760
1211440
1211120
1210800
1210480
1210160
1209840
1209520
1209200
1208880
1208560
1208240
1207920
1207600
1207280
1206960
1206640
1206320
1206000
1205680
1205360
1205040
1204720
1204400
1204080
1203760
1203440
1203120
1202800
1202480
1202160
1201840
1201520
1201200
1200880
1200560
1200240
1199920
1199600
1199280
1198960
1198640
1198320
1198000
1197680
1197360
1197040
1196720
1196400
1196080
1195760
1195440
1195120
1194800
1194480
1194160
1193840
1193520
1193200
1192880
1192560
1192240
1191920
1191600
1191280
1190960
1190640
1190320
1190000
1189680
1189360
1189040
1188720
1188400
1188080
1187760
1187440
1187120
1186800
1186480
1186160
1185840
1185520
1185200
1184880
1184560
1184240
1183920
1183600
1183280
1182960
1182640
1182320
1182000
1181680
1181360
1181040
1180720
1180400
1180080
1179760
1179440
1179120
1178800
1178480
1178160
1177840
1177520
1177200
1176880
1176560
1176240
1175920
1175600
1175280
1174960
1174640
1174320
1174000
1173680
1173360
1173040
1172720
1172400
1172080
1171760
1171440
1171120
1170800
1170480
1170160
1169840
1169520
1169200
1168880
1168560
1168240
1167920
1167600
1167280
1166960
1166640
1166320
1166000
1165680
1165360
1165040
1164720
1164400
1164080
1163760
1163440
1163120
1162800
1162480
1162160
1161840
1161520
1161200
1160880
1160560
1160240
1159920
1159600
1159280
1158960
1158640
1158320
1158000
1157680
1157360
1157040
1156720
1156400
1156080
1155760
1155440
1155120
1154800
1154480
1154160
1153840
1153520
1153200
1152880
1152560
1152240
1151920
1151600
1151280
1150960
1150640
1150320
1150000
1149680
1149360
1149040
1148720
1148400
1148080
1147760
1147440
1147120
1146800
1146480
1146160
1145840
1145520
1145200
1144880
1144560
1144240
1143920
1143600
1143280
1142960
1142640
1142320
1142000
1141680
1141360
1141040
1140720
1140400
1140080
1139760
1139440
1139120
1138800
1138480
1138160
1137840
1137520
1137200
1136880
1136560
1136240
1135920
1135600
1135280
1134960
1134640
1134320
1134000
1133680
1133360
1133040
1132720
1132400
1132080
1131760
1131440
1131120
1130800
1130480
1130160
1129840
1129520
1129200
1128880
1128560
1128240
1127920
1127600
1127280
1126960
1126640
1126320
1126000
1125680
1125360
1125040
1124720
1124400
1124080
1123760
1123440
1123120
1122800
1122480
1122160
1121840
1121520
1121200
1120880
1120560
1120240
1119920
1119600
1119280
1118960
1118640
1118320
1118000
1117680
1117360
1117040
1116720
1116400
1116080
1115760
1115440
1115120
1114800
1114480
1114160
1113840
1113520
1113200
1112880
1112560
1112240
1111920
1111600
1111280
1110960
1110640
1110320
1110000
1109680
1109360
1109040
1108720
1108400
1108080
1107760
1107440
1107120
1106800
1106480
1106160
1105840
1105520
1105200
1104880
1104560
1104240
1103920
1103600
1103280
1102960
1102640
1102320
1102000
1101680
1101360
1101040
1100720
1100400
1100080
1099760
1099440
1099120
1098800
1098480
1098160
1097840
1097520
1097200
1096880
1096560
1096240
1095920
1095600
1095280
1094960
1094640
1094320
1094000
1093680
1093360
1093040
1092720
1092400
1092080
1091760
1091440
1091120
1090800
1090480
1090160
1089840
1089520
1089200
1088880
1088560
1088240
1087920
1087600
1087280
1086960
1086640
1086320
1086000
1085680
1085360
1085040
1084720
1084400
1084080
1083760
1083440
1083120
1082800
1082480
1082160
1081840
1081520
1081200
1080880
1080560
1080240
1079920
1079600
1079280
1078960
1078640
1078320
1078000
1077680
1077360
1077040
1076720
1076400
1076080
1075760
1075440
1075120
1074800
1074480
1074160
1073840
1073520
1073200
1072880
1072560
1072240
1071920
1071600
1071280
1070960
1070640
1070320
1070000
1069680
1069360
1069040
1068720
1068400
1068080
1067760
1067440
1067120
1066800
1066480
1066160
1065840
1065520
1065200
1064880
1064560
1064240
1063920
1063600
1063280
1062960
1062640
1062320
1062000
1061680
1061360
1061040
1060720
1060400
1060080
1059760
1059440
1059120
1058800
1058480
1058160
1057840
1057520
1057200
1056880
1056560
1056240
1055920
1055600
1055280
1054960
1054640
1054320
1054000
1053680
1053360
1053040
1052720
1052400
1052080
1051760
1051440
1051120
1050800
1050480
1050160
1049840
1049520
1049200
1048880
1048560
1048240
1047920
1047600
1047280
1046960
1046640
1046320
1046000
1045680
1045360
1045040
1044720
1044400
1044080
1043760
1043440
1043120
1042800
1042480
1042160
1041840
1041520
1041200
1040880
1040560
1040240
1039920
1039600
1039280
1038960
1038640
1038320
1038000
1037680
1037360
1037040
1036720
1036400
1036080
1035760
1035440
1035120
1034800
1034480
1034160
1033840
1033520
1033200
1032880
1032560
1032240
1031920
1031600
1031280
1030960
1030640
1030320
1030000
1029680
1029360
1029040
1028720
1028400
1028080
1027760
1027440
1027120
1026800
1026480
1026160
1025840
1025520
1025200
1024880
1024560
1024240
1023920
1023600
1023280
1022960
1022640
1022320
1022000
1021680
1021360
1021040
1020720
1020400
1020080
1019760
1019440
1019120
1018800
1018480
1018160
1017840
1017520
1017200
1016880
1016560
1016240
1015920
1015600
1015280
1014960
1014640
1014320
1014000
1013680
1013360
1013040
1012720
1012400
1012080
1011760
1011440
1011120
1010800
1010480
1010160
1009840
1009520
1009200
1008880
1008560
1008240
1007920
1007600
1007280
1006960
1006640
1006320
1006000
1005680
1005360
1005040
1004720
1004400
1004080
1003760
1003440
1003120
1002800
1002480
1002160
1001840
1001520
1001200
1000880
1000560
1000240
999920
999600
999280
998960
998640
998320
998000
997680
997360
997040
996720
996400
996080
995760
995440
995120
994800
994480
994160
993840
993520
993200
992880
992560
992240
991920
991600
991280
990960
990640
990320
990000
989680
989360
989040
988720
988400
988080
987760
987440
987120
986800
986480
986160
985840
985520
985200
984880
984560
984240
983920
983600
983280
982960
982640
982320
982000
981680
981360
981040
980720
980400
980080
979760
979440
979120
978800
978480
978160
977840
977520
977200
976880
976560
976240
975920
975600
975280
974960
974640
974320
974000
973680
973360
973040
972720
972400
972080
971760
971440
971120
970800
970480
970160
969840
969520
969200
968880
968560
968240
967920
967600
967280
966960
966640
966320
966000
965680
965360
965040
964720
964400
964080
963760
963440
963120
962800
962480
962160
961840
961520
961200
960880
960560
960240
959920
959600
959280
958960
958640
958320
958000
957680
957360
957040
956720
956400
956080
955760
955440
955120
954800
954480
954160
953840
953520
953200
952880
952560
952240
951920
951600
951280
950960
950640
950320
950000
949680
949360
949040
948720
948400
948080
947760
947440
947120
946800
946480
946160
945840
945520
945200
944880
944560
944240
943920
943600
943280
942960
942640
942320
942000
941680
941360
941040
940720
940400
940080
939760
939440
939120
938800
938480
938160
937840
937520
937200
936880
936560
936240
935920
935600
935280
934960
934640
934320
934000
933680
933360
933040
932720
932400
932080
931760
931440
931120
930800
930480
930160
929840
929520
929200
928880
928560
928240
927920
927600
927280
926960
926640
926320
926000
925680
925360
925040
924720
924400
924080
923760
923440
923120
922800
922480
922160
921840
921520
921200
920880
920560
920240
919920
919600
919280
918960
918640
918320
918000
917680
917360
917040
916720
916400
916080
915760
915440
915120
914800
914480
914160
913840
913520
913200
912880
912560
912240
911920
911600
911280
910960
910640
910320
910000
909680
909360
909040
908720
908400
908080
907760
907440
907120
906800
906480
906160
905840
905520
905200
904880
904560
904240
903920
903600
903280
902960
902640
902320
902000
901680
901360
901040
900720
900400
900080
899760
899440
899120
898800
898480
898160
897840
897520
897200
896880
896560
896240
895920
895600
895280
894960
894640
894320
894000
893680
893360
893040
892720
892400
892080
891760
891440
891120
890800
890480
890160
889840
889520
889200
888880
888560
888240
887920
887600
887280
886960
886640
886320
886000
885680
885360
885040
884720
884400
884080
883760
883440
883120
882800
882480
882160
881840
881520
881200
880880
880560
880240
879920
879600
879280
878960
878640
878320
878000
877680
877360
877040
876720
876400
876080
875760
875440
875120
874800
874480
874160
873840
873520
873200
872880
872560
872240
871920
871600
871280
870960
870640
870320
870000
869680
869360
869040
868720
868400
868080
867760
867440
867120
866800
866480
866160
865840
865520
865200
864880
864560
864240
863920
863600
863280
862960
862640
862320
862000
861680
861360
861040
860720
860400
860080
859760
859440
859120
858800
858480
858160
857840
857520
857200
856880
856560
856240
855920
855600
855280
854960
854640
854320
854000
853680
853360
853040
852720
852400
852080
851760
851440
851120
850800
850480
850160
849840
849520
849200
848880
848560
848240
847920
847600
847280
846960
846640
846320
846000
845680
845360
845040
844720
844400
844080
843760
843440
843120
842800
842480
842160
841840
841520
841200
840880
840560
840240
839920
839600
839280
838960
838640
838320
838000
837680
837360
837040
836720
836400
836080
835760
835440
835120
834800
834480
834160
833840
833520
833200
832880
832560
832240
831920
831600
831280
830960
830640
830320
830000
829680
829360
829040
828720
828400
828080
827760
827440
827120
826800
826480
826160
825840
825520
825200
824880
824560
824240
823920
823600
823280
822960
822640
822320
822000
821680
821360
821040
820720
820400
820080
819760
819440
819120
818800
818480
818160
817840
817520
817200
816880
816560
816240
815920
815600
815280
814960
814640
814320
814000
813680
813360
813040
812720
812400
812080
811760
811440
811120
810800
810480
810160
809840
809520
809200
808880
808560
808240
807920
807600
807280
806960
806640
806320
806000
805680
805360
805040
804720
804400
804080
803760
803440
803120
802800
802480
802160
801840
801520
801200
800880
800560
800240
799920
799600
799280
798960
798640
798320
798000
797680
797360
797040
796720
796400
796080
795760
795440
795120
794800
794480
794160
793840
793520
793200
792880
792560
792240
791920
791600
791280
790960
790640
790320
790000
789680
789360
789040
788720
788400
788080
787760
787440
787120
786800
786480
786160
785840
785520
785200
784880
784560
784240
783920
783600
783280
782960
782640
782320
782000
781680
781360
781040
780720
780400
780080
779760
779440
779120
778800
778480
778160
777840
777520
777200
776880
776560
776240
775920
775600
775280
774960
774640
774320
774000
773680
773360
773040
772720
772400
772080
771760
771440
771120
770800
770480
770160
769840
769520
769200
768880
768560
768240
767920
767600
767280
766960
766640
766320
766000
765680
765360
765040
764720
764400
764080
763760
763440
763120
762800
762480
762160
761840
761520
761200
760880
760560
760240
759920
759600
759280
758960
758640
758320
758000
757680
757360
757040
756720
756400
756080
755760
755440
755120
754800
754480
754160
753840
753520
753200
752880
752560
752240
751920
751600
751280
750960
750640
750320
750000
749680
749360
749040
748720
748400
748080
747760
747440
747120
746800
746480
746160
745840
745520
745200
744880
744560
744240
743920
743600
743280
742960
742640
742320
742000
741680
741360
741040
740720
740400
740080
739760
739440
739120
738800
738480
738160
737840
737520
737200
736880
736560
736240
735920
735600
735280
734960
734640
734320
734000
733680
733360
733040
732720
732400
732080
731760
731440
731120
730800
730480
730160
729840
729520
729200
728880
728560
728240
727920
727600
727280
726960
726640
726320
726000
725680
725360
725040
724720
724400
724080
723760
723440
723120
722800
722480
722160
721840
721520
721200
720880
720560
720240
719920
719600
719280
718960
718640
718320
718000
717680
717360
717040
716720
716400
716080
715760
715440
715120
714800
714480
714160
713840
713520
713200
712880
712560
712240
711920
711600
711280
710960
710640
710320
710000
709680
709360
709040
708720
708400
708080
707760
707440
707120
706800
706480
706160
705840
705520
705200
704880
704560
704240
703920
703600
703280
702960
702640
702320
702000
701680
701360
701040
700720
700400
700080
699760
699440
699120
698800
698480
698160
697840
697520
697200
696880
696560
696240
695920
695600
695280
694960
694640
694320
694000
693680
693360
693040
692720
692400
692080
691760
691440
691120
690800
690480
690160
689840
689520
689200
688880
688560
688240
687920
687600
687280
686960
686640
686320
686000
685680
685360
685040
684720
684400
684080
683760
683440
683120
682800
682480
682160
681840
681520
681200
680880
680560
680240
679920
679600
679280
678960
678640
678320
678000
677680
677360
677040
676720
676400
676080
675760
675440
675120
674800
674480
674160
673840
673520
673200
672880
672560
672240
671920
671600
671280
670960
670640
670320
670000
669680
669360
669040
668720
668400
668080
667760
667440
667120
666800
666480
666160
665840
665520
665200
664880
664560
664240
663920
663600
663280
662960
662640
662320
662000
661680
661360
661040
660720
660400
660080
659760
659440
659120
658800
658480
658160
657840
657520
657200
656880
656560
656240
655920
655600
655280
654960
654640
654320
654000
653680
653360
653040
652720
652400
652080
651760
651440
651120
650800
650480
650160
649840
649520
649200
648880
648560
648240
647920
647600
647280
646960
646640
646320
646000
645680
645360
645040
644720
644400
644080
643760
643440
643120
642800
642480
642160
641840
641520
641200
640880
640560
640240
639920
639600
639280
638960
638640
638320
638000
637680
637360
637040
636720
636400
636080
635760
635440
635120
634800
634480
634160
633840
633520
633200
632880
632560
632240
631920
631600
631280
630960
630640
630320
630000
629680
629360
629040
628720
628400
628080
627760
627440
627120
626800
626480
626160
625840
625520
625200
624880
624560
624240
623920
623600
623280
622960
622640
622320
622000
621680
621360
621040
620720
620400
620080
619760
619440
619120
618800
618480
618160
617840
617520
617200
616880
616560
616240
615920
615600
615280
614960
614640
614320
614000
613680
613360
613040
612720
612400
612080
611760
611440
611120
610800
610480
610160
609840
609520
609200
608880
608560
608240
607920
607600
607280
606960
606640
606320
606000
605680
605360
605040
604720
604400
604080
603760
603440
603120
602800
602480
602160
601840
601520
601200
600880
600560
600240
599920
599600
599280
598960
598640
598320
598000
597680
597360
597040
596720
596400
596080
595760
595440
595120
594800
594480
594160
593840
593520
593200
592880
592560
592240
591920
591600
591280
590960
590640
590320
590000
589680
589360
589040
588720
588400
588080
587760
587440
587120
586800
586480
586160
585840
585520
585200
584880
584560
584240
583920
583600
583280
582960
582640
582320
582000
581680
581360
581040
580720
580400
580080
579760
579440
579120
578800
578480
578160
577840
577520
577200
576880
576560
576240
575920
575600
575280
574960
574640
574320
574000
573680
573360
573040
572720
572400
572080
571760
571440
571120
570800
570480
570160
569840
569520
569200
568880
568560
568240
567920
567600
567280
566960
566640
566320
566000
565680
565360
565040
564720
564400
564080
563760
563440
563120
562800
562480
562160
561840
561520
561200
560880
560560
560240
559920
559600
559280
558960
558640
558320
558000
557680
557360
557040
556720
556400
556080
555760
555440
555120
554800
554480
554160
553840
553520
553200
552880
552560
552240
551920
551600
551280
550960
550640
550320
550000
549680
549360
549040
548720
548400
548080
547760
547440
547120
546800
546480
546160
545840
545520
545200
544880
544560
544240
543920
543600
543280
542960
542640
542320
542000
541680
541360
541040
540720
540400
540080
539760
539440
539120
538800
538480
538160
537840
537520
537200
536880
536560
536240
535920
535600
535280
534960
534640
534320
534000
533680
533360
533040
532720
532400
532080
531760
531440
531120
530800
530480
530160
529840
529520
529200
528880
528560
528240
527920
527600
527280
526960
526640
526320
526000
525680
525360
525040
524720
524400
524080
523760
523440
523120
522800
522480
522160
521840
521520
521200
520880
520560
520240
519920
519600
519280
518960
518640
518320
518000
517680
517360
517040
516720
516400
516080
515760
515440
515120
514800
514480
514160
513840
513520
513200
512880
512560
512240
511920
511600
511280
510960
510640
510320
510000
509680
509360
509040
508720
508400
508080
507760
507440
507120
506800
506480
506160
505840
505520
505200
504880
504560
504240
503920
503600
503280
502960
502640
502320
502000
501680
501360
501040
500720
500400
500080
499760
499440
499120
498800
498480
498160
497840
497520
497200
496880
496560
496240
495920
495600
495280
494960
494640
494320
494000
493680
493360
493040
492720
492400
492080
491760
491440
491120
490800
490480
490160
489840
489520
489200
488880
488560
488240
487920
487600
487280
486960
486640
486320
486000
485680
485360
485040
484720
484400
484080
483760
483440
483120
482800
482480
482160
481840
481520
481200
480880
480560
480240
479920
479600
479280
478960
478640
478320
478000
477680
477360
477040
476720
476400
476080
475760
475440
475120
474800
474480
474160
473840
473520
473200
472880
472560
472240
471920
471600
471280
470960
470640
470320
470000
469680
469360
469040
468720
468400
468080
467760
467440
467120
466800
466480
466160
465840
465520
465200
464880
464560
464240
463920
463600
463280
462960
462640
462320
462000
461680
461360
461040
460720
460400
460080
459760
459440
459120
458800
458480
458160
457840
457520
457200
456880
456560
456240
455920
455600
455280
454960
454640
454320
454000
453680
453360
453040
452720
452400
452080
451760
451440
451120
450800
450480
450160
449840
449520
449200
448880
448560
448240
447920
447600
447280
446960
446640
446320
446000
445680
445360
445040
444720
444400
444080
443760
443440
443120
442800
442480
442160
441840
441520
441200
440880
440560
440240
439920
439600
439280
438960
438640
438320
438000
437680
437360
437040
436720
436400
436080
435760
435440
435120
434800
434480
434160
433840
433520
433200
432880
432560
432240
431920
431600
431280
430960
430640
430320
430000
429680
429360
429040
428720
428400
428080
427760
427440
427120
426800
426480
426160
425840
425520
425200
424880
424560
424240
423920
423600
423280
422960
422640
422320
422000
421680
421360
421040
420720
420400
420080
419760
419440
419120
418800
418480
418160
417840
417520
417200
416880
416560
416240
415920
415600
415280
414960
414640
414320
414000
413680
413360
413040
412720
412400
412080
411760
411440
411120
410800
410480
410160
409840
409520
409200
408880
408560
408240
407920
407600
407280
406960
406640
406320
406000
405680
405360
405040
404720
404400
404080
403760
403440
403120
402800
402480
402160
401840
401520
401200
400880
400560
400240
399920
399600
399280
398960
398640
398320
398000
397680
397360
397040
396720
396400
396080
395760
395440
395120
394800
394480
394160
393840
393520
393200
392880
392560
392240
391920
391600
391280
390960
390640
390320
390000
389680
389360
389040
388720
388400
388080
387760
387440
387120
386800
386480
386160
385840
385520
385200
384880
384560
384240
383920
383600
383280
382960
382640
382320
382000
381680
381360
381040
380720
380400
380080
379760
379440
379120
378800
378480
378160
377840
377520
377200
376880
376560
376240
375920
375600
375280
374960
374640
374320
374000
373680
373360
373040
372720
372400
372080
371760
371440
371120
370800
370480
370160
369840
369520
369200
368880
368560
368240
367920
367600
367280
366960
366640
366320
366000
365680
365360
365040
364720
364400
364080
363760
363440
363120
362800
362480
362160
361840
361520
361200
360880
360560
360240
359920
359600
359280
358960
358640
358320
358000
357680
357360
357040
356720
356400
356080
355760
355440
355120
354800
354480
354160
353840
353520
353200
352880
352560
352240
351920
351600
351280
350960
350640
350320
350000
349680
349360
349040
348720
348400
348080
347760
347440
347120
346800
346480
346160
345840
345520
345200
344880
344560
344240
343920
343600
343280
342960
342640
342320
342000
341680
341360
341040
340720
340400
340080
339760
339440
339120
338800
338480
338160
337840
337520
337200
336880
336560
336240
335920
335600
335280
334960
334640
334320
334000
333680
333360
333040
332720
332400
332080
331760
331440
331120
330800
330480
330160
329840
329520
329200
328880
328560
328240
327920
327600
327280
326960
326640
326320
326000
325680
325360
325040
324720
324400
324080
323760
323440
323120
322800
322480
322160
321840
321520
321200
320880
320560
320240
319920
319600
319280
318960
318640
318320
318000
317680
317360
317040
316720
316400
316080
315760
315440
315120
314800
314480
314160
313840
313520
313200
312880
312560
312240
311920
311600
311280
310960
310640
310320
310000
309680
309360
309040
308720
308400
308080
307760
307440
307120
306800
306480
306160
305840
305520
305200
304880
304560
304240
303920
303600
303280
302960
302640
302320
302000
301680
301360
301040
300720
300400
300080
299760
299440
299120
298800
298480
298160
297840
297520
297200
296880
296560
296240
295920
295600
295280
294960
294640
294320
294000
293680
293360
293040
292720
292400
292080
291760
291440
291120
290800
290480
290160
289840
289520
289200
288880
288560
288240
287920
287600
287280
286960
286640
286320
286000
285680
285360
285040
284720
284400
284080
283760
283440
283120
282800
282480
282160
281840
281520
281200
280880
280560
280240
279920
279600
279280
278960
278640
278320
278000
277680
277360
277040
276720
276400
276080
275760
275440
275120
274800
274480
274160
273840
273520
273200
272880
272560
272240
271920
271600
271280
270960
270640
270320
270000
269680
269360
269040
268720
268400
268080
267760
267440
267120
266800
266480
266160
265840
265520
265200
264880
264560
264240
263920
263600
263280
262960
262640
262320
262000
261680
261360
261040
260720
260400
260080
259760
259440
259120
258800
258480
258160
257840
257520
257200
256880
256560
256240
255920
255600
255280
254960
254640
254320
254000
253680
253360
253040
252720
252400
252080
251760
251440
251120
250800
250480
250160
249840
249520
249200
248880
248560
248240
247920
247600
247280
246960
246640
246320
246000
245680
245360
245040
244720
244400
244080
243760
243440
243120
242800
242480
242160
241840
241520
241200
240880
240560
240240
239920
239600
239280
238960
238640
238320
238000
237680
237360
237040
236720
236400
236080
235760
235440
235120
234800
234480
234160
233840
233520
233200
232880
232560
232240
231920
231600
231280
230960
230640
230320
230000
229680
229360
229040
228720
228400
228080
227760
227440
227120
226800
226480
226160
225840
225520
225200
224880
224560
224240
223920
223600
223280
222960
222640
222320
222000
221680
221360
221040
220720
220400
220080
219760
219440
219120
218800
218480
218160
217840
217520
217200
216880
216560
216240
215920
215600
215280
214960
214640
214320
214000
213680
213360
213040
212720
212400
212080
211760
211440
211120
210800
210480
210160
209840
209520
209200
208880
208560
208240
207920
207600
207280
206960
206640
206320
206000
205680
205360
205040
204720
204400
204080
203760
203440
203120
202800
202480
202160
201840
201520
201200
200880
200560
200240
199920
199600
199280
198960
198640
198320
198000
197680
197360
197040
196720
196400
196080
195760
195440
195120
194800
194480
194160
193840
193520
193200
192880
192560
192240
191920
191600
191280
190960
190640
190320
190000
189680
189360
189040
188720
188400
188080
187760
187440
187120
186800
186480
186160
185840
185520
185200
184880
184560
184240
183920
183600
183280
182960
182640
182320
182000
181680
181360
181040
180720
180400
180080
179760
179440
179120
178800
178480
178160
177840
177520
177200
176880
176560
176240
175920
175600
175280
174960
174640
174320
174000
173680
173360
173040
172720
172400
172080
171760
171440
171120
170800
170480
170160
169840
169520
169200
168880
168560
168240
167920
167600
167280
166960
166640
166320
166000
165680
165360
165040
164720
164400
164080
163760
163440
163120
162800
162480
162160
161840
161520
161200
160880
160560
160240
159920
159600
159280
158960
158640
158320
158000
157680
157360
157040
156720
156400
156080
155760
155440
155120
154800
154480
154160
153840
153520
153200
152880
152560
152240
151920
151600
151280
150960
150640
150320
150000
149680
149360
149040
148720
148400
148080
147760
147440
147120
146800
146480
146160
145840
145520
145200
144880
144560
144240
143920
143600
143280
142960
142640
142320
142000
141680
141360
141040
140720
140400
140080
139760
139440
139120
138800
138480
138160
137840
137520
137200
136880
136560
136240
135920
135600
135280
134960
134640
134320
134000
133680
133360
133040
132720
132400
132080
131760
131440
131120
130800
130480
130160
129840
129520
129200
128880
128560
128240
127920
127600
127280
126960
126640
126320
126000
125680
125360
125040
124720
124400
124080
123760
123440
123120
122800
122480
122160
121840
121520
121200
120880
120560
120240
119920
119600
119280
118960
118640
118320
118000
117680
117360
117040
116720
116400
116080
115760
115440
115120
114800
114480
114160
113840
113520
113200
112880
112560
112240
111920
111600
111280
110960
110640
110320
110000
109680
109360
109040
108720
108400
108080
107760
107440
107120
106800
106480
106160
105840
105520
105200
104880
104560
104240
103920
103600
103280
102960
102640
102320
102000
101680
101360
101040
100720
100400
100080
99760
99440
99120
98800
98480
98160
97840
97520
97200
96880
96560
96240
95920
95600
95280
94960
94640
94320
94000
93680
93360
93040
92720
92400
92080
91760
91440
91120
90800
90480
90160
89840
89520
89200
88880
88560
88240
87920
87600
87280
86960
86640
86320
86000
85680
85360
85040
84720
84400
84080
83760
83440
83120
82800
82480
82160
81840
81520
81200
80880
80560
80240
79920
79600
79280
78960
78640
78320
78000
77680
77360
77040
76720
76400
76080
75760
75440
75120
74800
74480
74160
73840
73520
73200
72880
72560
72240
71920
71600
71280
70960
70640
70320
70000
69680
69360
69040
68720
68400
68080
67760
67440
67120
66800
66480
66160
65840
65520
65200
64880
64560
64240
63920
63600
63280
62960
62640
62320
62000
61680
61360
61040
60720
60400
60080
59760
59440
59120
58800
58480
58160
57840
57520
57200
56880
56560
56240
55920
55600
55280
54960
54640
54320
54000
53680
53360
53040
52720
52400
52080
51760
51440
51120
50800
50480
50160
49840
49520
49200
48880
48560
48240
47920
47600
47280
46960
46640
46320
46000
45680
45360
45040
44720
44400
44080
43760
43440
43120
42800
42480
42160
41840
41520
41200
40880
40560
40240
39920
39600
39280
38960
38640
38320
38000
37680
37360
37040
36720
36400
36080
35760
35440
35120
34800
34480
34160
33840
33520
33200
32880
32560
32240
31920
31600
31280
30960
30640
30320
30000
29680
29360
29040
28720
28400
28080
27760
27440
27120
26800
26480
26160
25840
25520
25200
24880
24560
24240
23920
23600
23280
22960
22640
22320
22000
21680
21360
21040
20720
20400
20080
19760
19440
19120
18800
18480
18160
17840
17520
17200
16880
16560
16240
15920
15600
15280
14960
14640
14320
14000
13680
13360
13040
12720
12400
12080
11760
11440
11120
10800
10480
10160
9840
9520
9200
8880
8560
8240
7920
7600
7280
6960
6640
6320
6000
5680
5360
5040
4720
4400
4080
3760
3440
3120
2800
2480
2160
1840
1520
1200
880
560
240
100
%
0

Fig. 104C

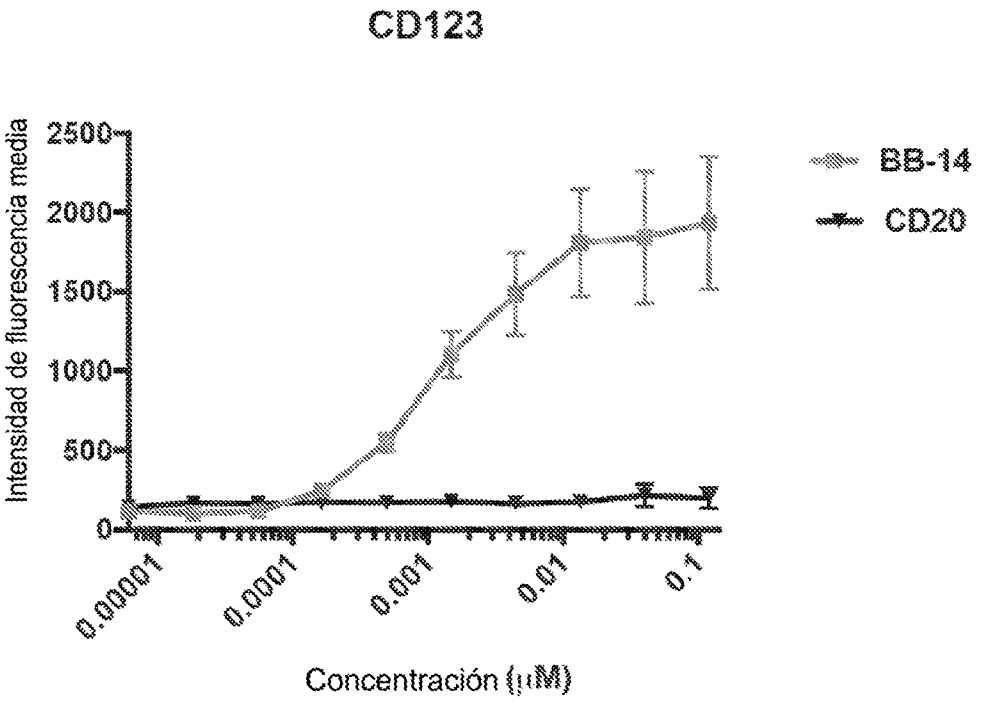


Fig. 104D

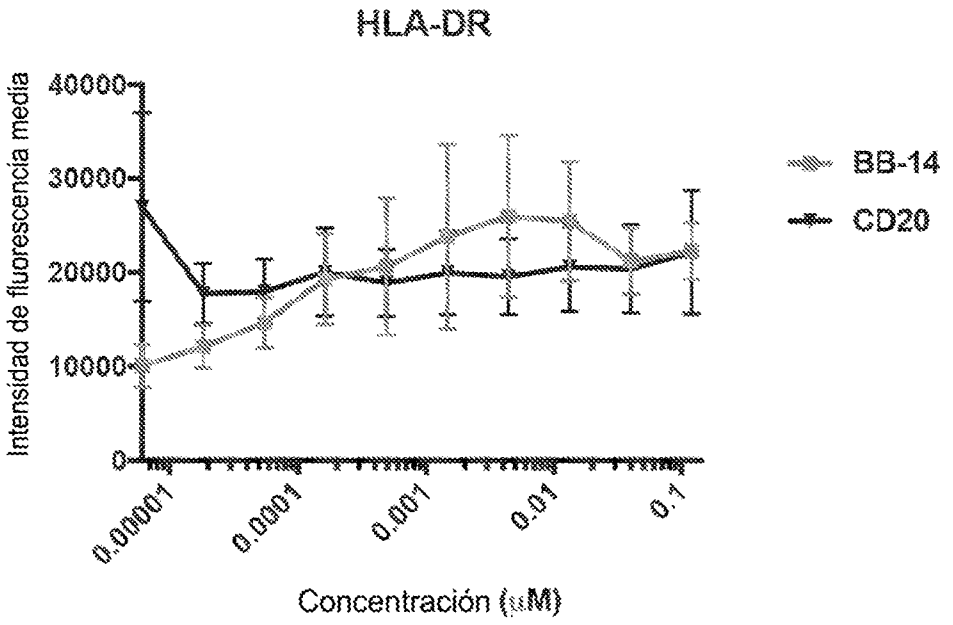


Fig. 104E

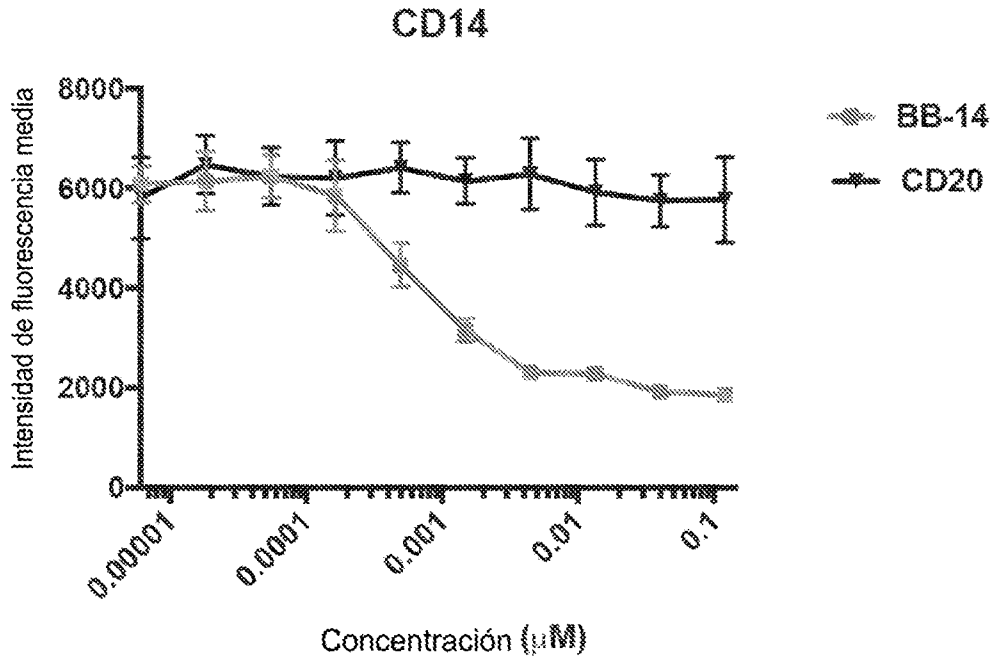


Fig. 104F

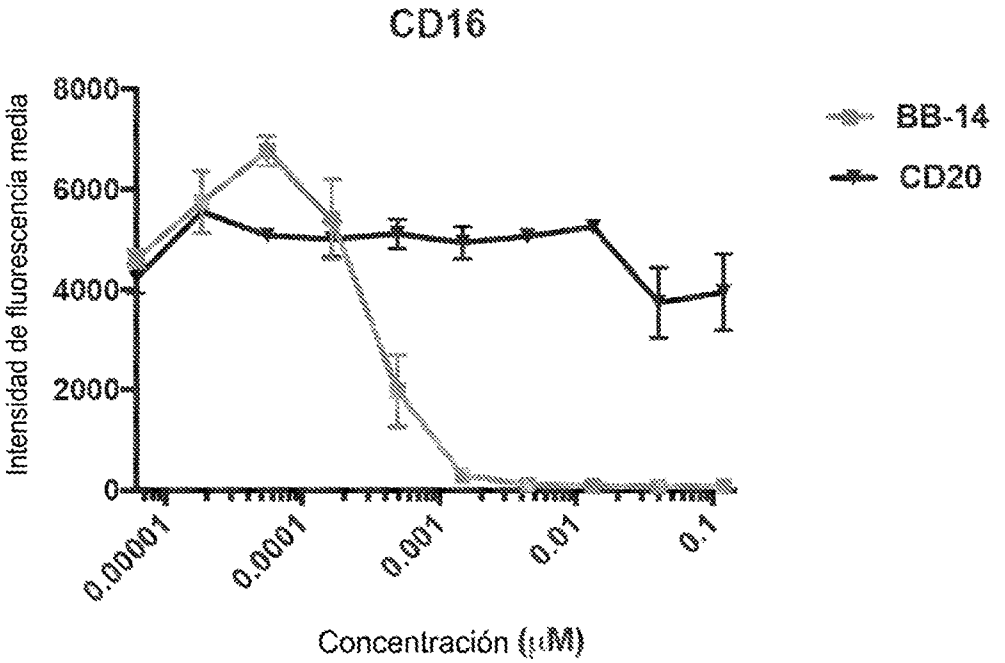


Fig. 104G

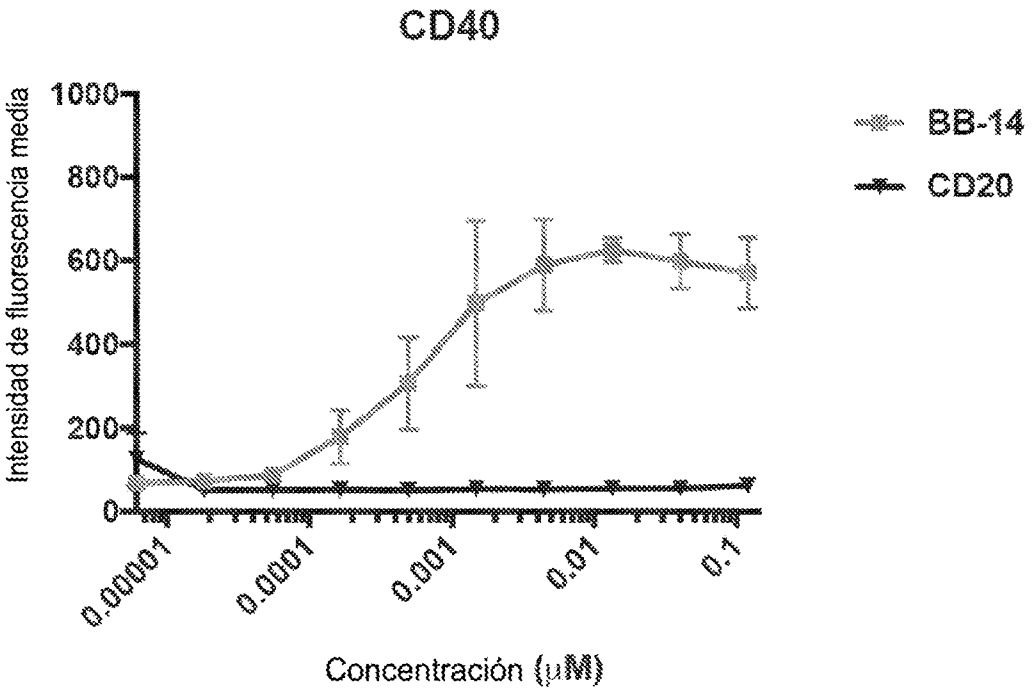


Fig. 104H

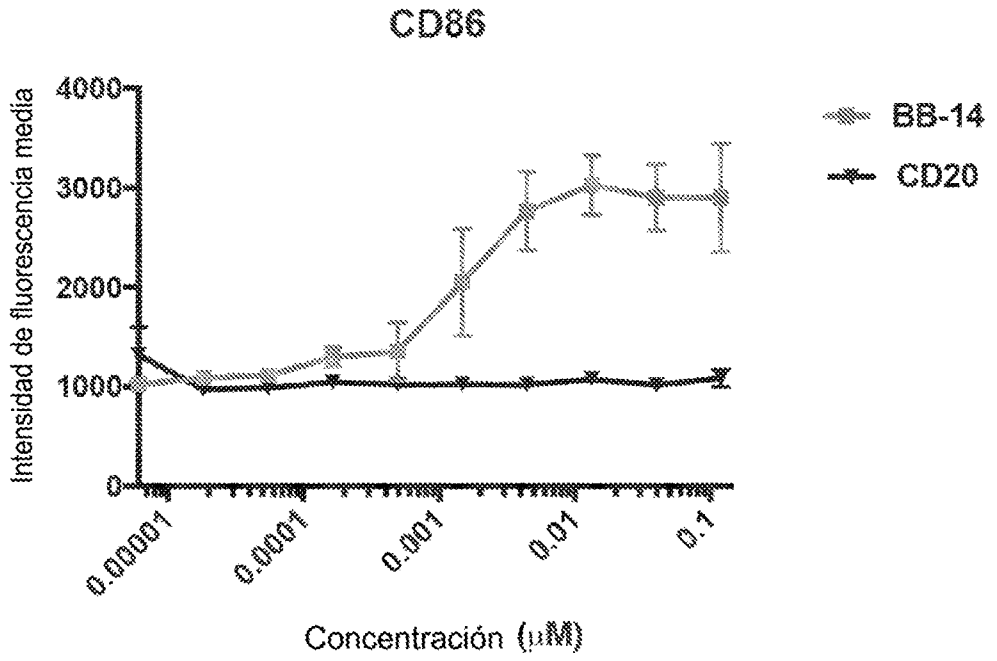


Fig. 104I

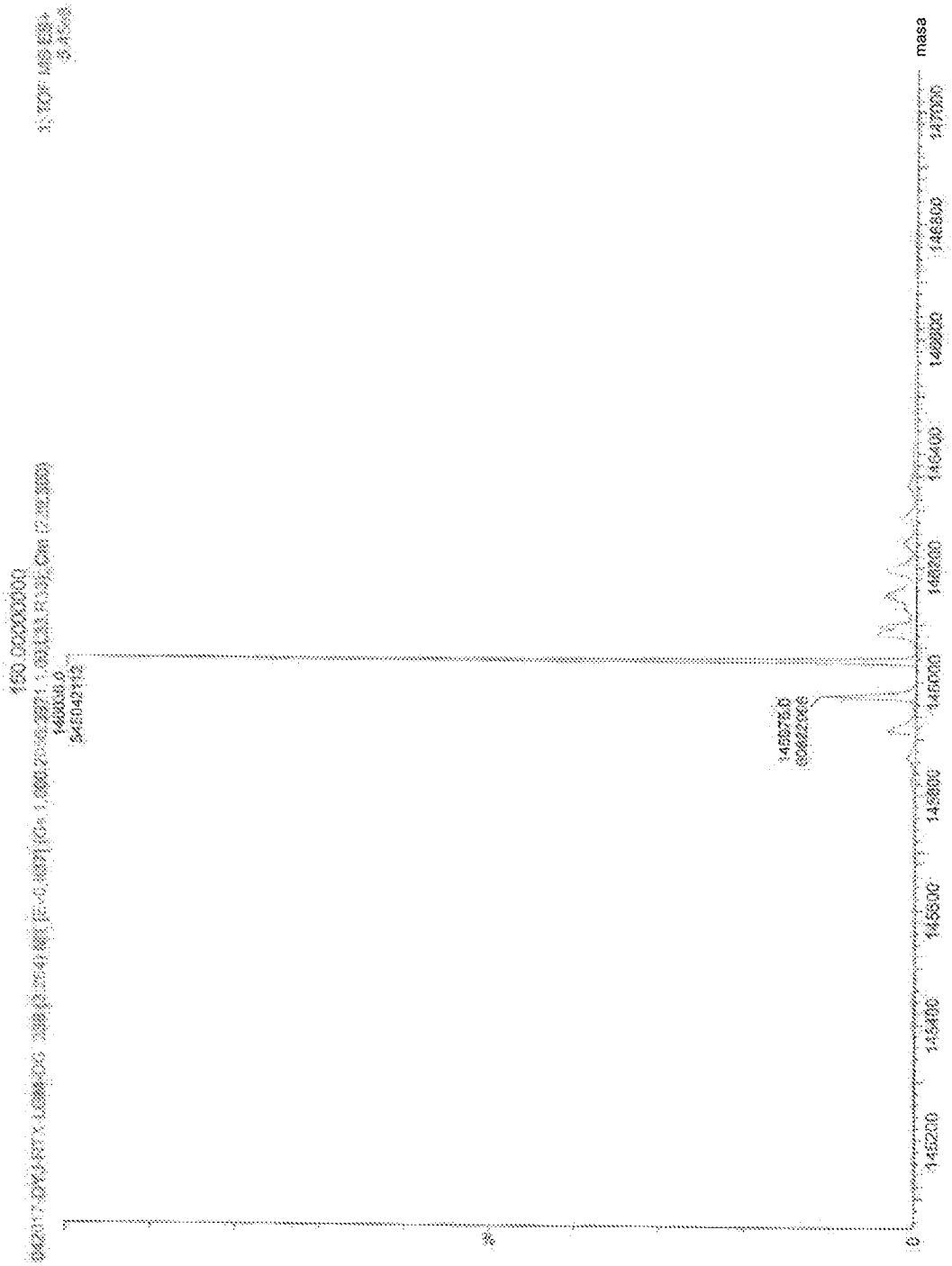

masa
%
0
1452200
1456400
1455200
1458000
1459800
1460000
1464400
1465200
1468000
1469800
1470000
1474400
1475200
1478000
1479800
1480000

Fig. 105A

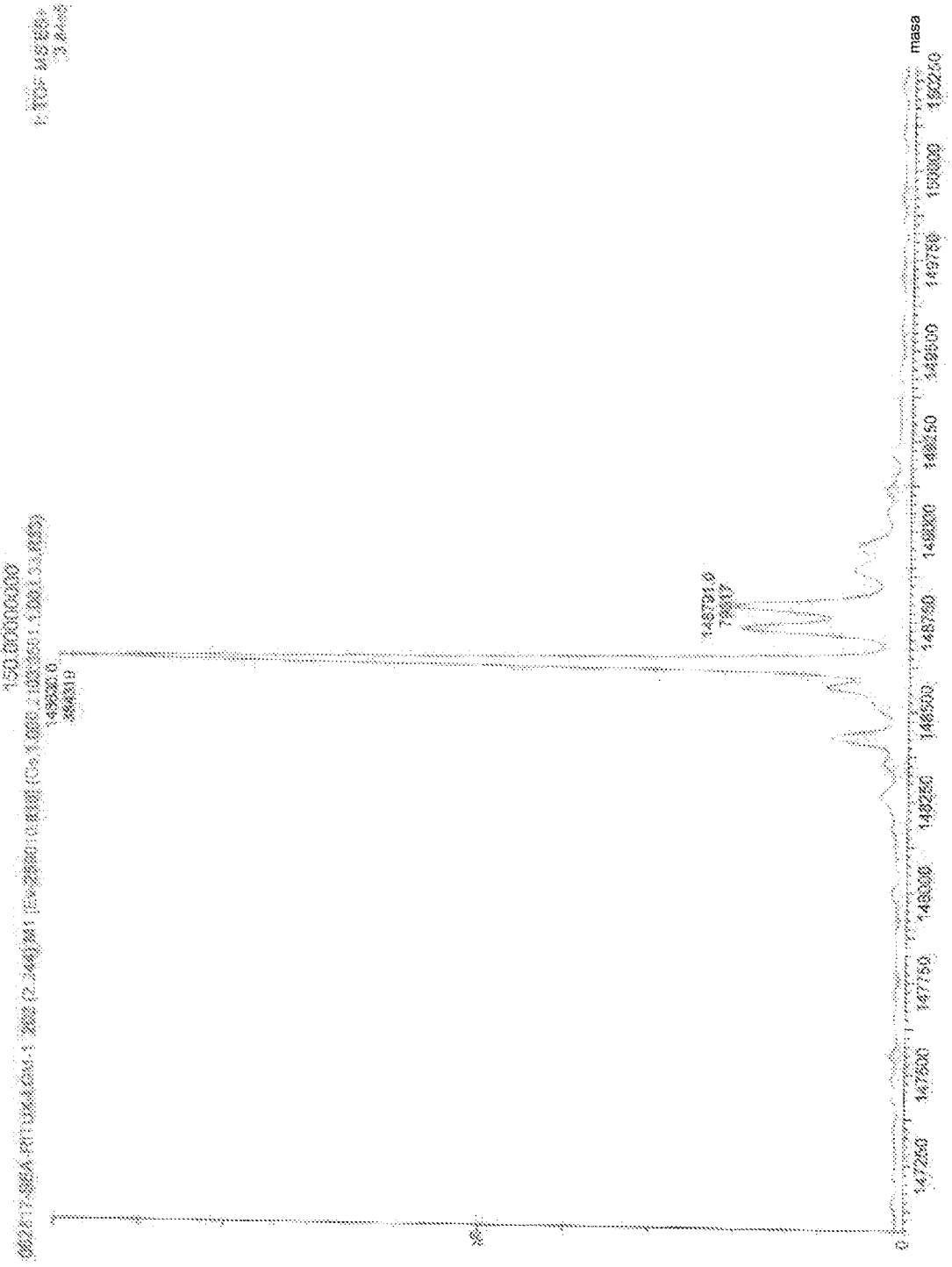


Fig. 105B

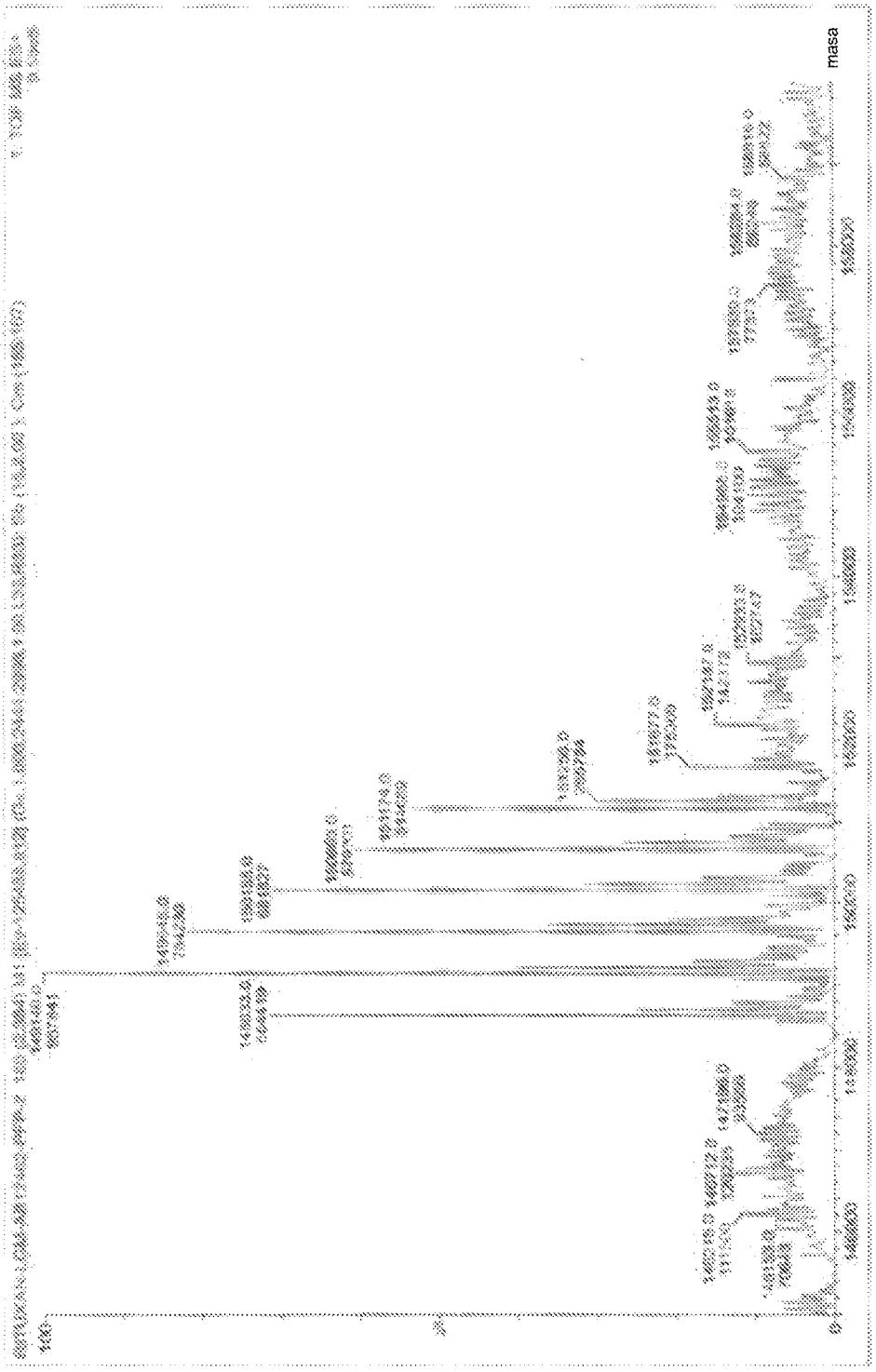


Fig. 105C

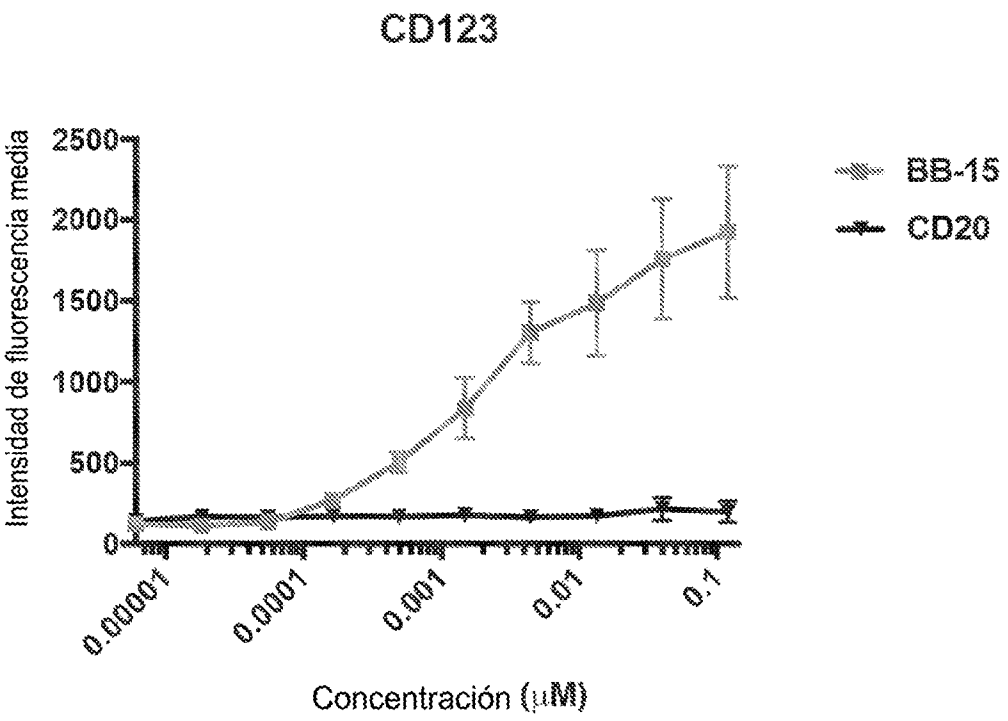


Fig. 105D

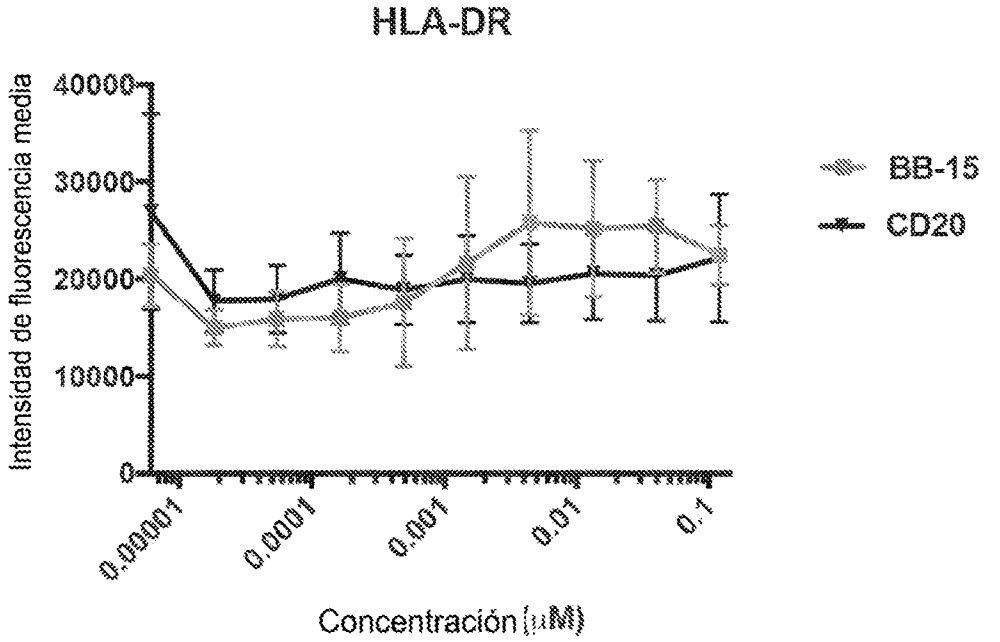


Fig. 105E

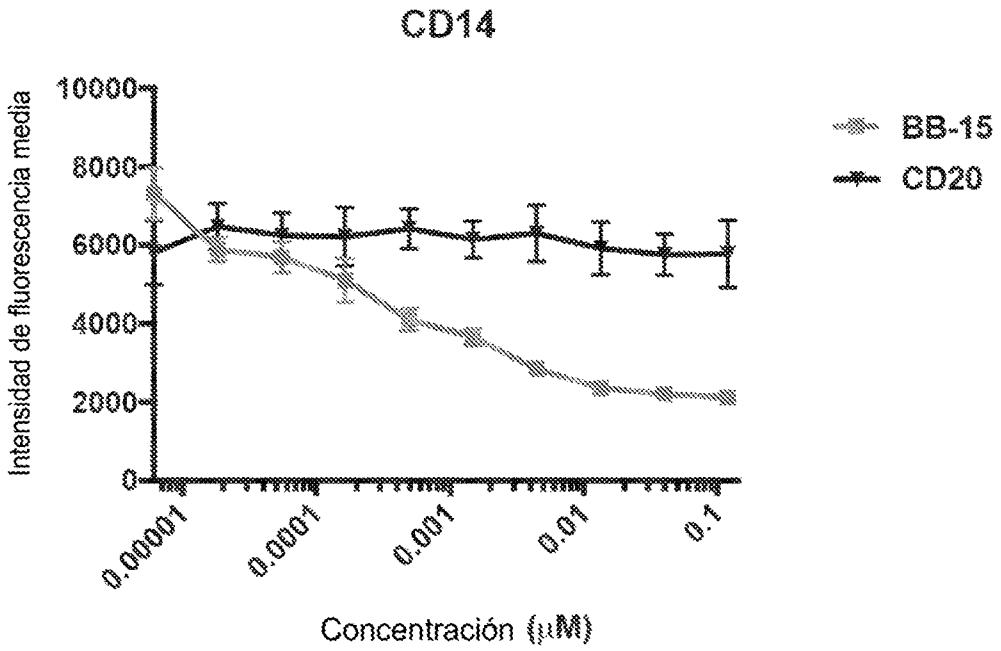


Fig. 105F

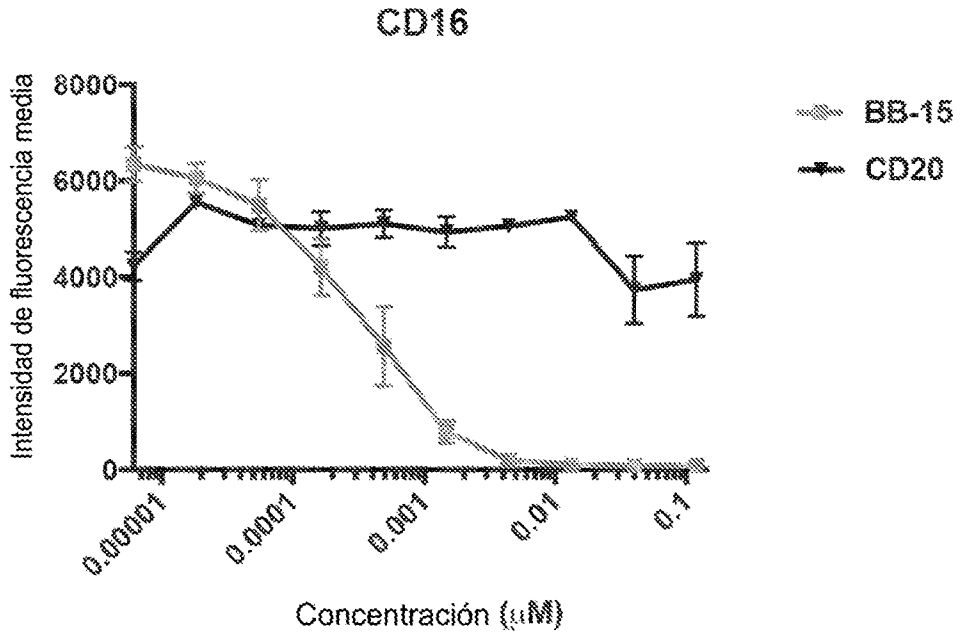


Fig. 105G

500

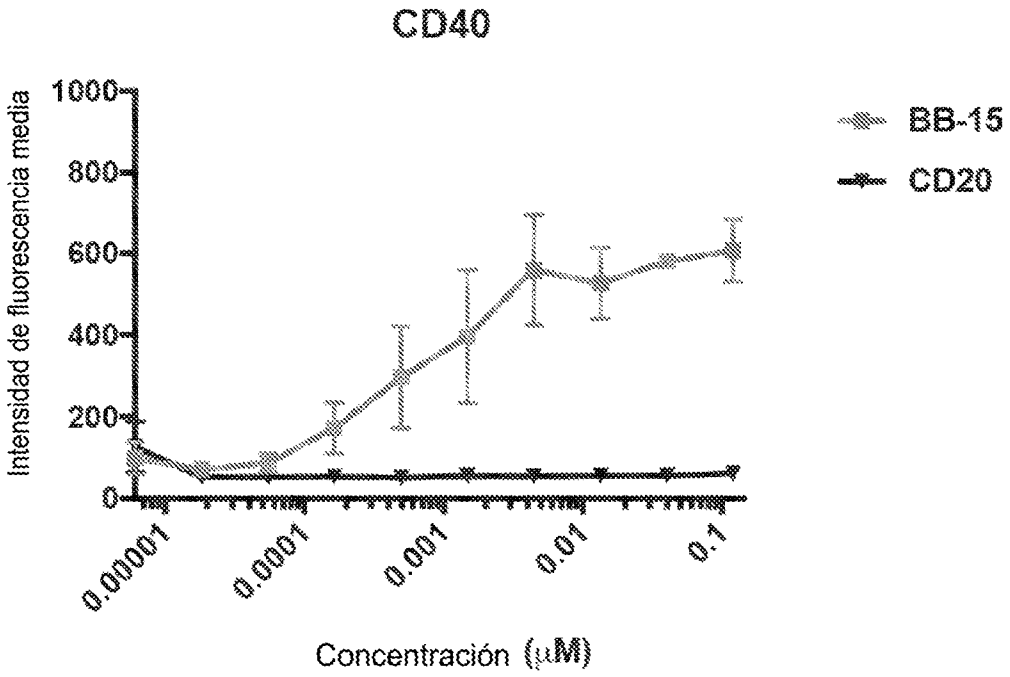


Fig. 105H

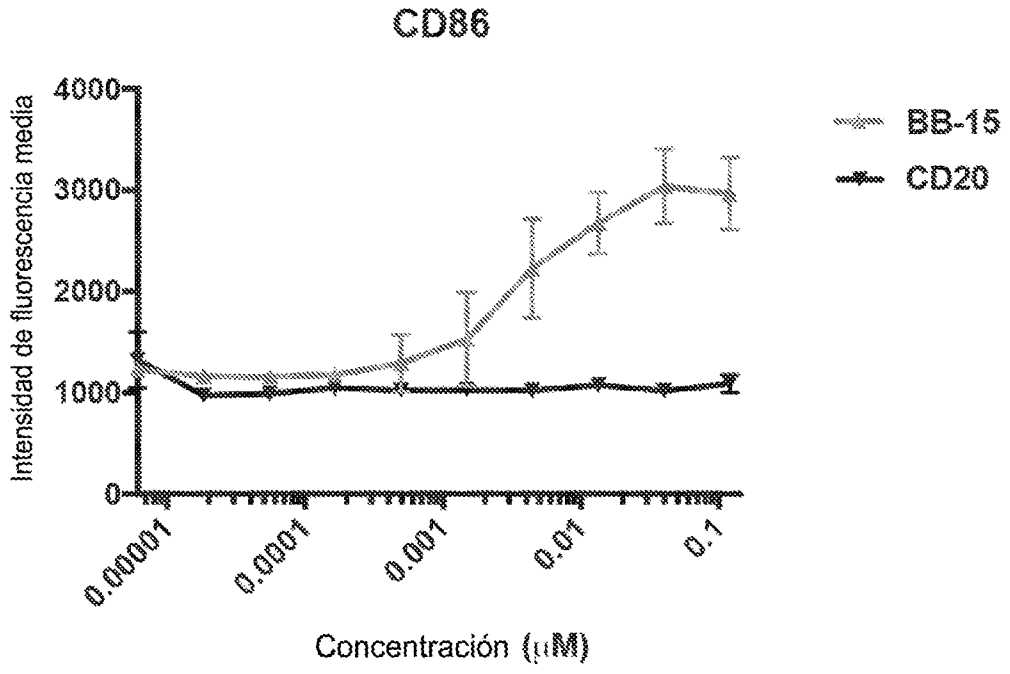
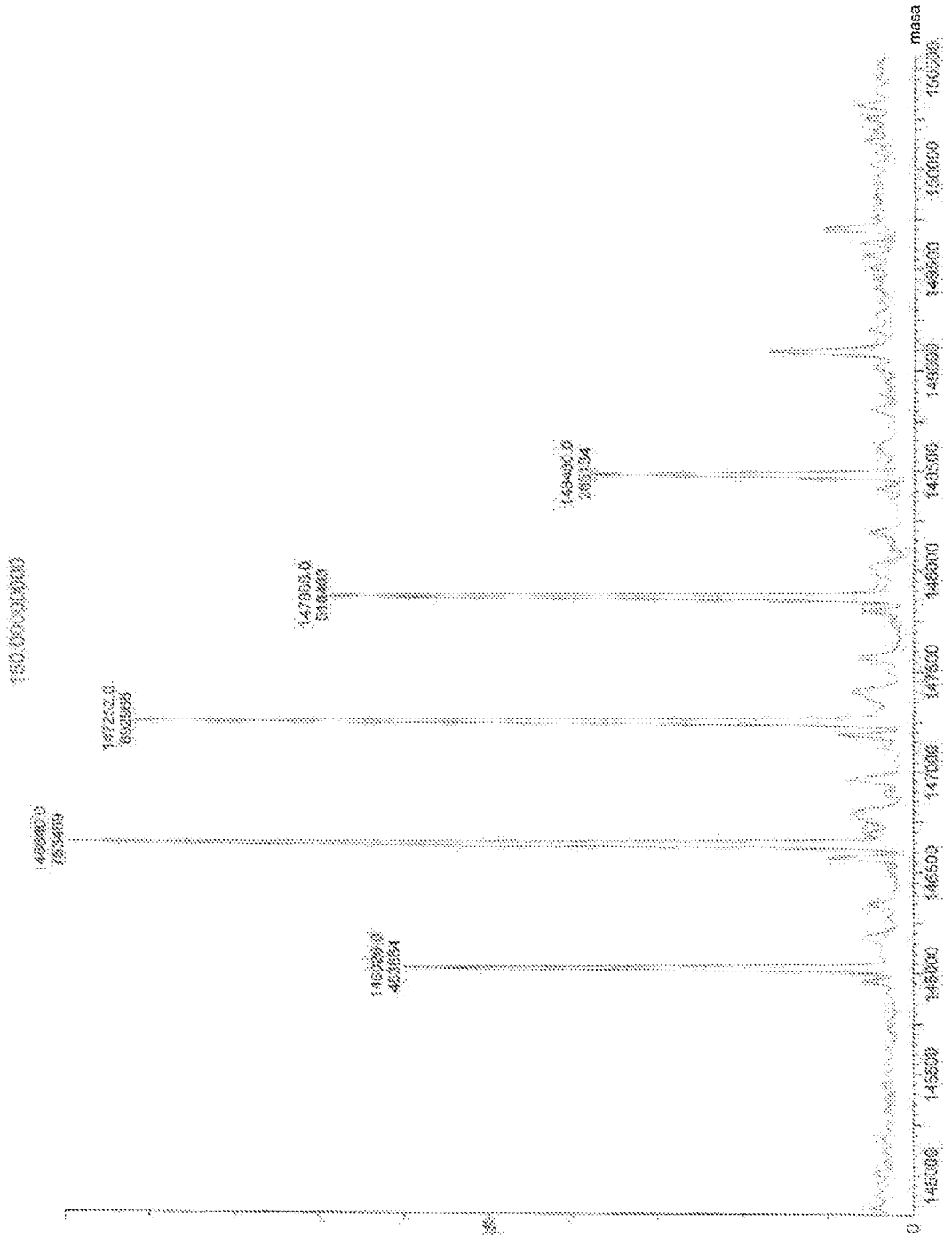


Fig. 105I


masa
100
%
0
1469.6
1473.6
1477.5
1481.5
1485.5
1489.5
1493.5
1497.5
1501.5
1505.5
1509.5
1513.5
1517.5
1521.5
1525.5
1529.5
1533.5
1537.5
1541.5
1545.5
1549.5
1553.5
1557.5
1561.5
1565.5
1569.5
1573.5
1577.5
1581.5
1585.5
1589.5
1593.5
1597.5
1601.5
1605.5
1609.5
1613.5
1617.5
1621.5
1625.5
1629.5
1633.5

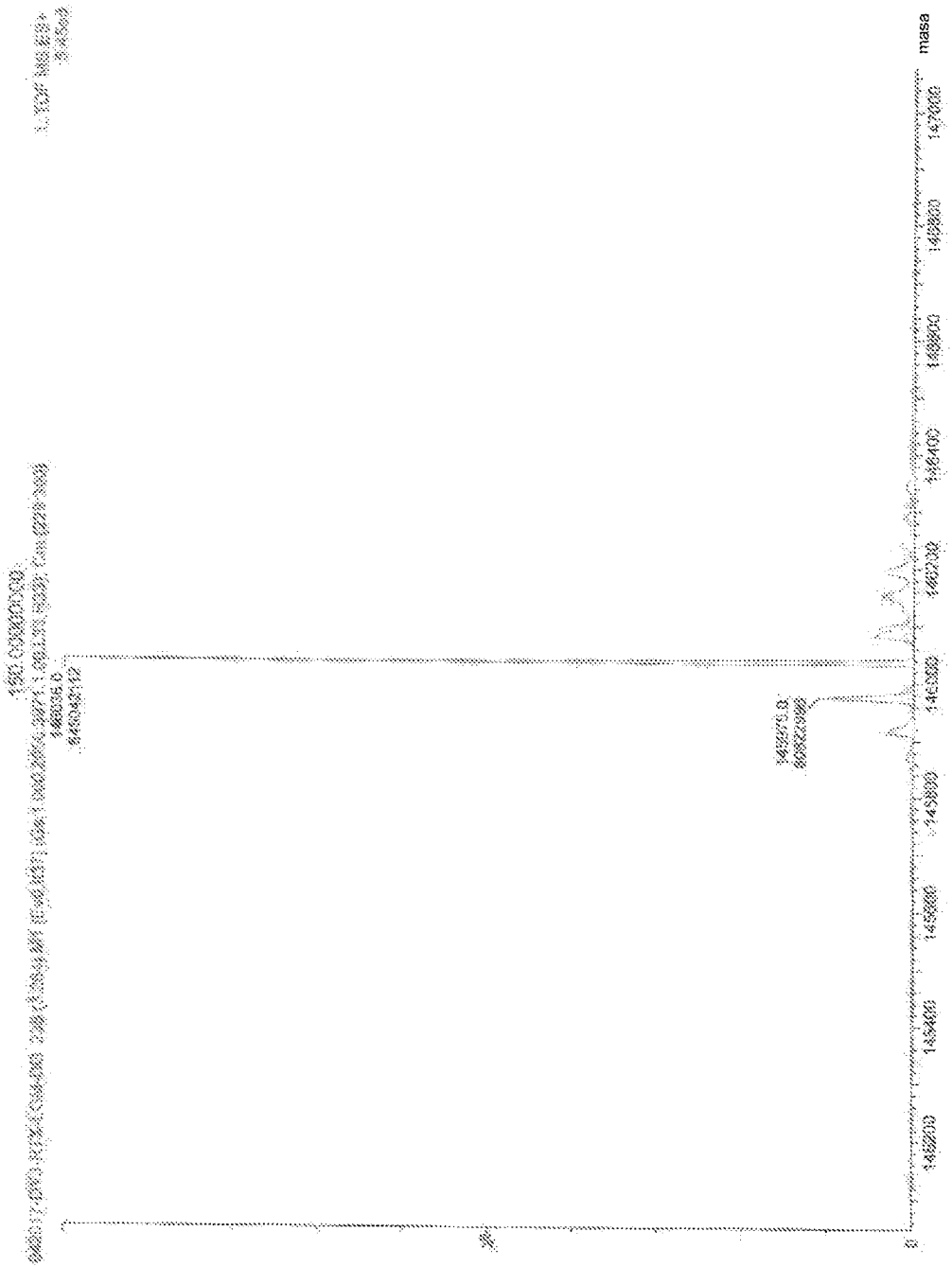


Fig. 106B

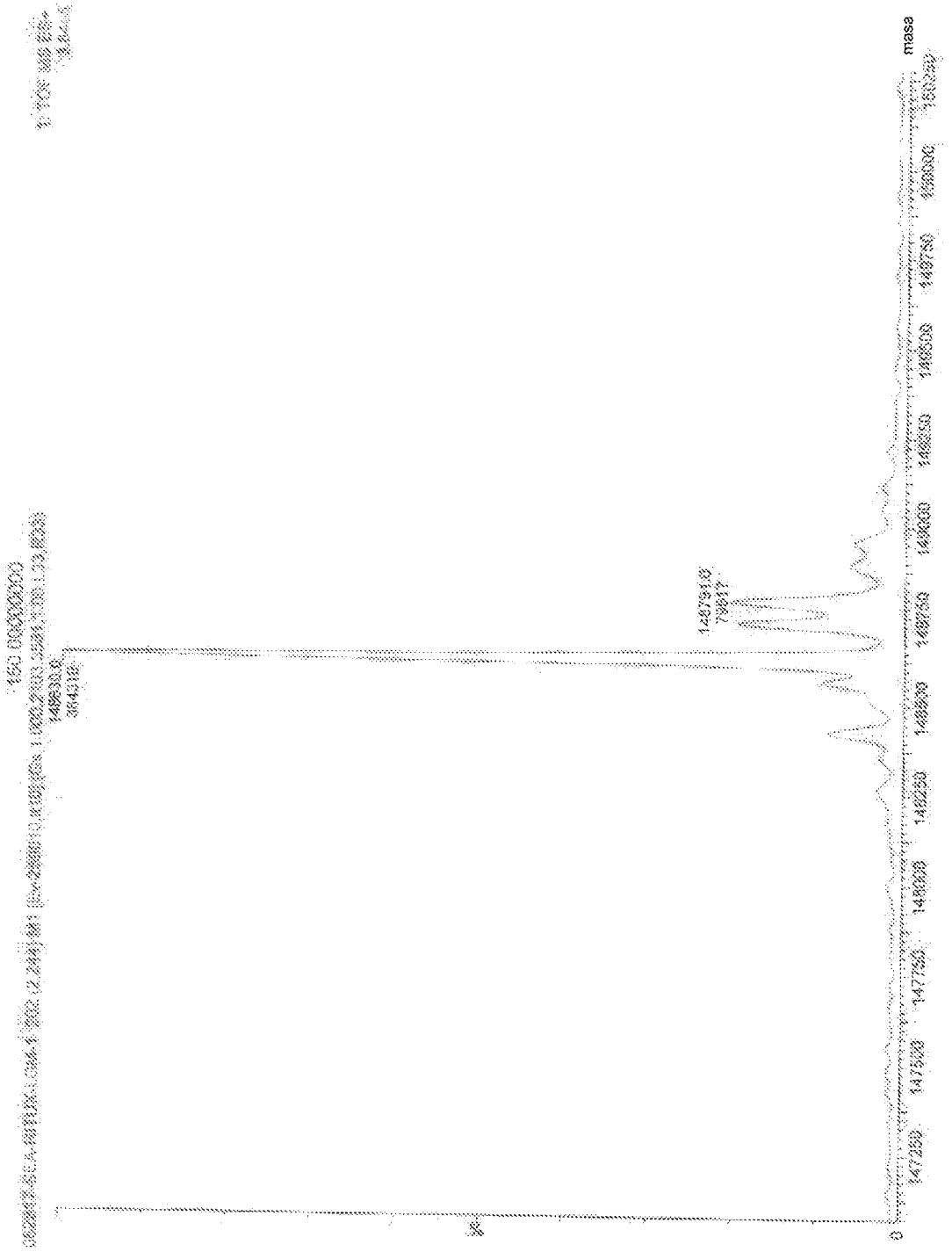

masa
%
0
147250
147500
147750
148000
148250
148500
148750
149000
149250
149500
149750
150000
150250
1497500
7911
1498000
364316

Fig. 106C

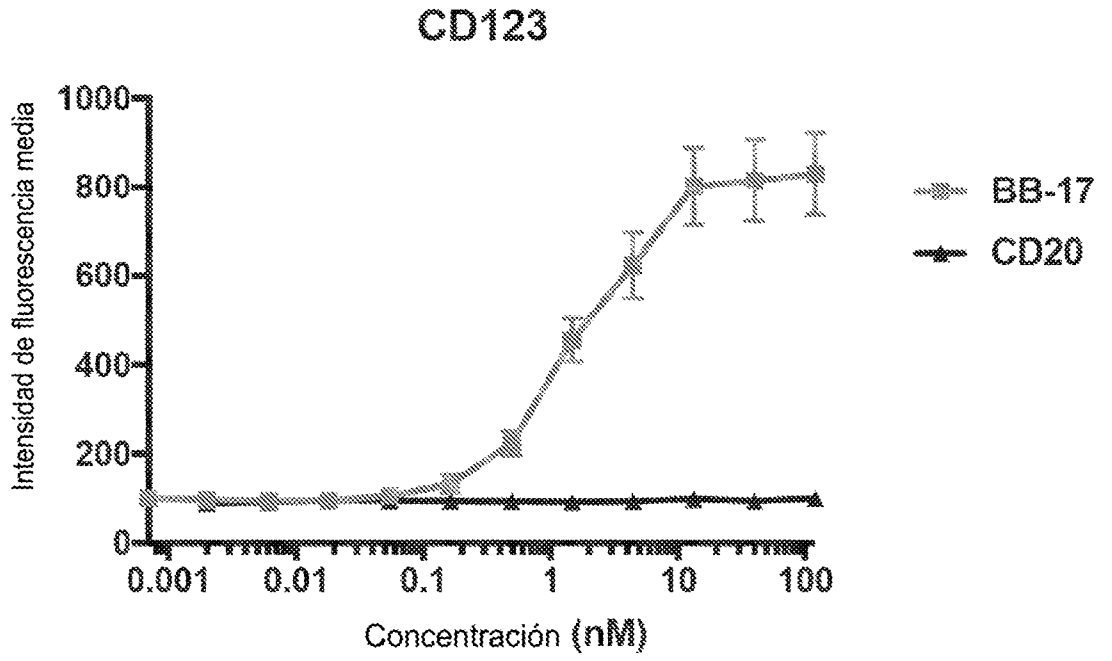


Fig. 106D

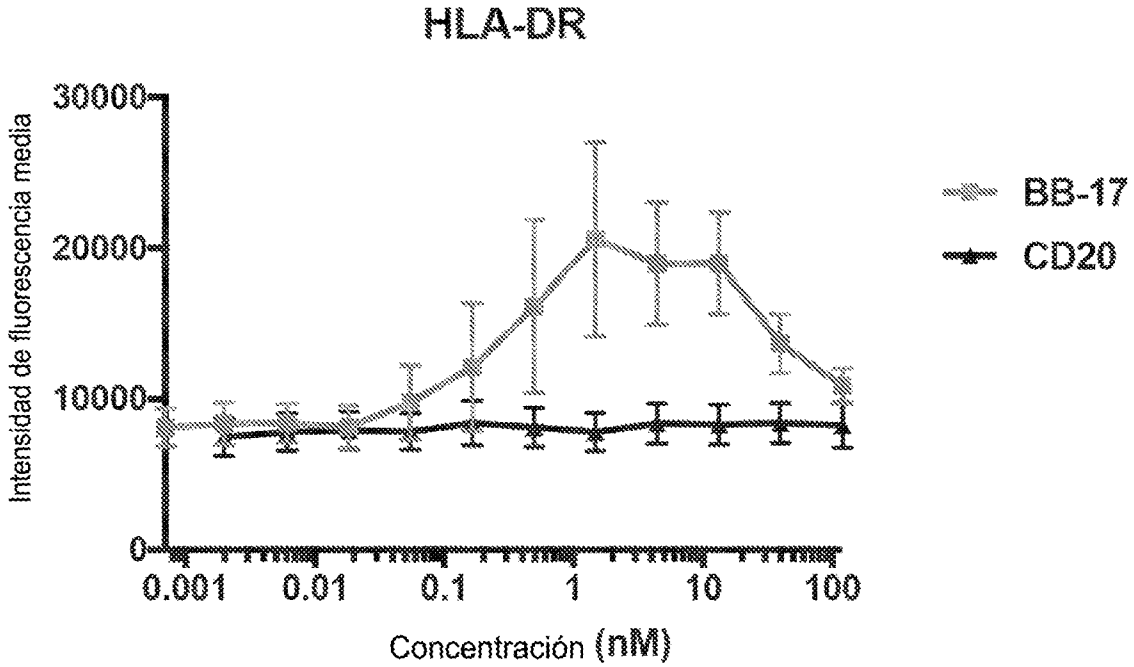


Fig. 106E

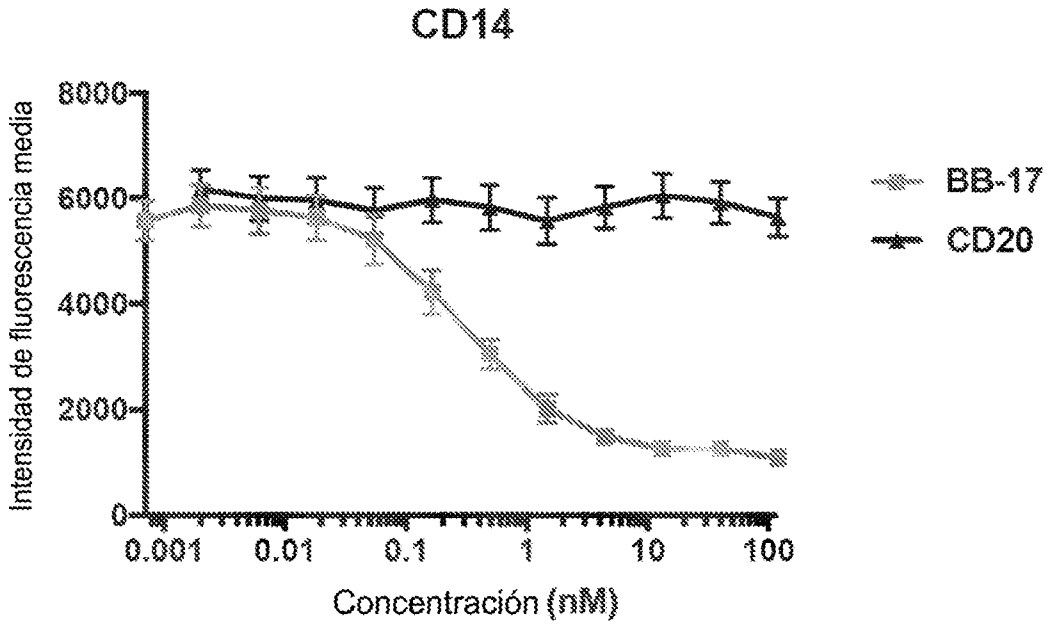


Fig. 106F

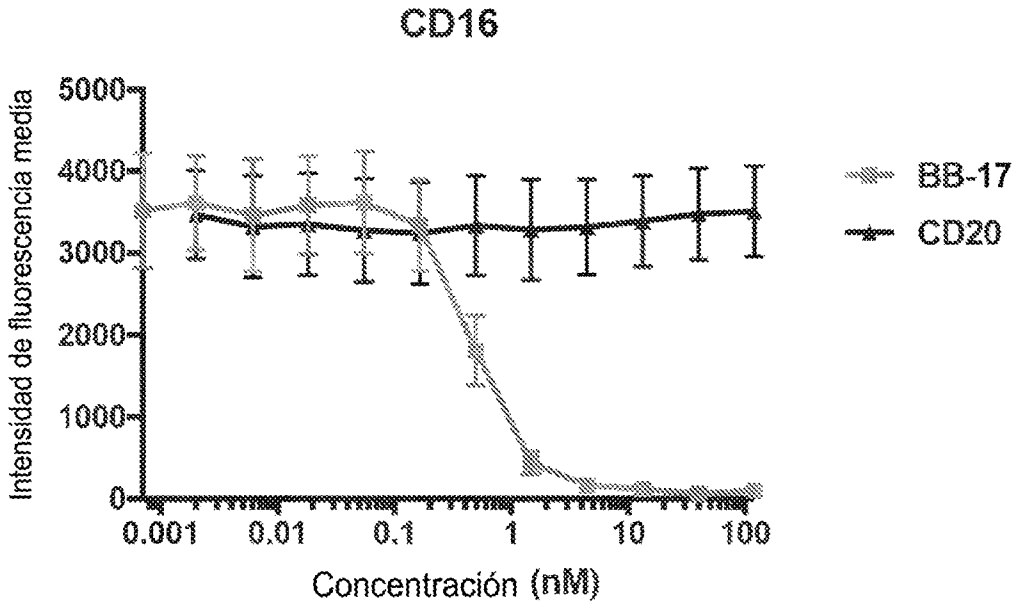


Fig. 106G

506

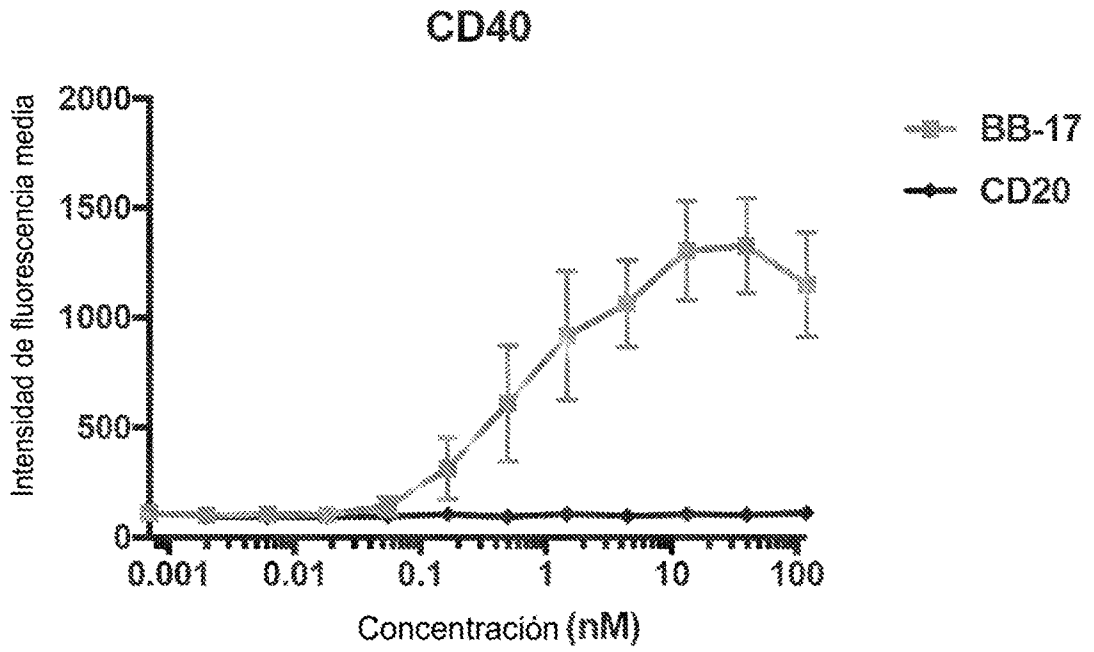


Fig. 106H

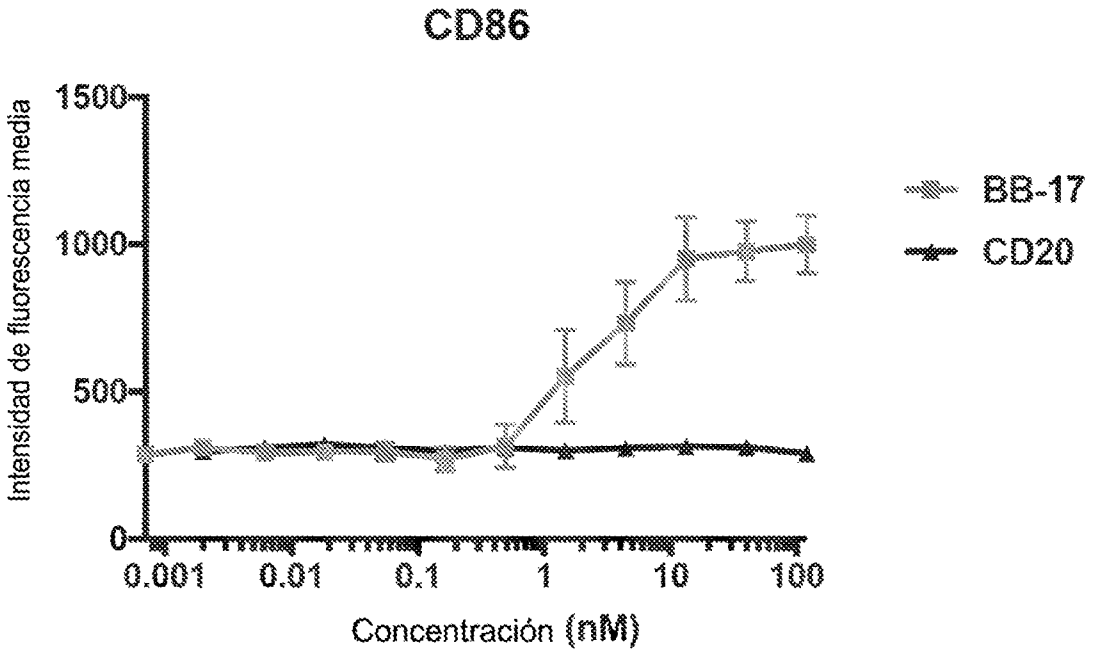


Fig. 106I

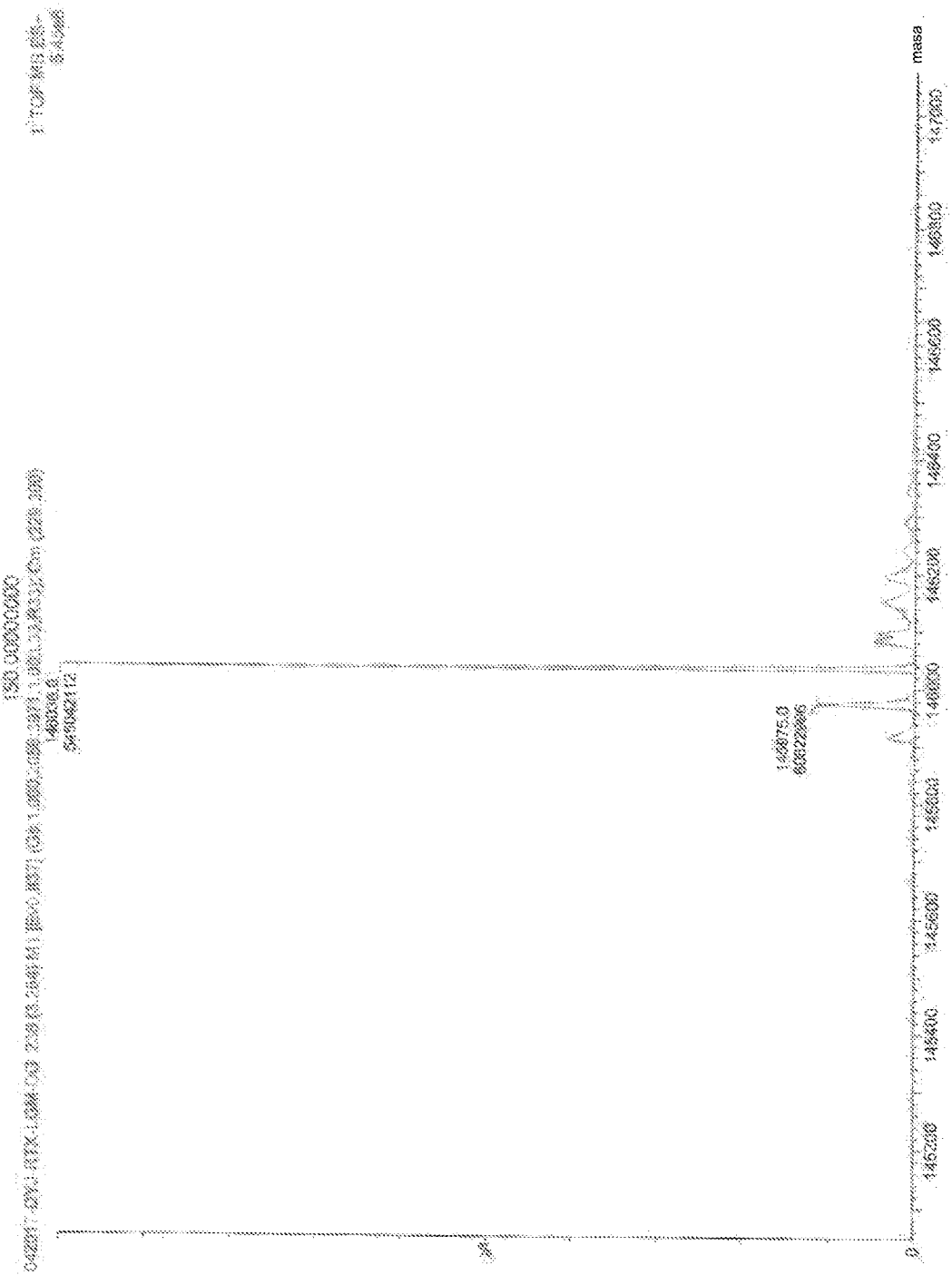

masa
1460675.0
60822806
1460336.6
54150421.2
1465200
1465400
1465600
1465800
1466000
1466200
1466400
1466600
1466800
1467000

Fig. 107A

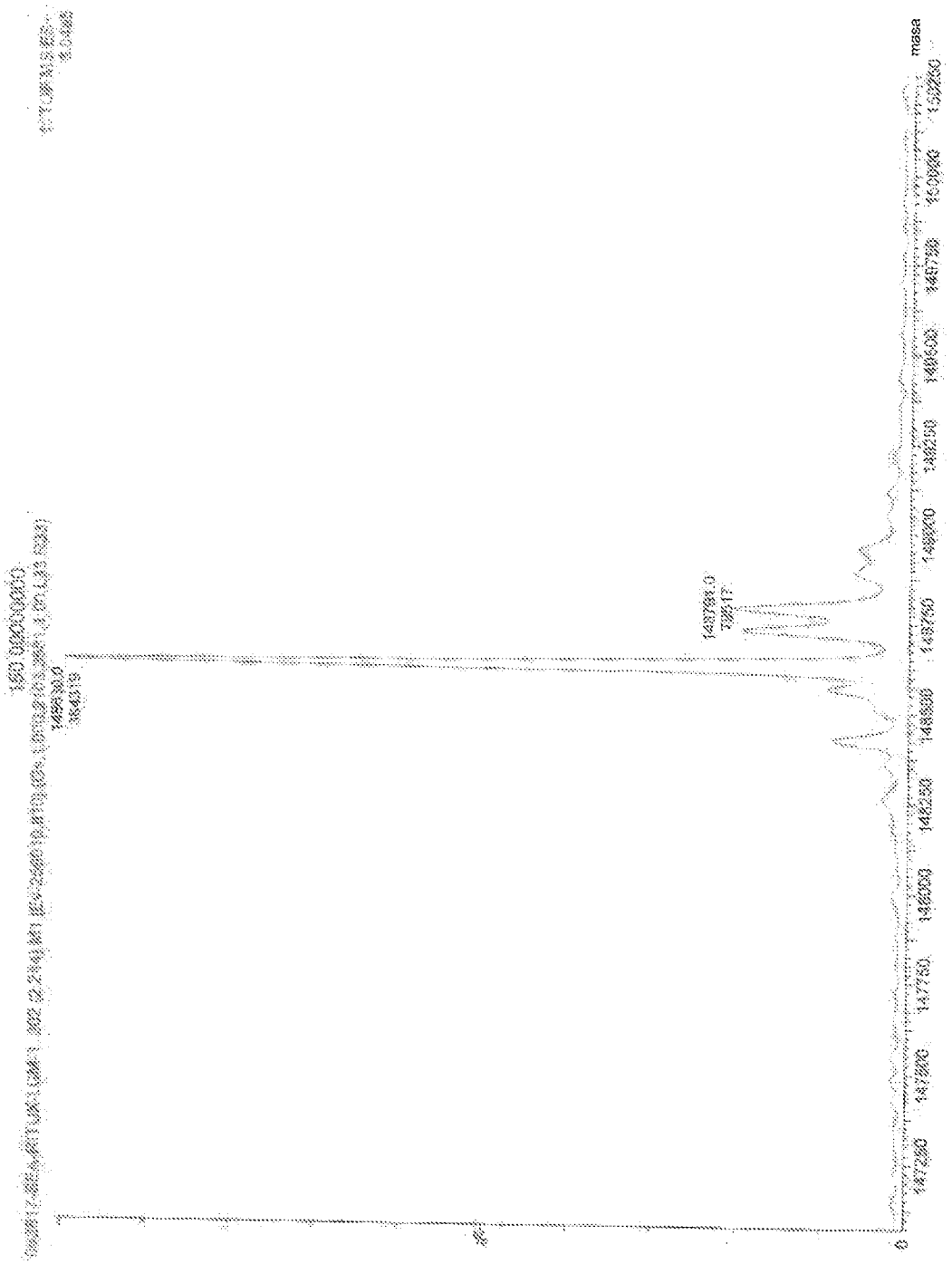


Fig. 107B

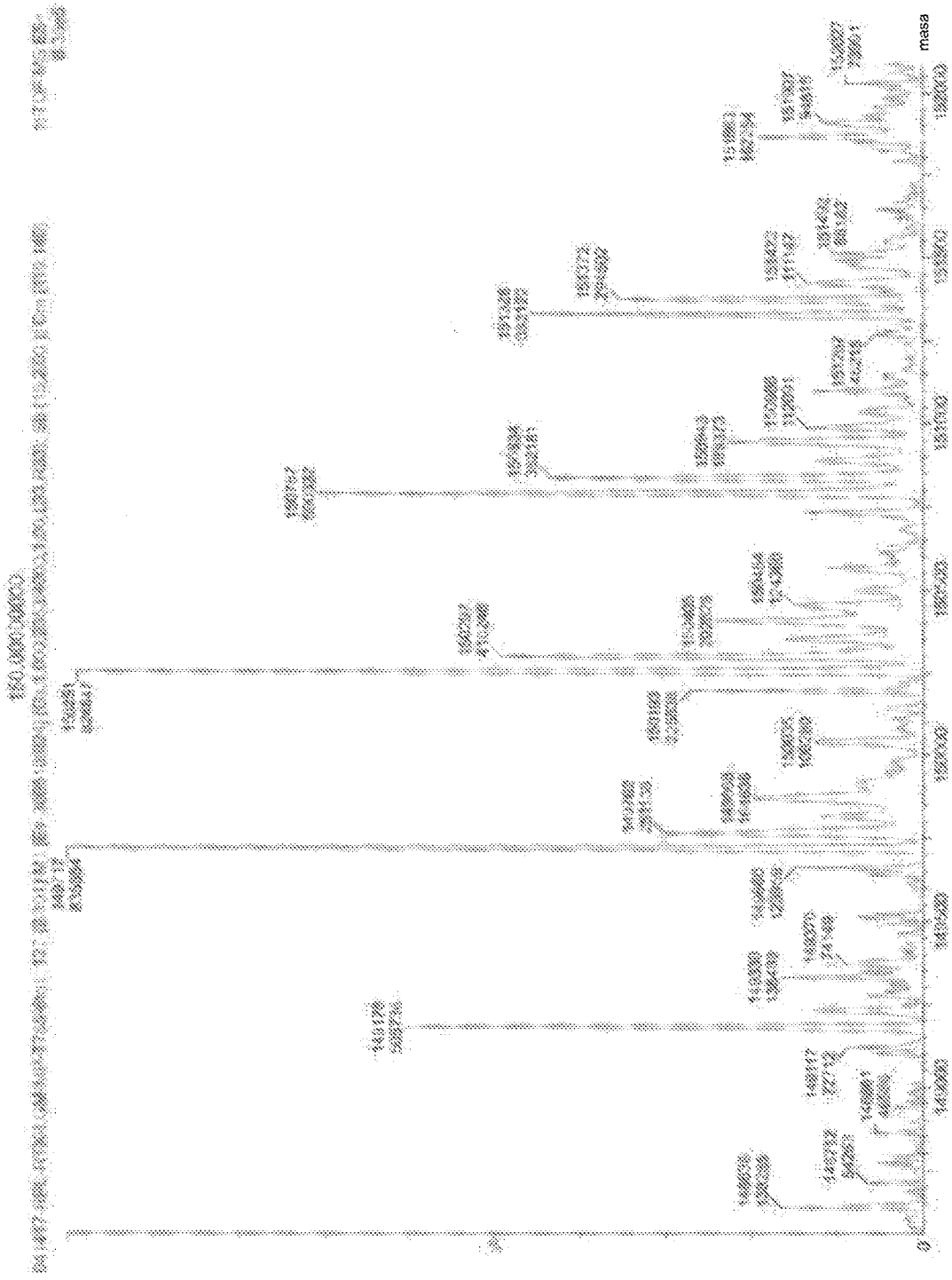


Fig. 107C

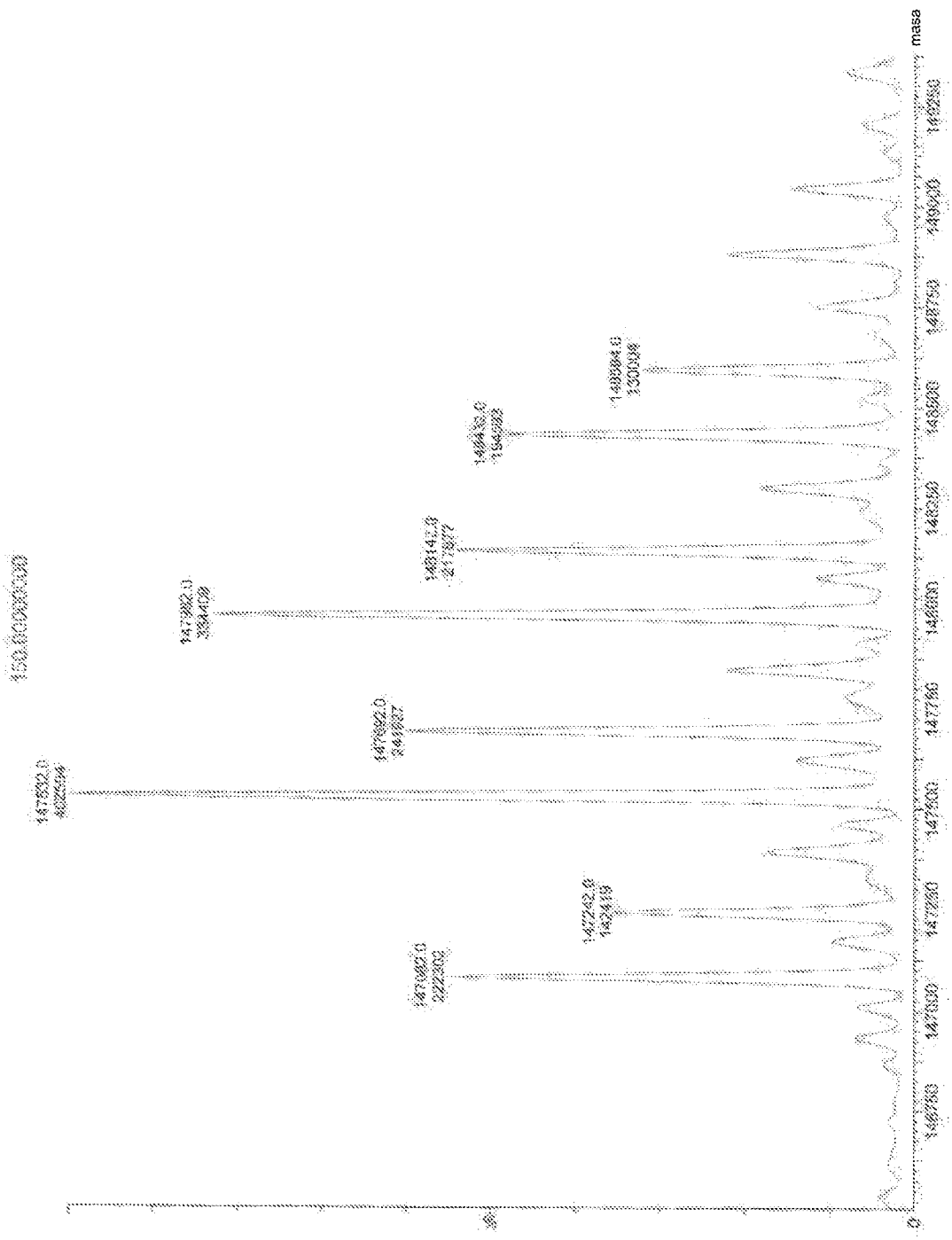

masa
%
0
150.000.000.000
147690.0
402594
147882.0
334479
147662.0
241827
147242.0
182419
147062.0
222300
148147.0
217877
148434.0
164088
148894.6
130038

Fig. 108A

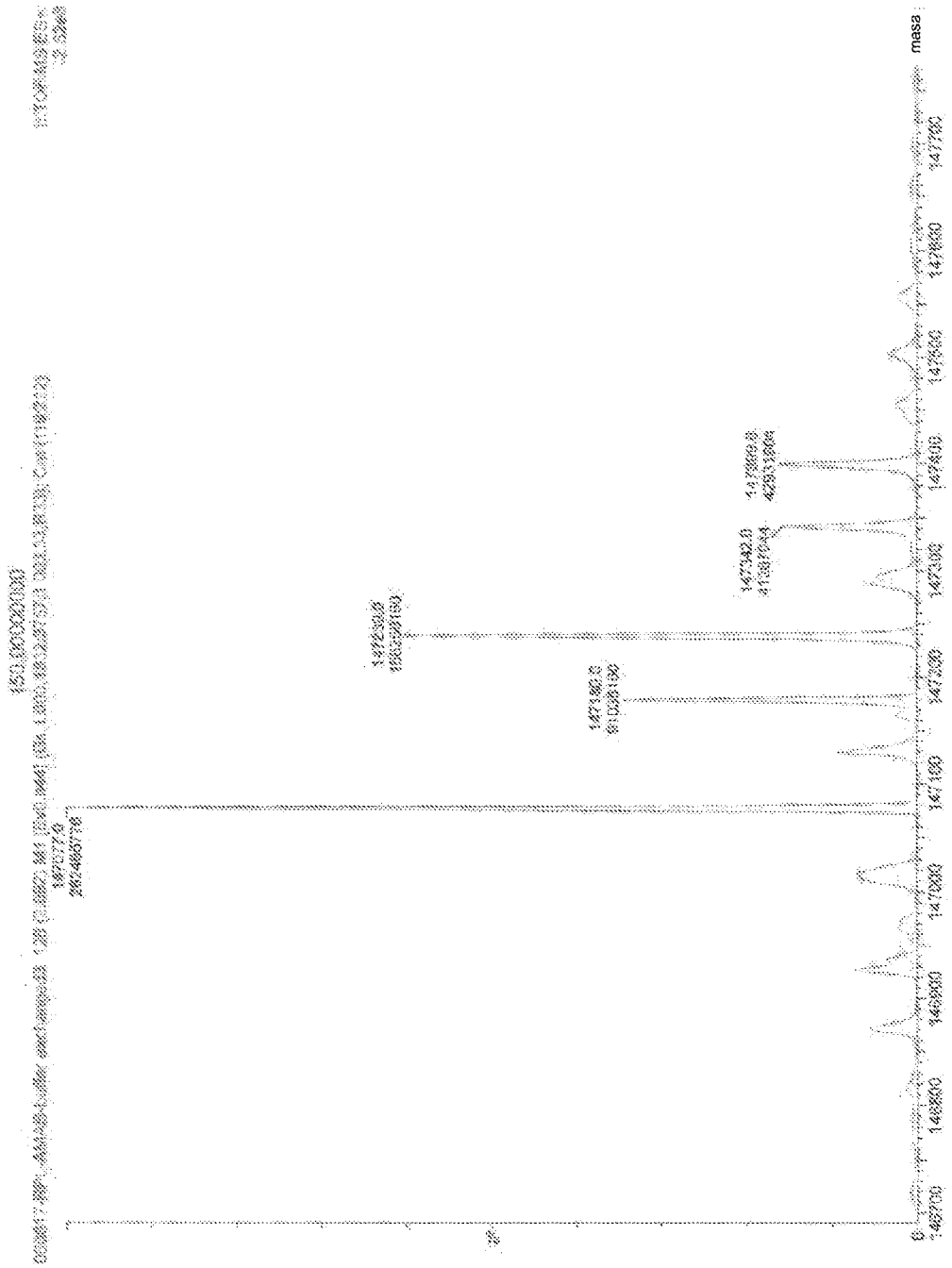

mass
%
1472.0
1472.8
1473.6
1474.4
1475.2
1476.0
1476.8
1477.6
1478.4
1479.2
1480.0
1480.8
1481.6
1482.4
1483.2
1484.0
1484.8
1485.6
1486.4
1487.2
1488.0

Fig. 108B

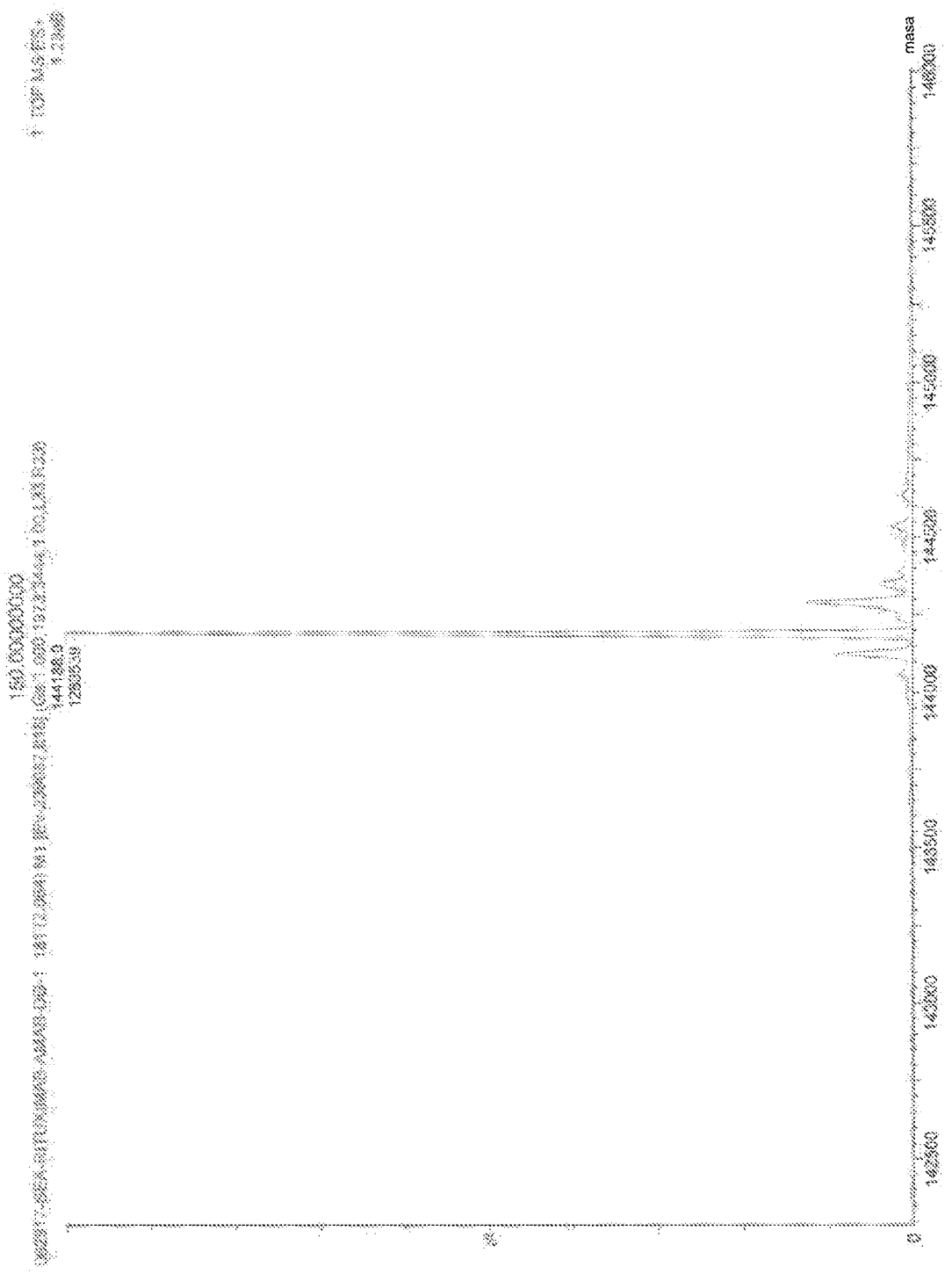


Fig. 108C

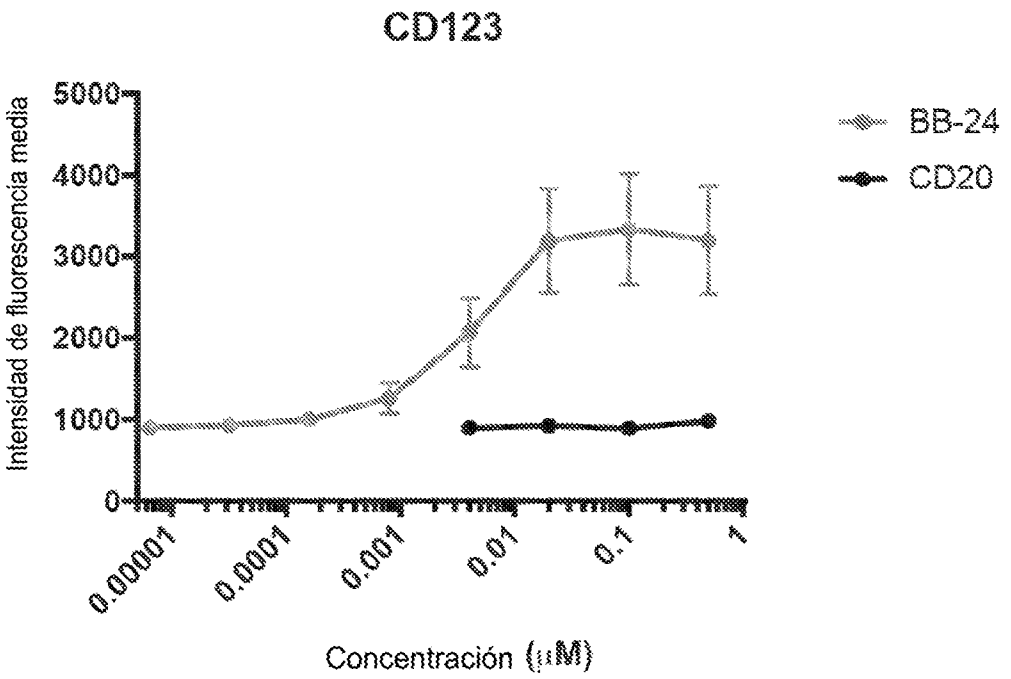


Fig. 108D

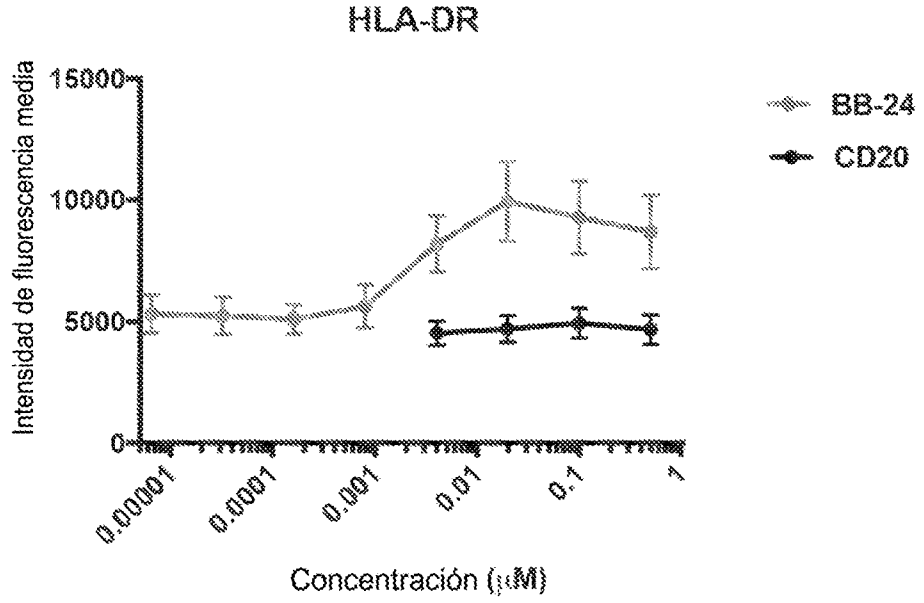


Fig. 108E

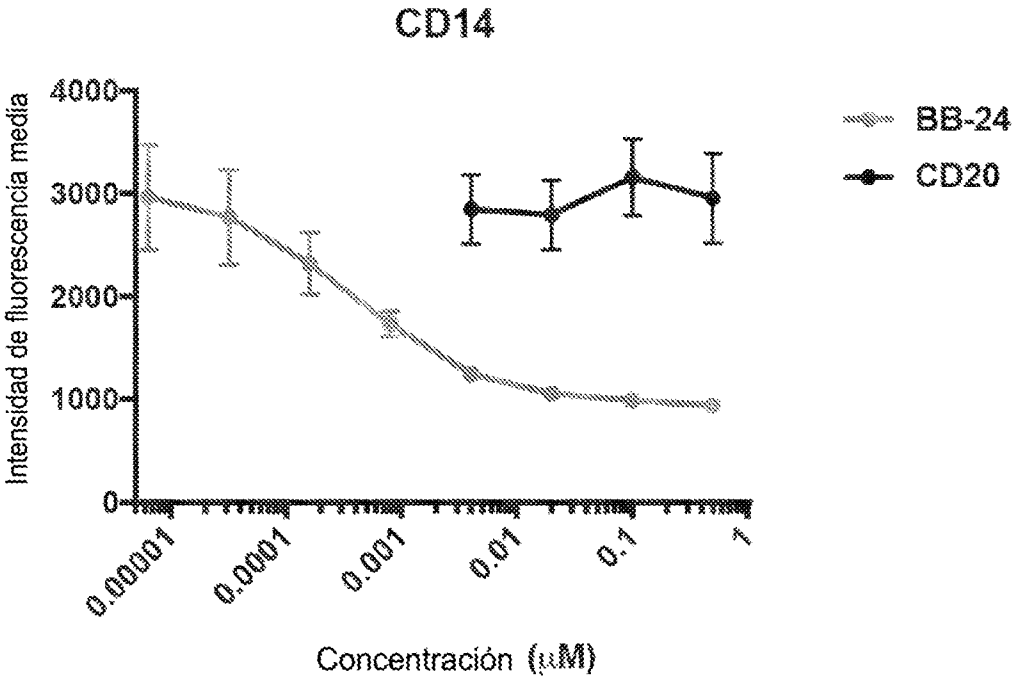


Fig. 108F

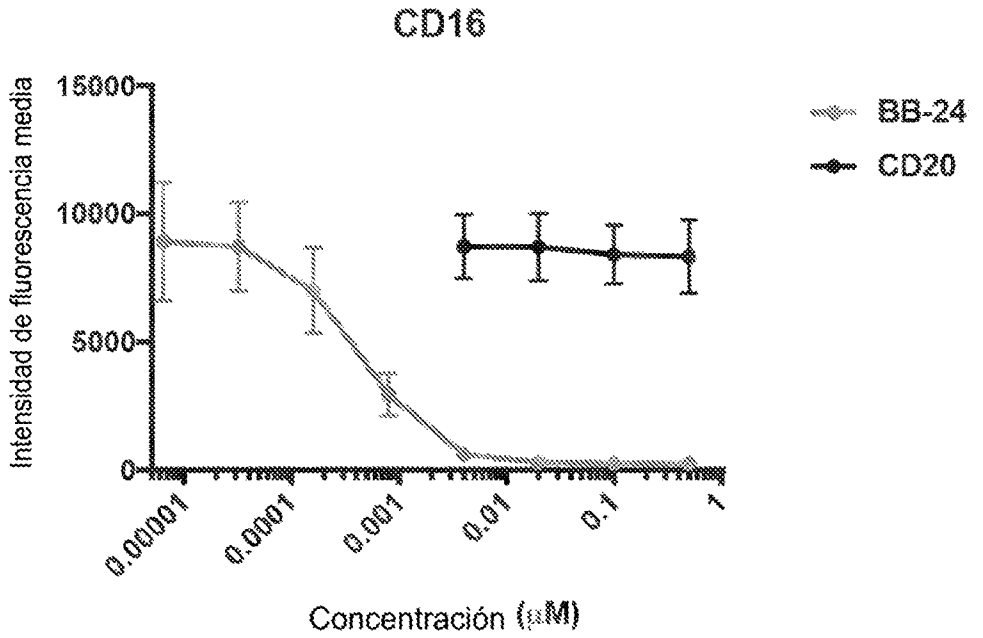


Fig. 108G

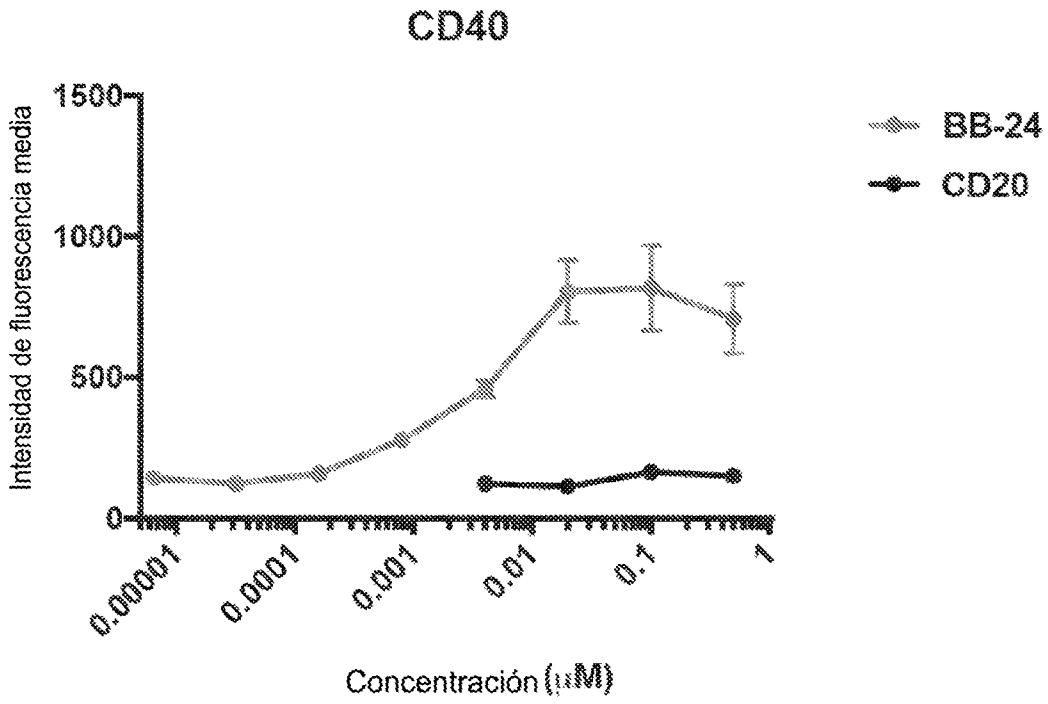


Fig. 108H

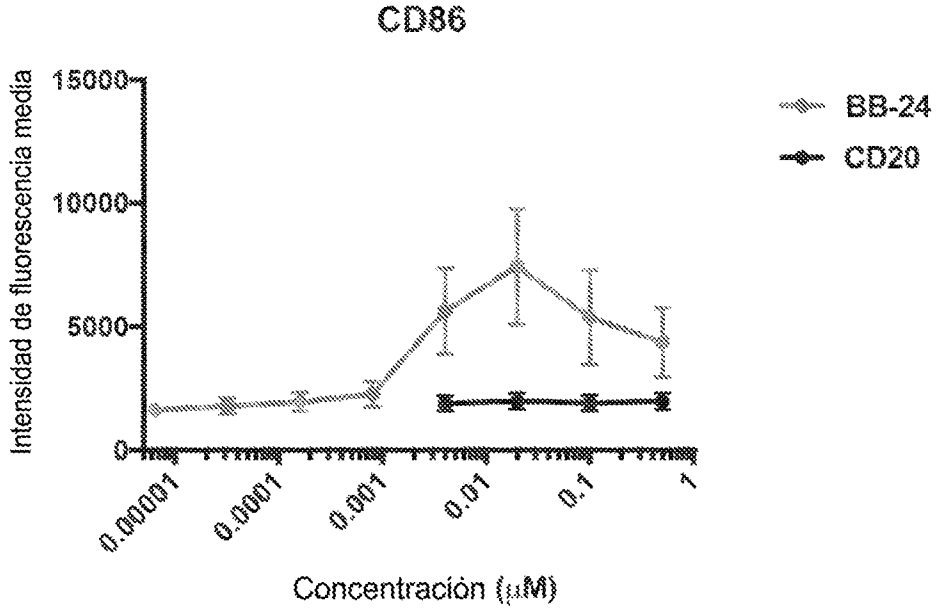


Fig. 108I

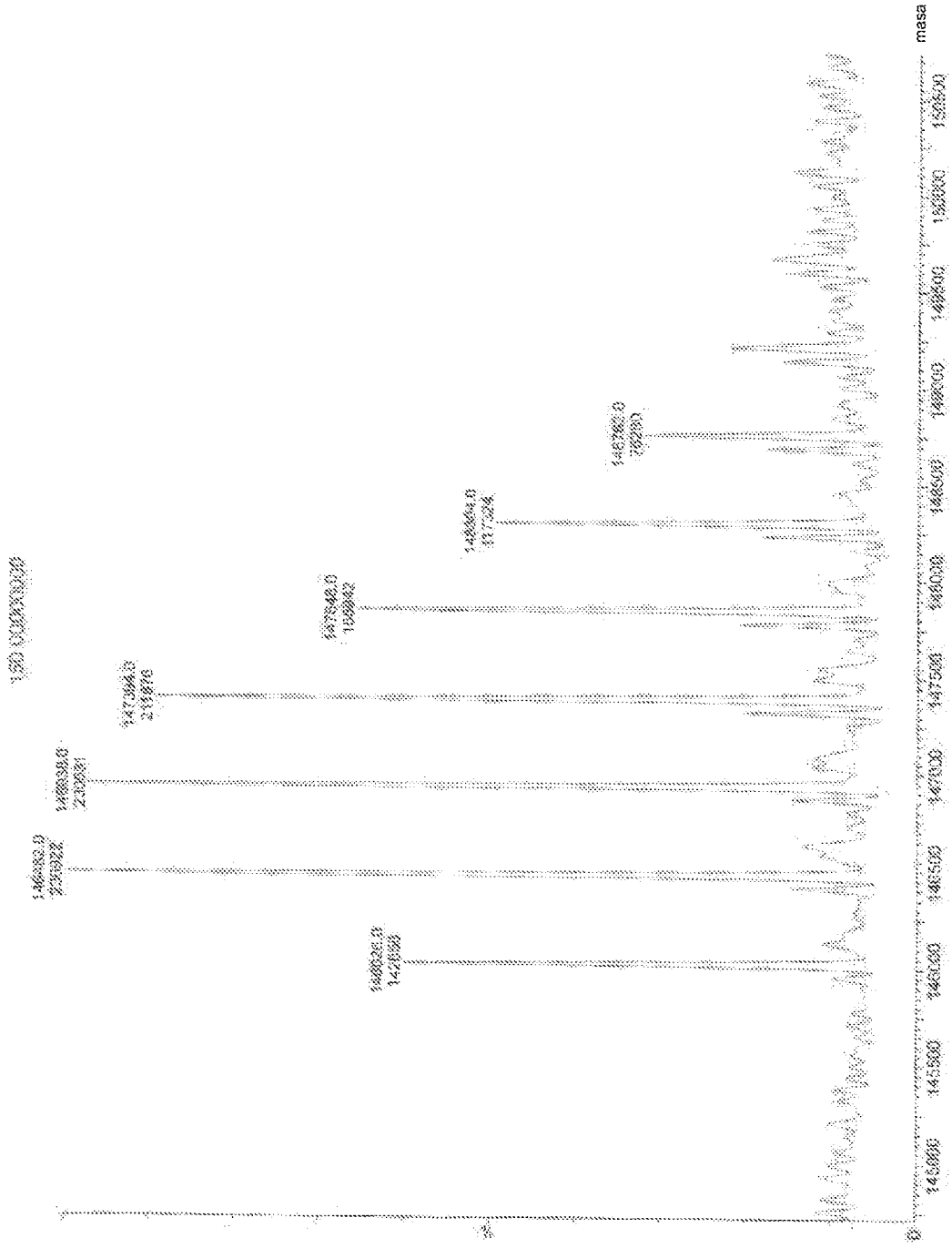

masa
1460000
1465000
1470000
1475000
1480000
1485000
1490000
1495000
1500000

Fig. 109A

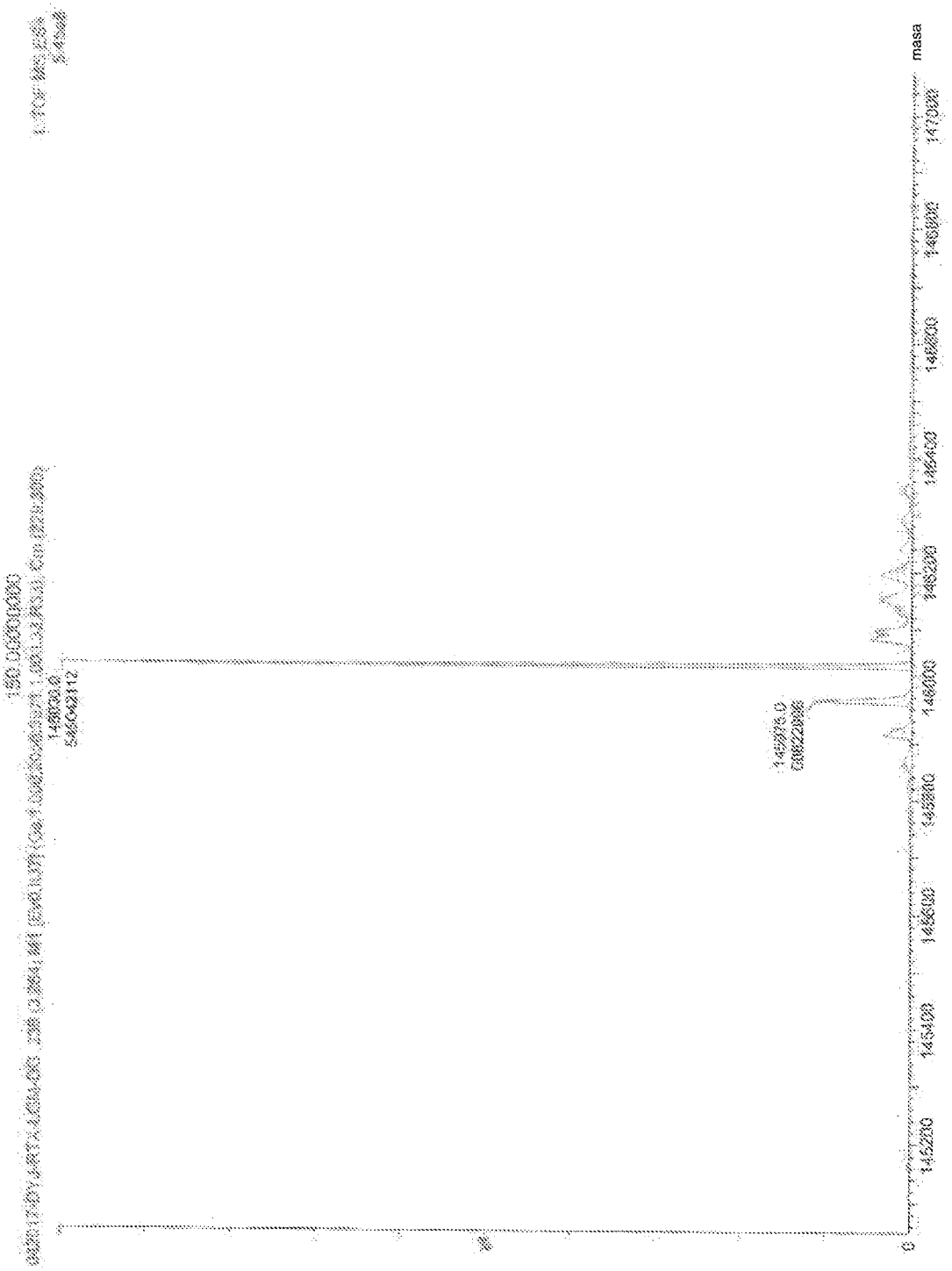

%
0
145200
145400
145600
145800
146000
146200
146400
146600
146800
147000
masa

Fig. 109B

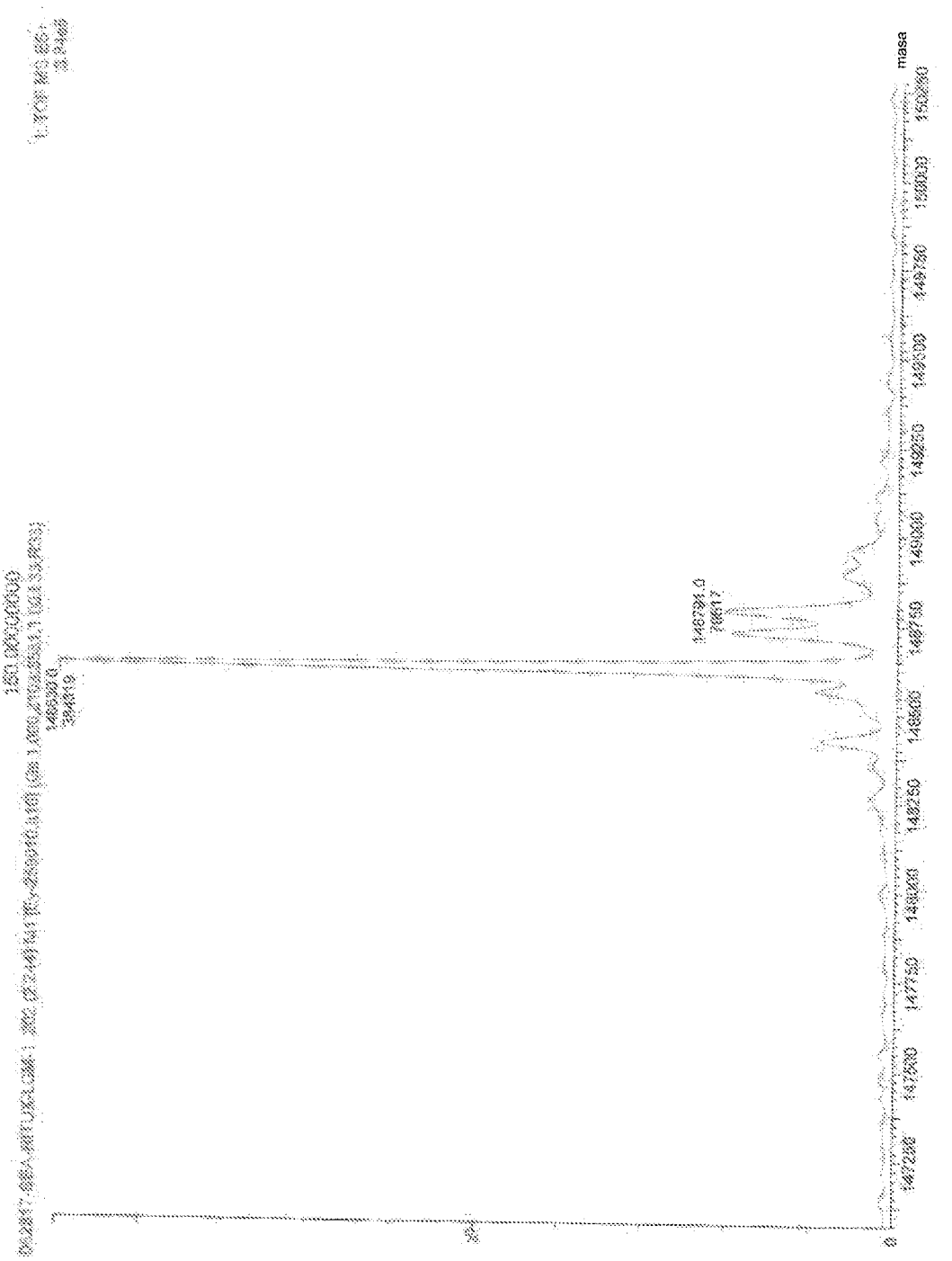


Fig. 109C

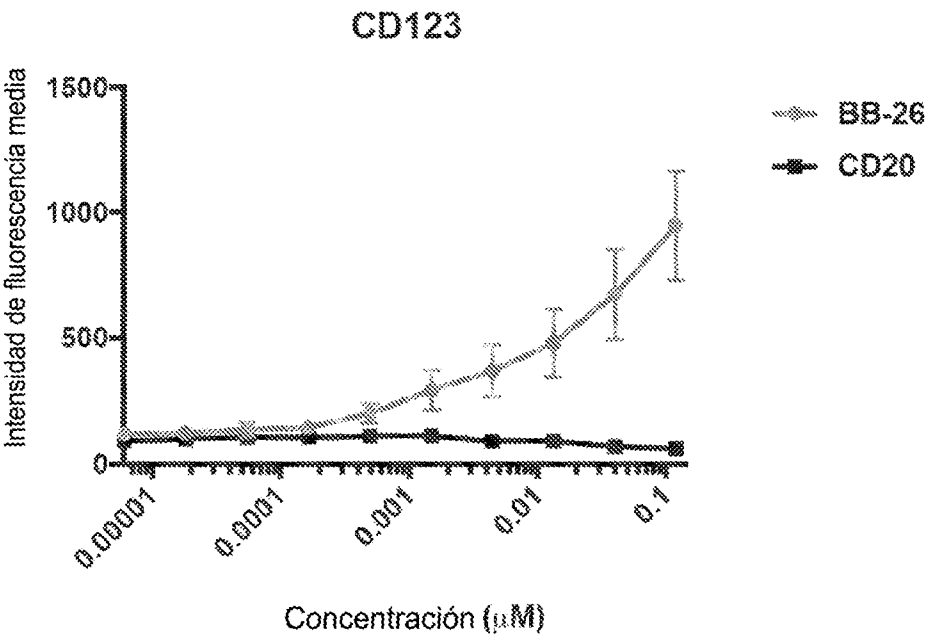


Fig. 109D

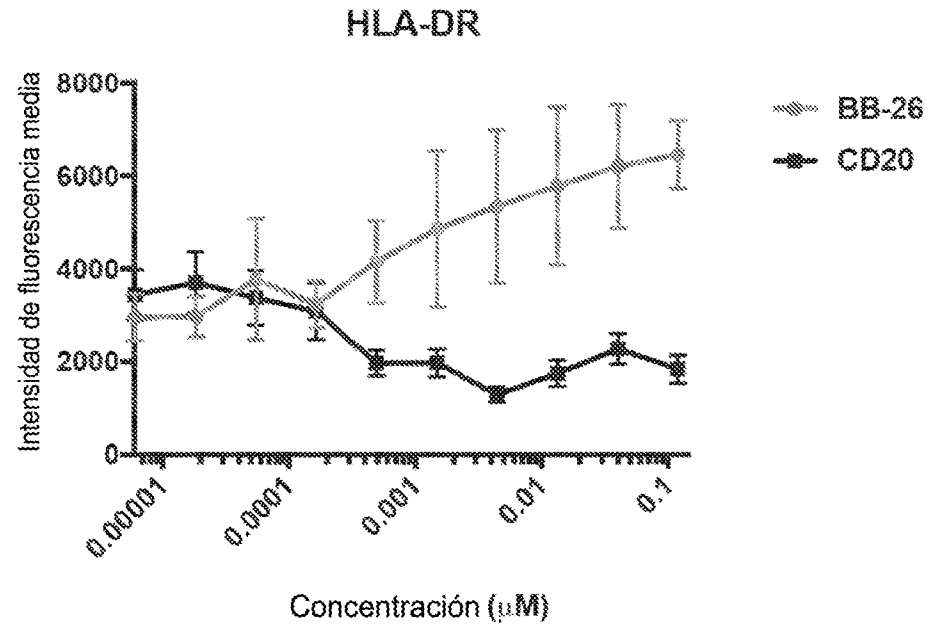


Fig. 109E

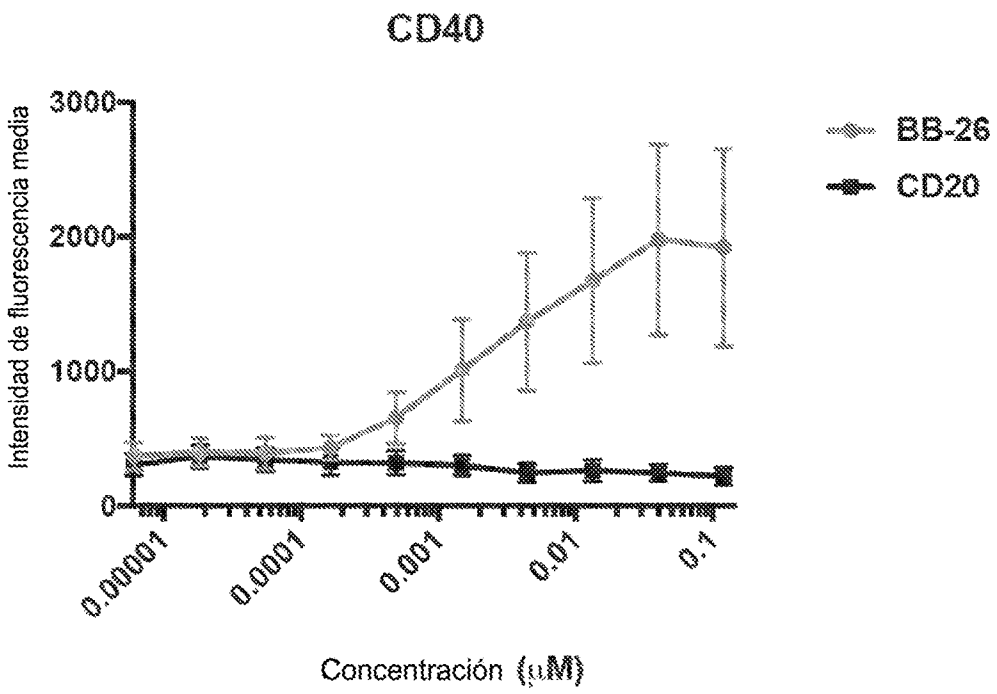


Fig. 109F

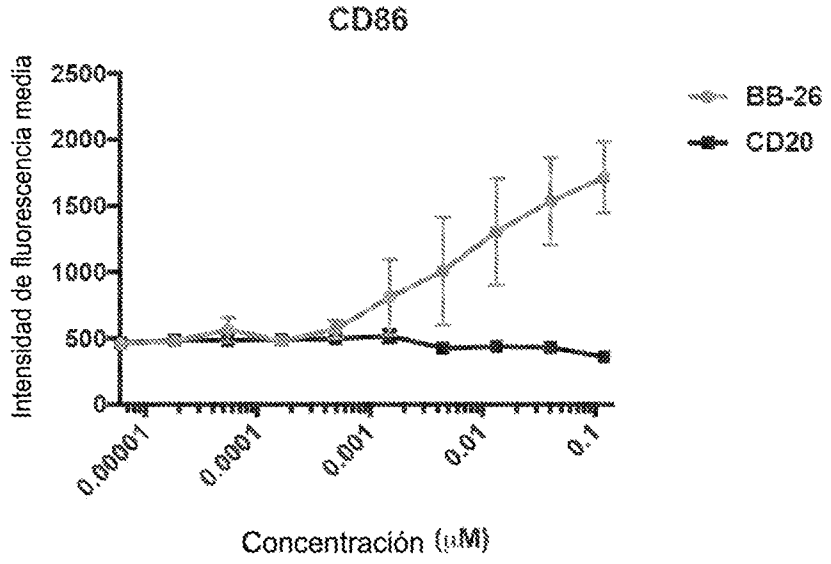


Fig. 109G

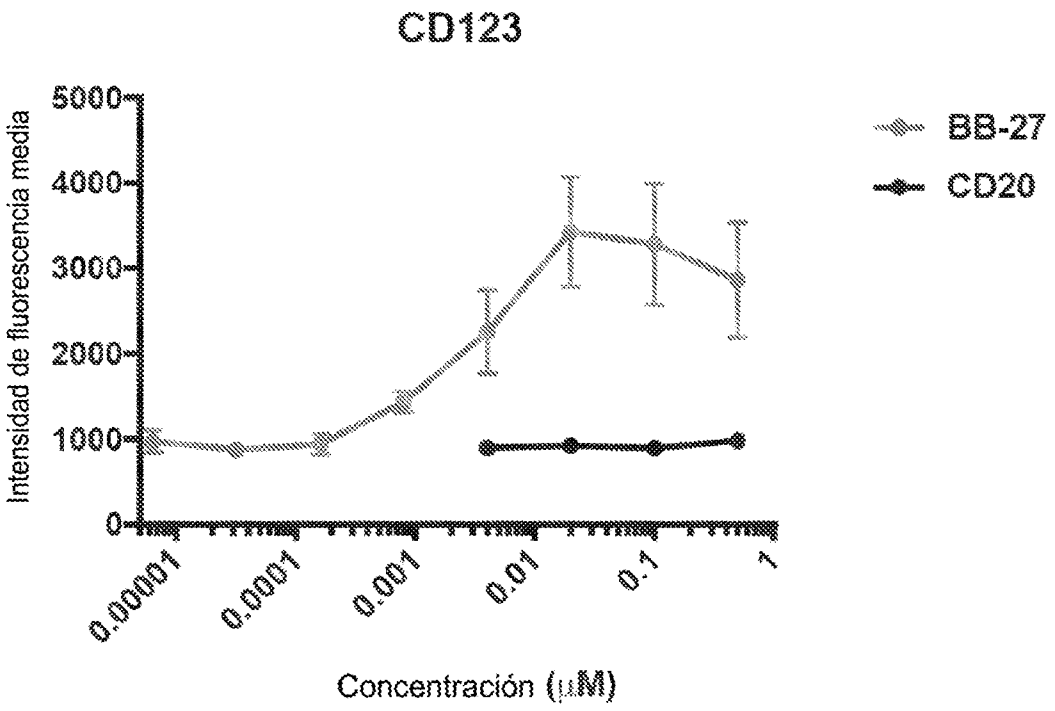


Fig. 110A

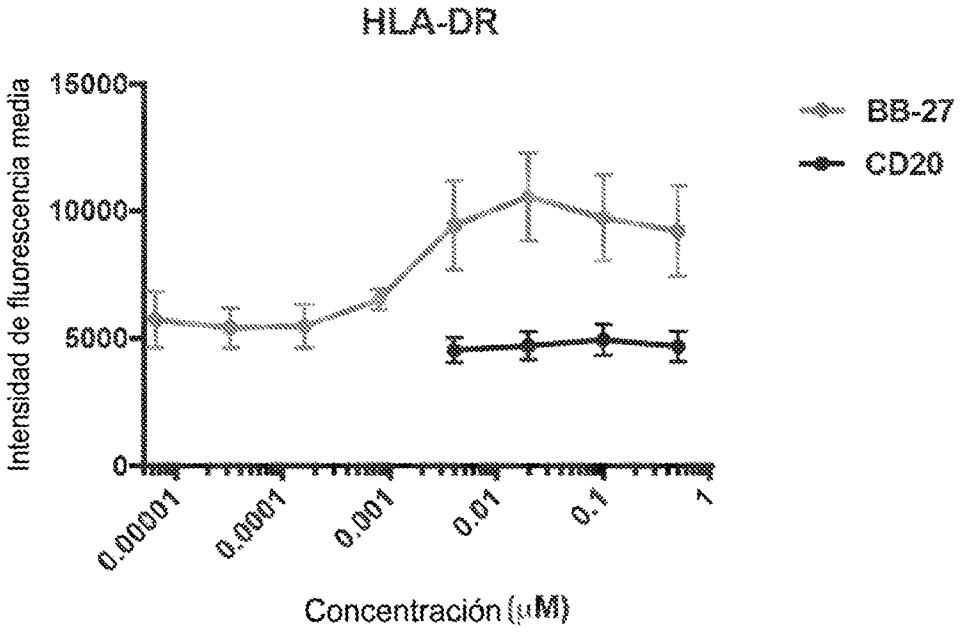


Fig. 110B

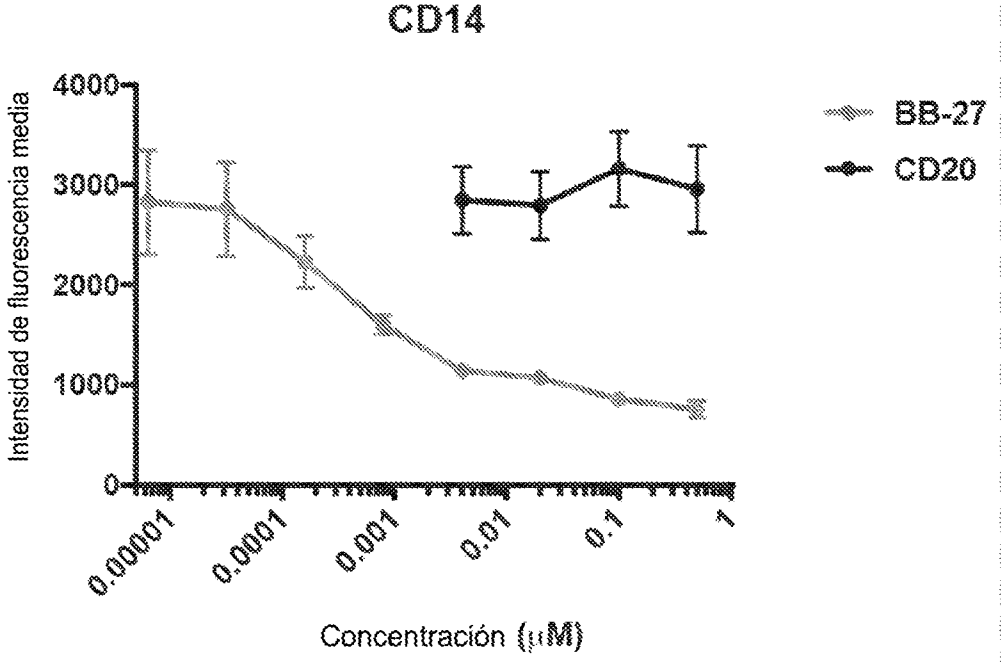


Fig. 110C

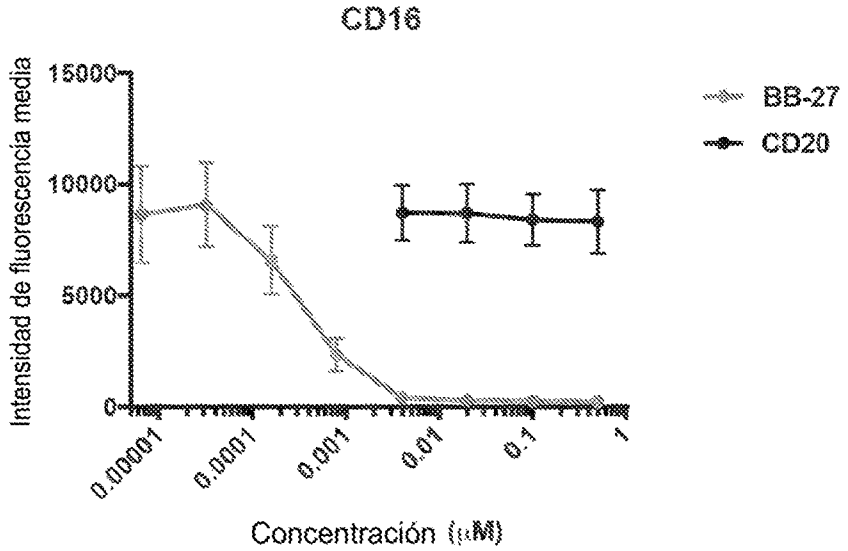


Fig. 110D

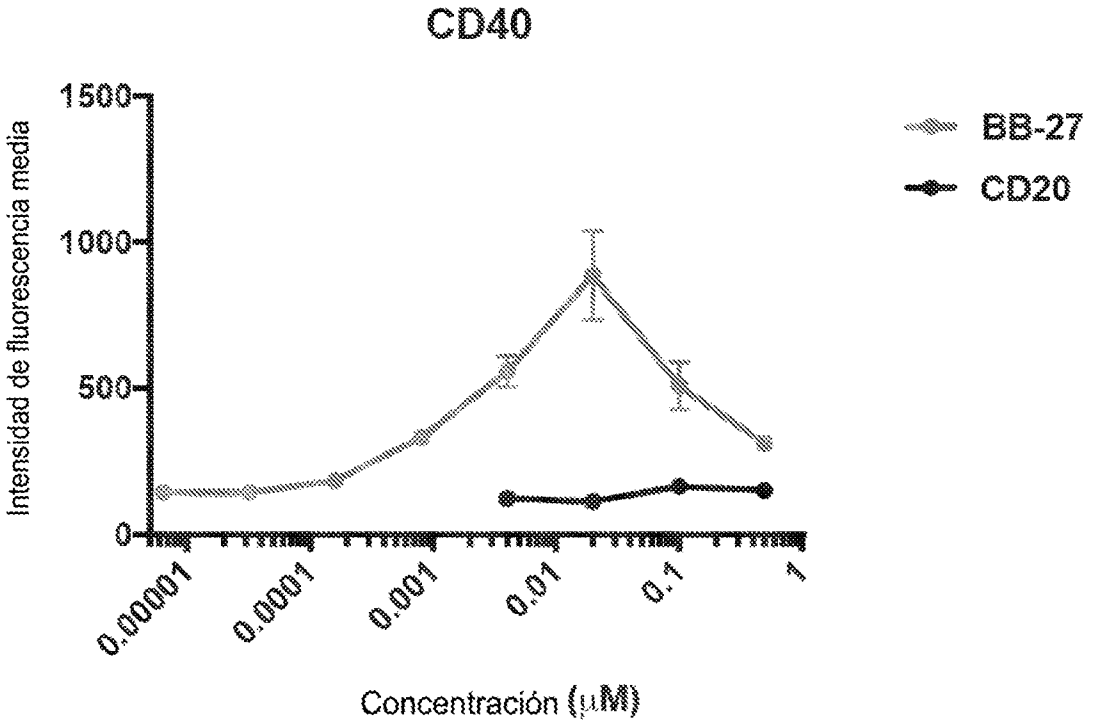


Fig. 110E

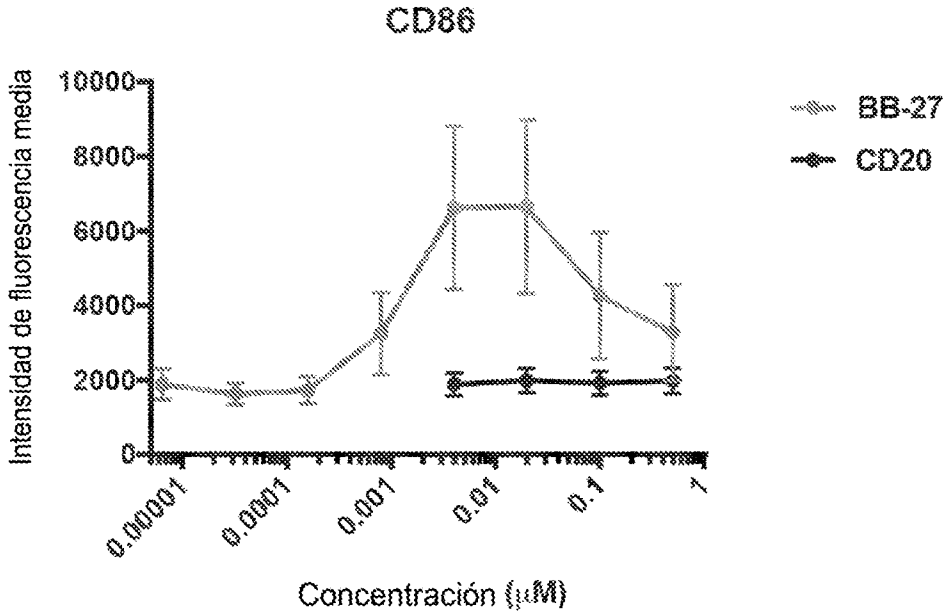


Fig. 110F

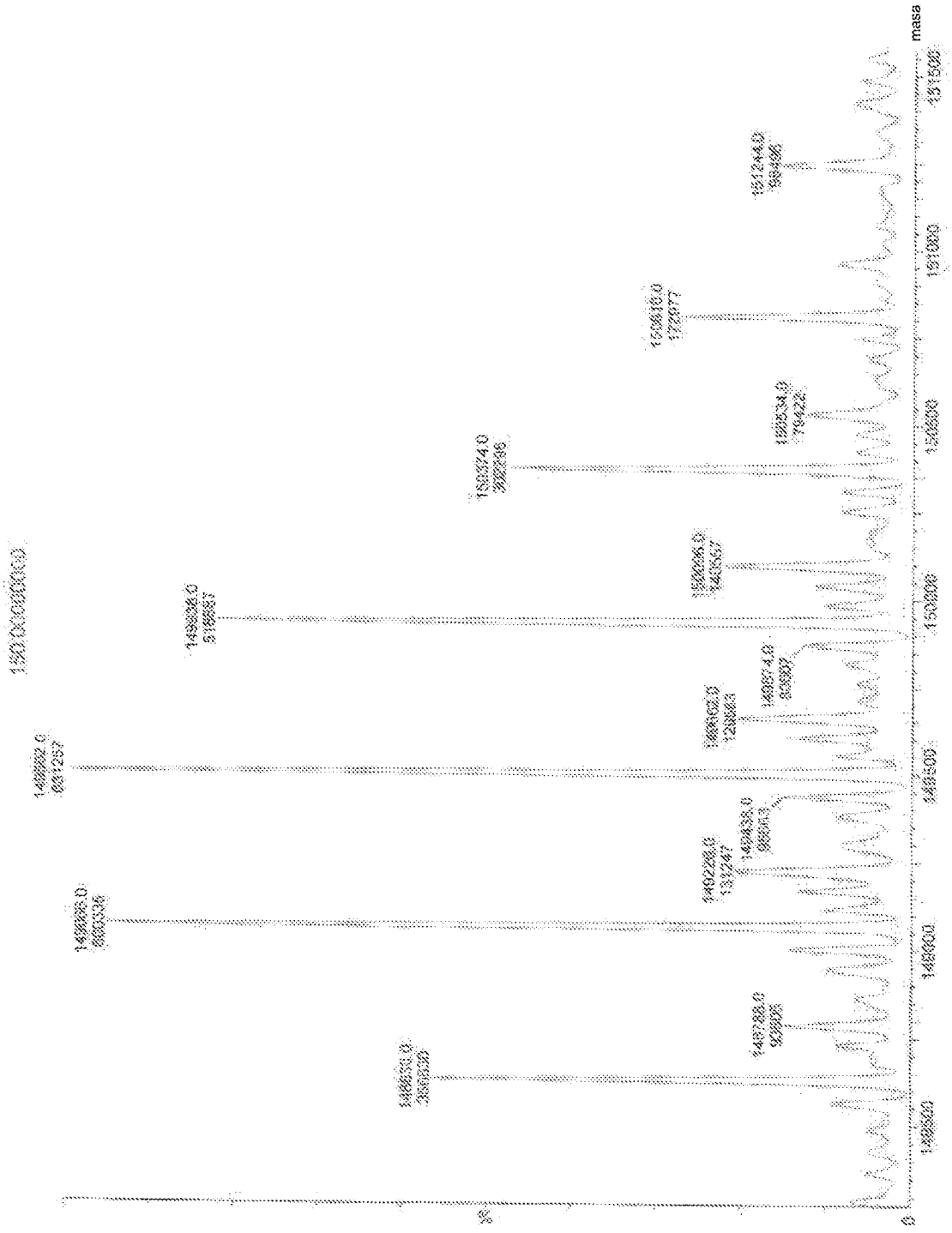

mass
%
0
1460500
1465000
1469500
1474000
1478500
1483000
1487500
1492000
1496500
1501000
1505500
1510000
1514500
1519000
1523500
1528000
1532500
1537000
1541500
1546000
1550500
1555000
1559500
1564000
1568500
1573000
1577500
1582000
1586500
1591000
1595500
1600000
1604500
1609000
1613500
1618000
1622500
1627000
1631500

Fig. 110G

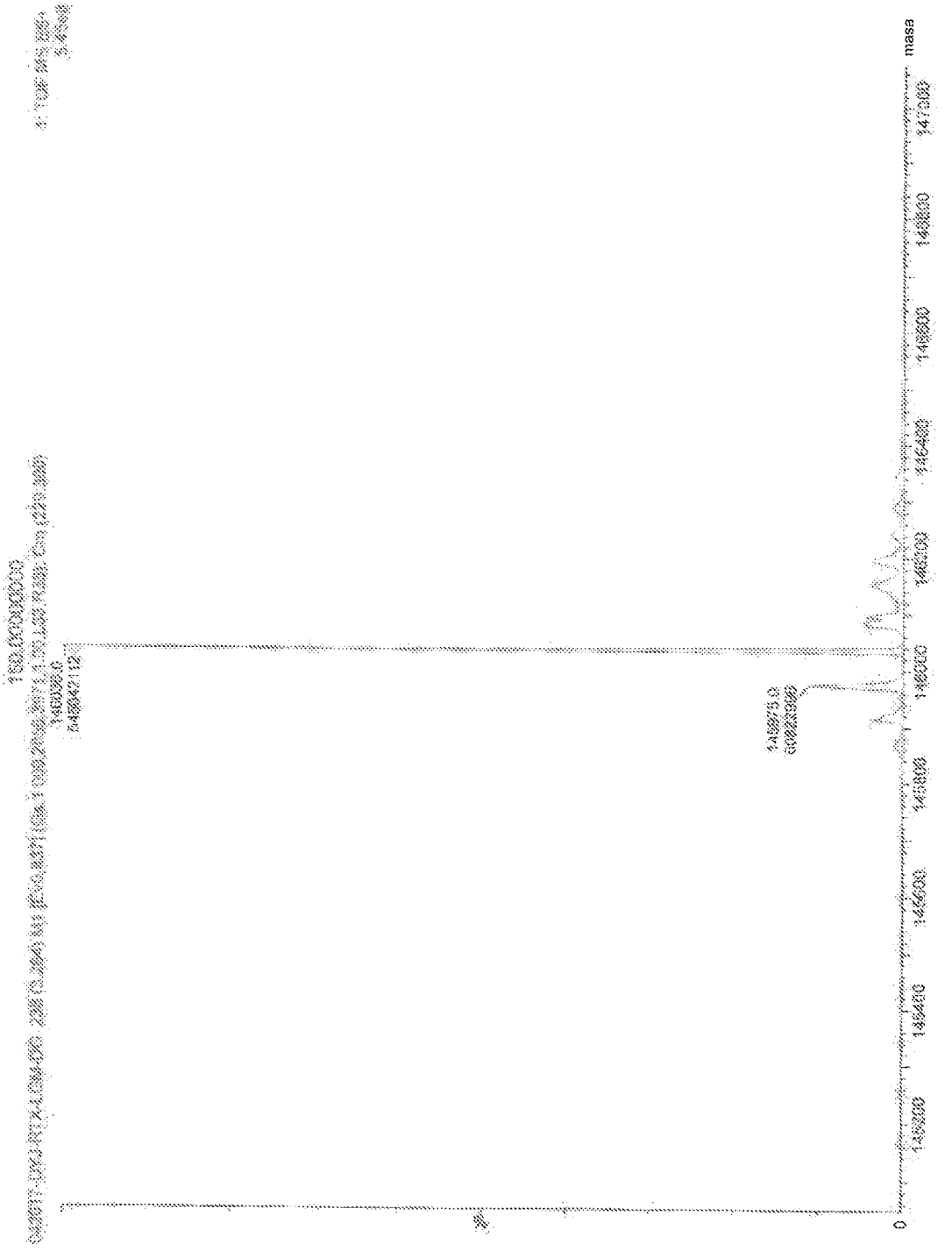


Fig. 110H

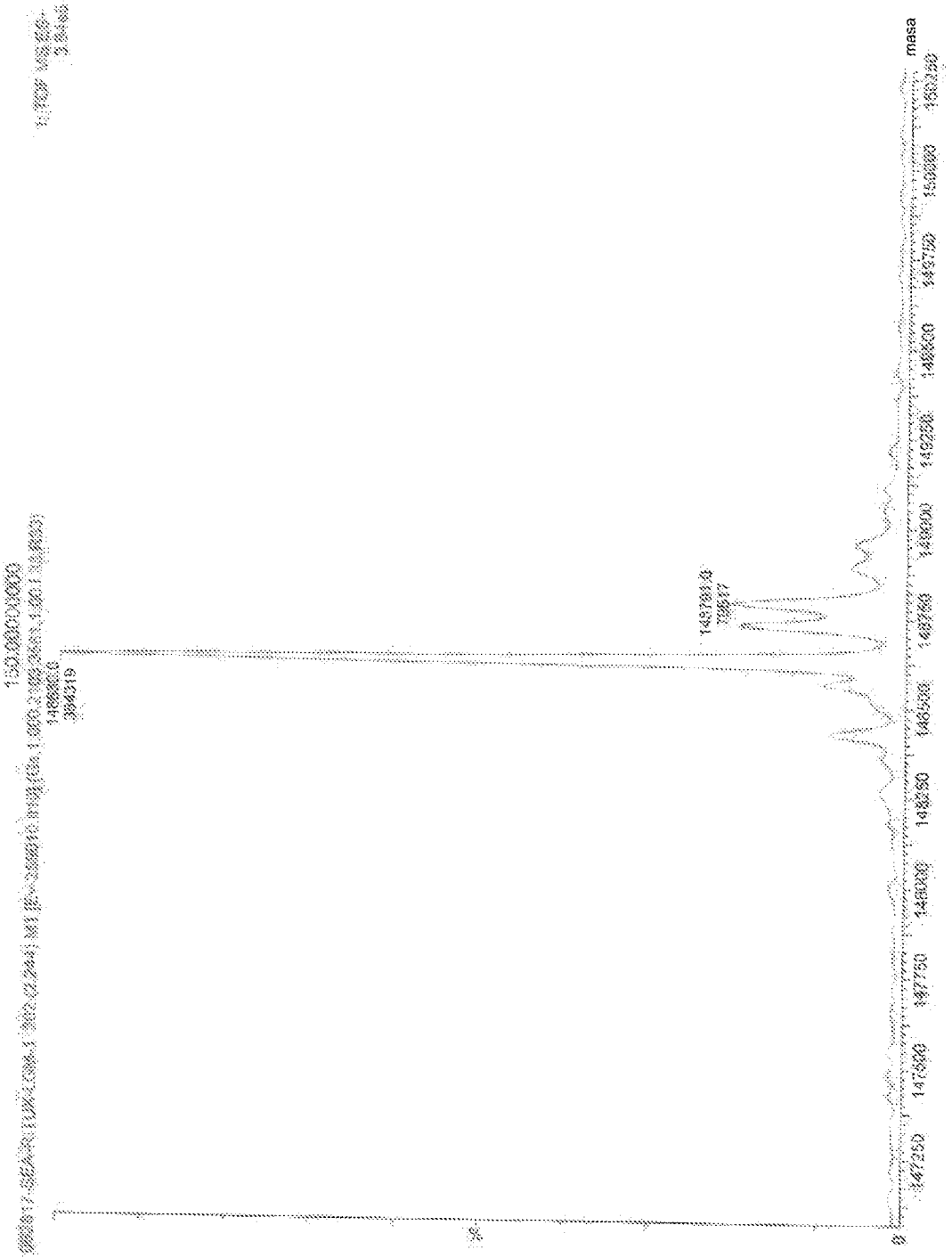


Fig. 110I

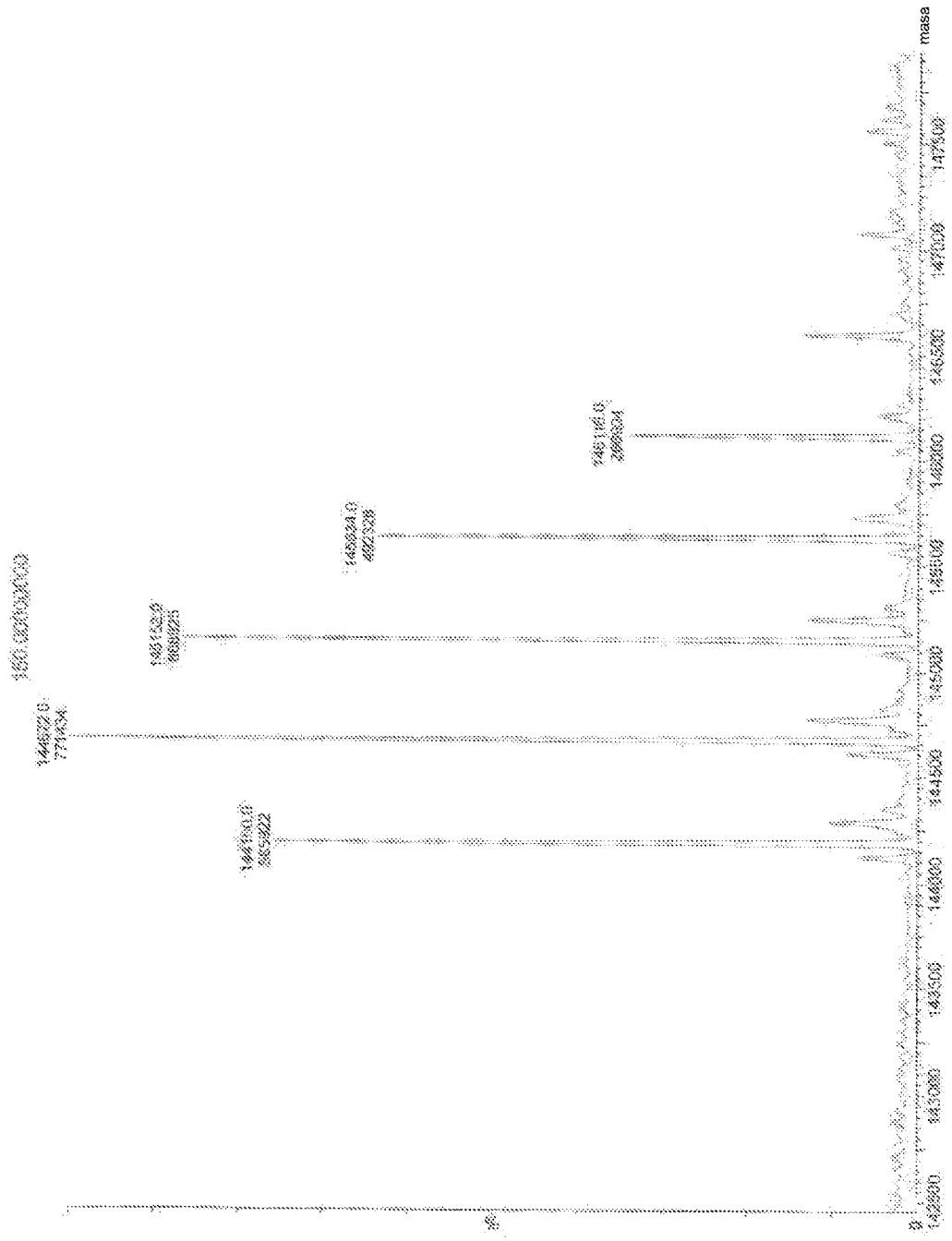

mass
1446720.0
1451520.0
1456324.0
1461126.0
1446720.0
1451520.0
1456324.0
1461126.0

Fig. 111A

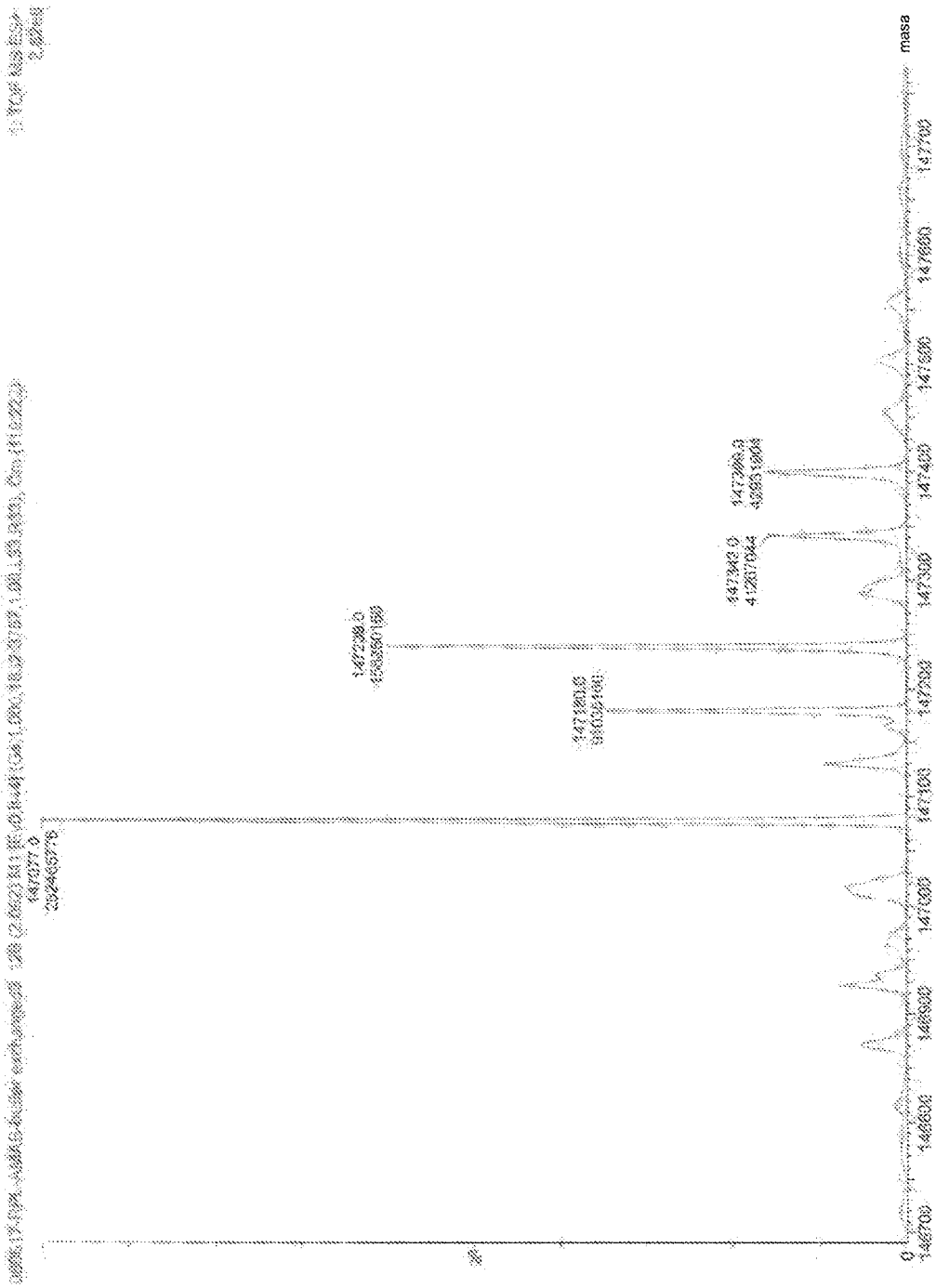


Fig. 111B

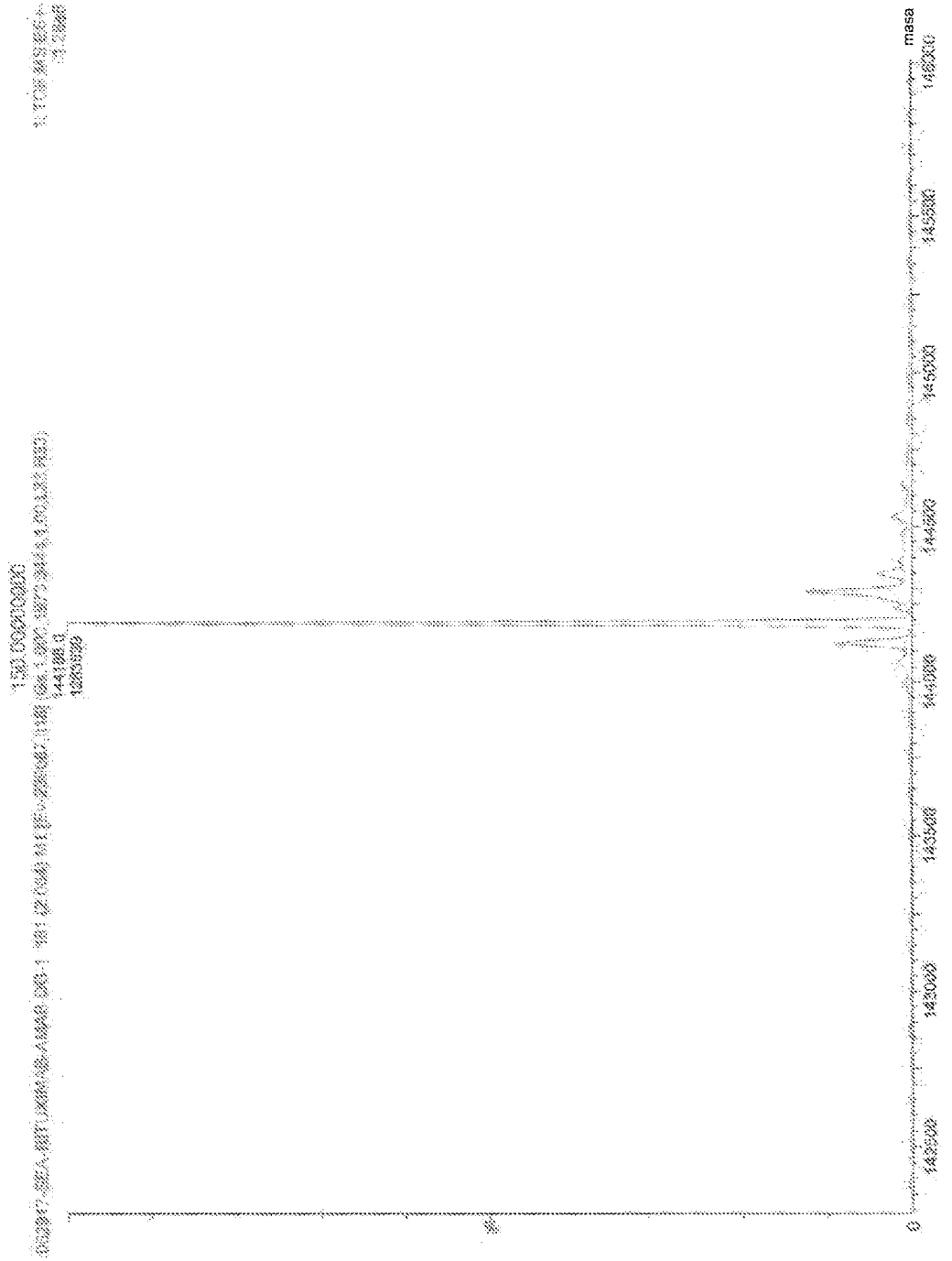

masa
145500
145000
144500
144000
143500
143000
142500
142000
141500
141188.0
1285596

Fig. 111C

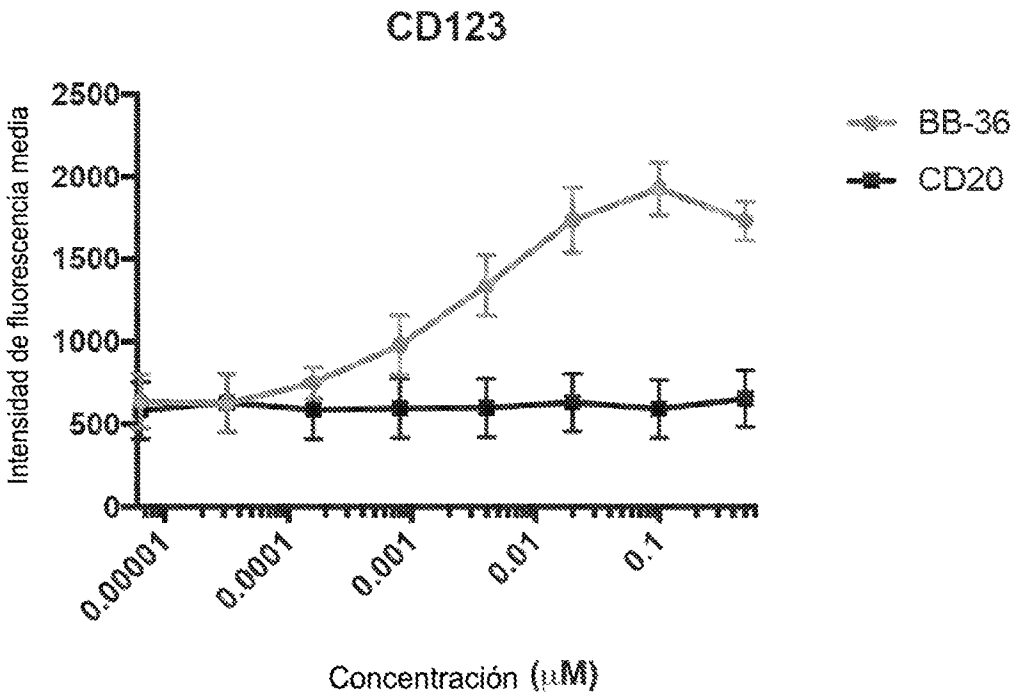


Fig. 111D

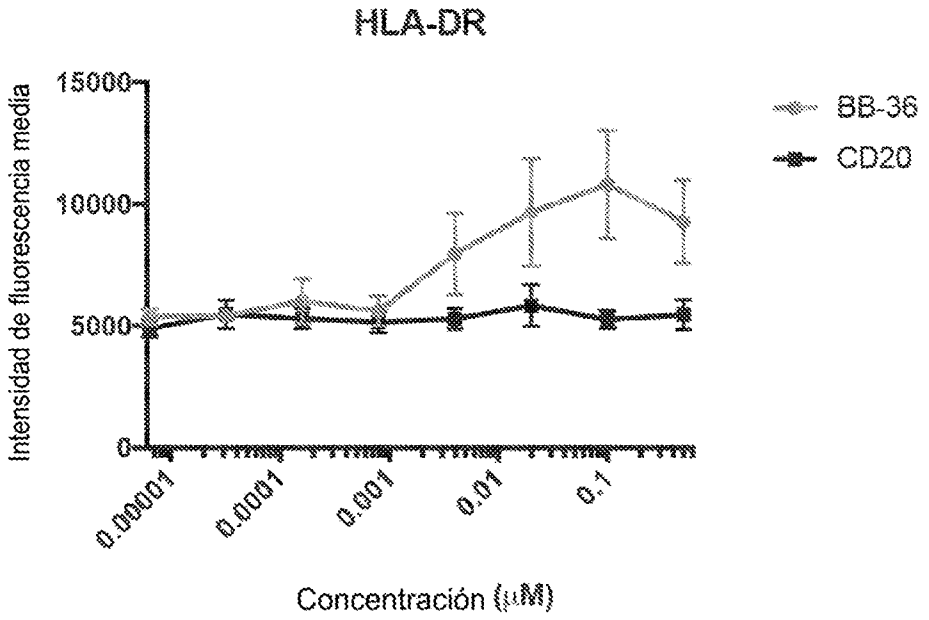


Fig. 111E

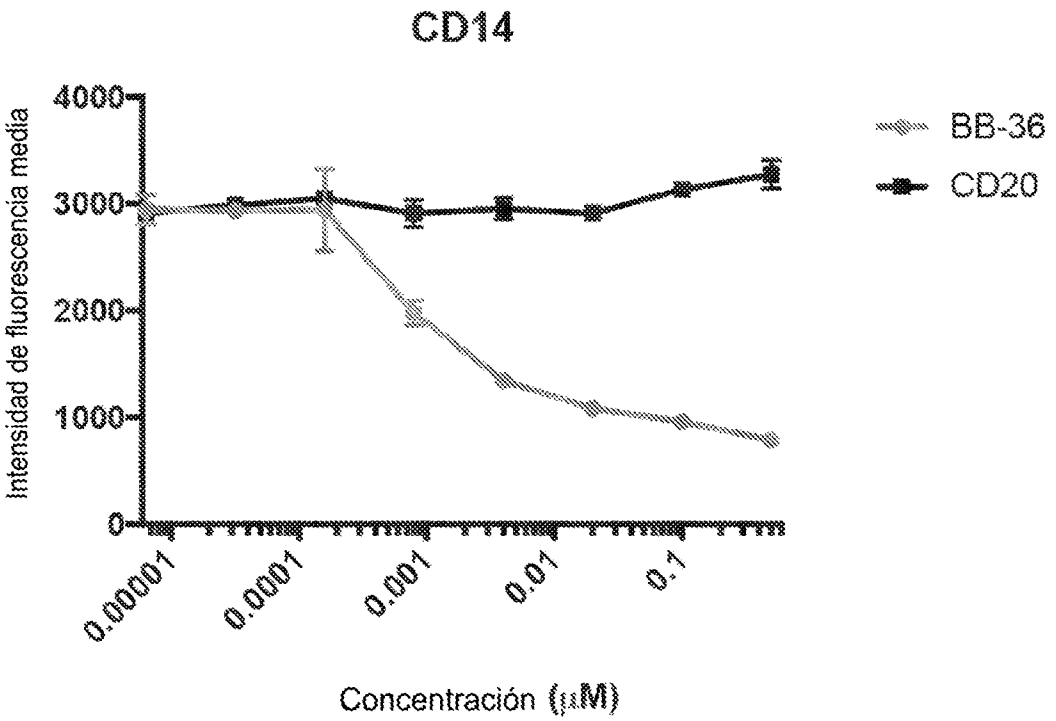


Fig. 111F

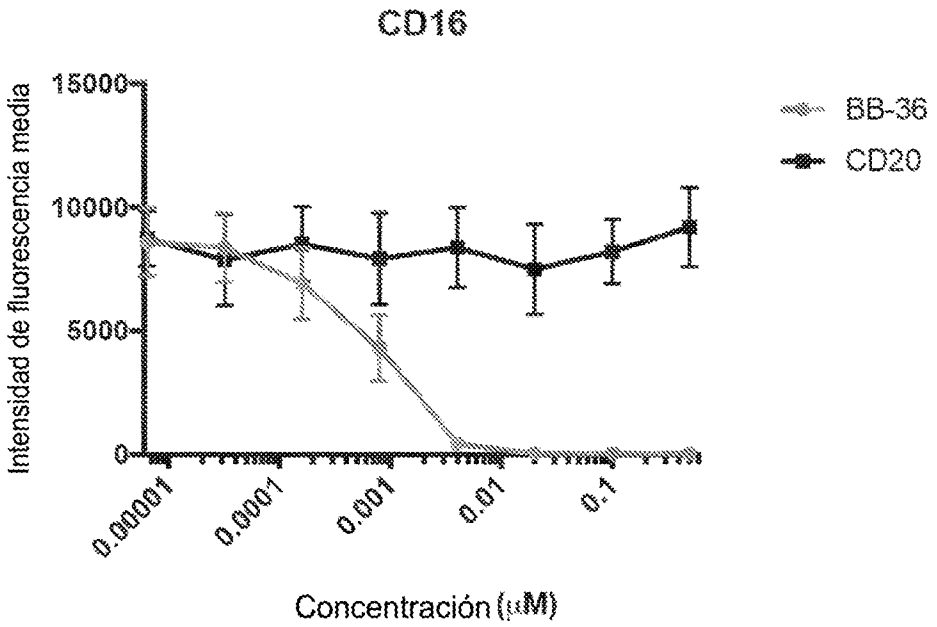


Fig. 111G

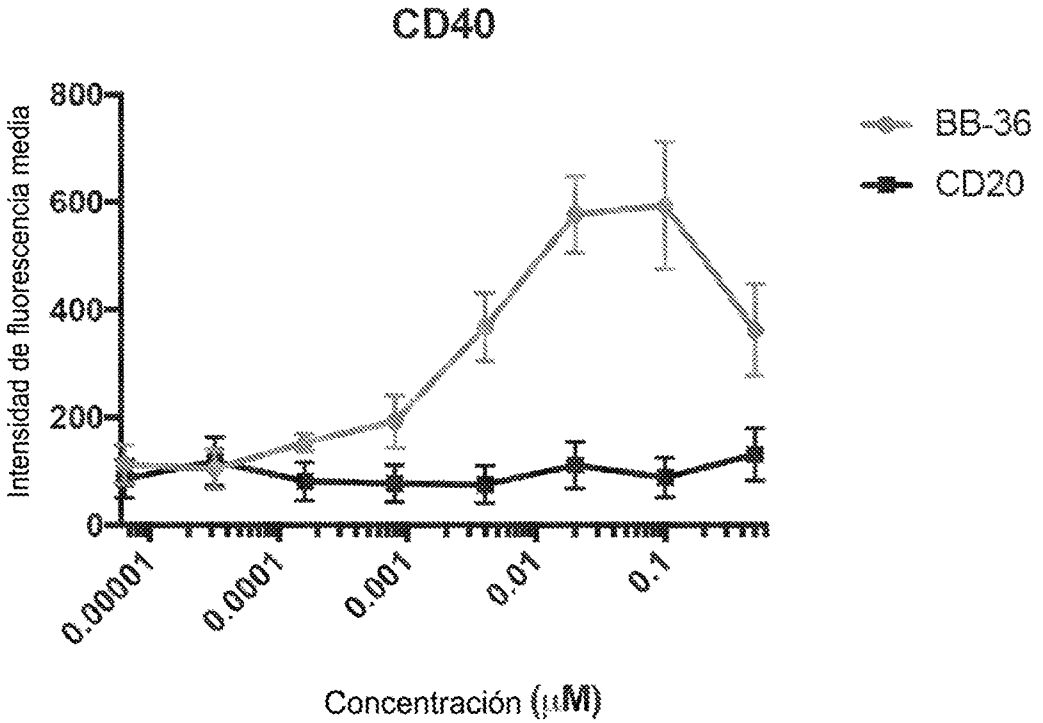


Fig. 111H

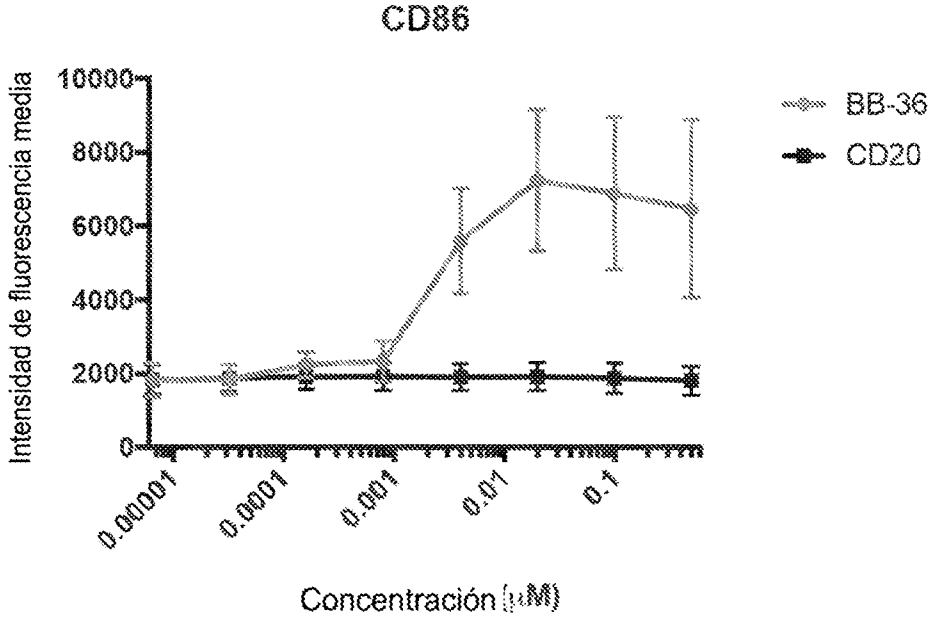


Fig. 111I

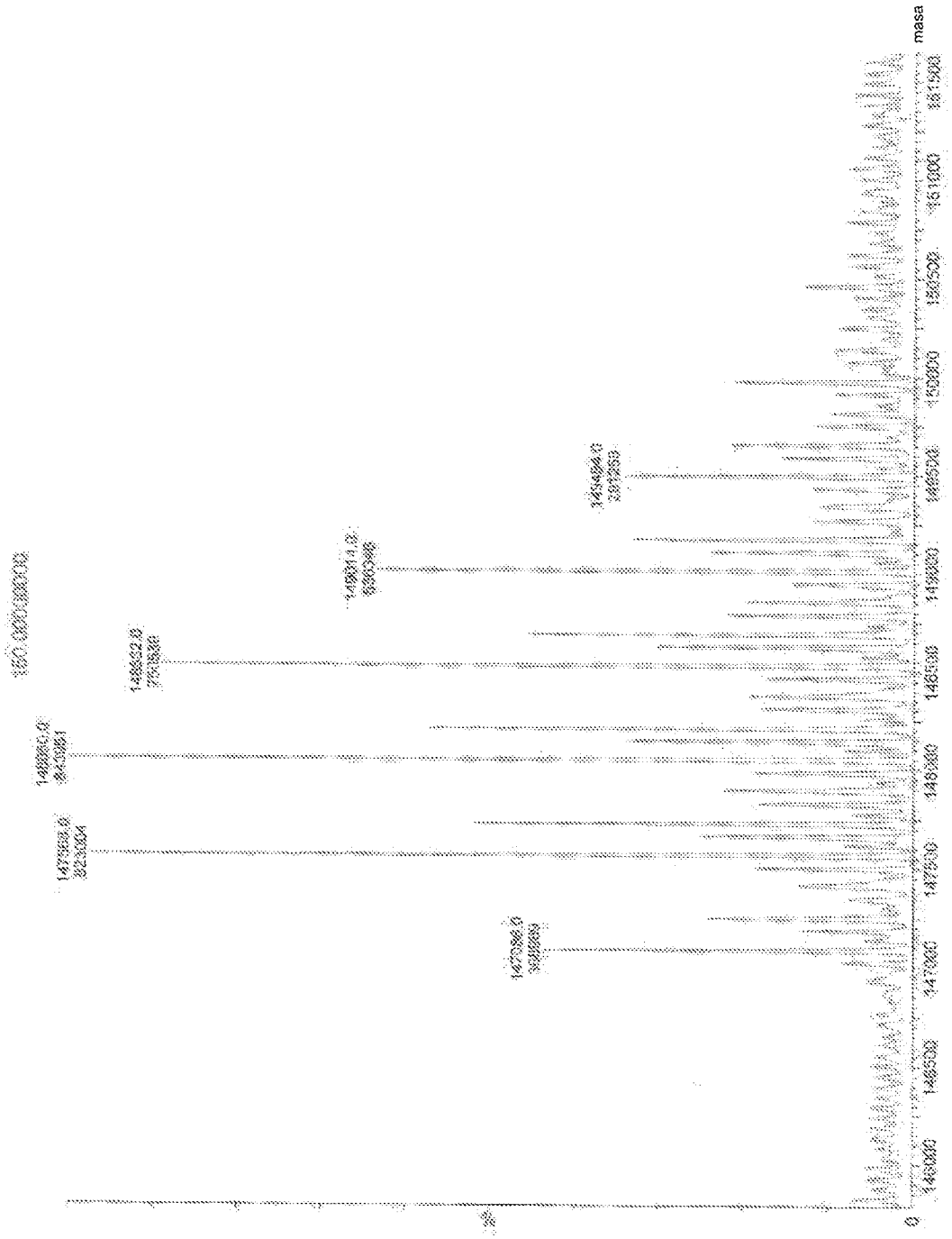
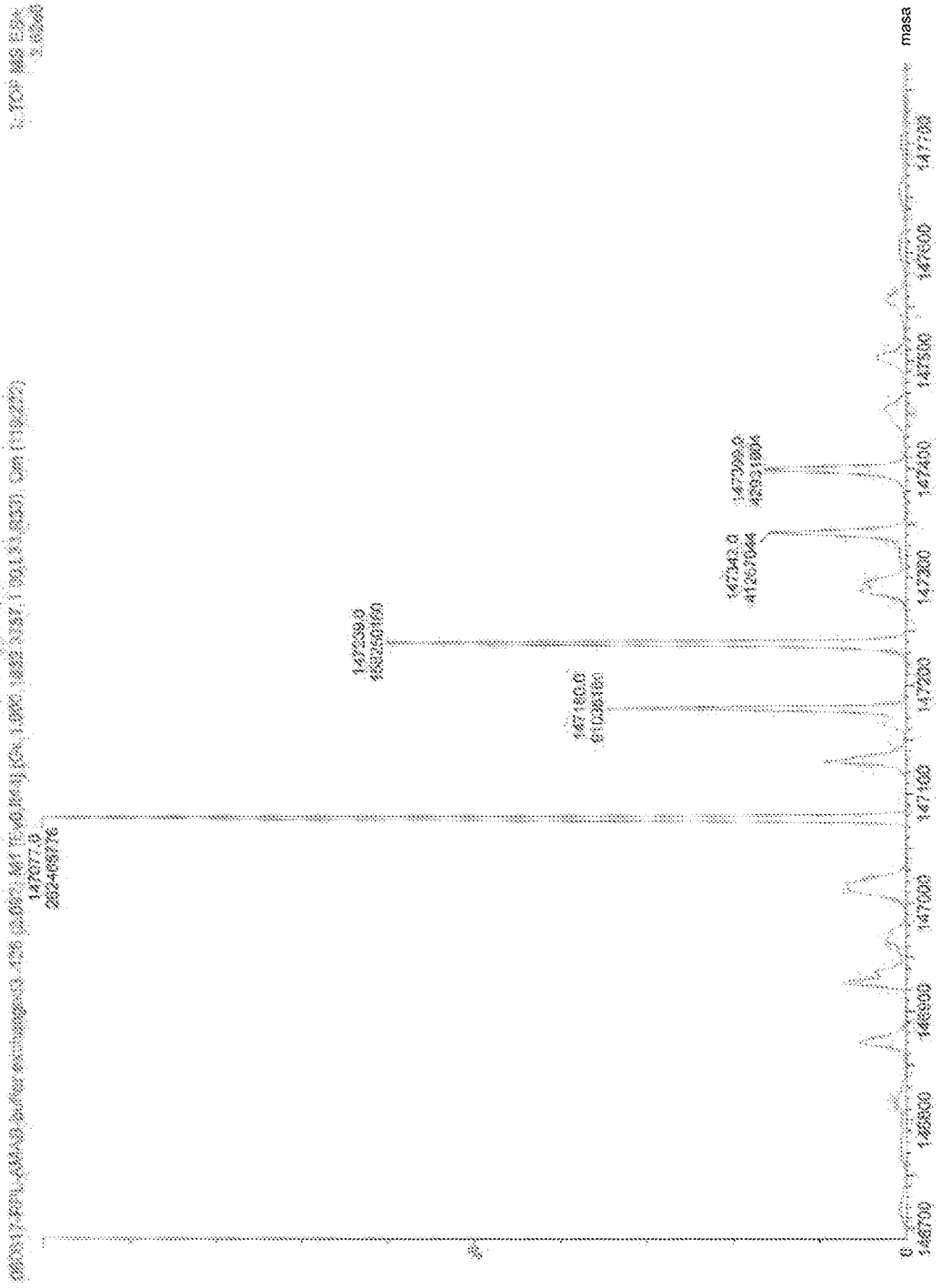

masa
1460000
1465000
1470000
1475000
1480000
1485000
1490000
1495000
1500000
1505000
1510000
1515000

Fig. 112A


masa
1467200
1467400
1467600
1467800
1468000
1468200
1468400
1468600
1468800
1469000
1469200
1469400
1469600
1469800
1470000
1470200
1470400
1470600
1470800
1471000
1471200
1471400
1471600
1471800
1472000
1472200
1472400
1472600
1472800
1473000
1473200
1473400
1473600
1473800
1474000
1474200
1474400
1474600
1474800
1475000

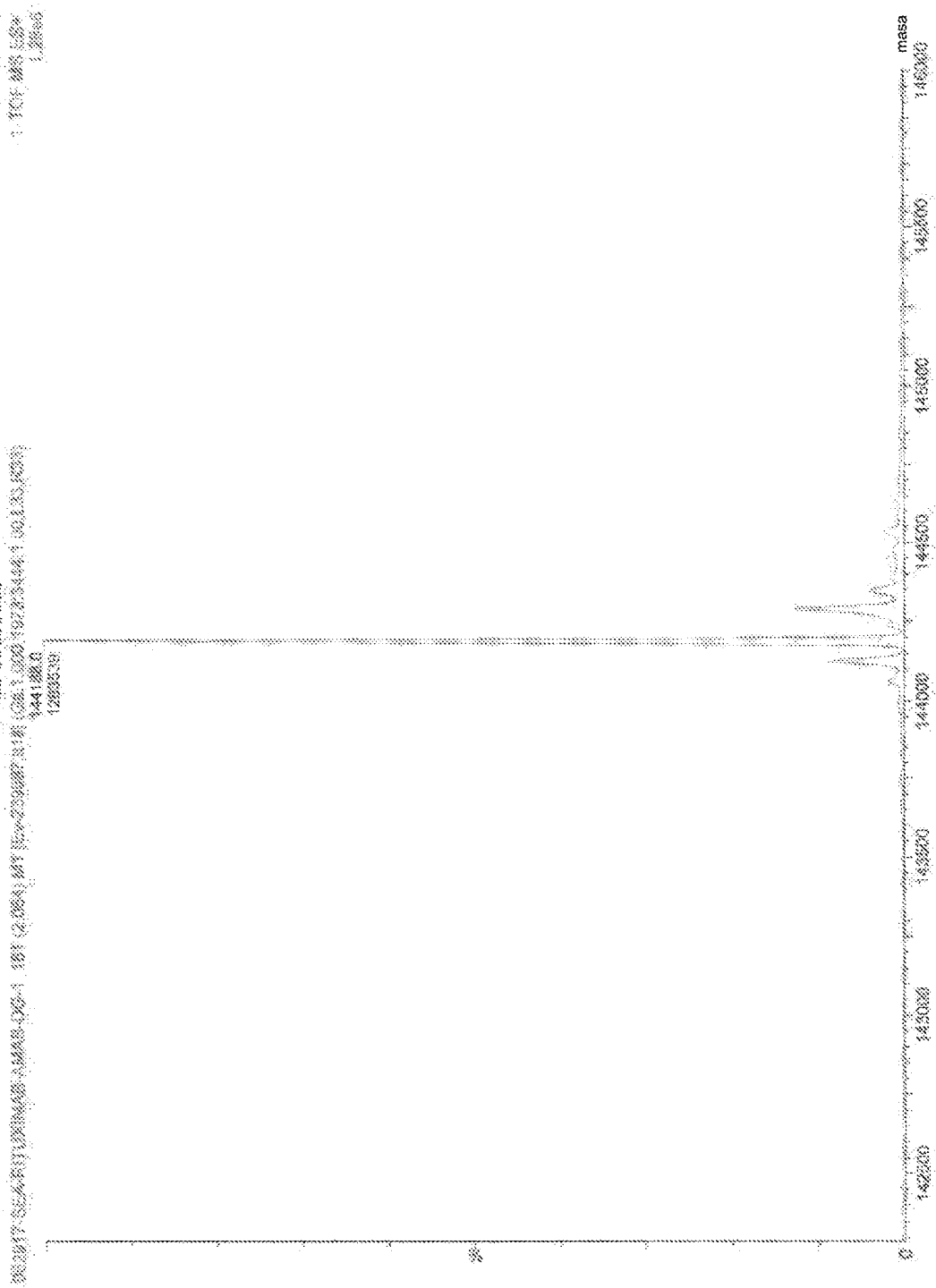

masa
1440000
1441000
1442000
1443000
1444000
1445000
1446000
1447000
1448000
1449000
1450000
%
0

Fig. 112C

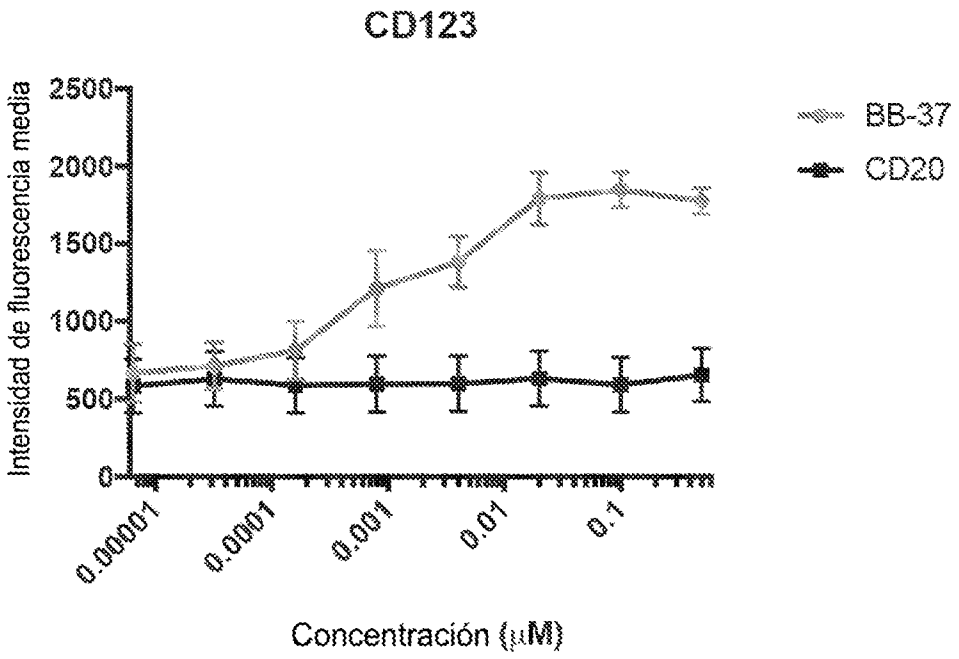


Fig. 112D

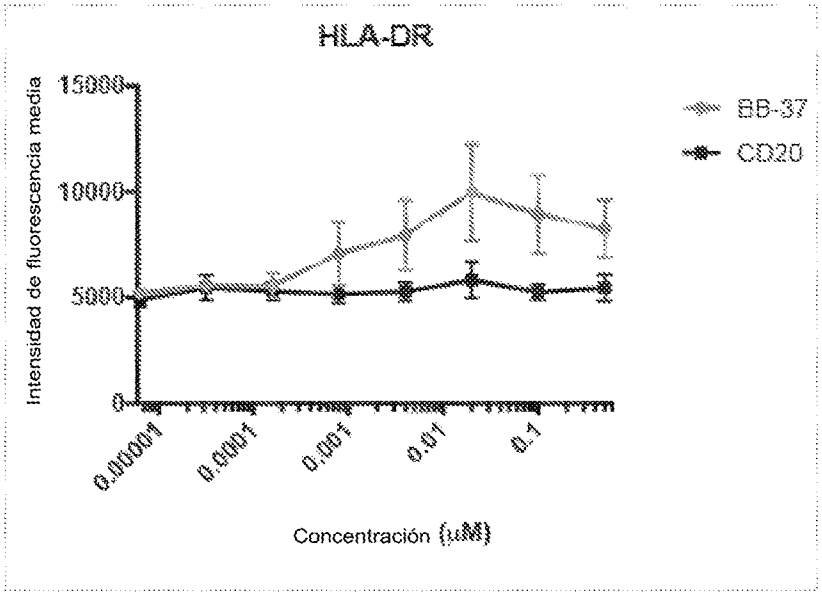


Fig. 112E

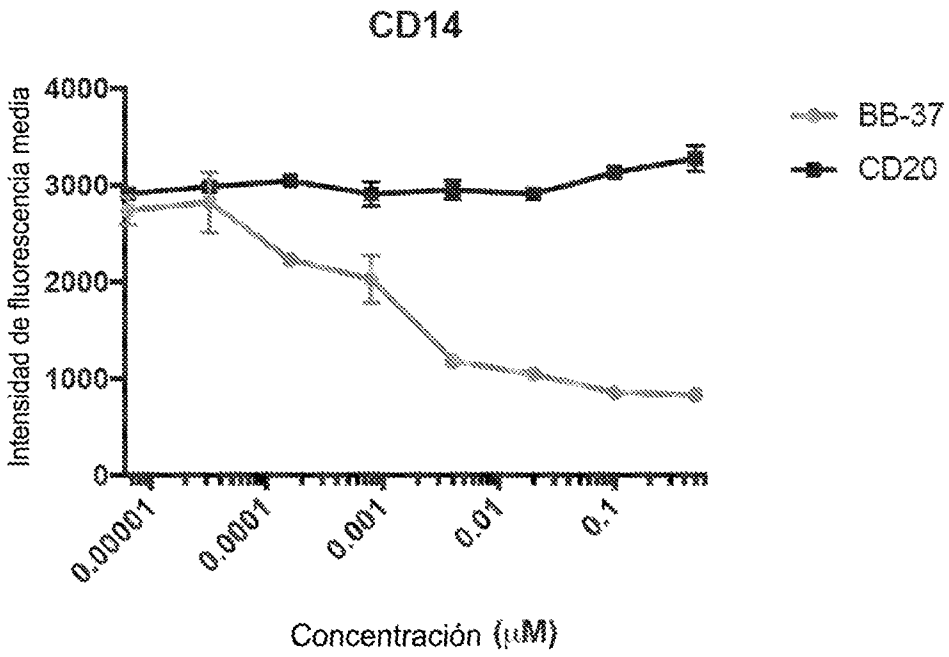


Fig. 112F

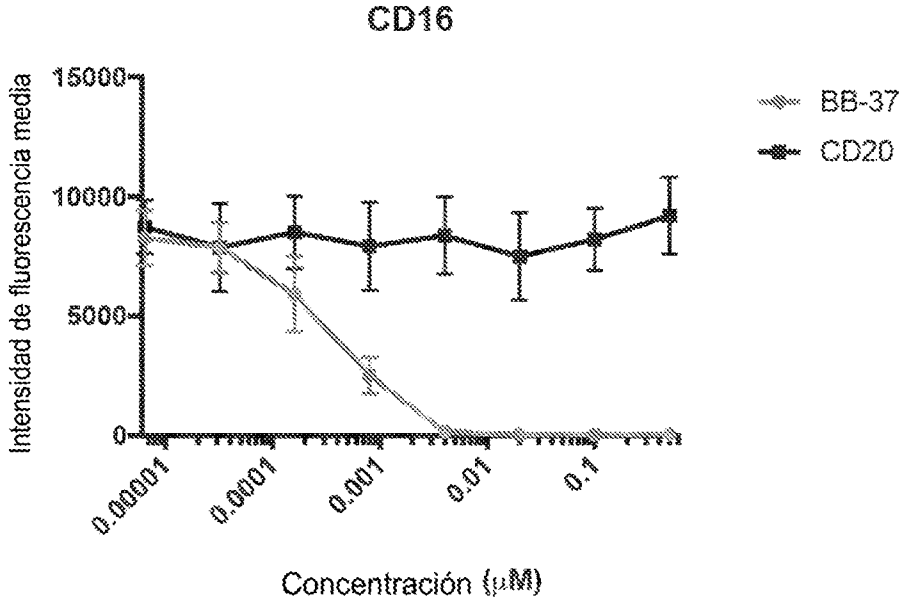


Fig. 112G

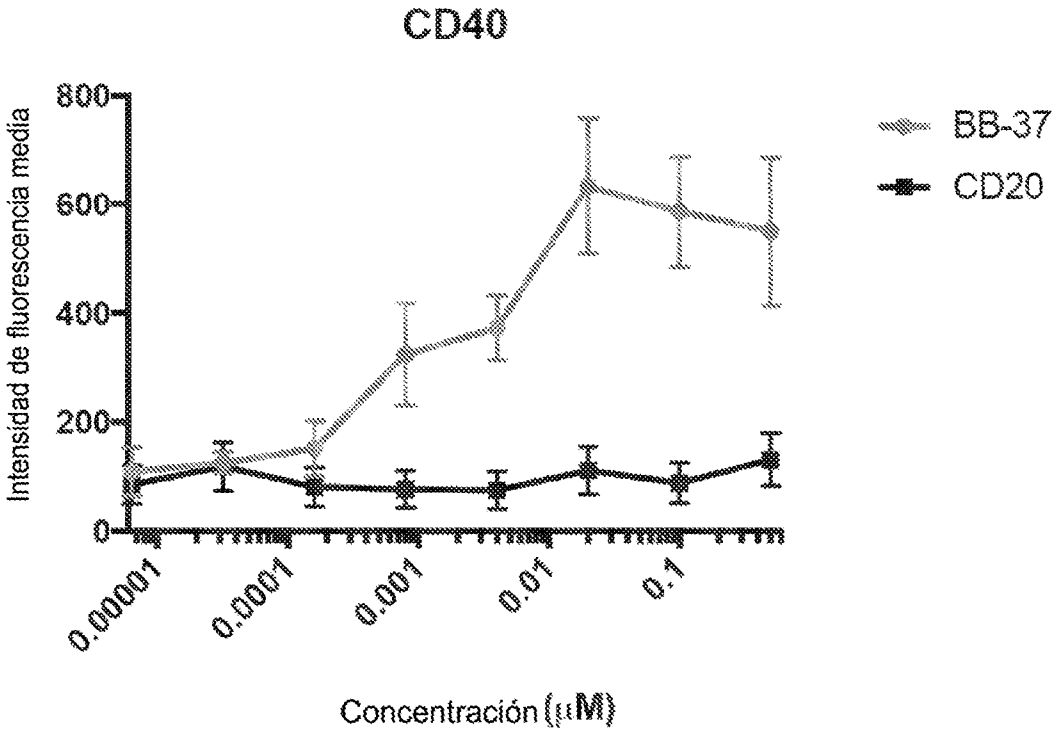


Fig. 112H

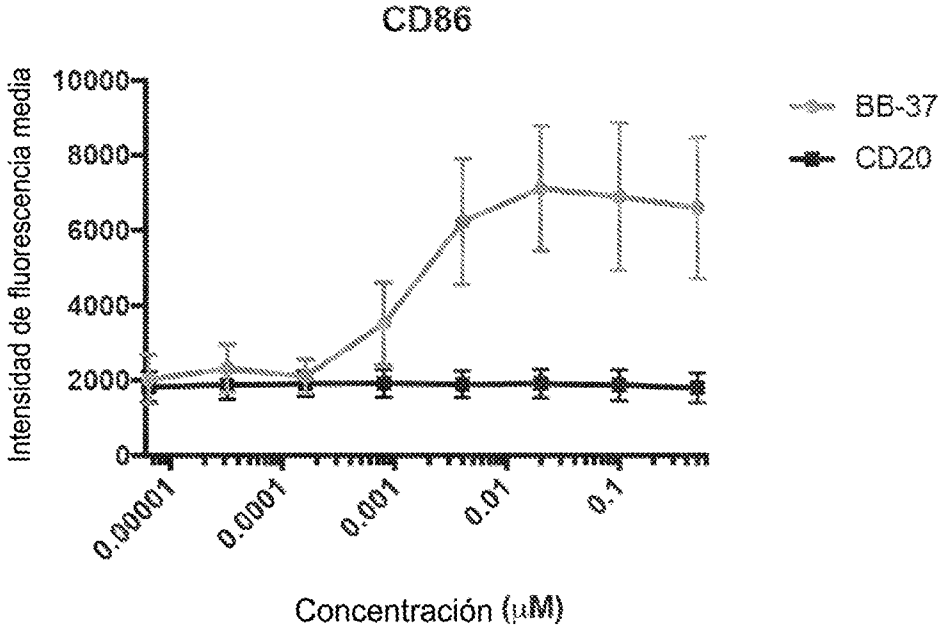
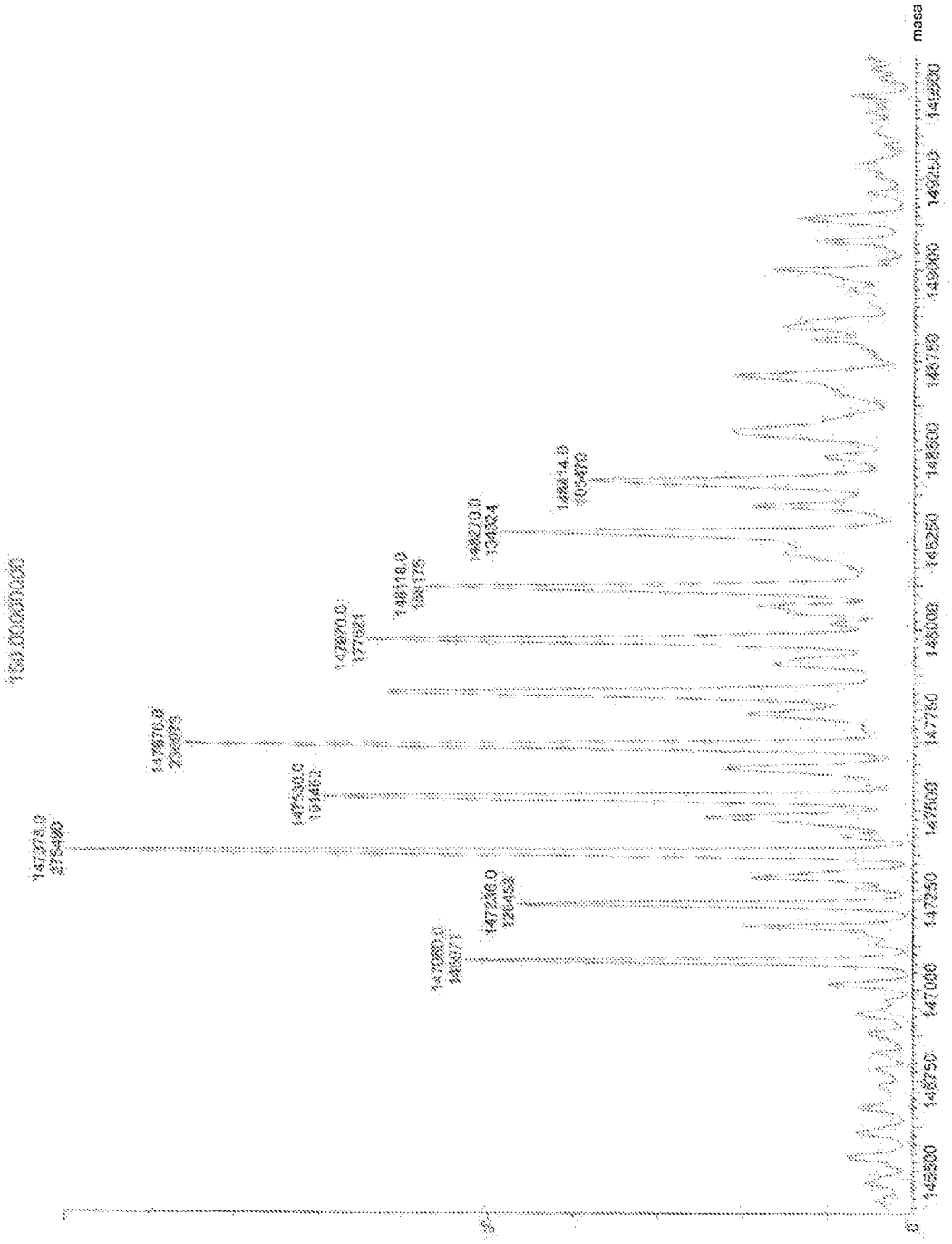
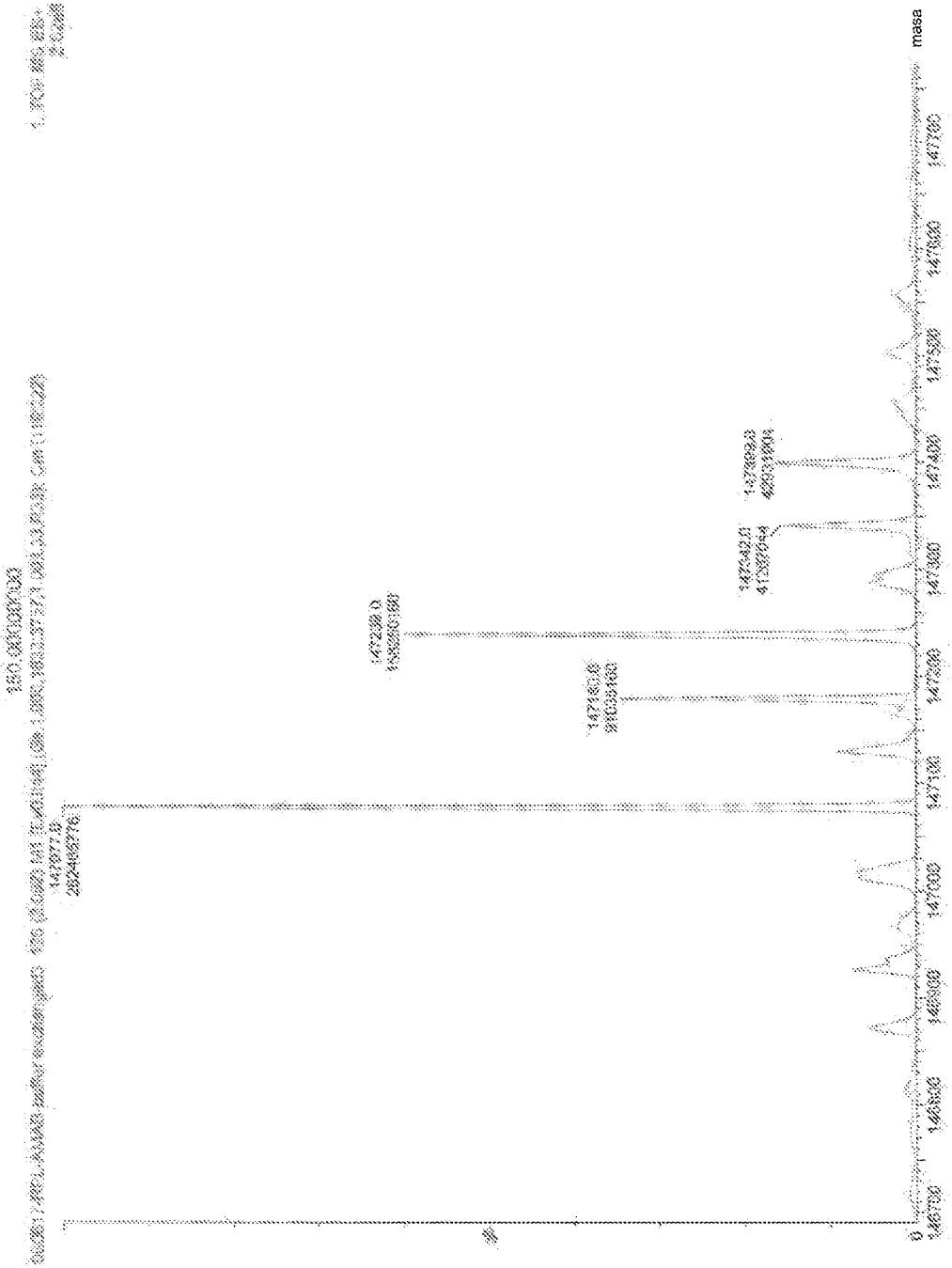


Fig. 112I


masa
1468000
1469750
1471000
1472500
1475000
1477500
1480000
1482500
1485000
1487500
1490000
1492500
1495000
1497500
1500000
1502500
1505000
1507500
1510000
1512500
1515000
1517500
1520000
1522500
1525000
1527500
1530000
1532500
1535000
1537500
1540000
1542500
1545000
1547500
1550000
1552500
1555000
1557500
1560000
1562500
1565000
1567500
1570000


masa
%
0
1472238.0
1472238.0
1472238.

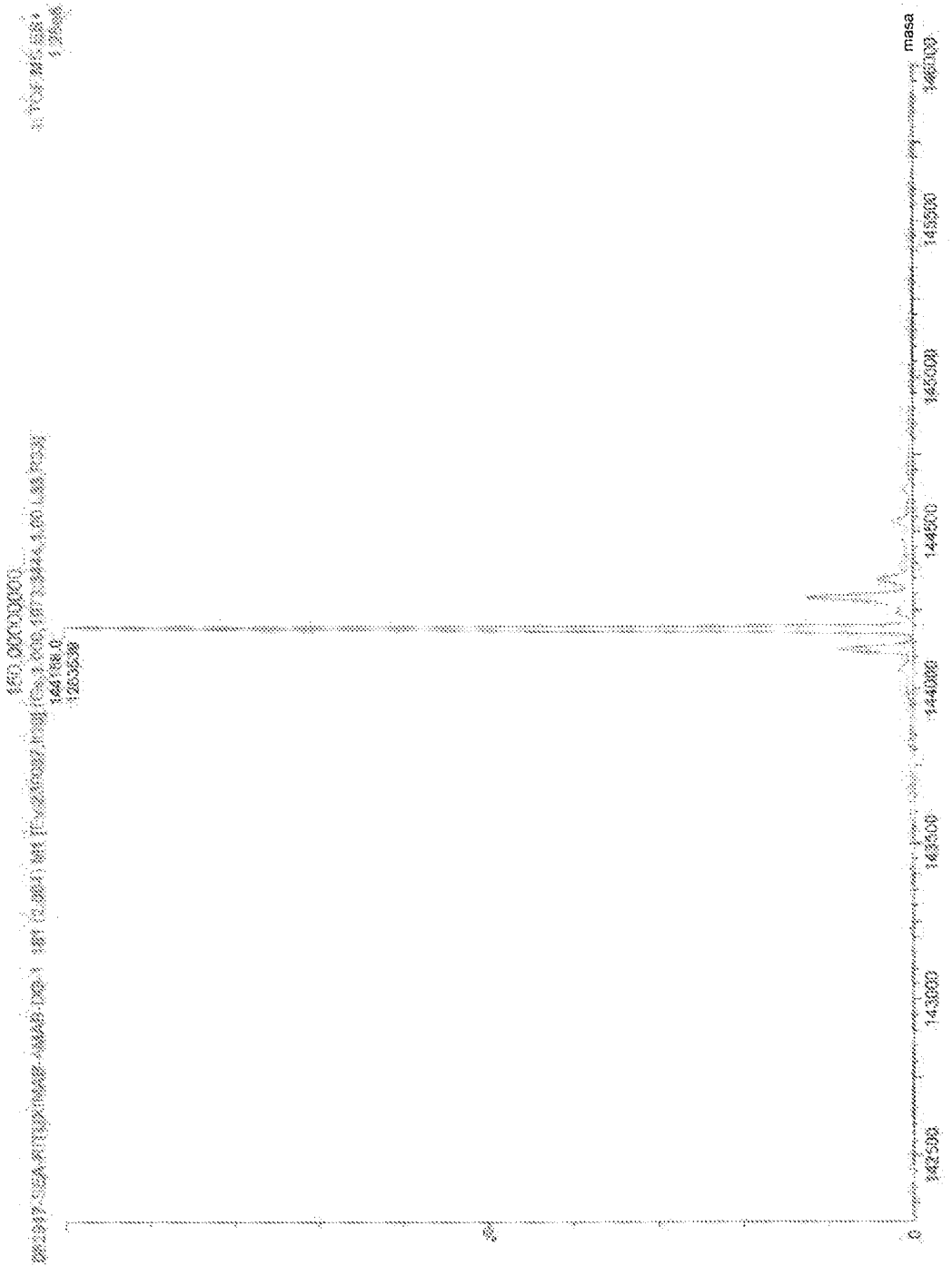

masa
1465000
1455000
1445000
1440000
1435000
1430000
1425000
%
0

Fig. 113C

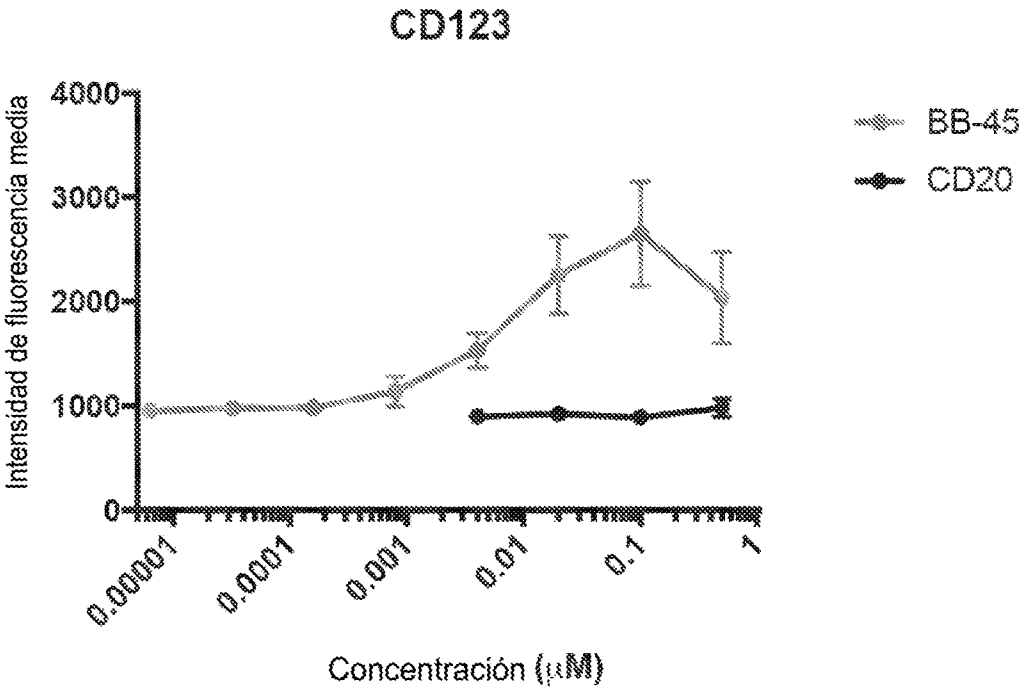


Fig. 113D

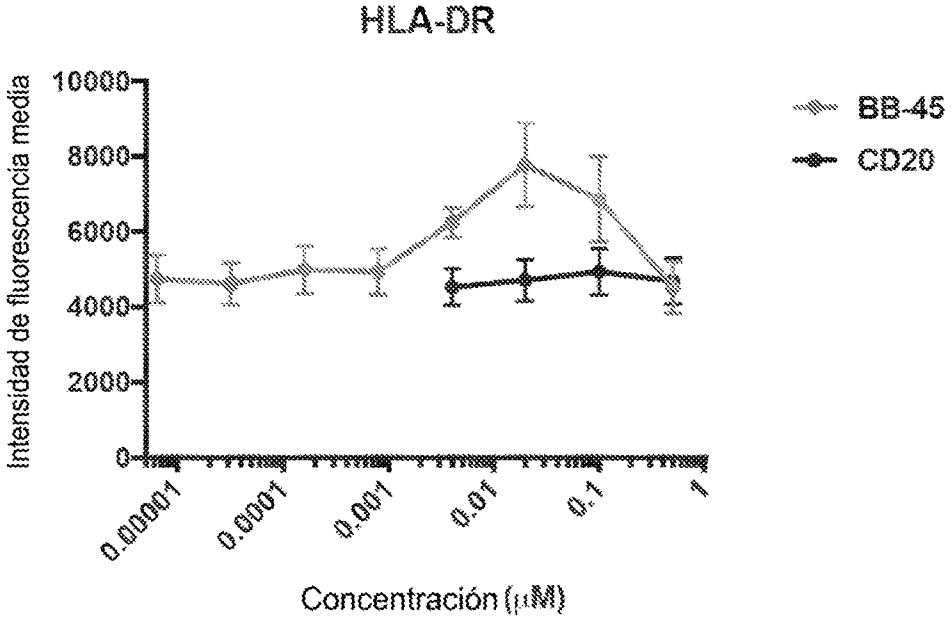


Fig. 113E

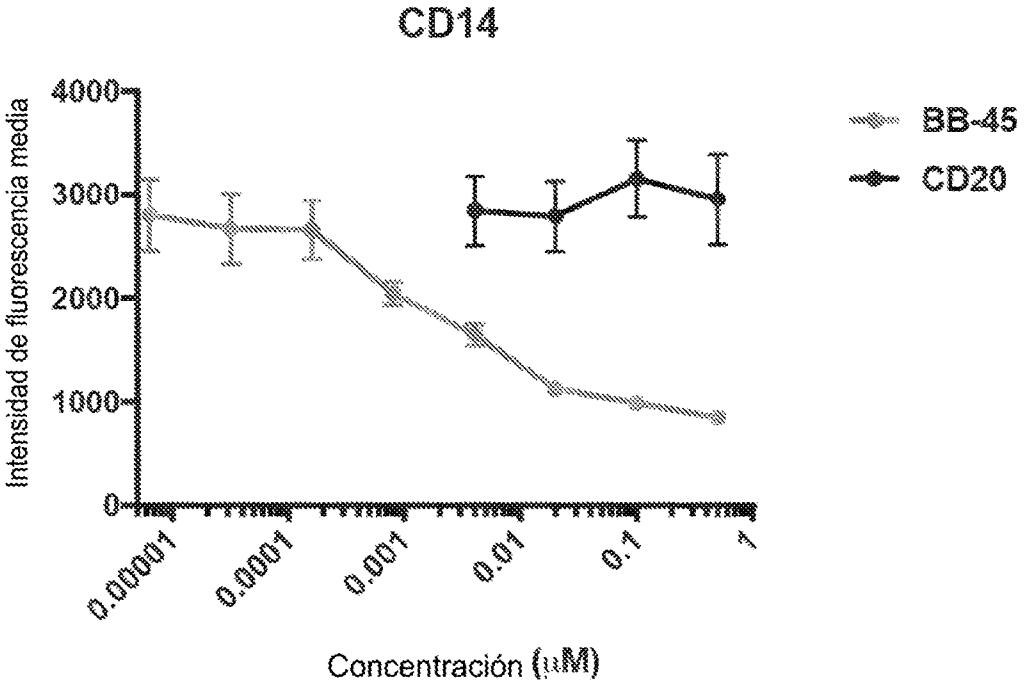


Fig. 113F

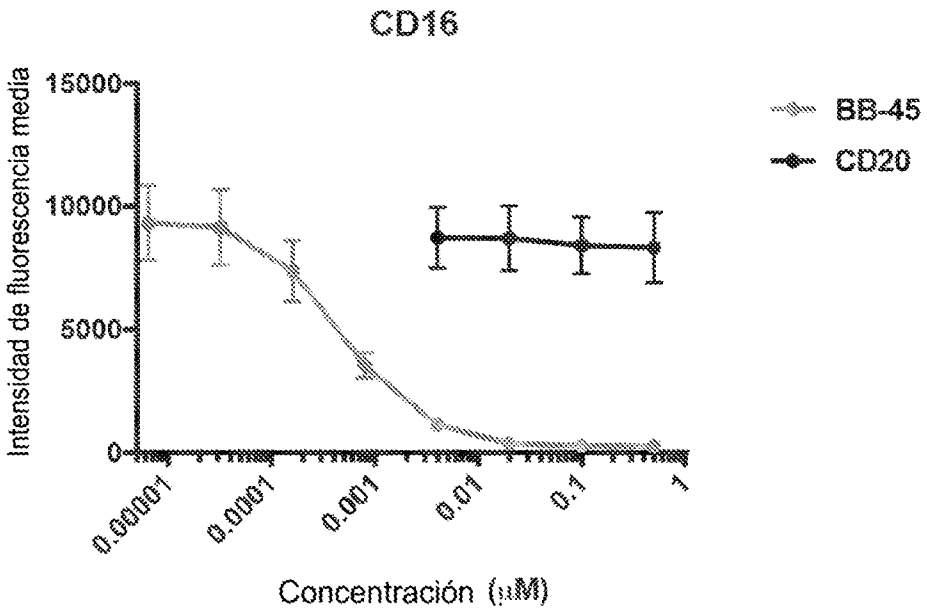


Fig. 113G

544

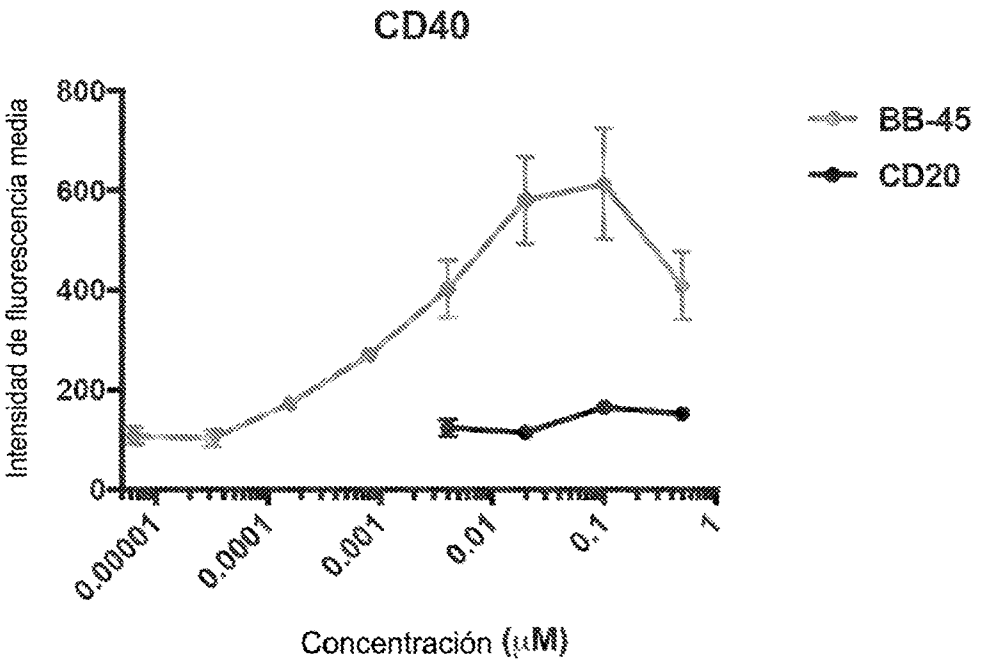


Fig. 113H

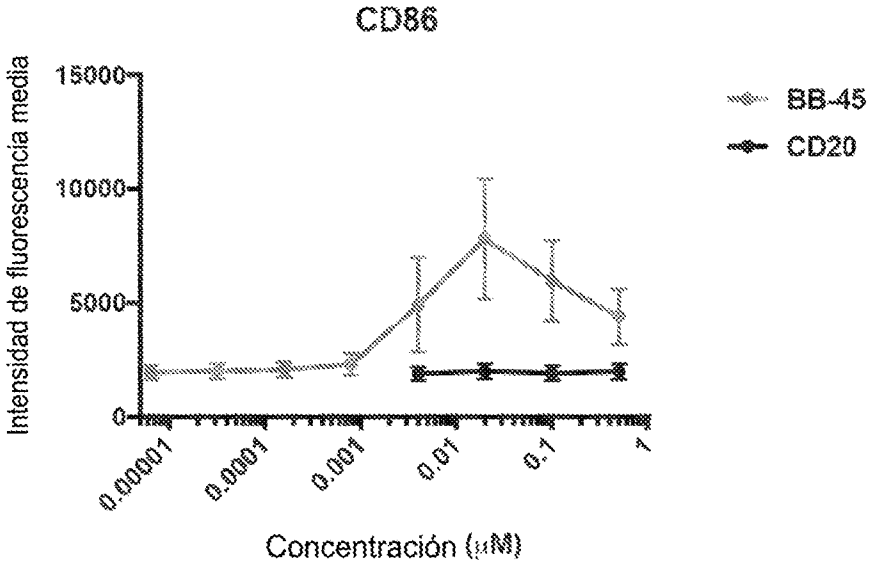


Fig. 113I

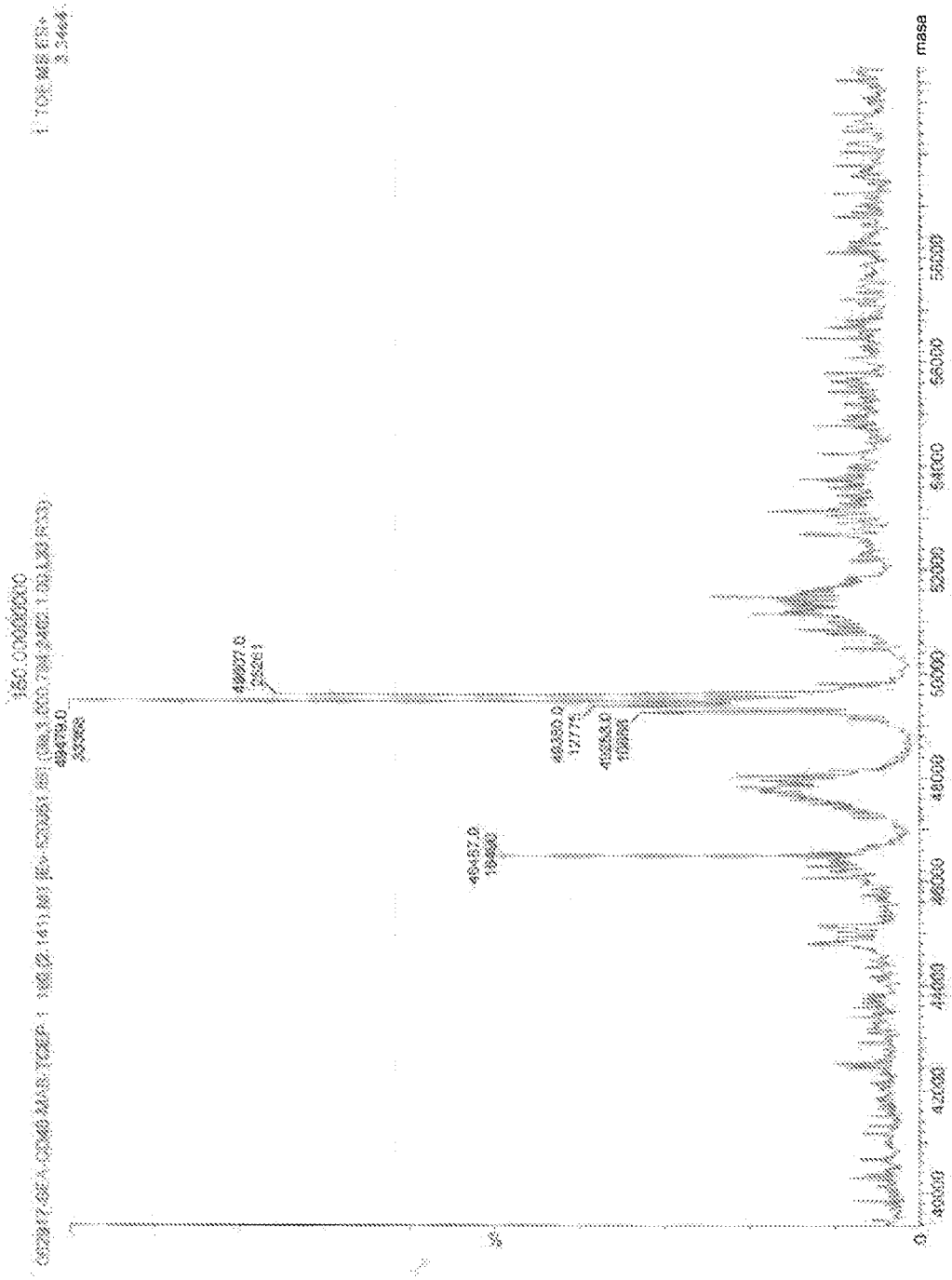


Fig. 114A

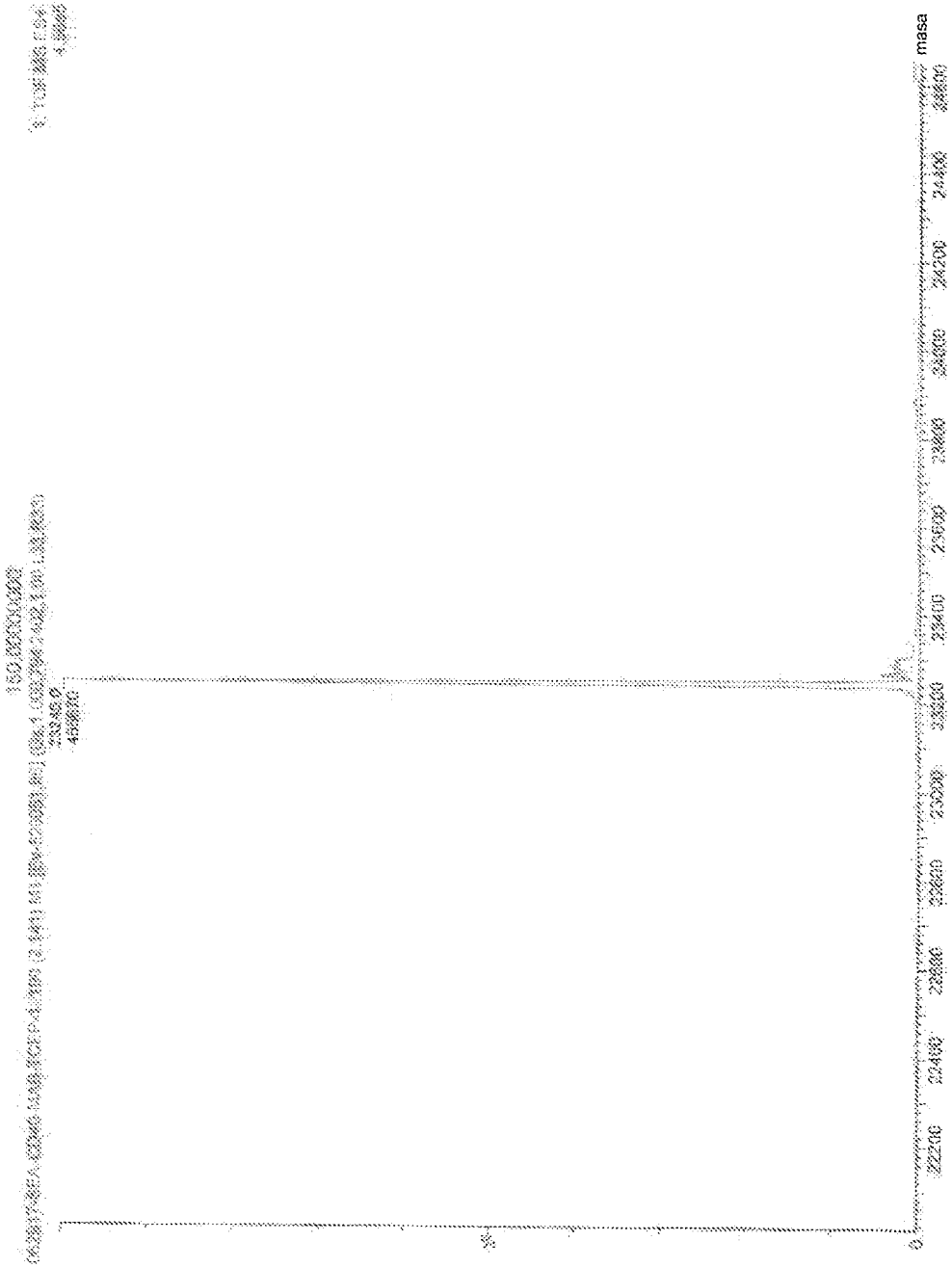

masa
%
0
22200
23400
24600
24800
25000
25200
25400
25600
25800
26000
26200
26400
26600
26800
27000
27200
27400
27600
27800
28000
28200
28400
28600
28800
29000
29200
29400
29600
29800
30000
30200
30400
30600
30800
31000
31200
31400
31600
31800
32000
32200
32400
32600
32800
33000
33200
33400
33600
33800
34000
34200
34400
34600
34800

Fig. 114B

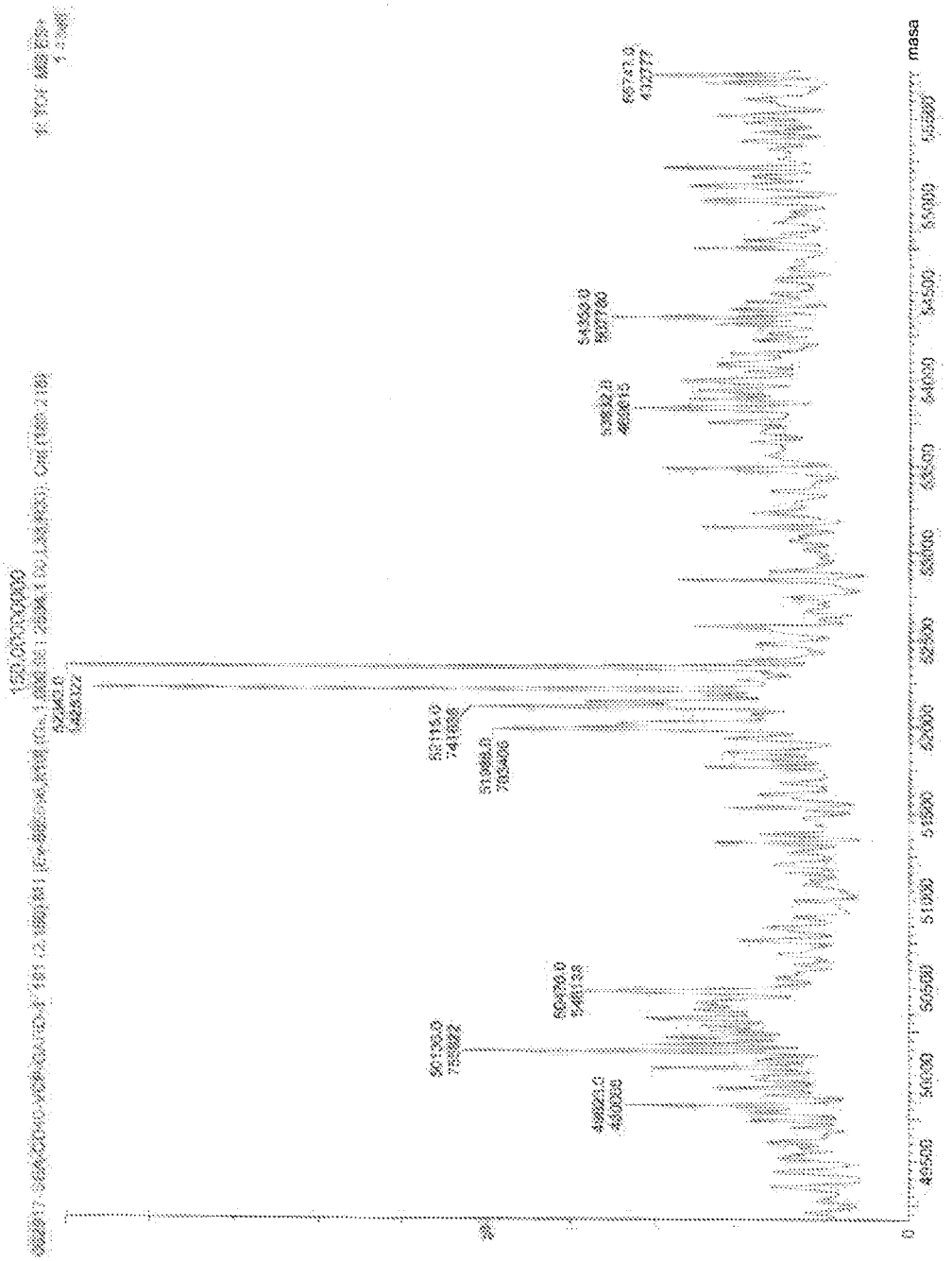


Fig. 114C

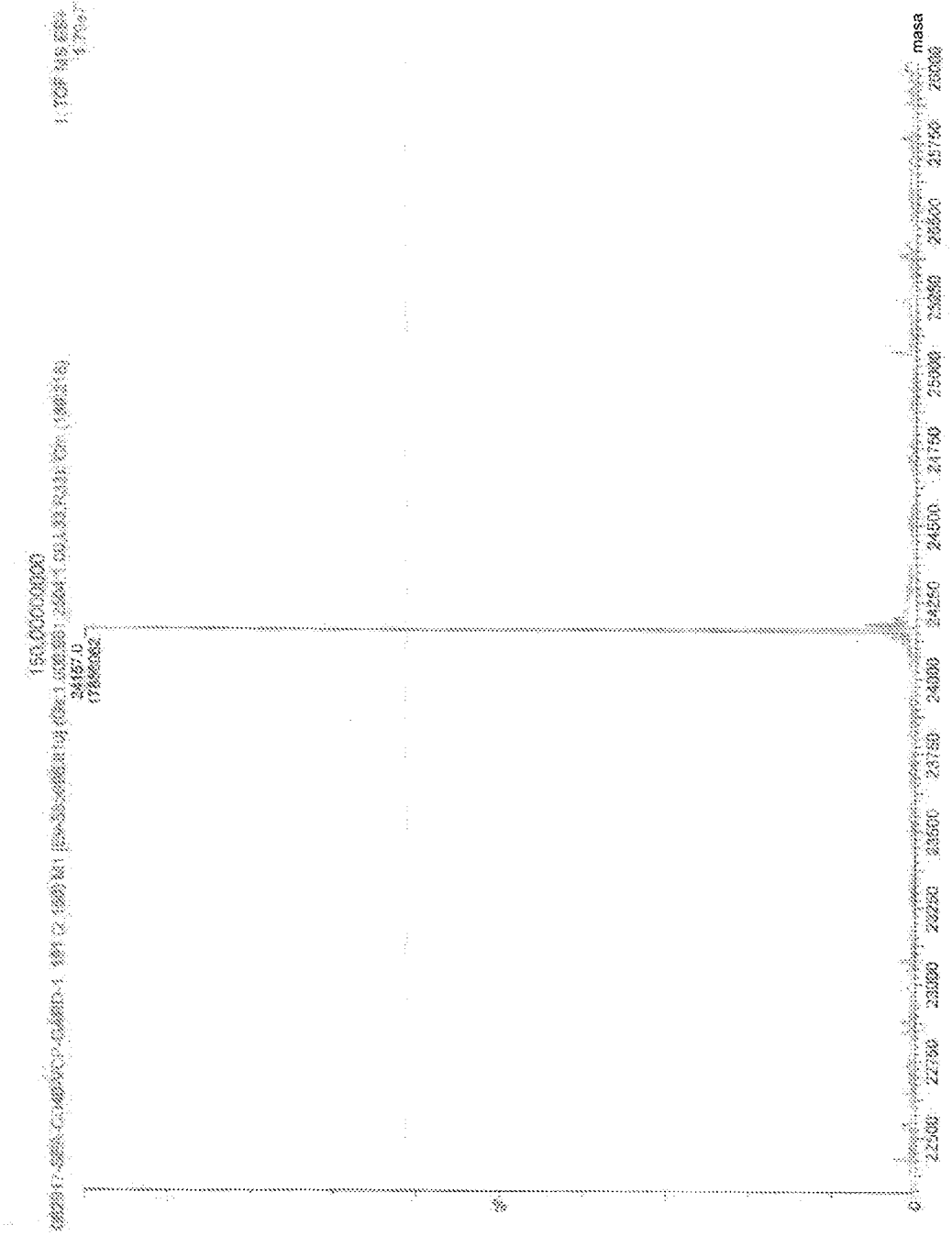


Fig. 114D

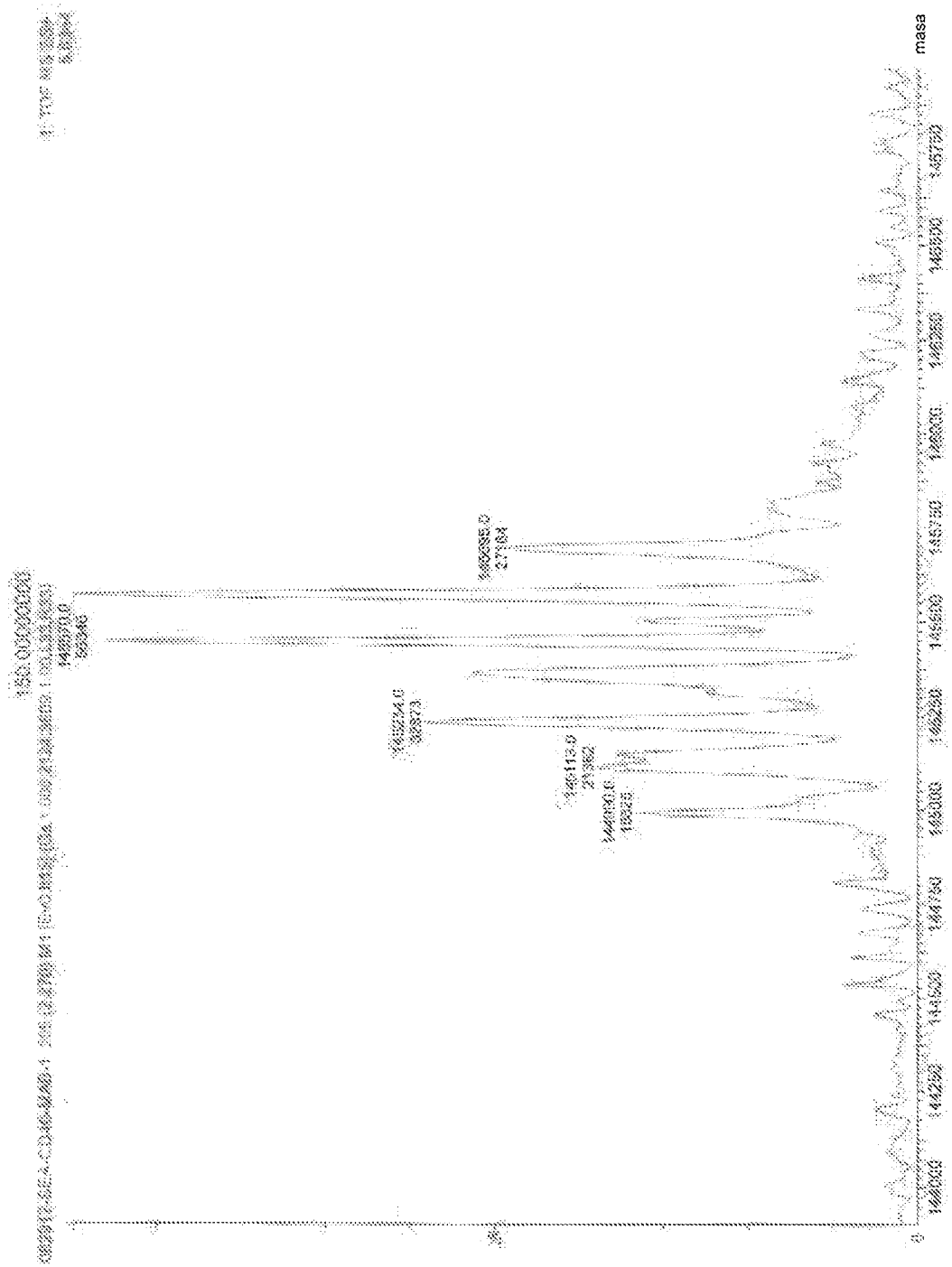


Fig. 115A

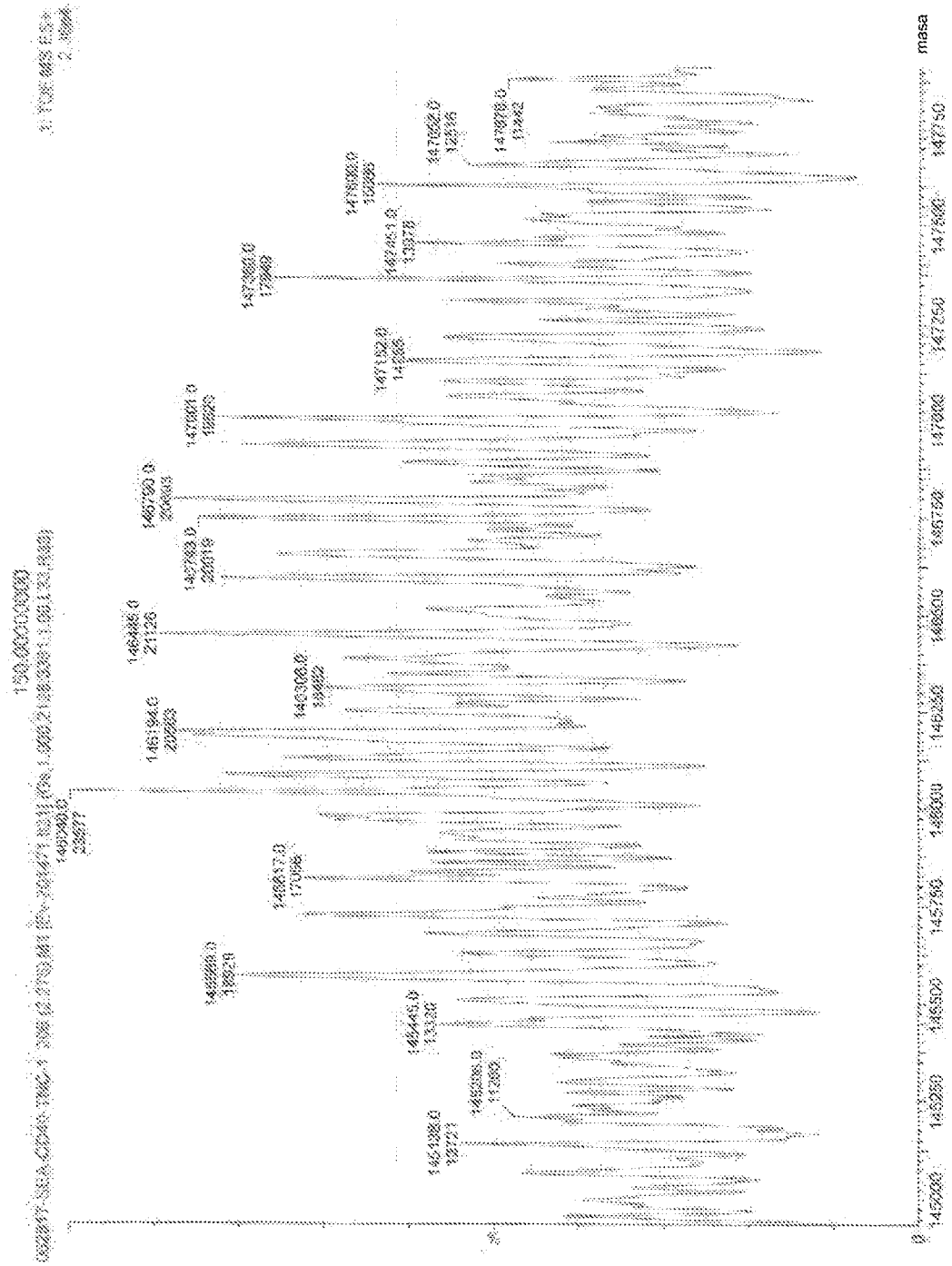


Fig. 115B

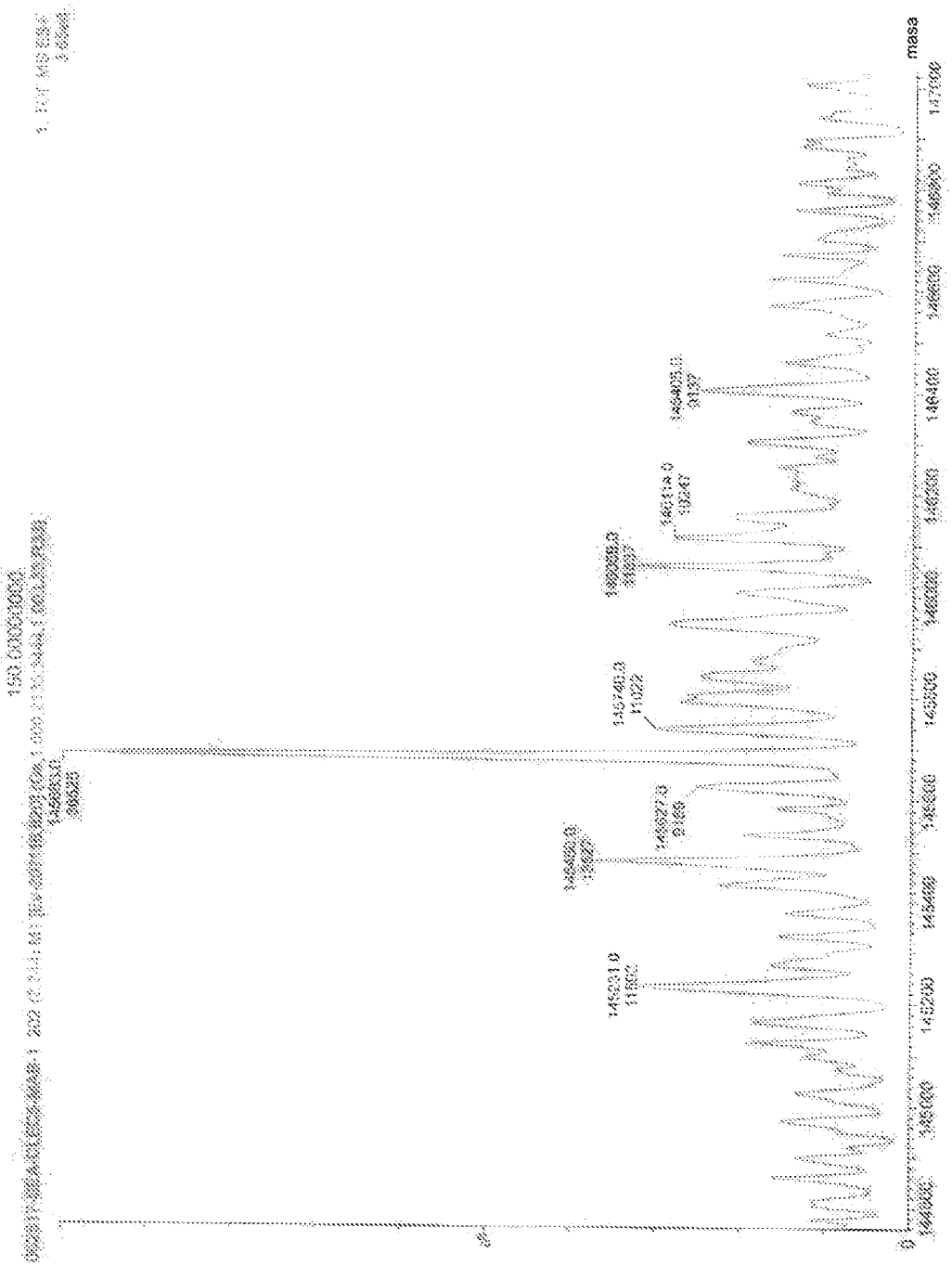


Fig. 116A

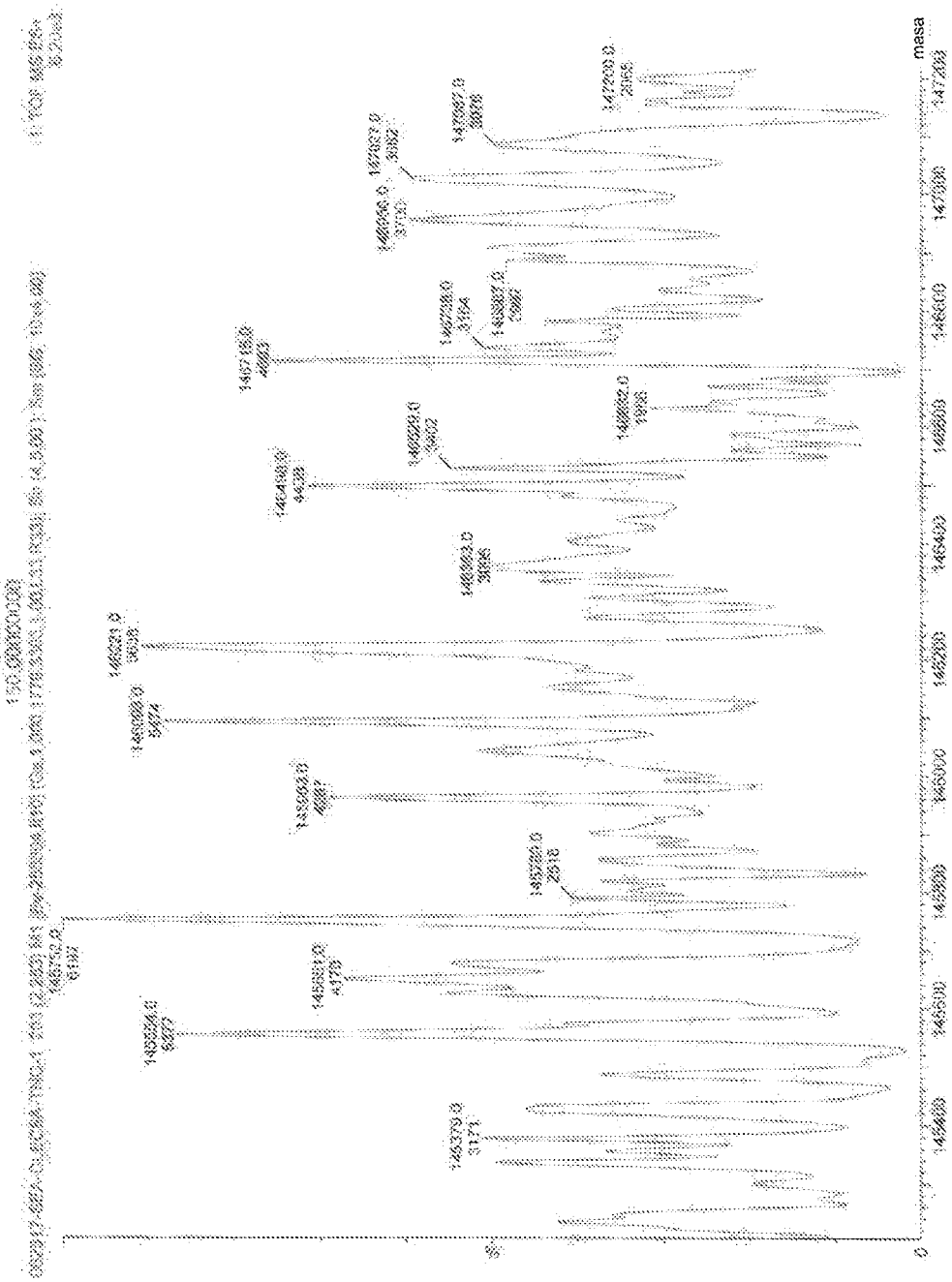


Fig. 116B

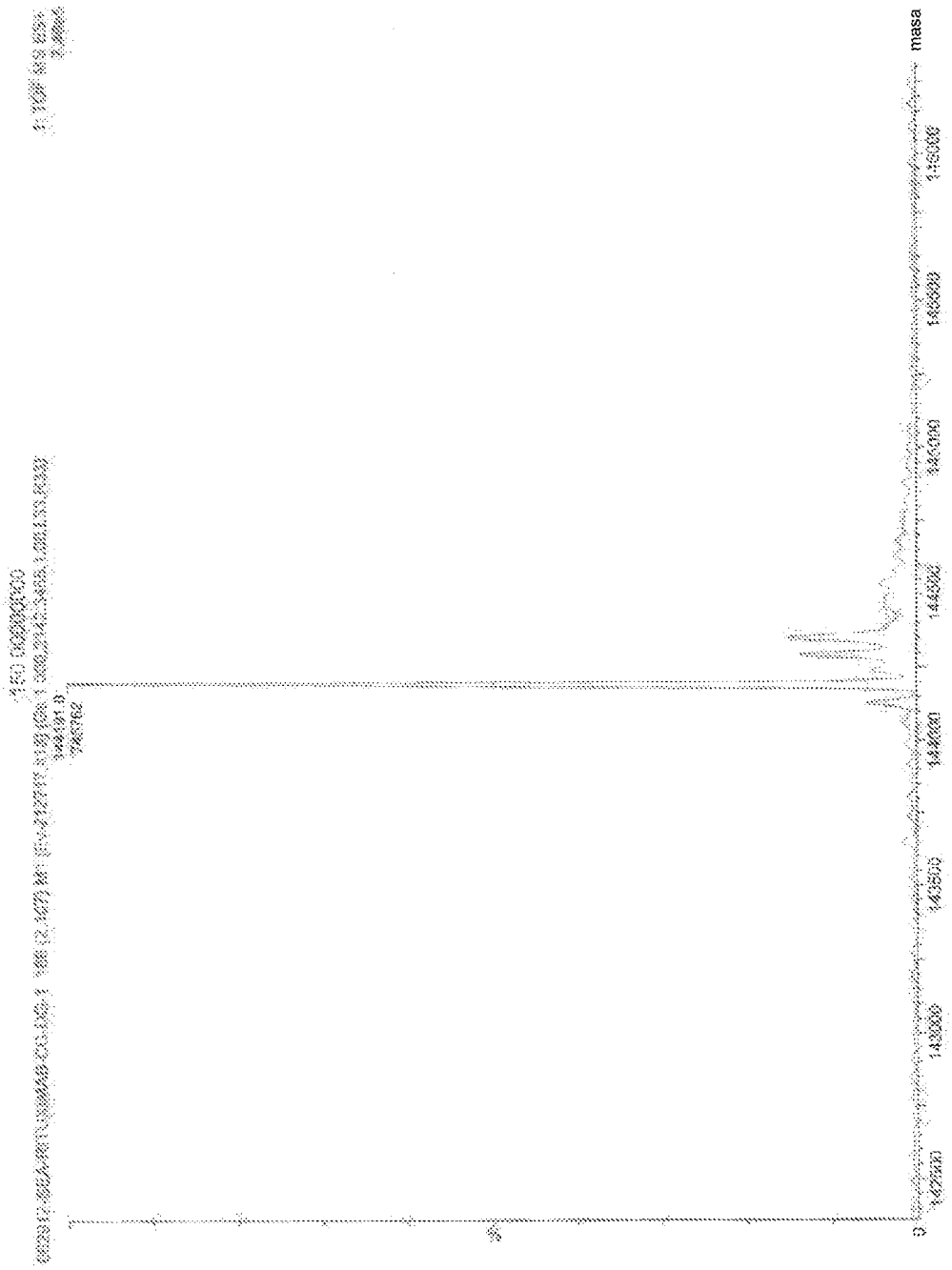

masa
%
100
0
1.446.762
1.446.000
1.445.500
1.445.000
1.444.500
1.444.000
1.443.500
1.443.000
1.442.500
1.442.000

Fig. 117A

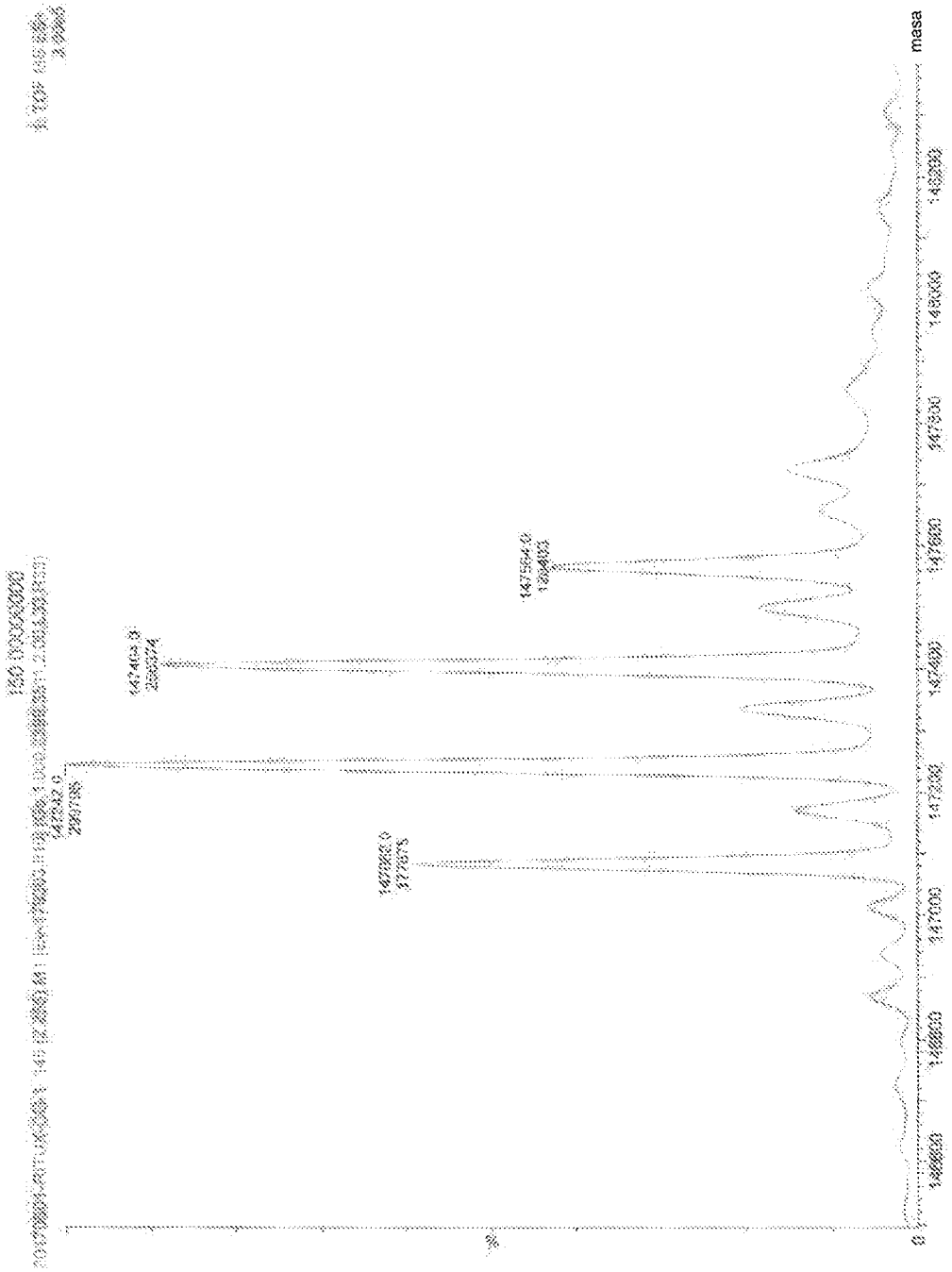

masa
%
100
0
1474409.9
1474552.9
1475000.0
1476000
1477000
1478000
1479000

Fig. 117B

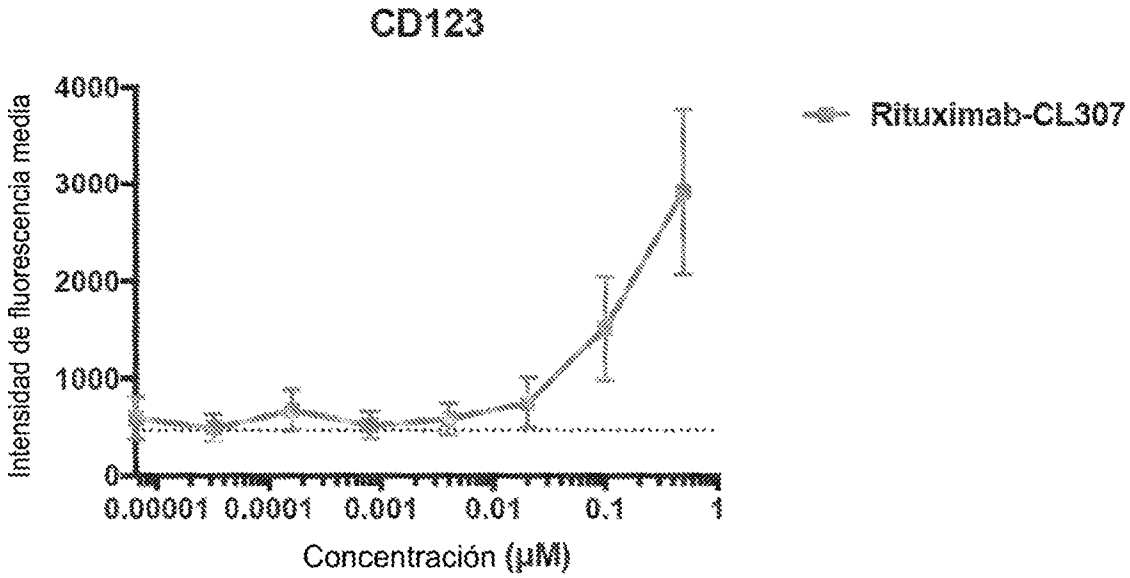


Fig. 118A

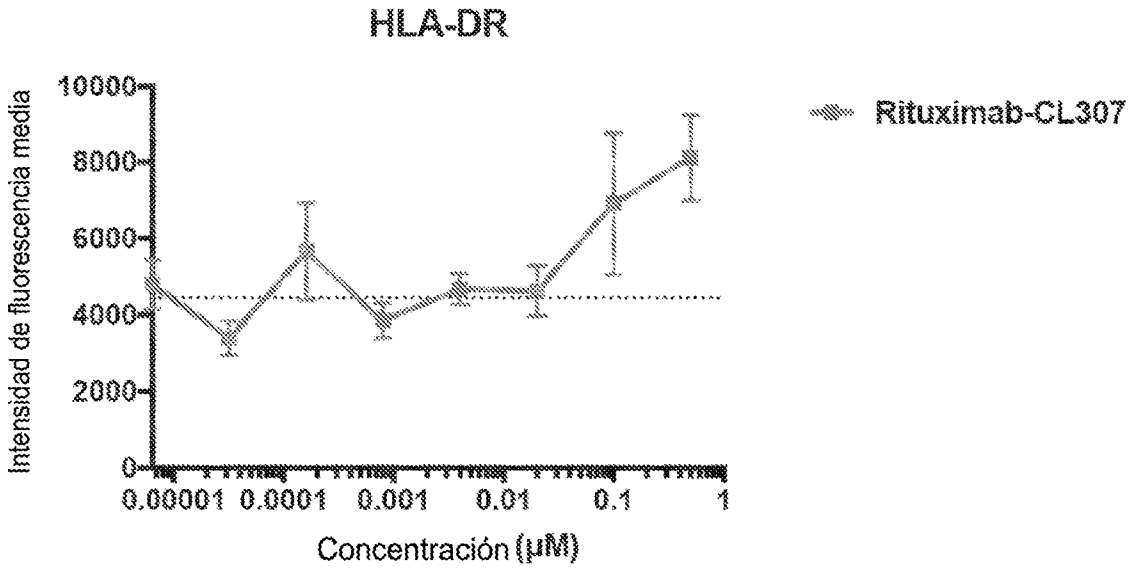


Fig. 118B

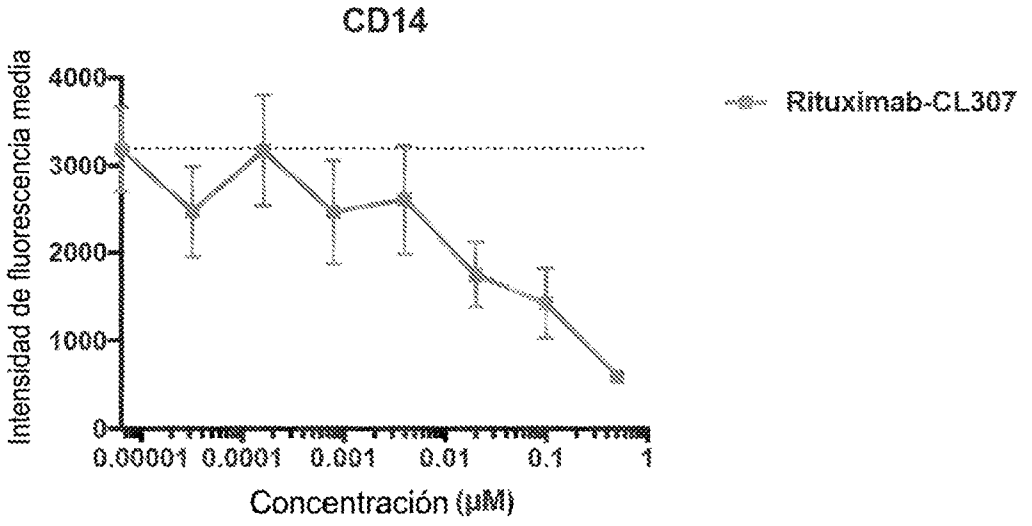


Fig. 118C

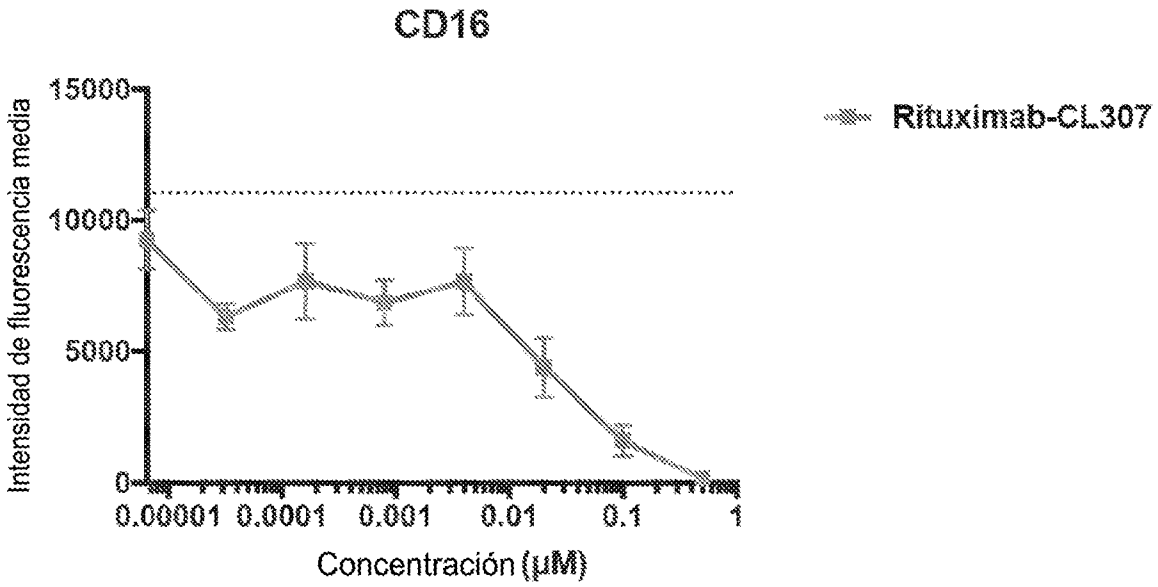


Fig. 118D

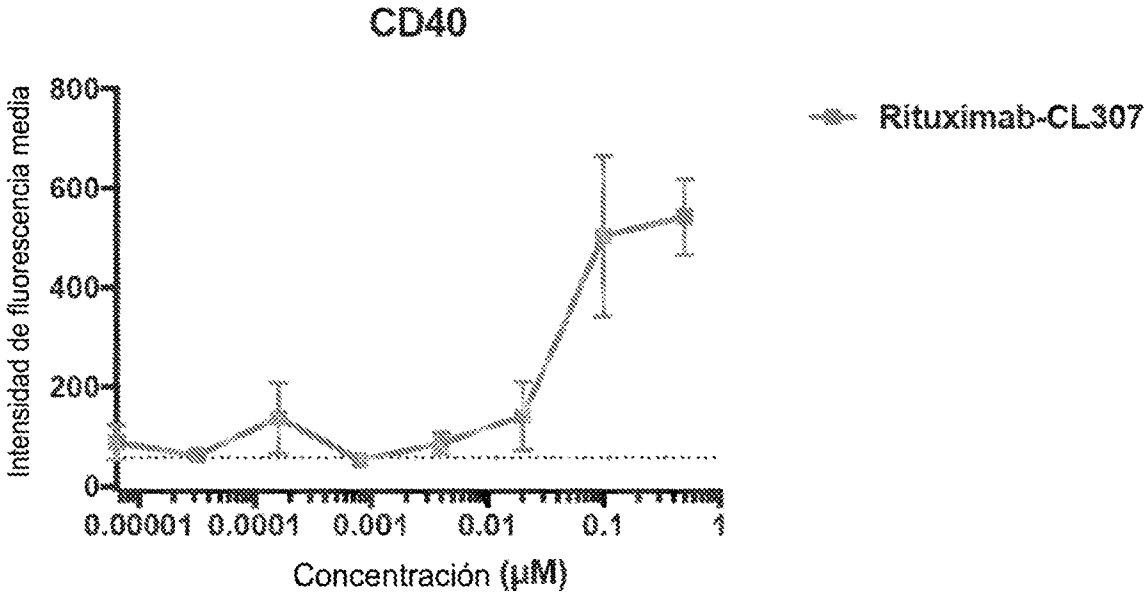


Fig. 118E

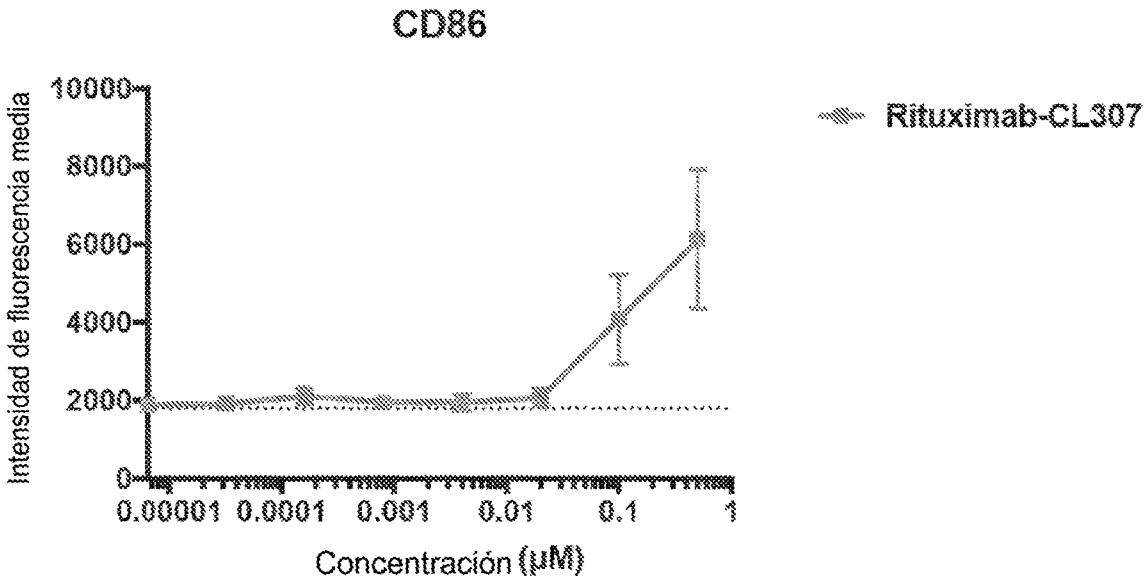


Fig. 118F

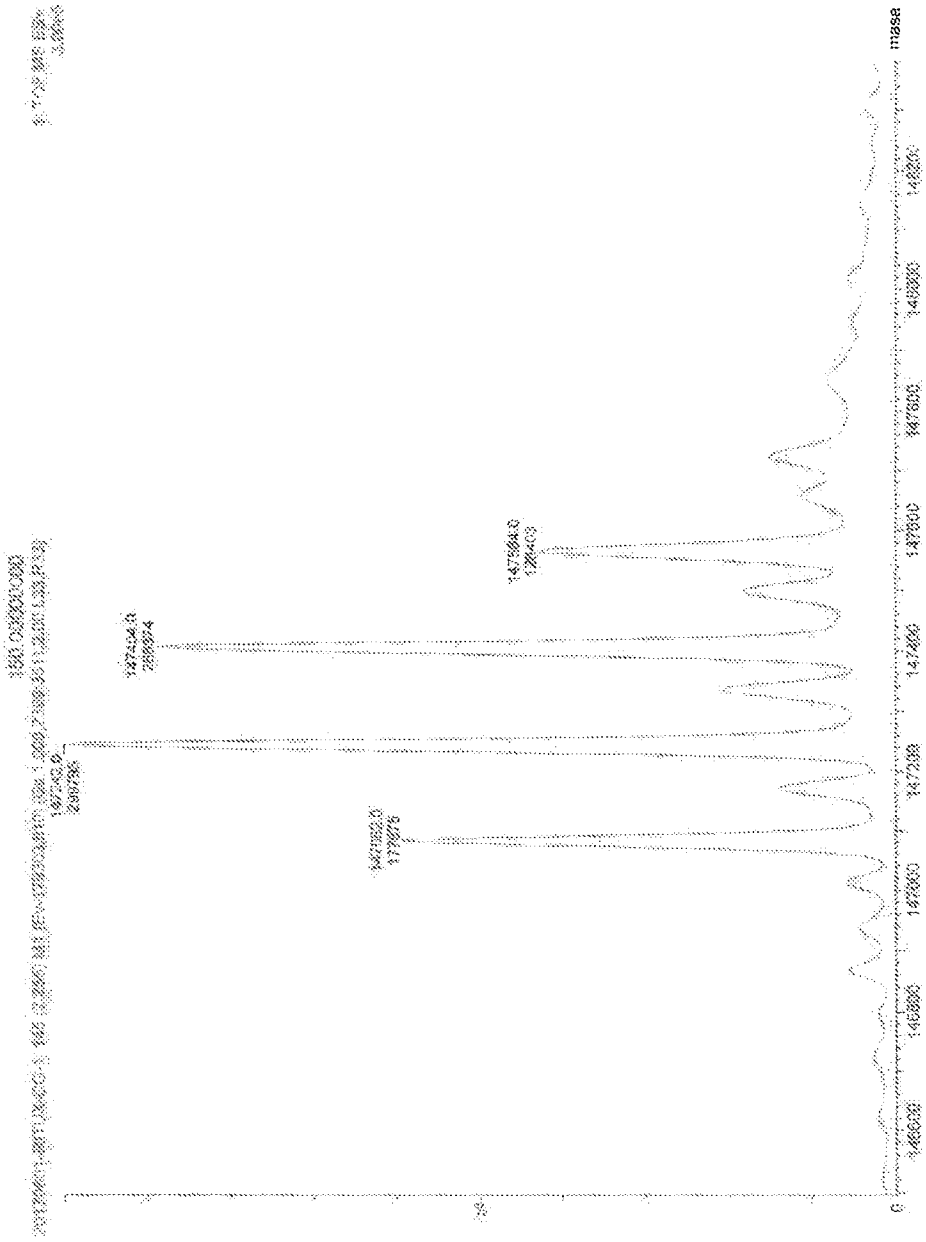


Fig. 118G

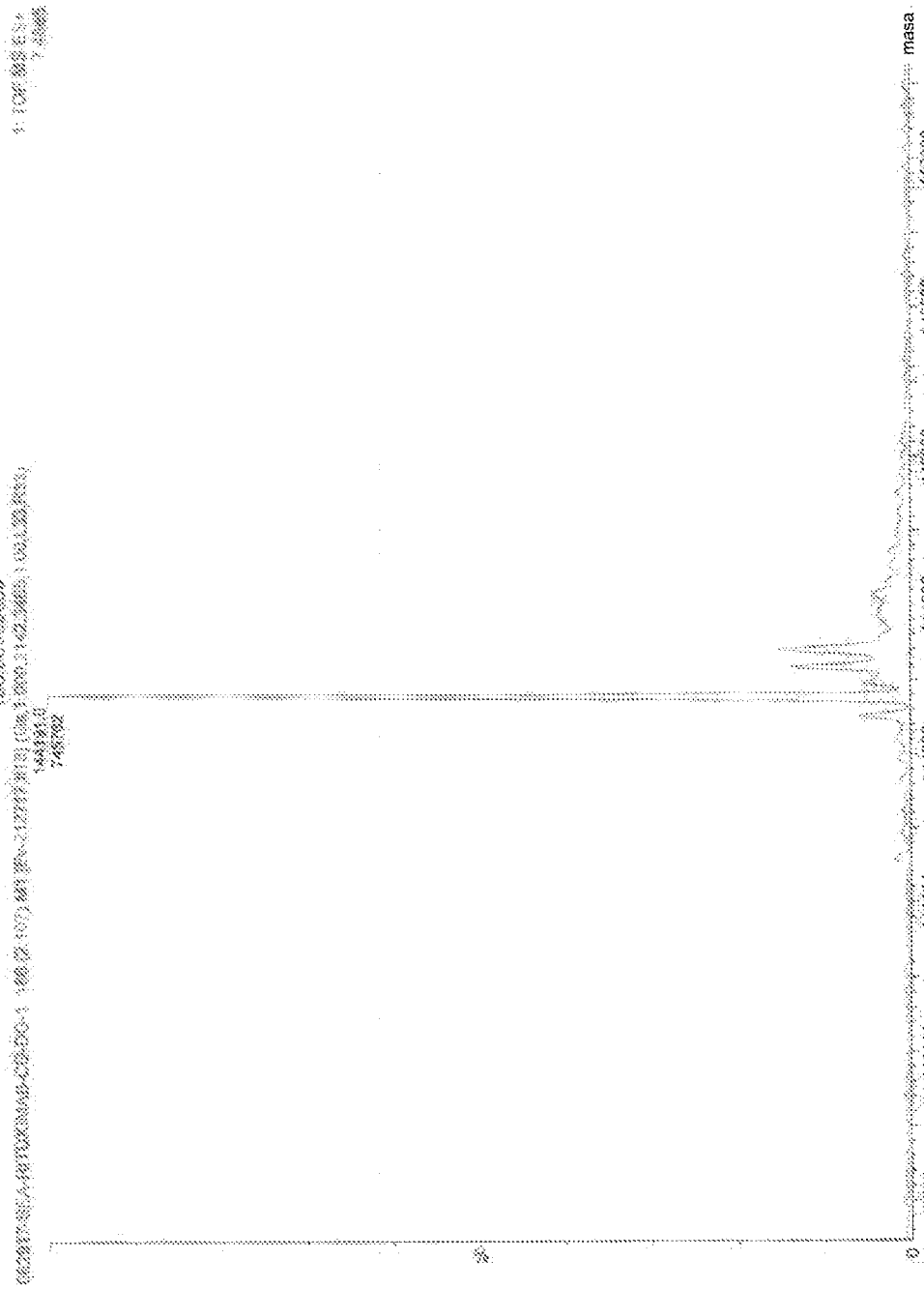


Fig. 118H

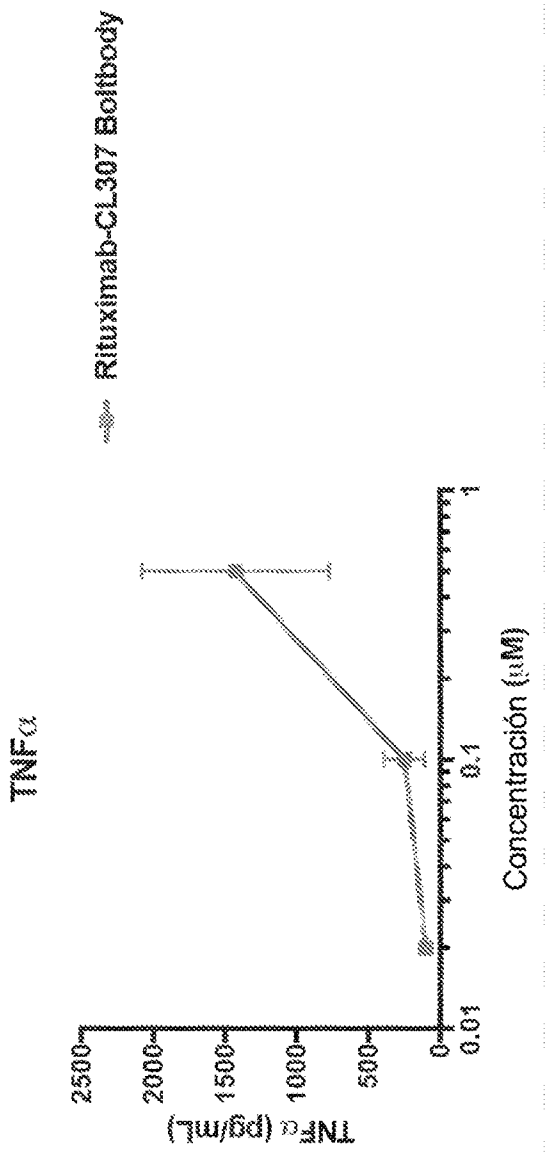

Rituximab-CL307 Boltbody
TNFα
TNFα (pg/mL)
2500
2000
1500
1000
500
0
0.01
0.1
1
Concentración (μM)

Fig. 118I

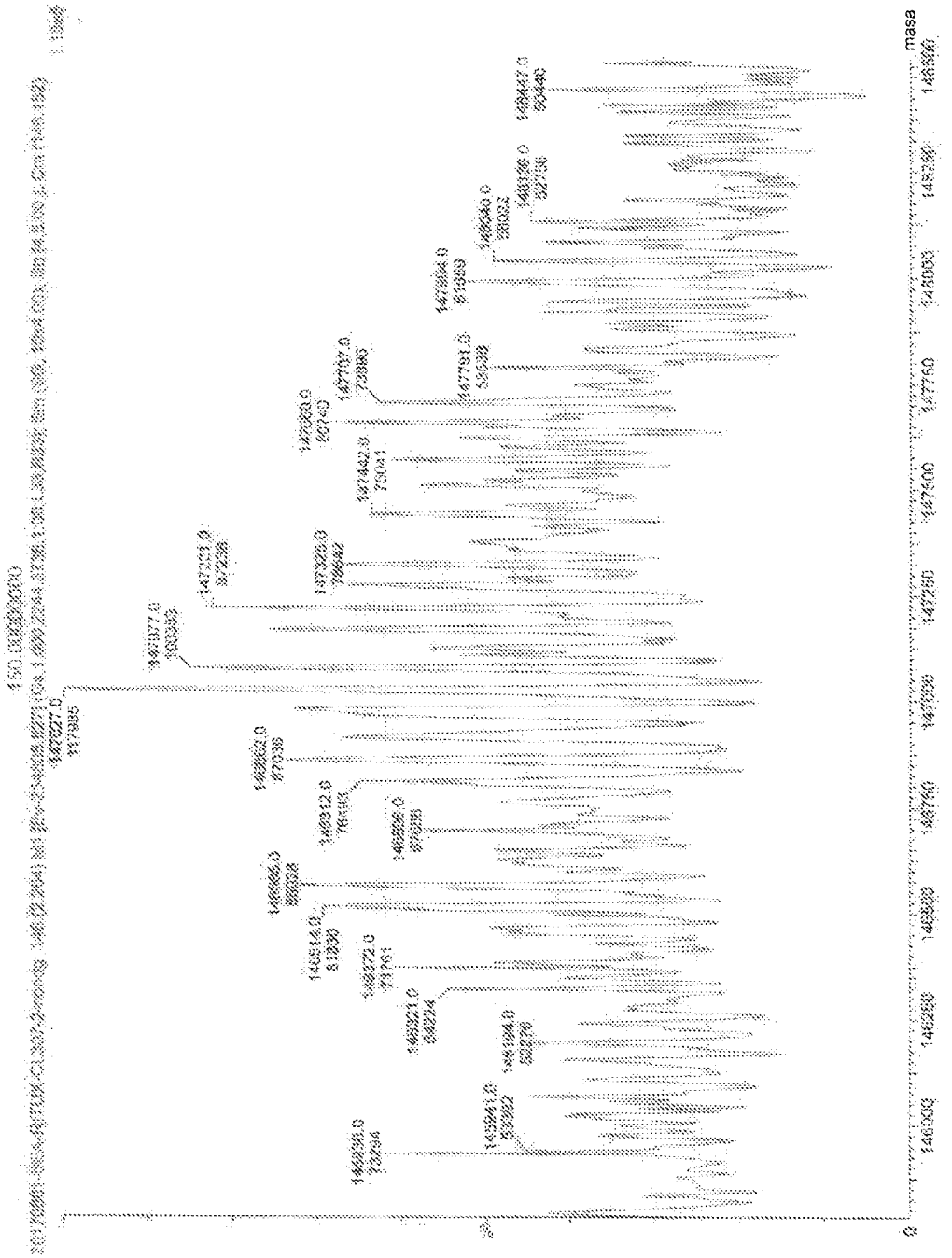


Fig. 118J

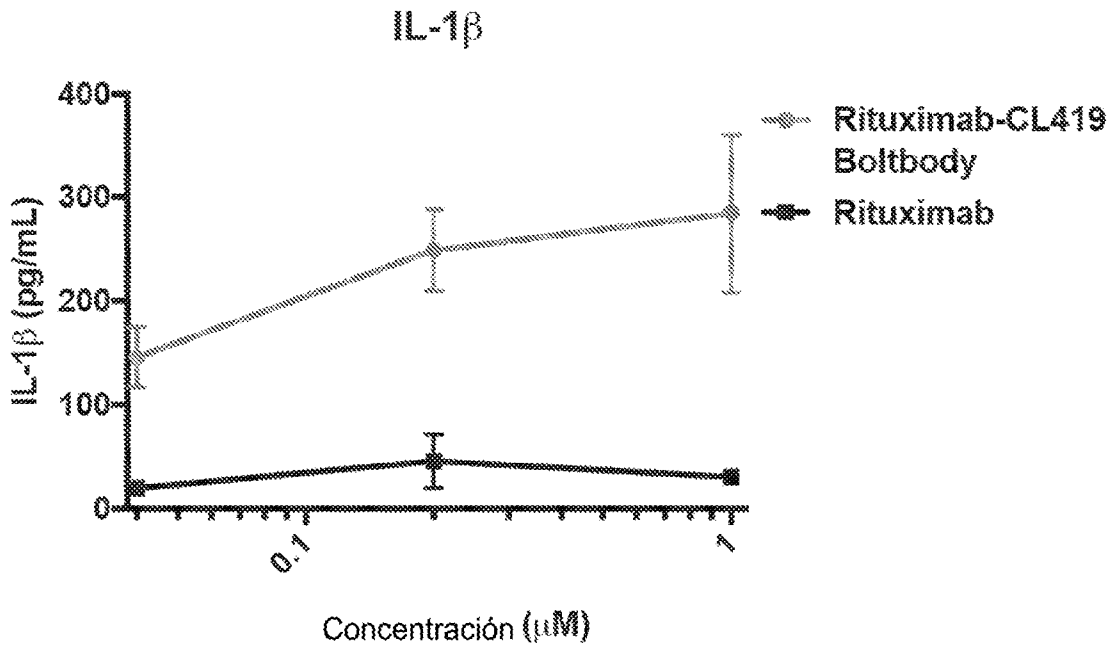

IL-1β
400
300
200
100
0
IL-1β (pg/mL)
0.1
1
Concentración (μM)
Rituximab-CL419 Boltbody
Rituximab

Fig. 119A

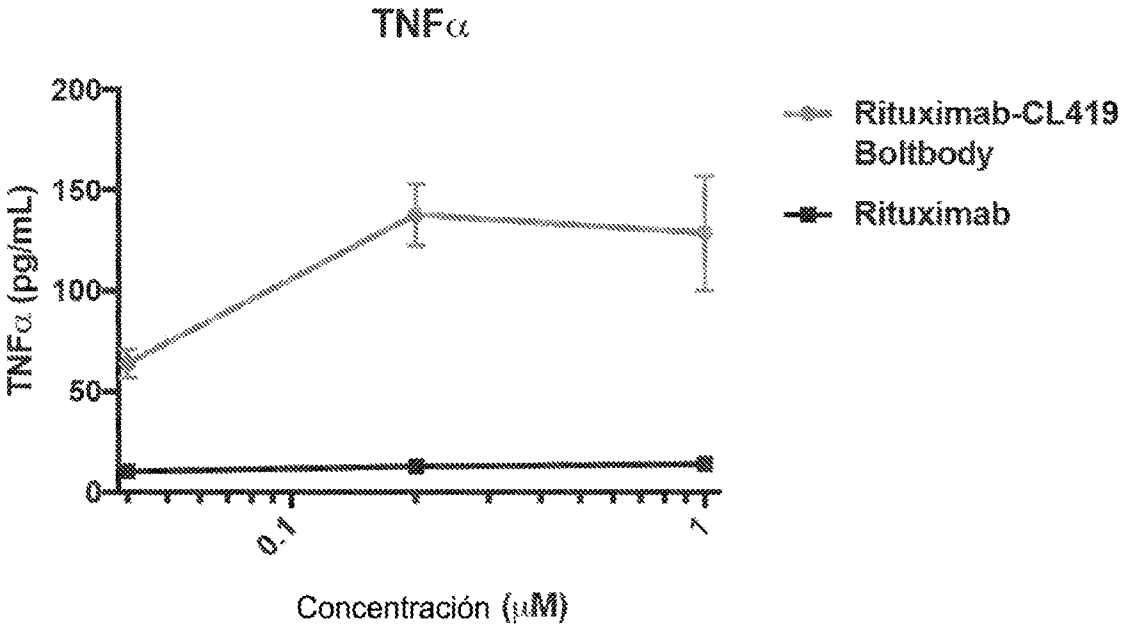

TNFα
200
150
100
50
0
TNFα (pg/mL)
0.1
1
Concentración (μM)
Rituximab-CL419 Boltbody
Rituximab

Fig. 119B

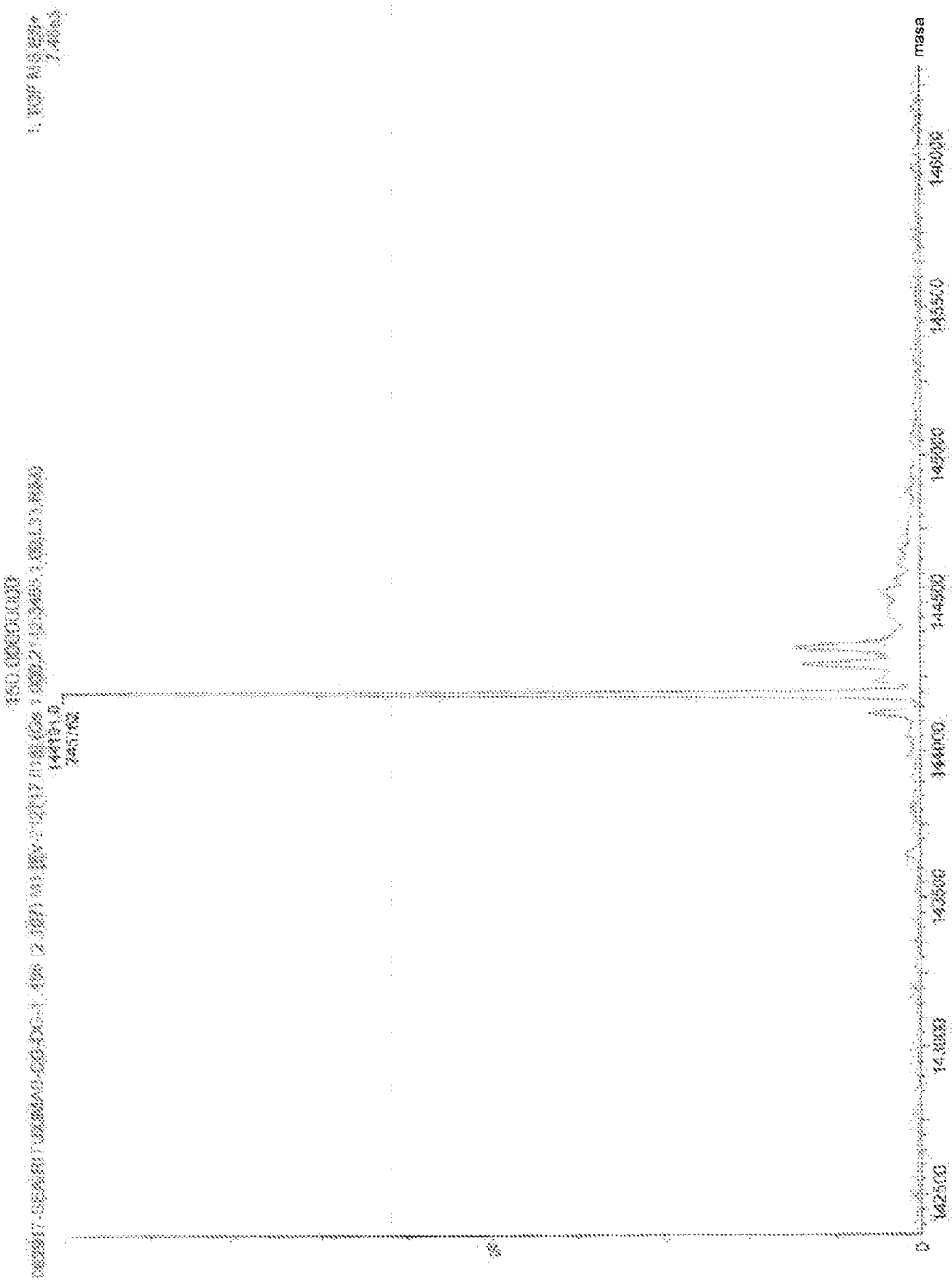


Fig. 119C

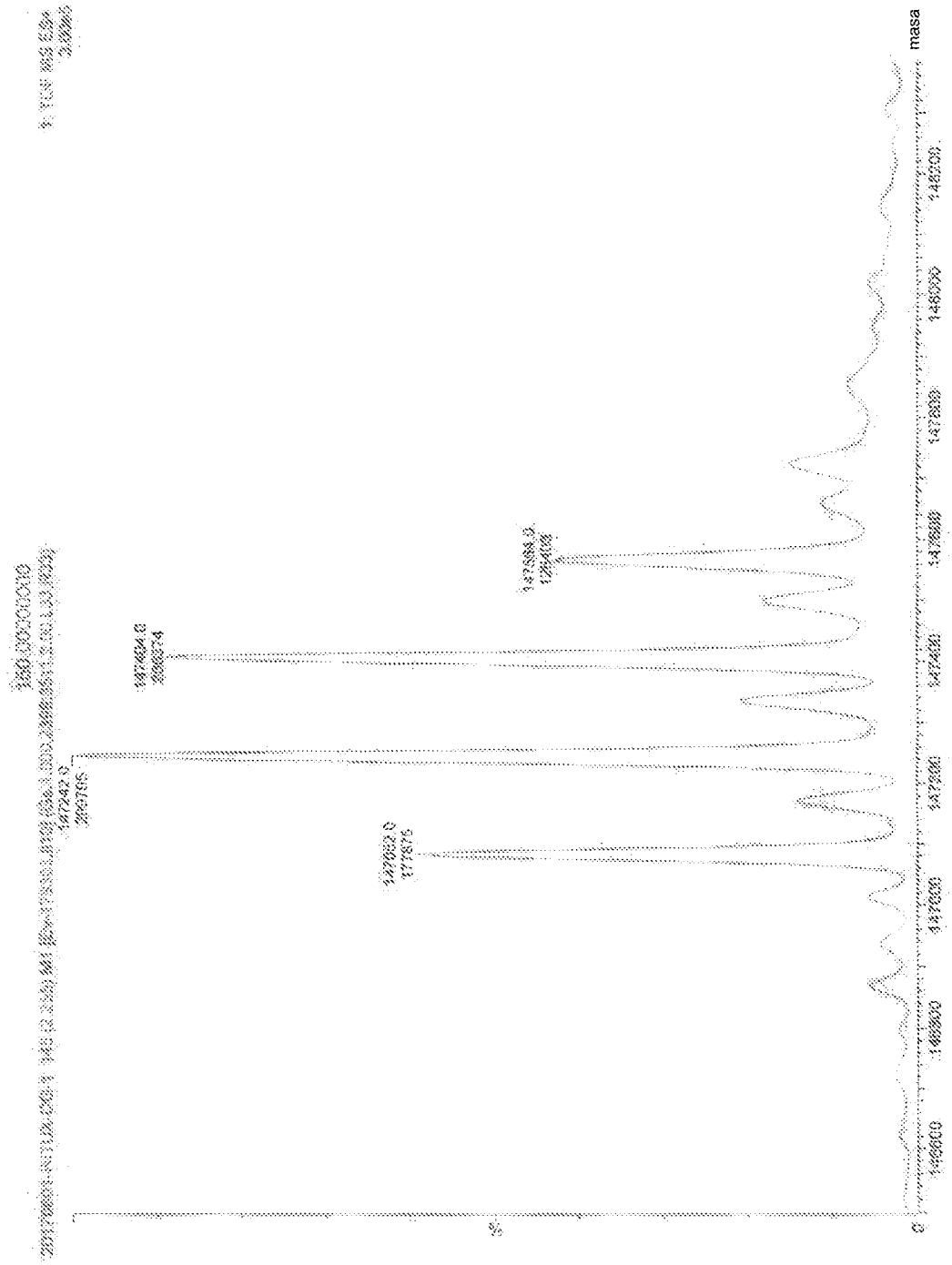


Fig. 119D

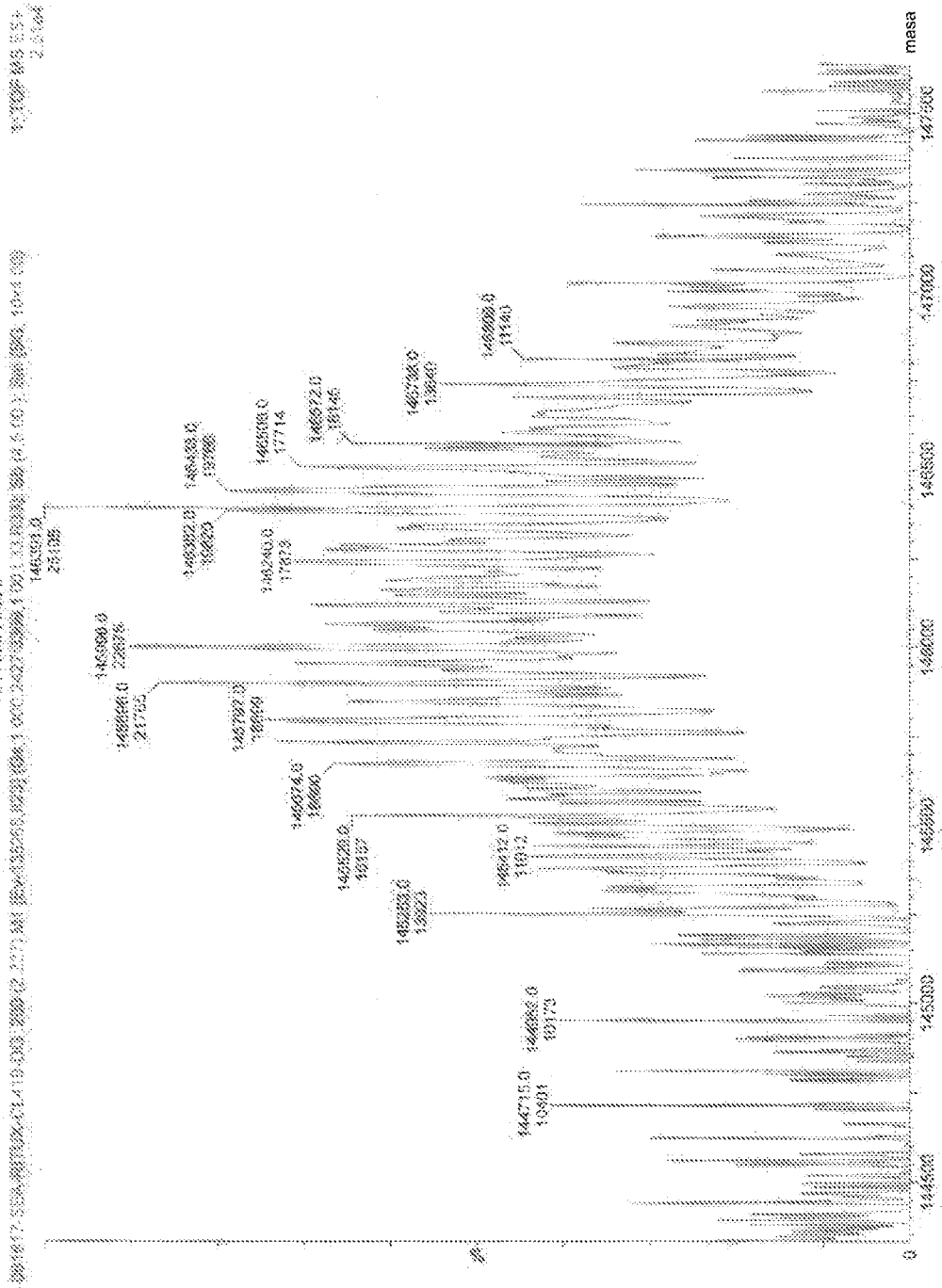

masa
%
100
0
144500
145000
145500
146000
146500
147000
147500
145593.0
25035
146996.0
22605
146646.0
21752
145744.0
18666
145528.0
18317
145888.0
18023
146512.0
18013
146240.0
17823
146598.0
17714
146672.0
18145
146438.0
18166
146736.0
18640
146998.0
19161
144715.0
19401
146066.0
18179

Fig. 119E

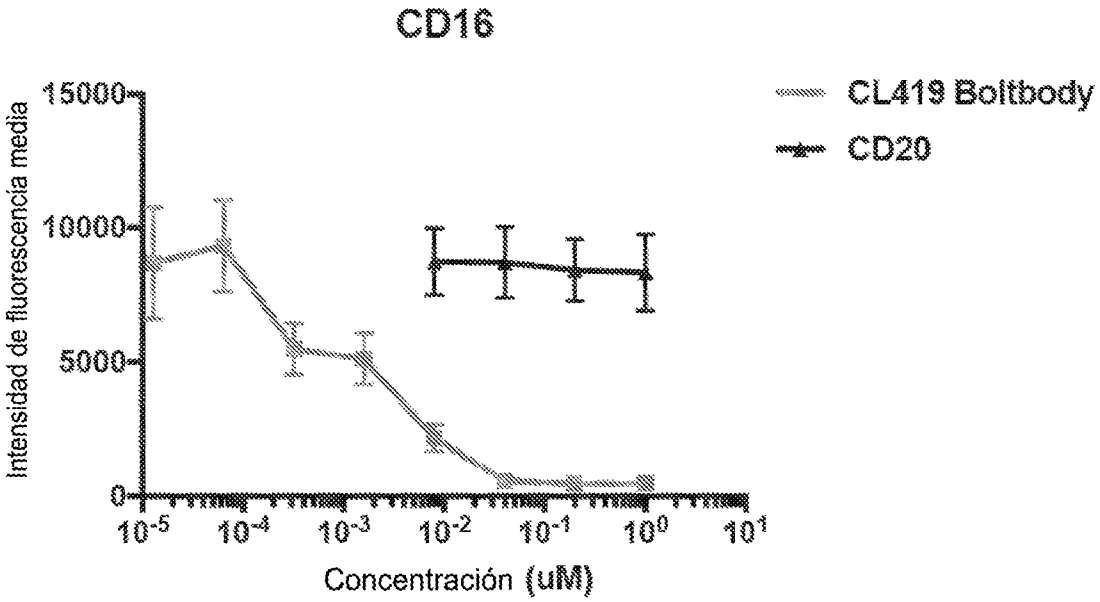


Fig. 119F

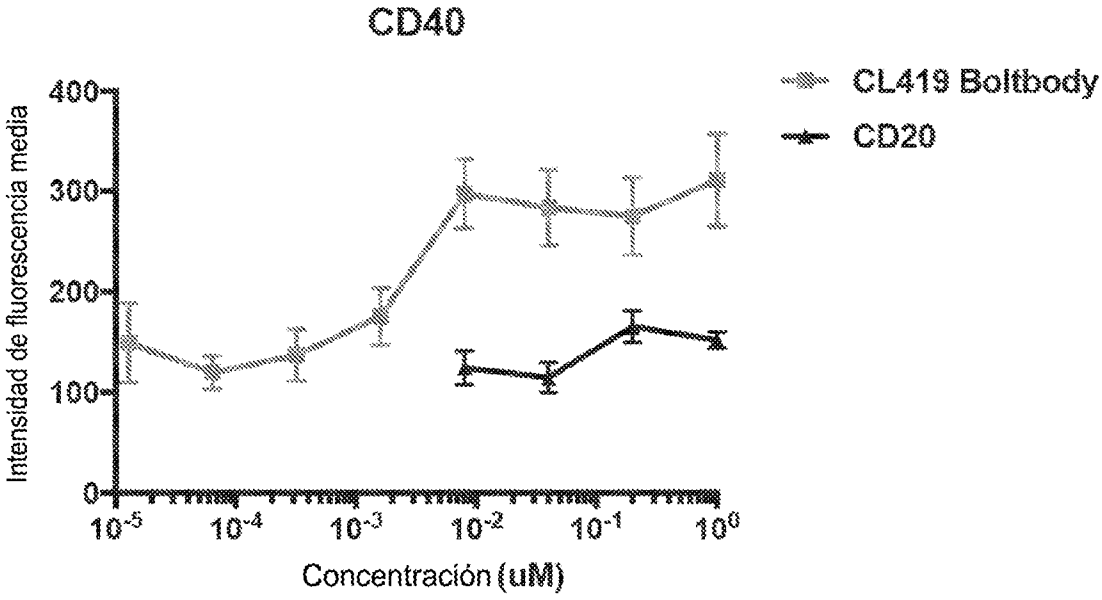


Fig. 119G

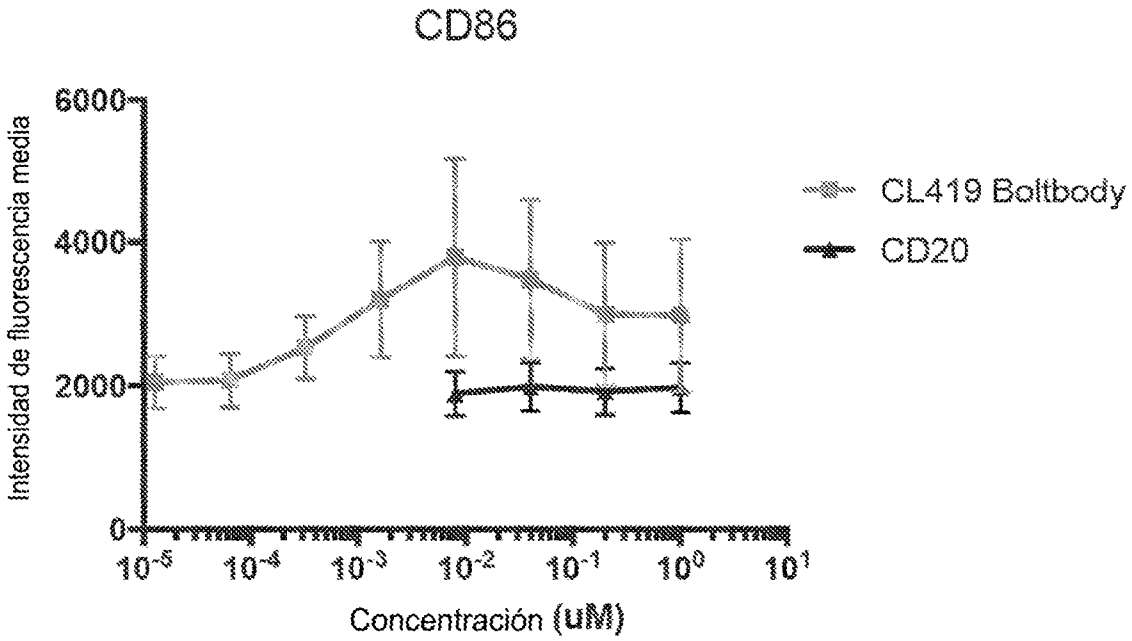


Fig. 119H

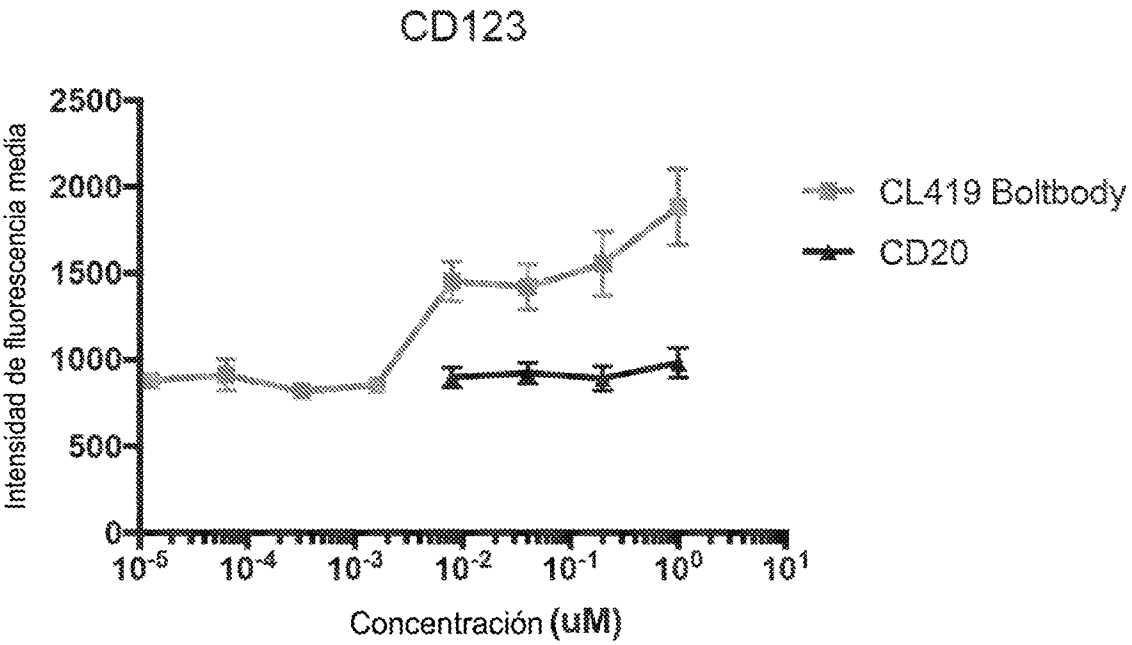


Fig. 119I

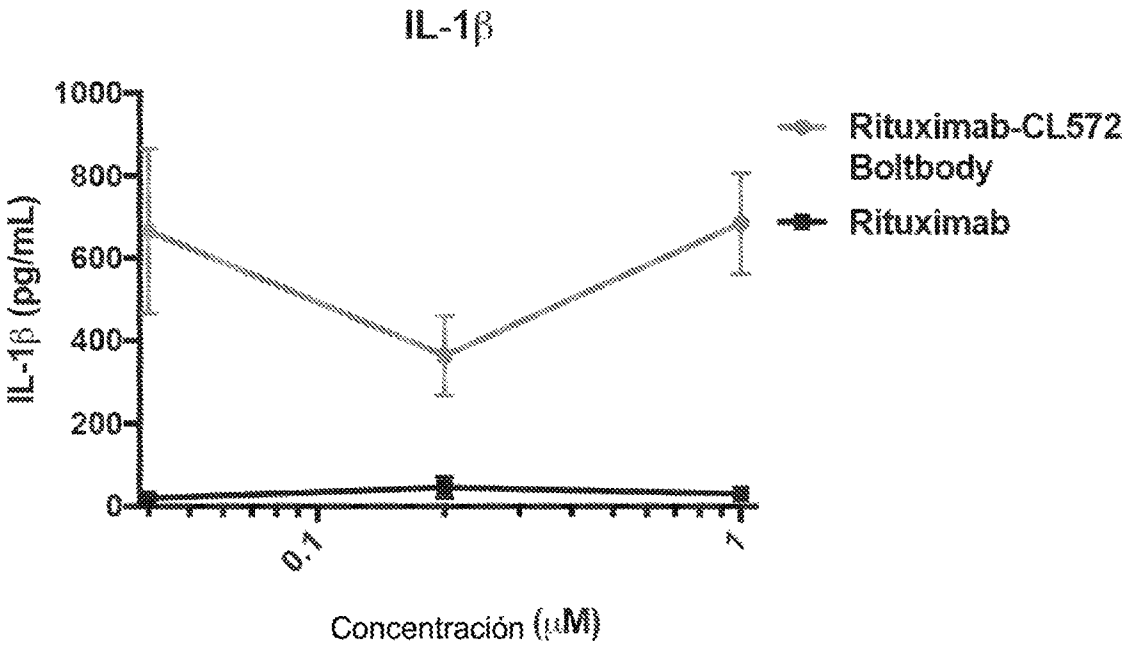

IL-1β
1000
800
600
400
200
0
IL-1β (pg/mL)
0.1
1
Concentración (μM)
Rituximab-CL572 Boltbody
Rituximab

Fig. 120A

570

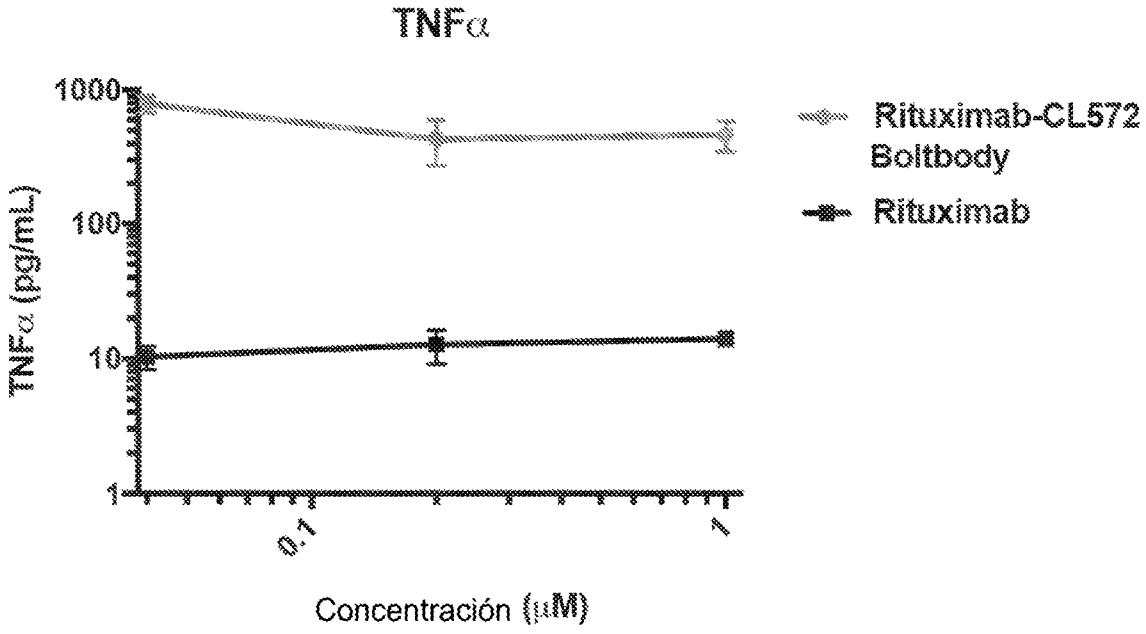

TNFα
1000
100
10
1
TNFα (pg/mL)
0.1
1
Concentración (μM)
Rituximab-CL572 Boltbody
Rituximab

Fig. 120B

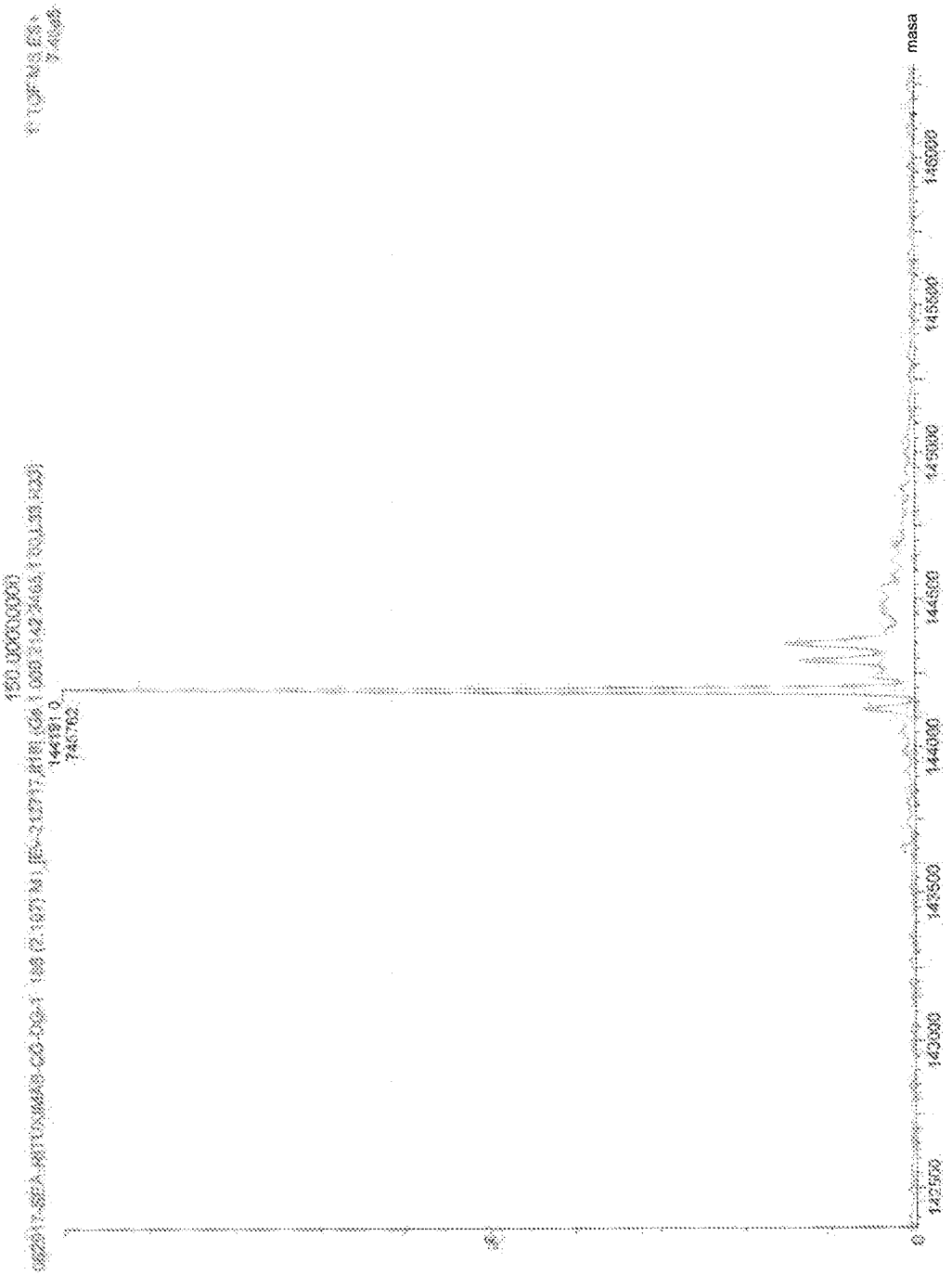

masa
144191.0
146760
146500
146000
145500
145000
144500
144000
143500
143000
142500

Fig. 120C

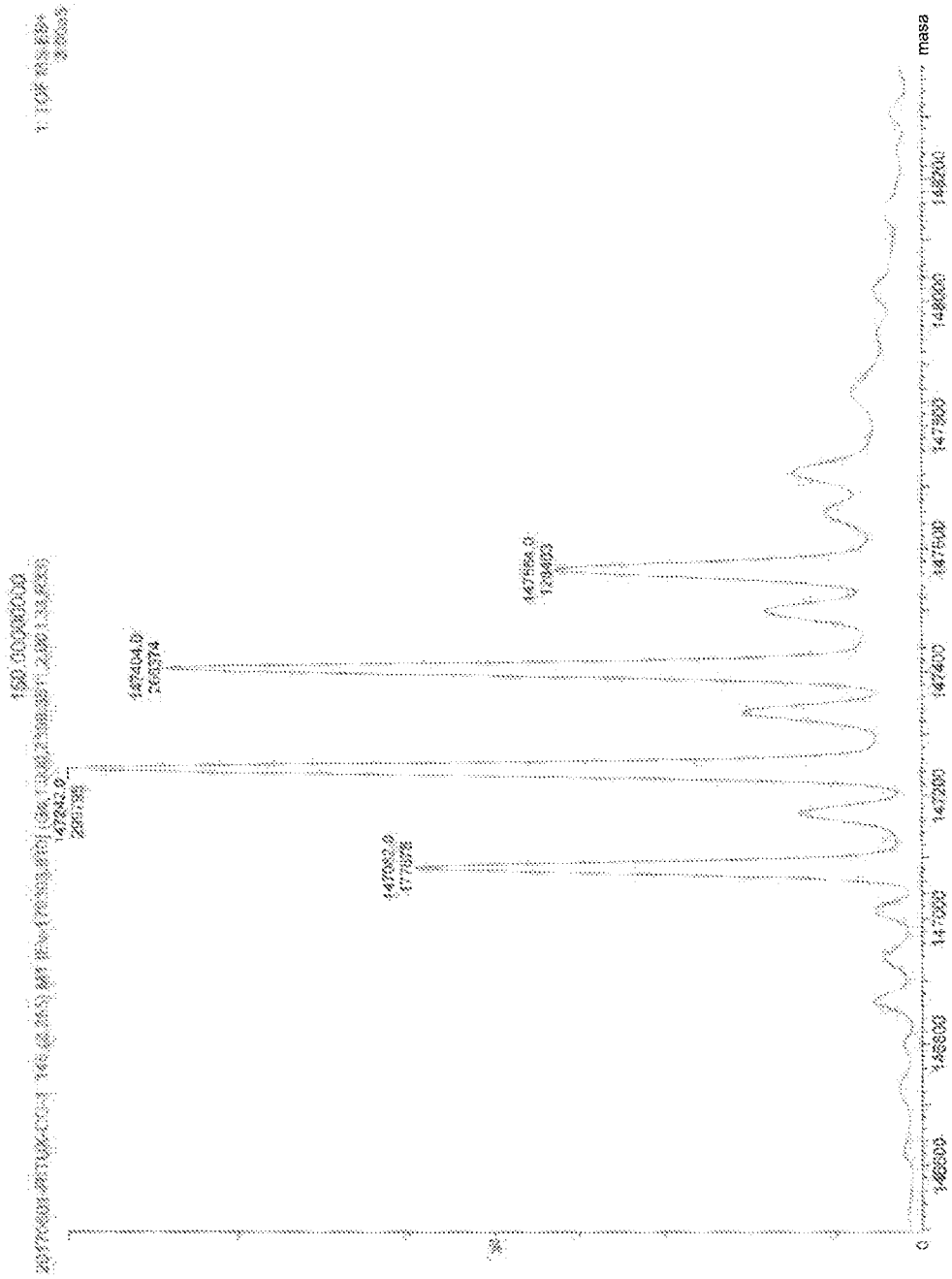
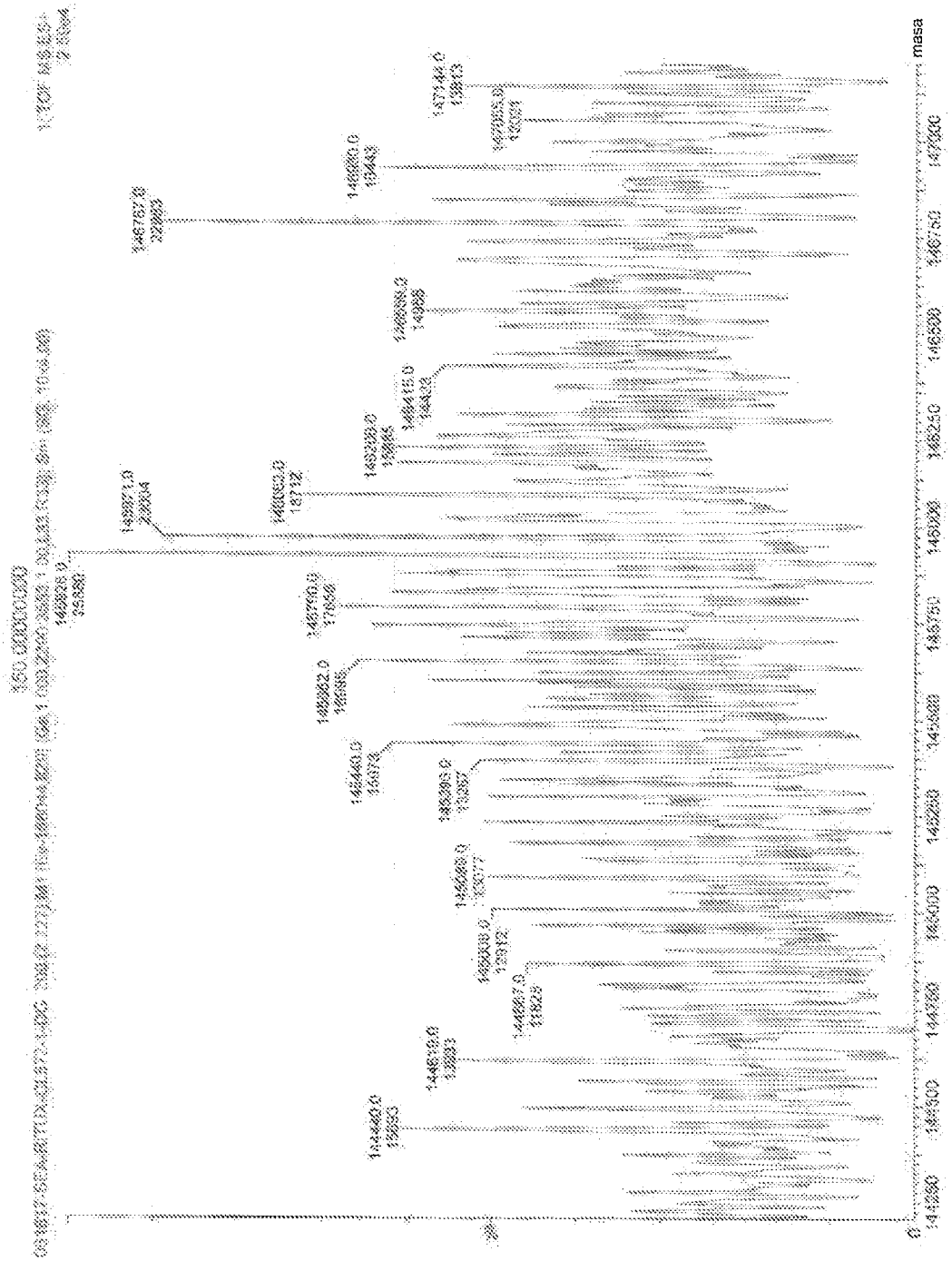

masa
%
1472304.0
263374
1472282.9
263136
1470383.9
477208
1470159.1
209803

Fig. 120D


masa
%
100.00000000
0
144000
144500
145000
145250
145500
145750
146000
146250
146500
146750
147000
147250
147500
147750
148000
148250
148500
148750
149000
149250
149500
149750
150000
150250
150500
150750
151000
151250
151500
151750
152000
152250
152500
152750
153000
153250
153500
153750
154000
154250
154500
154750

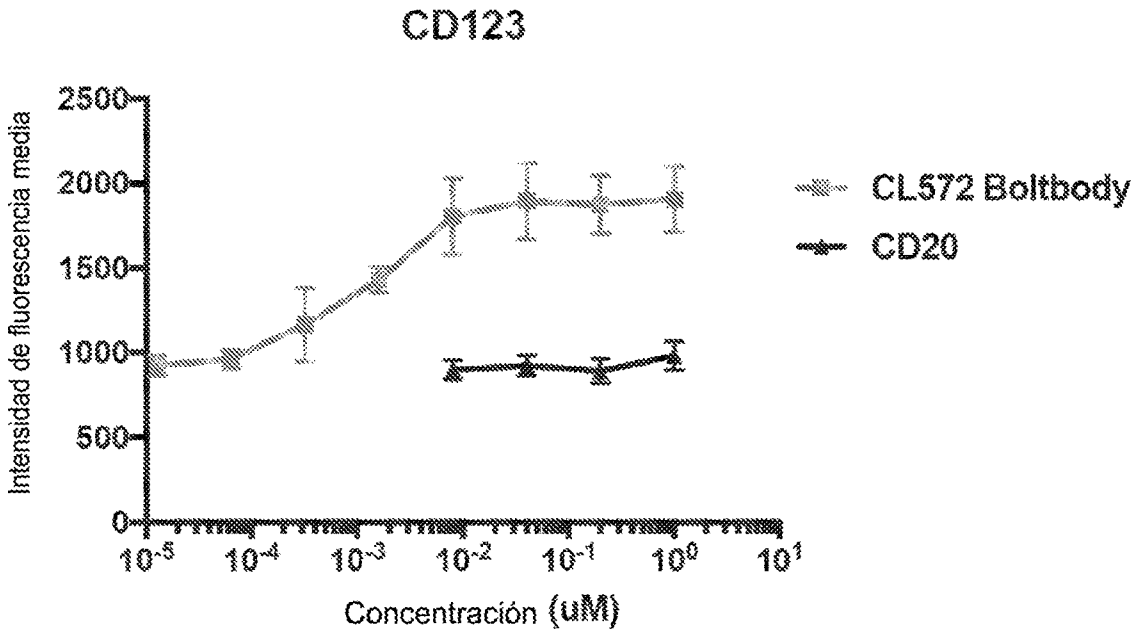


Fig. 120F

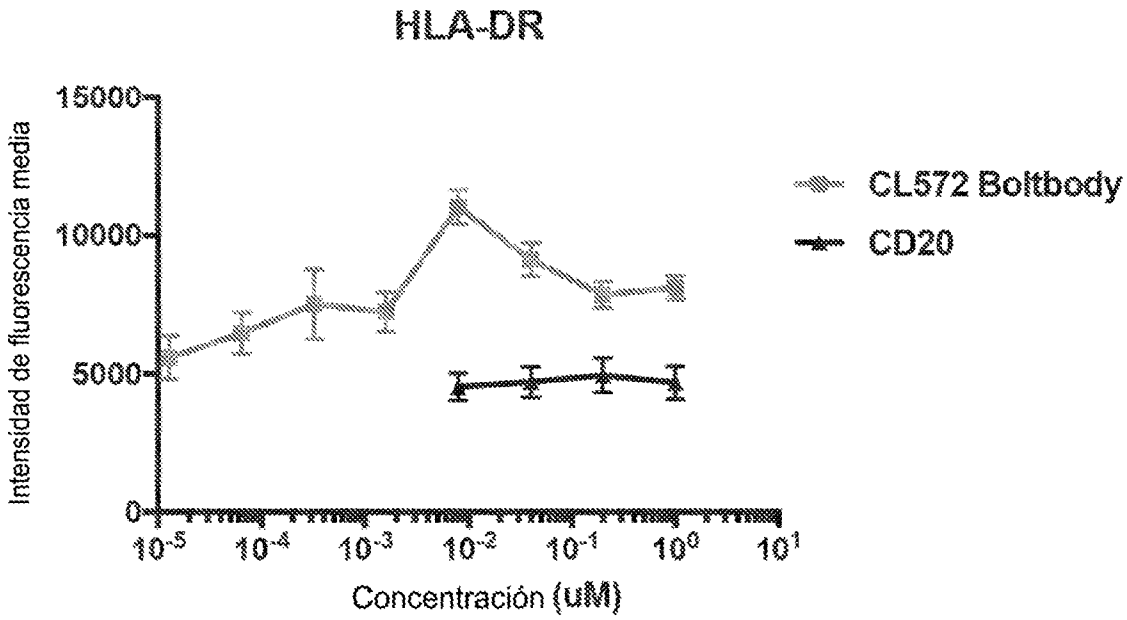


Fig. 120G

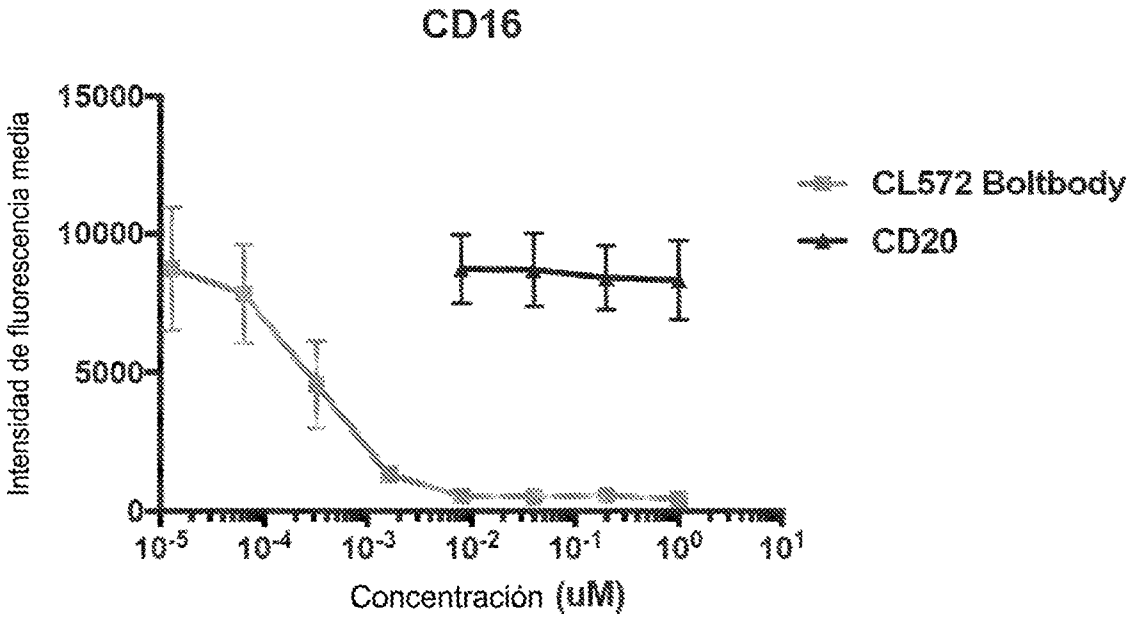


Fig. 120H

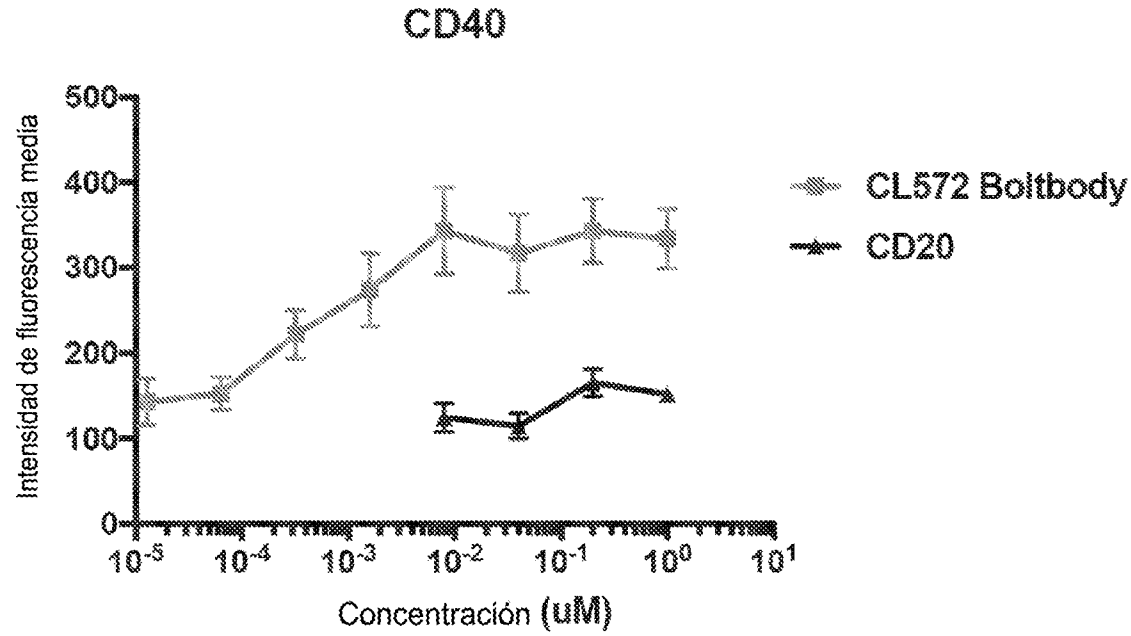


Fig. 120I

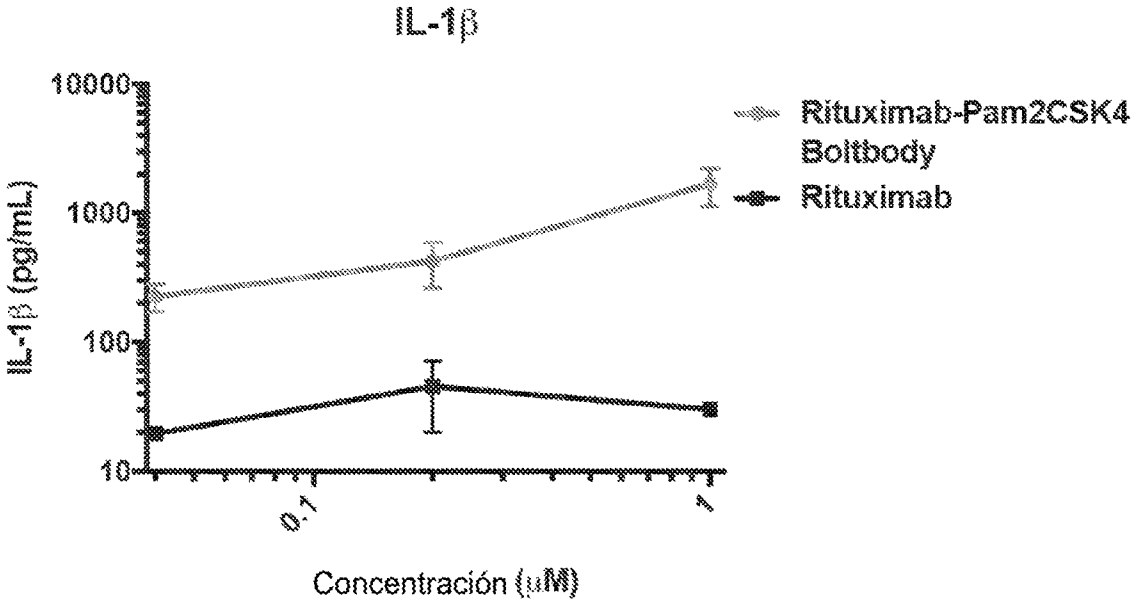

IL-1β
10000
1000
100
10
IL-1β (pg/mL)
0.1
1
Concentración (μM)
Rituximab-Pam2CSK4
Boltbody
Rituximab

Fig. 121A

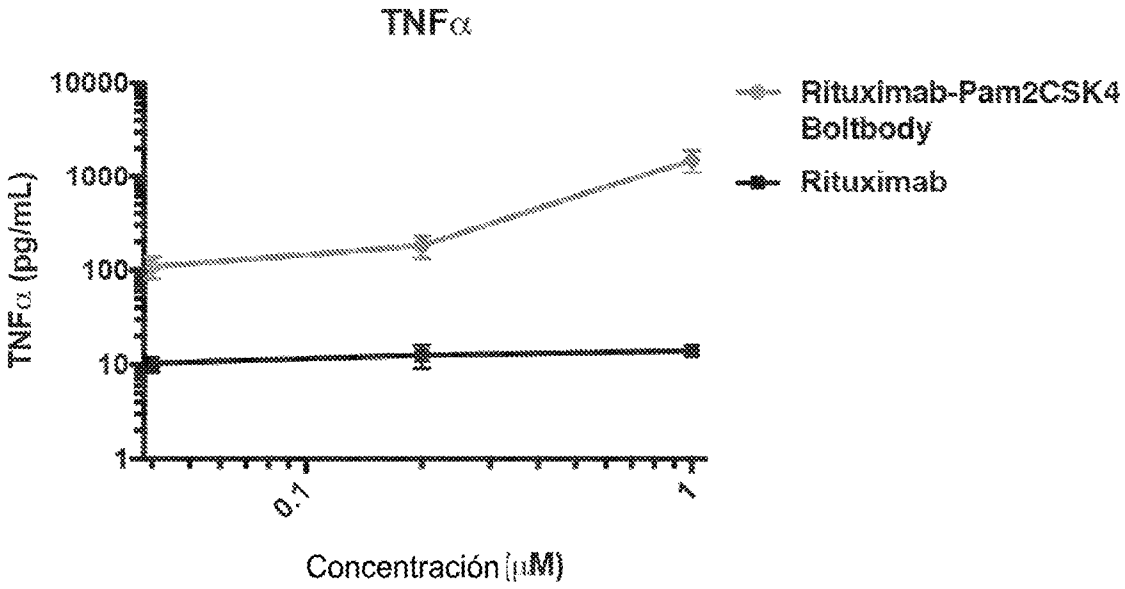

TNFα
10000
1000
100
10
1
TNFα (pg/mL)
0.1
1
Concentración (μM)
Rituximab-Pam2CSK4 Boltbody
Rituximab

Fig. 121B

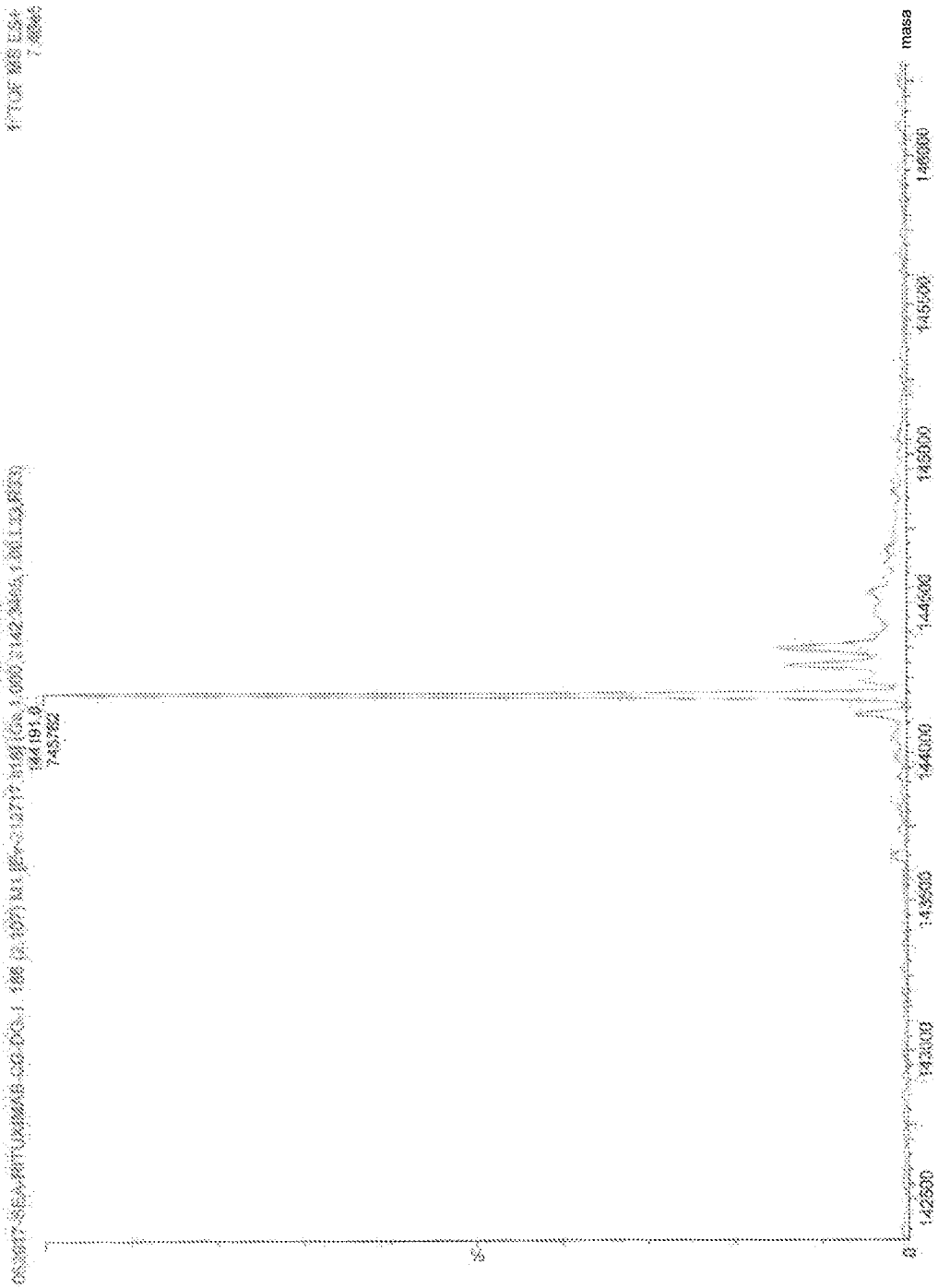

masa
%
1442500
1443000
1443500
1444000
1444500
1445000
1445500
1446000

Fig. 121C

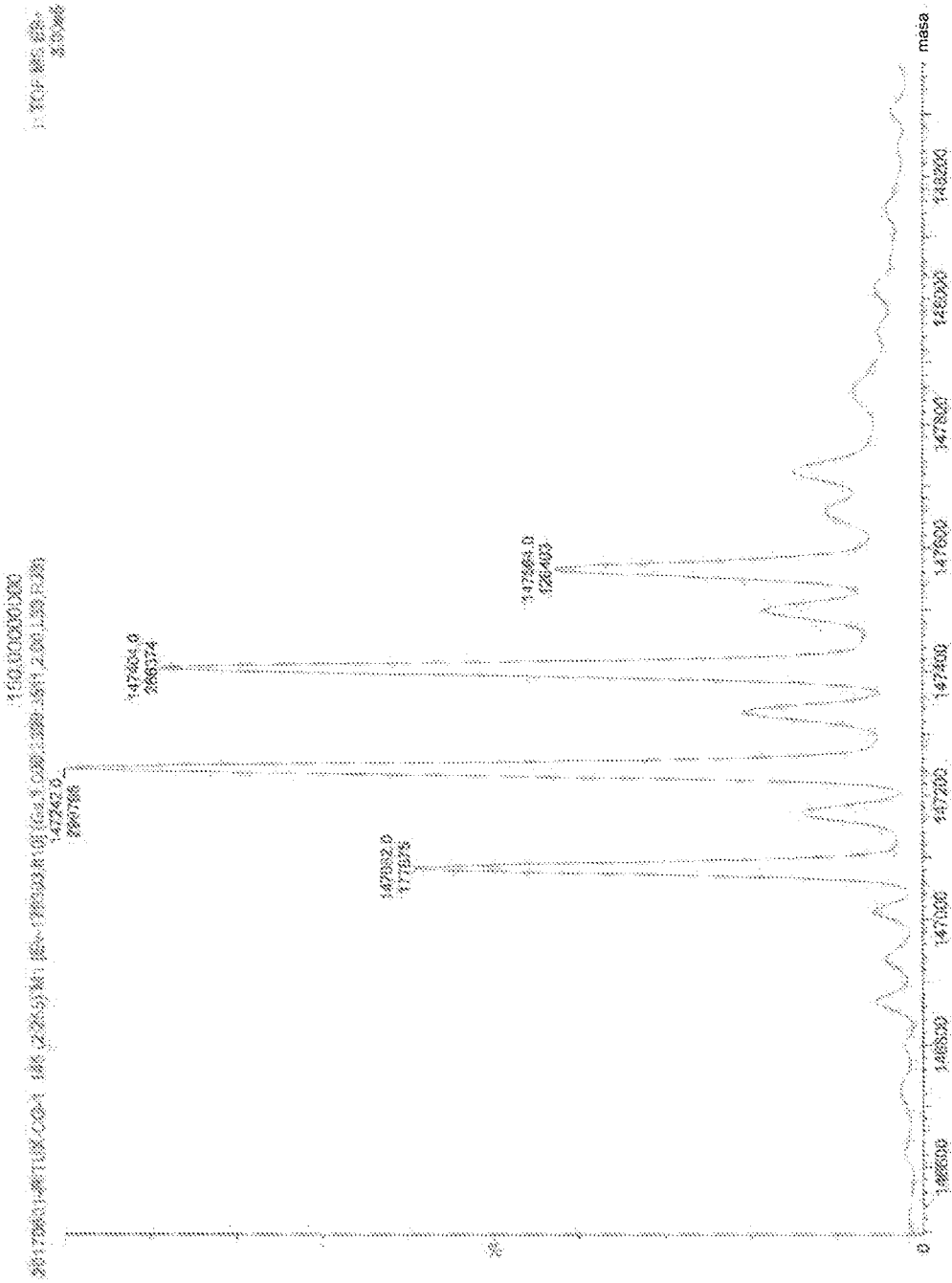


Fig. 121D

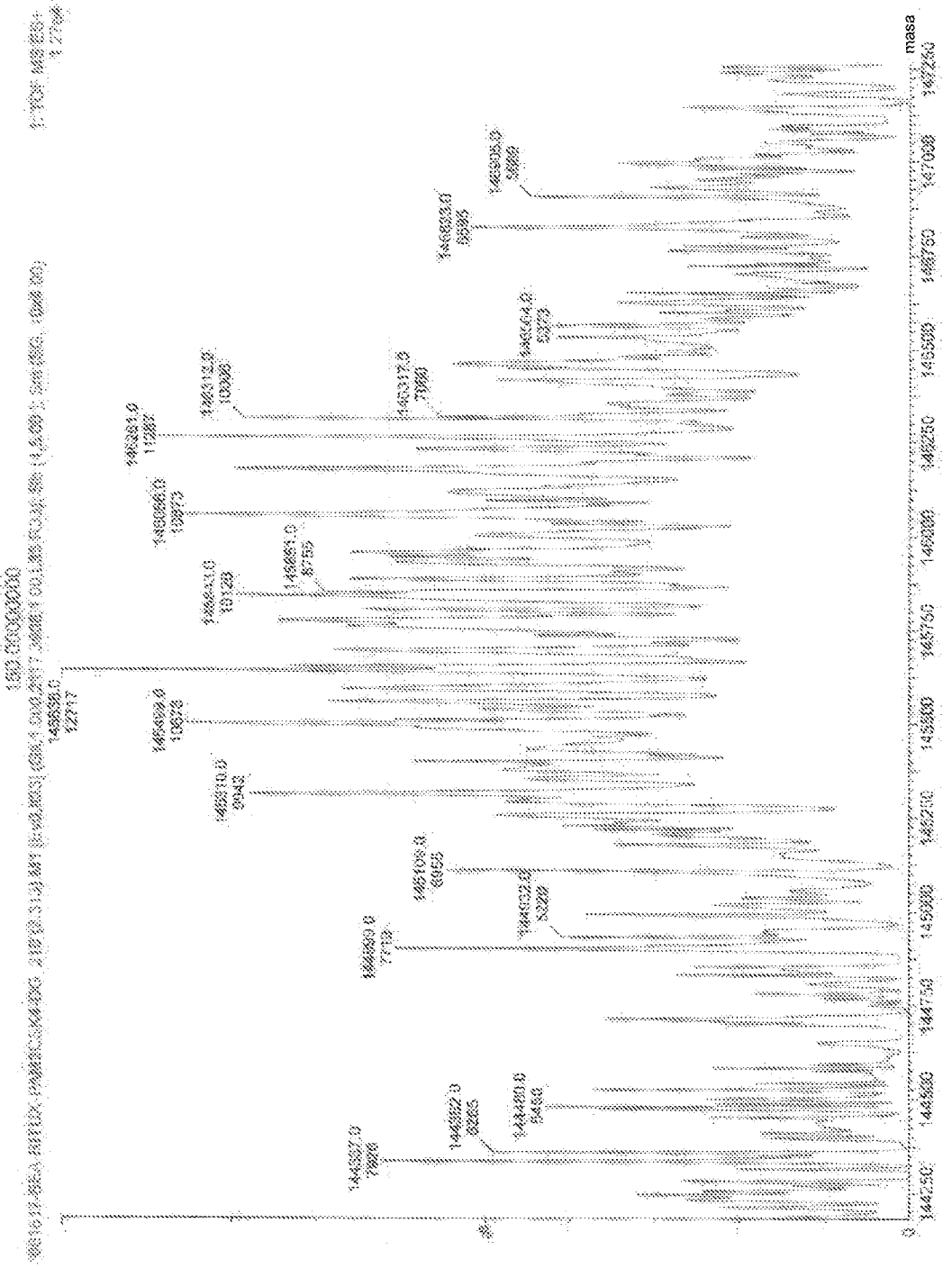


Fig. 121E

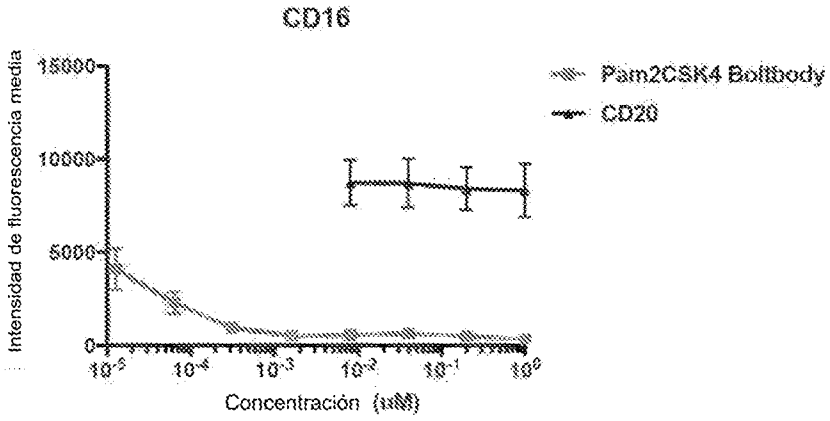


Fig. 121F

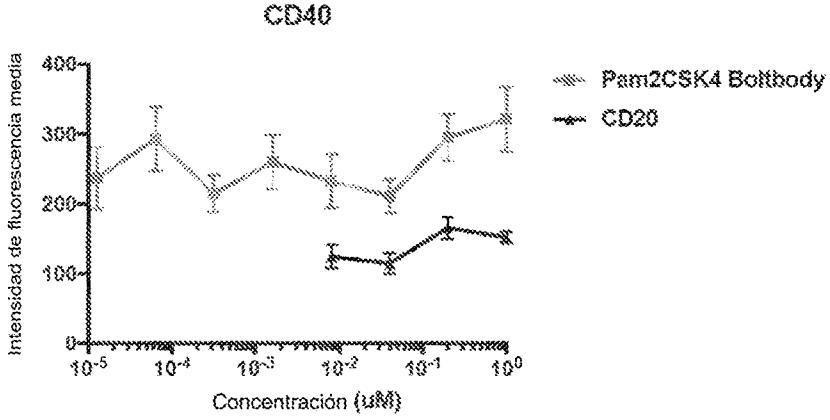


Fig. 121G

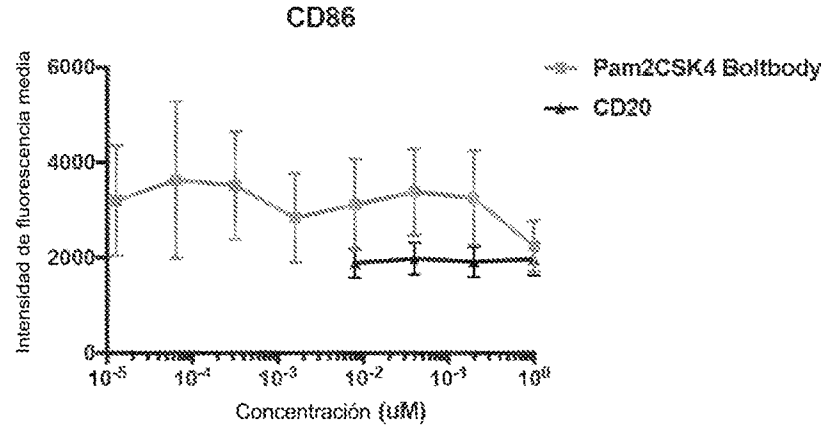


Fig. 121H

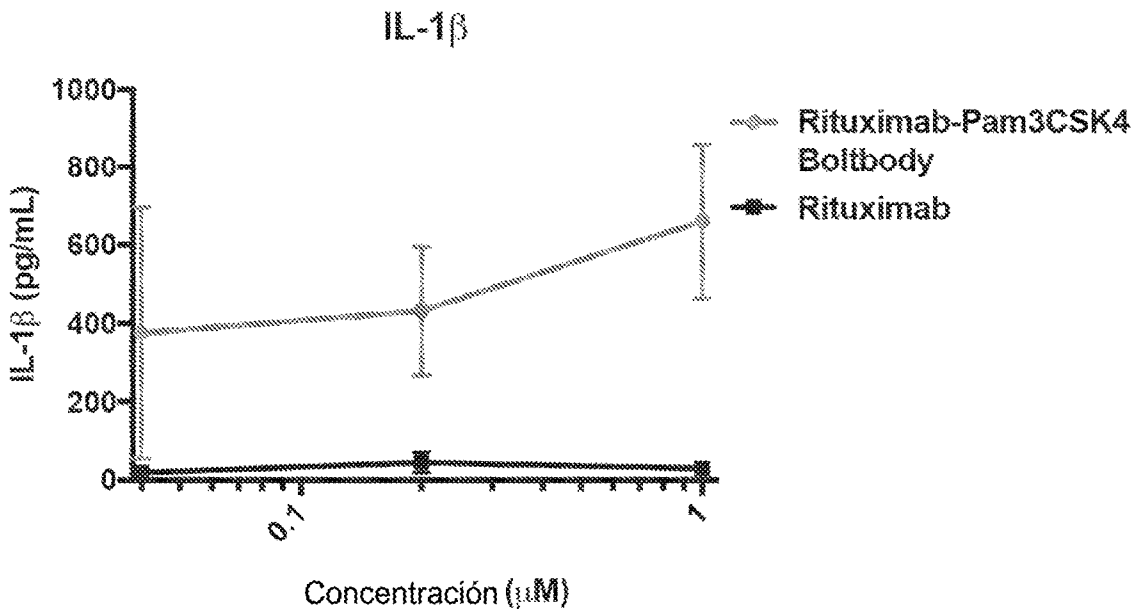

IL-1β
1000
800
600
400
200
0
IL-1β (pg/mL)
0.1
1
Concentración (μM)
Rituximab-Pam3CSK4 Boltbody
Rituximab

Fig. 122A

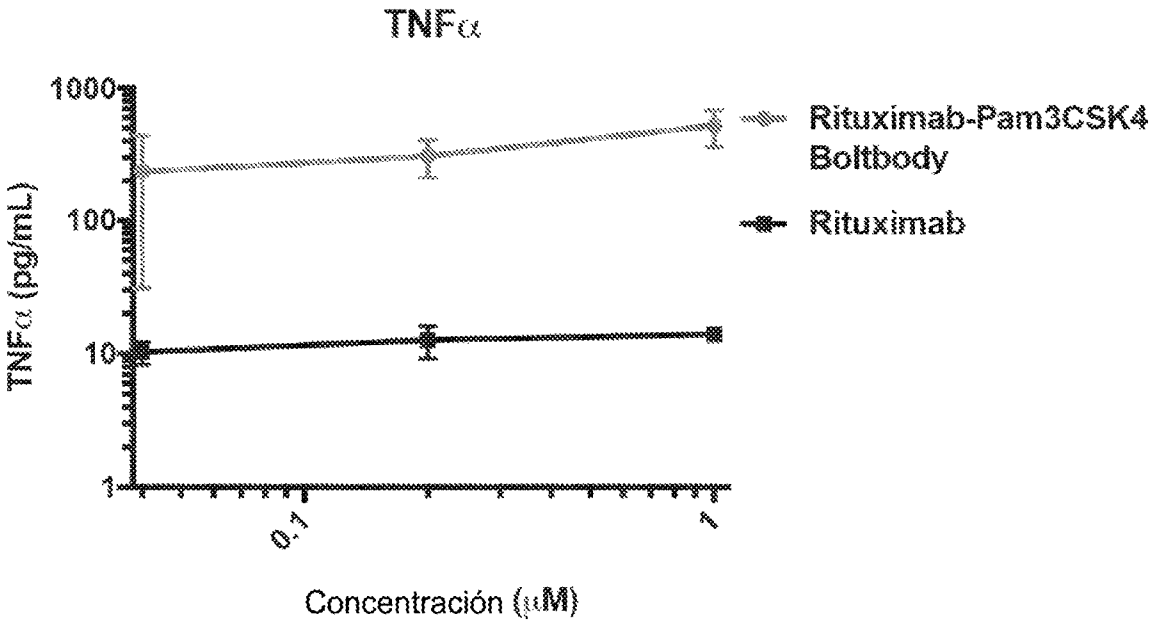

TNFα
1000
100
10
1
TNFα (pg/mL)
0.1
1
Concentración (μM)
Rituximab-Pam3CSK4 Boltbody
Rituximab

Fig. 122B

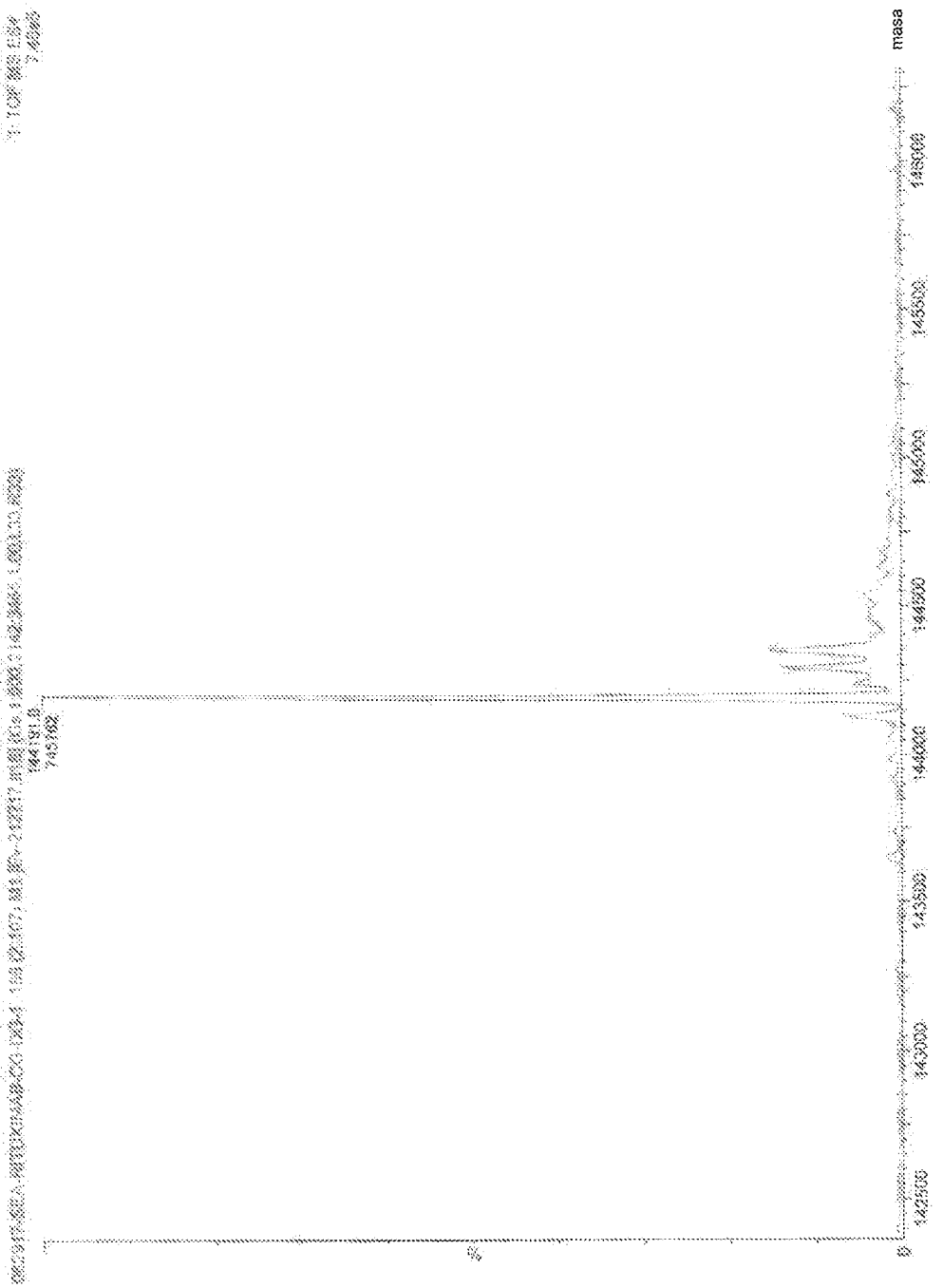


Fig. 122C

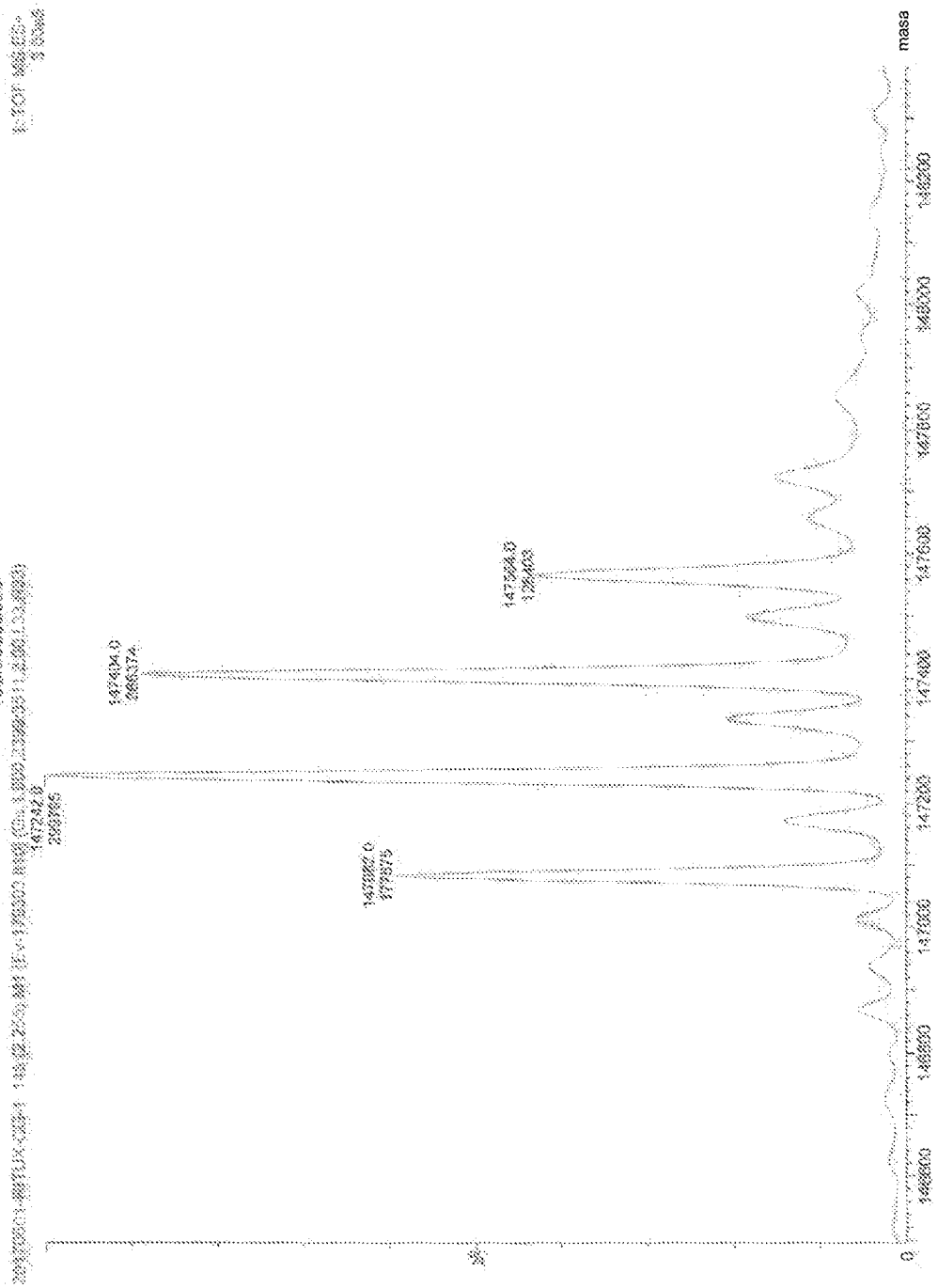


Fig. 122D

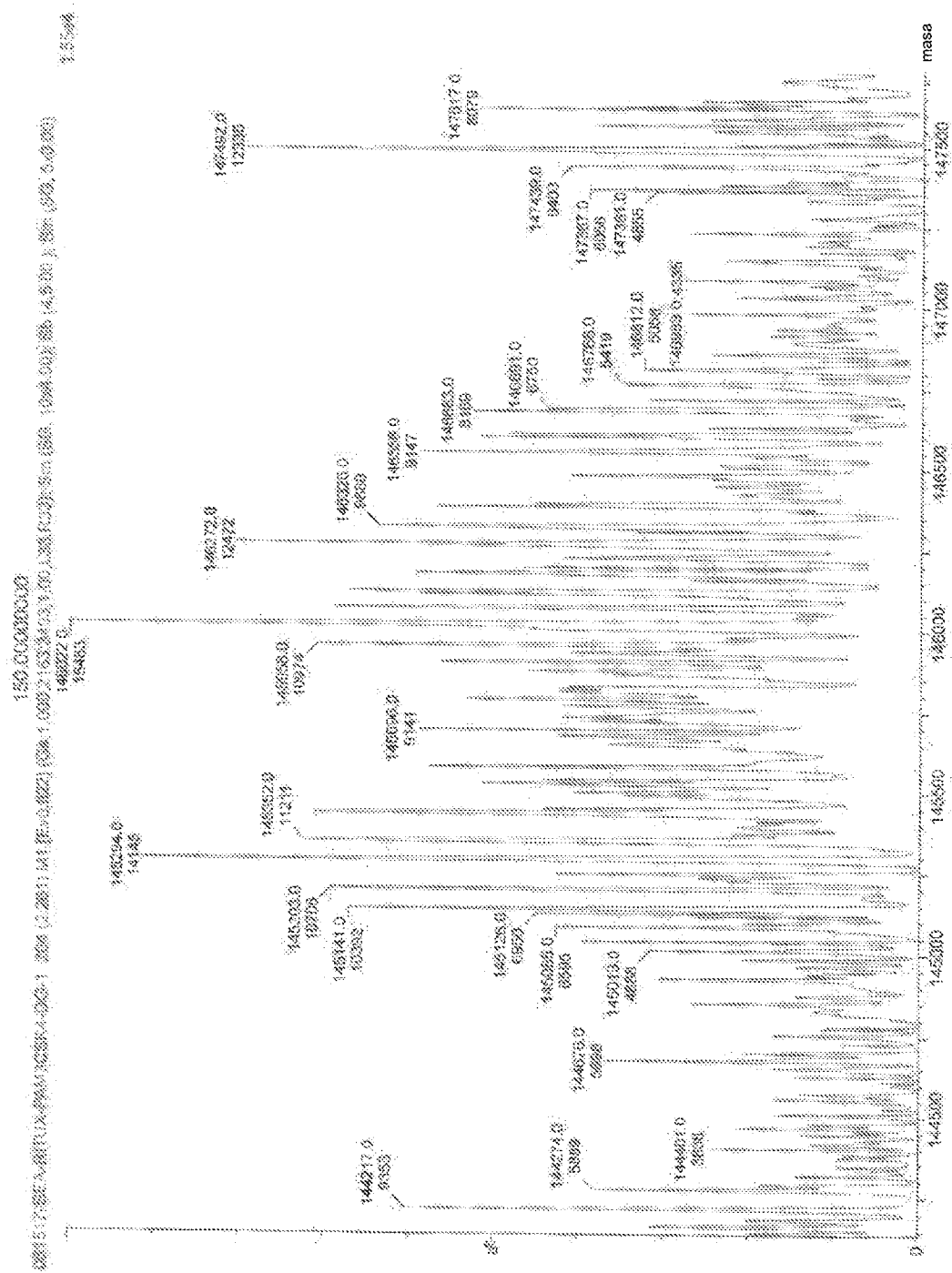


Fig. 122E

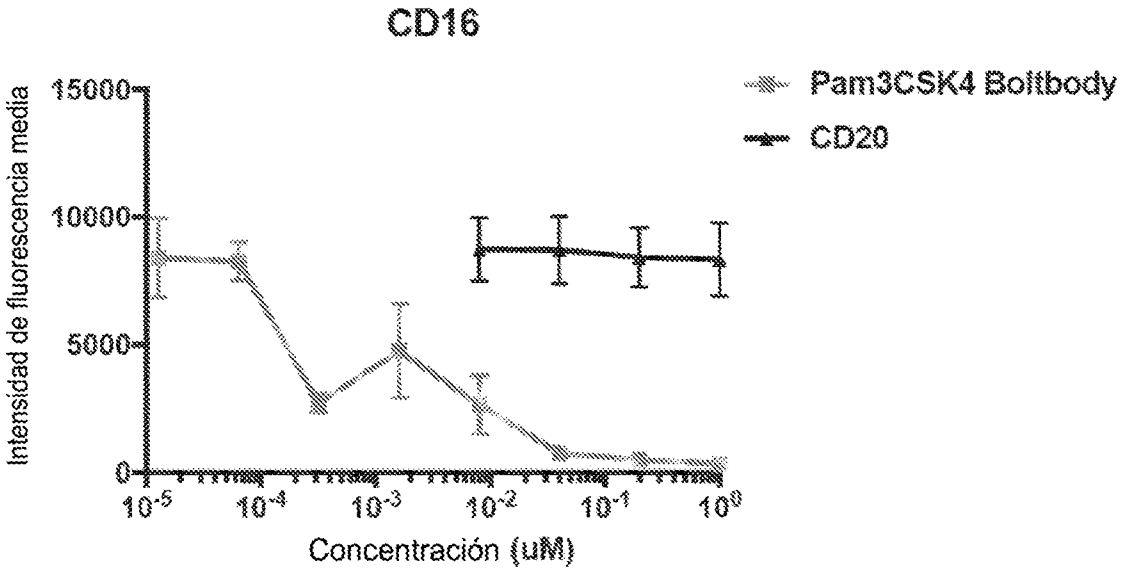


Fig. 122F

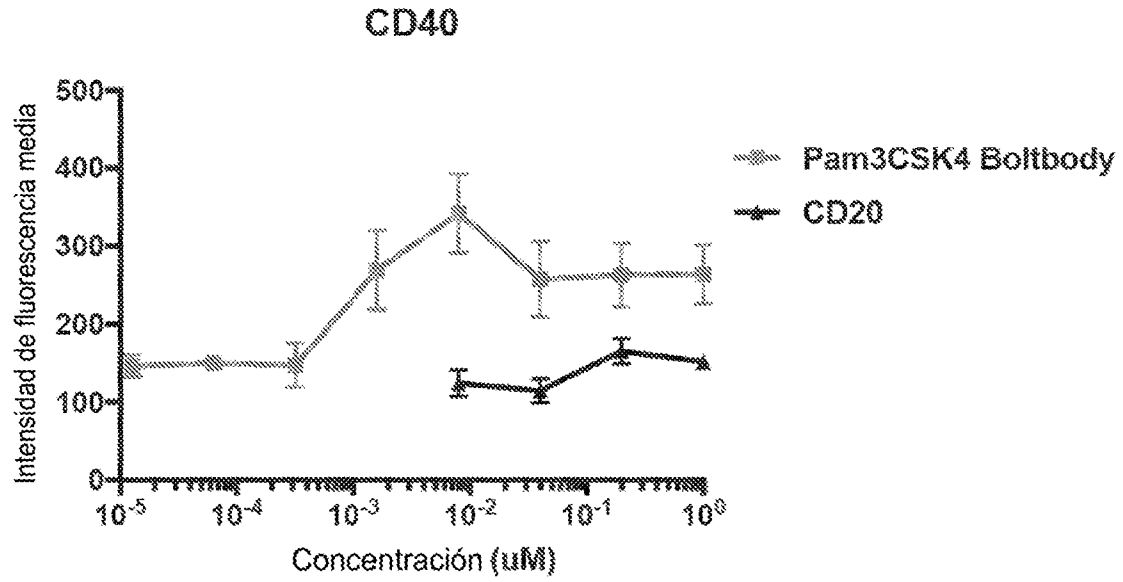


Fig. 122G

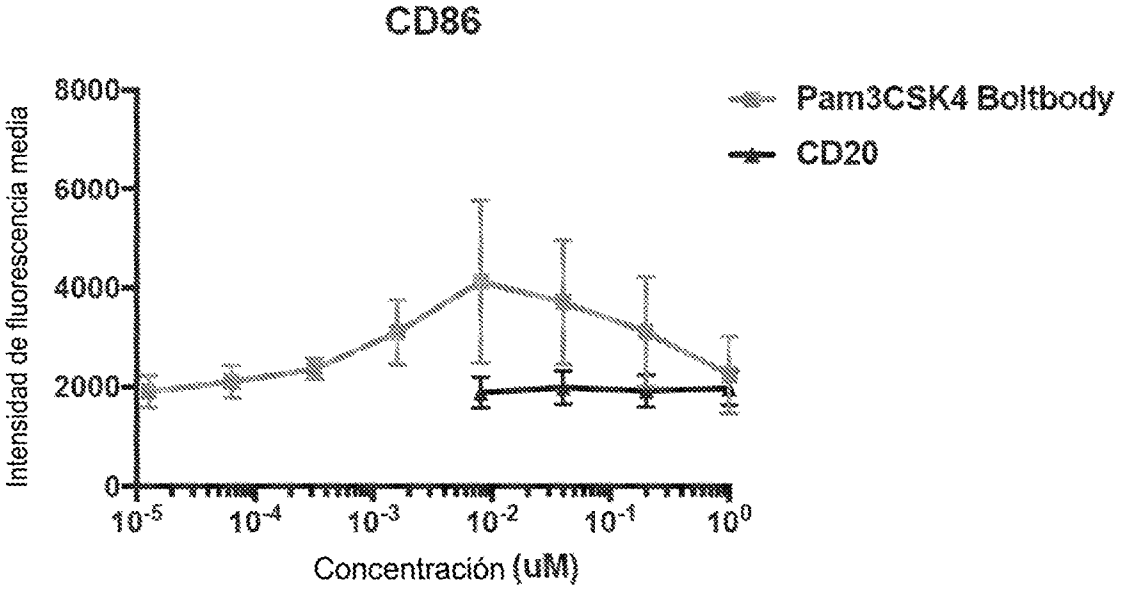


Fig. 122H

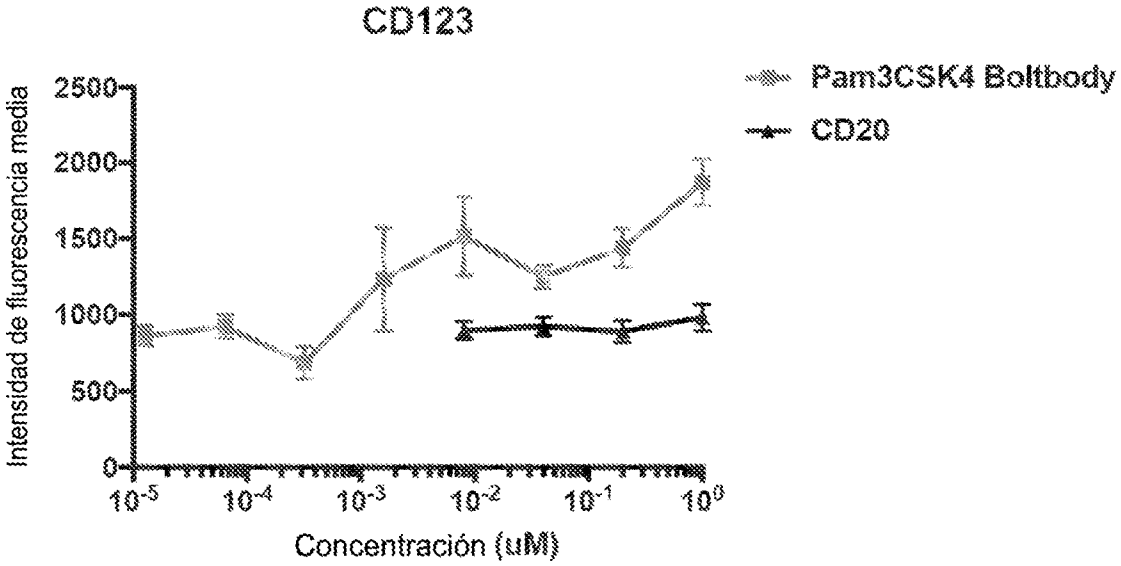


Fig. 122I

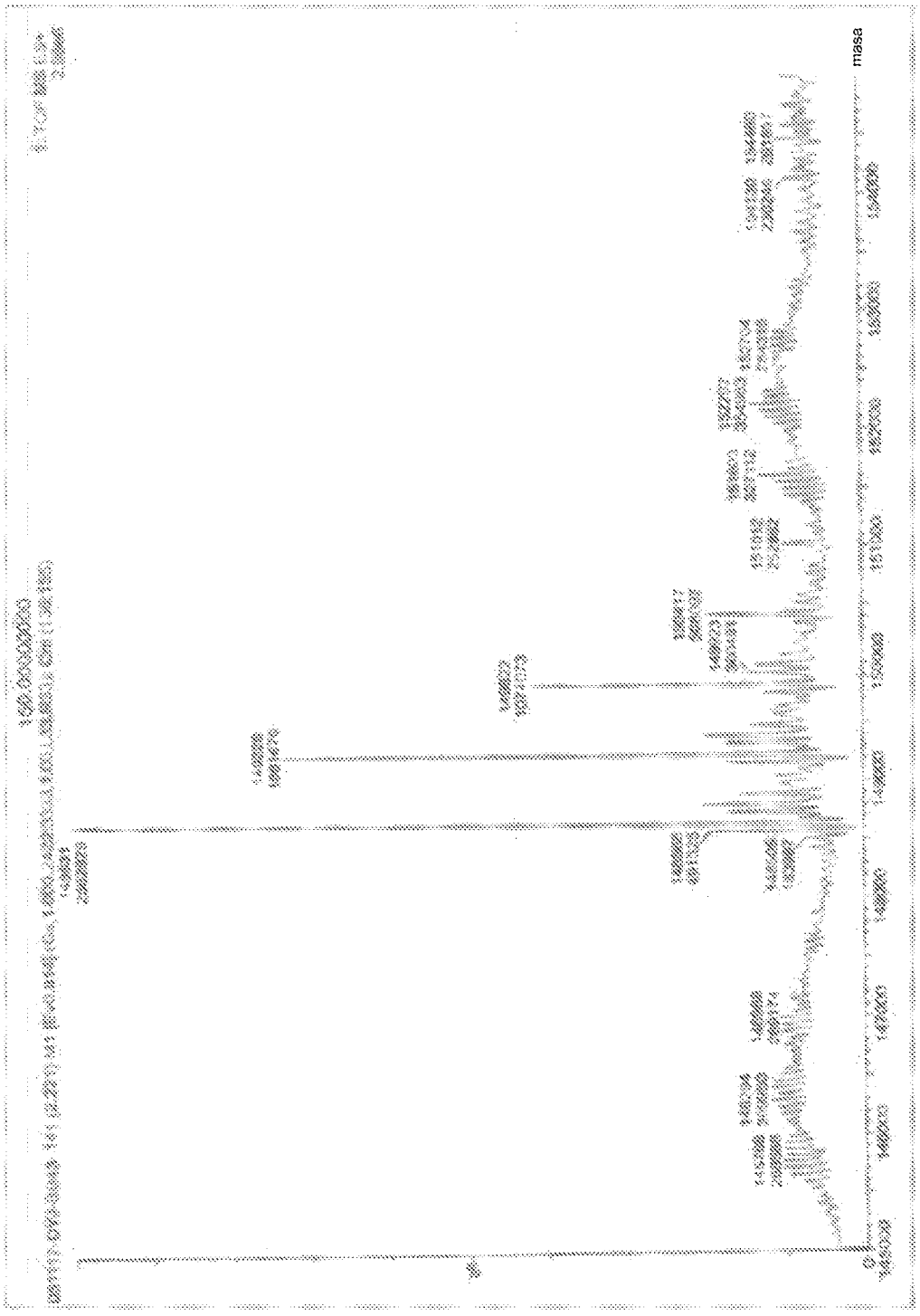


Fig. 123A

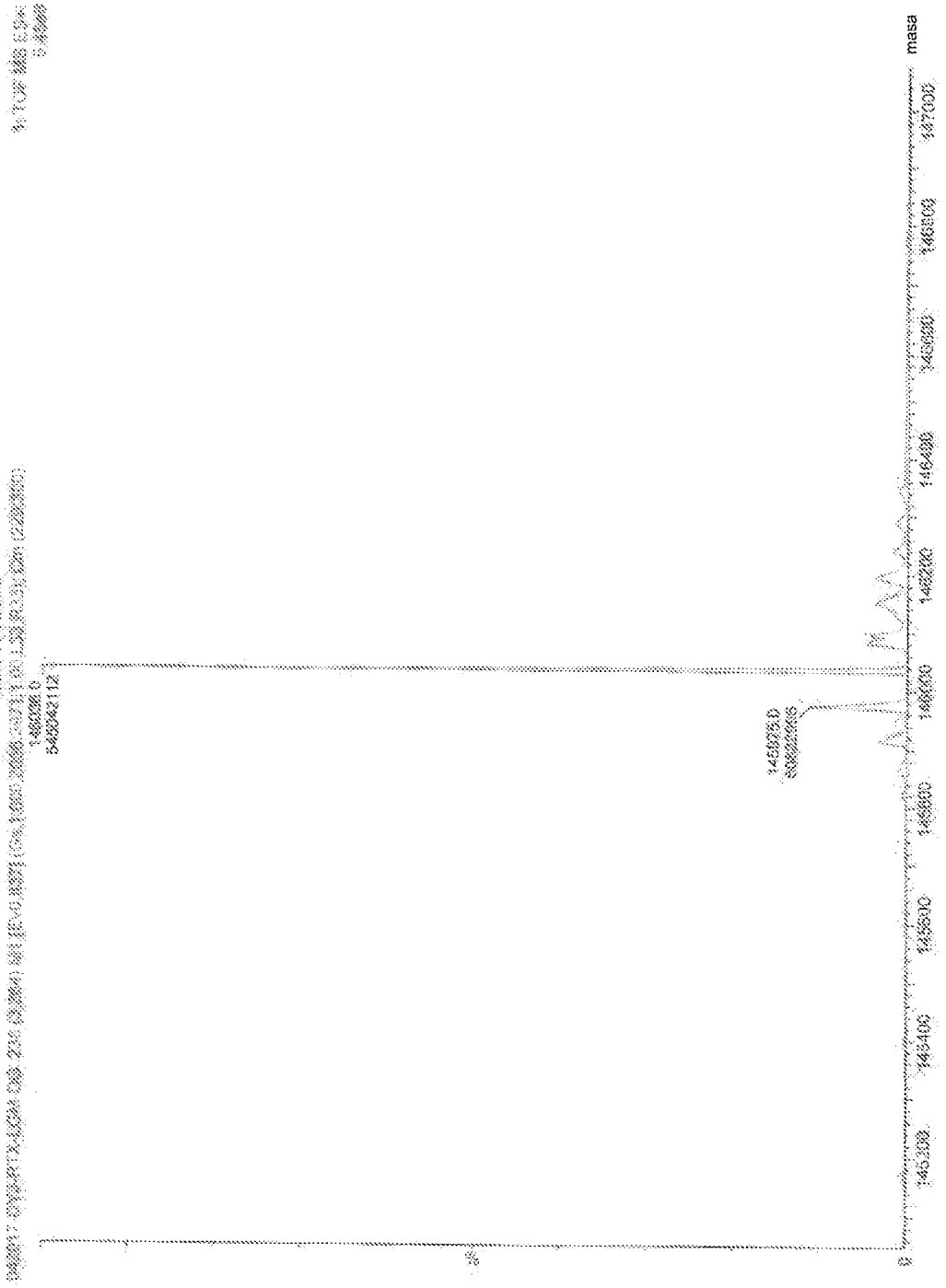


Fig. 123B

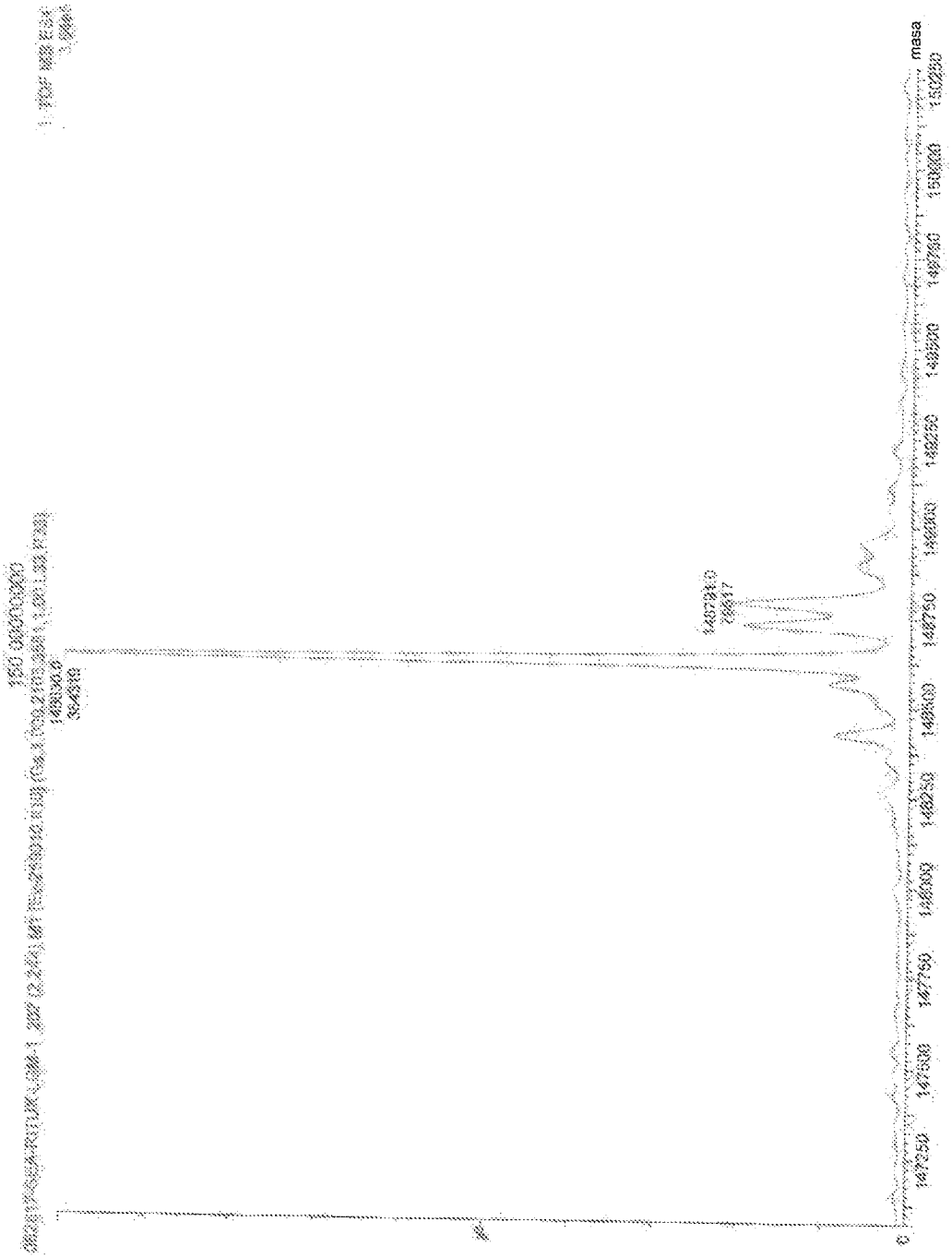


Fig. 123C

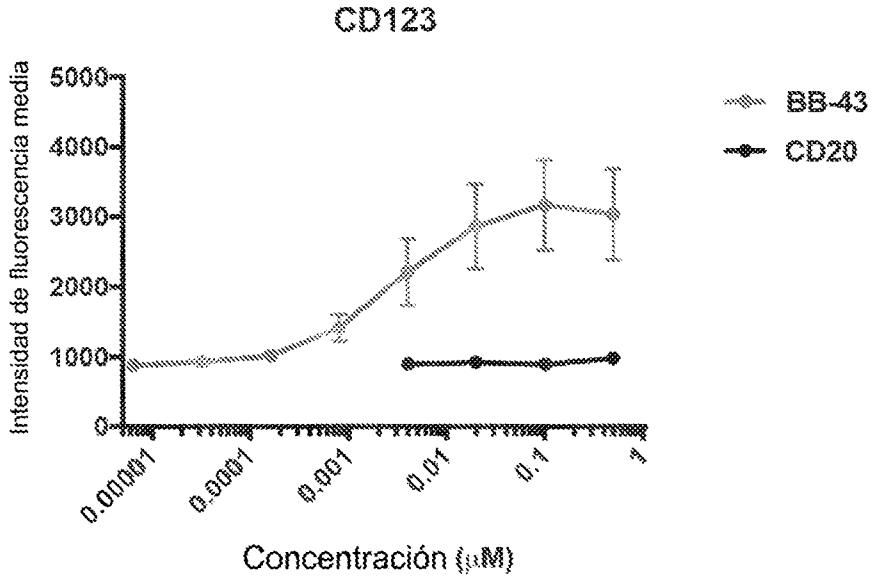


Fig. 123D

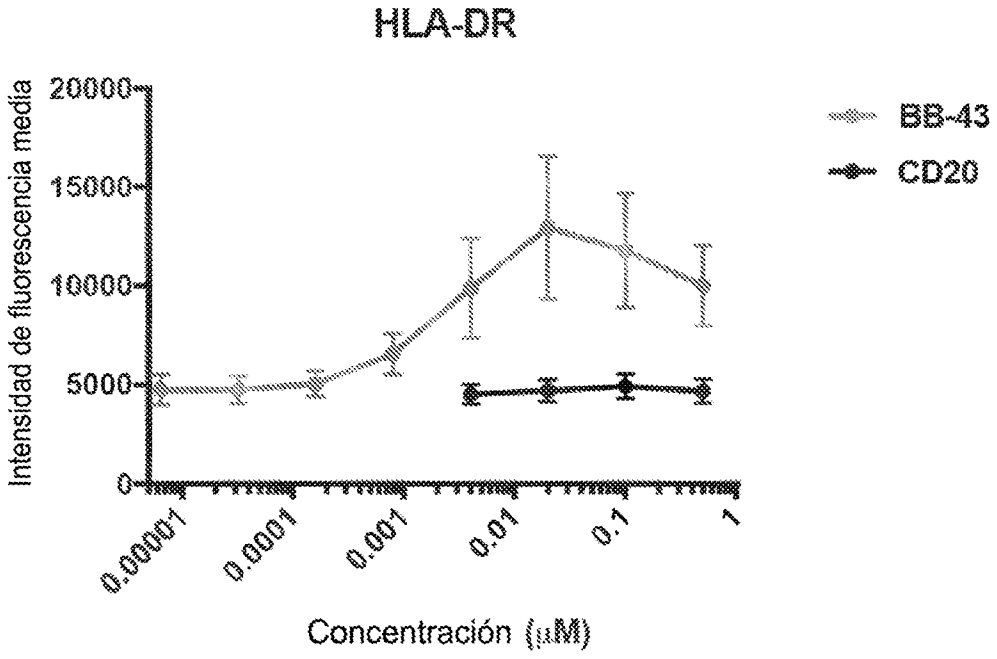


Fig. 123E

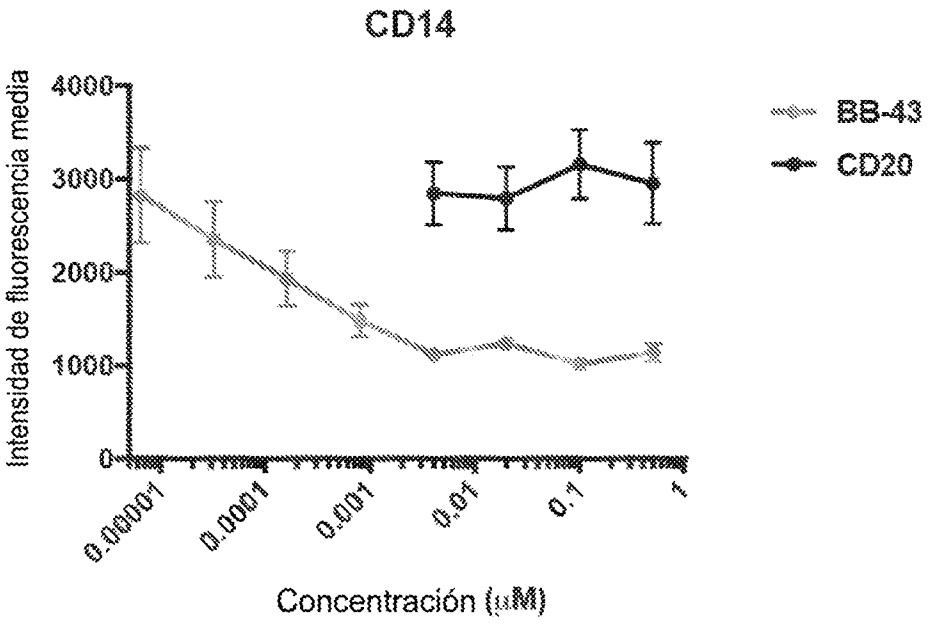


Fig. 123F

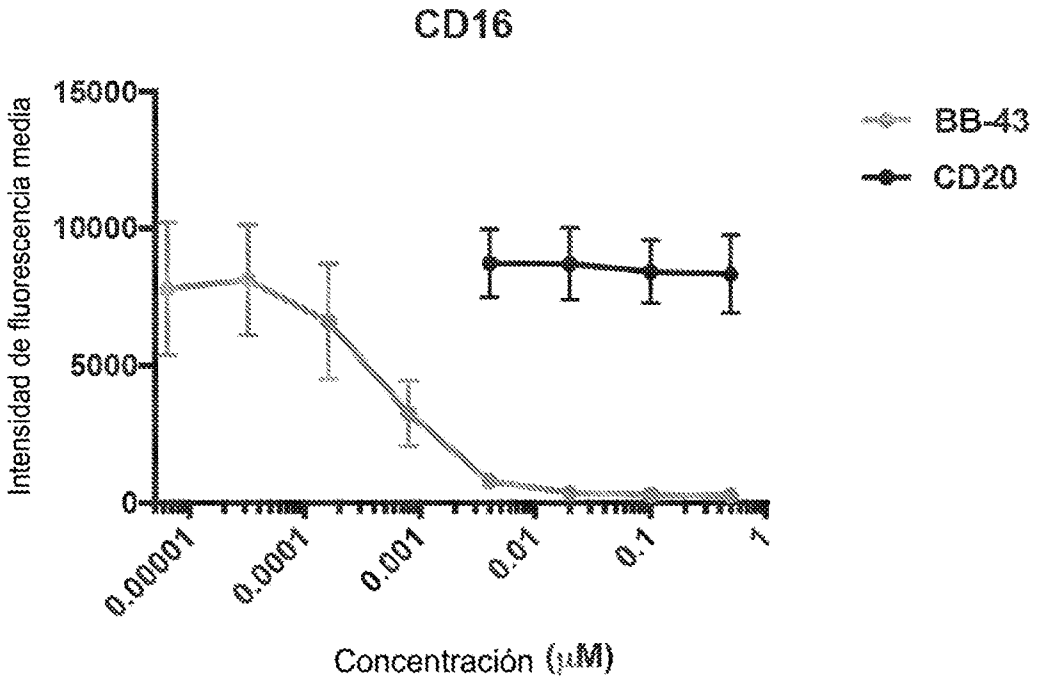


Fig. 123G

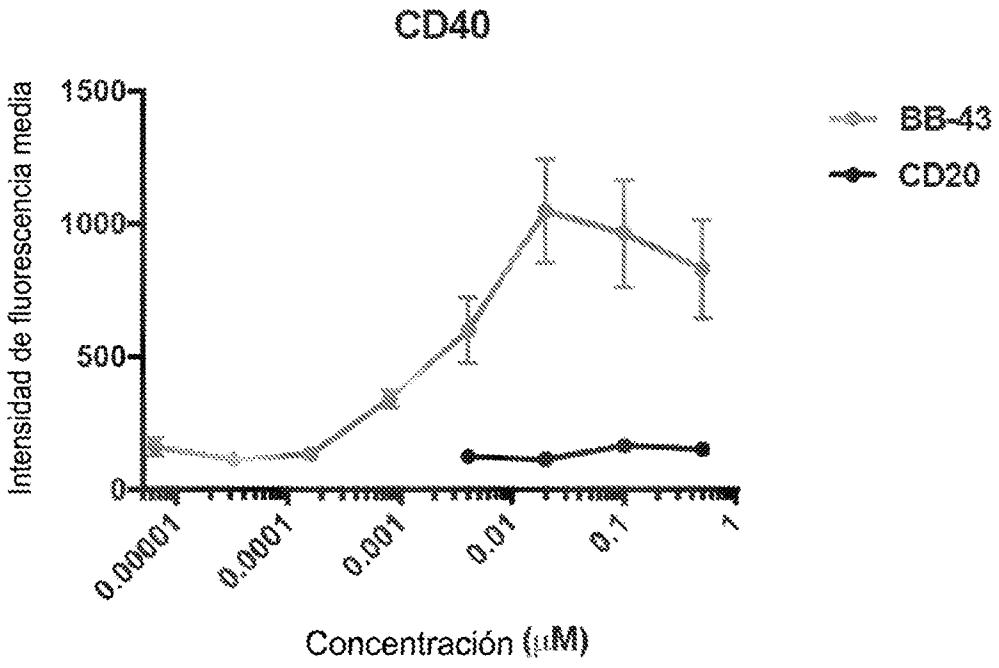


Fig. 123H

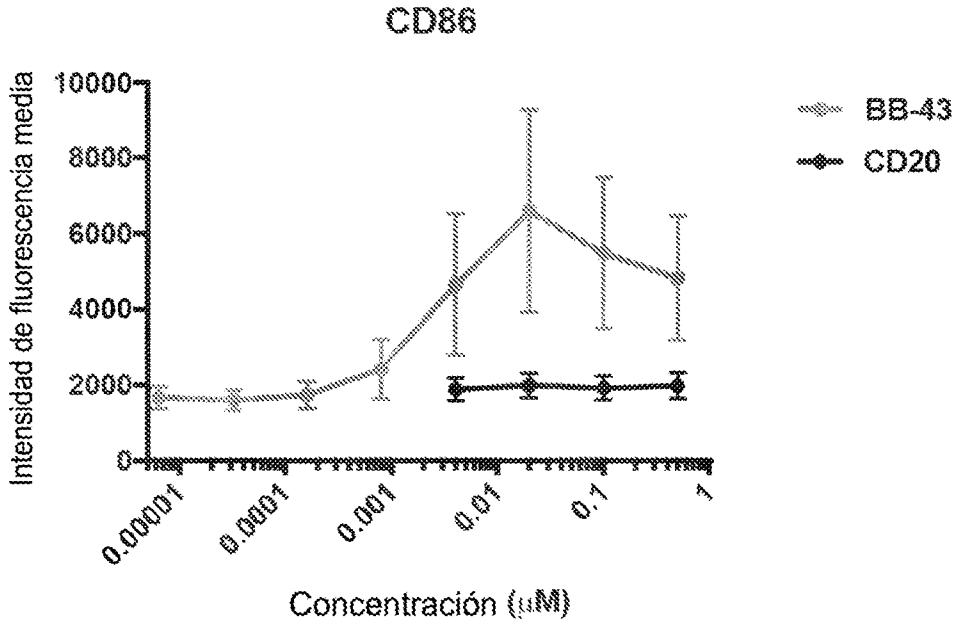


Fig. 123I

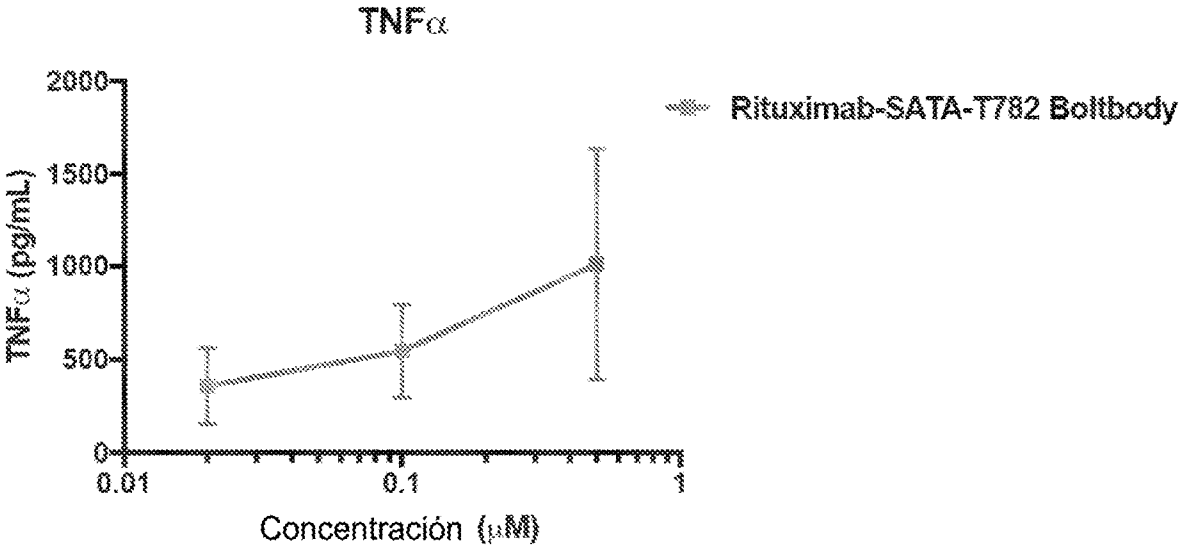

TNFα
Rituximab-SATA-T782 Boltbody
TNFα (pg/mL)
2000
1500
1000
500
0
0.01
0.1
1
Concentración (μM)

Fig. 124A

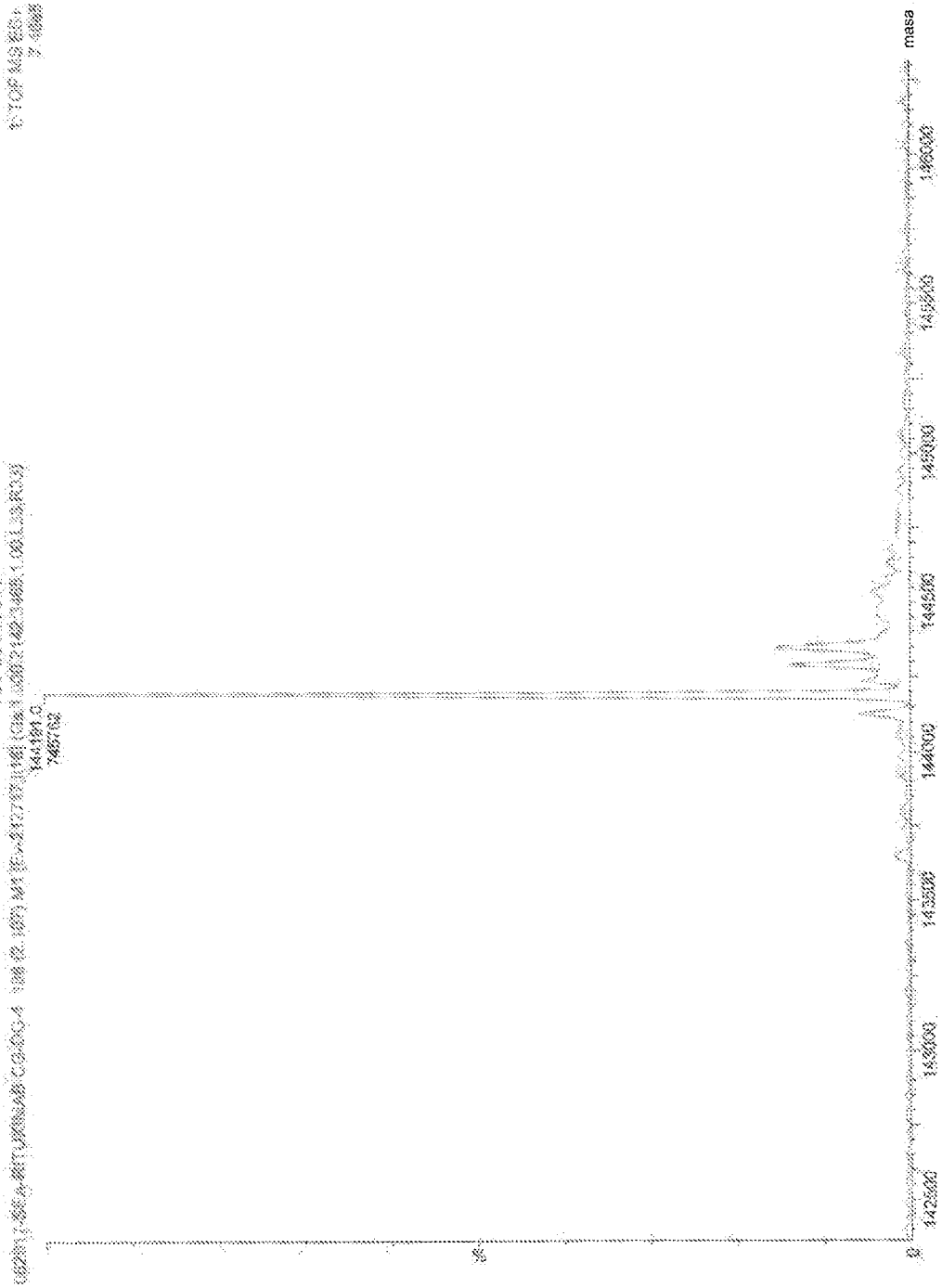

masa
144194.0
144700
160.0000000
%
0
142500
143000
143500
144000
144500
145000
145500
146000

Fig. 124B

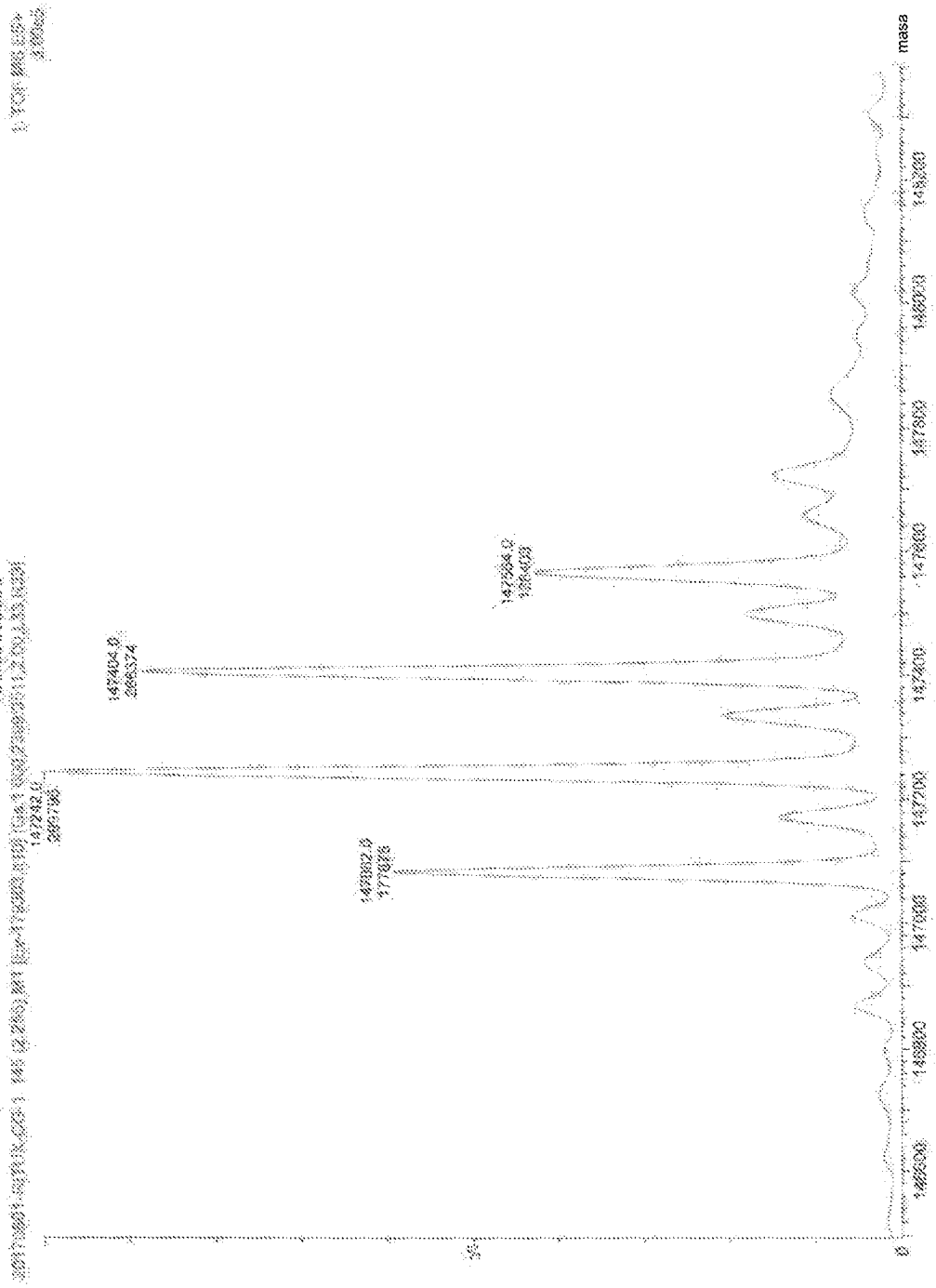


Fig. 124C

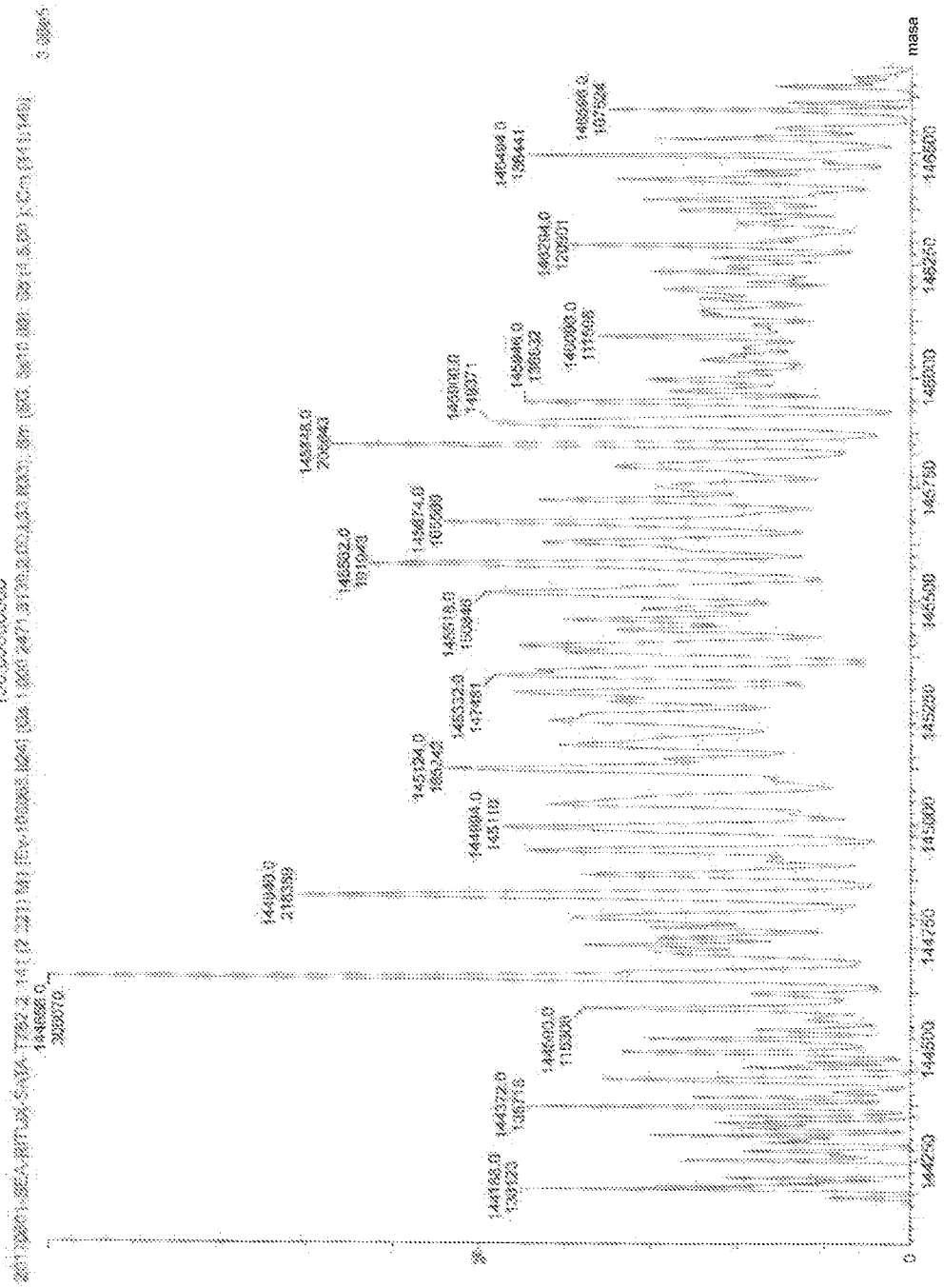


Fig. 124D

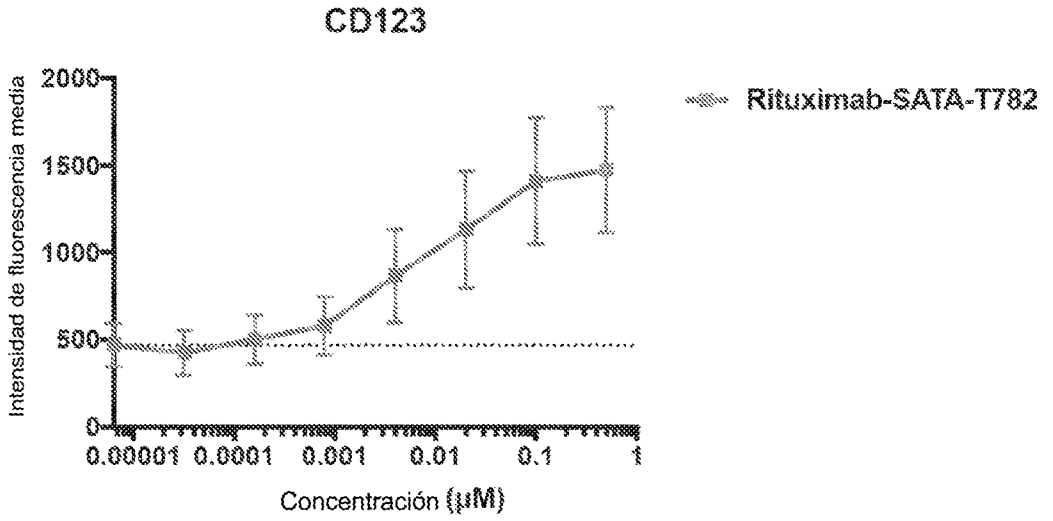


Fig. 124E

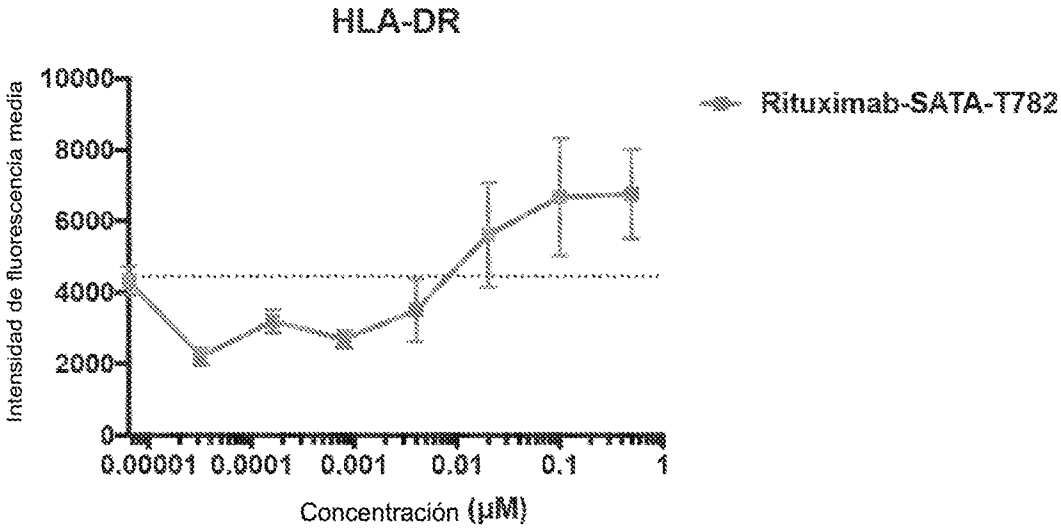


Fig. 124F

600

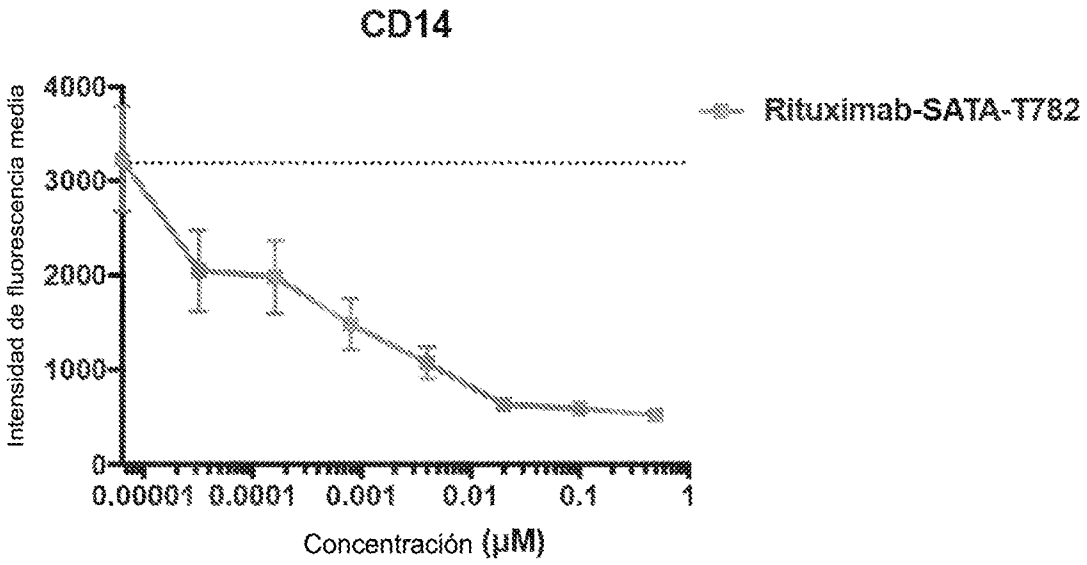


Fig. 124G

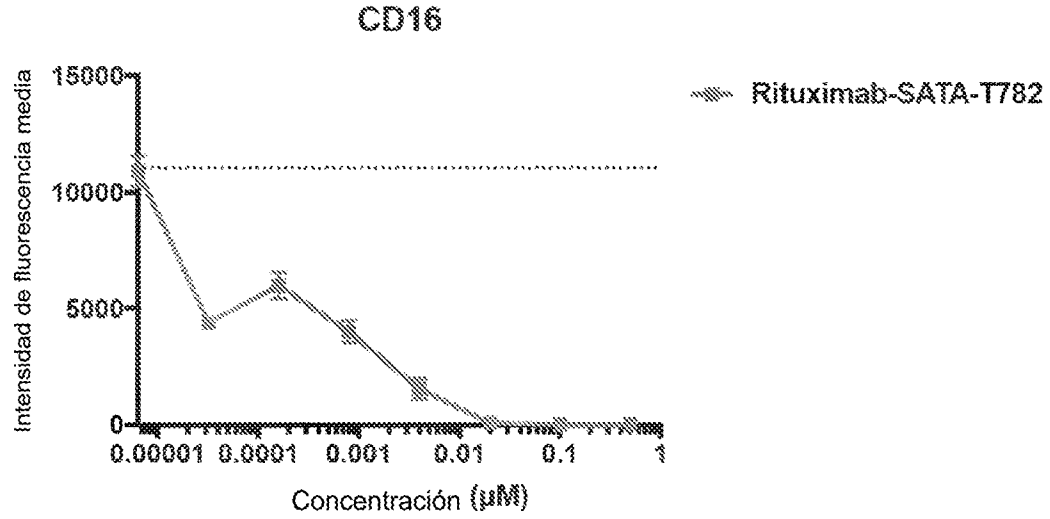


Fig. 124H

601

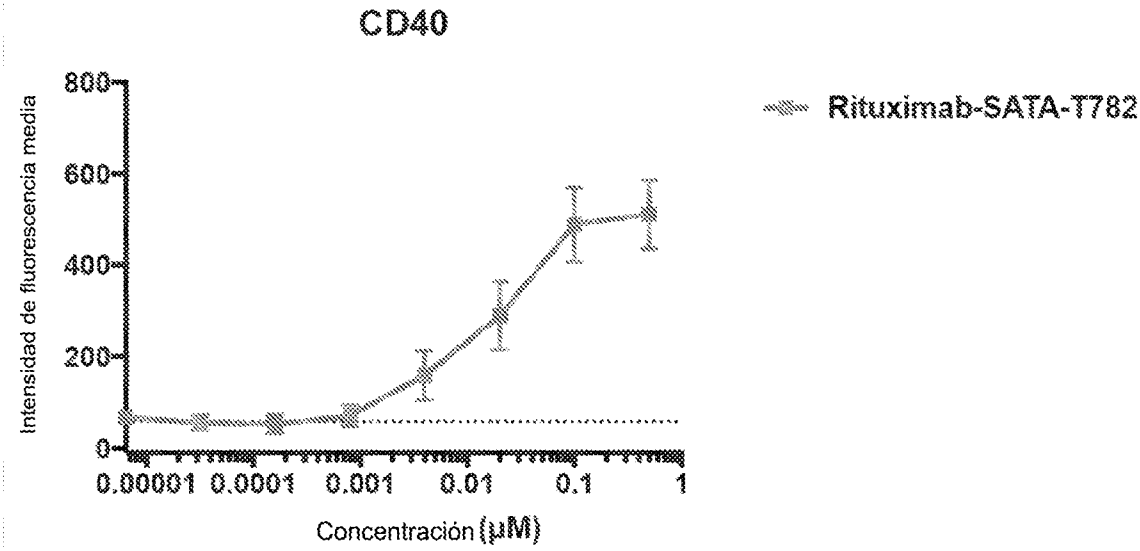


Fig. 124I

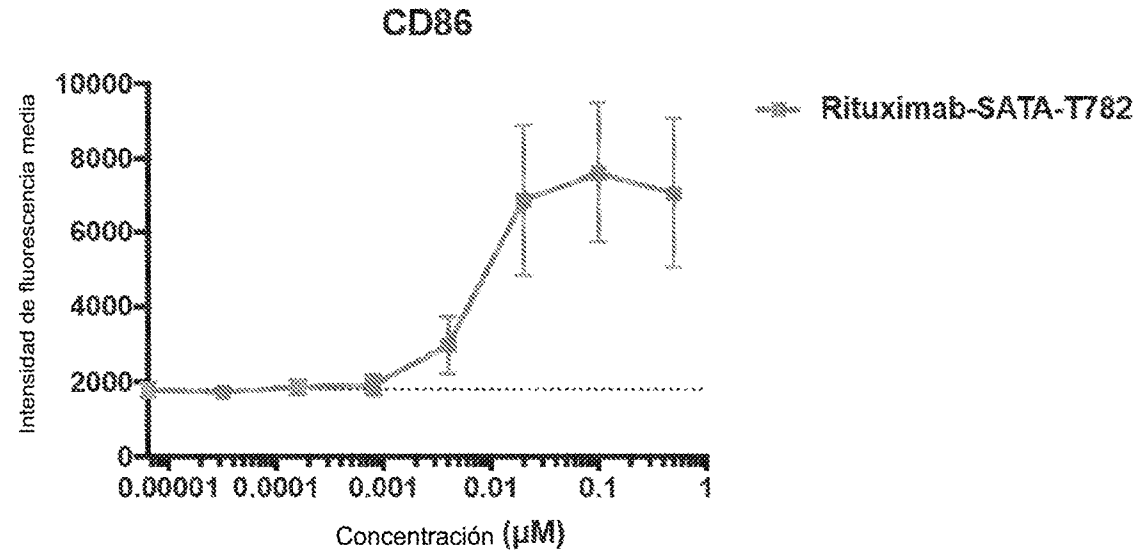


Fig. 124J

602

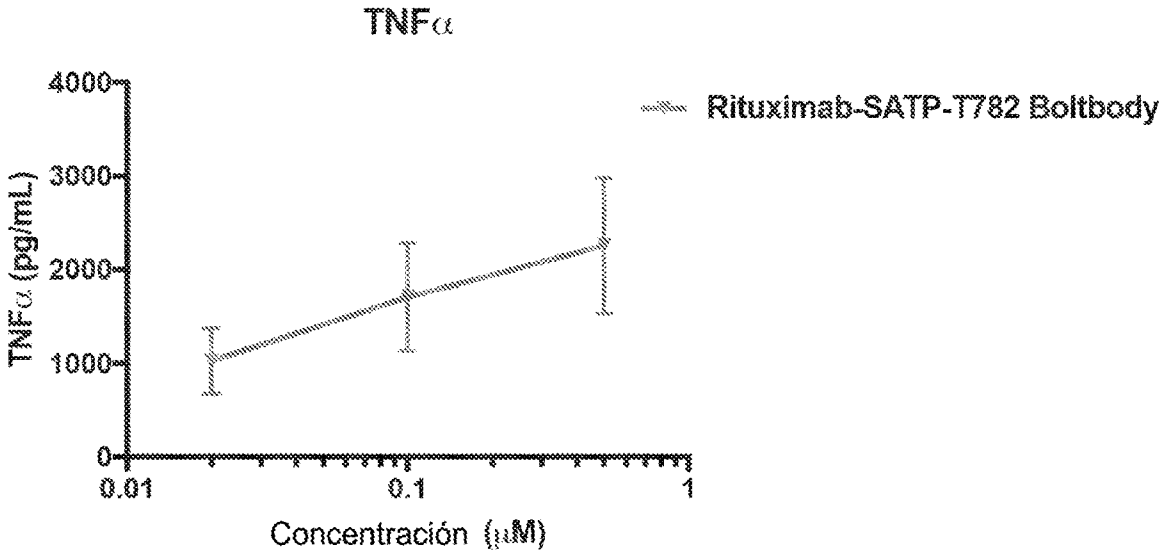

TNFα
Rituximab-SATP-T782 Boltbody
TNFα (pg/mL)
4000
3000
2000
1000
0
0.01
0.1
1
Concentración (μM)

Fig. 125A

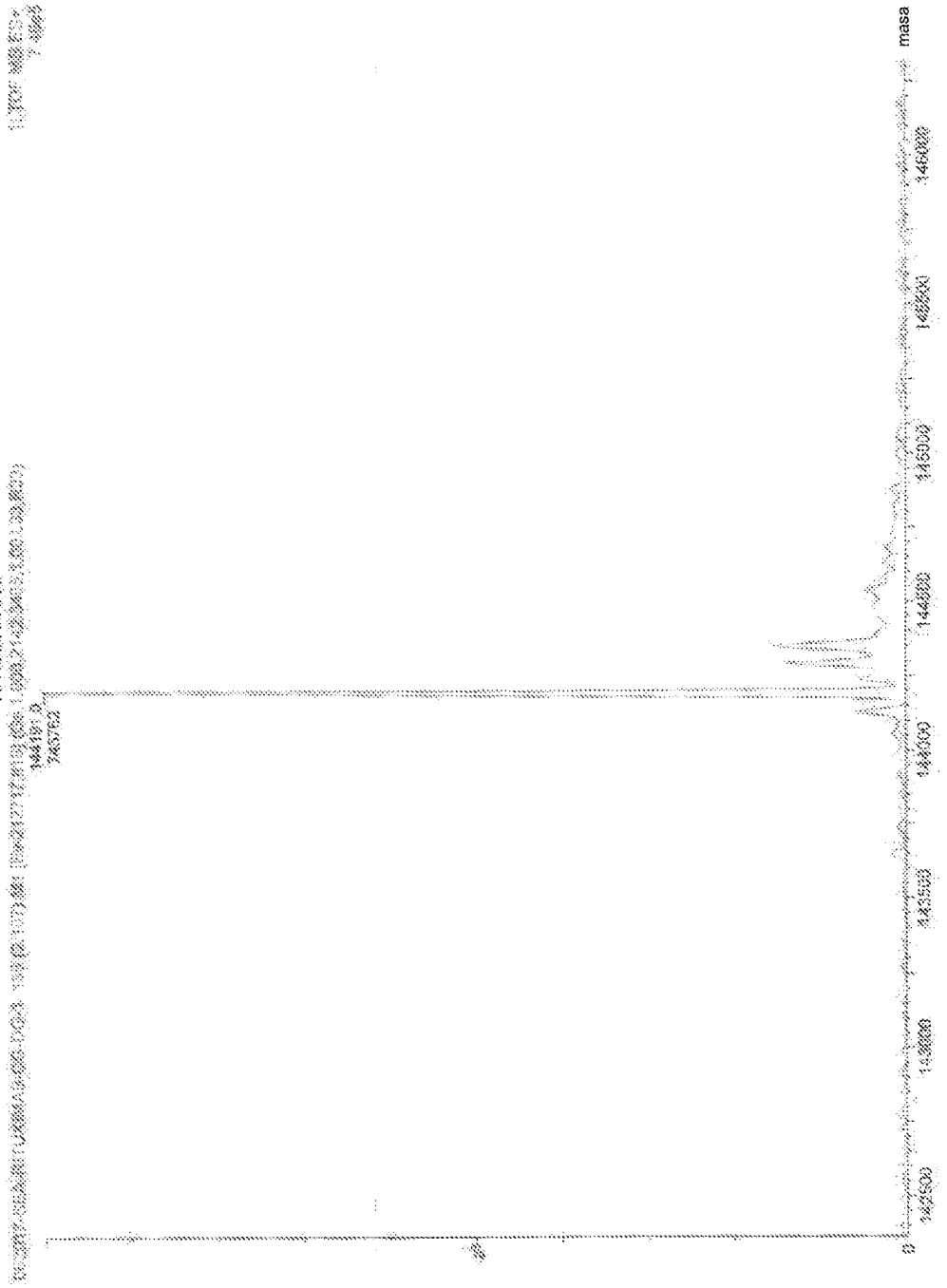


Fig. 125B

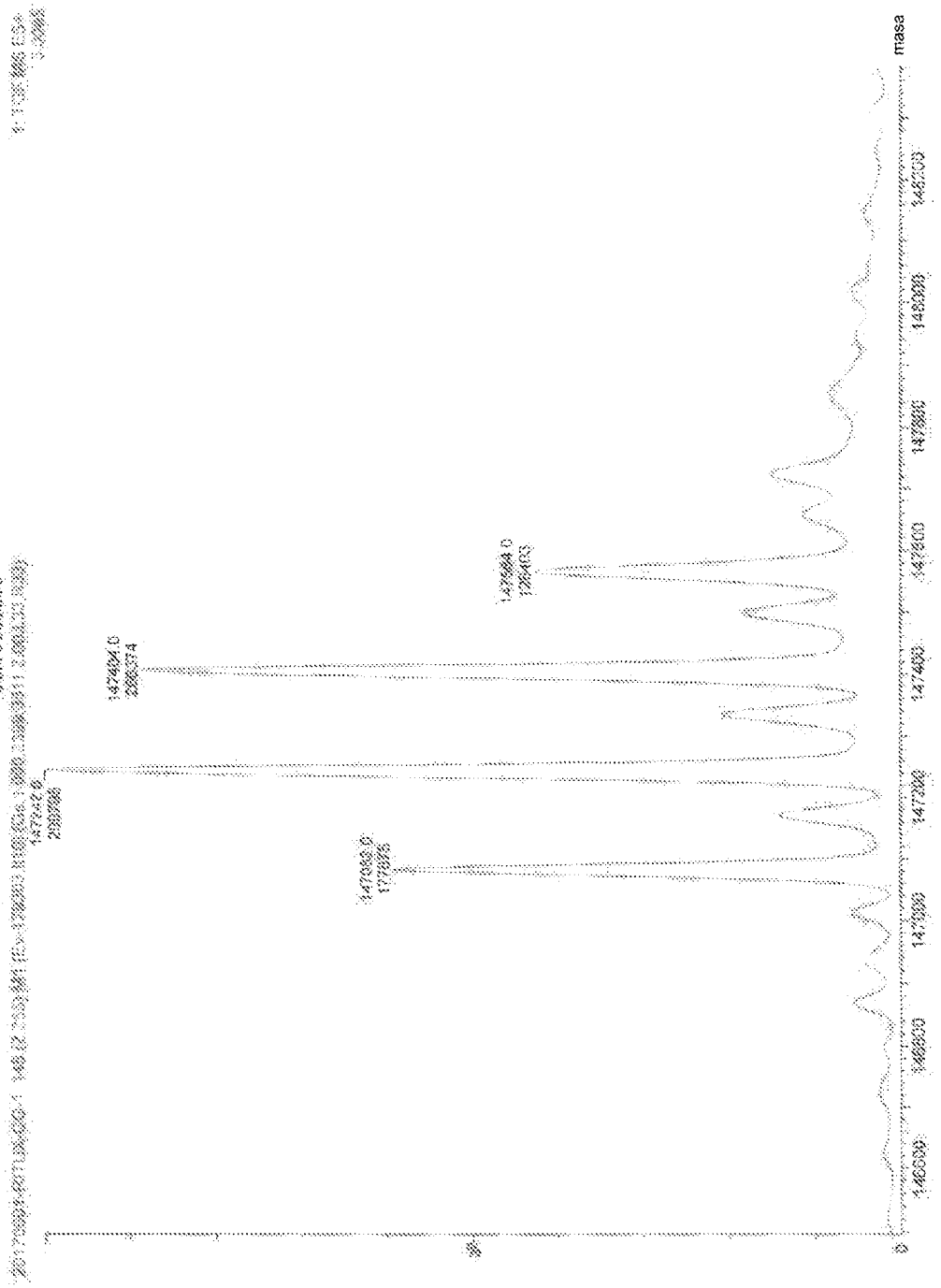


Fig. 125C

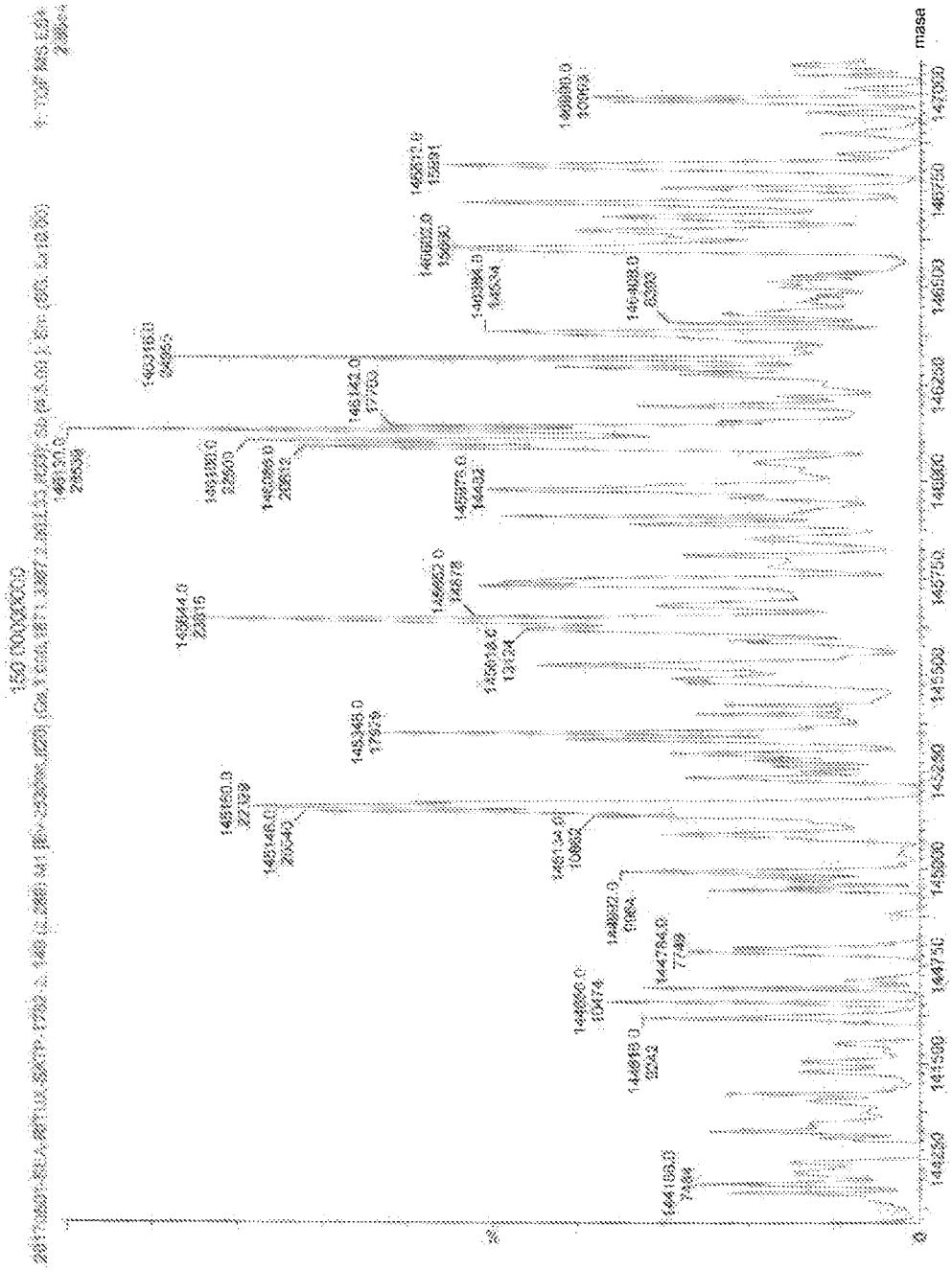


Fig. 125D

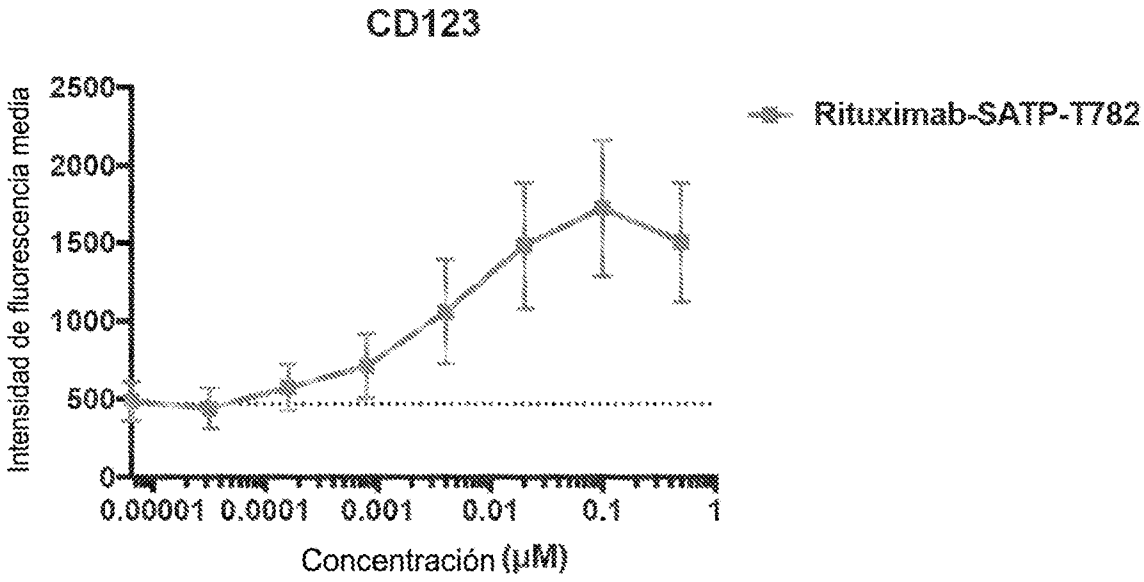


Fig. 125E

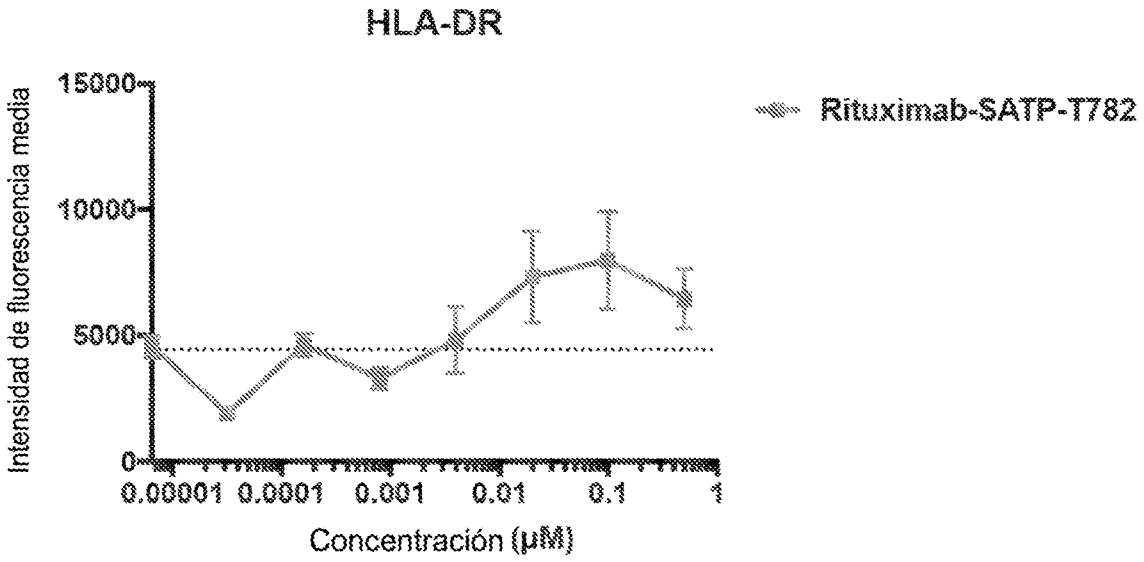


Fig. 125F

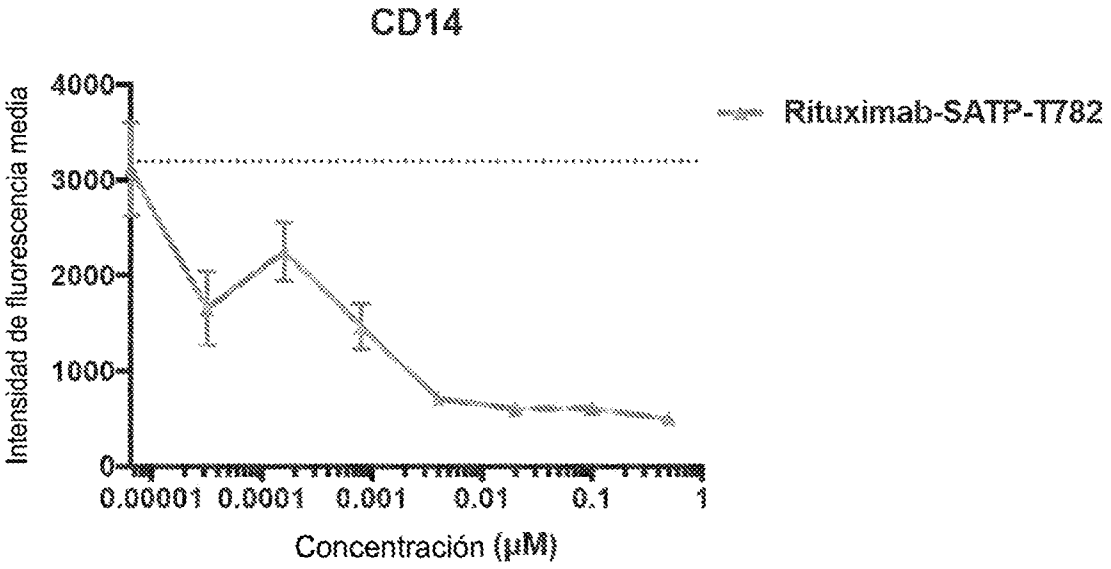


Fig. 125G

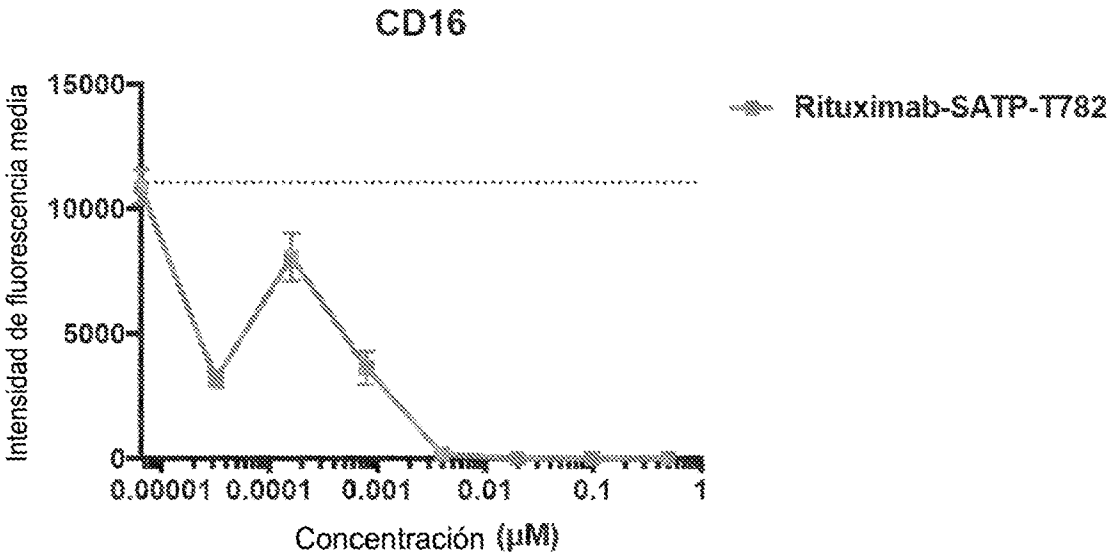


Fig. 125H

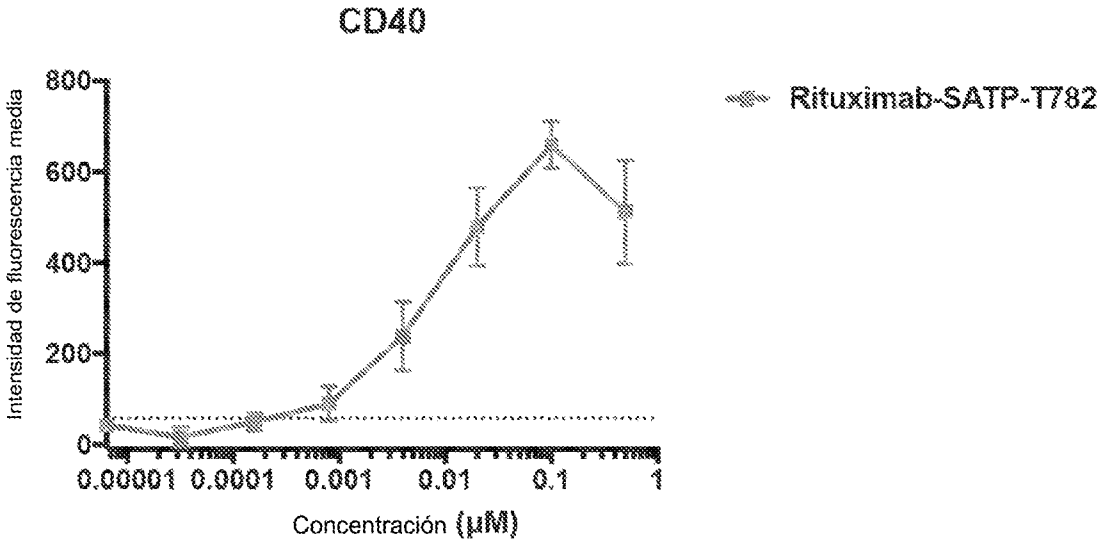


Fig. 125I

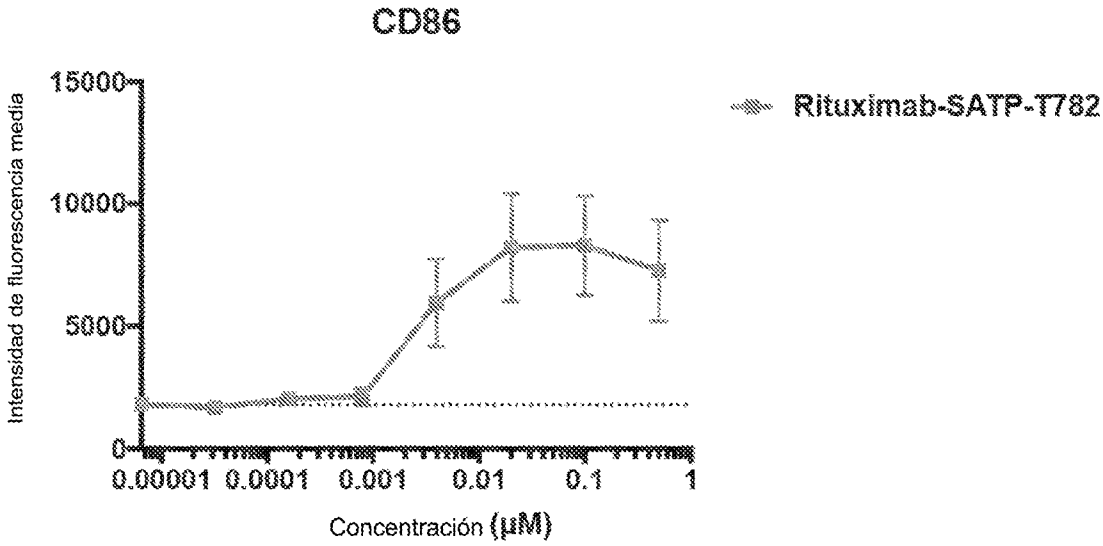


Fig. 125J

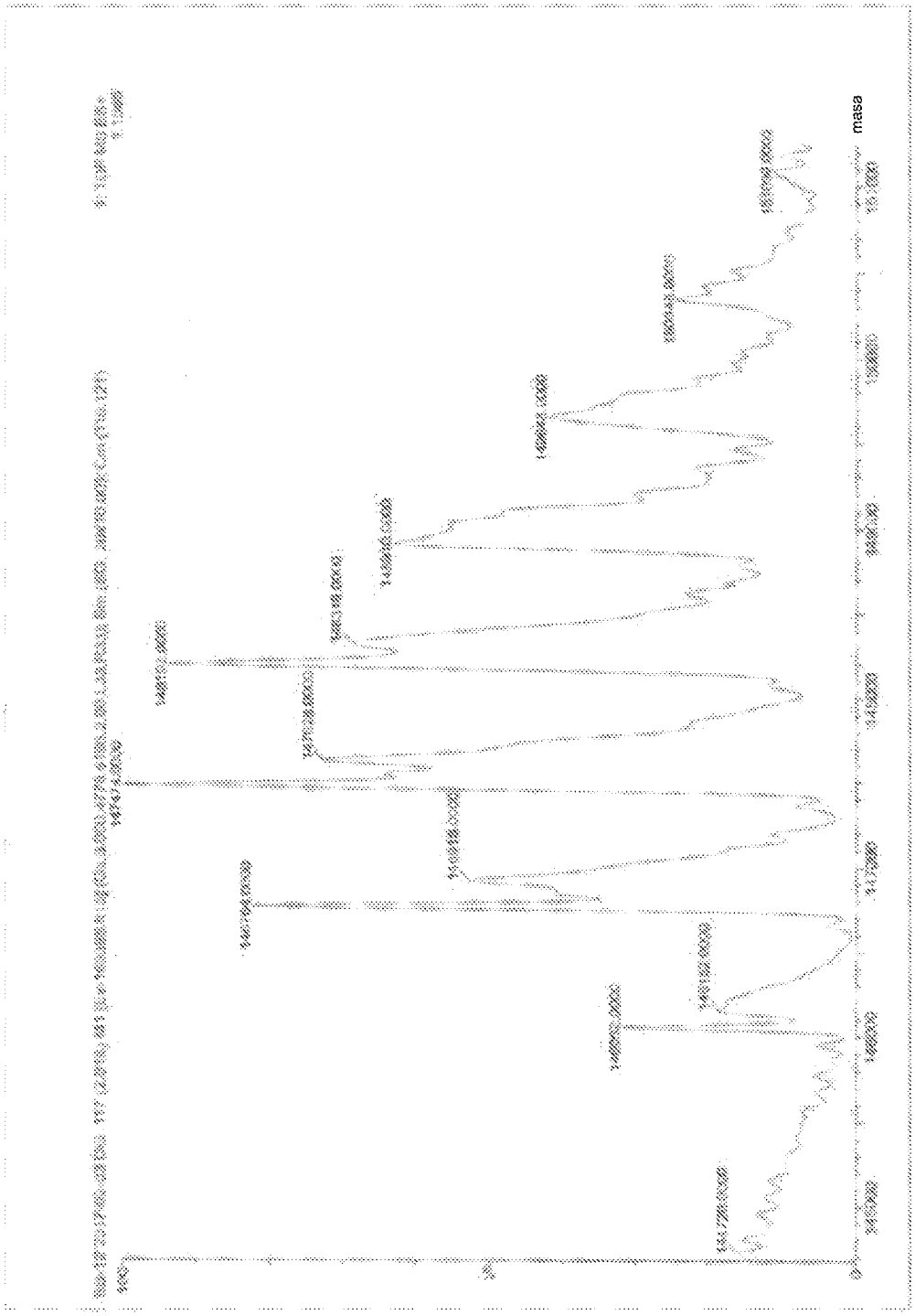


Fig. 126A

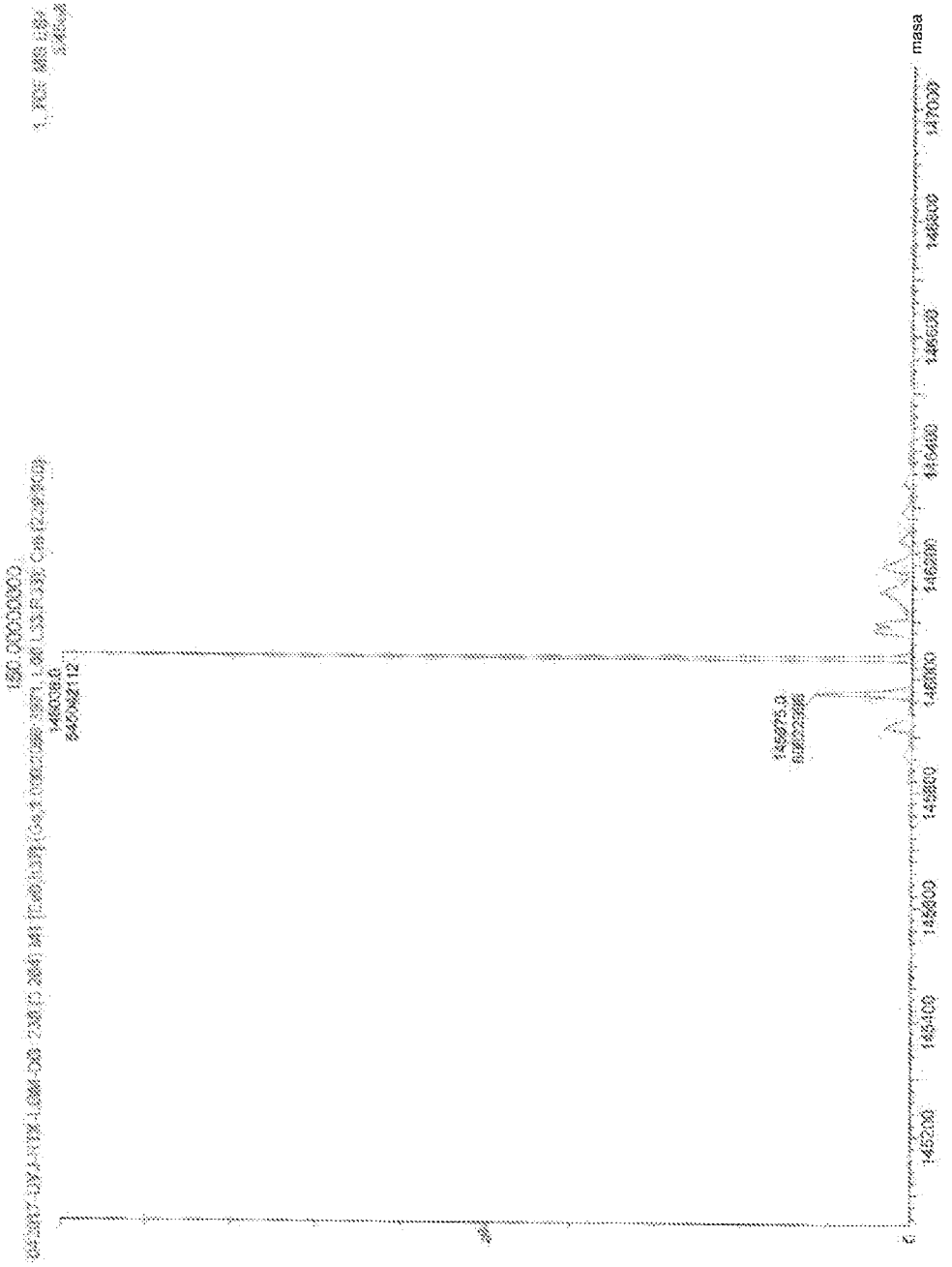


Fig. 126B

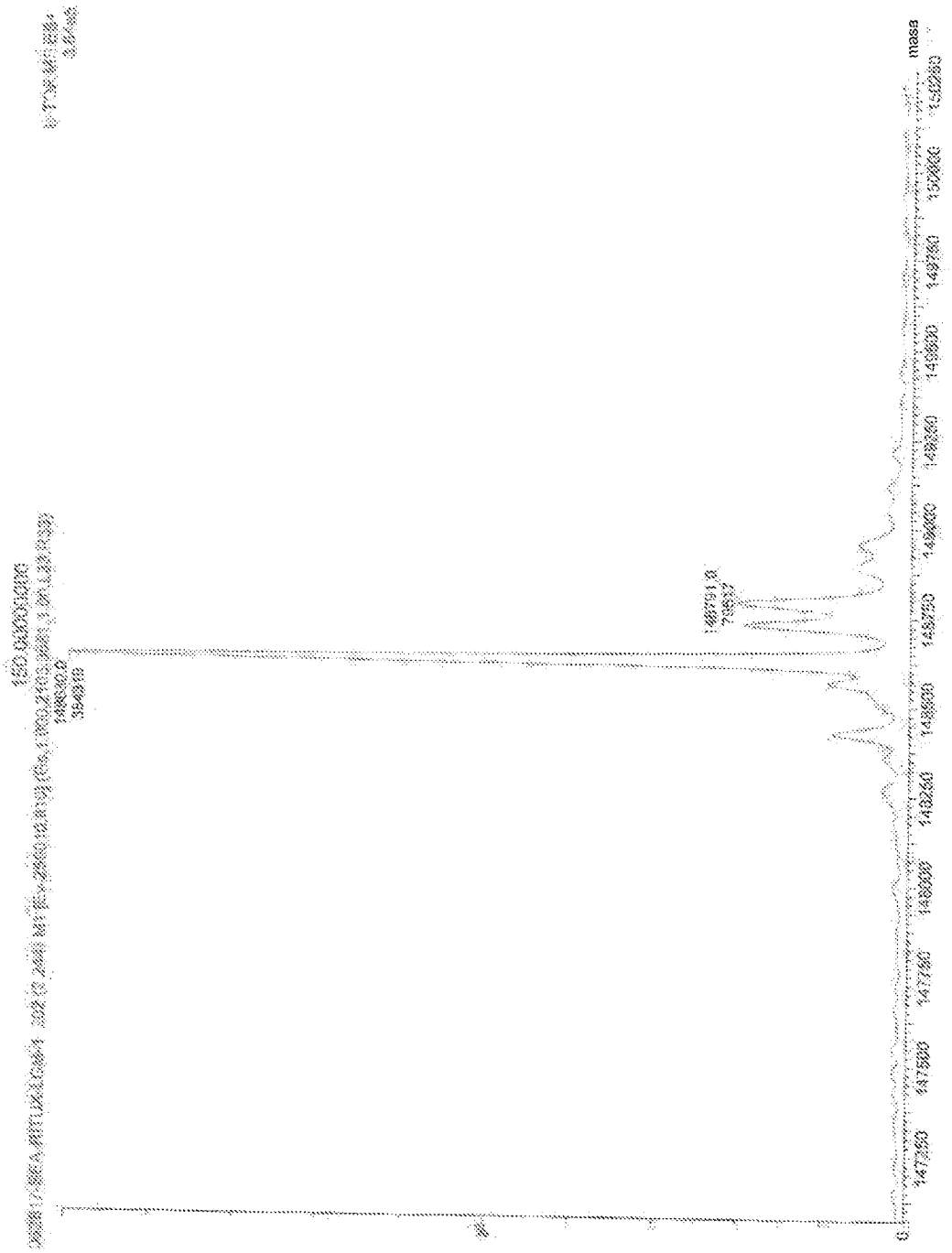


Fig. 126C

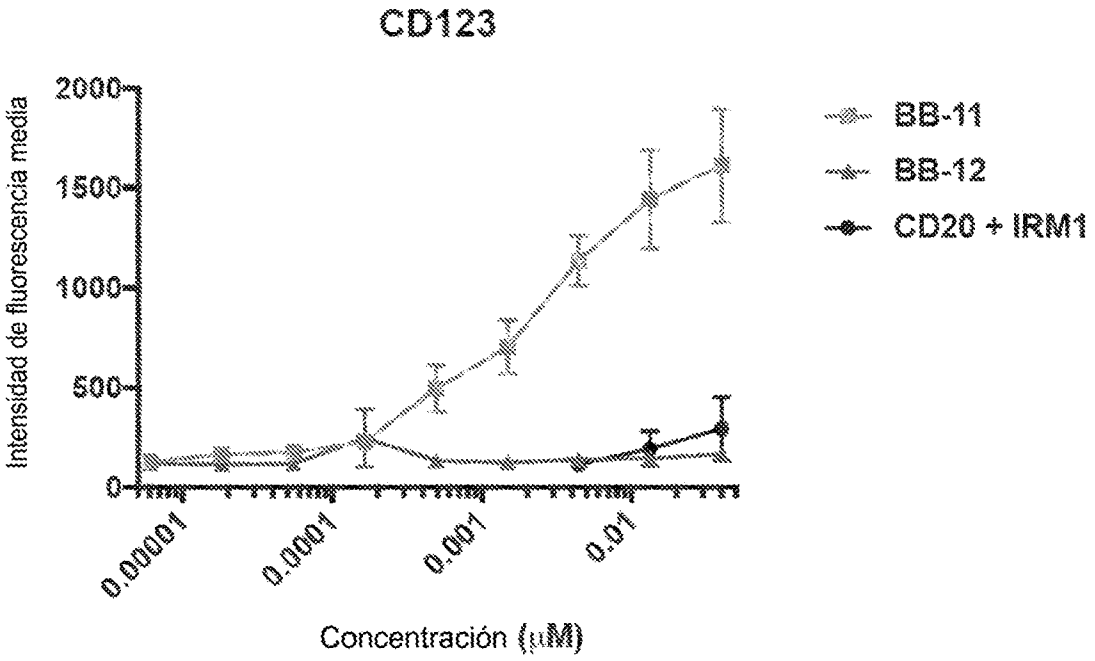


Fig. 126D

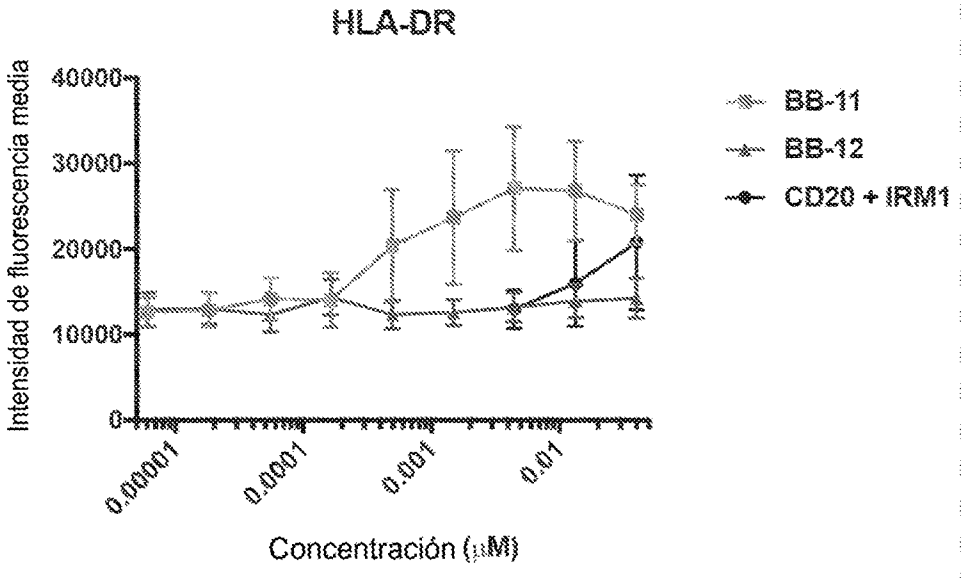


Fig. 126E

613

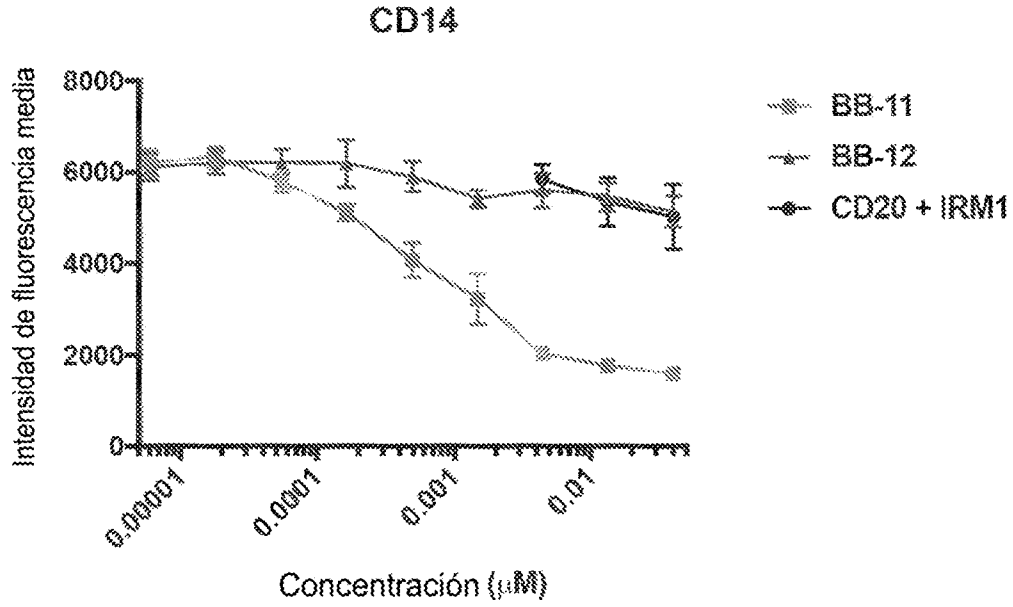


Fig. 126F

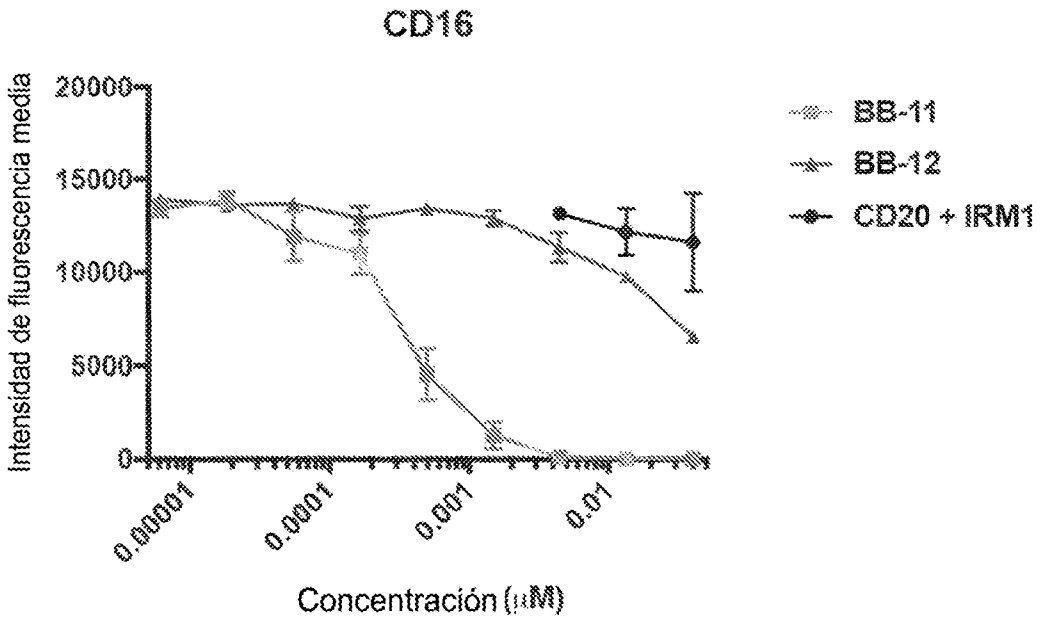


Fig. 126G

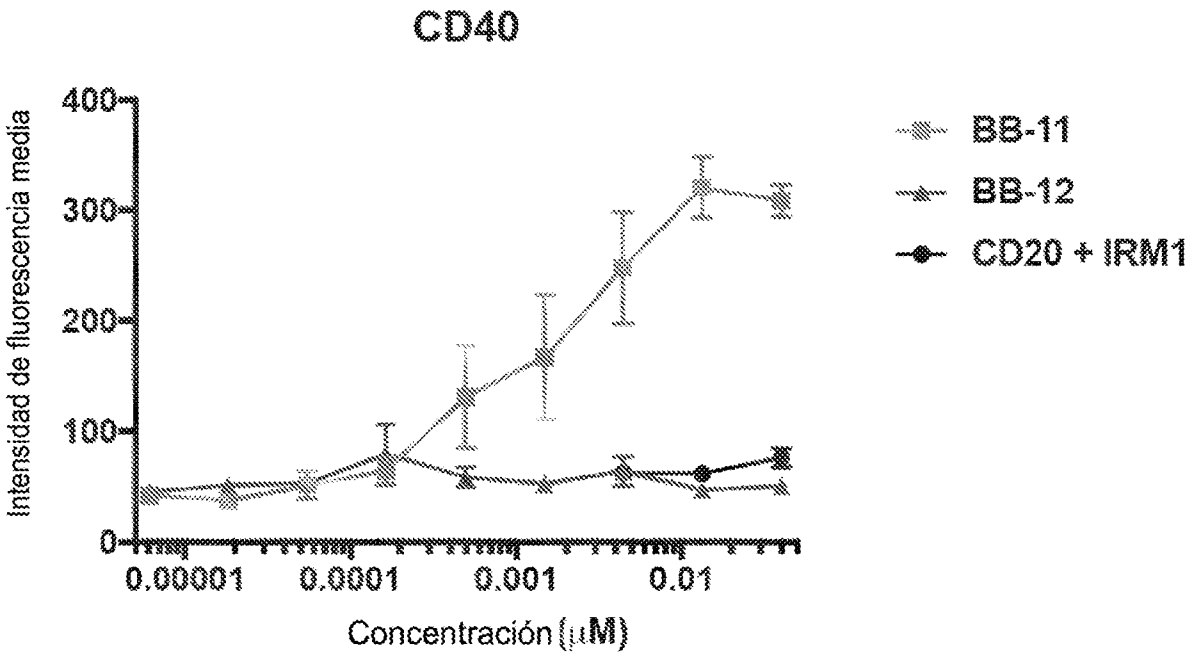


Fig. 126H

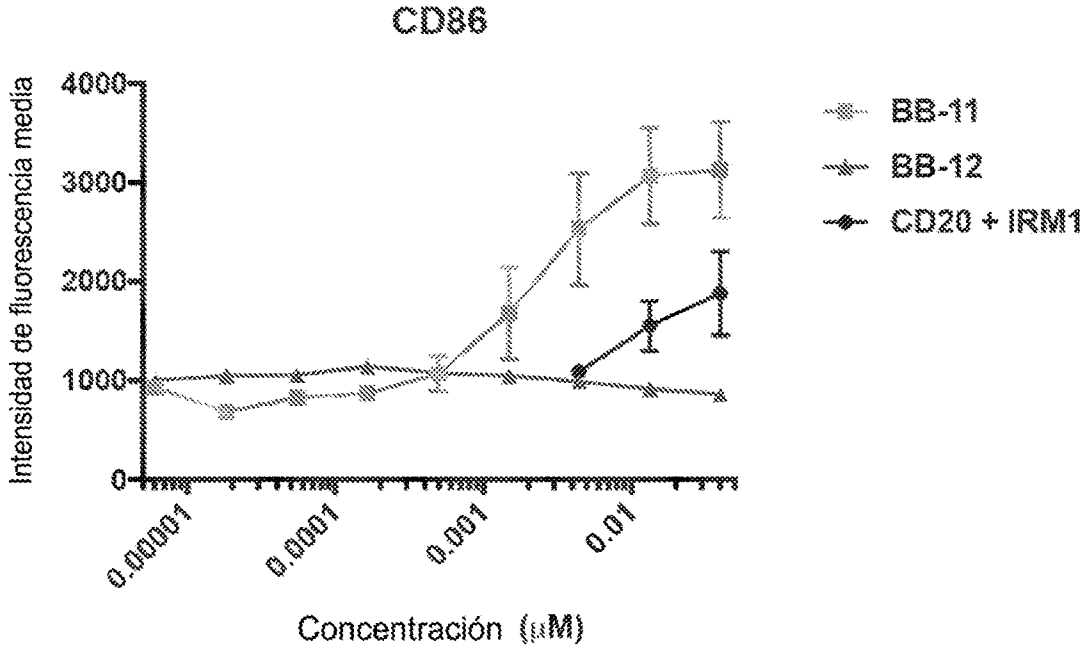


Fig. 126I

615

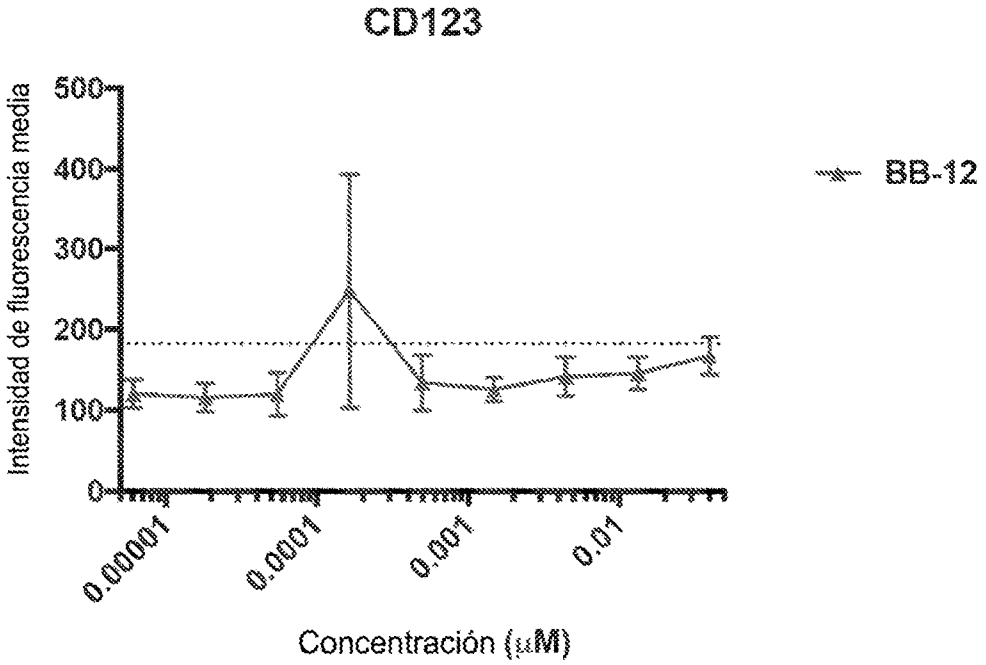


Fig. 126J

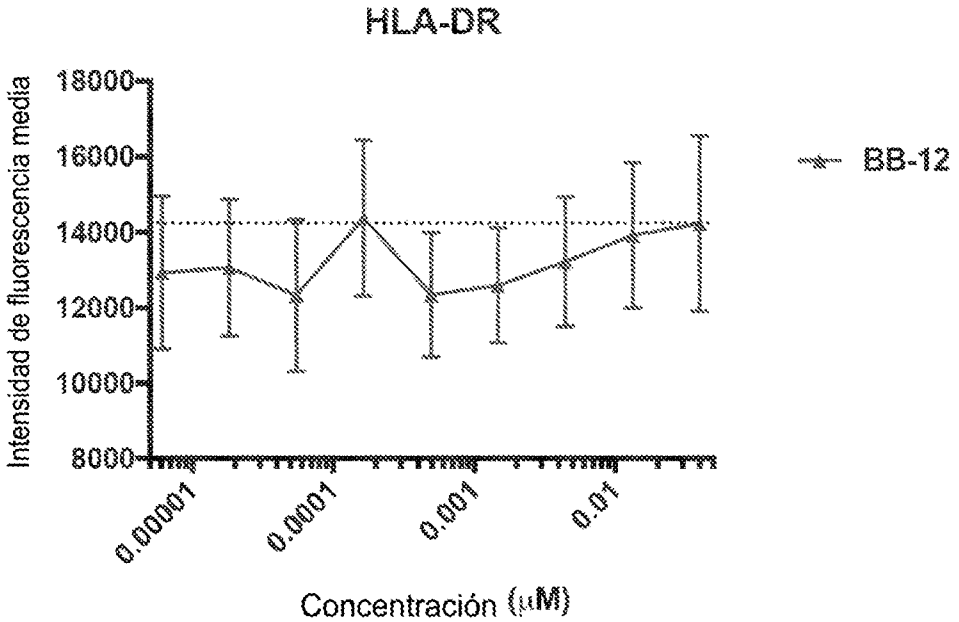


Fig. 126K

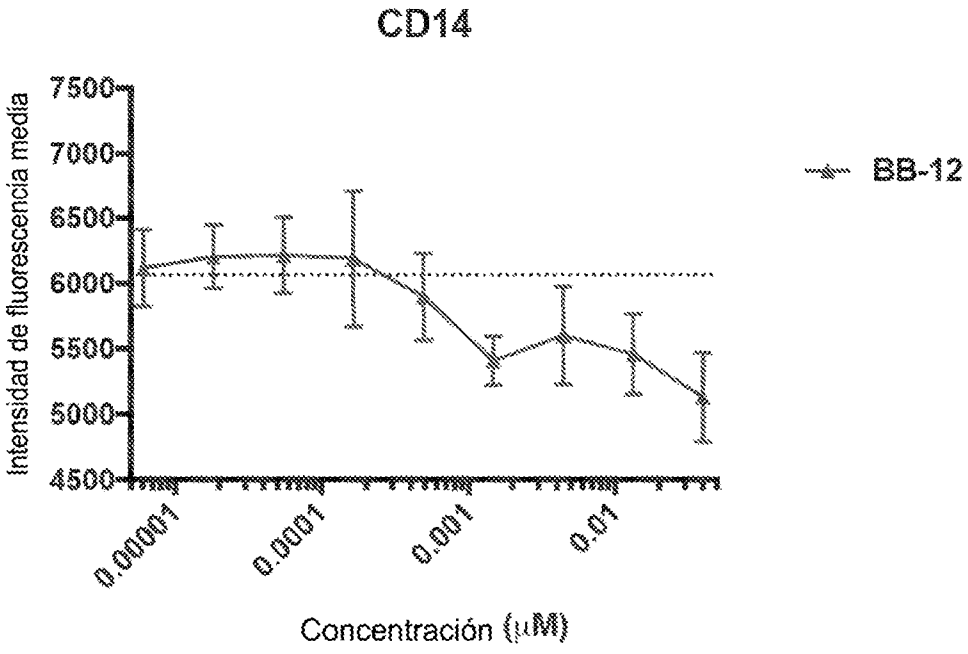


Fig. 126L

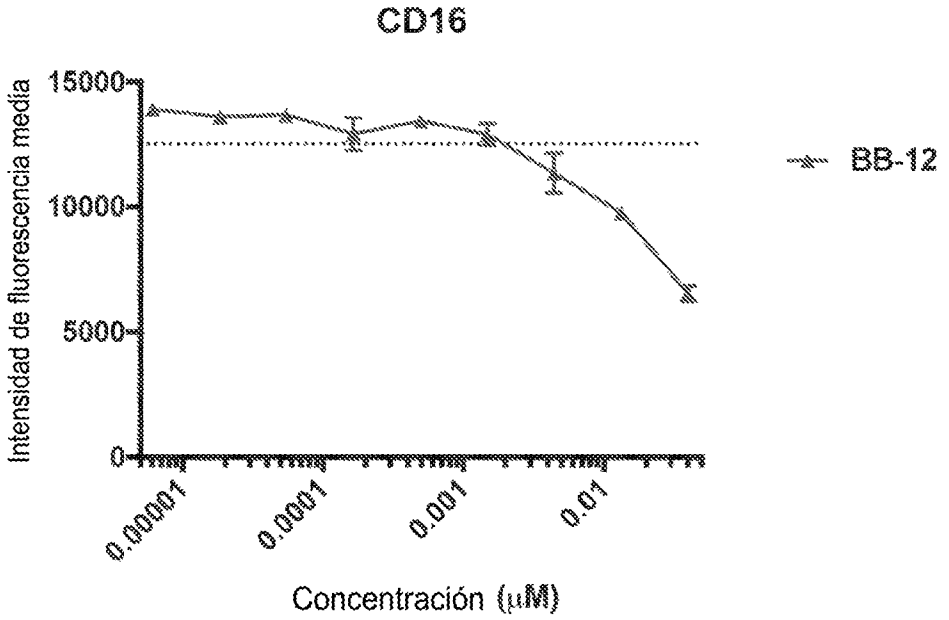


Fig. 126M

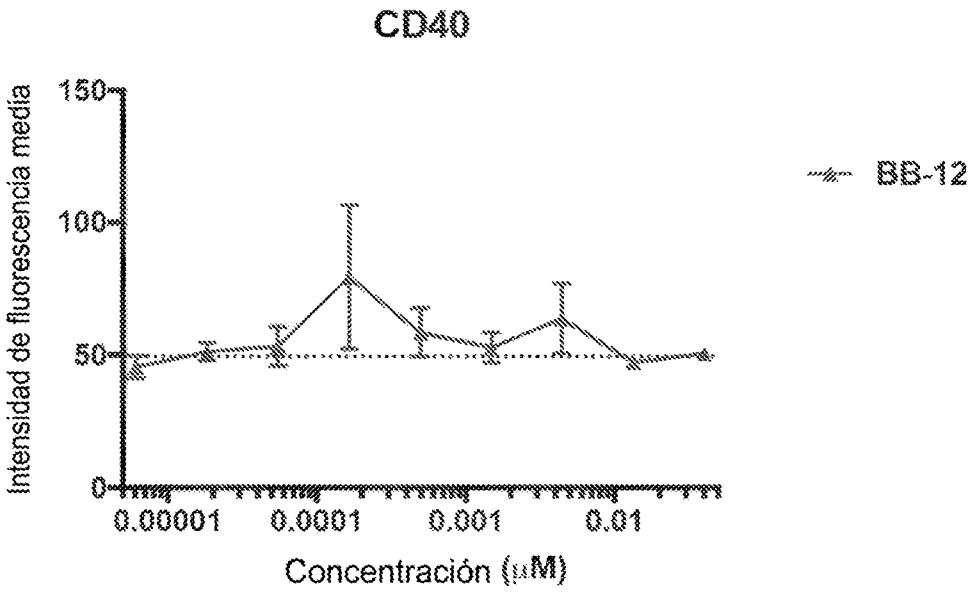


Fig. 126N

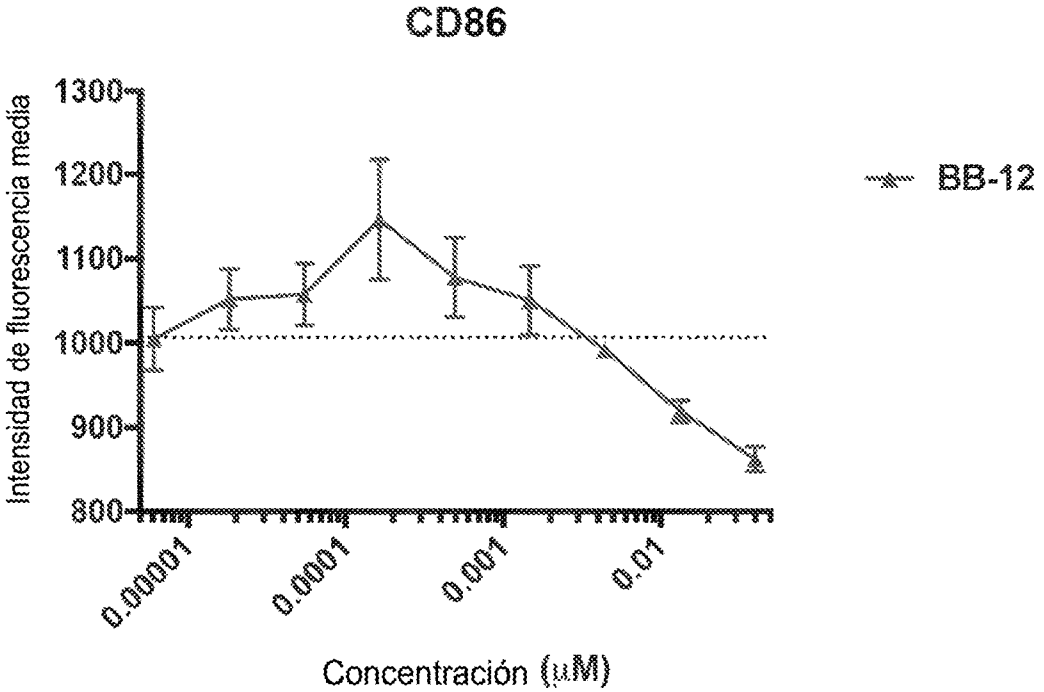


Fig. 126O

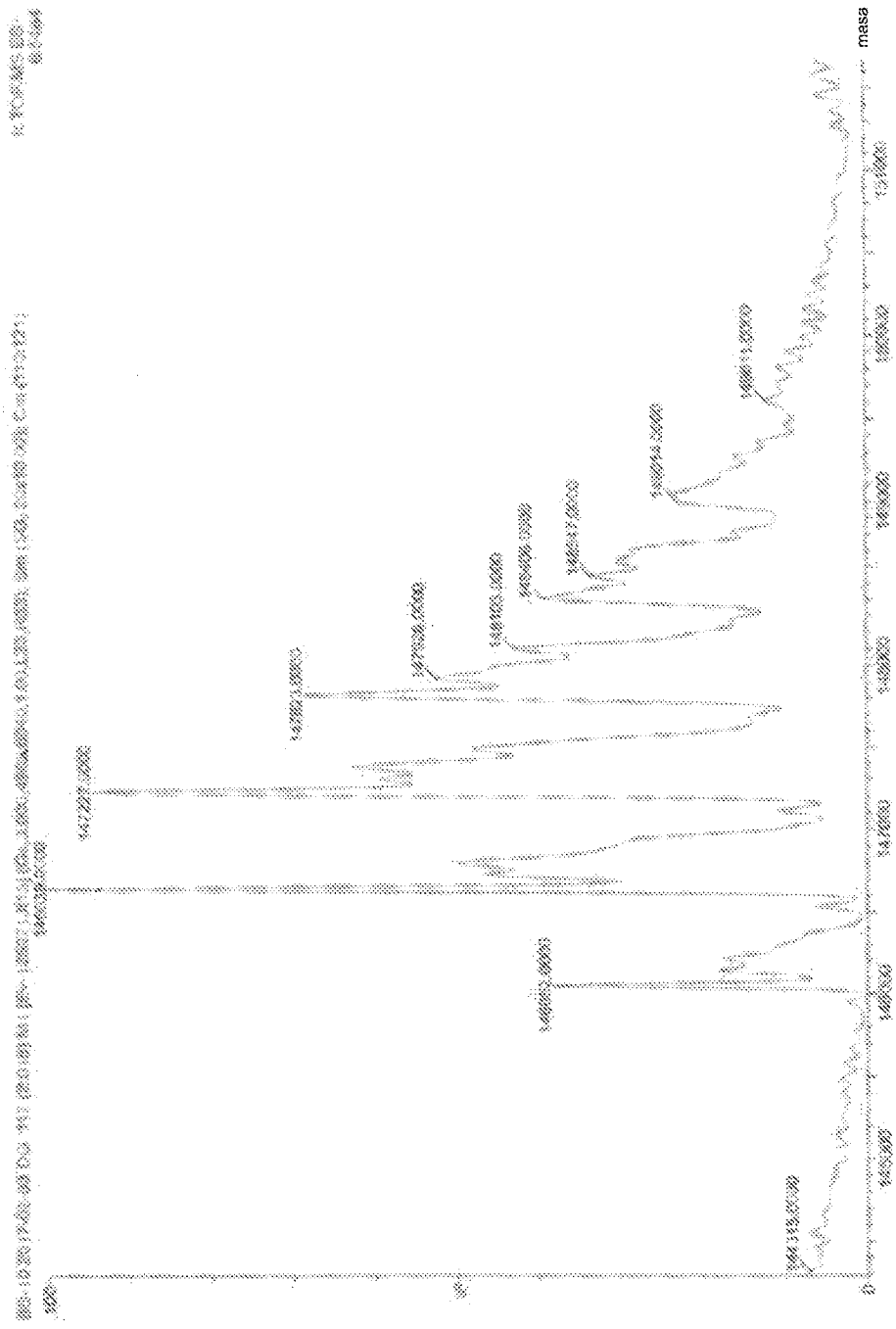


Fig. 127A

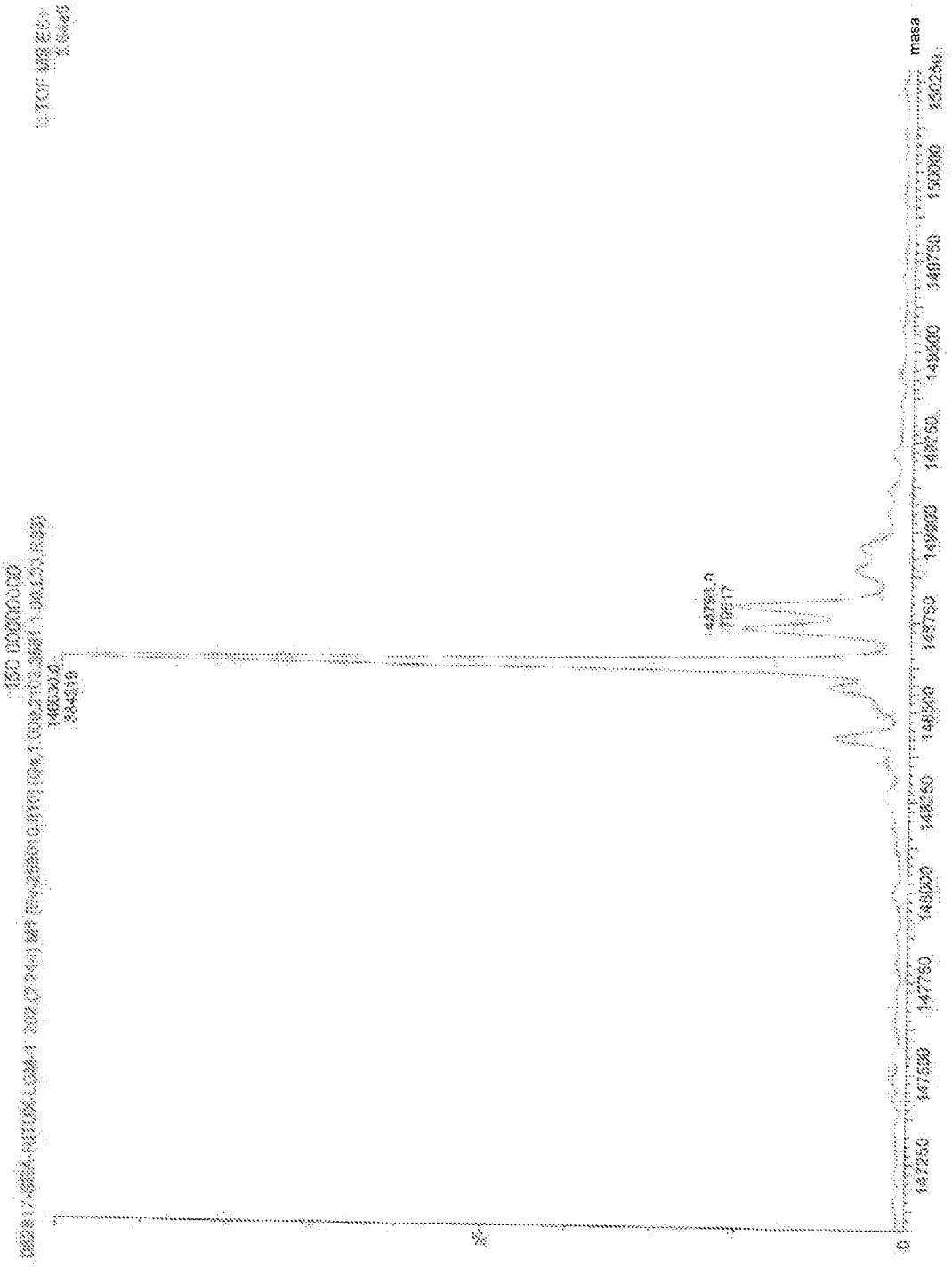

masa
%
0
187250
187500
187750
188000
188250
188500
188750
189000
189250
189500
189750
190000
190250
190500
190750
191000
191250
191500
191750
192000
192250
192500
192750
193000
193250
193500
193750
194000
194250
194500
194750
195000
195250
195500
195750
196000
196250
196500
196750
197000
197250
197500
197750
198000
198250
198500
198750
199000
199250
199500
199750
200000

Fig. 127B

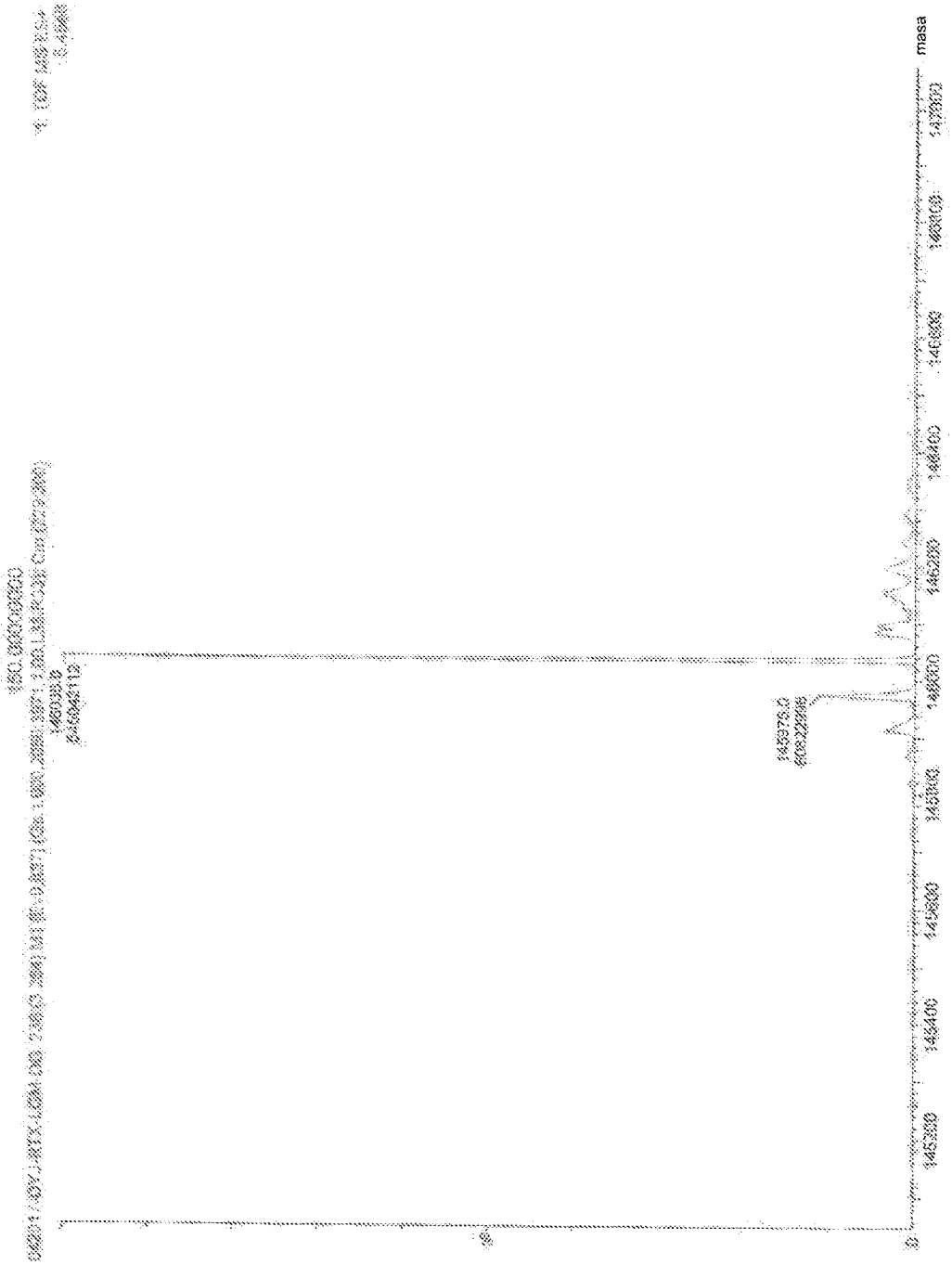


Fig. 127C

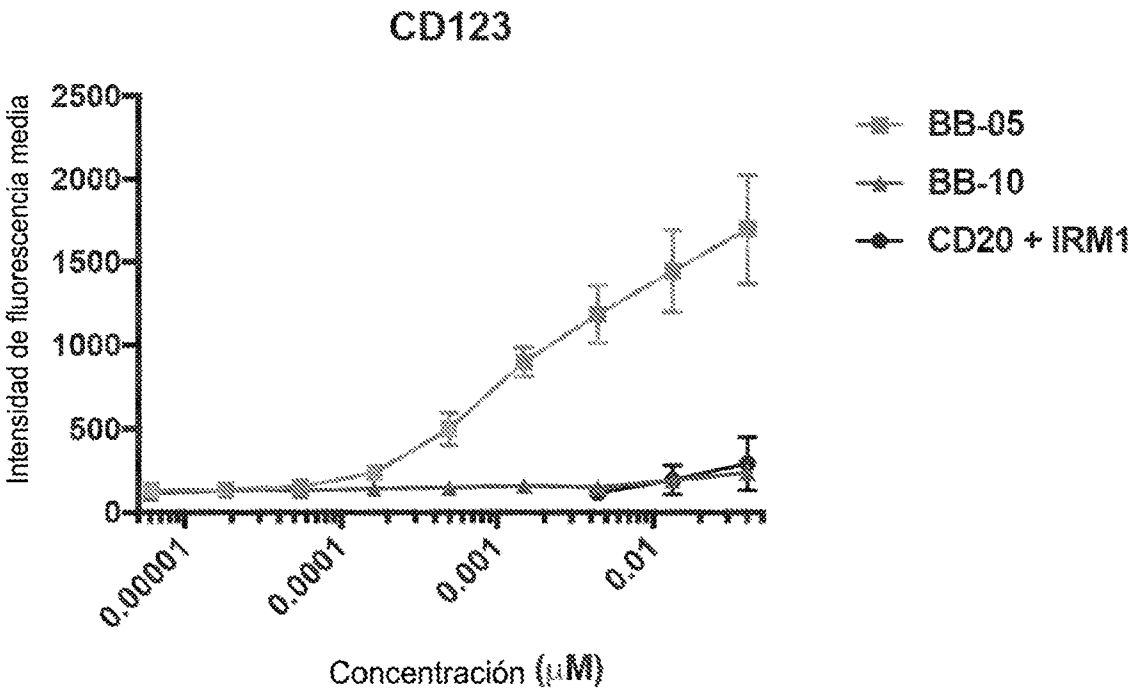


Fig. 127D

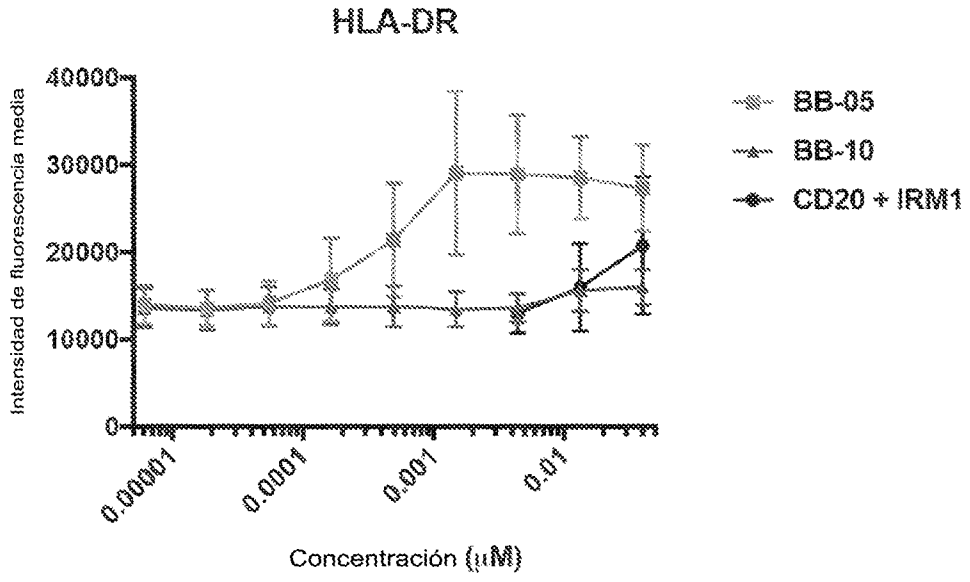


Fig. 127E

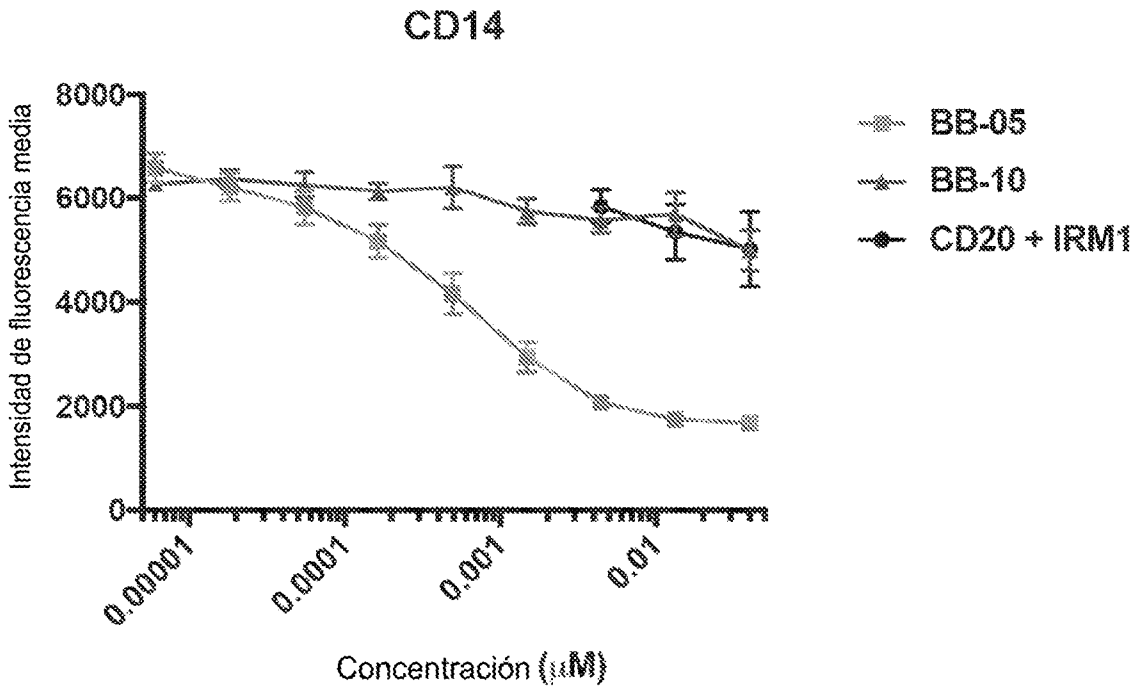


Fig. 127F

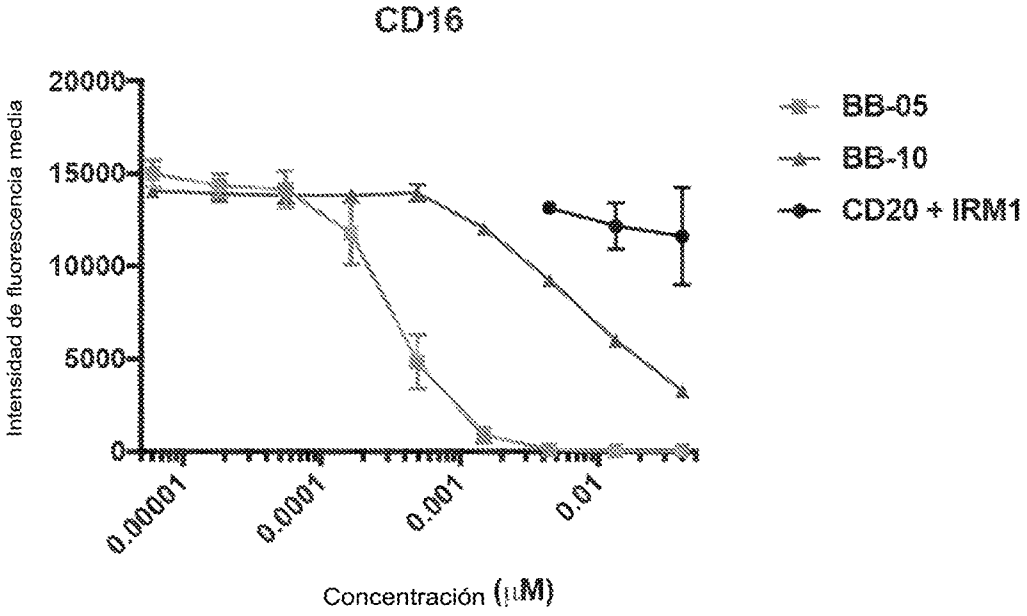


Fig. 127G

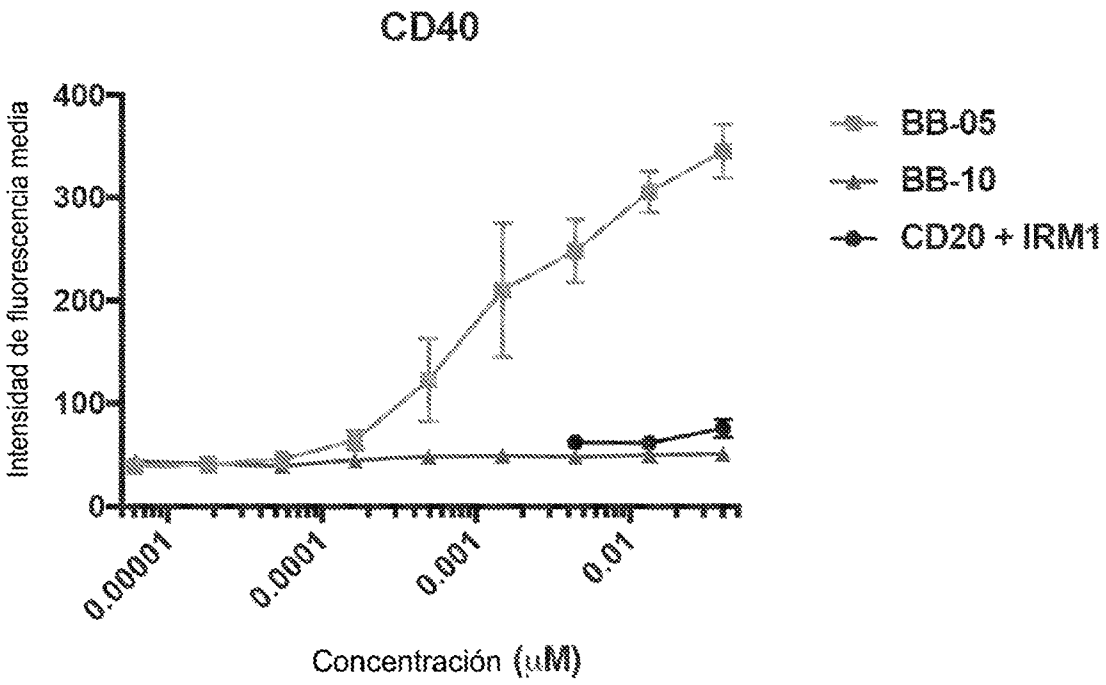


Fig. 127H

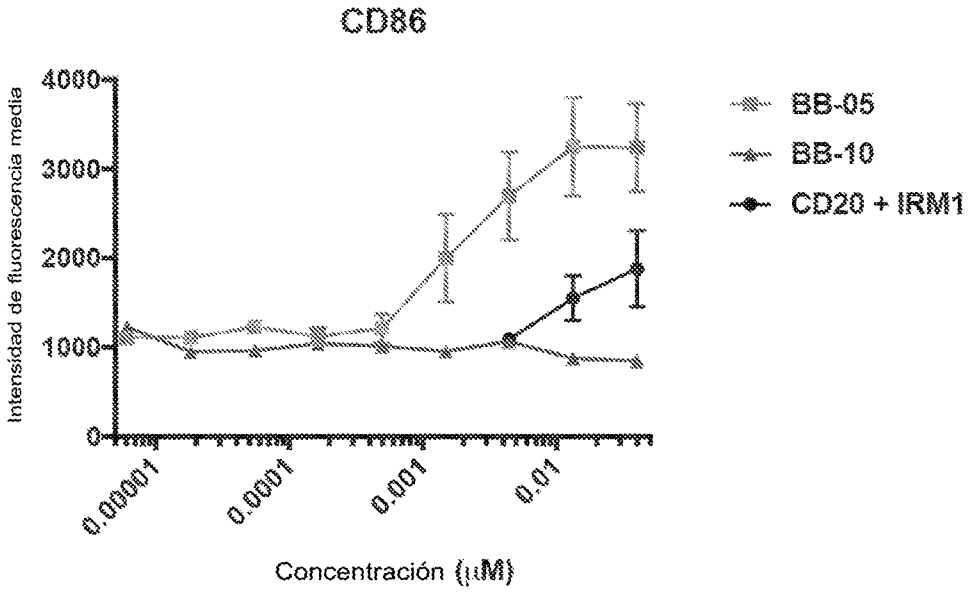


Fig. 127I

624

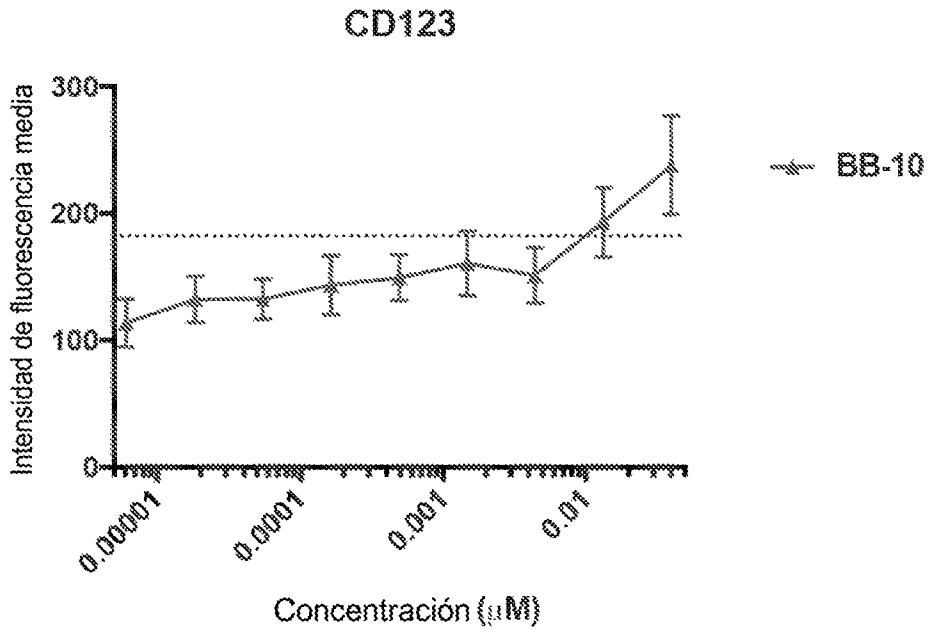


Fig. 127J

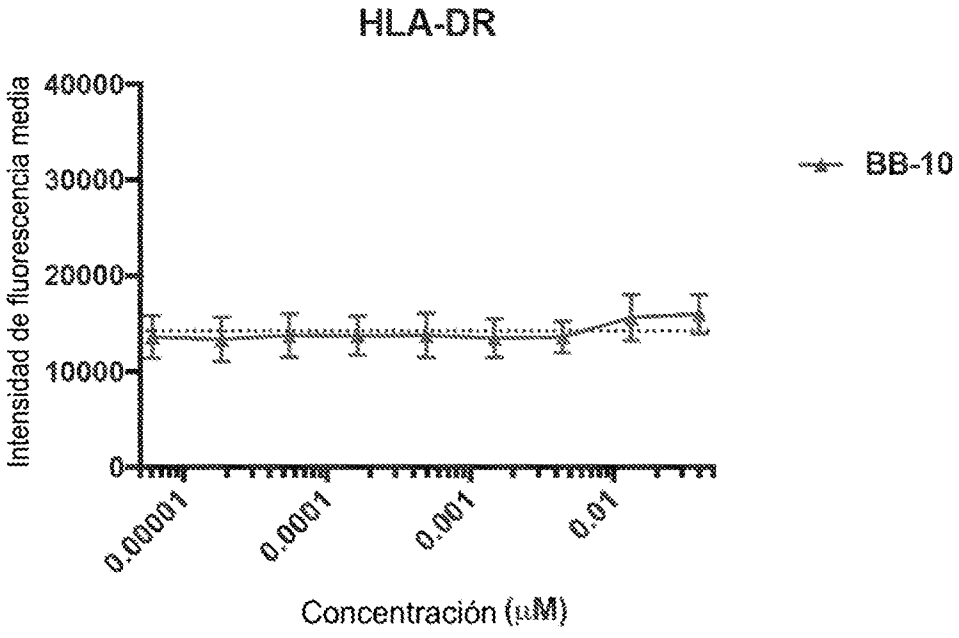


Fig. 127K

625

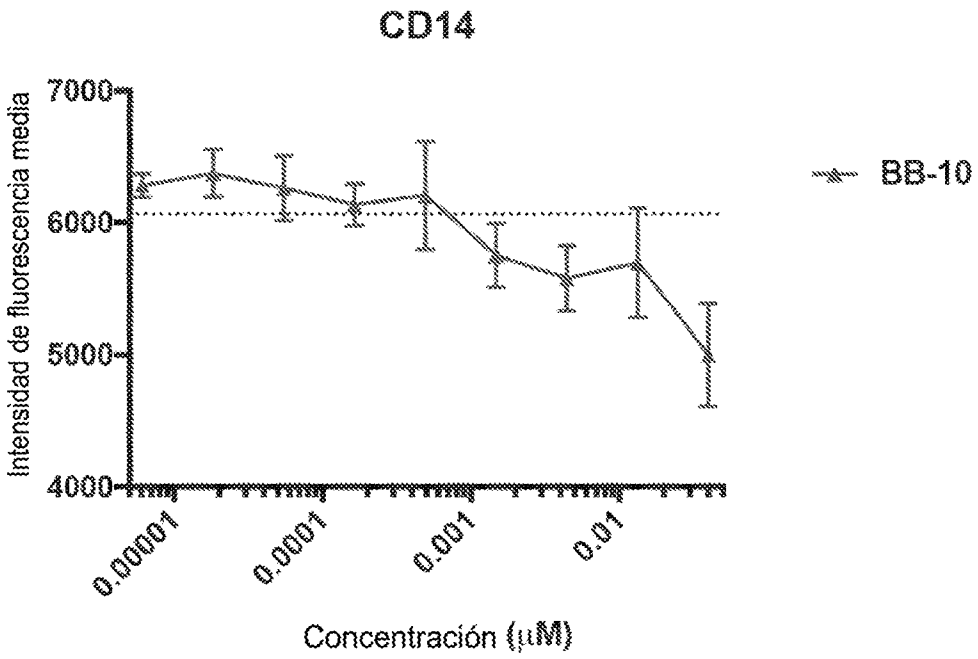


Fig. 127L

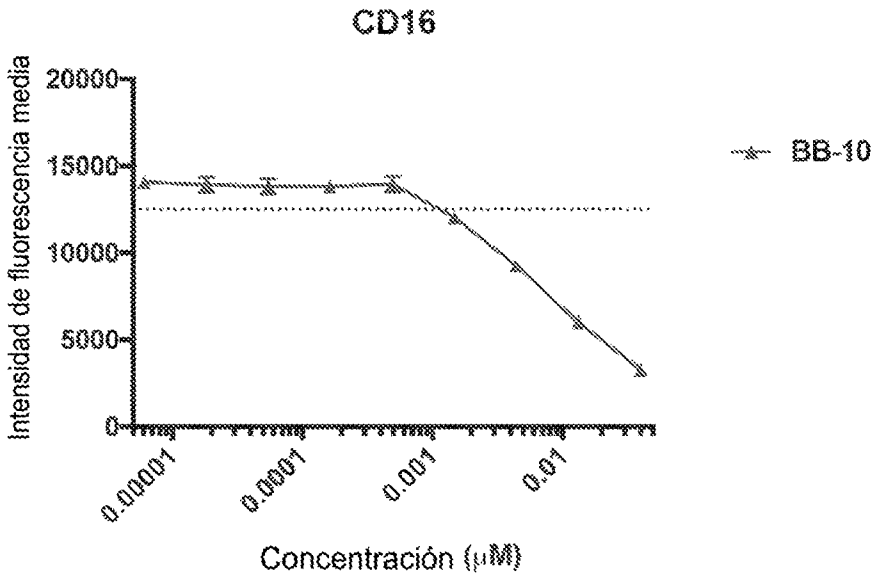


Fig. 127M

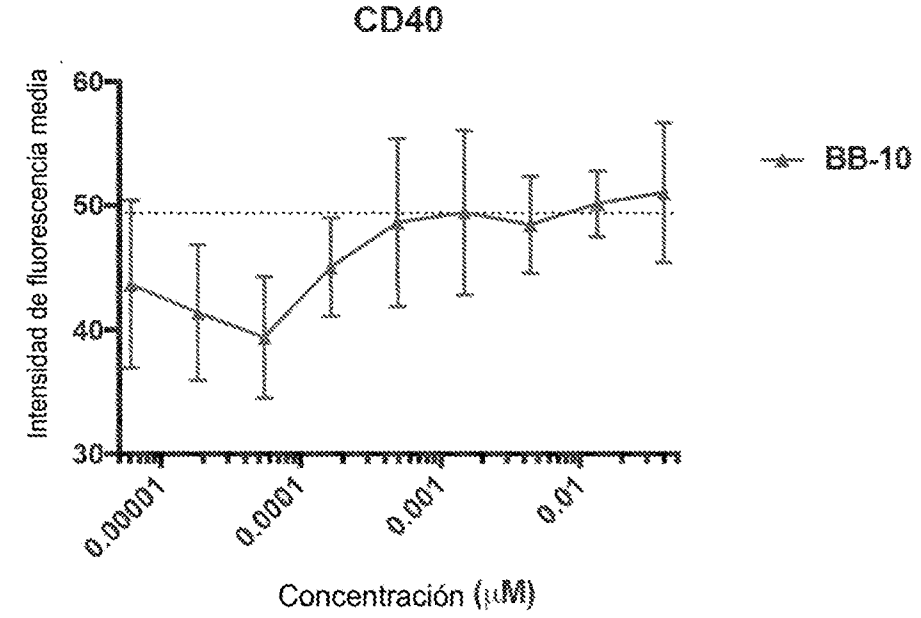


Fig. 127N

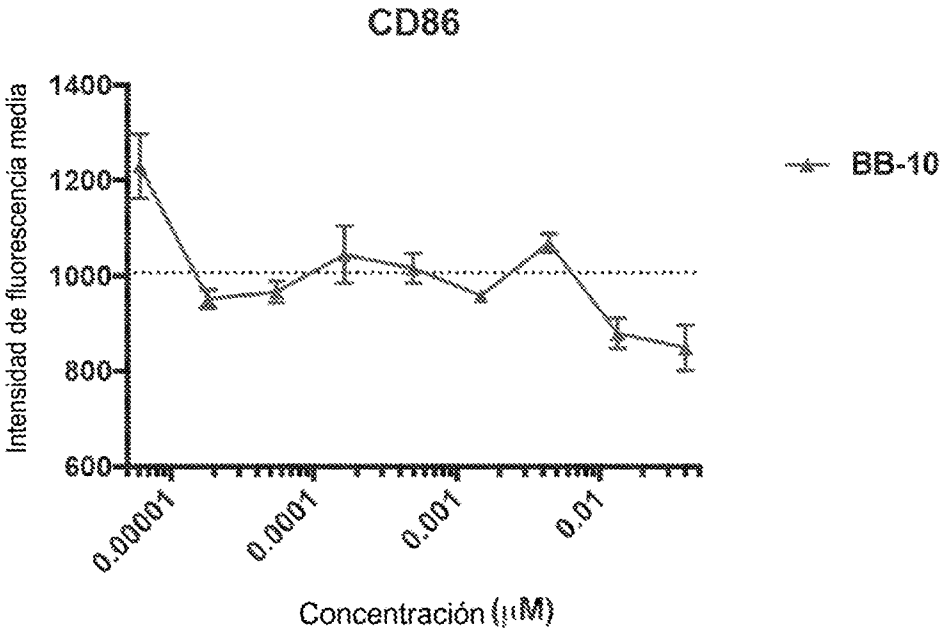


Fig. 127O

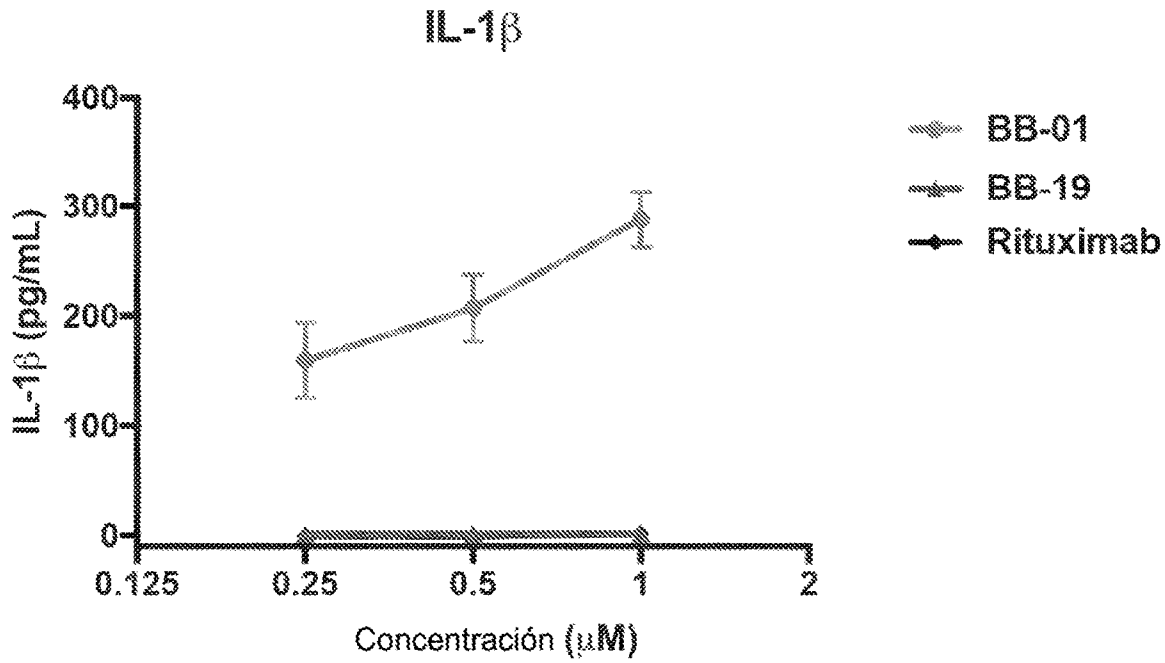


Fig. 128A

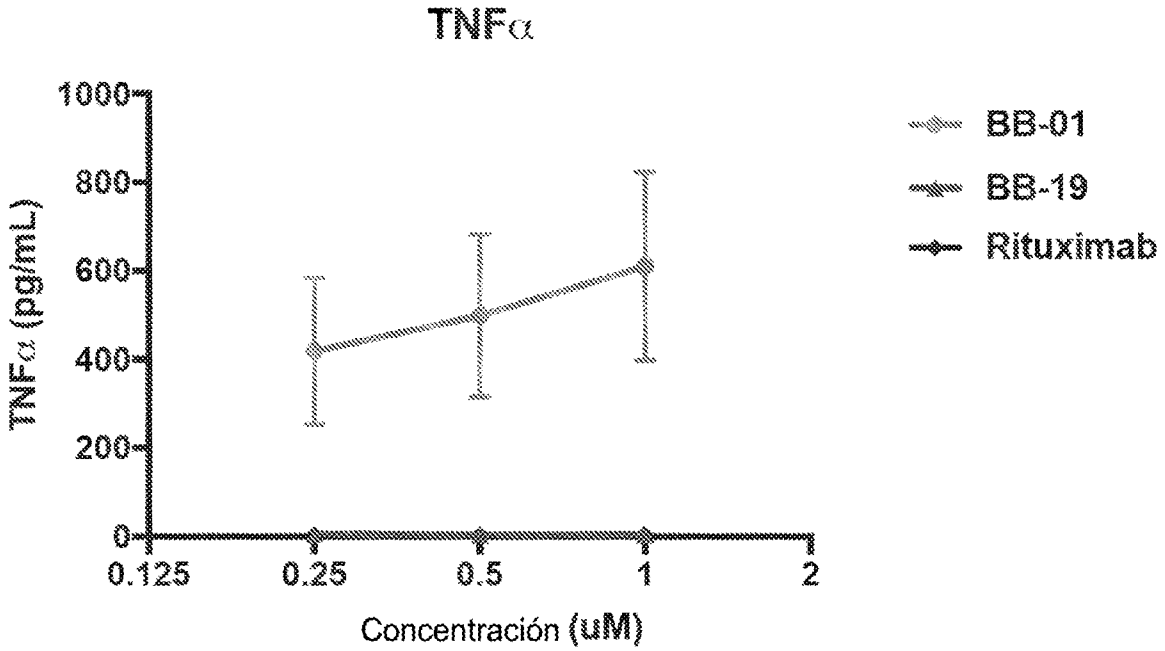


Fig. 128B

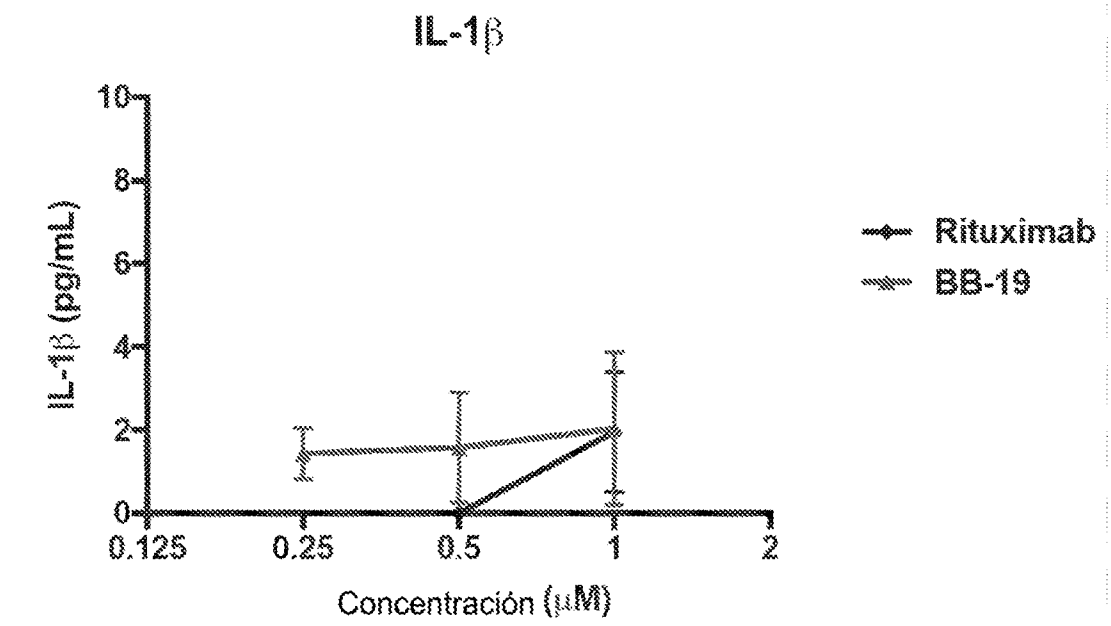


Fig. 128C

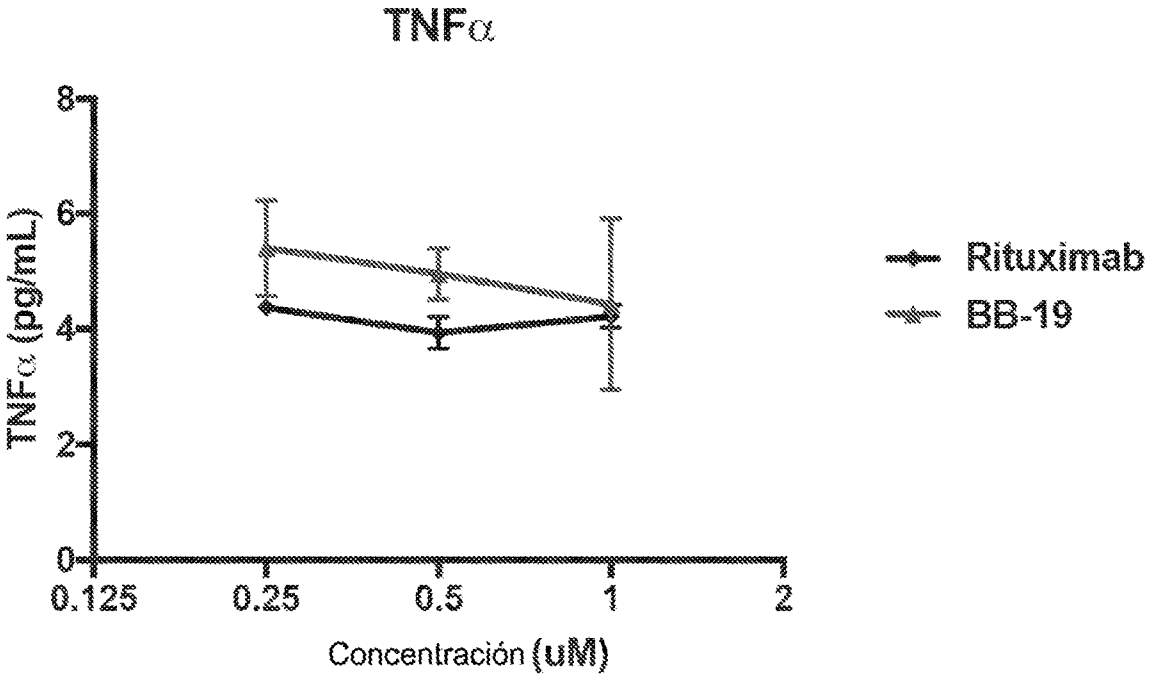


Fig. 128D

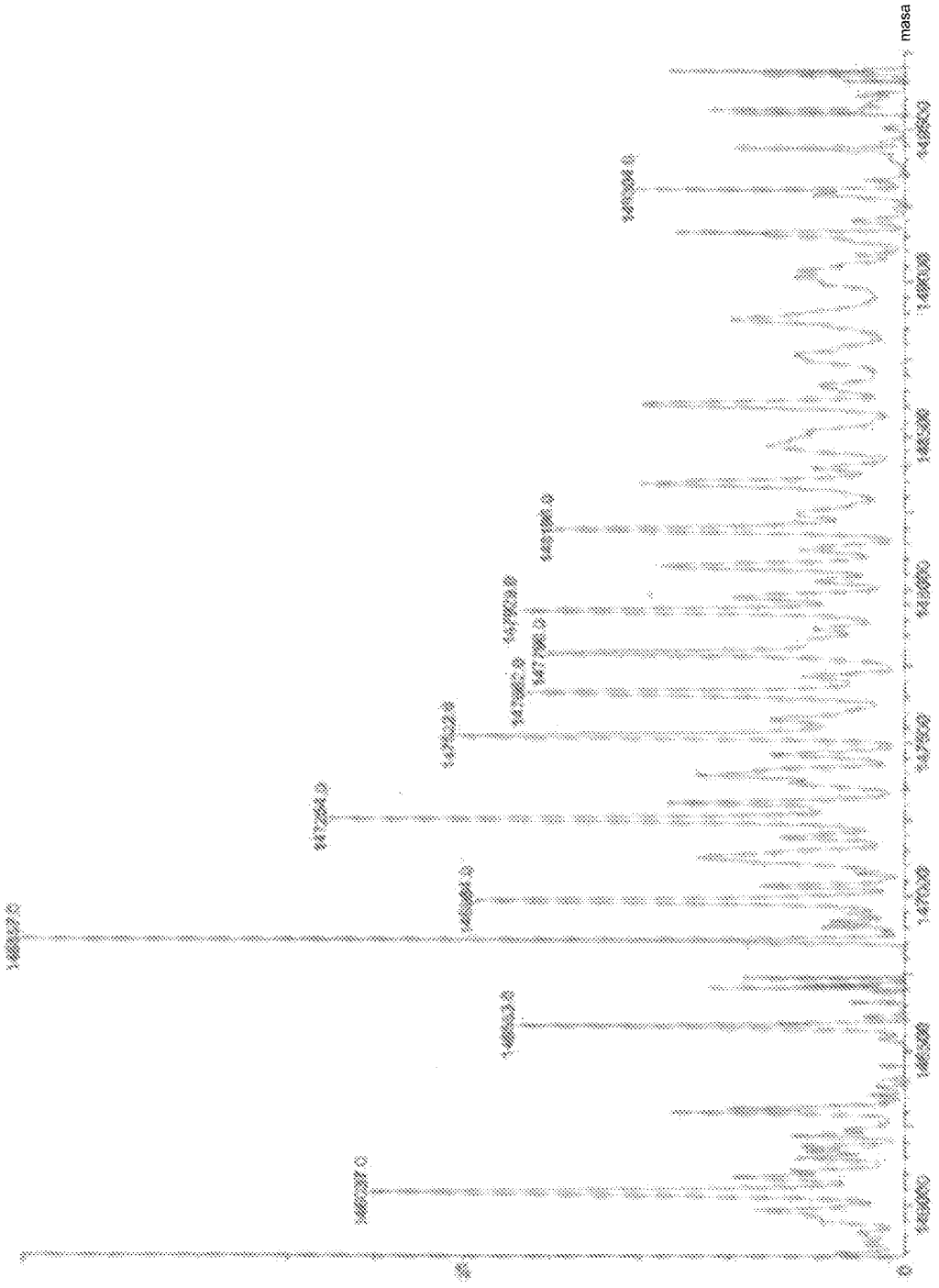


Fig. 128E

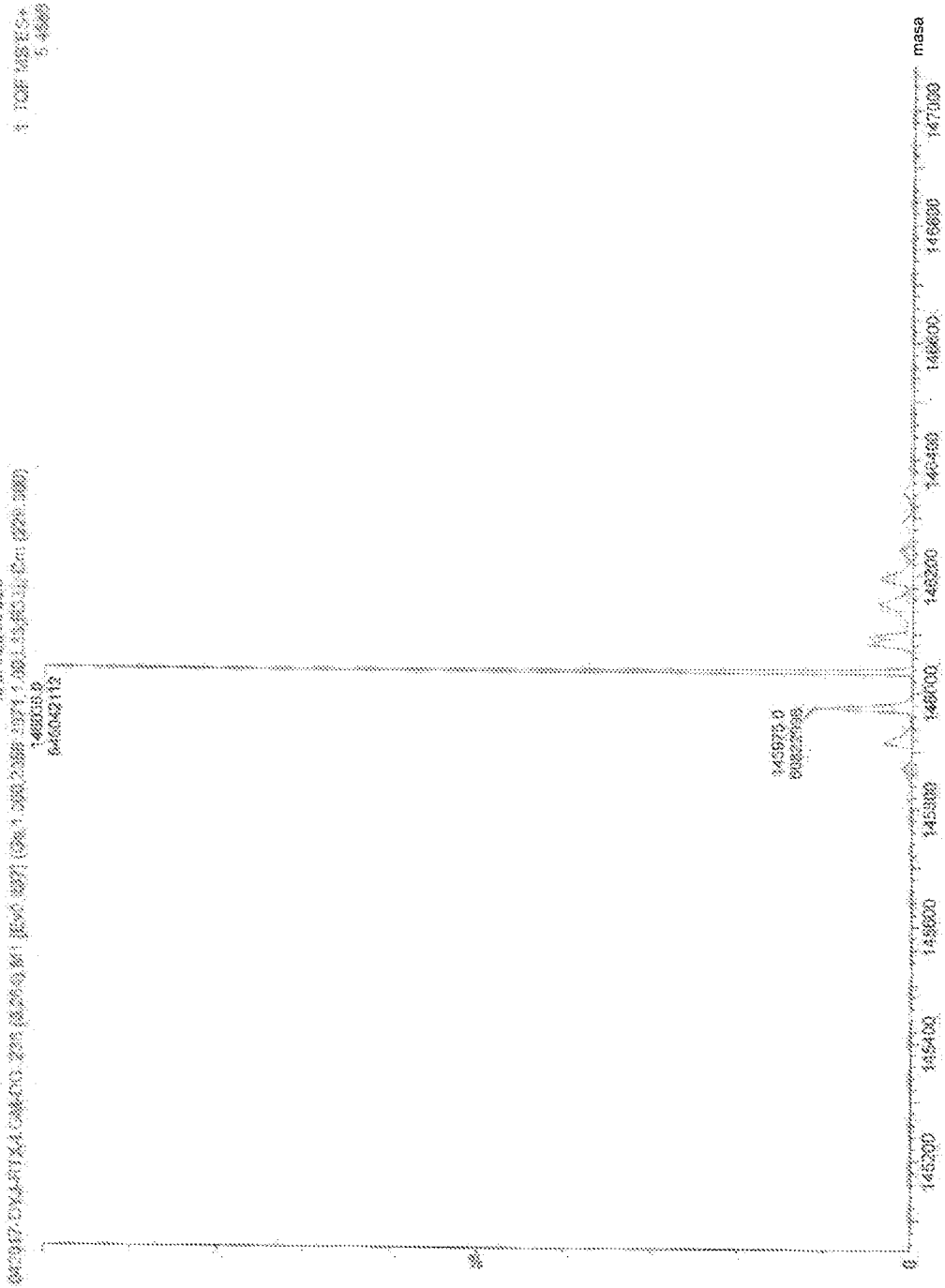


Fig. 128F

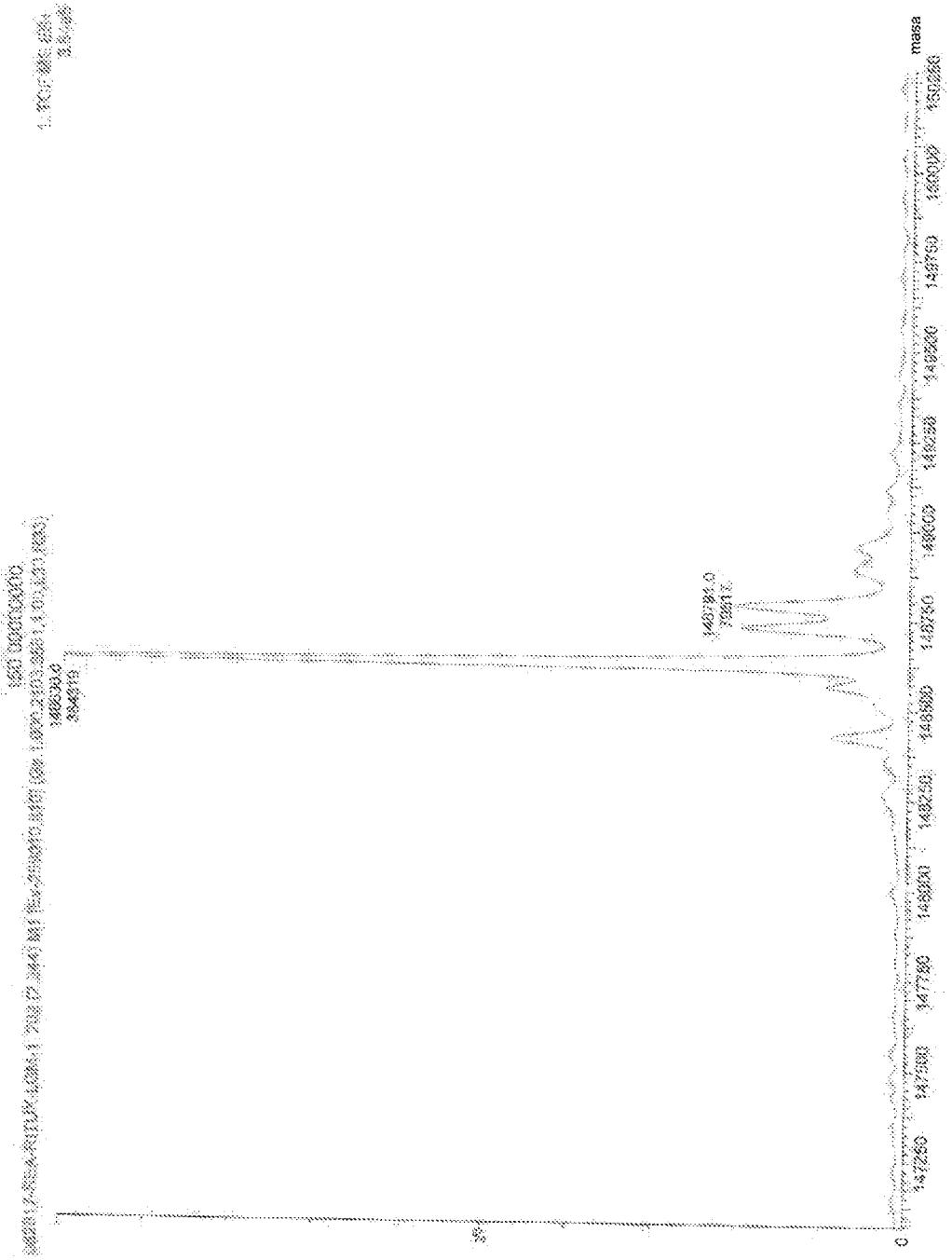

1460784.0
75617
1460330.0
33470
%
0
147250
147500
147750
148000
148250
148500
148750
149000
149250
149500
149750
150000
150250
mass

Fig. 128G

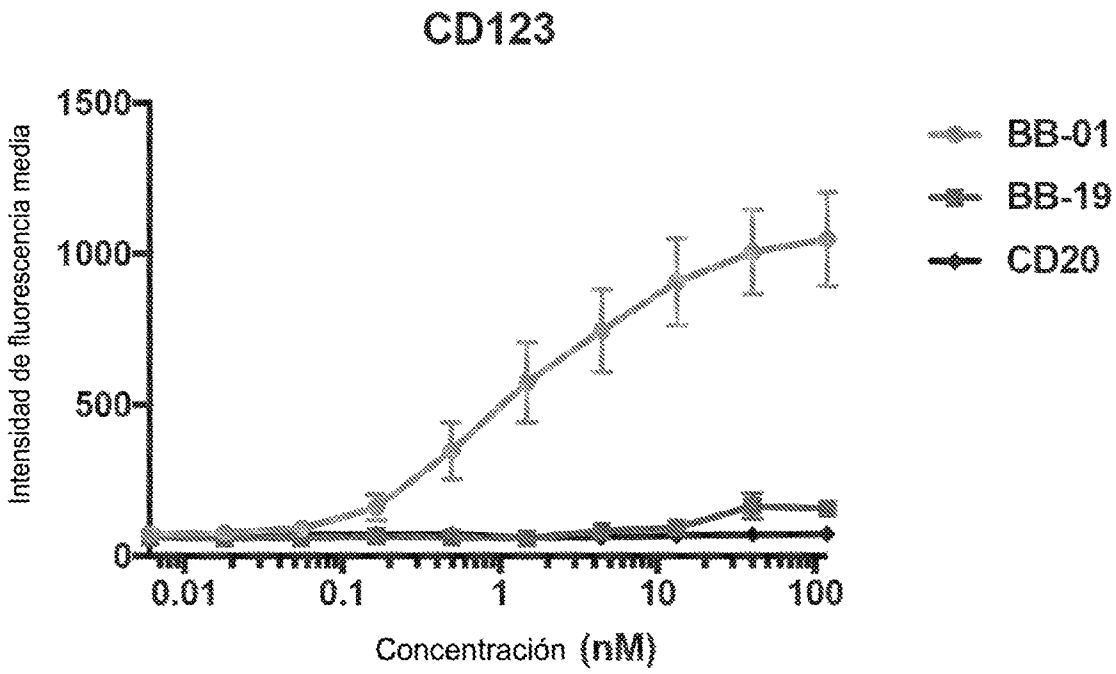


Fig. 128H

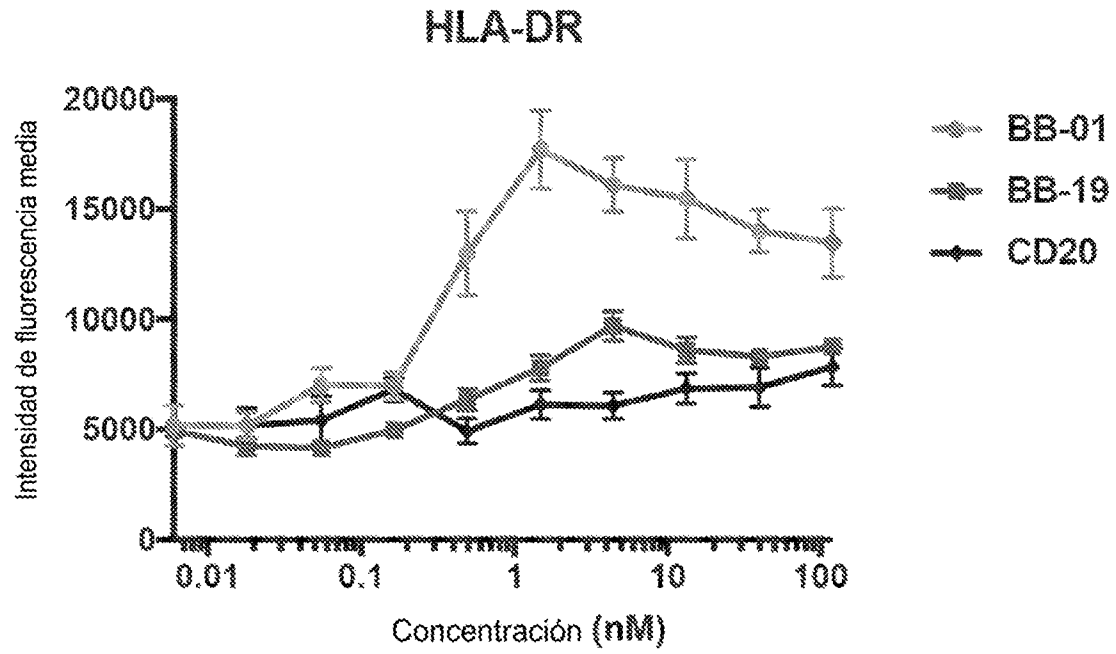


Fig. 128I

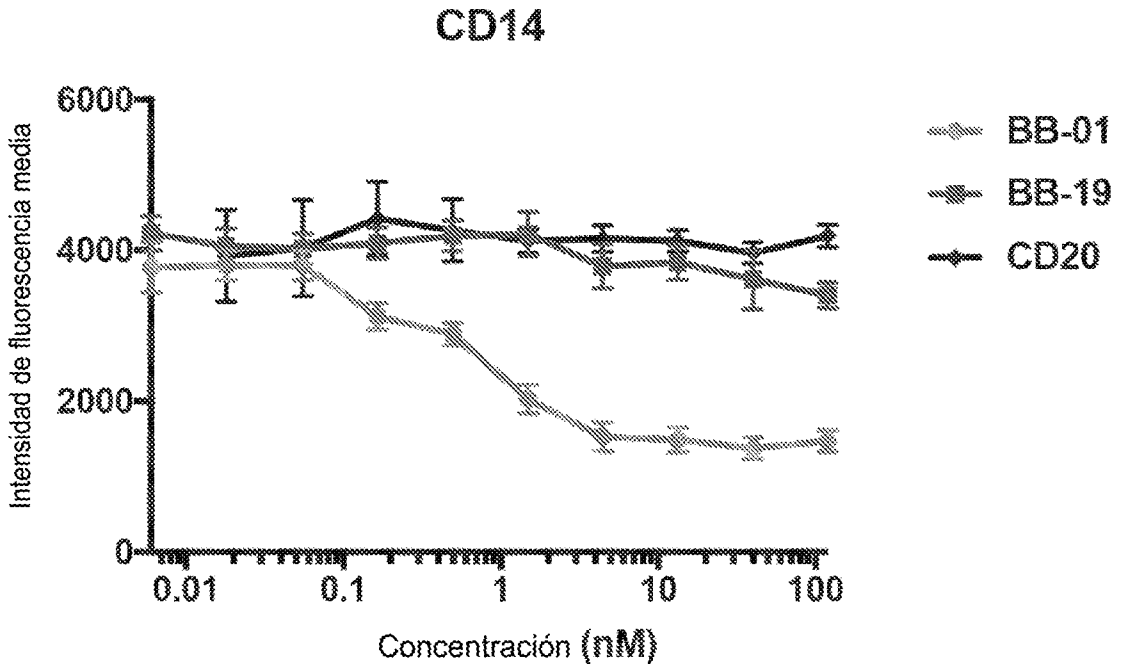


Fig. 128J

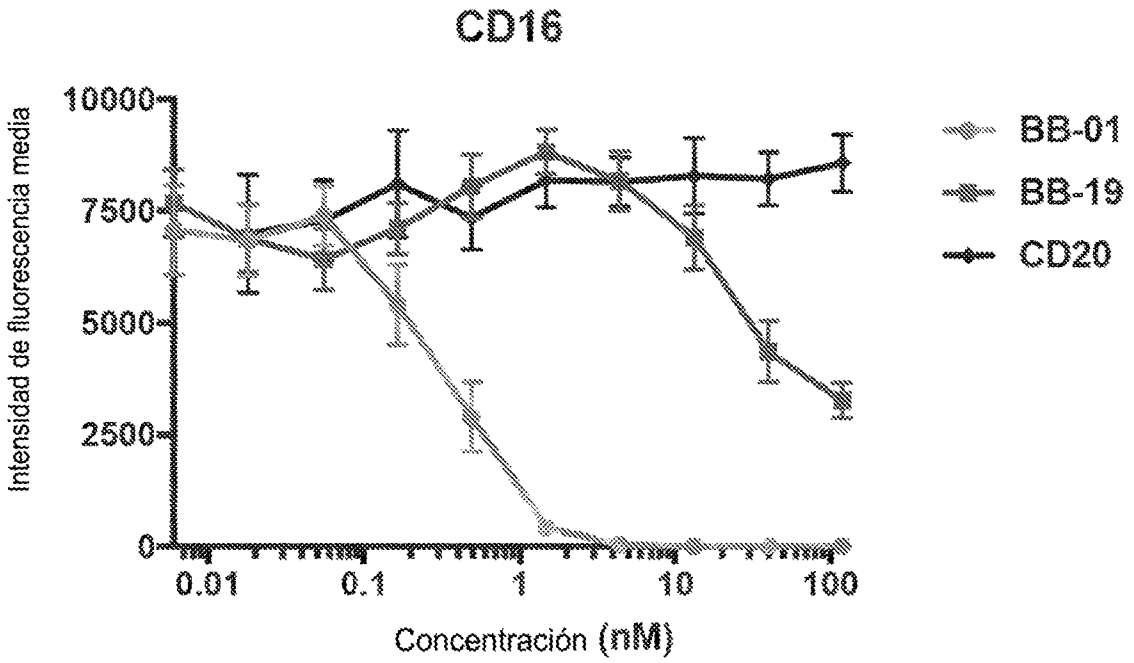


Fig. 128K

634

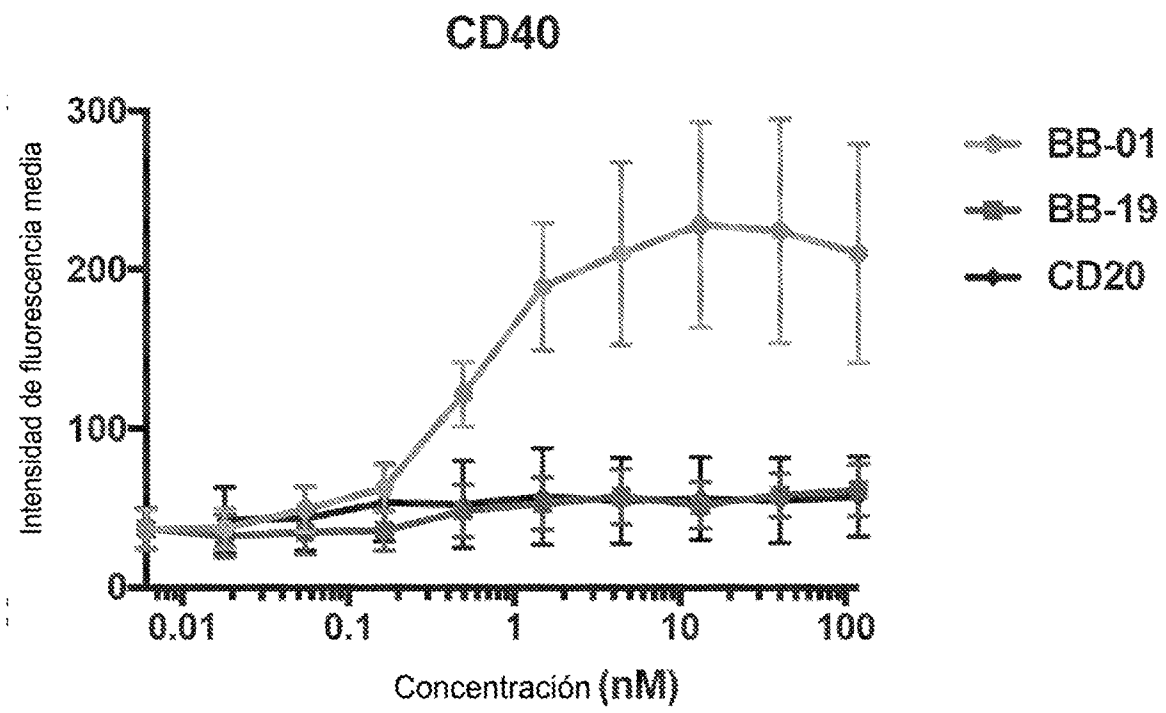


Fig. 128L

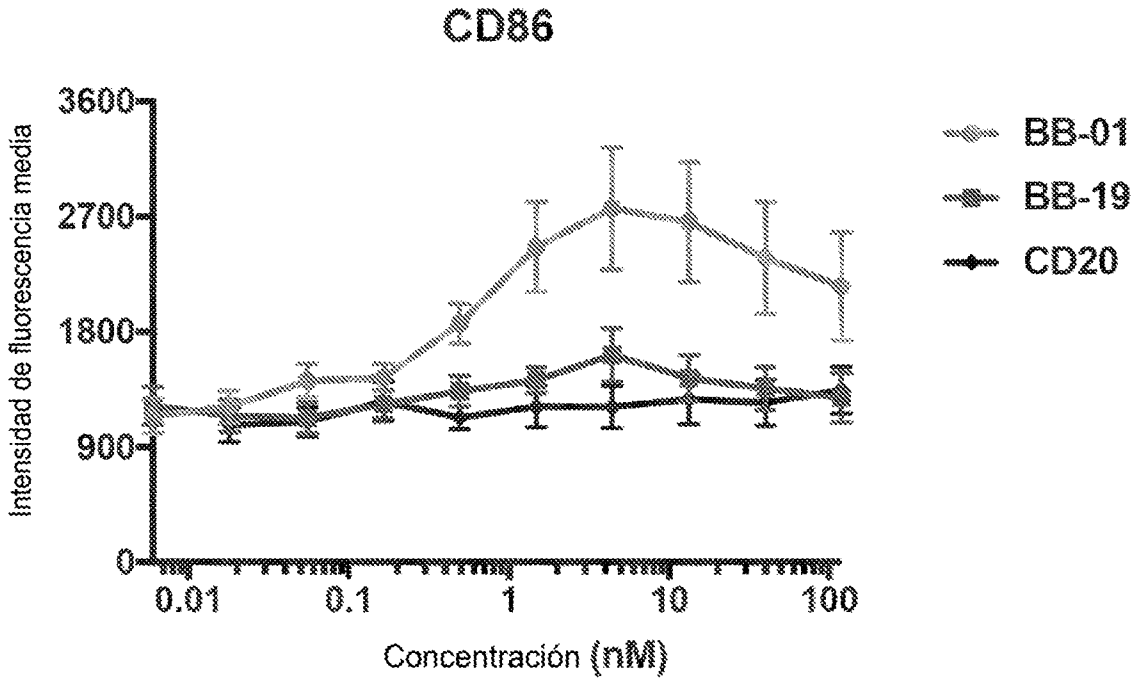


Fig. 128M

635

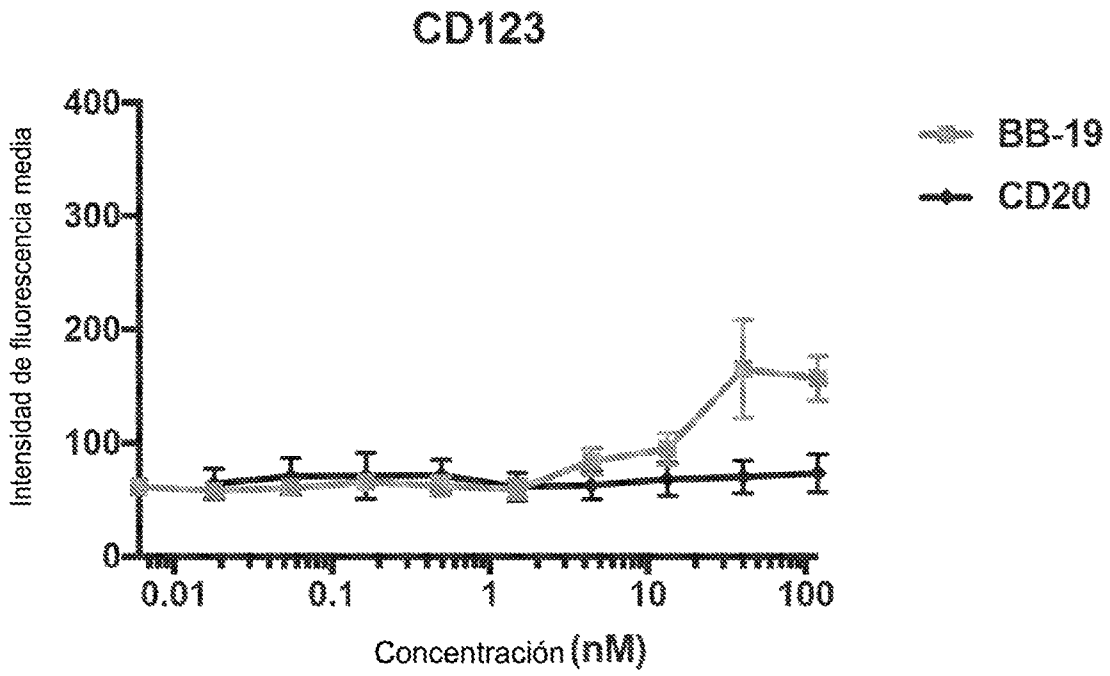


Fig. 128N

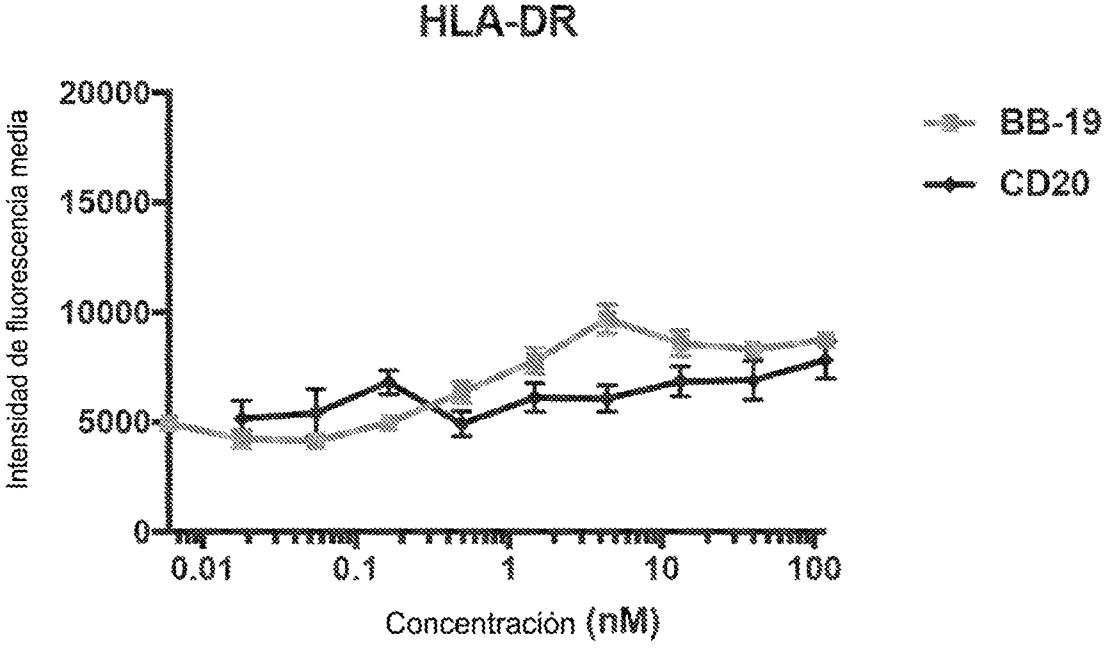


Fig. 128O

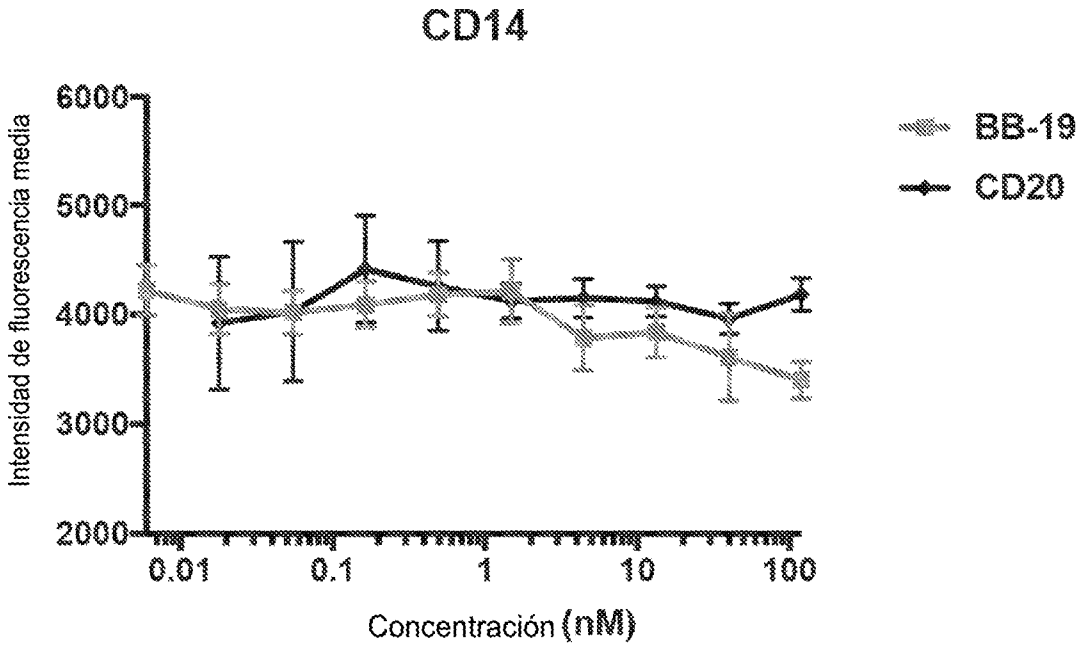


Fig. 128P

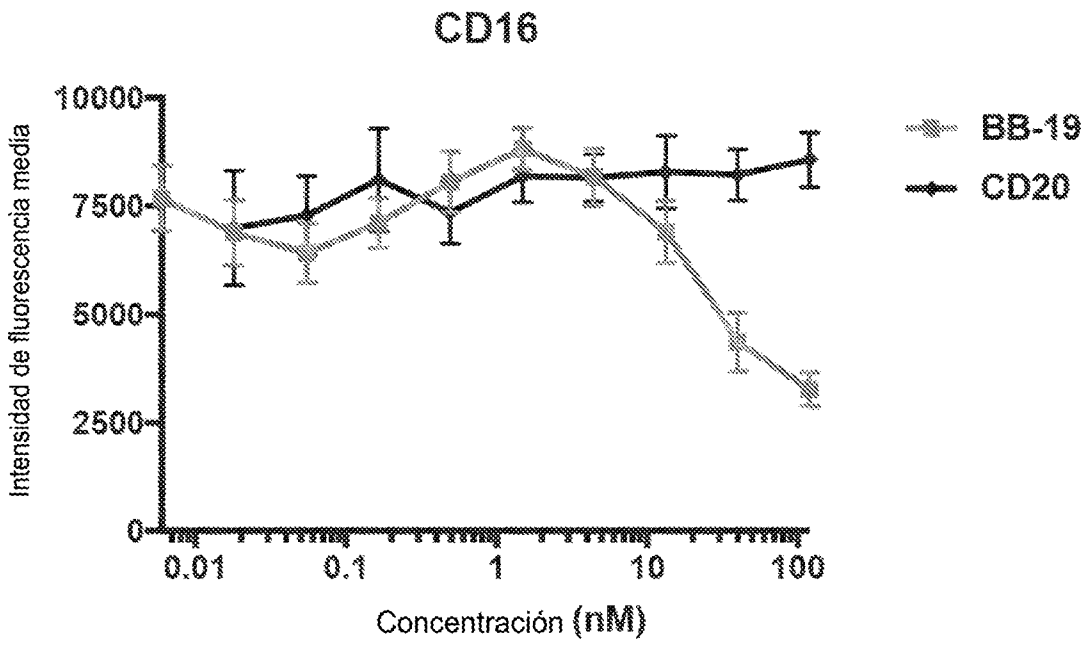


Fig. 128Q

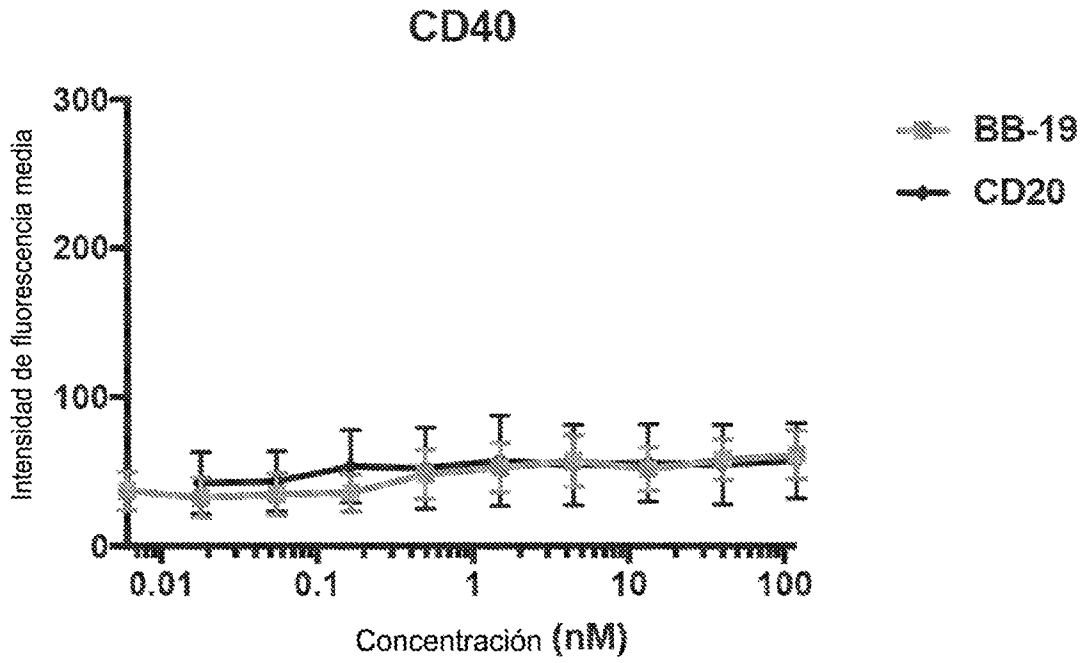


Fig. 128R

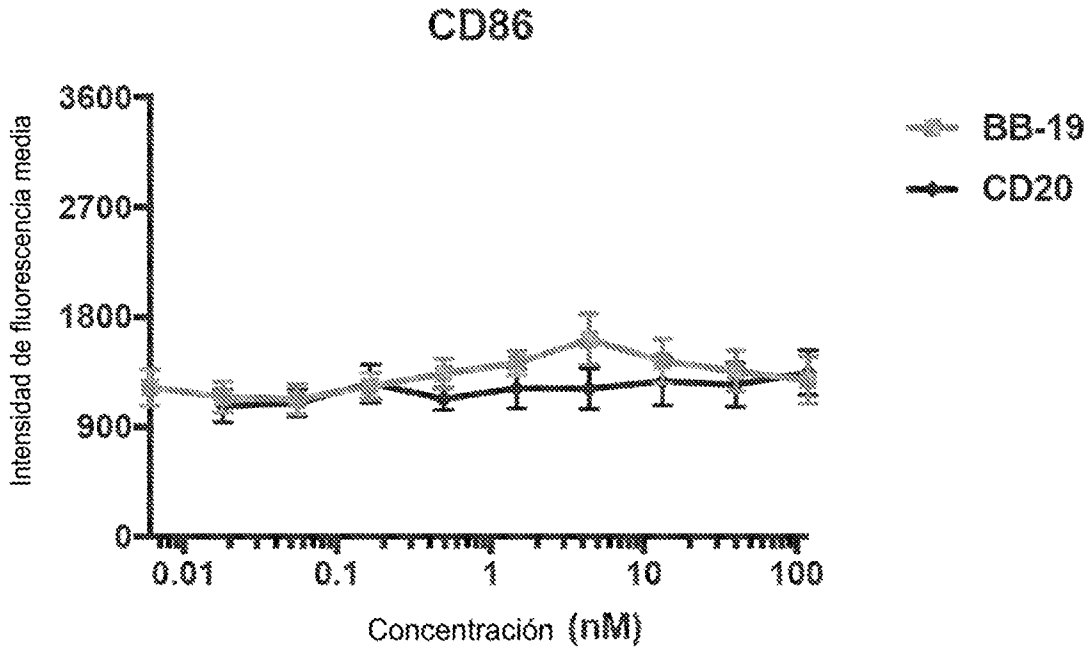


Fig. 128S

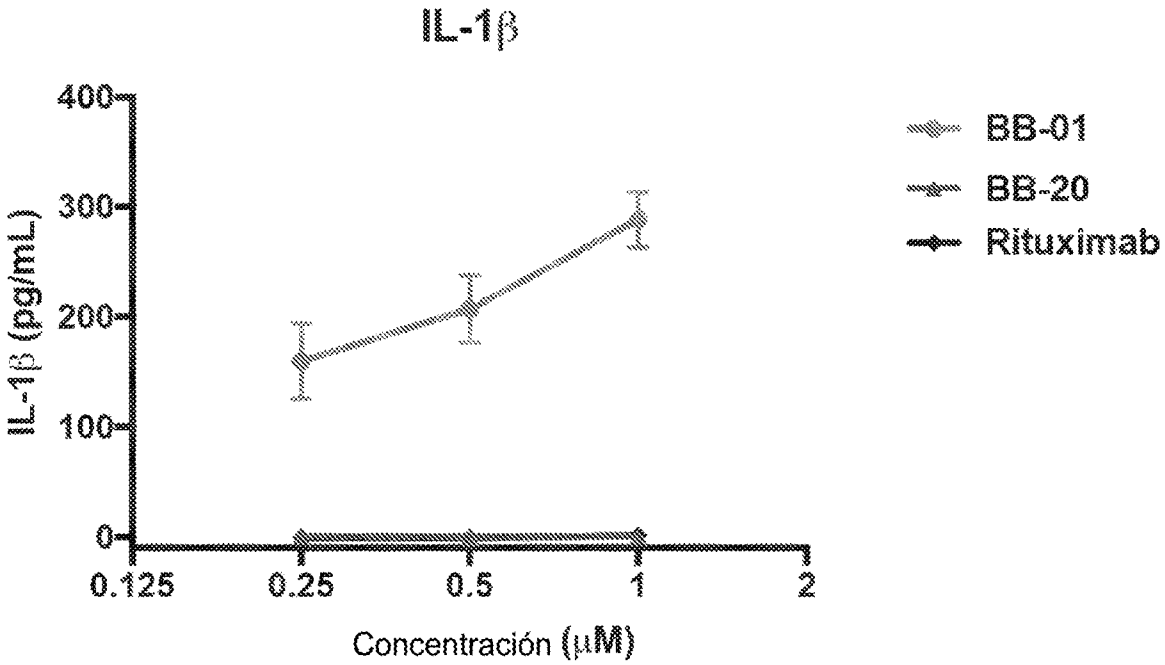


Fig. 129A

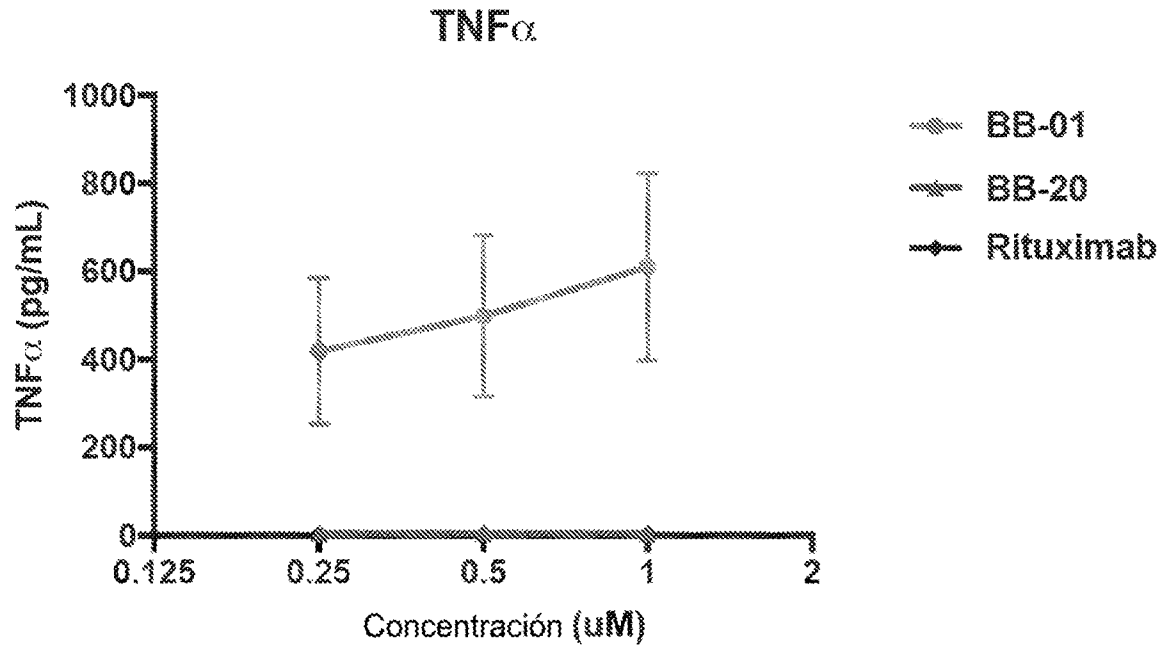


Fig. 129B

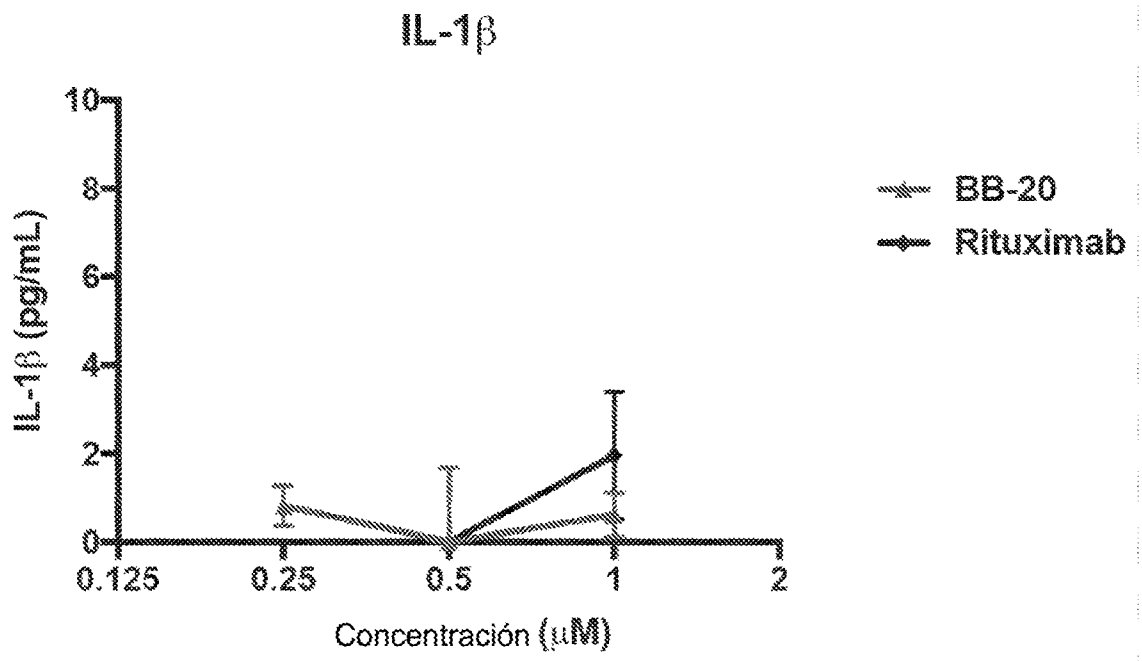


Fig. 129C

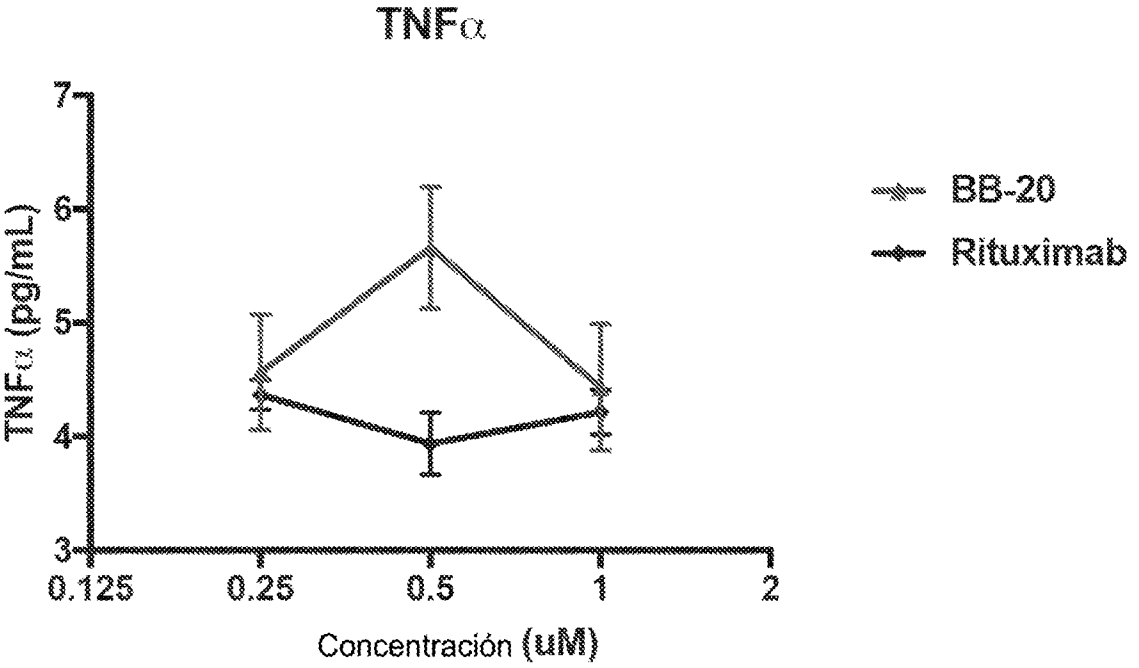


Fig. 129D

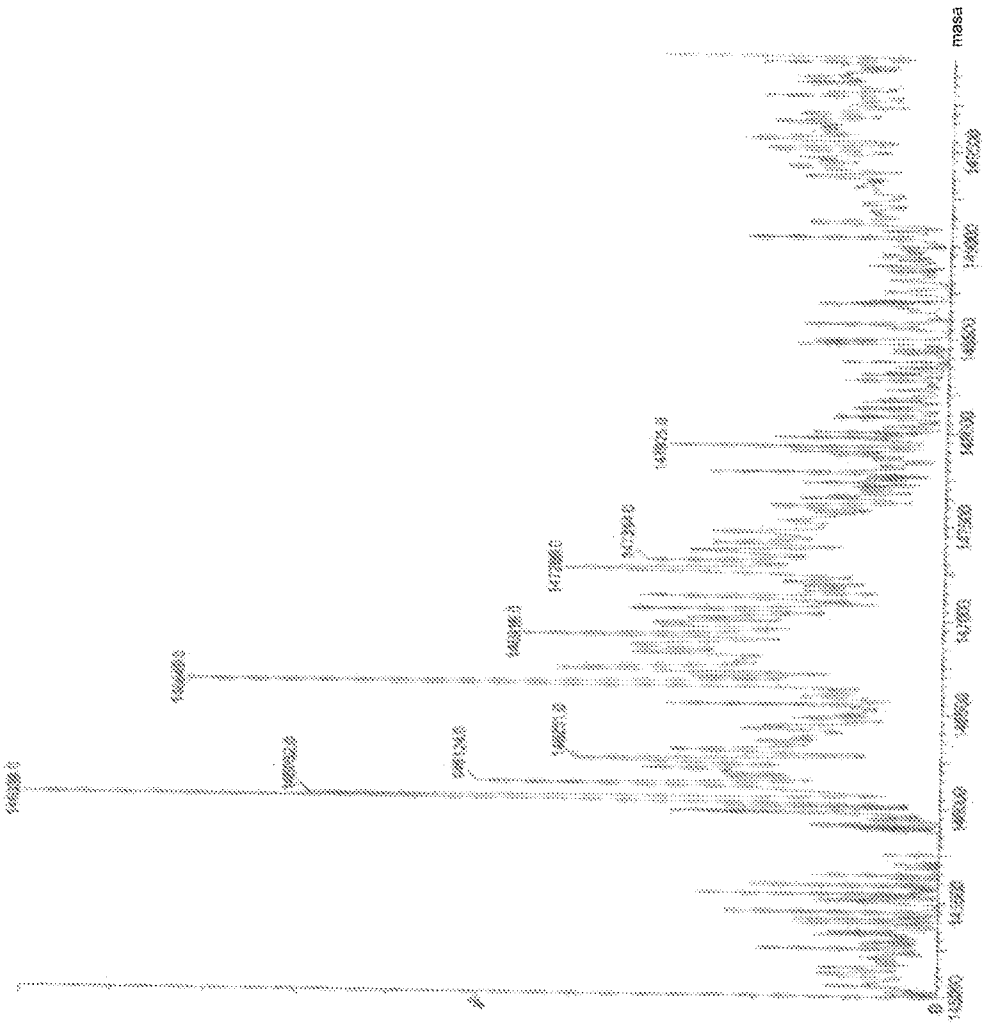


Fig. 129E

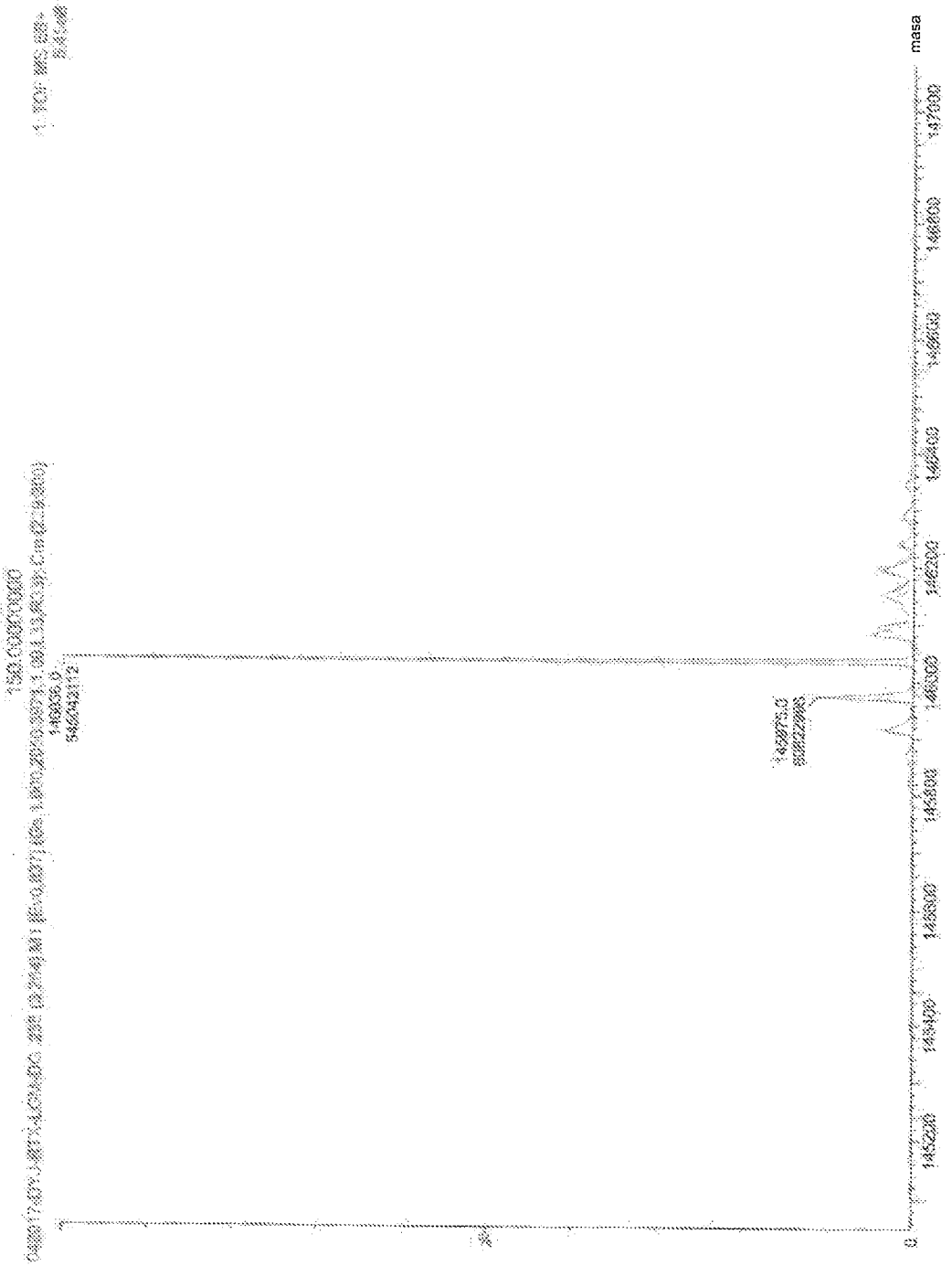


Fig. 129F

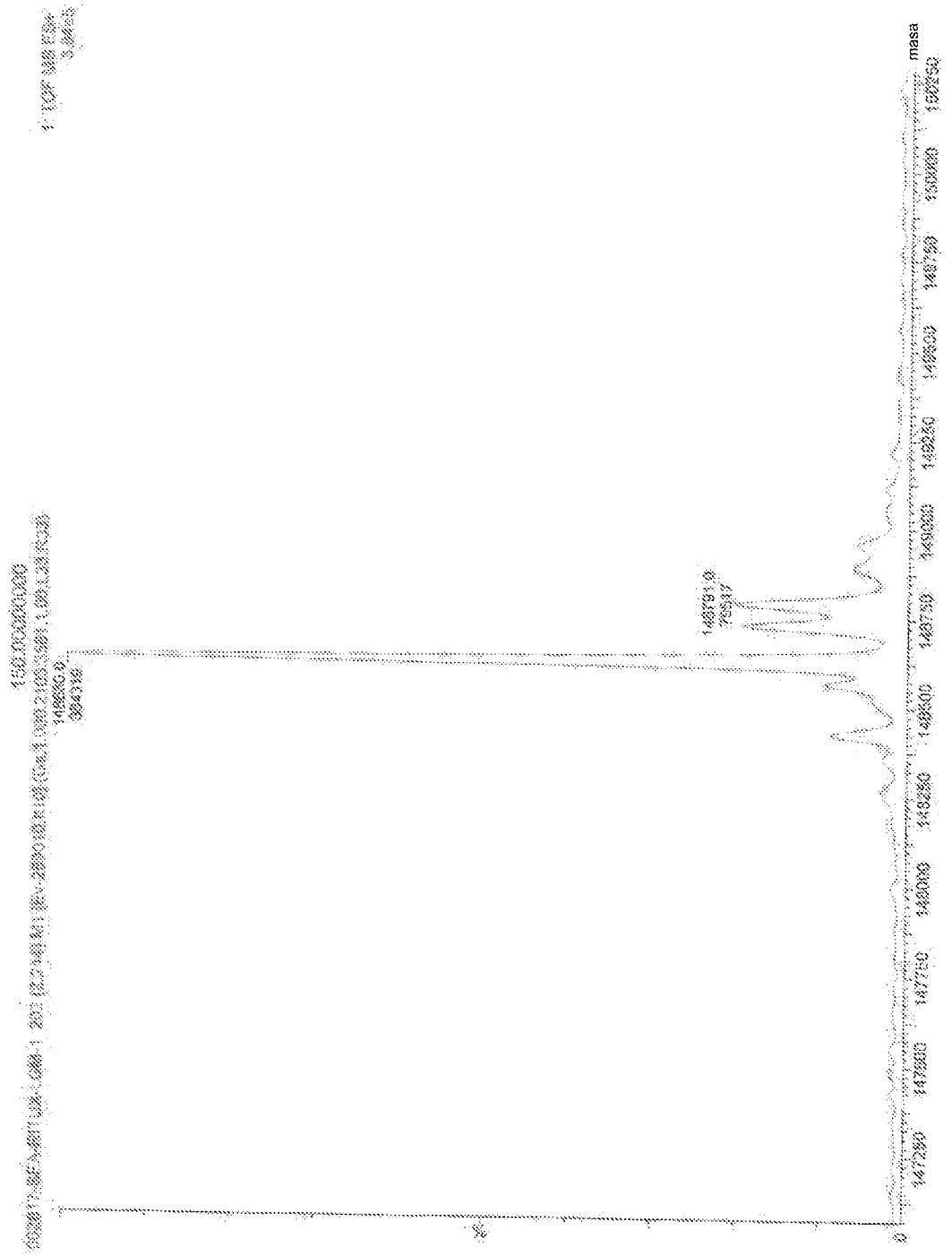

masa
1500000
1497500
1495000
1492500
1490000
1487500
1485000
1482500
1480000
1477500
1475000
1472500
1470000
1467500
1465000
1462500
1460000
1457500
1455000
1452500
1450000
1447500
1445000
1442500
1440000
1437500
1435000
1432500
1430000
1427500
1425000
1422500
1420000
1417500
1415000
1412500
1410000
1407500
1405000
1402500
1400000
1397500
1395000
1392500
1390000
1387500
1385000
1382500
1380000
1377500
1375000
1372500
1370000
1367500
1365000
1362500
1360000
1357500
1355000
1352500
1350000
1347500
1345000
1342500
1340000
1337500
1335000
1332500
1330000
1327500
1325000
1322500
1320000
1317500
1315000
1312500
1310000
1307500
1305000
1302500
1300000
1297500
1295000
1292500
1290000
1287500
1285000
1282500
1280000
1277500
1275000
1272500
1270000
1267500
1265000
1262500
1260000
1257500
1255000
1252500
1250000
1247500
1245000
1242500
1240000
1237500
1235000
1232500
1230000
1227500
1225000
1222500
1220000
1217500
1215000
1212500
1210000
1207500
1205000
1202500
1200000
1197500
1195000
1192500
1190000
1187500
1185000
1182500
1180000
1177500
1175000
1172500
1170000
1167500
1165000
1162500
1160000
1157500
1155000
1152500
1150000
1147500
1145000
1142500
1140000
1137500
1135000
1132500
1130000
1127500
1125000
1122500
1120000
1117500
1115000
1112500
1110000
1107500
1105000
1102500
1100000
1097500
1095000
1092500
1090000
1087500
1085000
1082500
1080000
1077500
1075000
1072500
1070000
1067500
1065000
1062500
1060000
1057500
1055000
1052500
1050000
1047500
1045000
1042500
1040000
1037500
1035000
1032500
1030000
1027500
1025000
1022500
1020000
1017500
1015000
1012500
1010000
1007500
1005000
1002500
1000000
997500
995000
992500
990000
987500
985000
982500
980000
977500
975000
972500
970000
967500
965000
962500
960000
957500
955000
952500
950000
947500
945000
942500
940000
937500
935000
932500
930000
927500
925000
922500
920000
917500
915000
912500
910000
907500
905000
902500
900000
897500
895000
892500
890000
887500
885000
882500
880000
877500
875000
872500
870000
867500
865000
862500
860000
857500
855000
852500
850000
847500
845000
842500
840000
837500
835000
832500
830000
827500
825000
822500
820000
817500
815000
812500
810000
807500
805000
802500
800000
797500
795000
792500
790000
787500
785000
782500
780000
777500
775000
772500
770000
767500
765000
762500
760000
757500
755000
752500
750000
747500
745000
742500
740000
737500
735000
732500
730000
727500
725000
722500
720000
717500
715000
712500
710000
707500
705000
702500
700000
697500
695000
692500
690000
687500
685000
682500
680000
677500
675000
672500
670000
667500
665000
662500
660000
657500
655000
652500
650000
647500
645000
642500
640000
637500
635000
632500
630000
627500
625000
622500
620000
617500
615000
612500
610000
607500
605000
602500
600000
597500
595000
592500
590000
587500
585000
582500
580000
577500
575000
572500
570000
567500
565000
562500
560000
557500
555000
552500
550000
547500
545000
542500
540000
537500
535000
532500
530000
527500
525000
522500
520000
517500
515000
512500
510000
507500
505000
502500
500000
497500
495000
492500
490000
487500
485000
482500
480000
477500
475000
472500
470000
467500
465000
462500
460000
457500
455000
452500
450000
447500
445000
442500
440000
437500
435000
432500
430000
427500
425000
422500
420000
417500
415000
412500
410000
407500
405000
402500
400000
397500
395000
392500
390000
387500
385000
382500
380000
377500
375000
372500
370000
367500
365000
362500
360000
357500
355000
352500
350000
347500
345000
342500
340000
337500
335000
332500
330000
327500
325000
322500
320000
317500
315000
312500
310000
307500
305000
302500
300000
297500
295000
292500
290000
287500
285000
282500
280000
277500
275000
272500
270000
267500
265000
262500
260000
257500
255000
252500
250000
247500
245000
242500
240000
237500
235000
232500
230000
227500
225000
222500
220000
217500
215000
212500
210000
207500
205000
202500
200000
197500
195000
192500
190000
187500
185000
182500
180000
177500
175000
172500
170000
167500
165000
162500
160000
157500
155000
152500
150000
147500
145000
142500
140000
137500
135000
132500
130000
127500
125000
122500
120000
117500
115000
112500
110000
107500
105000
102500
100000
97500
95000
92500
90000
87500
85000
82500
80000
77500
75000
72500
70000
67500
65000
62500
60000
57500
55000
52500
50000
47500
45000
42500
40000
37500
35000
32500
30000
27500
25000
22500
20000
17500
15000
12500
10000
7500
5000
2500
0
%
100
1: TOF MS ES+
3.84e3
150.0000000
149791.8
75917
149650.0
99416

Fig. 129G

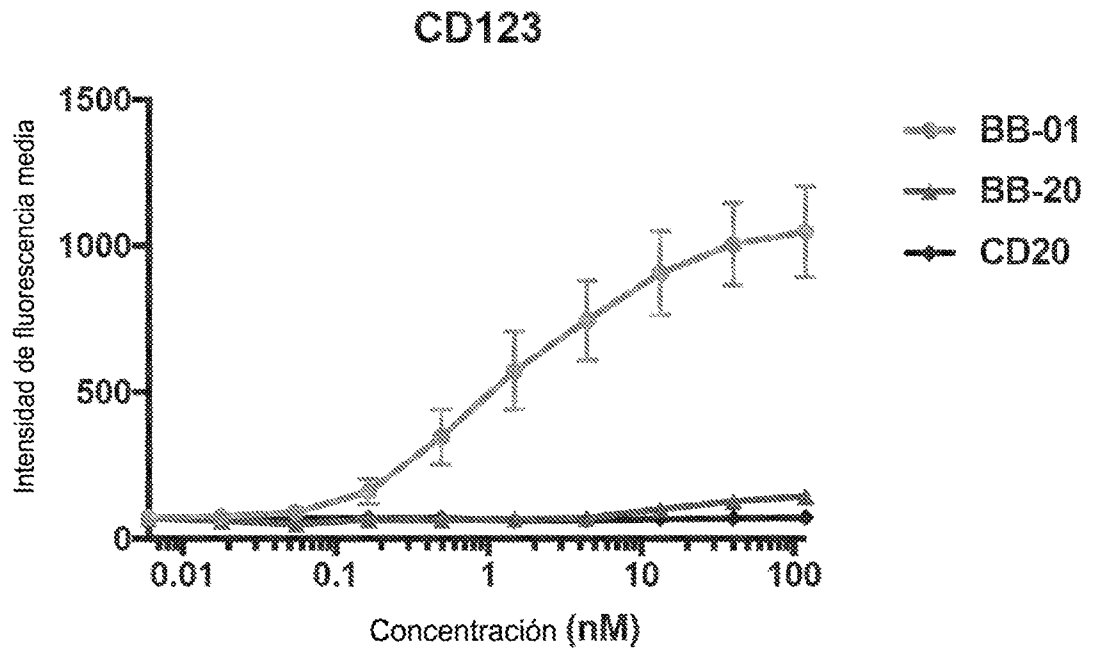


Fig. 129H

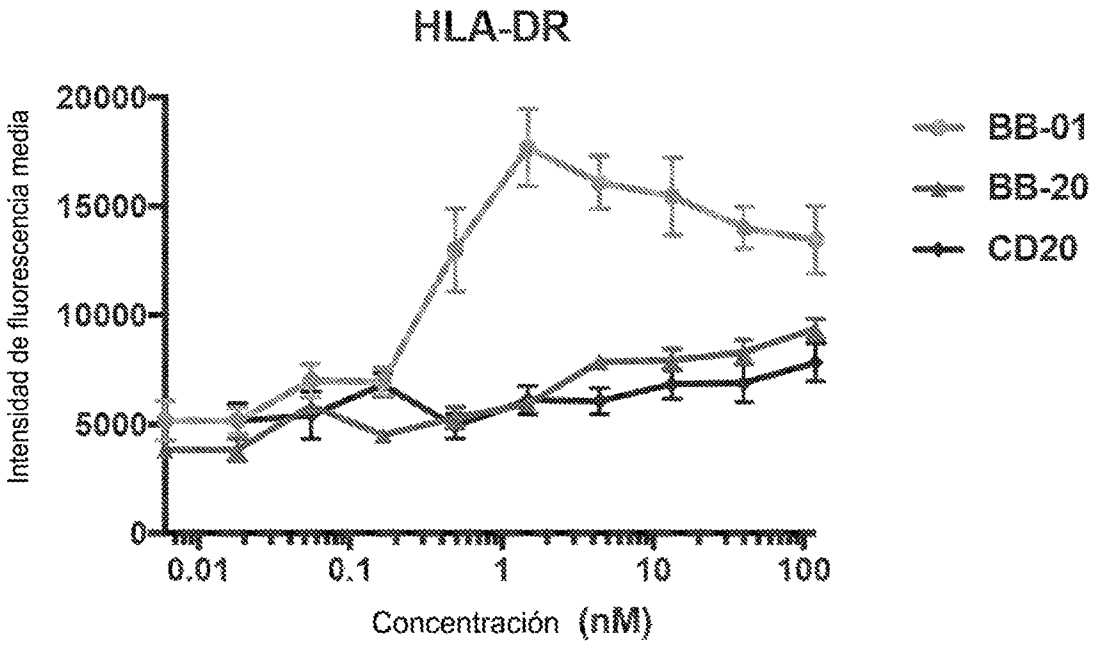


Fig. 129I

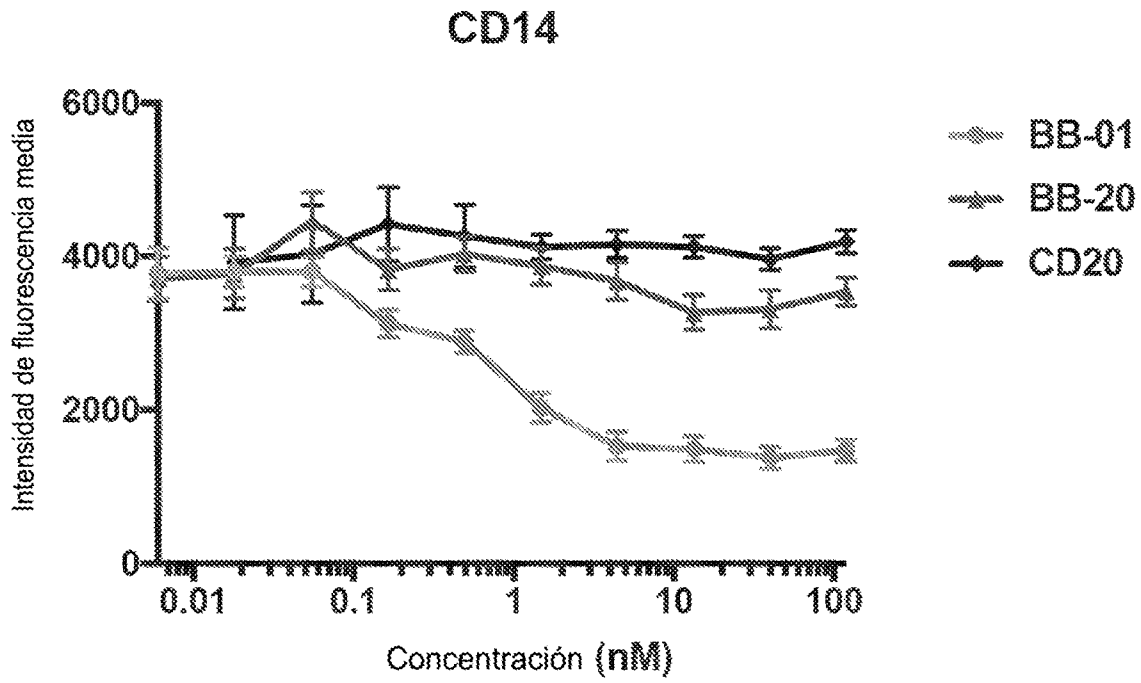


Fig. 129J

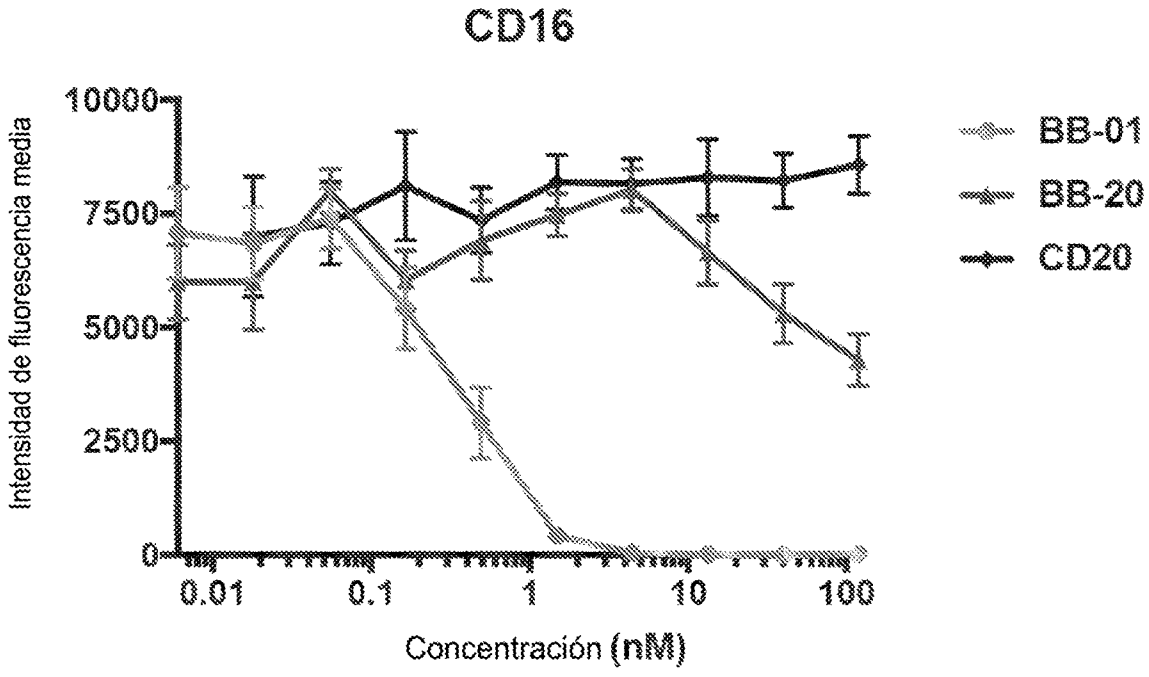


Fig. 129K

645

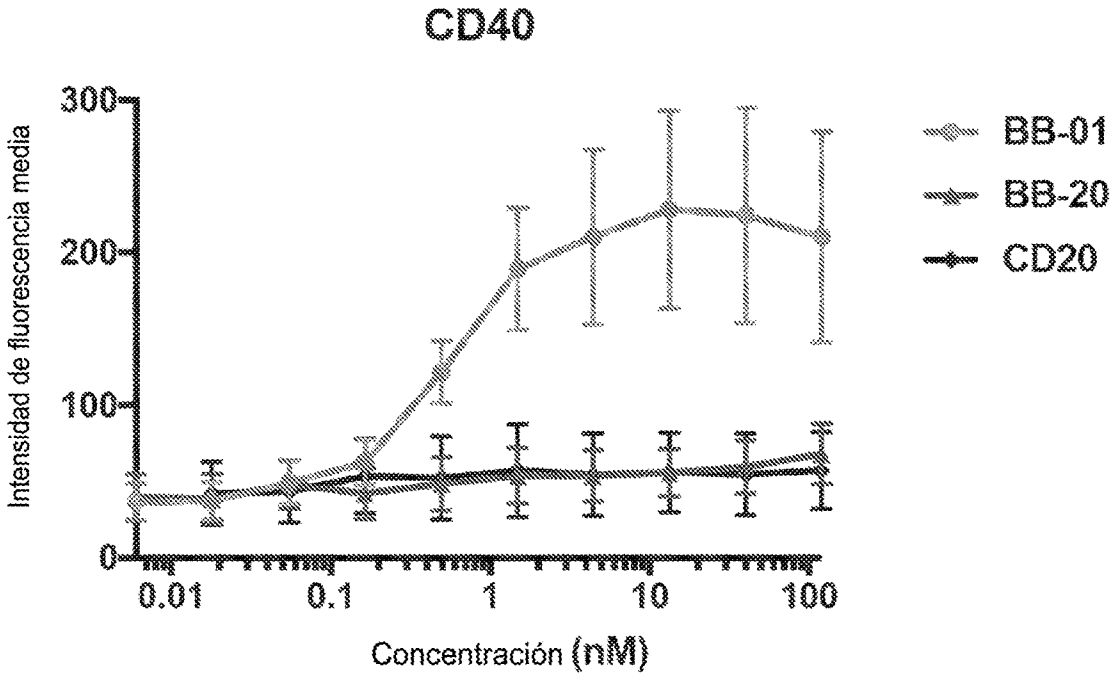


Fig. 129L

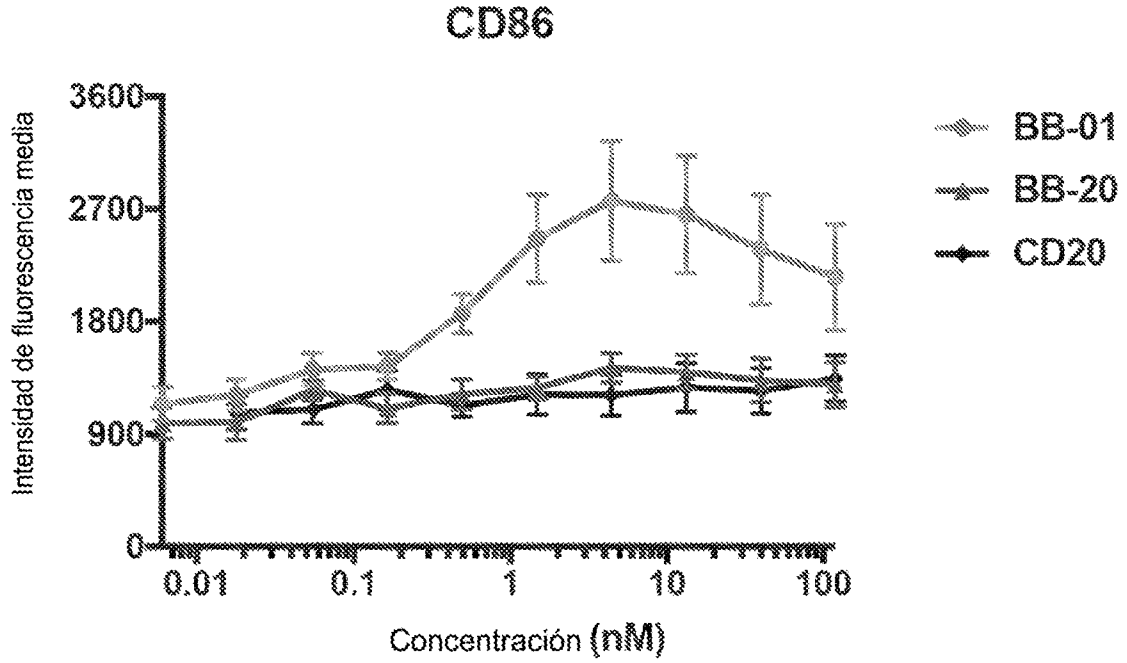


Fig. 129M

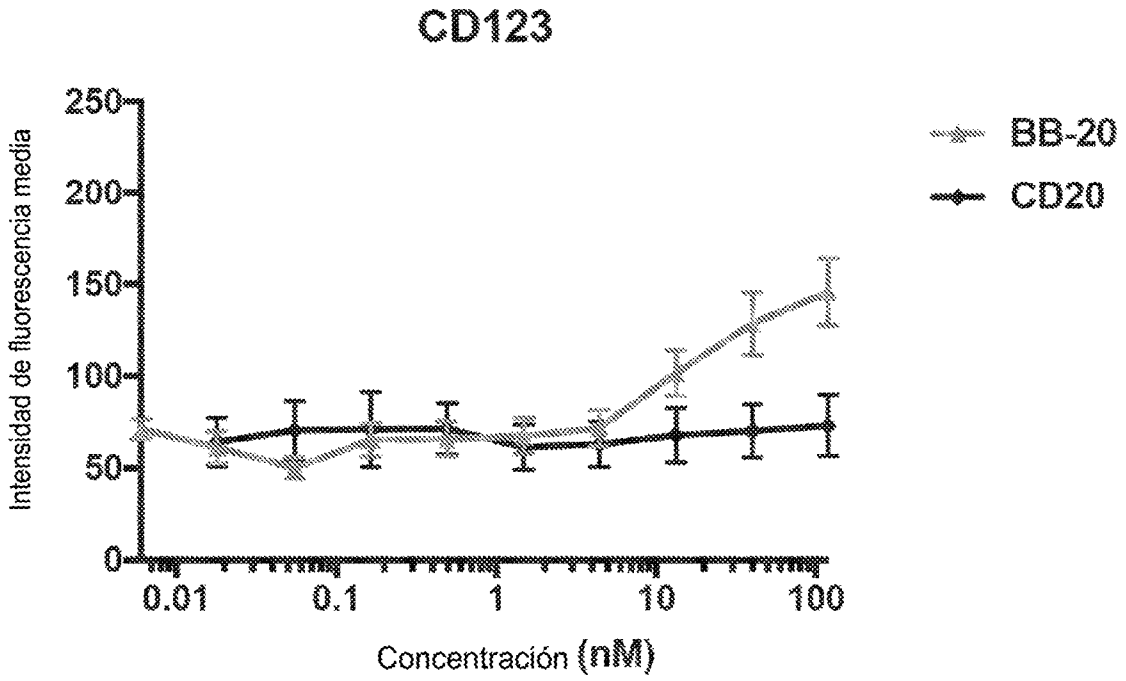


Fig. 129N

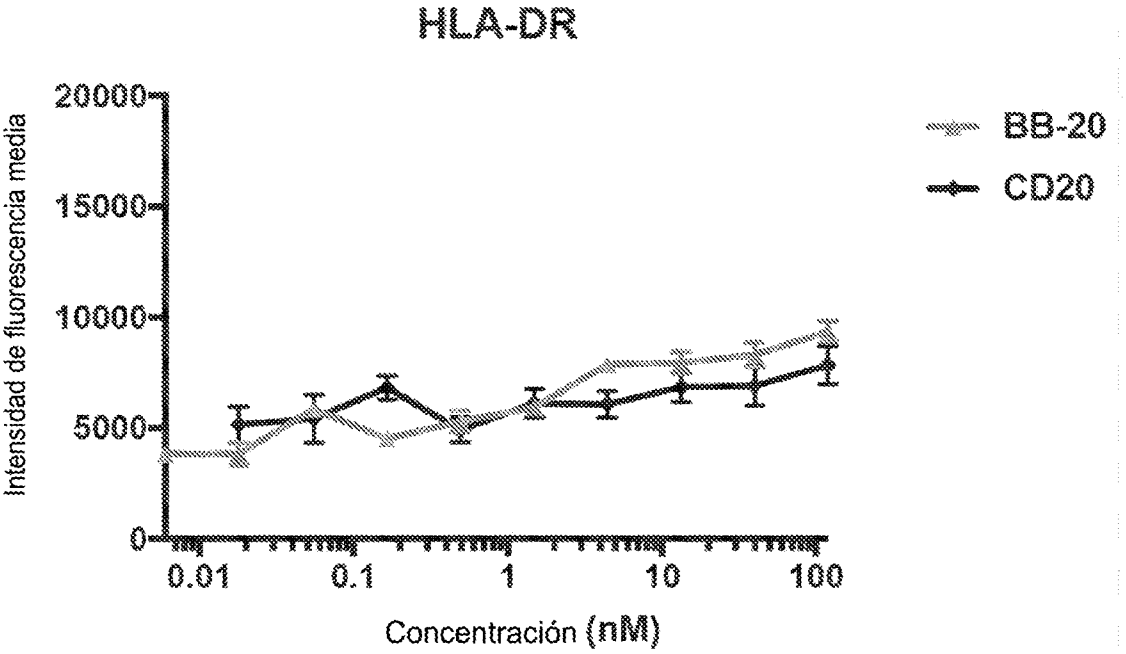


Fig. 129O

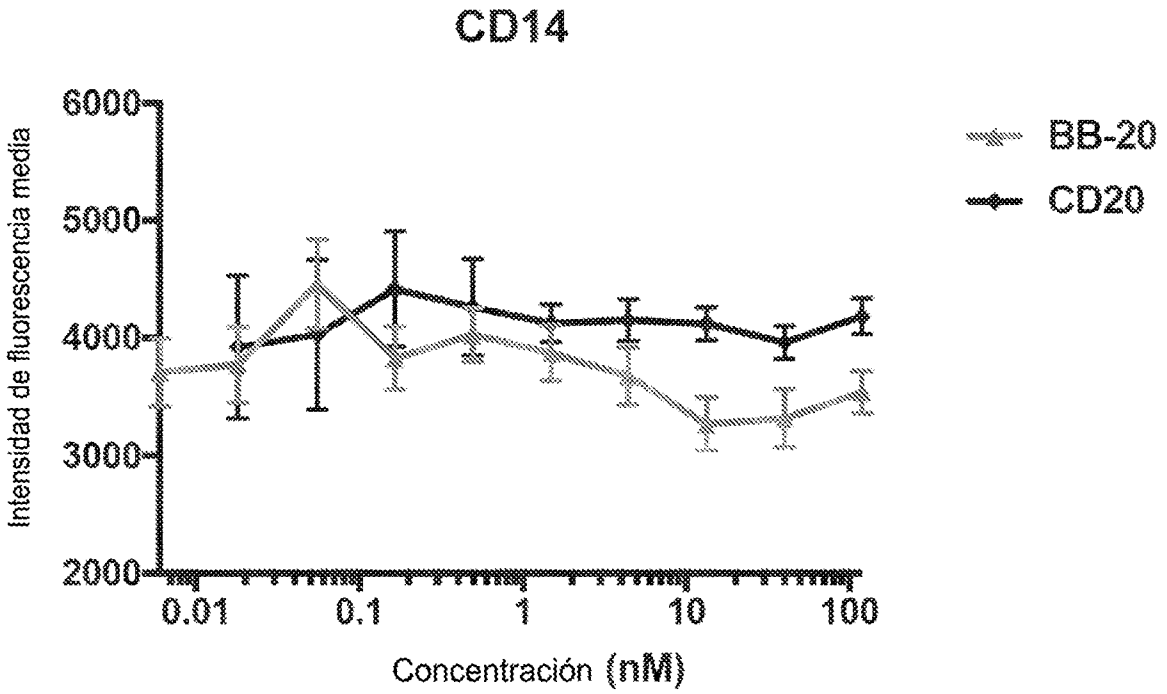


Fig. 129P

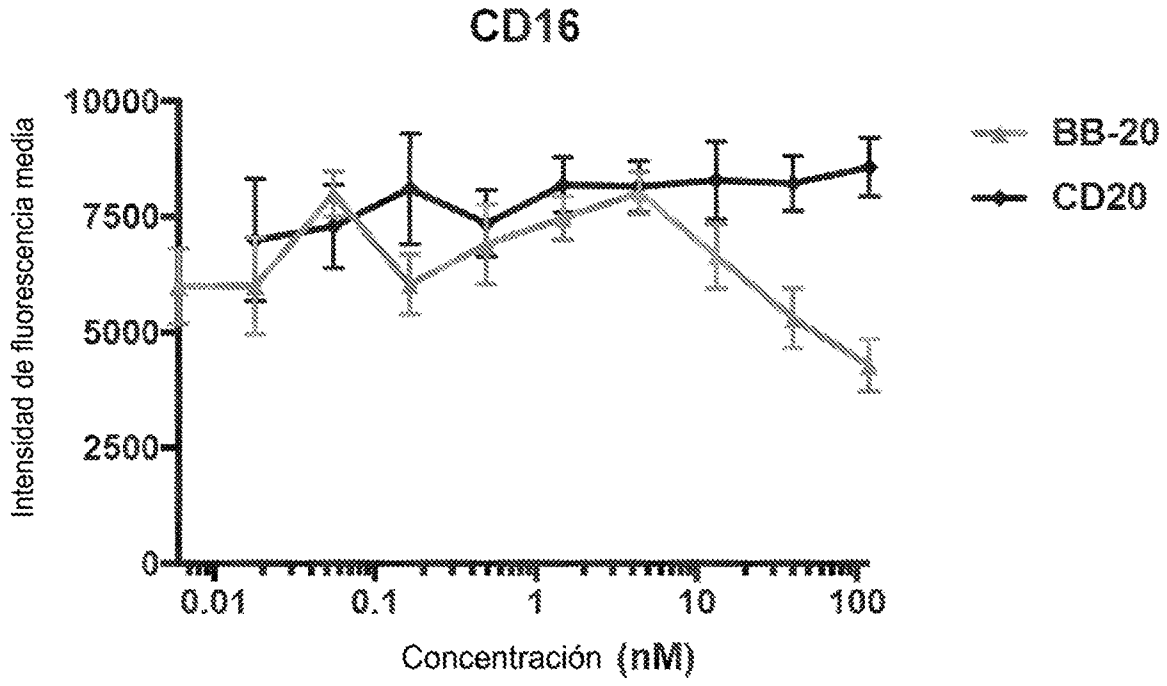


Fig. 129Q

648

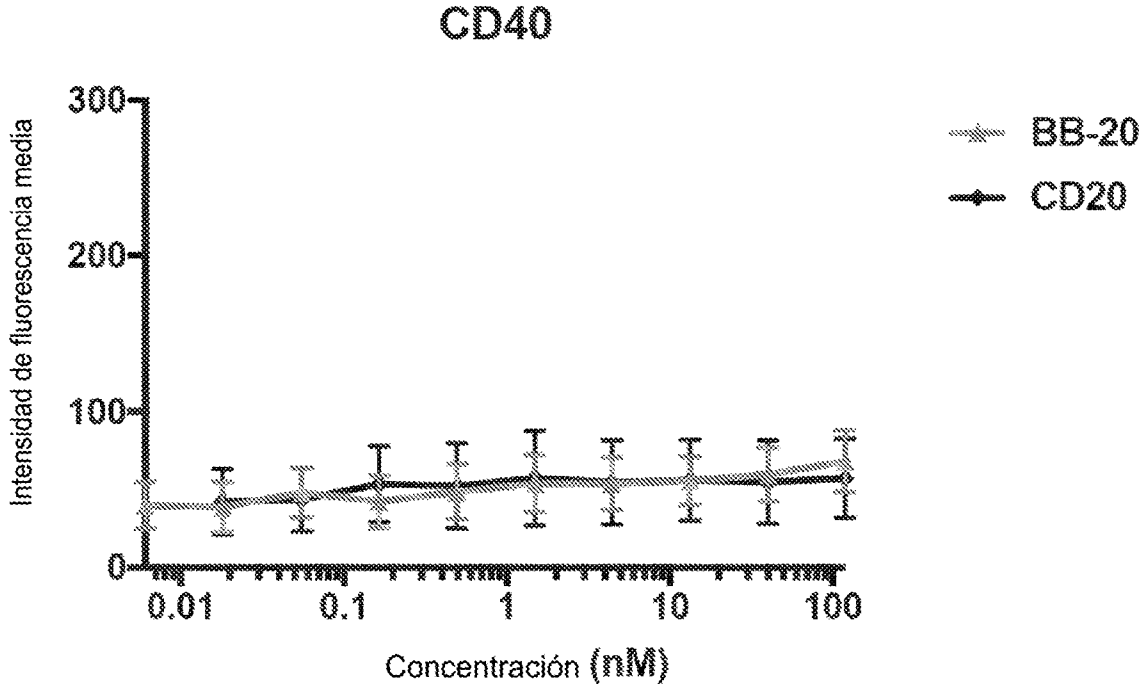


Fig. 129R

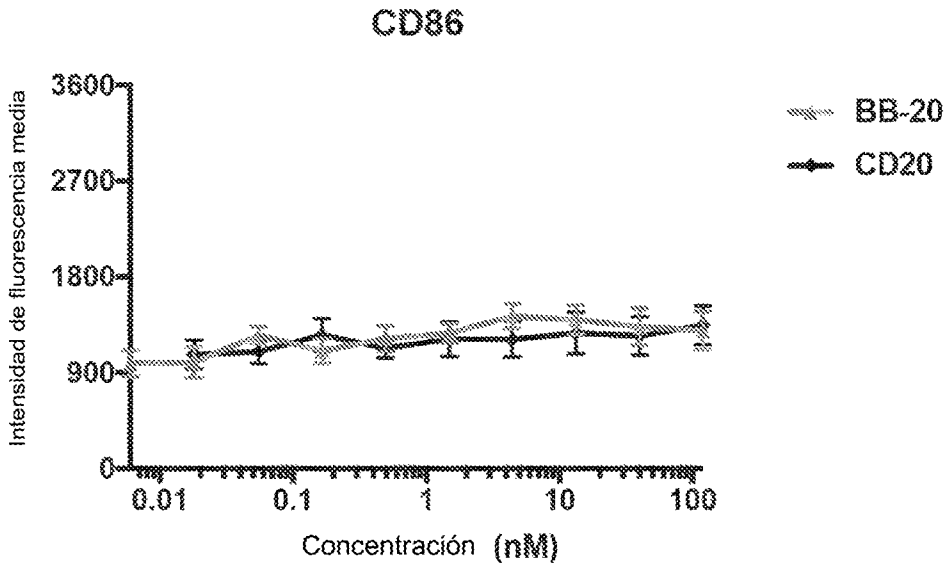


Fig. 129S

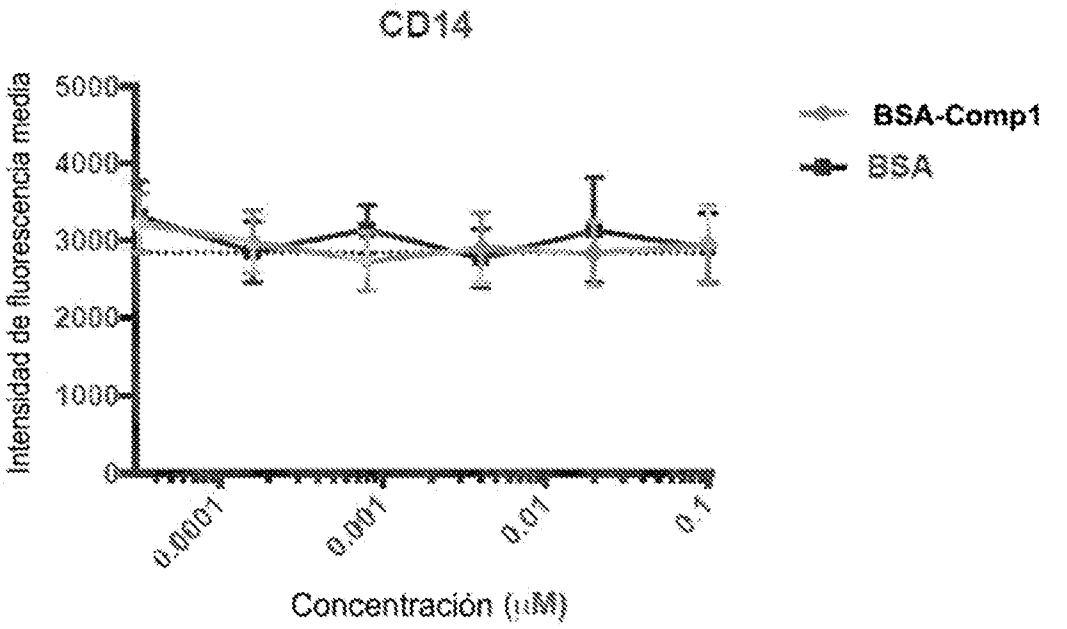


Fig. 130A

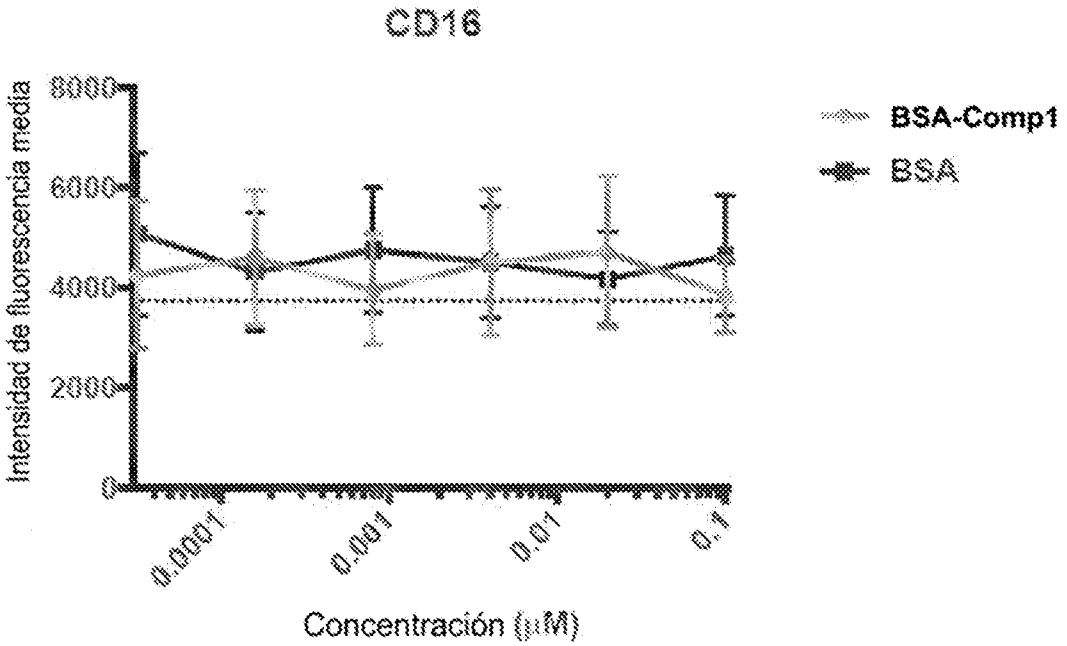


Fig. 130B

650

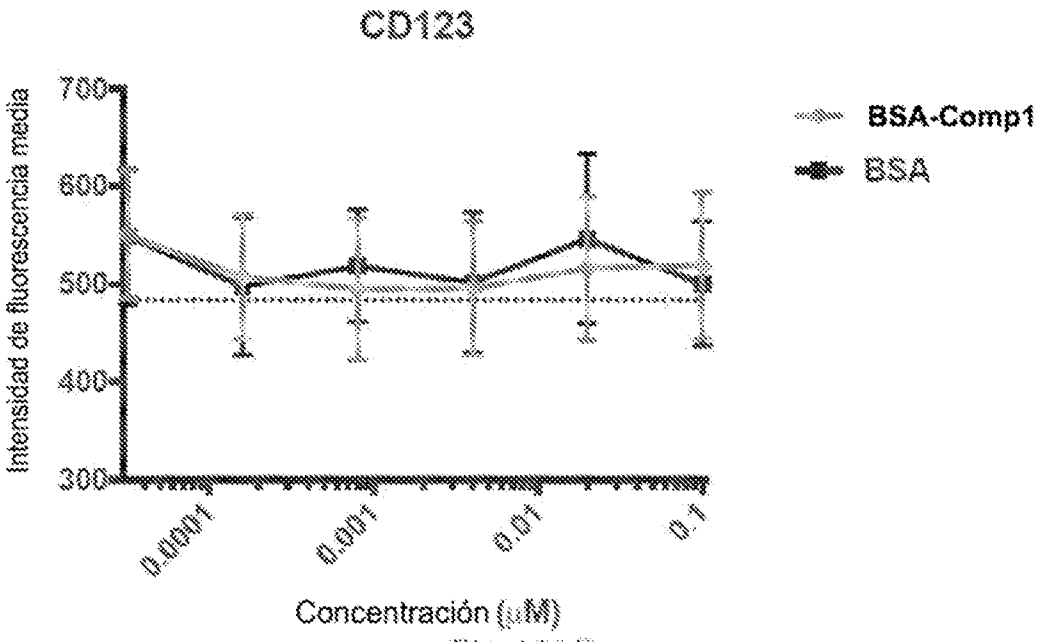


Fig. 130C

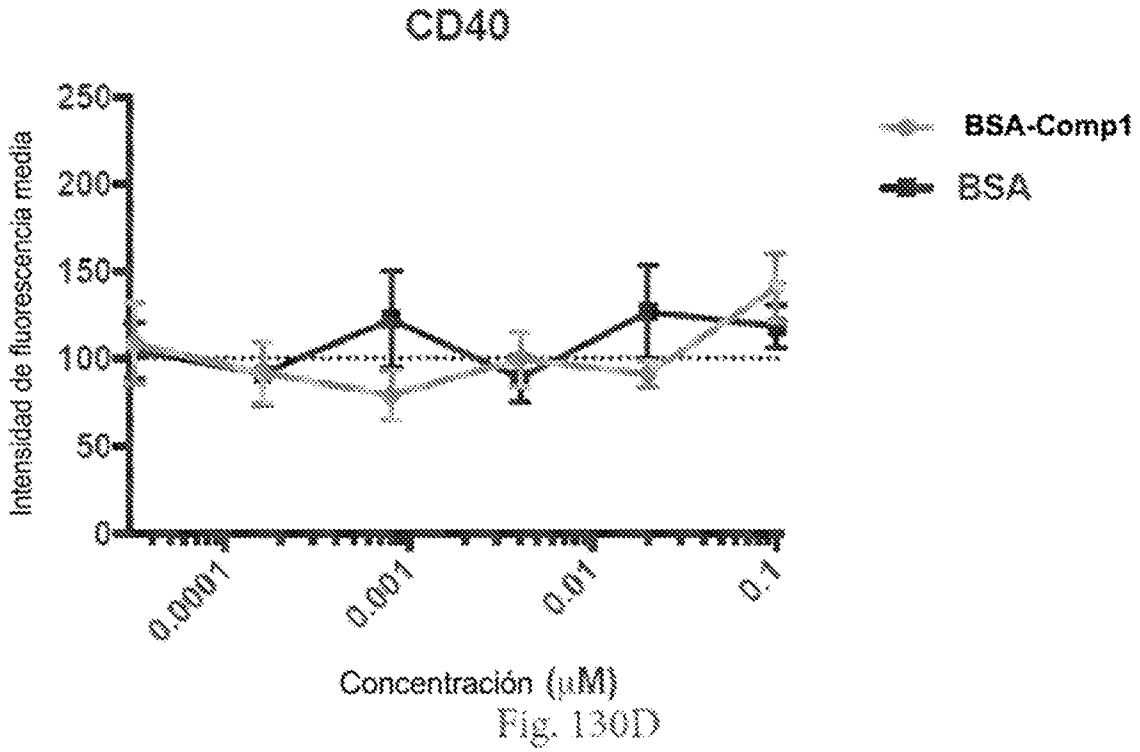


Fig. 130D

651

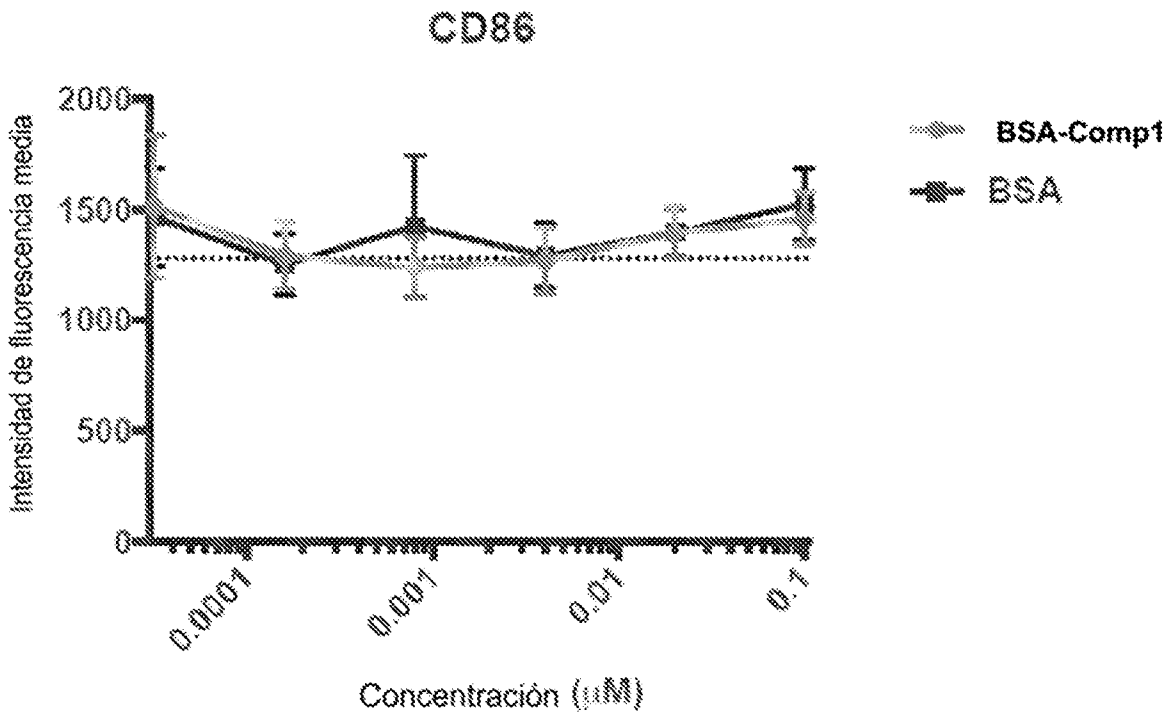


Fig. 130E

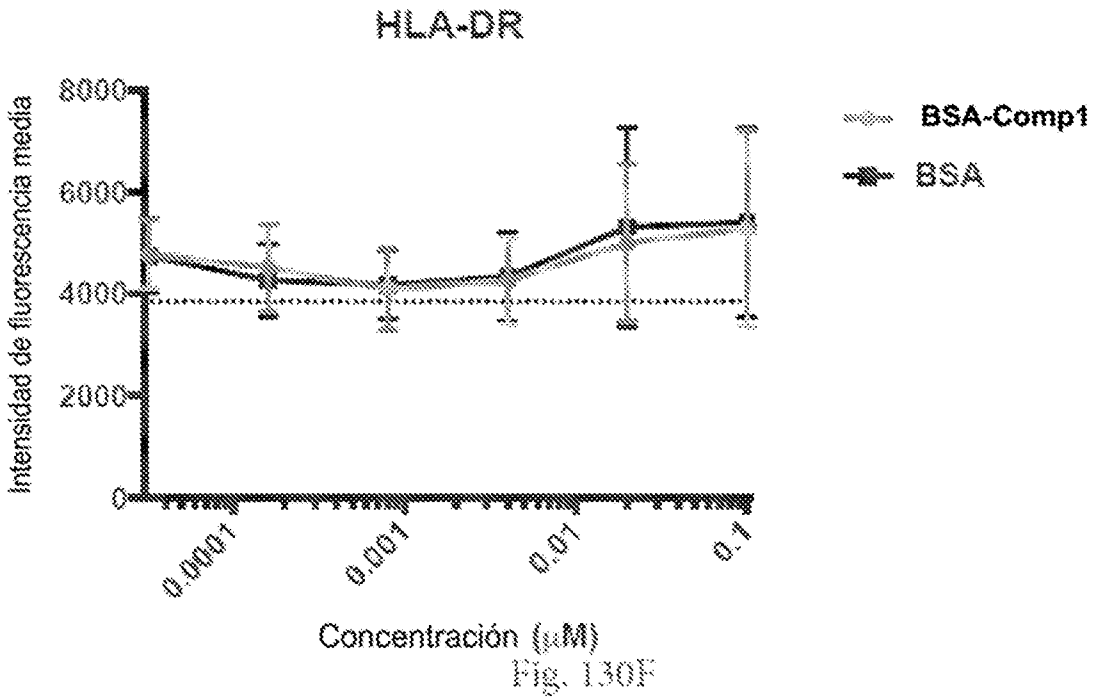


Fig. 130F

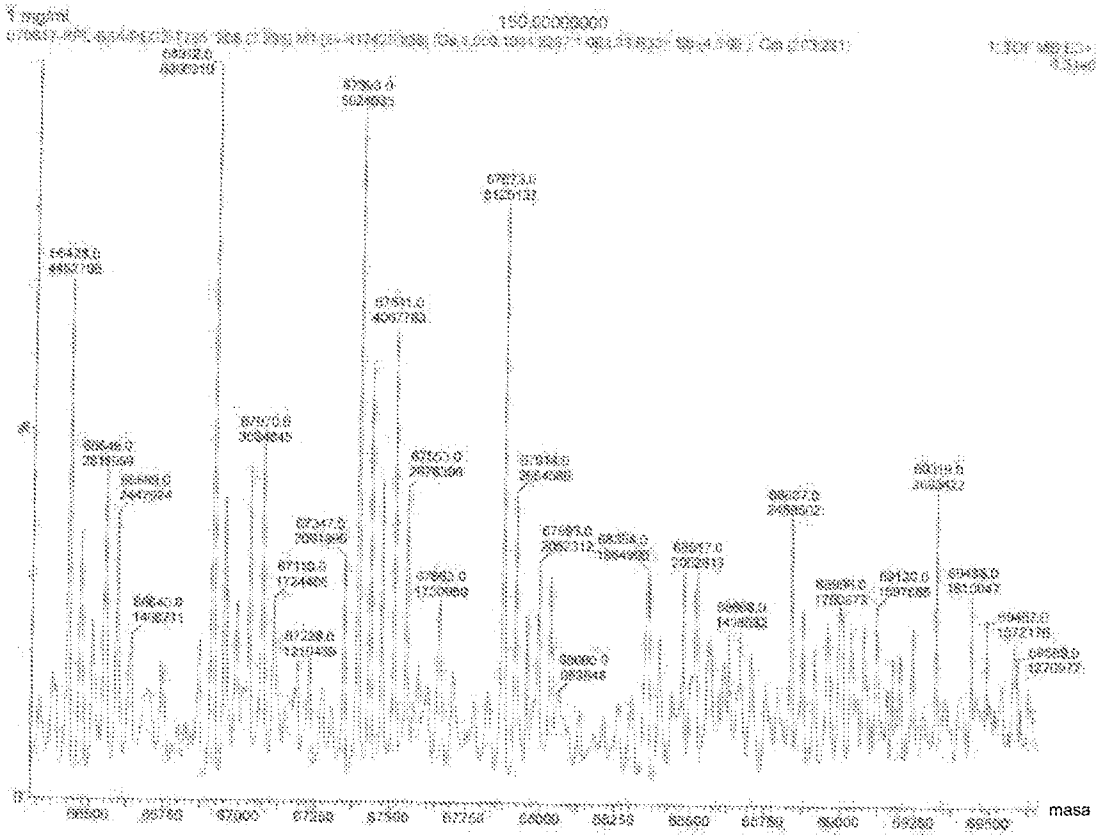


Fig. 130G

653

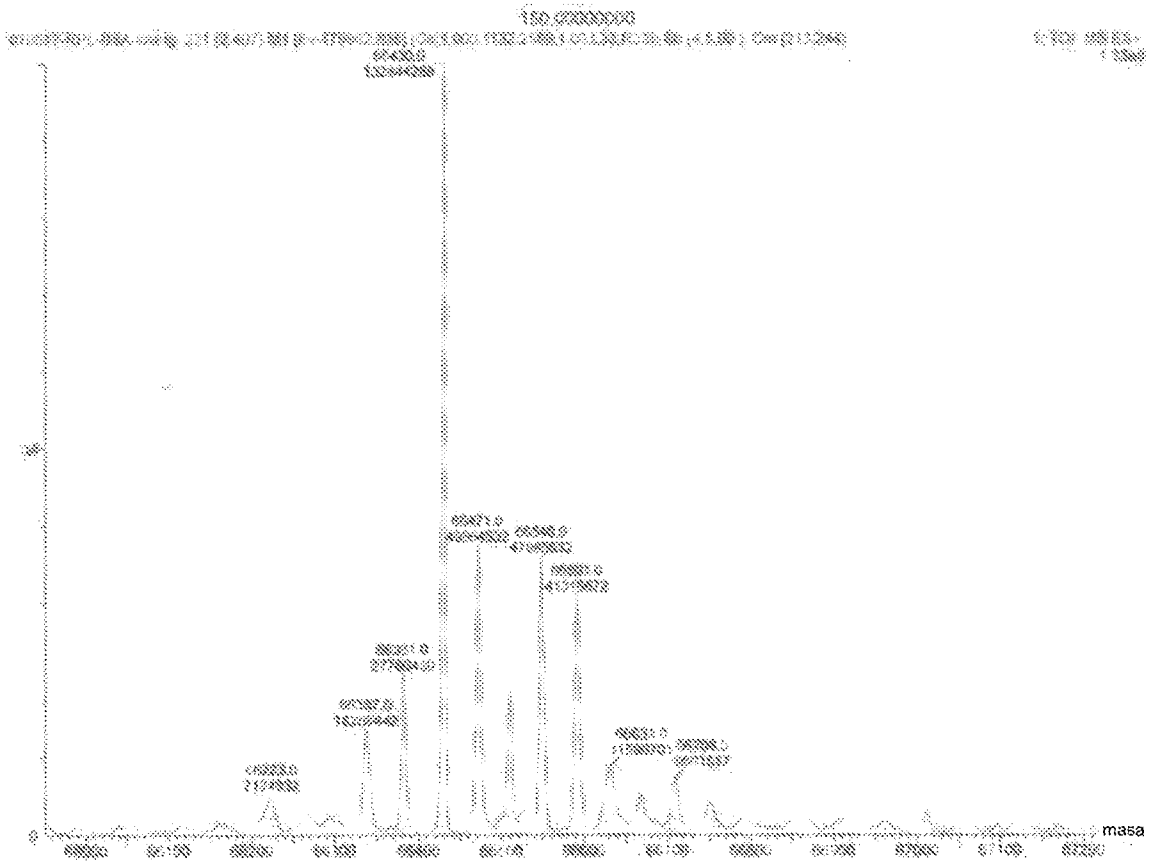


Fig. 130H

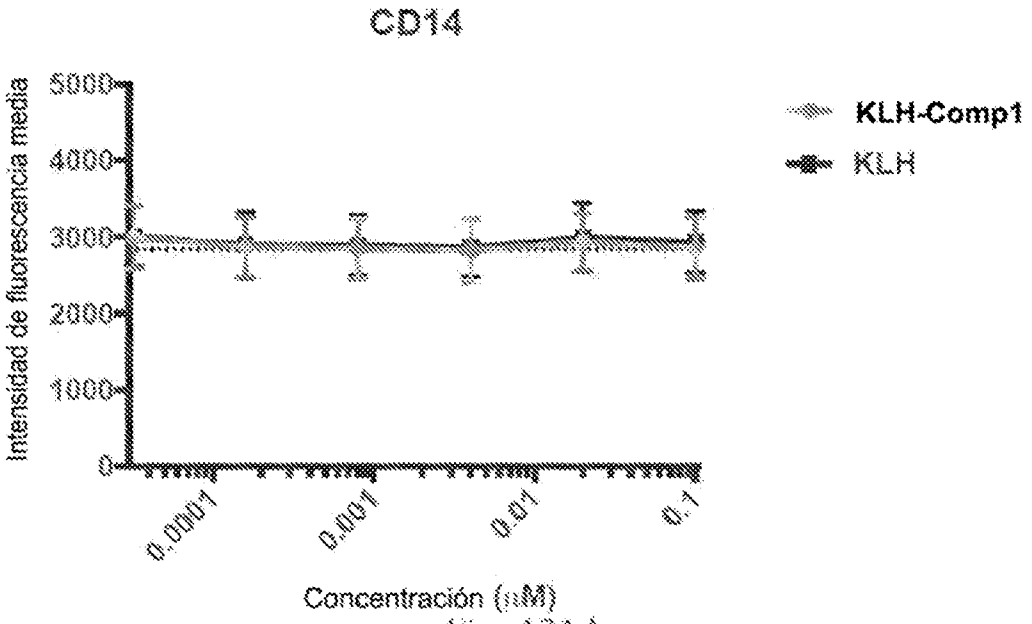


Fig. 131A

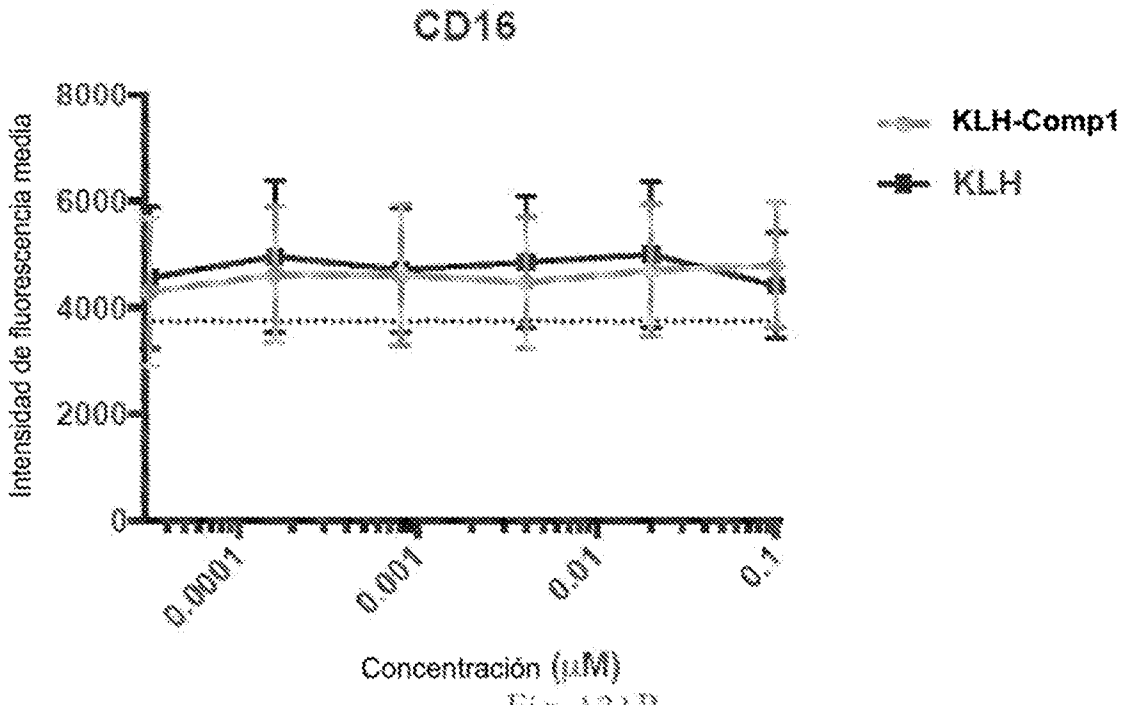


Fig. 131B

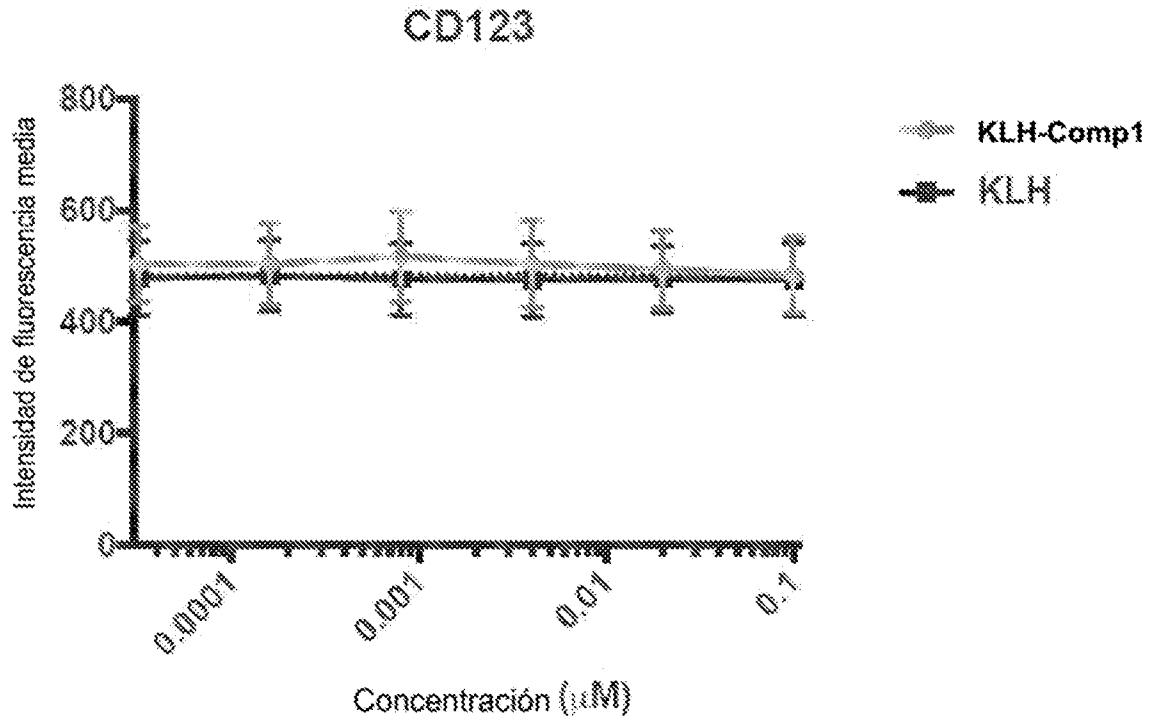


Fig. 131C

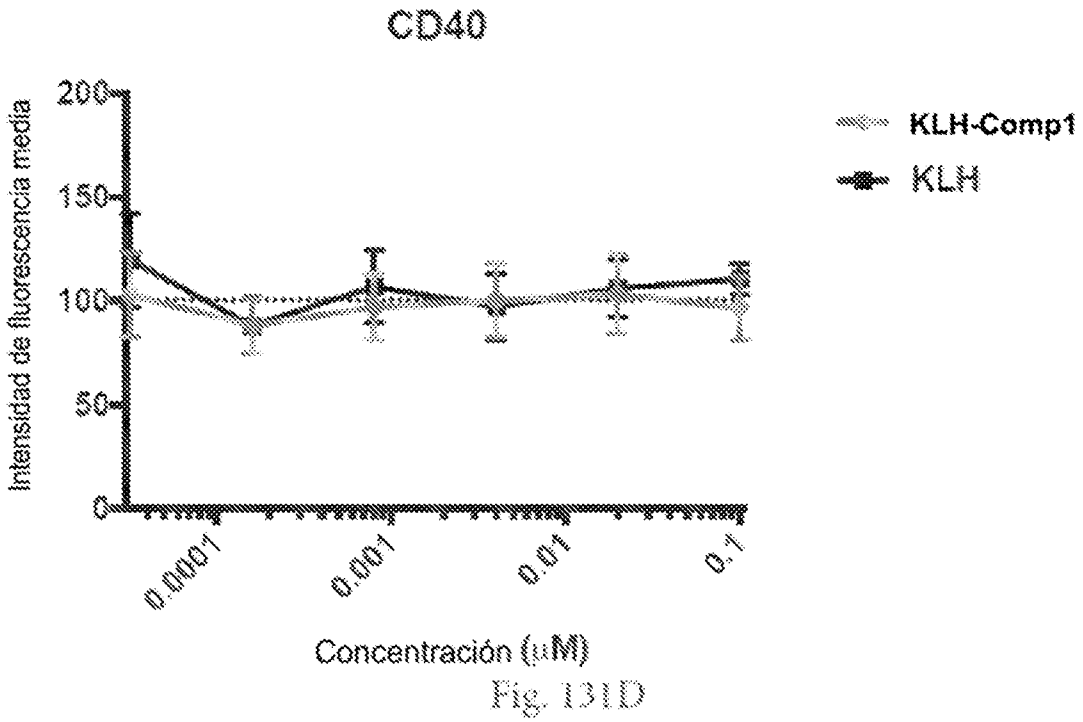


Fig. 131D

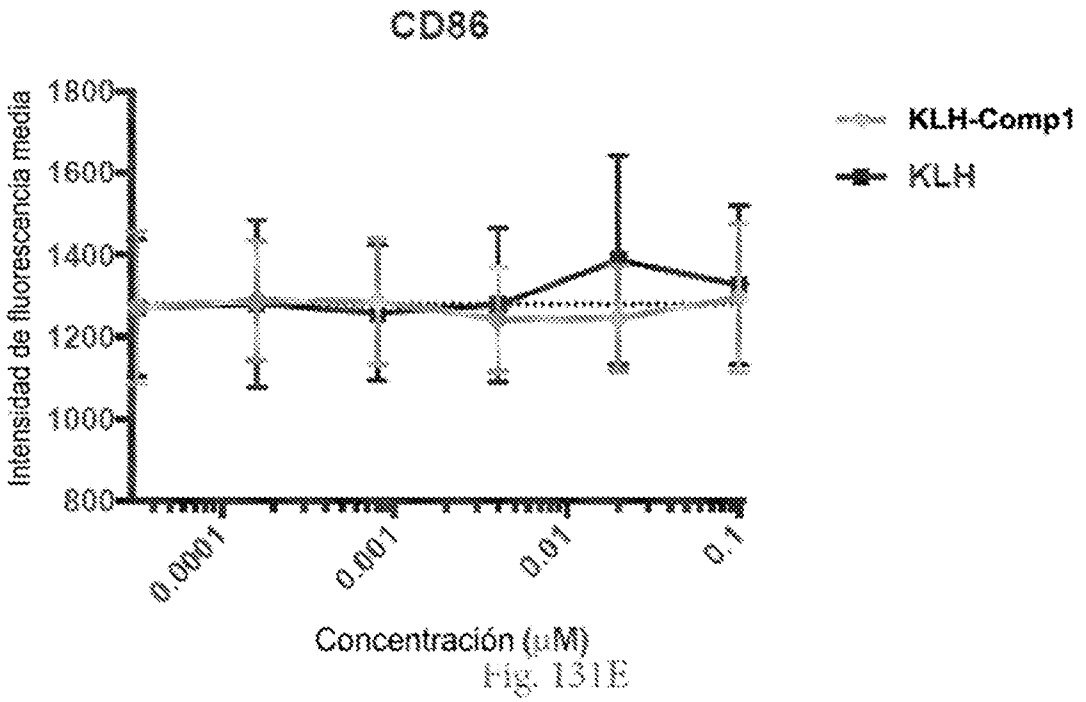


Fig. 131E

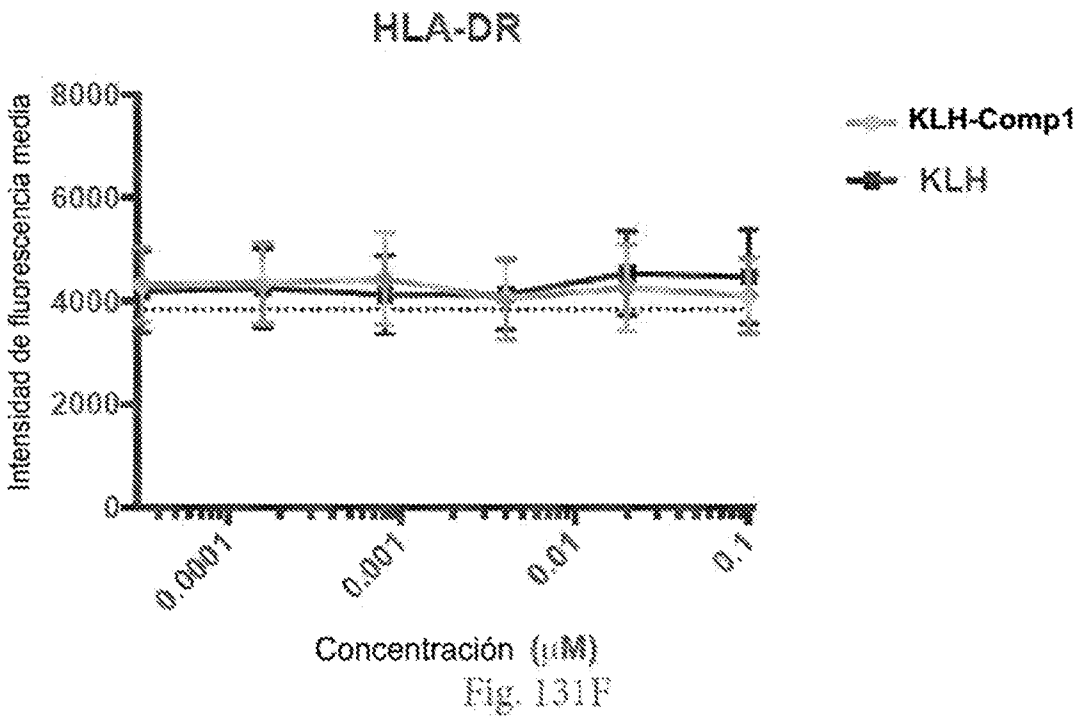


Fig. 131F

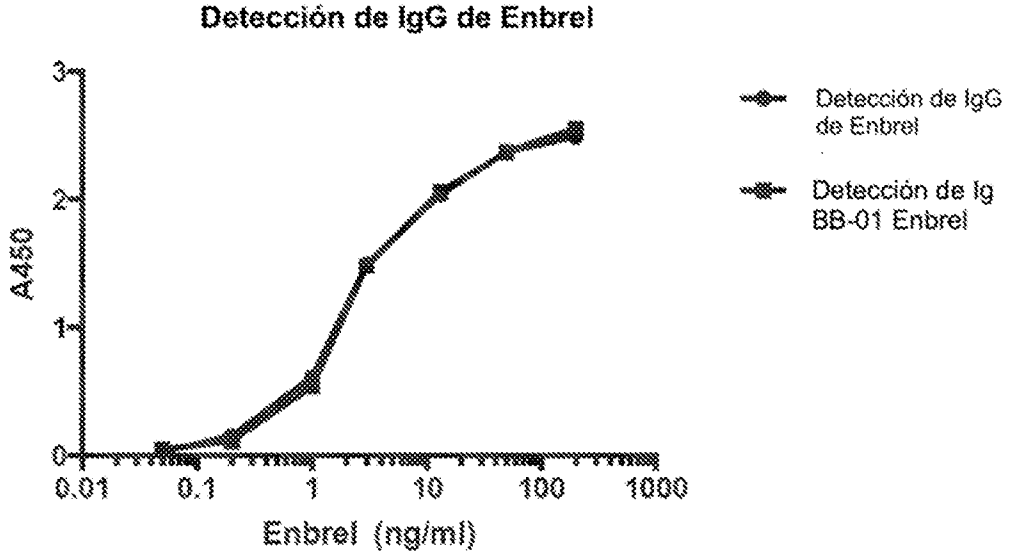


Fig. 132A

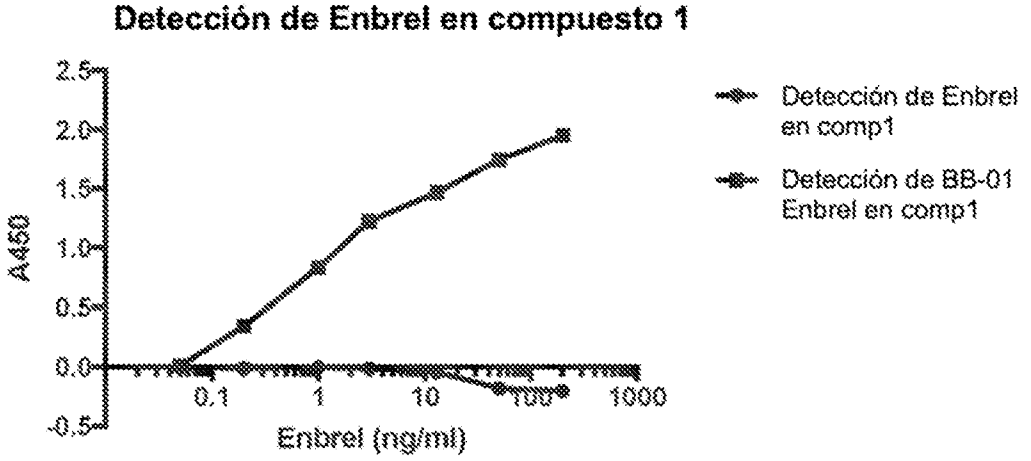


Fig. 132B

658

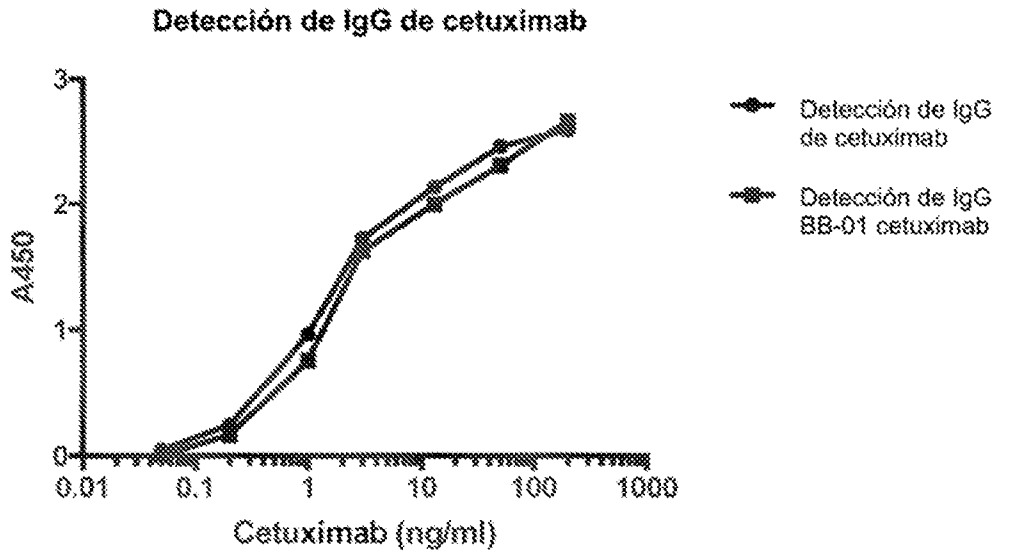


Fig. 132C

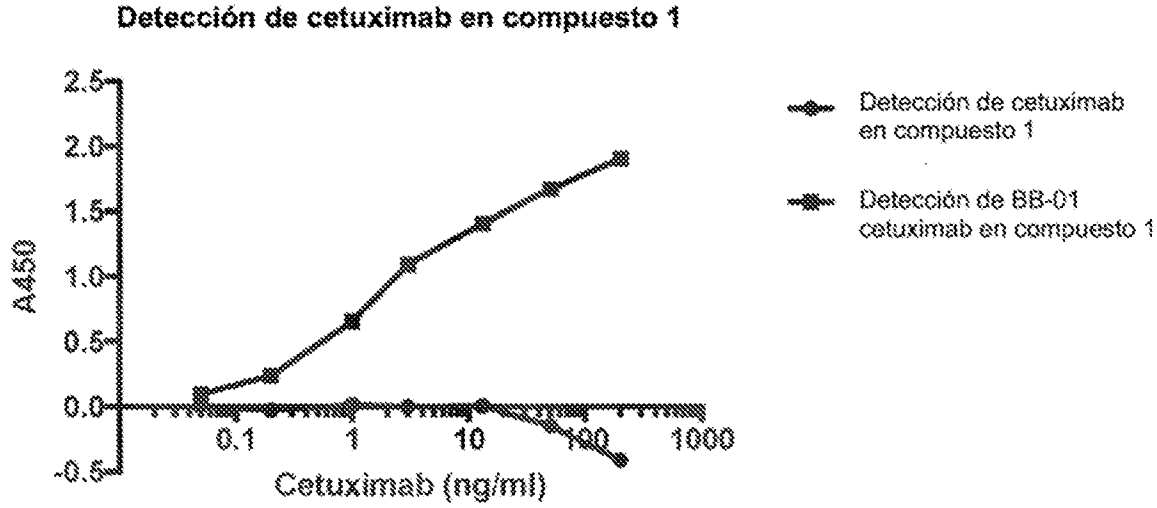


Fig. 132D

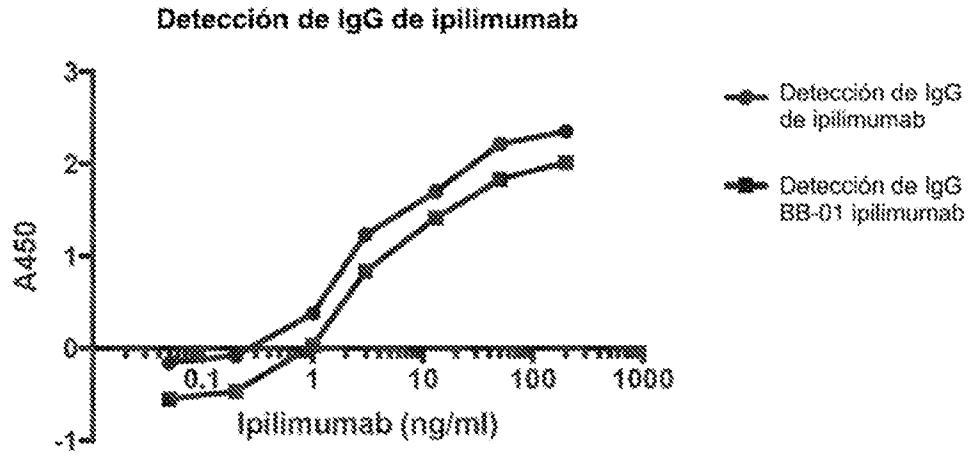


Fig. 132E

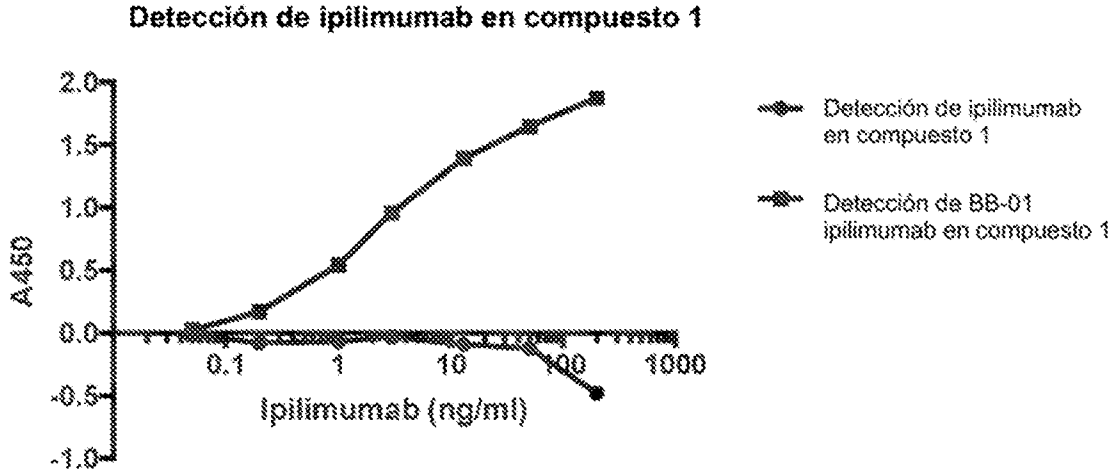


Fig. 132F

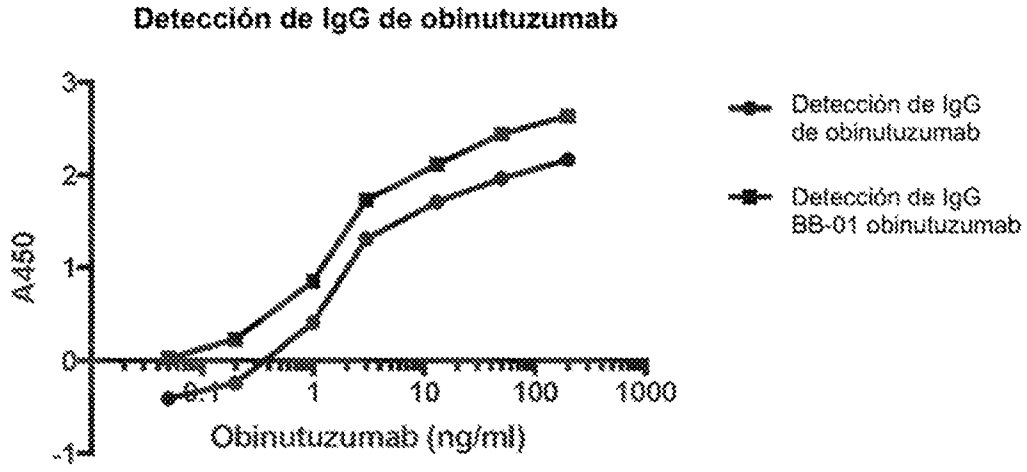


Fig. 132G

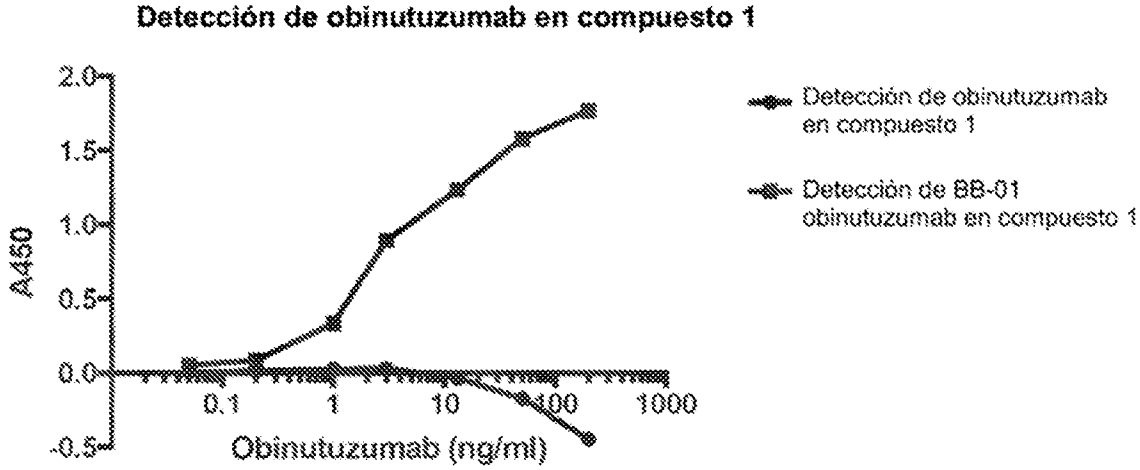


Fig. 132H

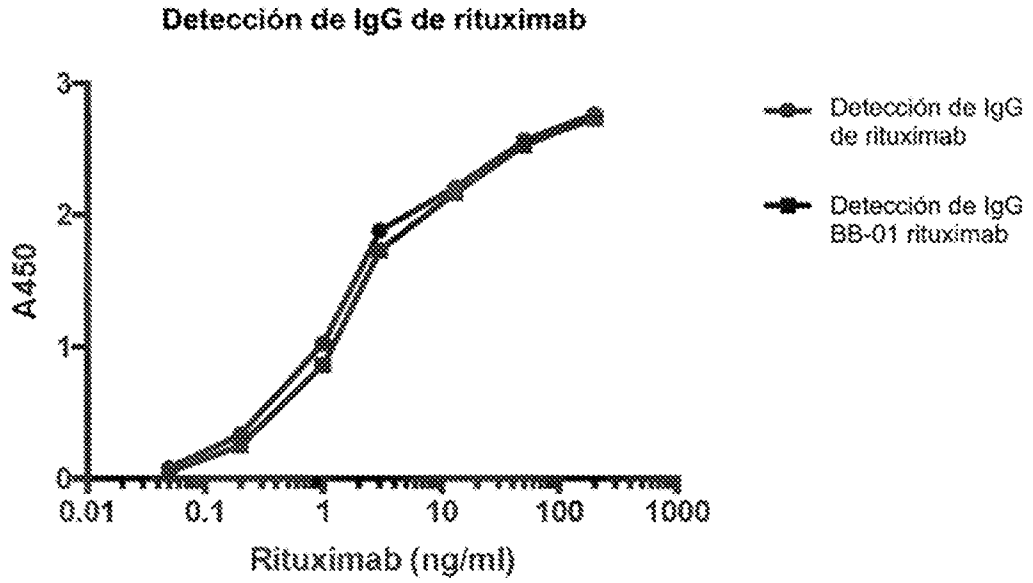


Fig. 132I

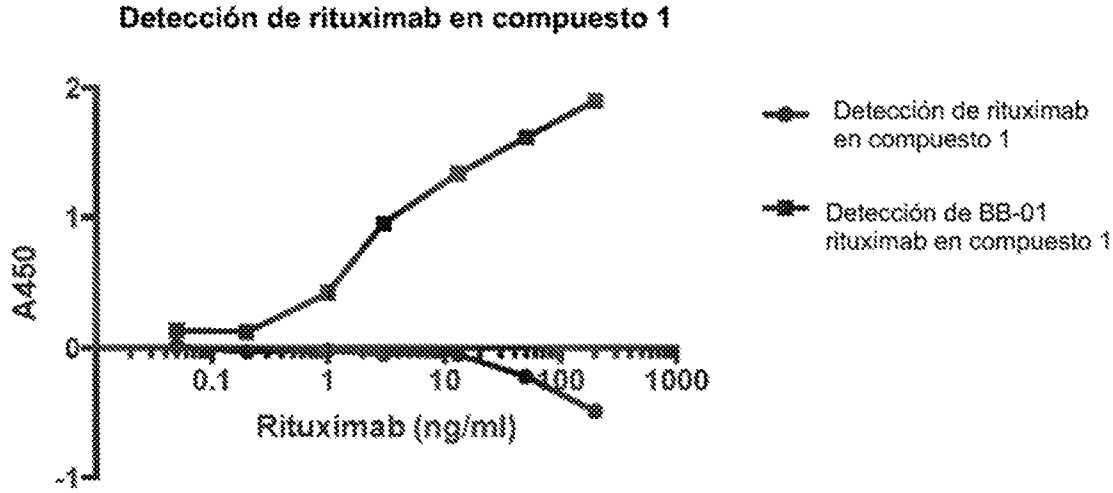


Fig. 132J

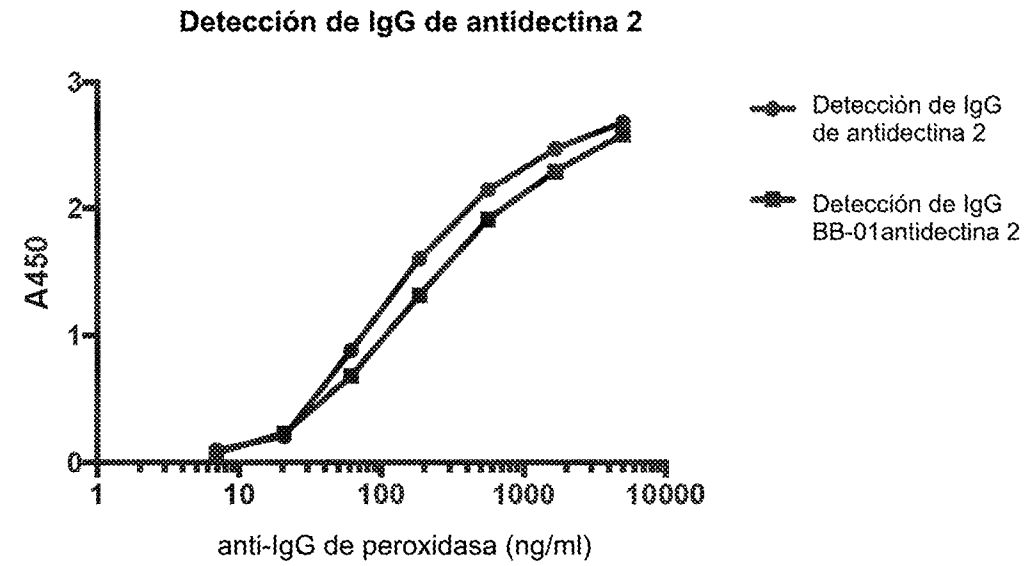


Fig. 132K

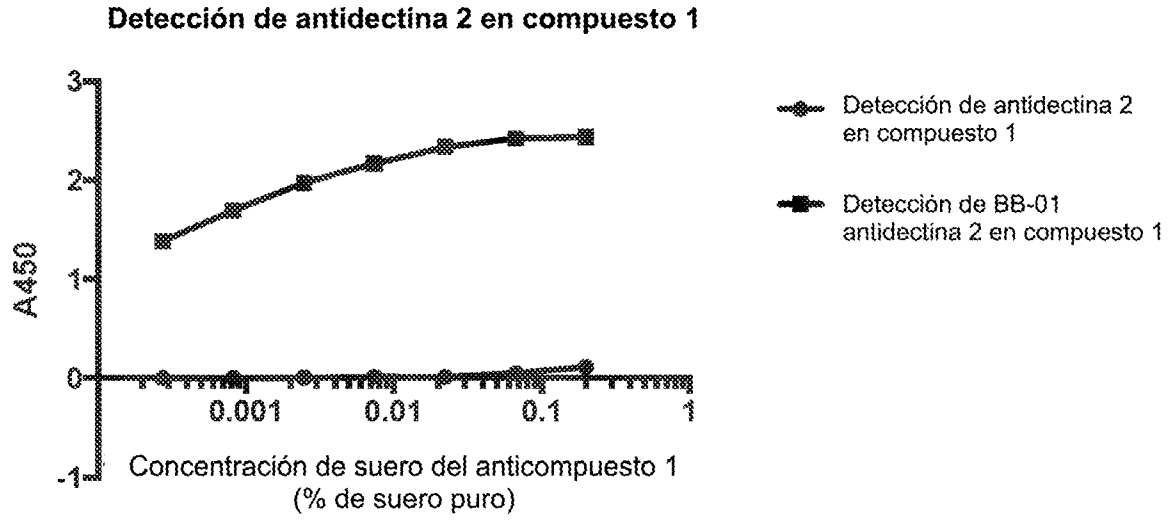


Fig. 132L

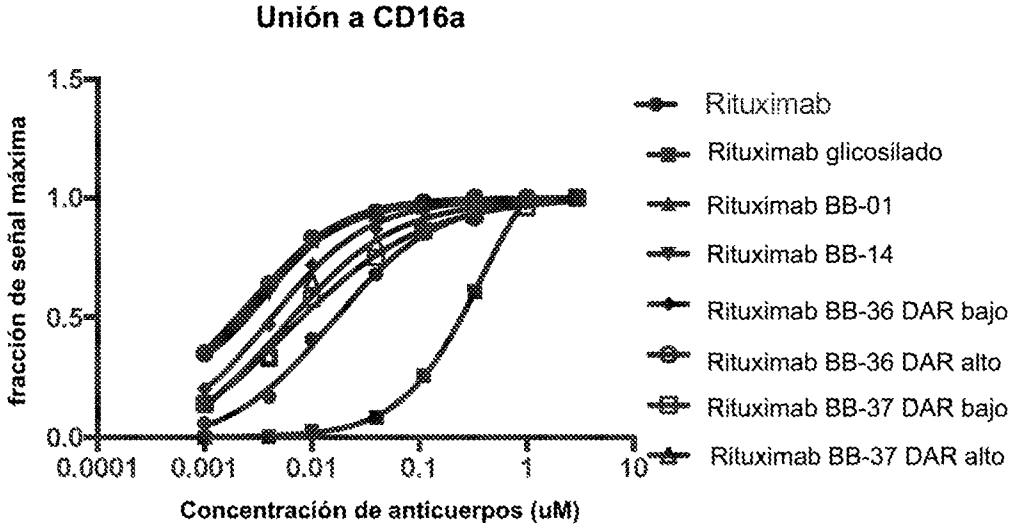


Fig. 133A

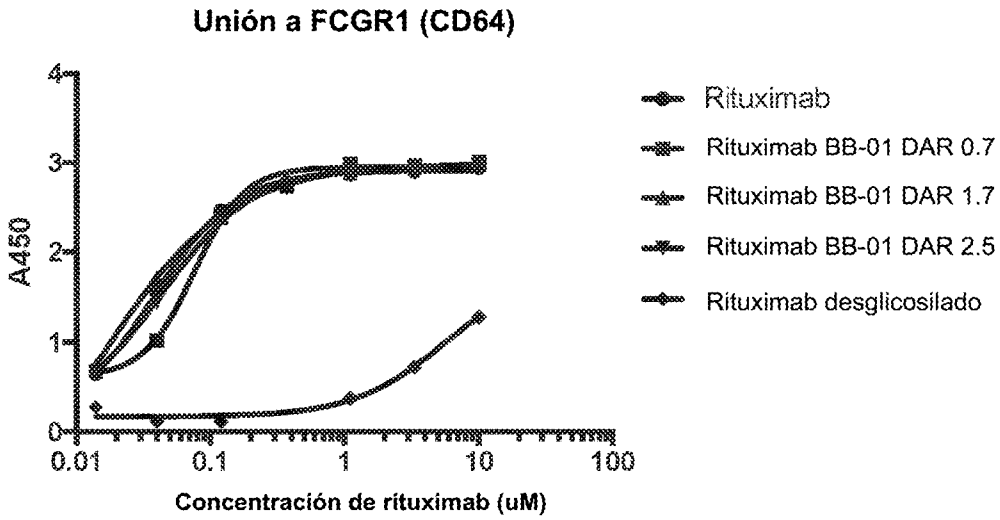


Fig. 133B

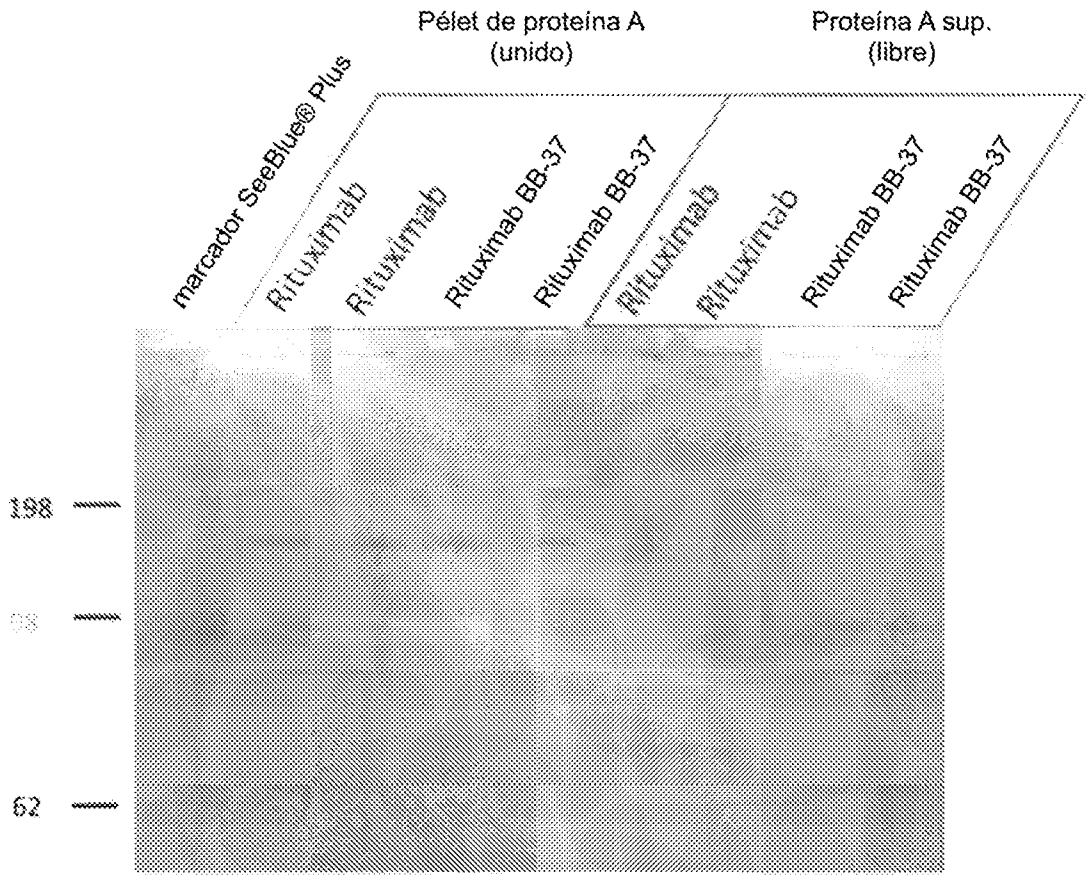

Pélet de proteína A
(unido)
Proteína A sup.
(libre)
marcador SeeBlue® Plus
Rituximab
Rituximab
Rituximab BB-37
Rituximab BB-37
Rituximab
Rituximab
Rituximab BB-37
Rituximab BB-37
198
98
62

Fig. 133C

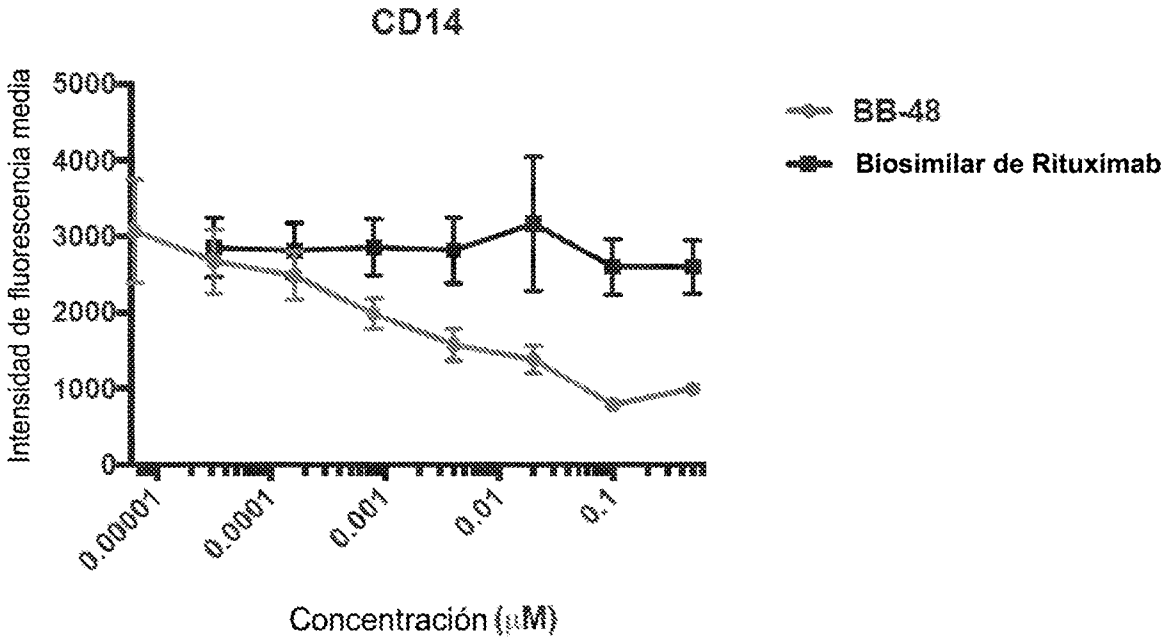


Fig. 134A

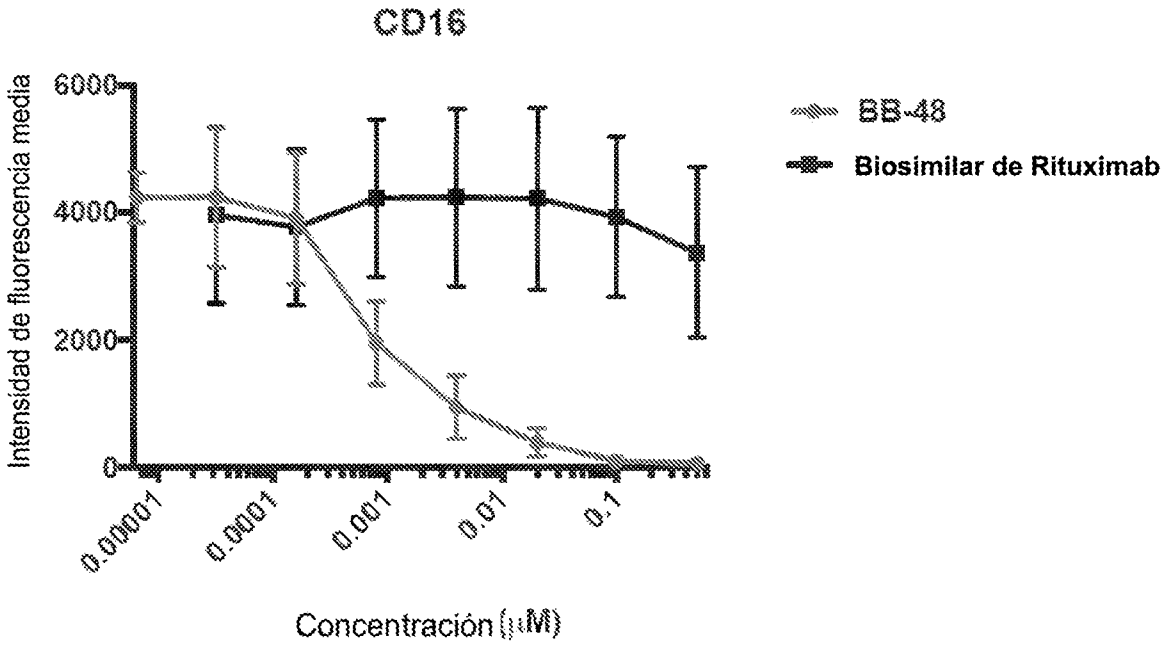


Fig. 134B

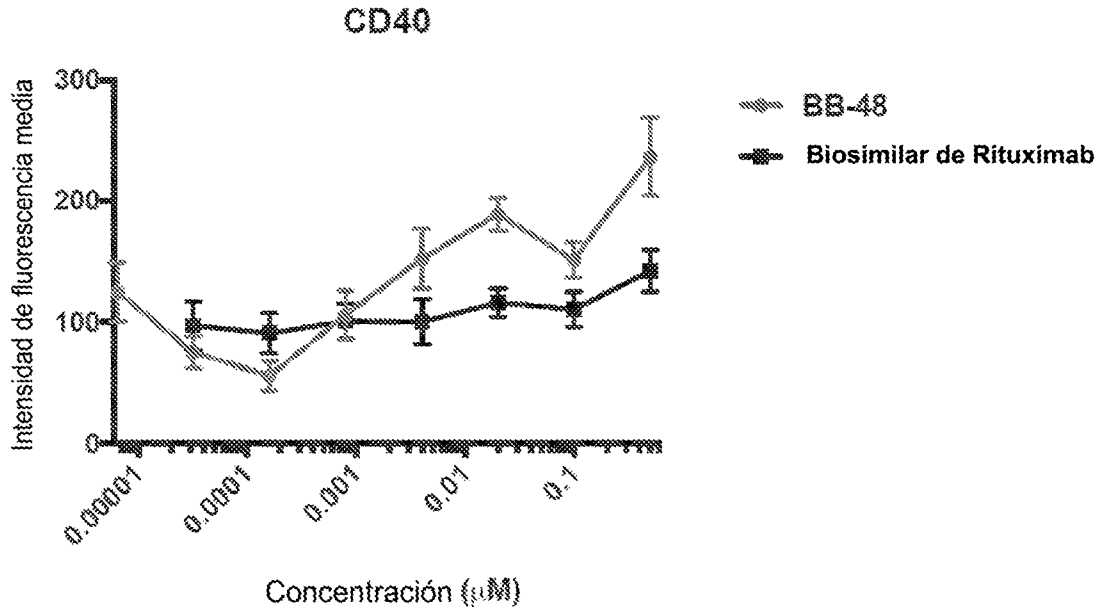


Fig. 134C

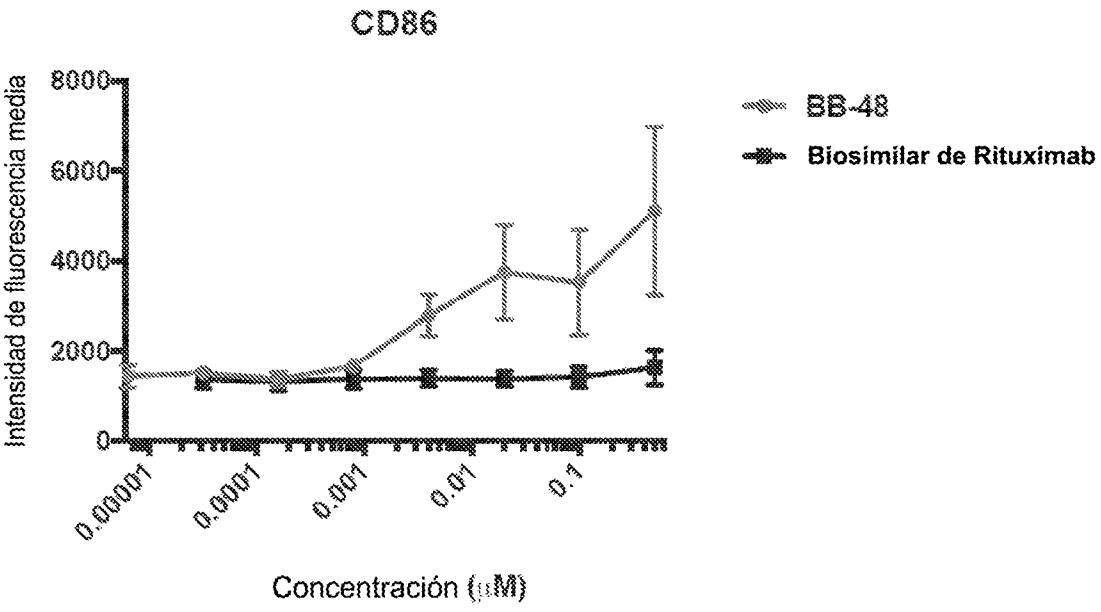


Fig. 134D

667

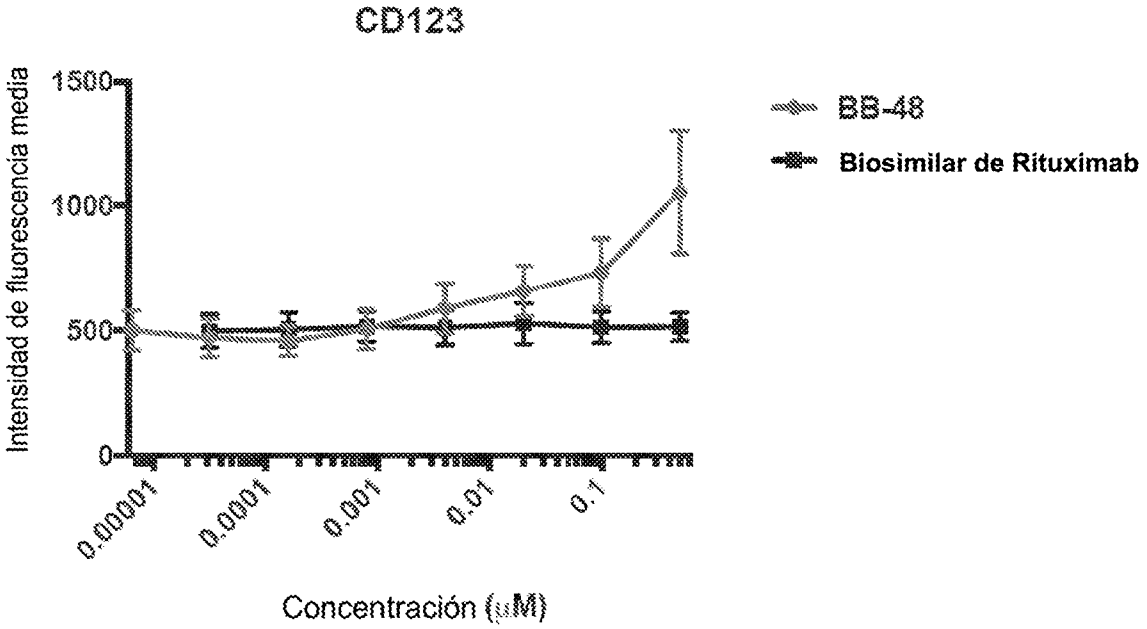


Fig. 134E

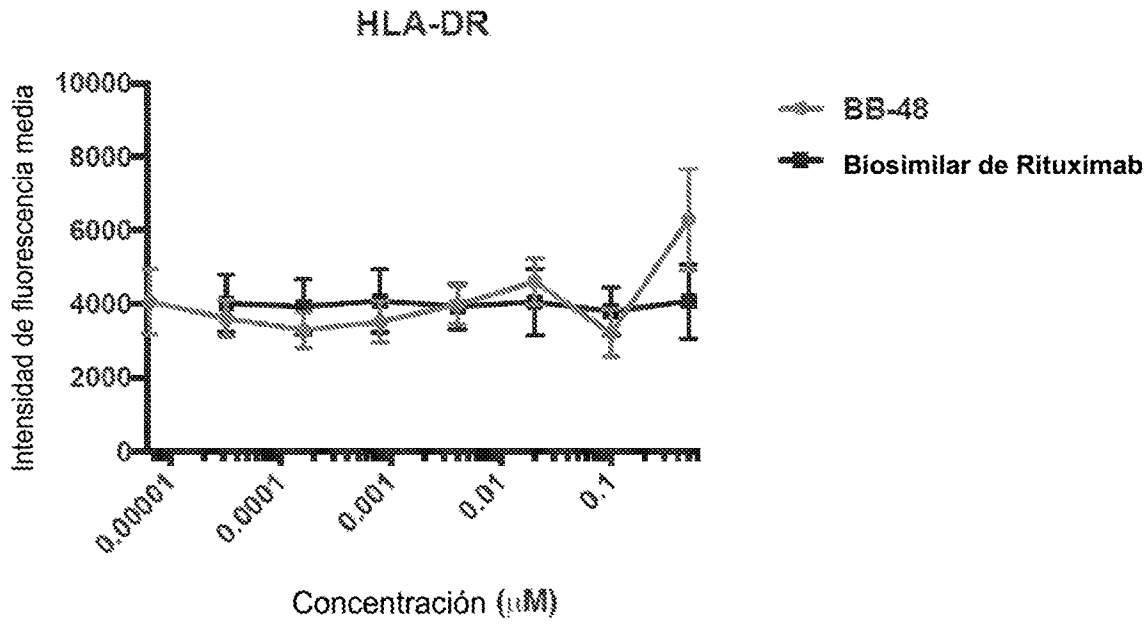


Fig. 134F

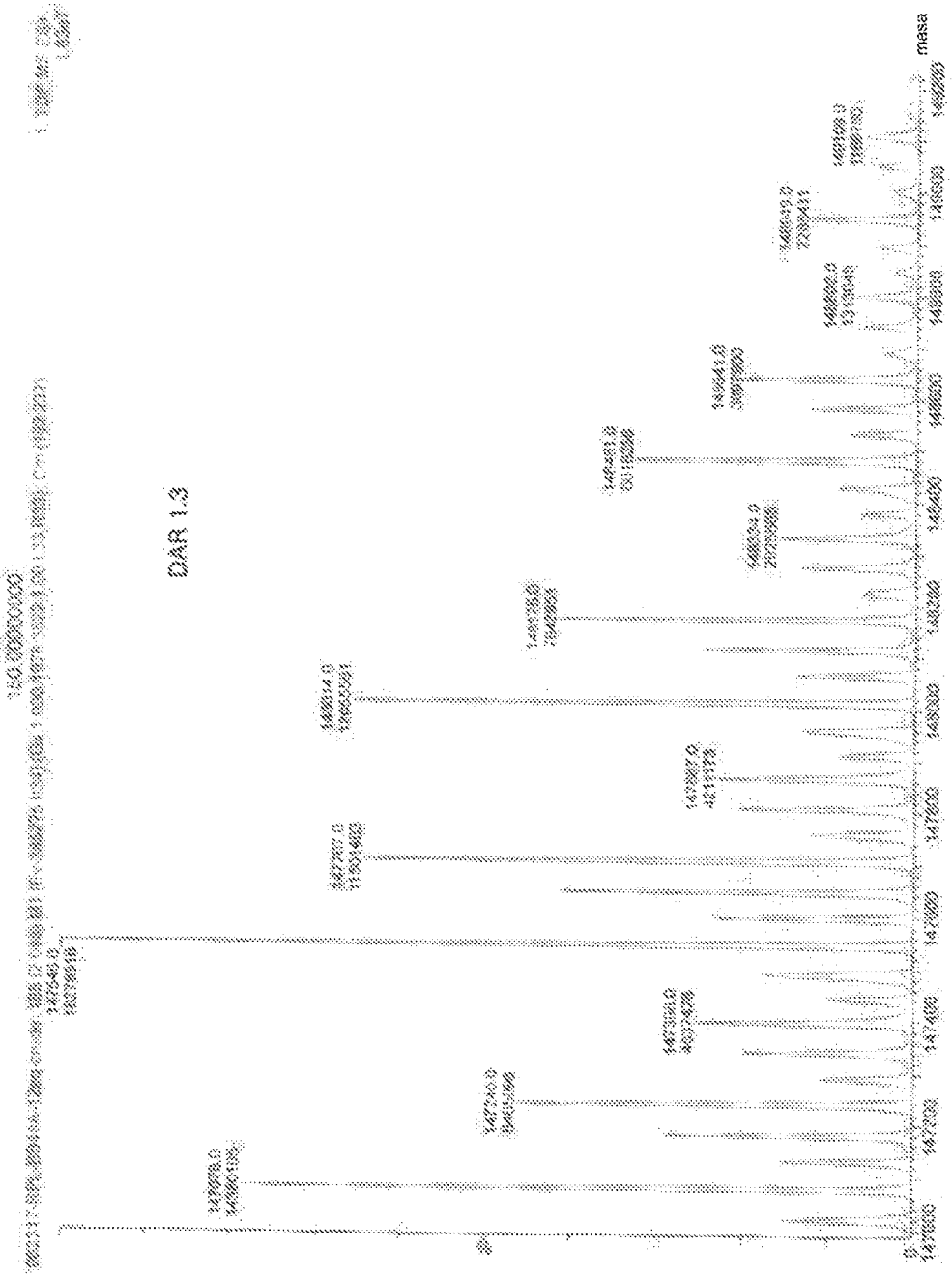


Fig. 134G

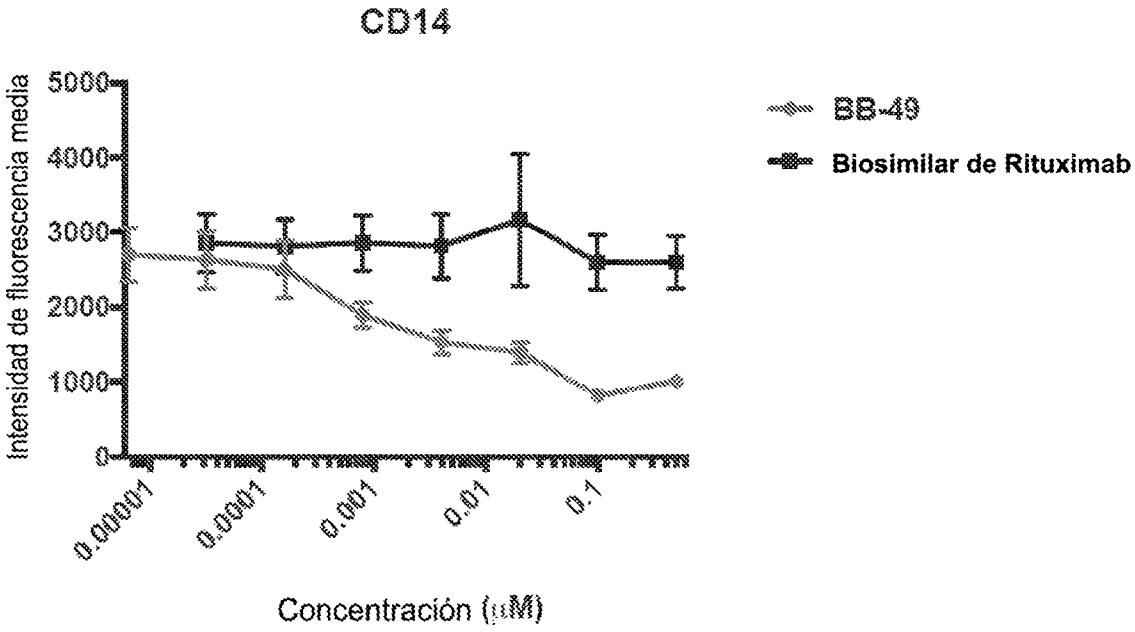


Fig. 135A

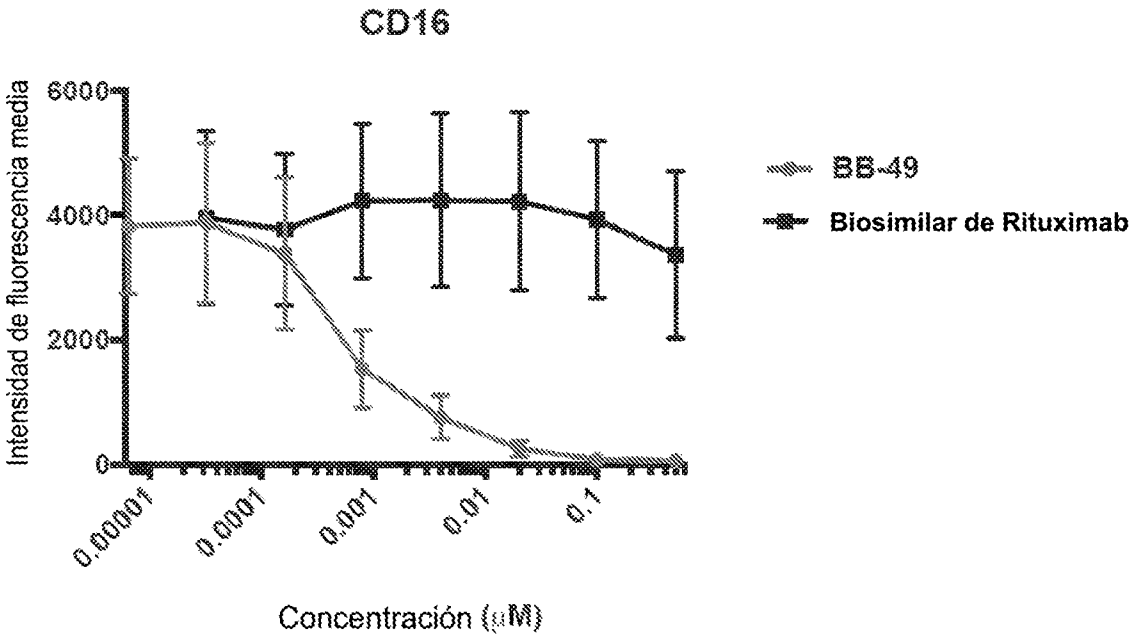


Fig. 135B

670

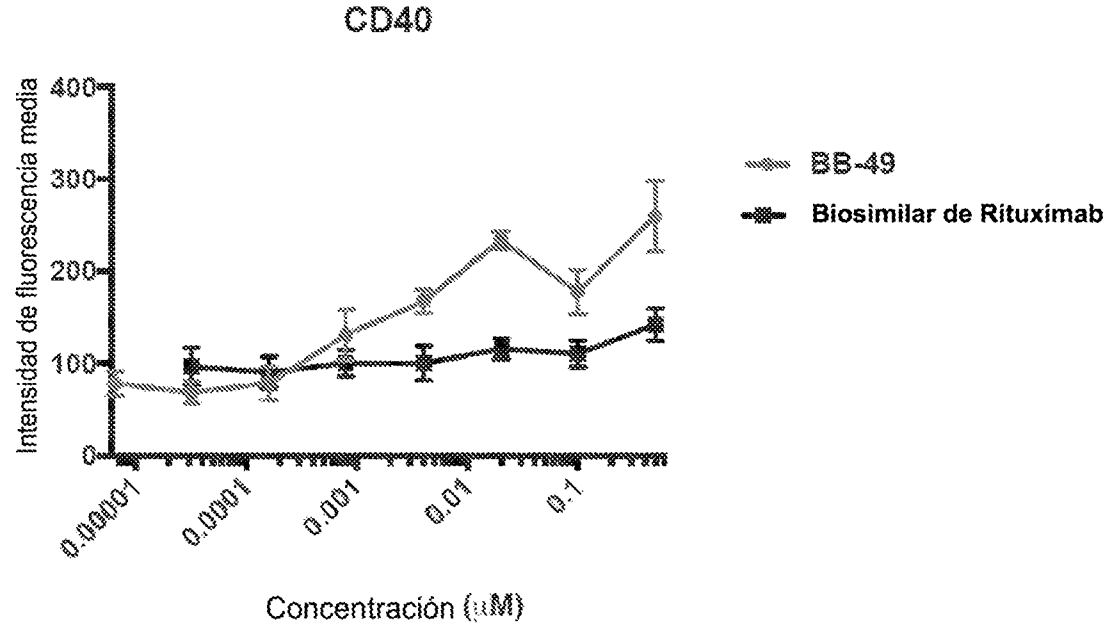


Fig. 135C

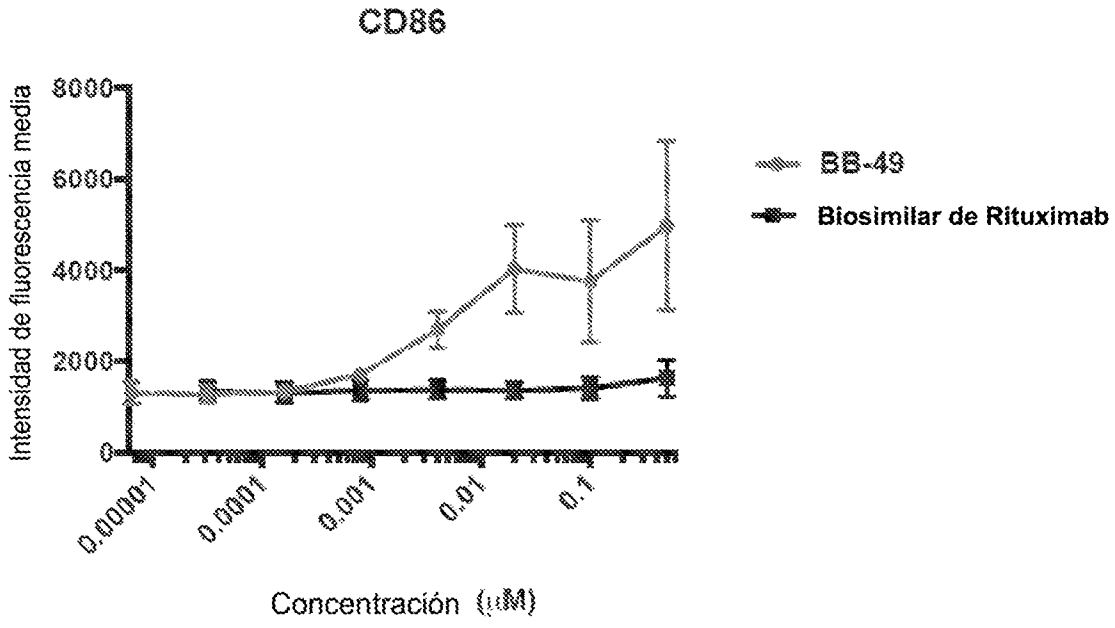


Fig. 135D

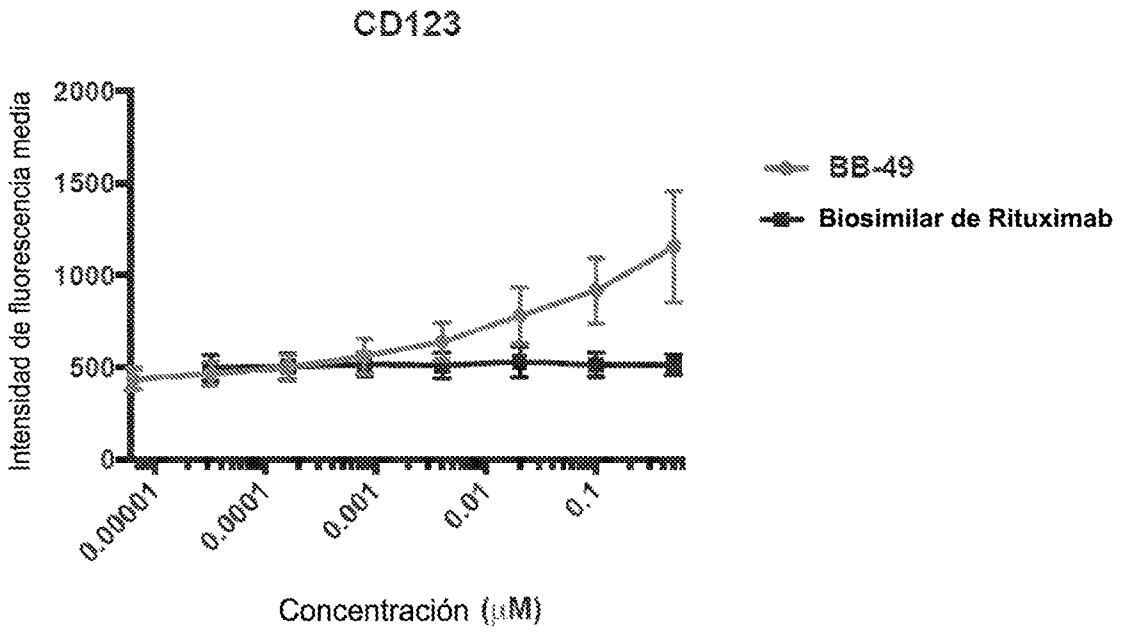


Fig. 135E

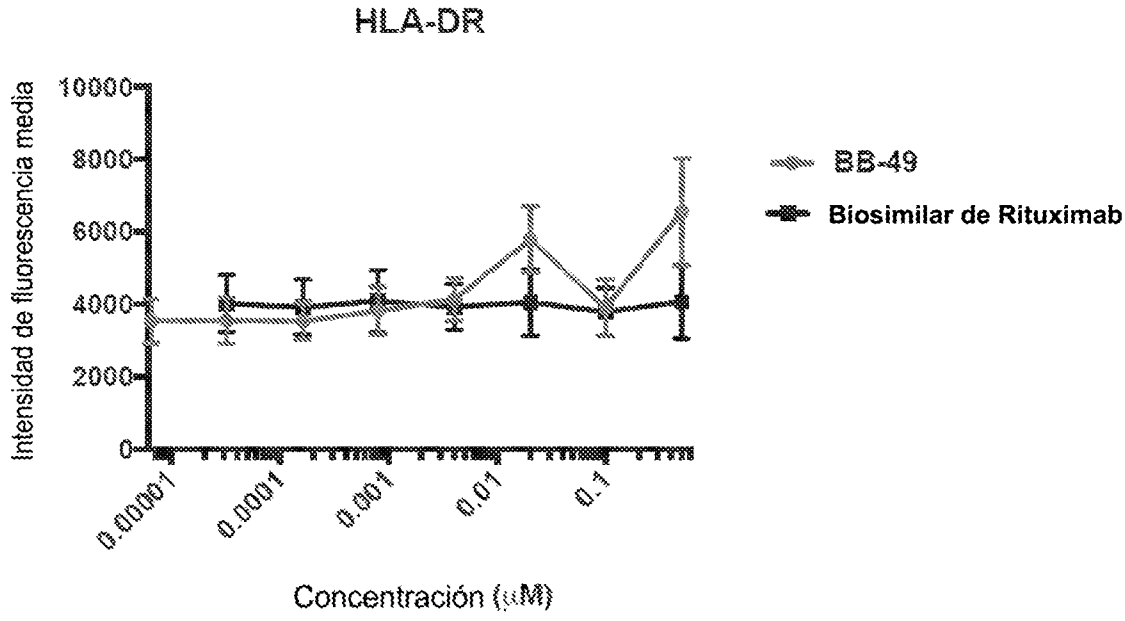


Fig. 135F

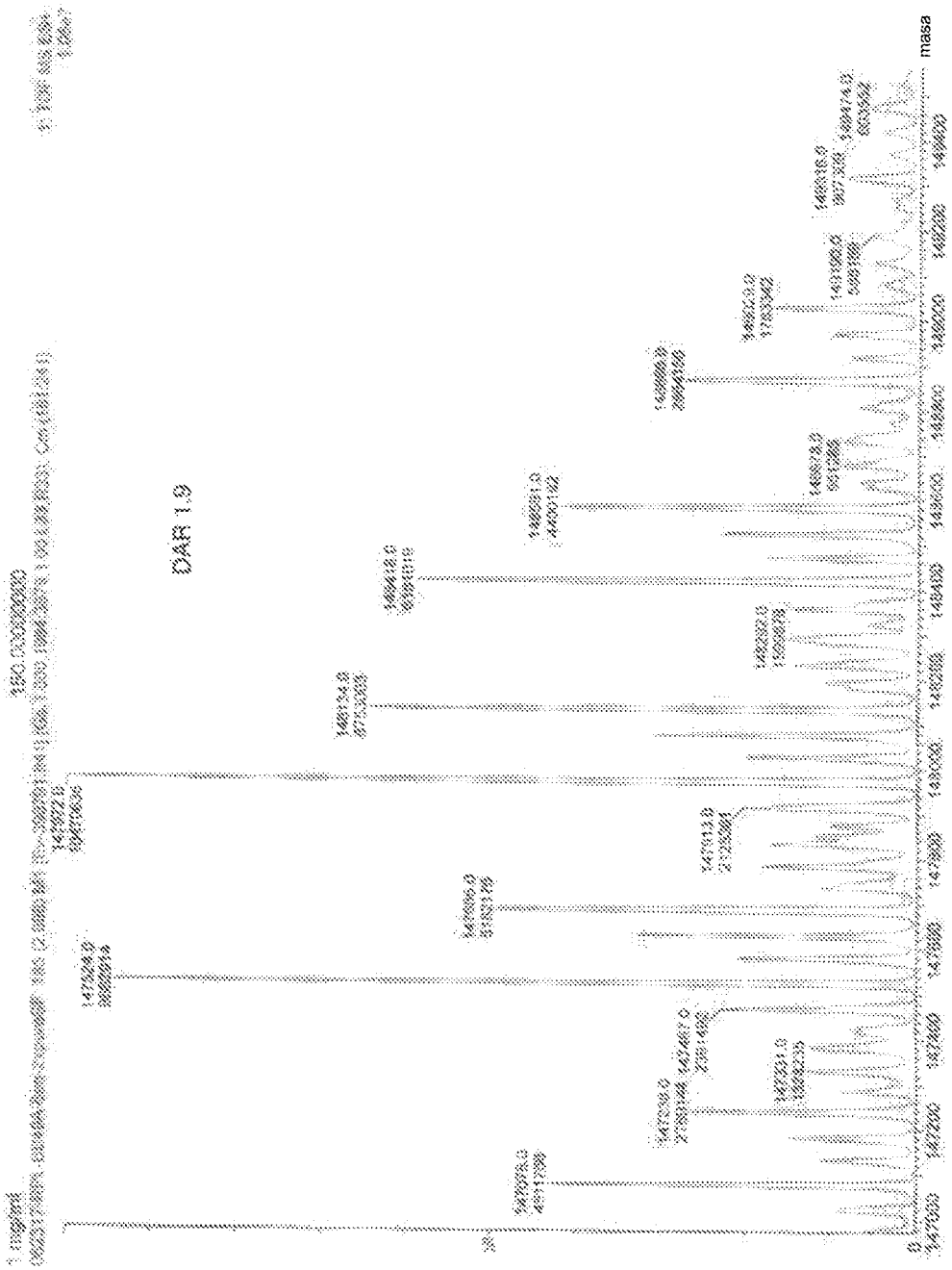


Fig. 135G

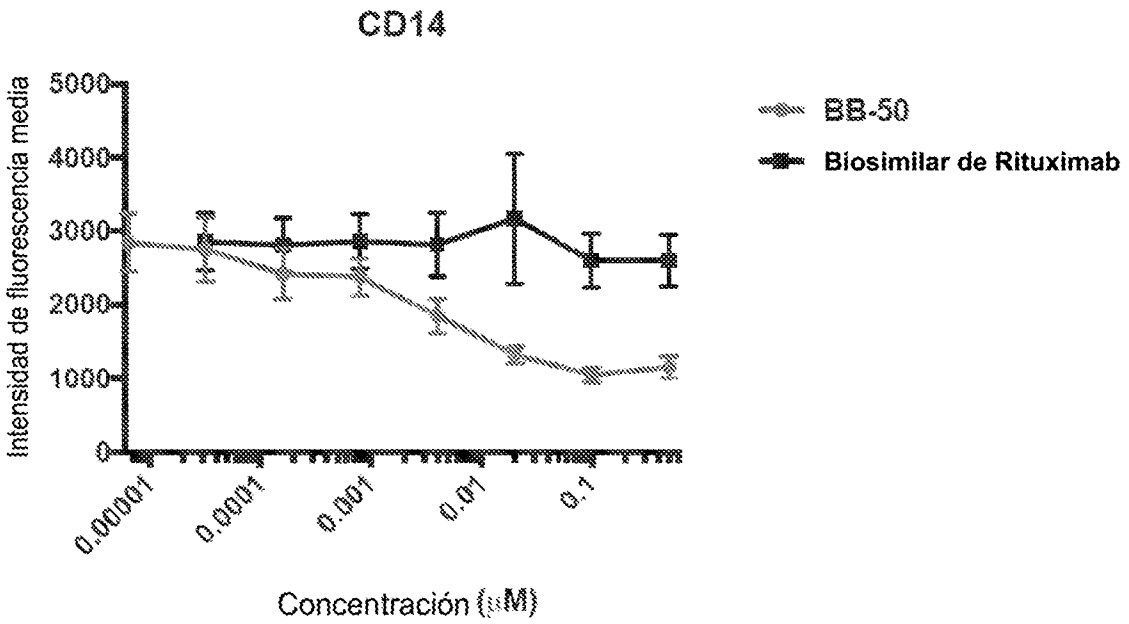


Fig. 136A

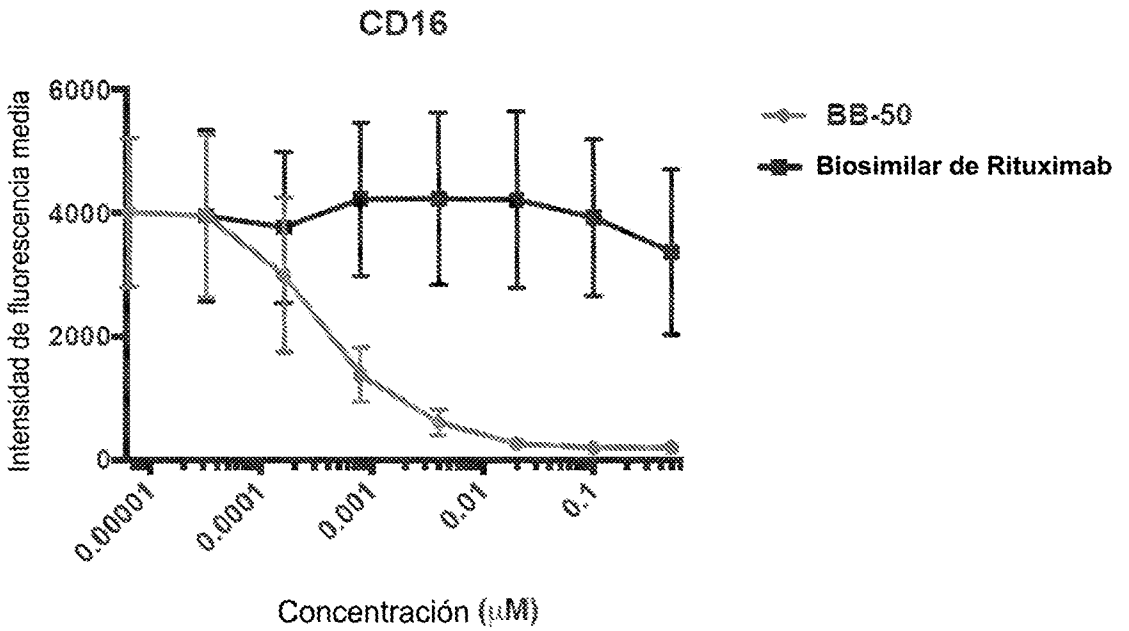


Fig. 136B

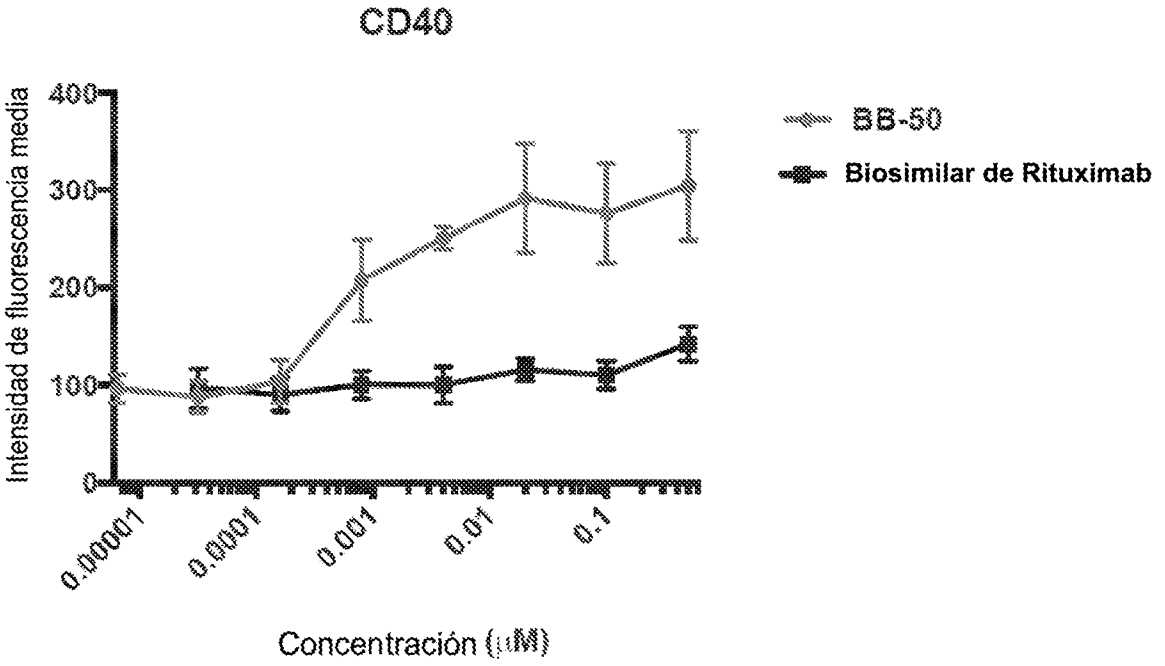


Fig. 136C

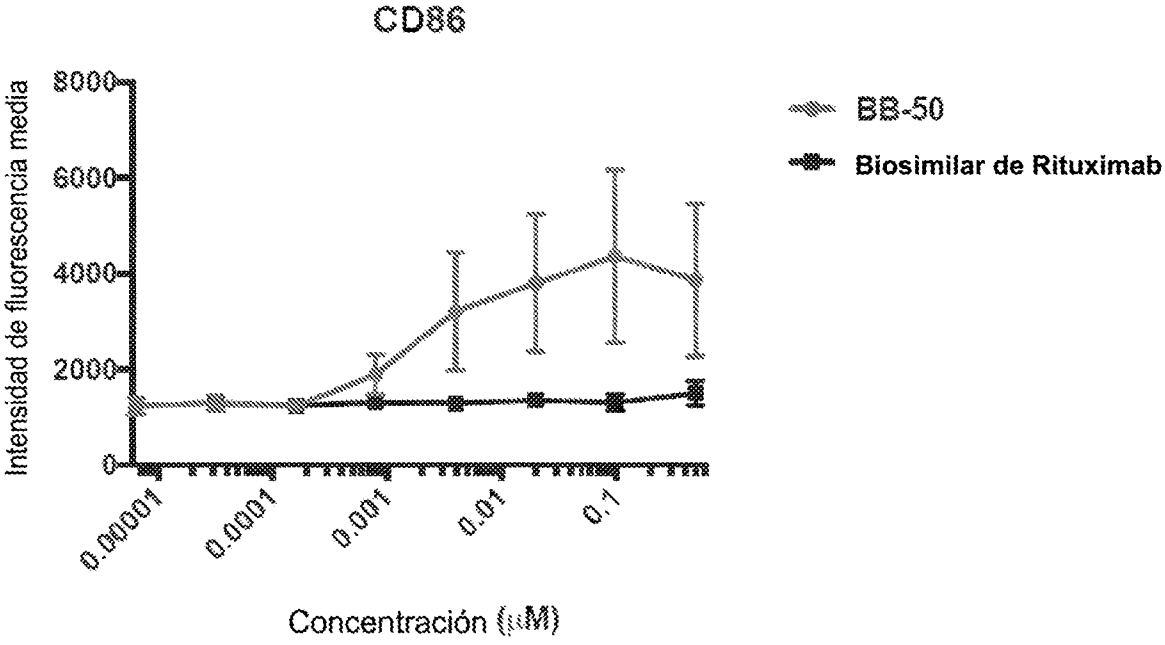


Fig. 136D

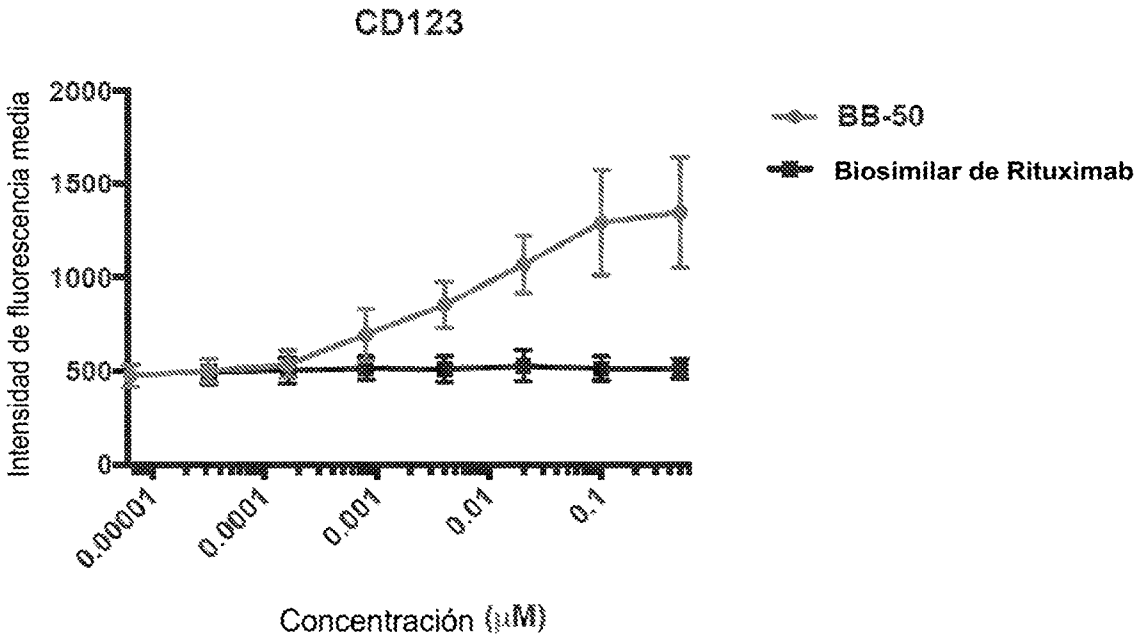


Fig. 136E

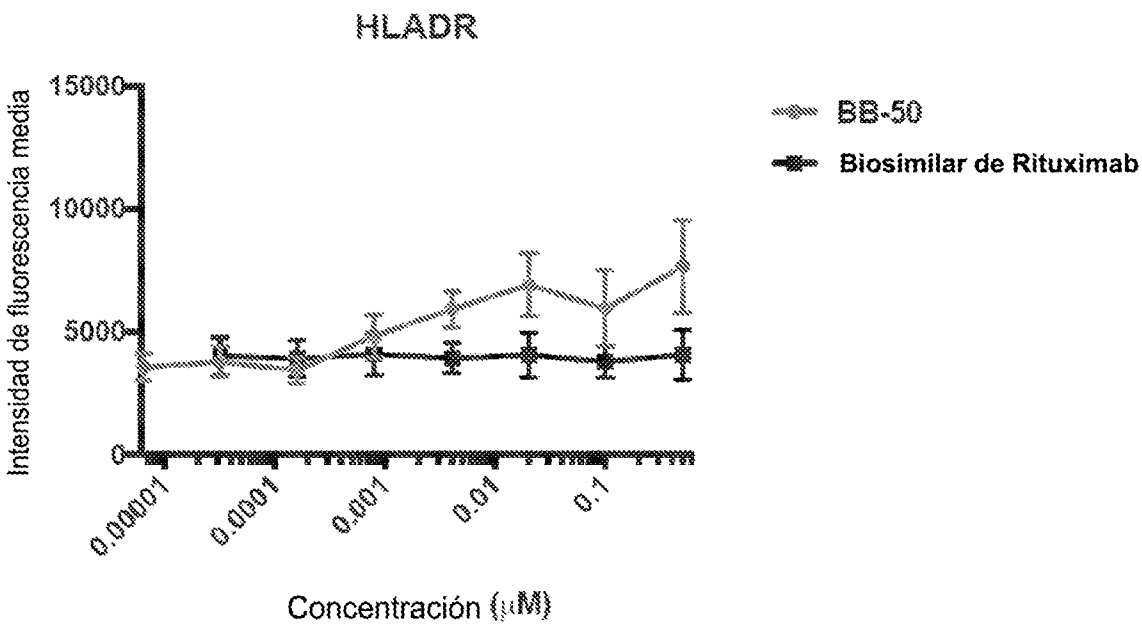


Fig. 136F

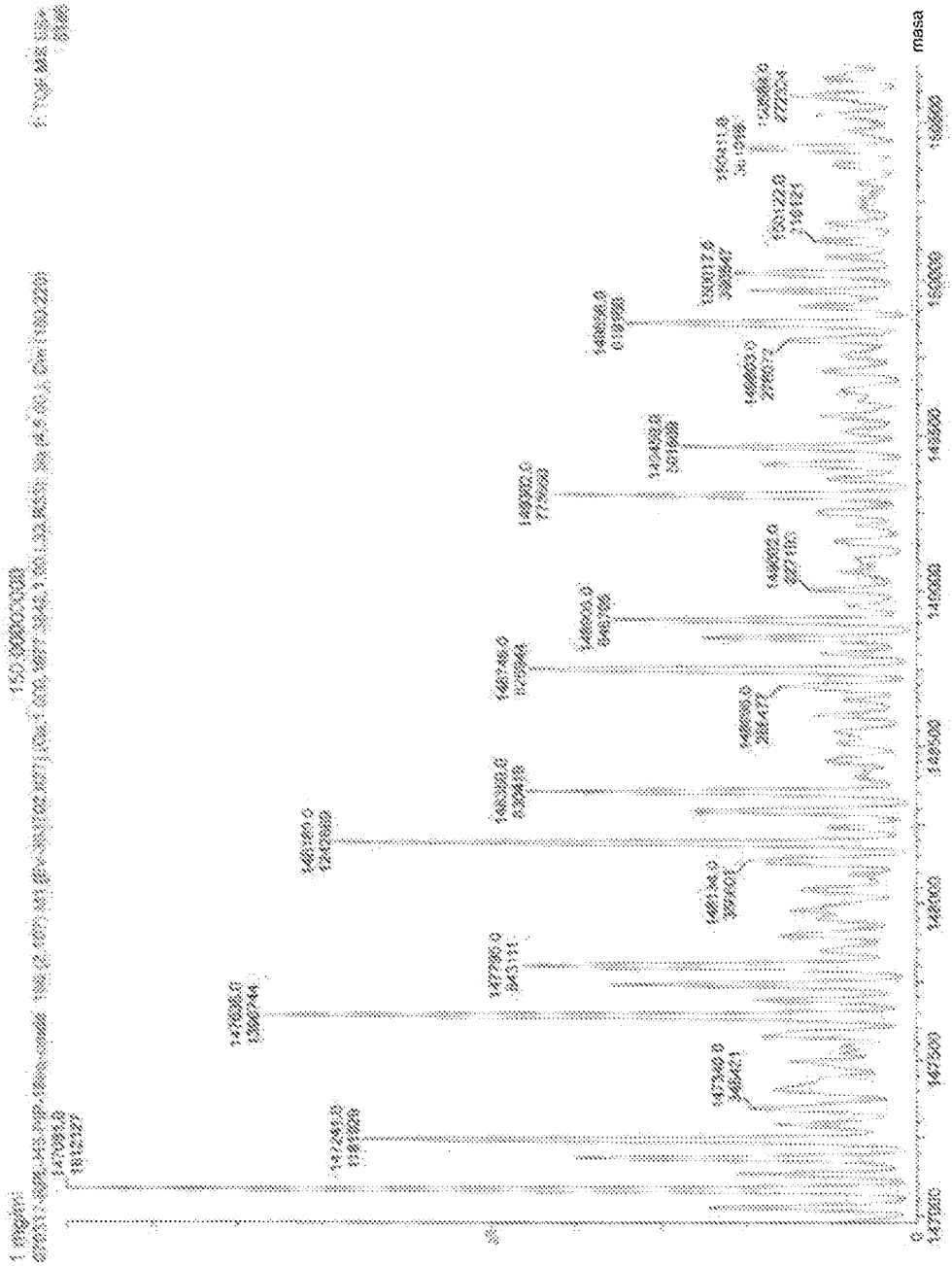


Fig. 136G

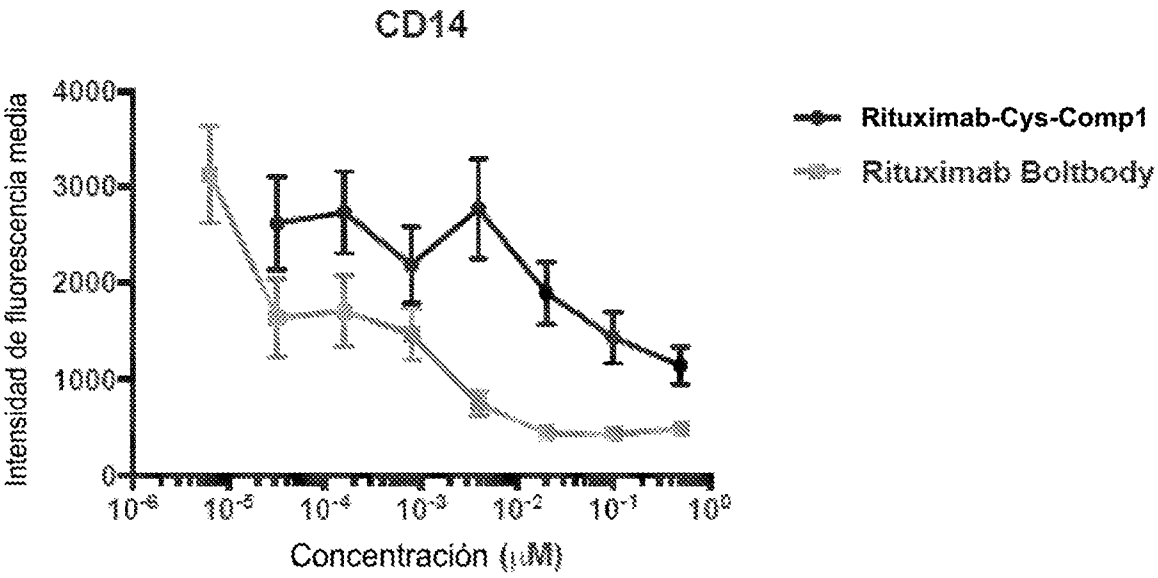


Fig. 137A

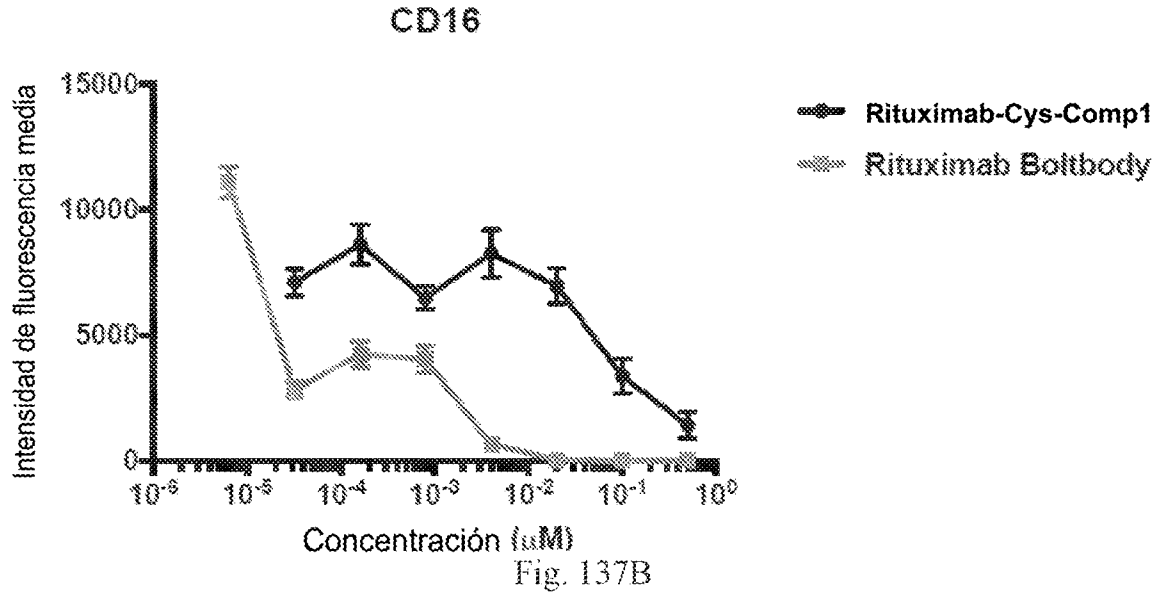


Fig. 137B

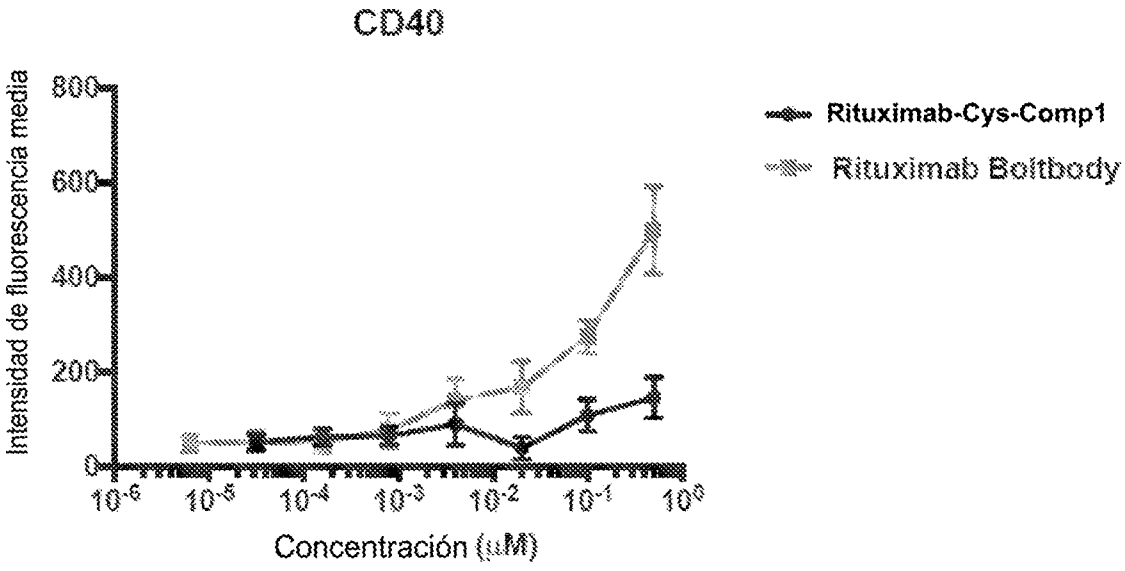


Fig. 137C

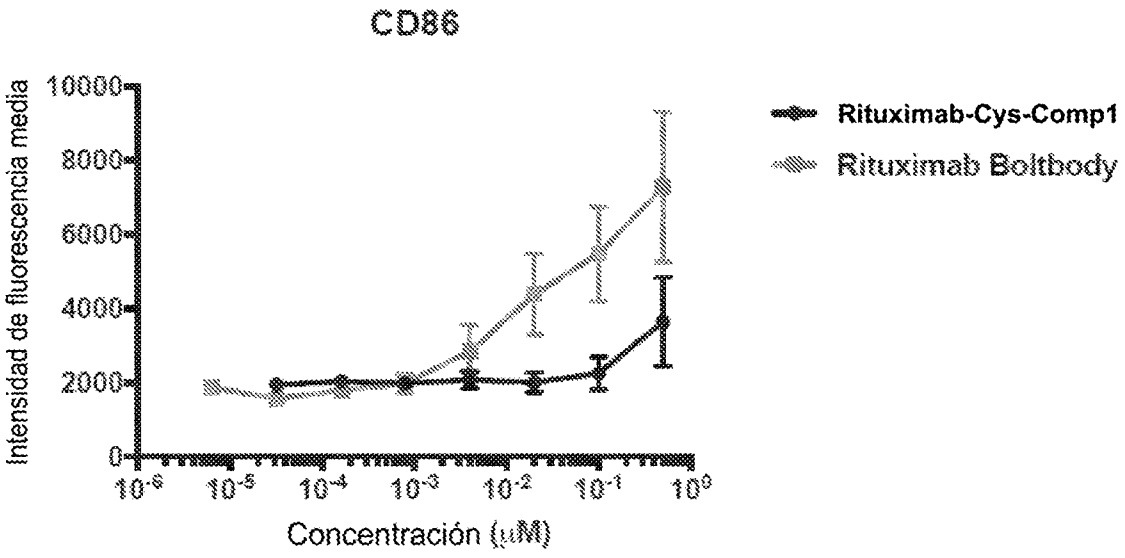


Fig. 137D

679

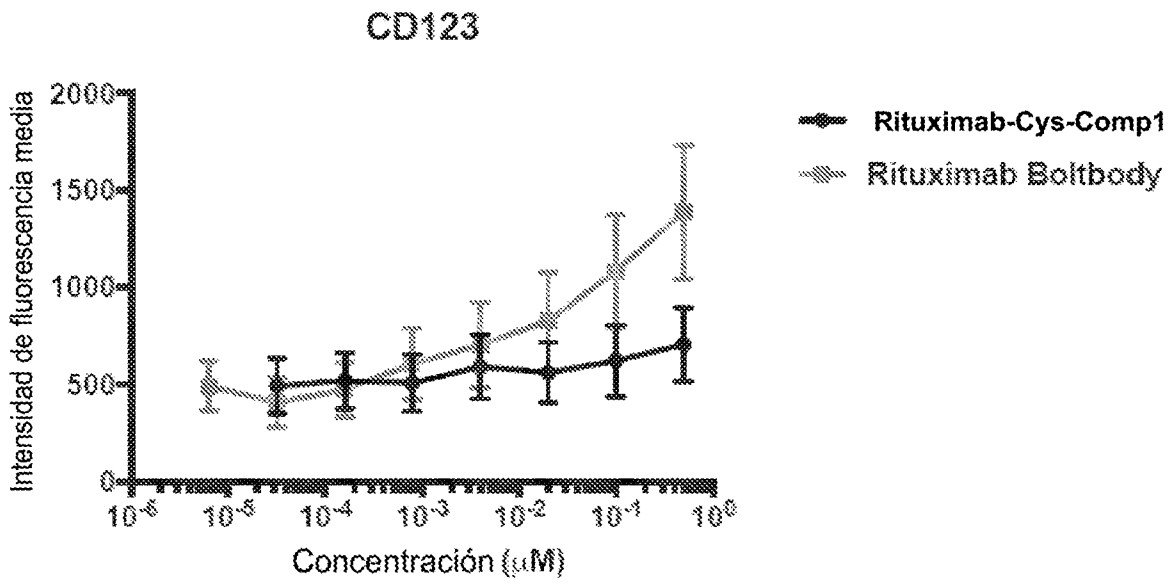

CD123
Intensidad de fluorescencia media
2000
1500
1000
500
0
10^{-6}
10^{-5}
10^{-4}
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
Concentración (μM)
Rituximab-Cys-Comp1
Rituximab Boltbody

Fig. 137E

680

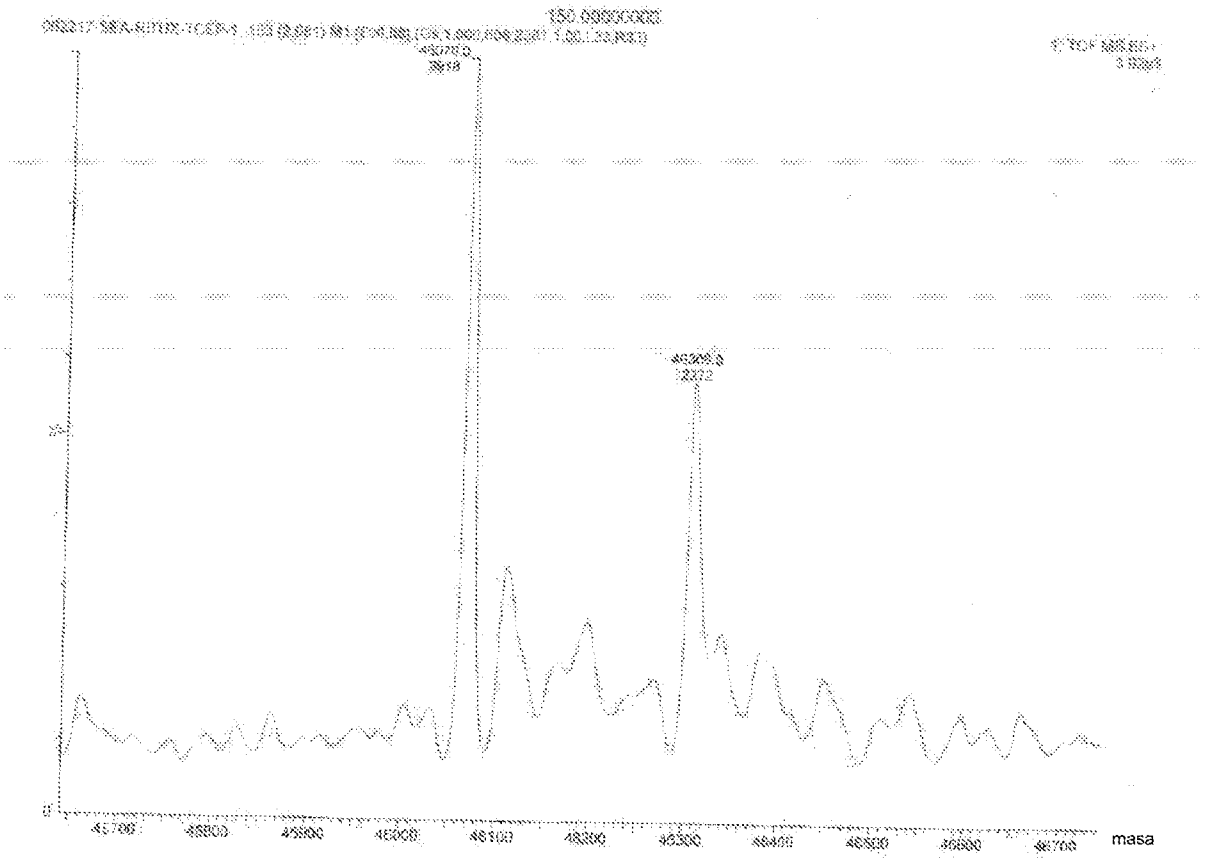


Fig. 137F

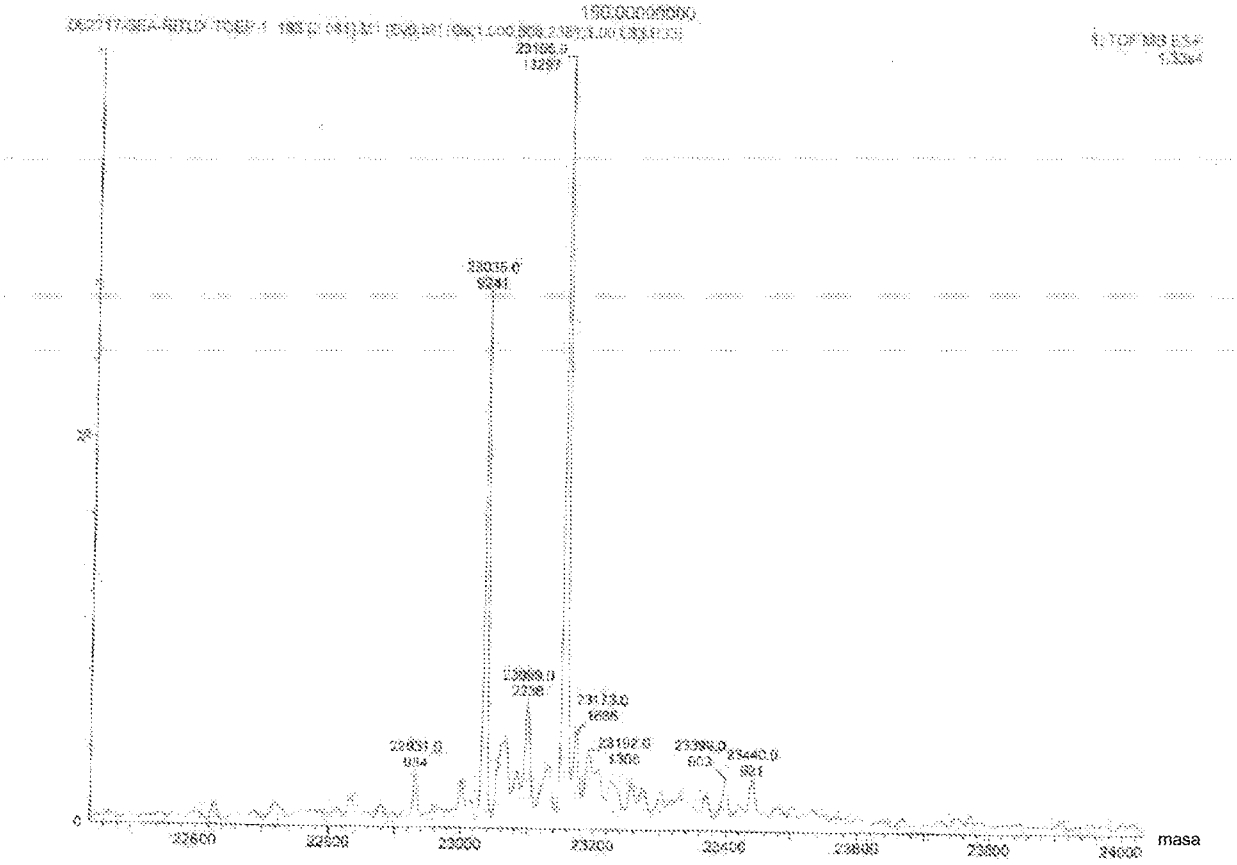


Fig. 137G

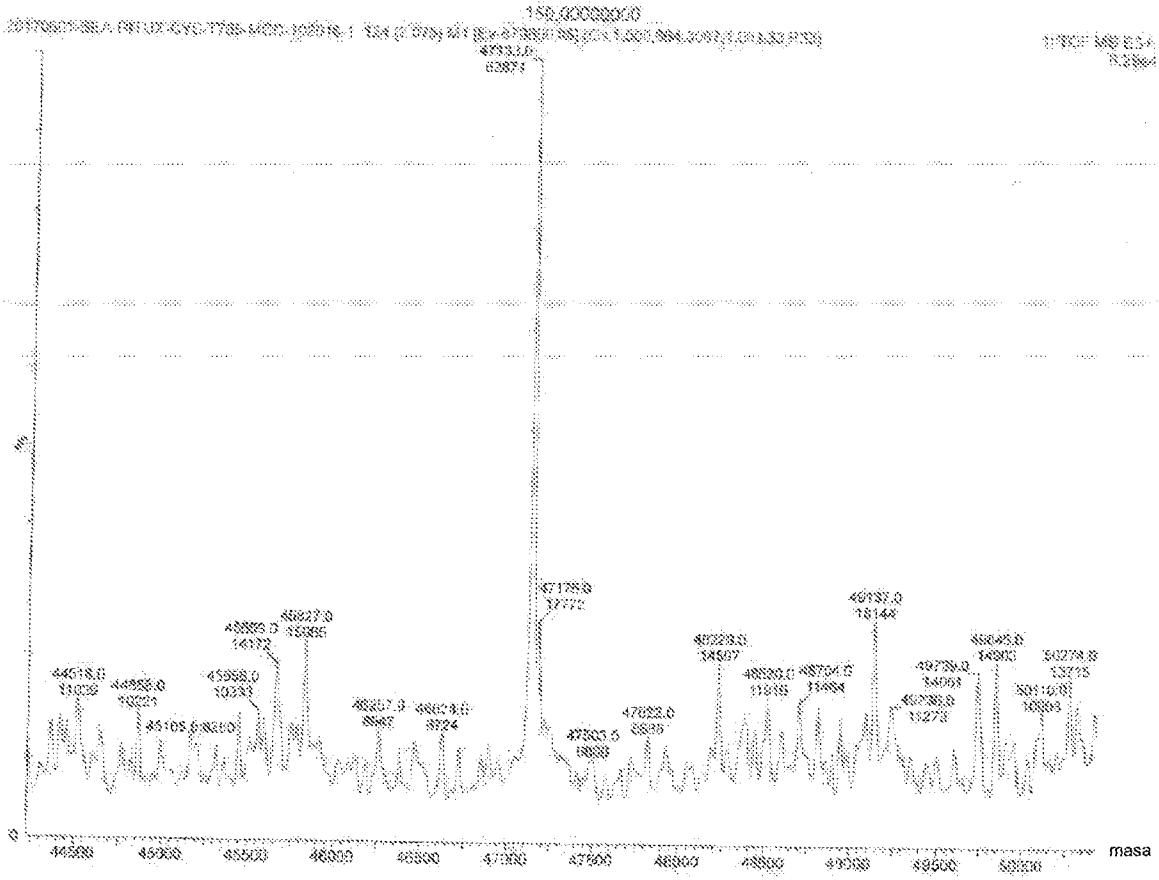


Fig. 137H

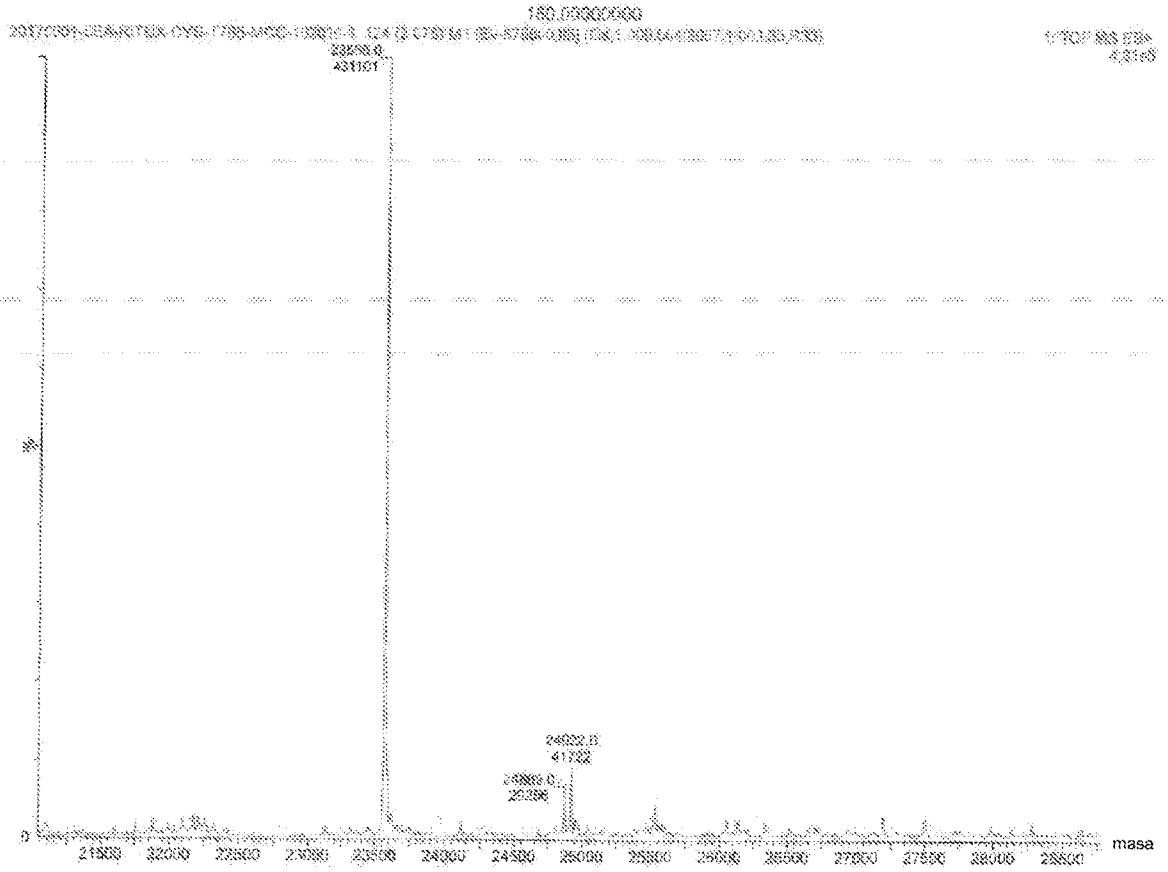


Fig. 137I

684

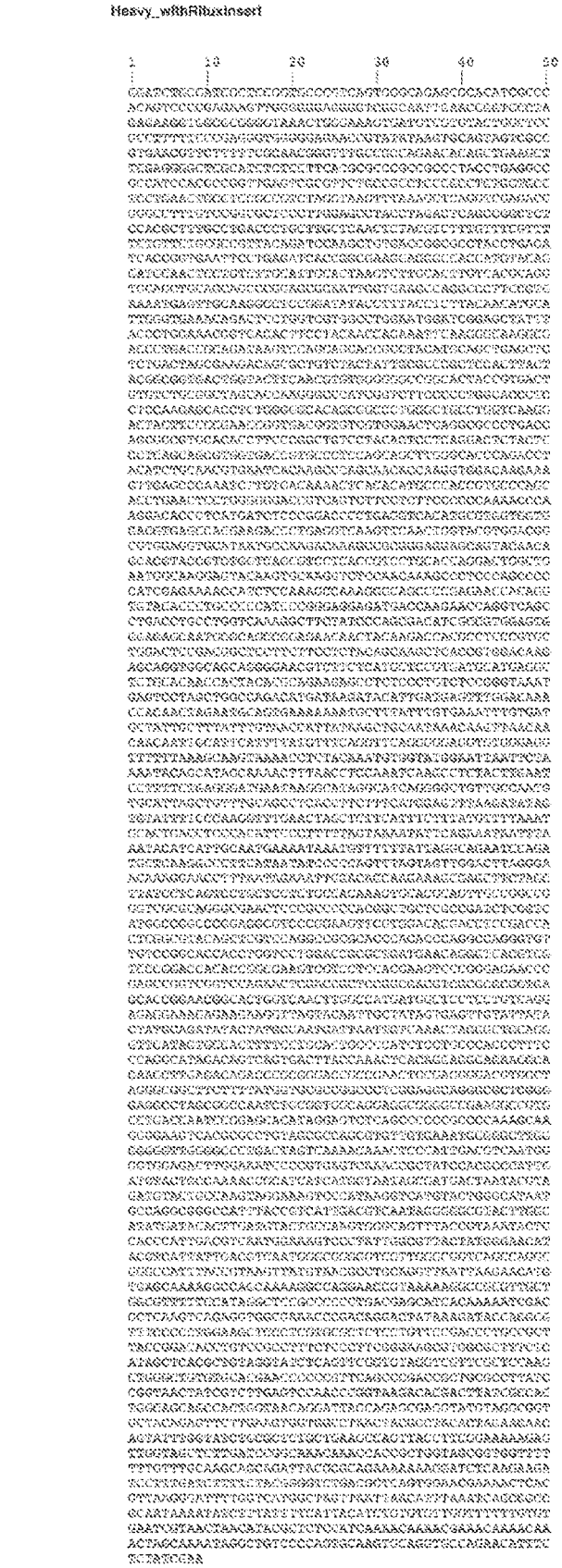


Fig. 138A

685

LC-V285C_withRituxInsert

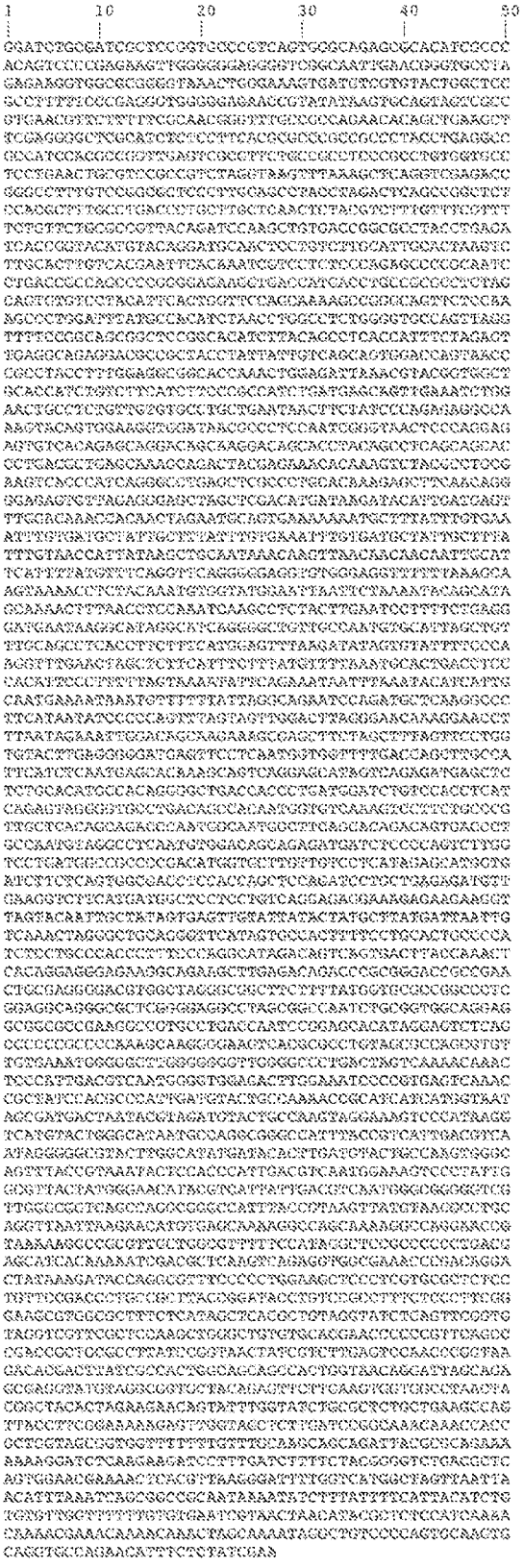


Fig. 138B

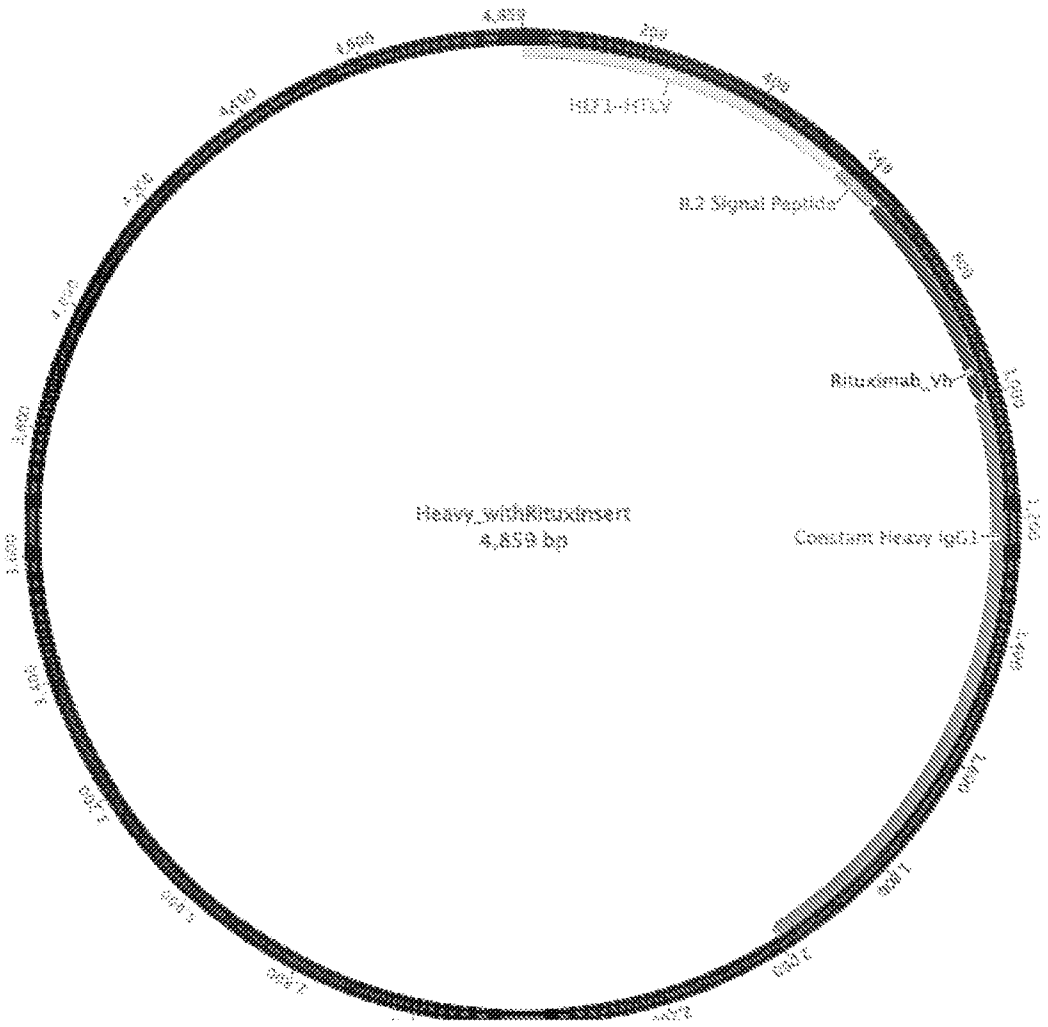

Heavy_withRituxInsert
8,859 bp
Rituximab_Vh
Constant Heavy (gG1)

Fig. 138C

687

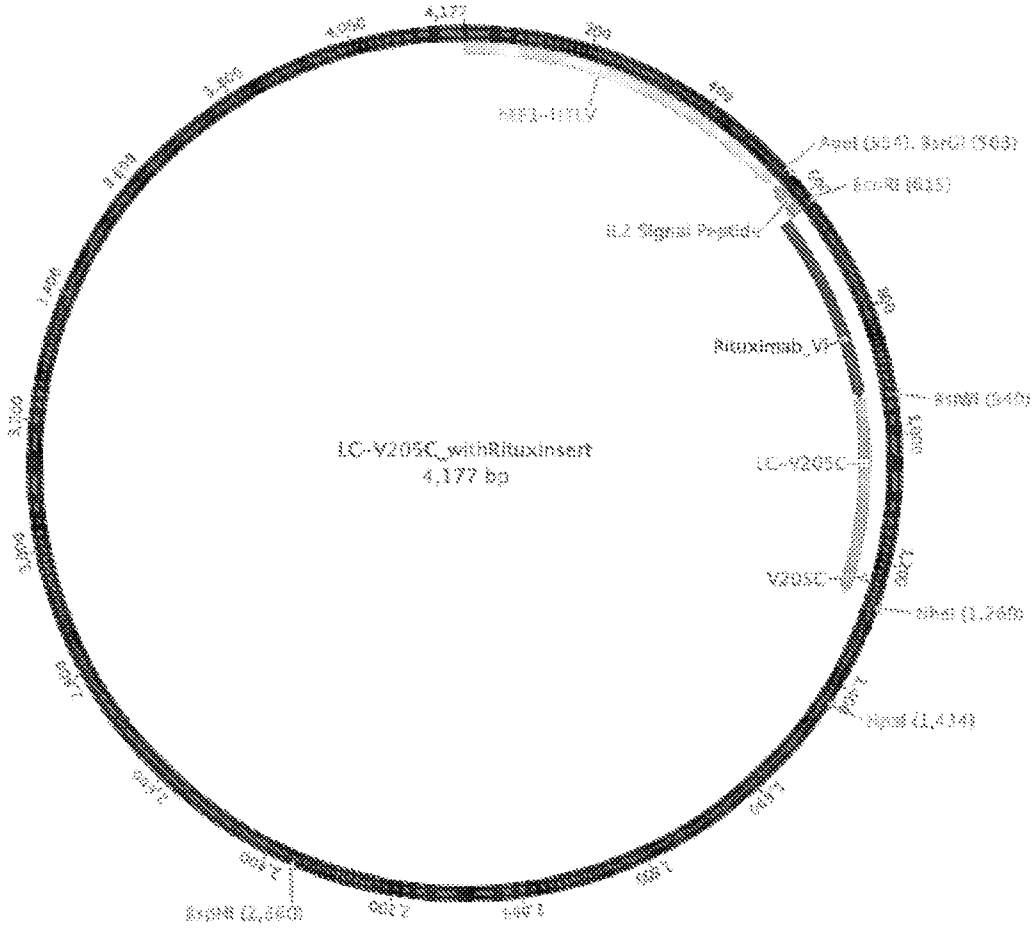

LC-V205C_withRituxinsert
4,177 bp
IL2 Signal Peptide
Rituximab_VH
LC-V205C
V205C
4,177
1
500
1,000
1,500
2,000
2,500
3,000
3,500
4,000

Fig. 138D

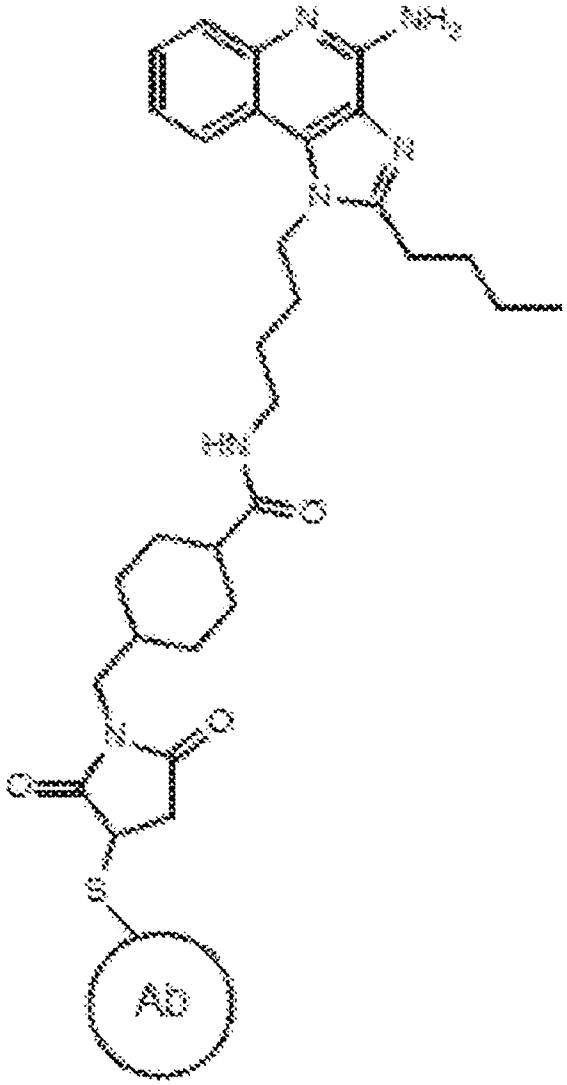


Fig. 138E

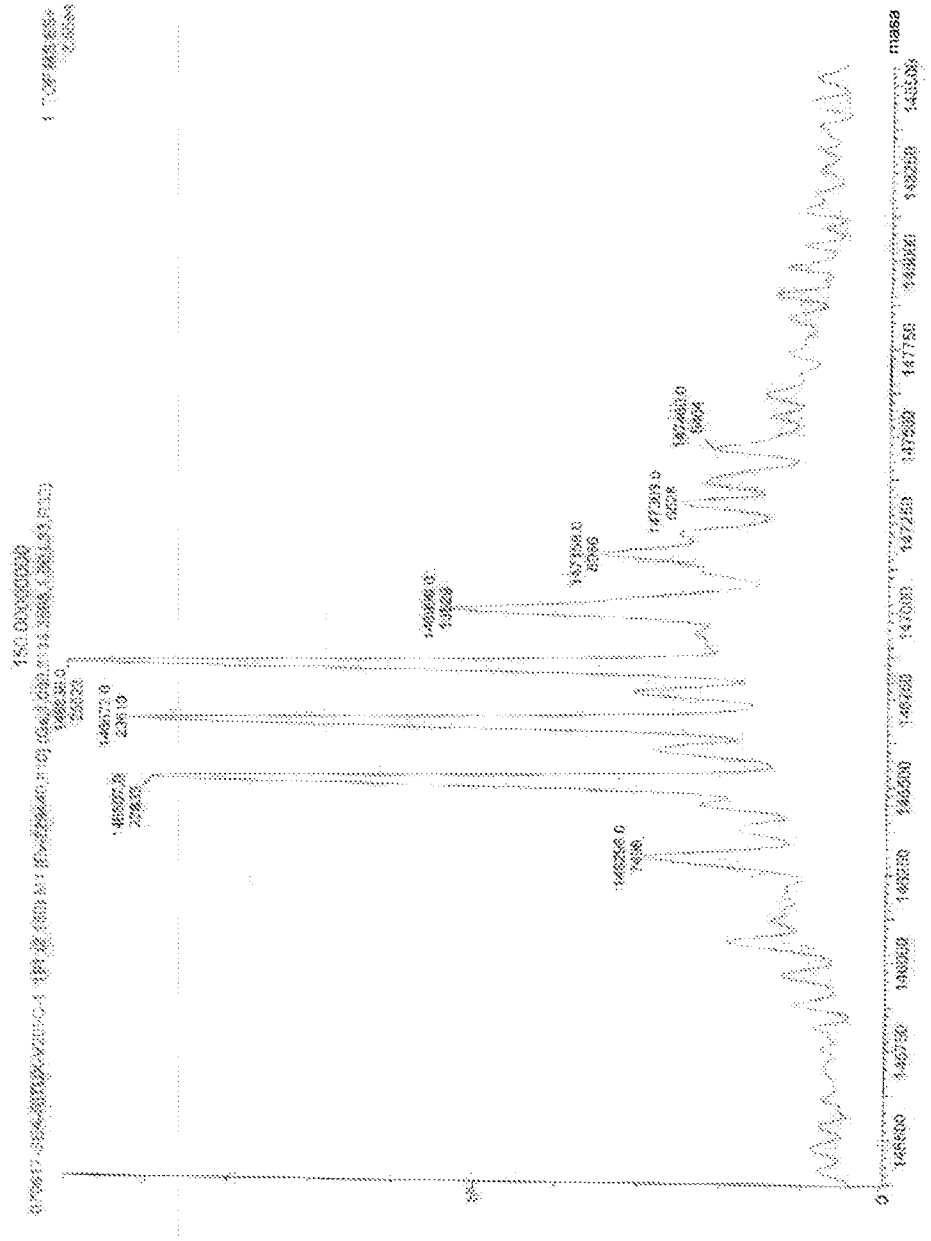


Fig. 138F

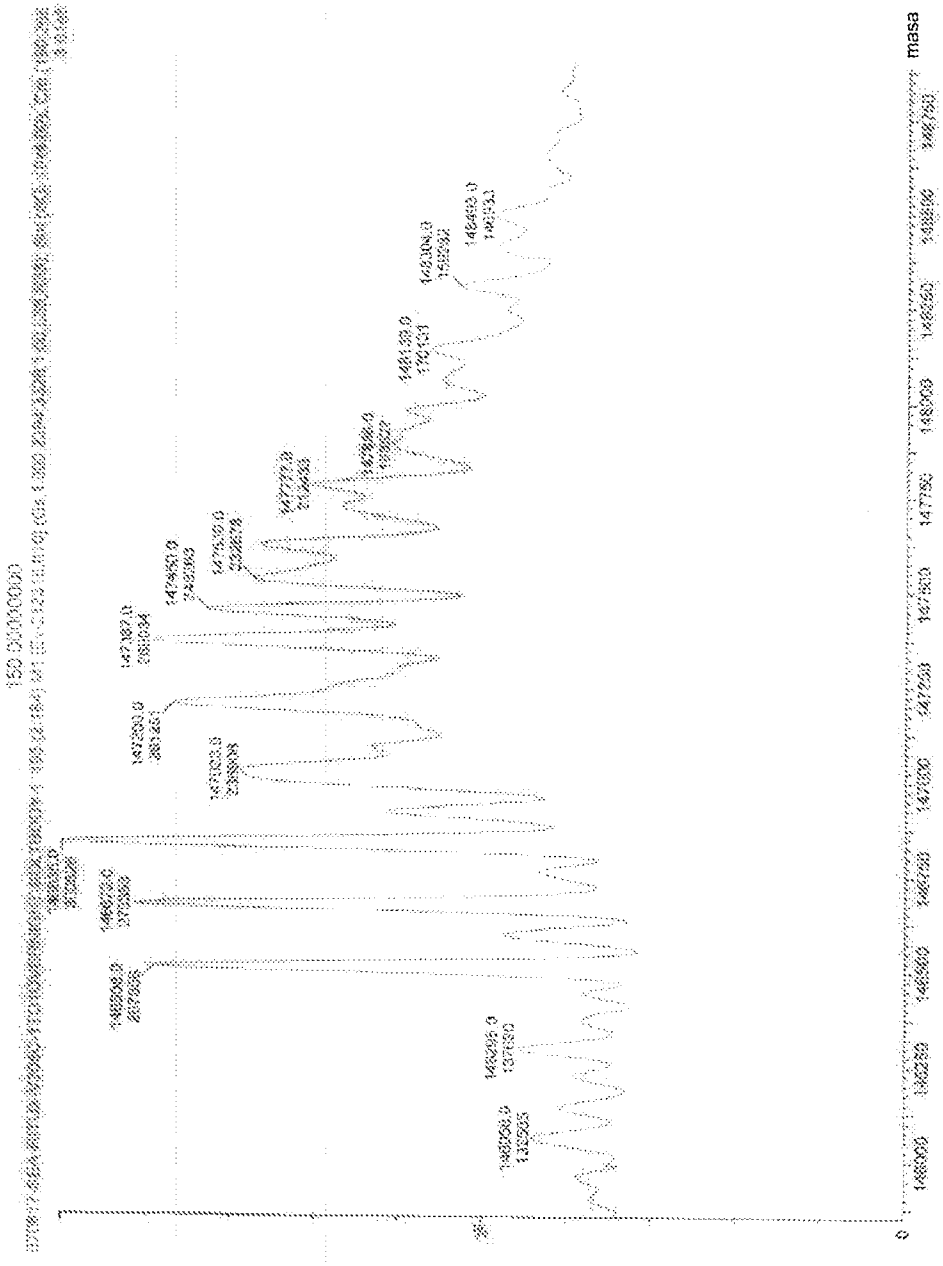


Fig. 138G