

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 877 548**

(51) Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 47/68** (2007.01)  
**A61P 37/06** (2006.01)  
**C07K 16/24** (2006.01)  
**C07J 71/00** (2006.01)  
**C07K 16/18** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.06.2017 PCT/US2017/035518**  
(87) Fecha y número de publicación internacional: **07.12.2017 WO17210471**  
(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2017 E 17733222 (8)**  
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.04.2021 EP 3464318**

---

(54) Título: **Agonista del receptor de glucocorticoides e inmunoconjungados del mismo**

(30) Prioridad:

**02.06.2016 US 201662344948 P**  
**04.08.2016 US 201662371134 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.11.2021**

(73) Titular/es:

**ABBVIE INC. (100.0%)**  
**1 North Waukegan Road**  
**North Chicago, IL 60064, US**

(72) Inventor/es:

**MCPHERSON, MICHAEL J.;**  
**HOBSON, ADRIAN D.;**  
**HAYES, MARTIN E.;**  
**MARVIN, CHRISTOPHER C.;**  
**SCHMIDT, DIANA;**  
**WAEGELL, WENDY;**  
**GOESS, CHRISTIAN;**  
**OH, JASON Z.;**  
**HERNANDEZ JR., AXEL y**  
**RANDOLPH, JOHN T.**

(74) Agente/Representante:

**SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio**

**ES 2 877 548 T3**

---

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

## DESCRIPCIÓN

Agonista del receptor de glucocorticoides e inmunoconjungados del mismo

5 Campo de la invención

El campo de la invención se refiere generalmente a inmunoconjungados agonistas del receptor de glucocorticoides y métodos para preparar y usar los mismos, por ejemplo, para tratar enfermedades autoinmunes o inflamatorias.

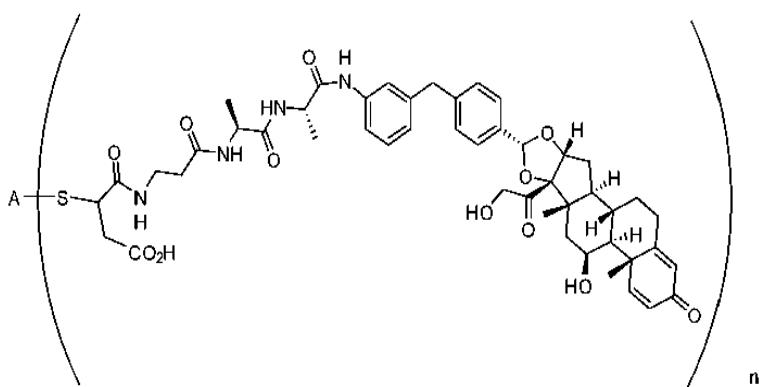
10 Antecedentes de la invención

El factor de necrosis tumoral alfa (TNFa) juega un papel central en la fisiopatología de varios trastornos humanos, y los agentes anti-TNFa (por ejemplo, adalimumab, etanercept e infliximab) tienen una utilidad terapéutica clínicamente validada en el tratamiento de trastornos autoinmunitarios e inflamatorios, como artritis reumatoide, psoriasis y enfermedad inflamatoria intestinal. A pesar de su éxito en la clínica, los biológicos anti-TNFa todavía están limitados en la eficacia máxima que pueden lograr en los pacientes, lo que requiere la identificación y el desarrollo de terapéuticas más potentes y efectivas. Los pacientes tratados con biológicos anti-TNFa también pueden desarrollar una respuesta inmunogénica a la terapéutica, lo que limita así su eficacia. Por lo tanto, las terapéuticas anti-TNFa con menor inmunogenicidad y alta eficacia serían útiles para controlar aún más la enfermedad.

20 Los agonistas de los receptores de glucocorticoides sintéticos (por ejemplo, dexametasona, prednisolona y budesonida) son una clase potente de moléculas pequeñas que se usan en el tratamiento de trastornos inflamatorios, pero su utilidad en el tratamiento crónico de enfermedades es limitada debido a los efectos secundarios graves. Se han descrito varios enfoques para conservar la eficacia antiinflamatoria de los glucocorticoides sintéticos mientras se evitan las toxicidades no deseadas (Rosen, J y Miner, JN Endocrine Reviews 26: 452-64 (2005)). Sin embargo, estas metodologías han tenido poco éxito. Existe una necesidad en el campo de las terapéuticas de enfermedades inflamatorias y autoinmunes para desarrollar terapéuticas con una eficacia mejorada y una acción de mayor duración en comparación con los anticuerpos anti-TNF y con efectos no deseados mínimos.

30 Breve resumen de la invención

35 La presente invención proporciona un compuesto:



40 en donde n es 2 o 4, y A es un anticuerpo que comprende SEQ ID NO: 66 y SEQ ID NO: 73 o adalimumab. En otras modalidades de la invención, n es 4. En otras modalidades de la invención, n es 2. En otras modalidades de la invención, A es adalimumab.

45 50 55 Breve descripción de los dibujos/figuras

La Figura 1 muestra la estabilidad proteolítica de un ADC que contiene un esteroide y un ADC que contiene MMAE (monometil auristatina E). (Vea el ejemplo 76).

60 La Figura 2 muestra la cinética de la pérdida de ADC esteroidal en el enlazador de fármacos en ratones. (Vea el ejemplo 77).

La Figura 3 muestra la actividad de una respuesta a una dosis terapéutica única de ADC esteroidal anti-mTNFa en un modelo de artritis en ratón. (Vea el ejemplo 85.)

La Figura 4 muestra la actividad del esteroide anti-TNFa humano en el modelo de artritis de ratón huTNFa Tg CAIA. (Vea el ejemplo 87).

65 La Figura 5 es un cromatograma HIC que muestra una mezcla heterogénea que contiene anticuerpos que tienen cero moléculas SM-LQ unidas (pico "E0"), dos moléculas SM-LQ unidas (pico "E2"), cuatro moléculas SM-LQ

unidas (pico "E4"), restos SM-LQ unidos (pico "E6") y ocho moléculas SM-LQ unidas (pico"E8"), en dependencia del número de enlaces disulfuro entre cadenas que se han reducido. (SM es un radical de un glucocorticosteroide; L es un enlazador y Q es un grupo heterobifuncional o grupo heterotrifuncional; o Q está ausente). (Vea el ejemplo 74).

5 La Figura 6 es un cromatograma SEC de adalimumab conjugado con un glucocorticosteroide. (Vea el ejemplo 74).

La Figura 7 es un gráfico de líneas que muestra datos de MS sin procesar de adalimumab conjugado con un glucocorticosteroide. (Vea el ejemplo 74).

10 La Figura 8 es un gráfico de líneas que muestra datos de EM deconvolucionado de adalimumab conjugado con un glucocorticosteroide. El cuadrado negro y el círculo representan el ADC con succinimida hidrolizada y no hidrolizada, respectivamente. La abundancia relativa de ADC hidrolizado y no hidrolizado se usa para determinar la conversión de hidrólisis. (Vea el ejemplo 74).

15 La Figura 9 muestra que un ADC esteroidal anti-TNF es significativamente más eficaz para reducir la inflamación del oído en ratones que la combinación concurrente del anticuerpo anti-TNF y el esteroide o el anticuerpo anti-TNF solo. (Vea el ejemplo 84).

20 La Figura 10 muestra que una dosis única de un ADC esteroidal anti-TNF es tan eficaz para reducir la hinchazón de la pata como 21 días de dosificación diaria de un esteroide. (Vea el ejemplo 85).

La Figura 11 muestra el cambio de peso de los animales tratados con esteroides, un anticuerpo anti-TNF, un ADC anti-TNF o un isótipo ADC. (Vea el ejemplo 85).

25 La Figura 12 muestra que una dosis única de un ADC esteroidal anti-TNF puede reducir la hinchazón establecida de la pata, mientras que una dosis única de un anticuerpo anti-TNF tuvo un efecto mínimo. (Vea el ejemplo 88).

La Figura 13 muestra el efecto del tratamiento con un ADC esteroidal anti-TNF sobre la pérdida ósea del tarso medida por micro-tomografía computarizada ( $\mu$ CT). (Los puntos de datos individuales (por ejemplo, círculos, cuadrados o triángulos) representan animales individuales). (Vea el ejemplo 88).

30 La Figura 14 muestra el efecto del tratamiento con un ADC esteroidal anti-TNF sobre la inflamación. (Los puntos de datos individuales (por ejemplo, círculos, cuadrados o triángulos) representan animales individuales). (Vea el ejemplo 88).

La Figura 15 muestra el efecto del tratamiento con un ADC esteroidal anti-TNF sobre la formación de pannus. (Los puntos de datos individuales (por ejemplo, círculos, cuadrados o triángulos) representan animales individuales). (Vea el ejemplo 88).

35 La Figura 16 muestra el efecto del tratamiento con un ADC esteroidal anti-TNF sobre la erosión ósea. (Los puntos de datos individuales (por ejemplo, círculos, cuadrados o triángulos) representan animales individuales). (Vea el ejemplo 88).

La Figura 17 muestra el efecto del tratamiento con un ADC esteroidal anti-TNF sobre el daño del cartílago. (Los puntos de datos individuales (por ejemplo, círculos, cuadrados o triángulos) representan animales individuales). (Vea el ejemplo 88).

40 La Figura 18 muestra el efecto del tratamiento con un ADC esteroidal anti-TNF sobre glóbulos blancos en sangre periférica. (Los puntos de datos individuales (por ejemplo, círculos, cuadrados o diamantes) representan animales individuales). (Vea el ejemplo 88).

La Figura 19 muestra el efecto del tratamiento con un ADC esteroidal anti-TNF sobre neutrófilos en sangre periférica. (Los puntos de datos individuales (por ejemplo, círculos, cuadrados o diamantes) representan animales individuales). (Vea el ejemplo 88).

45 La Figura 20 muestra el efecto del tratamiento con un ADC esteroidal anti-TNF sobre linfocitos en sangre periférica. (Los puntos de datos individuales (por ejemplo, círculos, cuadrados o diamantes) representan animales individuales). (Vea el ejemplo 88).

La Figura 21 muestra el efecto del tratamiento con un ADC esteroidal anti-TNF sobre monocitos en sangre periférica. (Los puntos de datos individuales (por ejemplo, círculos, cuadrados o diamantes) representan animales individuales). (Vea el ejemplo 88).

50 La Figura 22 muestra el efecto del tratamiento con un ADC esteroidal anti-TNF sobre eosinófilos en sangre periférica. (Vea el ejemplo 88).

La Figura 23 muestra el efecto del tratamiento con un ADC esteroidal anti-TNF sobre basófilos en sangre periférica. (Vea el ejemplo 88).

55 La Figura 24 muestra la actividad de un ADC esteroidal anti-TNF y un ADC esteroidal anti-CD 163 en artritis inducida por colágeno de ratón. (Vea el ejemplo 89.)

#### 55 Descripción detallada de la invención

##### I. Definiciones

60 Para facilitar la comprensión de la presente descripción, a continuación se definen varios términos y frases.

El término "proteína anti-TNF alfa" se refiere a proteínas que son capaces de (i) unirse a TNF alfa e (ii) inhibir la unión de TNF-alfa soluble a receptores de TNF de la superficie celular (p55 y/o p75) y/o lisar células que expresan el receptor de TNF alfa o TNF alfa de superficie *in vitro* en presencia de complemento. Las proteínas anti-TNF alfa incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-TNF o fragmentos de unión a antígeno de los mismos (por ejemplo, adalimumab o infliximab) así como receptores de TNF solubles (por ejemplo, etanercept).

Como se usa en la presente descripción, los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" son términos de la técnica y se pueden usar indistintamente en la presente descripción y se refieren a una molécula con un sitio de unión al antígeno que se une específicamente a un antígeno.

- 5 El término "anticuerpo" significa una molécula de inmunoglobulina que reconoce y se une específicamente a una diana, como una proteína, polipéptido, péptido, carbohidrato, polinucleótido, lípido o combinaciones de los anteriores a través de al menos un sitio de reconocimiento del antígeno dentro de la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en la presente descripción, el término "anticuerpo" abarca anticuerpos policlonales intactos, anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos químéricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada siempre que los anticuerpos exhiban la actividad biológica deseada. Un anticuerpo puede ser de cualquiera de las cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, o subclases (isotipos) de las mismas (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), basado en la identidad de sus dominios constantes de cadena pesada denominadas alfa, delta, epsilon, gamma y mu, respectivamente. Las diferentes clases de inmunoglobulinas tienen estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales diferentes y bien conocidas. Los anticuerpos pueden estar desnudos o conjugados con otras moléculas tales como toxinas, radioisótopos, etc. Como se usa en la presente descripción, el término "anticuerpo" abarca anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- El término "fragmento de anticuerpo" se refiere a una porción de un anticuerpo intacto. Un "fragmento de unión al antígeno" se refiere a una porción de un anticuerpo intacto que se une a un antígeno. Un fragmento de unión al antígeno puede contener las regiones variables determinantes de antígeno de un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, Fab', F(ab')2 y Fv, anticuerpos lineales y anticuerpos monocatenarios. Un "fragmento de unión al antígeno" puede ser un fragmento de unión al antígeno biespecífico o multiespecífico.
- El término "anticuerpo anti-TNF-alfa" o "un anticuerpo que se une a TNF-alfa" se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse al TNF-alfa con suficiente afinidad como para que el anticuerpo sea útil como un agente de diagnóstico y/o terapéutico en el TNF-alfa diana. El grado de unión de un anticuerpo anti-TNF-alfa a una proteína no TNF-alfa, no relacionada, puede ser menor que aproximadamente el 10 % de la unión del anticuerpo al TNF-alfa medido, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA). En determinadas modalidades, un anticuerpo que se une a TNF-alfa tiene una constante de disociación ( $K_d$ ) de  $\leq 1 \mu\text{M}$ ,  $\leq 100 \text{ nM}$ ,  $\leq 10 \text{ nM}$ ,  $\leq 1 \text{ nM}$  o  $\leq 0,1 \text{ nM}$ .
- Un anticuerpo "monoclonal" o un fragmento de unión al antígeno del mismo se refiere a un anticuerpo homogéneo o una población de fragmentos de unión al antígeno implicada en el reconocimiento y unión altamente específicos de un único determinante antigénico, o epítopo. Esto contrasta con los anticuerpos policlonales que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes antigenicos. El término anticuerpo "monoclonal" o fragmento de unión al antígeno del mismo abarca tanto anticuerpos monoclonales intactos como de longitud completa, así como fragmentos de anticuerpos (tales como Fab, Fab', F(ab')2, Fv), mutantes de cadena sencilla (scFv), proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprenda un sitio de reconocimiento del antígeno. Además, anticuerpo "monoclonal" o fragmento de unión al antígeno del mismo se refiere a dichos anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos elaborados de diversas formas, que incluyen pero no se limitan a, hibridomas, selección de fagos, expresión recombinante y animales transgénicos.
- El término anticuerpo "humanizado" o fragmento de unión al antígeno del mismo se refiere a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo murinos) o fragmentos de unión al antígeno que son cadenas de inmunoglobulinas específicas, inmunoglobulinas químéricas o fragmentos de las mismas que contienen secuencias mínimas no humanas (por ejemplo murinas). Normalmente, los anticuerpos humanizados o sus fragmentos de unión al antígeno son inmunoglobulinas humanas en las que los residuos de la región determinante complementaria (CDR) se reemplazan por residuos de la CDR de una especie no humana (por ejemplo, ratón, rata, conejo, hámster) que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas ("CDR injertada") (Jones y otros, Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann y otros, Nature 332: 323-327 (1988); Verhoeyen y otros, Science 239: 1534-1536 (1988)). En algunos casos, los residuos de la región marco (FR) Fv de una inmunoglobulina humana se reemplazan con los residuos correspondientes en un anticuerpo o fragmento de una especie no humana que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. El anticuerpo humanizado o su fragmento de unión al antígeno se pueden modificar adicionalmente mediante la sustitución de residuos adicionales en la región marco Fv y/o dentro de los residuos no humanos reemplazados para refinar y optimizar el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la misma especificidad, afinidad, y/o capacidad. En general, el anticuerpo humanizado o su fragmento de unión al antígeno comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos o tres, dominios variables que contienen todas o sustancialmente todas las regiones CDR que corresponden a la inmunoglobulina no humana mientras que todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado o su fragmento de unión al antígeno también pueden comprender al menos una parte de una región o dominio constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente el de una inmunoglobulina humana. Se describen ejemplos de métodos usados para generar anticuerpos humanizados en la patente de Estados Unidos 5,225,539; Roguska y otros, Proc. Natl. Acad. Sci., EE. UU., 91(3): 969-973 (1994), y Roguska y otros, Protein Eng.

9(10): 895-904 (1996). En algunas modalidades, un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo revestido.

Una "región variable" de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo o la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, ya sea sola o en combinación. Las regiones variables de la cadena pesada y ligera constan cada una de cuatro regiones marco (FR) conectadas por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) también conocidas como regiones hipervariables. Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos. Existen al menos dos técnicas para determinar las CDR: (1) un enfoque basado en la variabilidad de la secuencia entre especies (es decir, Kabat y otros. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5a ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)); y (2) un enfoque basado en estudios cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo (Al-Lazikani y otros (1997) J. Molec. Biol. 273:927-948)). Además, en ocasiones se usan en la técnica combinaciones de estos dos enfoques para determinar las CDR.

El sistema de numeración de Kabat se usa generalmente cuando se hace referencia a un residuo en el dominio variable (aproximadamente los residuos 1-107 de la cadena ligera y los residuos 1-113 de la cadena pesada) (por ejemplo, Kabat y otros, Sequences of Immunological Interest. 5<sup>a</sup> Ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Md. (1991)). A menos que se indique explícitamente lo contrario, el sistema de numeración usado en la presente descripción es el sistema de numeración de Kabat.

La numeración de la posición de los aminoácidos, como en Kabat, se refiere al sistema de numeración usado para los dominios variables de la cadena pesada o los dominios variables de la cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat y otros, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Md. (1991). Mediante el uso de este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o más, correspondientes a un acortamiento o inserción en un FR o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de la cadena pesada puede incluir un inserto de un solo aminoácido (residuo 52a de acuerdo con Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (por ejemplo, residuos 82a, 82b y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del residuo 82 del FR de la cadena pesada. La numeración de residuos de Kabat se puede determinar para un anticuerpo dado mediante el alineamiento en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "estándar". Chothia se refiere en cambio a la ubicación de los bucles estructurales (Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)). El final del bucle Chothia CDR-H1 cuando se numera mediante el uso de la convención de numeración de Kabat varía entre H32 y H34 en dependencia de la longitud del bucle (esto se debe a que el esquema de numeración de Kabat coloca las inserciones en H35A y H35B; si ni 35A ni 35B están presentes, el bucle termina en 32; si solo está presente 35A, el bucle termina en 33; si están presentes tanto 35A como 35B, el bucle termina en 34). Las regiones hipervariables de AbM representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y son usadas mediante el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular.

	Bucle	Kabat	AbM	Chotia
40	L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
	L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
	L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
	H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32..34
45				(Numeración de Kabat)
	H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32
				(Numeración de Chothia)
	H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
	H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

En ciertos aspectos, las CDR de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se pueden determinar de acuerdo con el esquema de numeración de Chothia, que se refiere a la ubicación de los bucles estructurales de inmunoglobulina (vea, por ejemplo, Chothia C & Lesk AM, (1987), J Mol Biol 196: 901-917; Al-Lazikani B y otros, (1997) J Mol Biol 273: 927-948; Chothia C y otros, (1992) J Mol Biol 227: 799-817; Tramontano A y otros, (1990) J Mol Biol 215(1): 175-82; y Patente de Estados Unidos No. 7.709.226). Normalmente, cuando se usa la convención de numeración de Kabat, el bucle CDR-H1 de Chothia está presente en los aminoácidos 26 a 32, 33 o 34 de la cadena pesada, el bucle CDR-H2 de Chothia está presente en los aminoácidos 52 a 56 de la cadena pesada, y el bucle CDR-H3 de Chothia está presente en los aminoácidos 95 a 102 de la cadena pesada, mientras que el bucle CDR-L1 de Chothia está presente en los aminoácidos 24 a 34 de la cadena ligera, el bucle CDR-L2 de Chothia está presente en los aminoácidos 50 a 56 de la cadena ligera, y el bucle CDR-L3 de Chothia está presente en los aminoácidos 89 a 97 de la cadena ligera. El final del bucle CDR-H1 de Chothia cuando se numera al usar la convención de numeración de Kabat varía entre H32 y H34 en dependencia de la longitud del bucle (esto se debe a que el esquema de numeración de Kabat coloca las inserciones en H35A y H35B; si ni 35A ni 35B están presentes, el bucle termina en 32; si solo está presente 35A, el bucle termina en 33; si están presentes tanto 35A como 35B, el bucle termina en 34).

- En ciertos aspectos, las CDR de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se pueden determinar de acuerdo con el sistema de numeración IMGT como se describe en Lefranc MP, (1999) *The Immunologist* 7: 132-136 y Lefranc MP y otros, (1999) *Nucleic Acids Res* 27: 209-212. De acuerdo con el esquema de numeración IMGT, VH-CDR1 está en las posiciones 26 a 35, VH-CDR2 está en las posiciones 51 a 57, VH-CDR3 está en las posiciones 93 a 102, VL-CDR1 está en las posiciones 27 a 32, VL-CDR2 está en las posiciones 50 a 52, y VL-CDR3 está en las posiciones 89 a 97.
- En ciertos aspectos, las CDR de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se pueden determinar de acuerdo con MacCallum RM y otros, (1996) *J Mol Biol* 262: 732-745. *Vea también, por ejemplo,* Martin A. "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains", en *Antibody Engineering*, Kontermann y Dübel, eds., Capítulo 31, págs. 422-439, Springer-Verlag, Berlín (2001).
- En ciertos aspectos, las CDR de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se pueden determinar de acuerdo con el esquema de numeración AbM, que se refiere a regiones hipervariables de AbM que representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y son usadas por el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular (Oxford Molecular Group, Inc.).
- El término anticuerpo "humano" significa un anticuerpo producido por un ser humano o un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a un anticuerpo producido por un ser humano elaborado mediante el uso de cualquier técnica conocida en la técnica. Esta definición de un anticuerpo humano incluye anticuerpos intactos o de longitud completa, fragmentos de los mismos y/o anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido de cadena pesada y/o ligera humana tales como, por ejemplo, un anticuerpo que comprende polipéptidos de cadena ligera murina y cadena pesada humana.
- El término anticuerpos "químéricos" se refiere a anticuerpos en donde la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina se deriva de dos o más especies. Normalmente, la región variable de las cadenas ligera y pesada corresponde a la región variable de anticuerpos derivados de una especie de mamíferos (por ejemplo, ratón, rata, conejo, etc.) con la especificidad, afinidad y capacidad deseadas, mientras que las regiones constantes son homólogas a las secuencias en anticuerpos derivados de otro (generalmente humano) para evitar provocar una respuesta inmune en esa especie.
- El término "epítopo" o "determinante antigénico" se usa indistintamente en la presente descripción y se refiere a la parte de un antígeno capaz de ser reconocido y unido específicamente por un anticuerpo particular. Cuando el antígeno es un polipéptido, los epítopos pueden formarse tanto a partir de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos se retienen normalmente tras la desnaturización de proteínas, mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario se pierden normalmente tras la desnaturización de proteínas. Un epítopo incluye normalmente al menos 3, y más usualmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única.
- La "afinidad de unión" generalmente se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su pareja de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, como se usa en la presente descripción, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su pareja Y generalmente se puede representar mediante la constante de disociación ( $K_d$ ). La afinidad se puede medir mediante métodos comunes conocidos en la técnica, que incluyen los descritos en la presente descripción. Los anticuerpos de baja afinidad generalmente se unen al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad generalmente se unen al antígeno más rápido y tienden a permanecer unidos por más tiempo. Se conocen en la técnica una variedad de métodos para medir la afinidad de unión, cualquiera de los cuales puede usarse para los propósitos de la presente descripción. A continuación se describen modalidades ilustrativas específicas.
- "O mejor" cuando se usa en la presente descripción para referirse a la afinidad de unión se refiere a una unión más fuerte entre una molécula y su pareja de unión. "O mejor" cuando se usa en la presente descripción se refiere a una unión más fuerte, representada por un valor numérico de  $K_d$  más pequeño. Por ejemplo, un anticuerpo que tiene una afinidad por un antígeno de "0,6 nM o mejor", la afinidad del anticuerpo por el antígeno es <0,6 nM, es decir, 0,59 nM, 0,58 nM, 0,57 nM, etc. o cualquier valor inferior a 0,6 nM.
- Por "se une específicamente", generalmente se quiere decir que un anticuerpo se une a un epítopo a través de su dominio de unión al antígeno, y que la unión implica cierta complementariedad entre el dominio de unión al antígeno y el epítopo. De acuerdo con esta definición, se dice que un anticuerpo "se une específicamente" a un epítopo cuando se une a ese epítopo, a través de su dominio de unión al antígeno, más fácilmente de lo que se uniría a un epítopo aleatorio no relacionado. El término "especificidad" se usa en la presente descripción para calificar la afinidad relativa por la que un determinado anticuerpo se une a un cierto epítopo. Por ejemplo, se puede considerar que el anticuerpo "A" tiene una mayor especificidad por un epítopo dado que el anticuerpo "B", o se puede decir que el anticuerpo "A" se une al epítopo "C" con una mayor especificidad que la que tiene por el epítopo "D" relacionado.

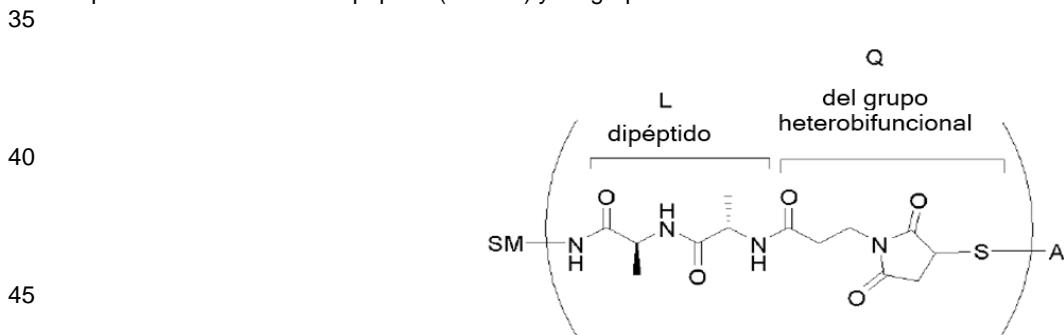
Por "se une preferentemente" se entiende que el anticuerpo se une específicamente a un epítopo más fácilmente de lo que se uniría a un epítopo relacionado, similar, homólogo o análogo. Por tanto, un anticuerpo que "se une preferentemente" a un epítopo dado se unirá más probablemente a ese epítopo que a un epítopo relacionado, incluso aunque dicho anticuerpo pueda reaccionar de forma cruzada con el epítopo relacionado.

5 Se dice que un anticuerpo "inhibe competitivamente" la unión de un anticuerpo de referencia a un epítopo dado si el anticuerpo se une preferentemente a ese epítopo o un epítopo superpuesto en la medida en que bloquea, hasta cierto grado, la unión del anticuerpo de referencia al epítopo. La inhibición competitiva puede determinarse mediante 10 cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, ensayos ELISA de competición. Se puede decir que un anticuerpo inhibe competitivamente la unión del anticuerpo de referencia a un epítopo dado en al menos un 90 %, al menos un 80 %, al menos un 70 %, al menos un 60 % o al menos un 50 %.

15 Un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que está "aislado" es un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que se encuentra en una forma que no se encuentra en la naturaleza. Los polipéptidos, anticuerpos, polinucleótidos, vectores, células o composiciones aislados incluyen aquellos que se han purificado hasta el punto de que ya no se encuentran en la forma en que se encuentran en la naturaleza. En algunas modalidades, un anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que se aísla es sustancialmente puro.

20 Como se usa en la presente descripción, "sustancialmente puro" se refiere a material que es al menos 50 % puro (es decir, libre de contaminantes), al menos 90 % puro, al menos 95 % puro, al menos 98 % puro, o al menos 99 % puro.

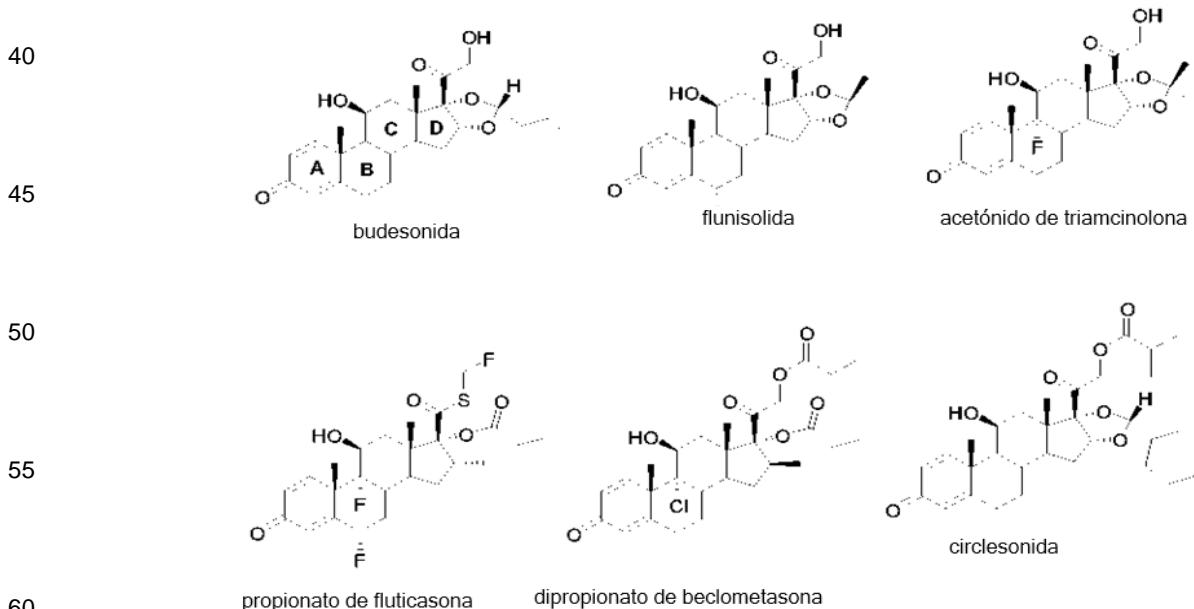
25 El término "inmunoconjungado", "conjungado", "conjungado anticuerpo-fármaco" o "ADC", como se usa en la presente descripción, se refiere a un compuesto o un derivado del mismo que está unido a una proteína, como un agente de unión celular (por ejemplo, un anticuerpo anti-TNF -alfa o fragmento del mismo) y se define por una fórmula genérica:  $(SM-L-Q)_n -A$ , en la que SM = radical derivado de un agonista del receptor de glucocorticoides de molécula pequeña, por ejemplo, un glucocorticosteroide, L = enlazador, Q = grupo heterobifuncional, un grupo 30 heterotrifuncional, o está ausente, y A = una proteína (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, una proteína anti-TNF, un anticuerpo anti-TNF-alfa o fragmento del mismo, un receptor soluble, o un receptor de TNF soluble) y  $n = 1-10$ . Los inmunoconjungados también se pueden definir mediante la fórmula genérica en orden inverso:  $A- (Q-L-SM)_n$  A modo de ilustración, la siguiente fórmula genérica muestra un inmunoconjungado 35 que tiene un enlazador dipéptido (Ala-Ala) y un grupo heterobifuncional basado en tioéster de succinimida:



40 En la presente descripción, el término "enlazador" se refiere a cualquier resto químico capaz de unir una proteína, por ejemplo, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos de unión al antígeno) o equivalente funcional a un glucocorticosteroide. Los enlazadores pueden ser susceptibles a escisión (un "enlazador escindible") lo que facilita así la liberación del glucocorticosteroide. Por ejemplo, tales enlazadores escindibles pueden ser 45 susceptibles a la escisión inducida por ácido, escisión fotoinducida, escisión inducida por peptidasas, escisión inducida por esterasa y escisión de enlaces disulfuro, en condiciones en las que el glucocorticosteroide y/o el anticuerpo permanecen activos. Alternativamente, los enlazadores pueden ser sustancialmente resistentes a la escisión (un "enlazador no escindible").

50 En la presente descripción, los enlazadores no escindibles son cualquier resto químico capaz de unir un glucocorticosteroide a un anticuerpo de una manera covalente estable y no cae en las categorías enumeradas anteriormente para enlazadores escindibles. Por tanto, los enlazadores no escindibles son sustancialmente resistentes a la escisión inducida por ácido, la escisión fotoinducida, la escisión inducida por peptidasas, la escisión inducida por esterasa y la escisión del enlace disulfuro. Además, no escindible se refiere a la capacidad del enlace químico en el enlazador o adyacente al enlazador para resistir la escisión inducida por un ácido, un agente de escisión fotolábil, una peptidasa, una esterasa o un compuesto químico o fisiológico que escinde un enlace disulfuro, 55 en condiciones en las que un glucocorticosteroide y/o el anticuerpo no pierden su actividad.

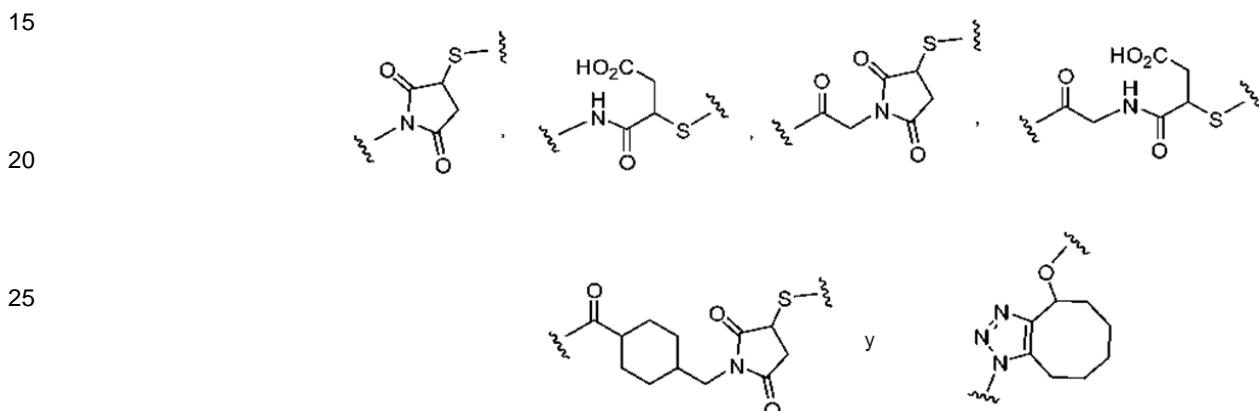
- Algunos enlazadores escindibles son escindidos por peptidasas ("enlazadores escindibles por peptidasa"). Sólo ciertos péptidos se escinden fácilmente dentro o fuera de las células, vea, por ejemplo, Trout y otros, 79 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 626-629 (1982) y Umemoto y otros 43 Int. J. Cancer, 677-684 (1989). Además, los péptidos están compuestos de unidades de  $\alpha$ -aminoácidos y enlaces peptídicos, que químicamente son enlaces amida entre el carboxilato de un aminoácido y el grupo amino de un segundo aminoácido. Se entiende que otros enlaces amida, como el enlace entre un carboxilato y el grupo  $\alpha$ -aminoácido de la lisina, no son enlaces peptídicos y se consideran no escindibles.
- Algunos enlazadores son escindidos por esterasas ("enlazadores escindibles por esterasa"). Solo ciertos ésteres pueden ser escindidos por las esterasas presentes dentro o fuera de las células. Los ésteres se forman por la condensación de un ácido carboxílico y un alcohol. Los ésteres simples son ésteres producidos con alcoholes simples, como alcoholes alifáticos y alcoholes aromáticos pequeños cíclicos y pequeños.
- En algunas modalidades, el componente enlazador escindible puede comprender un péptido que comprende de uno a diez residuos de aminoácidos. En estas modalidades, el péptido permite la escisión del enlazador por una proteasa, lo que facilita así la liberación del glucocorticosteroide tras la exposición a proteasas intracelulares, tales como enzimas lisosomales (Doronina y otros (2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784). Los péptidos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, dipéptidos, tripéptidos, tetrapéptidos y pentapéptidos. Los dipéptidos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, alanina-alanina (ala-ala), valinecitrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe); fenilalanina-lisina (fk o phe-lys); fenilalanina-homolisina (phe-homolisina); y N-metil-valina-citrulina (Me-val-cit). Los tripéptidos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly).
- Un péptido puede comprender residuos de aminoácidos naturales y/o no naturales. El término "aminoácido de origen natural" se refiere a Ala, Asp, Cys, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gin, Arg, Ser, Thr, Val, Trp y Tyr. Los "aminoácidos no naturales" (es decir, los aminoácidos no se encuentran naturalmente) incluyen, a modo de ejemplo no limitante, homoserina, homoarginina, citrulina, fenilglicina, taurina, yodotirosina, selenocisteína, norleucina ("Nle"), norvalina ("Nva"), beta-alanina, L- o D-naftalanina, ornitina ("Orn") y similares. Los péptidos pueden diseñarse y optimizarse para la escisión enzimática por una enzima particular, por ejemplo, una proteasa asociada a tumores, catepsina B, C y D, o una proteasa plasmina.
- Los aminoácidos también incluyen las formas D de aminoácidos naturales y no naturales. "D-" designa un aminoácido que tiene la configuración "D" (dextrogiratoria), en oposición a la configuración en los aminoácidos ("L-") que se encuentran en la naturaleza. Los aminoácidos naturales y no naturales pueden adquirirse comercialmente (Sigma Chemical Co., Advanced Chemtech) o sintetizarse mediante el uso de métodos conocidos en la técnica.
- En la presente descripción, el término "glucocorticosteroide" se refiere a hormonas esteroideas naturales o sintéticas que interactúan con los receptores de glucocorticoides. Los glucocorticosteroideos ilustrativos no limitantes incluyen:



- A modo de ejemplo, los anillos A, B, C y D del esqueleto de esteroides están marcados para budesonida. Los glucocorticosteroideos se describen en el documento WO 2009/069032.
- Un "radical de un glucocorticosteroide" se deriva de la eliminación de uno o más átomos de hidrógeno de un glucocorticosteroide original. La eliminación del(es) átomo(s) de hidrógeno facilita(n) la unión del

glucocorticosteroide original a un enlazador. En una modalidad, el átomo de hidrógeno se elimina de cualquier grupo adecuado -NH<sub>2</sub> del glucocorticosteroide parental. En otra modalidad, el átomo de hidrógeno se elimina de cualquier grupo -OH adecuado del glucocorticosteroide parental. En otra modalidad, el átomo de hidrógeno se elimina de cualquier grupo -SH adecuado del glucocorticosteroide parental. En otra modalidad, el átomo de hidrógeno se elimina de cualquier grupo -N(H) adecuado del glucocorticosteroide parental. En otra modalidad, el átomo de hidrógeno se elimina de cualquier grupo -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub> - o -CH = adecuado del glucocorticosteroide parental. En una modalidad, el "radical de un glucocorticosteroide" es un radical monovalente derivado de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un glucocorticosteroide parental.

- 5      10      En la presente descripción, el término "grupo heterobifuncional" o el término "grupo heterotrifuncional" se refiere a un resto químico que conecta un enlazador y una proteína, por ejemplo, un anticuerpo. Los grupos heterobi y trifuncionales se caracterizan por tener diferentes grupos reactivos en cada extremo del resto químico. Los grupos heterobifuncionales ilustrativos no limitantes incluyen:



Un grupo heterotrifuncional ilustrativo no limitante es:



45      50      El término "razón de fármaco-anticuerpo" o "DAR" se refiere al número de SM (es decir, radicales derivados de un agonista del receptor de glucocorticoides de molécula pequeña, por ejemplo, un glucocorticosteroide) unidos a A (es decir, una proteína, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, una proteína anti-TNF, un anticuerpo anti-TNF-alfa o fragmento del mismo, un receptor soluble o un receptor de TNF soluble). Por tanto, en el inmunoconjunto que tiene la fórmula genérica (SM-L-Q)n-A, el DAR se define por la variable "n".

55      60      Cuando se hace referencia a un compuesto que tiene la fórmula (SM-L-Q)n-A que representa un inmunoconjunto individual, el DAR se refiere al número de SM enlazados al individuo A (por ejemplo, n es un número entero del 1 al 10).

65      70      Cuando se hace referencia a un compuesto que tiene la fórmula (SM-L-Q)n-A que representa una pluralidad de inmunoconjuntos, el DAR se refiere al número promedio de SM enlazados al As (por ejemplo, n es un número entero o fracción del 1 al 10). Así, a modo de ejemplo, un compuesto que tiene la fórmula (SM-L-Q)n-A que comprende un primer inmunoconjunto con 3 SM por A y un segundo inmunoconjunto con 4 SM por A tendría un DAR (es decir, una "n") de 3,5.

75      80      El término "sujeto" se refiere a cualquier animal (por ejemplo, un mamífero), que incluyen, entre otros, humanos, primates no humanos, roedores y similares, que va a ser el receptor de un tratamiento particular. Normalmente, los términos "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente en la presente descripción en referencia a un sujeto humano.

85      90      El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en una forma tal que permite que la actividad biológica del ingrediente activo sea eficaz y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administraría la formulación. La formulación puede ser estéril.

Términos como "al tratar" o "tratamiento" o "tratar" o "al aliviar" o "aliviar" se refieren a medidas terapéuticas que curan, ralentizan, reducen los síntomas de, y/o detienen la progresión de una afección o trastorno patológico diagnosticado. Por lo tanto, aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya han sido diagnosticados o se sospecha que tienen el trastorno. Las medidas profilácticas o preventivas se refieren a medidas que previenen y/o retrasan el desarrollo de una condición o trastorno patológico específico. Por tanto, aquellos que necesitan medidas profilácticas o preventivas incluyen aquellos propensos a padecer el trastorno y aquellos en los que se debe prevenir el trastorno.

"Polinucleótido" o "ácido nucleico", como se usa indistintamente en la presente descripción, se refiere a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud e incluye ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda incorporarse a un polímero mediante ADN o ARN polimerasa. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación de la estructura de los nucleótidos puede impartirse antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede interrumpirse por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido se puede modificar adicionalmente después de la polimerización, por ejemplo mediante conjugación con un componente de marcaje. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "tapas", sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces no cargados (por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, cabamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), los que contienen restos colgantes, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, pty-L-lisina, etc.), los que tienen intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), los que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidantes, etc.), los que contienen alquilantes, los que tienen enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), así como formas no modificadas del(los) polinucleótido (s). Además, cualquiera de los grupos hidroxilo normalmente presentes en los azúcares puede reemplazarse, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegerse con grupos protectores estándar o activarse para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales, o puede conjugarse con soportes sólidos. El OH terminal 5' y 3' puede fosforilarse o sustituirse con aminas o restos de grupos protectores orgánicos de 1 a 20 átomos de carbono. También se pueden derivar otros hidroxilos a grupos protectores estándar. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares ribosa o desoxiribosa que se conocen generalmente en la técnica, que incluyen, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alilo, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares α-anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares piranosa, azúcares furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos abásicos tales como metil ribósido. Se pueden reemplazar uno o más enlaces fosfodiéster por grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, pero no se limitan a, modalidades en las que el fosfato se reemplaza por P(O)S ("tioato"), P(S) S ("ditioato"), "(O)NR<sub>2</sub> ("amidato"), P(O)R, P (O)OR', CO o CH<sub>2</sub> ("formacetal"), en el que cada R o R' es independientemente H o alquilo (1-20 C) sustituido o no sustituido que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. No es necesario que todos los enlaces en un polinucleótido sean idénticos. La descripción anterior se aplica a todos los polinucleótidos a los que se hace referencia en esta descripción, que incluyen ARN y ADN.

El término "vector" significa una construcción, que es capaz de administrar, y opcionalmente expresar, uno o más genes o secuencias de interés en una célula huésped. Los ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores virales, vectores de expresión de ADN o ARN desnudos, vectores de plásmidos, cósmidos o fagos, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes de condensación catiónicos, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas, y ciertas células eucariotas, como las células productoras.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en la presente descripción para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede estar interrumpido por no aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que se ha modificado de forma natural o por intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, como la conjugación con un componente de marcaje. También se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluidos, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Se entiende que, debido a que los polipéptidos de esta descripción se basan en anticuerpos, en ciertas modalidades, los polipéptidos pueden presentarse como cadenas simples o cadenas asociadas.

Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad" en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje específico de nucleótidos o residuos de aminoácidos que son iguales, cuando se comparan y alinean (mediante la introducción de huecos, si es necesario) para una correspondencia máxima, sin considerar ninguna sustitución conservativa de aminoácidos como parte de la identidad de secuencia. El porcentaje de identidad se puede medir mediante el uso del software o algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual. Se conocen en la técnica varios algoritmos y software que pueden usarse para obtener alineamientos de secuencias de aminoácidos o nucleótidos. Un ejemplo no limitante de un algoritmo de alineación de secuencias es el algoritmo descrito en Karlin y otros, Proc. Natl. Acad. Sci., 87:2264-2268 (1990), modificado en Karlin y otros, Proc. Natl. Acad. Sci., 90:5873-5877 (1993), e incorporado

- en los programas NBLAST y XBLAST (Altschul y otros, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402 (1991)). En determinadas modalidades, Gapped BLAST se puede usar como se describe en Altschul y otros, *Nucleic Acids Res.* 25:3389 - 3402 (1997). BLAST-2, WU-BLAST-2 (Altschul y otros, *Methods in Enzymology*, 266:460-480 (1996)), ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, California) o Megalign (DNASTAR) son otros programas de software disponibles públicamente que se pueden usar para alinear secuencias. En ciertas modalidades, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina mediante el uso del programa GAP en el software GCG (por ejemplo, mediante el uso de una matriz NWGapDNA.CMP y un peso de espacio de 40, 50, 60, 70 o 90 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6). En ciertas modalidades alternativas, el programa GAP en el paquete de software GCG, que incorpora el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* (48): 444-453 (1970)) se puede usar para determinar el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos (por ejemplo, mediante el uso de una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de intervalo de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5). Alternativamente, en ciertas modalidades, el porcentaje de identidad entre secuencias de nucleótidos o aminoácidos se determina mediante el uso del algoritmo de Myers y Miller (*CABIOS*, 4:11-17 (1989)). Por ejemplo, el porcentaje de identidad se puede determinar mediante el uso del programa ALIGN (versión 2.0) y mediante el uso de un PAM120 con tabla de residuos, una penalización de longitud de espacio de 12 y una penalización de espacio de 4. Un experto en la técnica puede determinar los parámetros apropiados para la alineación máxima mediante un software de alineación particular. En determinadas modalidades, se usan los parámetros predeterminados del software de alineación. En ciertas modalidades, el porcentaje de identidad "X" de una primera secuencia de aminoácidos a una segunda secuencia de aminoácidos se calcula como  $100 \times (Y/Z)$ , donde Y es el número de residuos de aminoácidos puntuados como coincidencias idénticas en la alineación de la primera y segunda secuencias (alineadas por inspección visual o un programa de alineación de secuencias particular) y Z es el número total de residuos en la segunda secuencia. Si la longitud de una primera secuencia es más larga que la segunda secuencia, el porcentaje de identidad de la primera secuencia a la segunda secuencia será más largo que el porcentaje de identidad de la segunda secuencia a la primera secuencia.
- Como ejemplo no limitante, si cualquier polinucleótido en particular tiene un cierto porcentaje de identidad de secuencia (por ejemplo, es al menos un 80 % idéntico, al menos un 85 % idéntico, al menos un 90 % idéntico y, en algunas modalidades, al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico) a una secuencia de referencia puede, en ciertas modalidades, determinarse mediante el uso del programa Bestfit (Paquete de Análisis de Secuencia de Wisconsin, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). Bestfit usa el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (*Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489 (1981)) para encontrar el mejor segmento de homología entre dos secuencias. Cuando se usa Bestfit o cualquier otro programa de alineación de secuencias para determinar si una secuencia en particular es, por ejemplo, 95 % idéntica a una secuencia de referencia de acuerdo con la presente descripción, los parámetros se establecen de manera que el porcentaje de identidad se calcula sobre la longitud completa de la secuencia de nucleótidos de referencia y que se permiten huecos en la homología de hasta el 5 % del número total de nucleótidos en la secuencia de referencia.
- En algunas modalidades, dos ácidos nucleicos o polipéptidos de la descripción son sustancialmente idénticos, lo que significa que tienen al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % y en algunas modalidades al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de residuos de nucleótidos o aminoácidos, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima, según se mide mediante el uso de un algoritmo de comparación de secuencias o mediante inspección visual. La identidad puede existir en una región de las secuencias que tiene al menos aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 40-60 residuos de longitud o cualquier valor integral entre ellos, y puede estar en una región más larga que 60-80 residuos, por ejemplo, en al menos aproximadamente 90-100 residuos, y en algunas modalidades, las secuencias son sustancialmente idénticas en toda la longitud de las secuencias que se comparan, como la región codificante de una secuencia de nucleótidos, por ejemplo.
- Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es aquella en la que un residuo de aminoácido se reemplaza con otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares, que incluyen cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales de ramificación beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por ejemplo, la sustitución de una fenilalanina por una tirosina es una sustitución conservativa. En algunas modalidades, las sustituciones conservativas en las secuencias de los polipéptidos y anticuerpos de la descripción no anulan la unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos al antígeno o antígenos, por ejemplo, el TNF-alfa al que se une el anticuerpo. Los métodos para identificar sustituciones conservativas de nucleótidos y aminoácidos que no eliminan la unión de antígenos son bien conocidos en la técnica (vea, por ejemplo, Brummell y otros, *Biochem.* 32: 1180 -1187 (1993); Kobayashi y otros, *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999); y Burks y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997)).
- En la presente descripción, el término "grupo protector" o "PG" se refiere a un grupo que bloquea, es decir, protege, la funcionalidad amina mientras se llevan a cabo reacciones en otros grupos funcionales o partes de la molécula.

- Los expertos en la técnica estarán familiarizados con la selección, unión y escisión de grupos protectores de amina, y apreciarán que se conocen muchos grupos protectores diferentes en la técnica, siendo la idoneidad de un grupo protector u otro dependiente de la particularidad del esquema sintético planeado. Se encuentran disponibles para consulta tratados sobre el tema, como Wuts, PGM; Greene, TW, "Greene's Protective Groups in Organic Synthesis", 5 4<sup>a</sup> Ed., J. Wiley & Sons, NY, 2007. Los grupos protectores adecuados incluyen el grupo carbobencíloxi (Cbz), *terc*-butiloxicarbonilo (BOC), 9-fluorenilmethoxycarbonilo (FMOC) y bencílo (Bn). En una modalidad, el grupo protector es el grupo BOC.
- 10 Los compuestos descritos en la presente descripción contienen centros asimétricos y, por tanto, dan lugar a enantiómeros, diastereómeros y otras formas estereoquímicas. La presente descripción pretende abarcar el uso de todas estas formas posibles, así como sus formas racémicas y resueltas y mezclas de las mismas. Los enantiómeros individuales pueden separarse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica en vista de la 15 presente descripción. Cuando los compuestos descritos en la presente descripción contienen dobles enlaces olefínicos u otros centros de simetría geométrica, y a menos que se especifique lo contrario, se pretende que incluyan isómeros geométricos tanto E como Z. También se pretende que todos los tautómeros queden abarcados por la presente descripción.
- 20 La presente descripción abarca la preparación y el uso de solvatos de los compuestos descritos en la presente descripción. Los solvatos normalmente no alteran significativamente la actividad fisiológica o la toxicidad de los compuestos y, como tales, pueden funcionar como equivalentes farmacológicos. El término "solvato" como se usa en la presente descripción es una combinación, asociación física y/o solvatación de un compuesto de la presente descripción con una molécula de disolvente tal como, *por ejemplo*, un disolvato, monosolvato o hemisolvato, donde la razón de molécula de disolvente a compuesto de la presente descripción es aproximadamente 2:1, 25 aproximadamente 1:1 o aproximadamente 1:2, respectivamente. Esta asociación física implica diversos grados de enlaces iónicos y covalentes, incluidos los enlaces de hidrógeno. En ciertos casos, el solvato puede aislarse, como cuando se incorporan una o más moléculas de disolvente en la red cristalina de un sólido cristalino. Por tanto, "solvato" abarca tanto solvatos en fase de solución como solvatos aislados. Los compuestos descritos en la 30 presente descripción pueden estar presentes como formas solvatadas con un disolvente farmacéuticamente aceptable, tal como agua, metanol, etanol y similares, y se pretende que la descripción incluya formas tanto solvatadas como no solvatadas de los compuestos descritos en la presente descripción. Un tipo de solvato es un hidrato. Un "hidrato" se refiere a un subgrupo particular de solvatos donde la molécula de disolvente es agua. Los solvatos normalmente pueden funcionar como equivalentes farmacológicos. La preparación de solvatos es conocida en la técnica. Vea, *por ejemplo*, M. Caira y otros, *J. Pharmaceut. Sci.*, 93(3):601-611 (2004), que describe la 35 preparación de solvatos de fluconazol con acetato de etilo y con agua. EC van Tonder y otros, *AAPS Pharm Describen preparaciones similares de solvatos, hemisolvatos, hidratos y similares. Sci. Tech.*, 5(1): Artículo 12 (2004), y AL Bingham y otros, *Chem. Commun.* 603-604 (2001). Un proceso típico, no limitante, para preparar un solvato implicaría disolver un compuesto descrito en la presente descripción en un disolvente deseado (orgánico, agua o una mezcla de los mismos) a temperaturas por encima de 20 °C a aproximadamente 25 °C, luego enfriar la 40 solución a una velocidad suficiente para formar cristales y aislar los cristales mediante métodos conocidos, *por ejemplo*, filtración. Se pueden usar técnicas analíticas como la espectroscopía infrarroja para confirmar la presencia del disolvente en un cristal del solvato.
- 45 La presente descripción abarca la preparación y el uso de sales de los compuestos descritos en la presente descripción, incluidas las sales no tóxicas farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de sales de adición farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición de ácidos orgánicos e inorgánicos y sales básicas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales metálicas tales como sal de sodio, sal de potasio, sal de cesio y similares; metales alcalinotérreos tales como sal de calcio, sal de magnesio y similares; sales de amina orgánica tales como sal de trietilamina, sal de piridina, sal de picolina, sal de etanolamina, sal de trietanolamina, sal de diciclohexilamina, sal de N,N'-dibenciletilendiamina y similares; sales de ácidos inorgánicos 50 tales como clorhidrato, bromhidrato, fosfato, sulfato y similares; sales de ácidos orgánicos tales como citrato, lactato, tartrato, maleato, fumarato, mandelato, acetato, dicloroacetato, trifluoroacetato, oxalato, formato y similares; sulfonatos tales como metanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato y similares; y sales de aminoácidos tales como arginato, asparaginato, glutamato y similares.
- 55 Las sales de adición de ácido se pueden formar mediante la mezcla de una solución del compuesto particular descrito con una solución de un ácido no tóxico farmacéuticamente aceptable como ácido clorhídrico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido carbónico, ácido fosfórico, ácido oxálico, ácido dicloroacético o similares. Las sales básicas se pueden formar mediante la mezcla de una solución del compuesto de la presente descripción con una solución de una base no tóxica farmacéuticamente aceptable tal como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de colina, carbonato de sodio y similares.
- 60 Como se usa en la presente descripción y reivindicaciones, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen formas plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.
- 65 Se entiende que siempre que se describen en la presente descripción modalidades con el lenguaje "que comprende", también se proporcionan modalidades análogas descritas en términos de "que consiste en" y/o "que

consiste esencialmente en".

El término "y/o" como se usa en una frase como "A y/o B" en la presente descripción pretende incluir tanto "A como B", "A o B", "A" y "B". Asimismo, el término "y/o" como se usa en una frase como "A, B y/o C" pretende abarcar cada una de las siguientes modalidades: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

## II. Proteínas para la unión a agonistas del receptor de glucocorticoides

La presente descripción proporciona agentes inmunoconjungados que contienen agonistas del receptor de glucocorticoides unidos a proteínas, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos y proteínas receptoras solubles. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es humano, humanizado, químérico o murino. En algunas modalidades, la proteína, por ejemplo, el anticuerpo, su fragmento de unión al antígeno o la proteína receptora soluble, puede unirse a una diana en la superficie de una célula y volverse internalizada.

La presente descripción también proporciona inmunoconjungados que contienen agonistas del receptor de glucocorticoides unidos a proteínas anti-TNF alfa. En determinadas modalidades, las proteínas anti-TNF alfa son anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos. En determinadas modalidades, las proteínas anti-TNF alfa son anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen a TNF alfa (por ejemplo, TNF alfa soluble y/o TNF alfa unido a membrana). En determinadas modalidades, las proteínas anti-TNF alfa son proteínas receptoras de TNF solubles, por ejemplo, proteínas receptoras de TNF solubles fusionadas a un dominio constante de la cadena pesada o un fragmento del mismo tal como un Fc. En algunas modalidades, la proteína anti-TNF alfa, por ejemplo, el anticuerpo anti-TNF, su fragmento de unión al antígeno o el receptor de TNF soluble pueden unirse al TNF alfa en la superficie de una célula y volverse internalizado. Por ejemplo, el documento US 2014/0294813 describe proteínas anti-TNF que exhiben internalización celular al unirse al TNF humano de la superficie celular.

En determinadas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos se unen al TNF-alfa humano y/o de ratón. Se conocen en la técnica anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno que se unen a TNF-alfa.

La longitud completa de la secuencia de aminoácidos unida a la membrana de TNF alfa humano es:

MSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSFLIVAGATTLFCLLHFGVIGPQ

REEFPRDLSLISPLAQAVRSSRTPSDKPVAHVANPQAEGQLQWLNRANALLANGVELRDNQ  
LVVPSEGGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLHTHSRIAQSQTGVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKP

WYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL (SEQ ID NO: 1). El TNF alfa humano soluble contiene los aminoácidos 77-233 de SEQ ID NO: 1. La longitud completa de la secuencia de aminoácidos para la membrana murino unido a TNF-alfa es:

MSTESMIRDVELAEEALPKQMGGFQNSRRCLCLSFLVAGATTLFCLLNFGVIGPQRDEKFPN

GPLISSLMAQTTLRSSQNSSDKPVAHVANHQVEEQLEWLSQRANALLANGMDLKDNQLVV

PADGLYLVYSQVLFKGQGCPDYVLLHTVSRAISYQEKVNLLSAVKSPCPKDTPEGAELKPWY

EPIYLGGVFQLEKGDRQSAEVNLPKYLDFAESGQVYFGVIAL (SEQ ID NO: 2). El TNF alfa murino soluble contiene los aminoácidos 80-235 de SEQ ID NO: 2.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-TNF-alfa o su fragmento de unión al antígeno se unen al TNF-alfa humano. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-TNF-alfa o su fragmento de unión al antígeno son humanos, humanizados o químicos.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-TNF-alfa o su fragmento de unión al antígeno se unen al TNF-alfa murino. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-TNF-alfa o su fragmento de unión al antígeno son murinos.

En determinadas modalidades, el anticuerpo anti-TNF-alfa o el fragmento de unión al antígeno tienen uno o más de los siguientes efectos: neutralizan la citotoxicidad del TNF-alfa humano en un ensayo de L929 *in vitro* con una IC<sub>50</sub> de 1X10<sup>-7</sup> M o menos; bloquean la interacción de TNF-alfa con los receptores de superficie celular p55 y p75; y/o lisan células que expresan TNF de superficie *in vitro* en presencia de complemento.

En determinadas modalidades, el anticuerpo anti-TNF-alfa o el fragmento de unión al antígeno no se unen al TNF-beta.

Los anticuerpos anti-TNF-alfa y sus fragmentos de unión al antígeno incluyen, por ejemplo, adalimumab, infliximab, certolizumab pegol, afelimomab, nerelizumab, ozorizumab, placulumab y golimumab. Se proporcionan anticuerpos anti-TNF-alfa y fragmentos de unión al antígeno adicionales, por ejemplo, en los documentos WO 2013/087912, WO 2014/152247 y WO 2015/073884.

El adalimumab se describe en la Patente de Estados Unidos No. 6.258.562. Infliximab se describe en la patente de

Estados Unidos No. 5.656.272. El certolizumab se analiza en el documento WO 01/94585. El afelimomab (también conocido como MAK195) se analiza en Vincent, Int. J. Clin. Pract. 54: 190-193 (2000). Ozoralizumab (también conocido como ATN-103) es un nanocuerpo. Contiene tres regiones variables de cadena pesada fusionadas por enlazadores GlySer. Las regiones variables 1 y 3 son idénticas y el ozoralizumab no contiene una cadena pesada. El ozoralizumab se analiza en el documento WO 2012/131053. Placulumab (también conocido como CEP-37247) es un anticuerpo de dominio que consiste en un dímero de VL-pCH1-CH2-CH3 o [V-kappa]2-Fc y se analiza en Gay y otros, Mabs 2: 625-638 (2010). Golimumab (también conocido como CNTO 148) se analiza en el documento WO2013/ 087912, y las secuencias se proporcionan en GenBank: DI496971.1 y GenBank DI 496970.1.

- 5 Los anticuerpos anti-TNF-alfa y sus fragmentos de unión al antígeno también incluyen anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que inhiben competitivamente la unión de adalimumab, infliximab, certolizumab pegol, afelimomab, nerelimomab, ozoralizumab, placulumab o golimumab a TNF-alfa. Los anticuerpos anti-TNF-alfa y sus fragmentos de unión al antígeno también incluyen anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno que se unen al mismo epítopo de TNF-alfa que adalimumab, infliximab, certolizumab pegol, afelimomab, nerelimomab, ozoralizumab, placulumab o golimumab.
- 10

En determinadas modalidades, el anticuerpo anti-TNF-alfa o su fragmento de unión al antígeno inhiben competitivamente la unión de adalimumab a TNF-alfa. En determinadas modalidades, el anticuerpo anti-TNF-alfa o su fragmento de unión al antígeno se unen al mismo epítopo de TNF-alfa que el adalimumab. En determinadas modalidades, el anticuerpo anti-TNF-alfa o su fragmento de unión al antígeno es adalimumab o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En determinadas modalidades, el anticuerpo anti-TNF-alfa o su fragmento de unión al antígeno es adalimumab.

15

20 En determinadas modalidades, el anticuerpo anti-TNF-alfa o su fragmento de unión al antígeno comprenden secuencias de adalimumab. Las secuencias de adalimumab se proporcionan en las Tablas 1-6.

25

Tabla 1 Secuencias de aminoácidos de CDR de la cadena pesada variable:

Anticuerpo	VH-CDR1	VH-CDR2	VH-CDR3
adalimumab	DYAMH (SEQ ID NO:3) GFTFDDYAMH (SEQ ID NO:4) NO:6)	oAITWNSGHIDYADSVEG	<b>VSYLSTASS (SEQ ID NO:5)</b> <b>VSYLSTASSLDY (SEQ ID NO:94)</b>

30 Tabla 2: Secuencias de aminoácidos de CDR de la cadena ligera variable

Anticuerpo	VL-CDR1	VL-CDR2	VL-CDR3
adalimumab	RASQQIRNYLA (SEQ ID NO:32)	AASTLQS (SEQ ID NO:33)	QRYNRAPYT (SEQ ID NO:34)

40 Tabla 3: Secuencias variables de aminoácidos de la cadena pesada

Anticuerpo	Secuencia de aminoácidos VH (SEQ ID NO)
adalimumab	<b>EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSA</b> <b>ITWNSGHIDYADSVEGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSY</b> <b>LSTASSLDYWQQGTLTVSS (SEQ ID NO:50)</b>

45 Tabla 4: Secuencias de aminoácidos de la cadena ligera variable

Anticuerpo	Secuencia de aminoácidos VL (SEQ ID NO)
adalimumab	<b>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAKPILLIYAAAS</b> <b>TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTSSLQPEDVATYYCQRYNAPYTGFQGTVK EIK (SEQ ID NO:59)</b>

50 Tabla 5: Secuencias de aminoácidos de la cadena pesada de longitud completa

Anticuerpo	Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de longitud completa (SEQ ID NO)
Adalimumab (D2E7)	<b>EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSA</b> <b>ITWNSGHIDYADSVEGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSY</b> <b>LSTASSLDYWQQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY</b> <b>FPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPALVQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNV</b> <b>NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCPCPAPEELLGGPSVFLPPPKPKDTLMIS</b> <b>RTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS</b> <b>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSR</b> <b>DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY</b> <b>TVDKSRWOOGNVFSCSVMHFAT, HNHYTOKST, ST, SPGK ISEO A NO66</b>

SKT,

Tabla 6: Secuencias de aminoácidos de la cadena ligera de longitud completa

	Anticuerpo	Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de longitud completa (SEQ ID NO)
5	Adalimumab (D2E7)	<b>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQSGVPSRFSGSGSTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSQ GNSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC (SEQ ID NO:73)</b>

- 10 Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar mediante el uso de métodos de hibridomas, tales como los descritos por Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256:495. Mediante el uso del método del hibridoma, se inmuniza un ratón, hámster u otro animal huésped apropiado para provocar la producción por linfocitos de anticuerpos que se unirán específicamente a un antígeno inmunizante. Los linfocitos también se pueden inmunizar *in vitro*. Despues de la inmunización, los linfocitos se aíslan y fusionan con una línea celular de mieloma adecuada mediante el uso, por ejemplo, de polietilenglicol, para formar células de hibridoma que luego pueden seleccionarse de linfocitos no fusionados y células de mieloma. Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra un antígeno elegido según se determina mediante inmunoprecipitación, inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) pueden luego propagarse en cultivo *in vitro* mediante el uso de métodos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, 1986) o *in vivo* como tumores ascíticos en un animal. Los anticuerpos monoclonales pueden luego purificarse del medio de cultivo o del fluido ascítico como se describe para los anticuerpos policlonales.
- 15 Alternativamente, también se pueden preparar anticuerpos monoclonales mediante el uso de métodos de ADN recombinante como se describe en la Patente de Estados Unidos 4.816.567. Los polinucleótidos que codifican un anticuerpo monoclonal se aíslan de células B maduras o células de hibridoma, como por RT-PCR mediante el uso de cebadores oligonucleotídicos que amplifican específicamente los genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo, y su secuencia se determina mediante el uso de procedimientos convencionales. Los polinucleótidos aislados que codifican las cadenas pesada y ligera se cloran luego en vectores de expresión adecuados, que cuando se transfieren en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otra manera no producen proteína inmunoglobulina, los anticuerpos monoclonales son generados por las células huésped. Además, los anticuerpos monoclonales recombinantes o fragmentos de los mismos de la especie deseada pueden aislarse de bibliotecas de presentación de fagos que expresan CDR de la especie deseada como se describe (McCafferty y otros, 1990, *Nature*, 348:552-554; Clackson y otros, 1991, *Nature*, 352:624-628; y Marks y otros, 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597).
- 20 El polinucleótido o polinucleótidos que codifican un anticuerpo monoclonal se pueden modificar adicionalmente de varias formas diferentes mediante el uso de tecnología de ADN recombinante para generar anticuerpos alternativos. Los anticuerpos monoclonales de ratón pueden sustituirse 1) por aquellas regiones de, por ejemplo, un anticuerpo humano para generar un anticuerpo químérico o 2) para un anticuerpo no polipéptido de inmunoglobulina para generar un anticuerpo de fusión. En algunas modalidades, las regiones constantes se truncan o eliminan para generar el fragmento de anticuerpo deseado de un anticuerpo monoclonal. Puede usarse mutagénesis dirigida al sitio o de alta densidad de la región variable para optimizar la especificidad, afinidad, etc. de un anticuerpo monoclonal.
- 25 En algunas modalidades, el anticuerpo monoclonal contra el TNF-alfa es un anticuerpo humanizado. En determinadas modalidades, dichos anticuerpos se usan terapéuticamente para reducir la antigenicidad y las respuestas de HAMA (anticuerpo anti-ratón humano) cuando se administran a un sujeto humano.
- 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90
- El polinucleótido o polinucleótidos que codifican un anticuerpo monoclonal se pueden modificar adicionalmente de varias formas diferentes mediante el uso de tecnología de ADN recombinante para generar anticuerpos alternativos. En algunas modalidades, los dominios constantes de las cadenas ligeras y pesadas de, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de ratón puede sustituirse 1) por aquellas regiones de, por ejemplo, un anticuerpo humano para generar un anticuerpo químérico o 2) para un anticuerpo no polipéptido de inmunoglobulina para generar un anticuerpo de fusión. En algunas modalidades, las regiones constantes se truncan o eliminan para generar el fragmento de anticuerpo deseado de un anticuerpo monoclonal. Puede usarse mutagénesis dirigida al sitio o de alta densidad de la región variable para optimizar la especificidad, afinidad, etc. de un anticuerpo monoclonal.
- En algunas modalidades, el anticuerpo monoclonal contra el TNF-alfa es un anticuerpo humanizado. En determinadas modalidades, dichos anticuerpos se usan terapéuticamente para reducir la antigenicidad y las respuestas de HAMA (anticuerpo anti-ratón humano) cuando se administran a un sujeto humano.
- También se pueden usar métodos para manipular, humanizar o renovar anticuerpos humanos o no humanos y son bien conocidos en la técnica. Un anticuerpo humanizado, revestido o modificado por ingeniería genética de manera similar puede tener uno o más residuos de aminoácidos de una fuente que no es humana, por ejemplo, pero no se limita a, ratón, rata, conejo, primate no humano u otro mamífero. Estos residuos de aminoácidos no humanos se reemplazan por residuos que a menudo se denominan residuos "importados", que normalmente se toman de un dominio variable, constante u otro dominio "importado" de una secuencia humana conocida.
- Dichas secuencias importadas pueden usarse para reducir la inmunogenicidad o reducir, potenciar o modificar la unión, afinidad, velocidad activa, velocidad inactiva, avidez, especificidad, vida media o cualquier otra característica adecuada, como se conoce en la técnica. En general, los residuos de CDR están directa y más sustancialmente implicados en influir en la unión de TNF-alfa. Por consiguiente, parte o todas las secuencias de CDR no humanas o humanas se mantienen mientras que las secuencias no humanas de las regiones variable y constante pueden reemplazarse con aminoácidos humanos u otros.
- Los anticuerpos también pueden ser opcionalmente humanizados, revestidos, modificados por ingeniería genética o anticuerpos humanos diseñados con retención de alta afinidad por el antígeno, por ejemplo, TNF-alfa y otras

propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, los anticuerpos humanizados (o humanos) o modificados por ingeniería genética y los anticuerpos revestidos pueden prepararse opcionalmente mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos conceptuales humanizados y modificados mediante el uso de modelos tridimensionales de las secuencias parentales, modificadas y humanizadas. Los

5 modelos de inmunoglobulina tridimensionales están comúnmente disponibles y son familiares para los expertos en la técnica. Hay disponibles programas informáticos que ilustran y muestran probables estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estos arreglos permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse

10 a su antígeno, tal como TNF-alfa. De esta manera, los residuos del marco (FR) pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias de importación y consenso de modo que se logre la característica deseada del anticuerpo, tal como una mayor afinidad por el o los antígenos diana.

15 La humanización, revestimiento o ingeniería de anticuerpos de la presente descripción se puede realizar mediante el uso de cualquier método conocido, tal como, pero no limitado a, los descritos en Winter (Jones y otros, *Nature* 321:522 (1986); Riechmann y otros, *Nature* 332:323 (1988); Verhoeven y otros, *Science* 239:1534 (1988)), Sims y otros, *J. Immunol.* 151: 2296 (1993); Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901 (1987), Carter y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285 (1992); Presta y otros, *J. Immunol.* 151:2623 (1993), patente de Estados Unidos. No. 5,639,641, 5,723,.323; 5,976,.862; 5,824,514; 5,817,483; 5,814,476; 5,763,192; 5,723,323; 5,766,886; 5,714,352; 6,204,023;

20 6,180,370; 5,693,762; 5,530,101; 5,585,089; 5,225,539; 4,816,567; PCT/ US98/16280; US96/18978; US91/09630; US91/05939; US94/01234; GB89/01334; GB91/01134; GB92/01755; WO90/14443; WO90/14424; WO90/14430; EP 229246; 7,557,189; 7,538,195; y 7,342,110.

25 En determinadas modalidades alternativas, el anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-TNF alfa) es un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos se pueden preparar directamente mediante el uso de diversas técnicas conocidas en la técnica. Se pueden generar linfocitos B humanos inmortalizados inmunizados *in vitro* o aislados de un individuo inmunizado que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (Vea, por ejemplo, Cole y otros, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pág. 77 (1985); Boemer y otros, 1991, *J. Immunol.*, 147 (1):86-95; y Patente de Estados Unidos 5,750,373). Además, el anticuerpo humano puede seleccionarse de una

30 biblioteca de fagos, donde esa biblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos, como se describe, por ejemplo, en Vaughan y otros, 1996, *Nat. Biotech.*, 14:309-314, Sheets y otros, 1998, *Proc. Nat'l. Acad. Sci.*, 95:6157-6162, Hoogenboom y Winter, 1991, *J. Mol. Biol.*, 227:381 y Marks y otros, 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581). Las técnicas para la generación y uso de bibliotecas de fagos de anticuerpos también se describen en las Patentes de Estados Unidos No. 5,969,108, 6,172,197, 5,885,793, 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915; 6,593,081; 6,300,064; 6,653,068;

35 6,706,484; y 7,264,963; y Rothe y otros, 2007, *J. Mol. Bio.*, Doi: 10.1016/j.jmb.2007.12.018. Las estrategias de maduración por afinidad y las estrategias de reorganización de cadenas (Marks y otros, 1992, *Bio/Technology* 10:779-783) son conocidas en la técnica y pueden emplearse para generar anticuerpos humanos de alta afinidad.

40 Los anticuerpos humanizados también se pueden preparar en ratones transgénicos que contienen loci de inmunoglobulina humana que, tras la inmunización, son capaces de producir el repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de la producción de inmunoglobulina endógena. Este enfoque se describe en las Patentes de Estados Unidos 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; y 5,661,016.

45 En determinadas modalidades, se proporciona un fragmento de anticuerpo para, por ejemplo, aumentar la penetración del tumor. Se conocen varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtienen mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (por ejemplo, Morimoto y otros, 1993, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117; Brennan y otros, 1985, *Science*, 229:81). En determinadas modalidades, los fragmentos de anticuerpos se producen de forma recombinante. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y scFv pueden expresarse y secretarse a partir de *E. coli* u otras células huésped, lo que permite la producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Dichos fragmentos de anticuerpos también se pueden aislar de bibliotecas de fagos de anticuerpos. El fragmento de anticuerpo también puede ser anticuerpos lineales como se describe en la patente de Estados Unidos 5,641,870. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos resultarán evidentes para el médico experto.

55 Para los propósitos de la presente descripción, debe apreciarse que los anticuerpos modificados pueden comprender cualquier tipo de región variable que proporcione la asociación del anticuerpo con el antígeno (por ejemplo, TNF alfa). A este respecto, la región variable puede comprender o derivarse de cualquier tipo de mamífero que pueda inducirse a montar una respuesta humoral y generar inmunoglobulinas contra el antígeno asociado al tumor deseado. Como tal, la región variable de los anticuerpos modificados puede ser, por ejemplo, de origen humano, murino, de primates no humanos (por ejemplo, monos cynomolgus, macacos, etc.) o de lupino. En algunas modalidades, tanto las regiones variables como las constantes de las inmunoglobulinas modificadas son humanas. En otras modalidades, las regiones variables los anticuerpos compatibles (normalmente derivados de una fuente no humana) se pueden modificar por ingeniería genética o adaptar específicamente para mejorar las propiedades de unión o reducir la inmunogenicidad de la molécula. A este respecto, las regiones variables útiles en la presente descripción se pueden humanizar o alterar de otro modo mediante la inclusión de secuencias de aminoácidos importadas.

Las proteínas anti-TNF alfa incluyen proteínas receptoras de TNF solubles. La proteína anti-TNF alfa puede ser un receptor de TNF p75 soluble. La proteína anti-TNF alfa puede ser un receptor de TNF p55 soluble.

- 5 El receptor de TNF soluble puede unirse tanto al TNF alfa como al TNF beta. El receptor de TNF soluble puede unirse al TNF alfa, pero no al TNF beta.
- 10 El receptor de TNF soluble puede inhibir la unión de TNF alfa (y opcionalmente TNF beta) a los receptores de TNF de la superficie celular.
- 15 Una proteína anti-TNF alfa, por ejemplo, un receptor de TNF soluble, puede fusionarse con un dominio constante de la cadena pesada o un fragmento del mismo o una región Fc o un fragmento del mismo. El fragmento del dominio constante de la cadena pesada o el fragmento Fc puede ser una parte del dominio constante o Fc que es capaz de unirse al receptor Fc. El fragmento de dominio constante de la cadena pesada o el fragmento Fc puede ser una parte del dominio constante o Fc que es capaz de inducir la lisis celular *in vitro* en presencia de complemento. El fragmento del dominio constante de la cadena pesada o el fragmento Fc puede ser una parte del dominio constante o Fc que es capaz de inducir ADCC.
- 20 El dominio constante de la cadena pesada o fragmento del mismo o región Fc o fragmento de la misma puede ser un dominio constante de la cadena pesada humana o fragmento del mismo o región Fc humana o fragmento de la misma. El dominio constante de cadena pesada o fragmento del mismo o región Fc o fragmento de la misma puede ser un dominio constante de la cadena pesada de IgG1 o fragmento del mismo o una región Fc de IgG1 o fragmento de la misma. El dominio constante de la cadena pesada o fragmento del mismo o la región Fc o fragmento de la misma puede ser un dominio constante de la cadena pesada de IgG1 humana o fragmento del mismo o la región Fc de IgG1 humana o fragmento de la misma.
- 25 Los expertos en la técnica apreciarán que los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos de esta descripción y las proteínas anti-TNF de esta descripción incluyen anticuerpos, fragmentos de unión al antígeno de los mismos y proteínas anti-TNF (por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos que se unen a antígenos, o proteínas receptoras de TNF solubles) que comprenden uno o más de los dominios de la región constante, incluidos los dominios que se han alterado para proporcionar las características bioquímicas deseadas, como la vida media sérica reducida en comparación con un anticuerpo, fragmento de unión al antígeno del mismo, o proteína anti-TNF de aproximadamente la misma inmunogenicidad que comprende una región constante nativa o inalterada. En algunas modalidades, la región constante del anticuerpo, su fragmento de unión al antígeno o proteína anti-TNF (por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno o proteínas receptoras de TNF solubles) comprenderán una región constante humana. Las modificaciones de la región constante compatibles con esta descripción comprenden adiciones, delecciones o sustituciones de uno o más aminoácidos en uno o más dominios. Es decir, el anticuerpo, fragmento de unión al antígeno del mismo o proteínas anti-TNF (por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno o proteínas receptoras de TNF solubles) descritos en la presente descripción pueden comprender alteraciones o modificaciones de uno o más de los tres dominios constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) y/o el dominio constante de la cadena ligera (CL). En algunas modalidades, se contemplan regiones constantes modificadas en donde uno o más dominios están parcial o totalmente eliminados. En algunas modalidades, los anticuerpos, fragmentos de unión al antígeno de los mismos o proteínas anti-TNF (por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno o proteínas receptoras de TNF solubles) comprenderán construcciones o variantes de dominio delecionados en donde el dominio CH2 completo se ha eliminado (construcciones ACH2). En algunas modalidades, el dominio de la región constante omitido será reemplazado por un espaciador de aminoácidos corto (por ejemplo, 10 residuos) que proporciona algo de la flexibilidad molecular impartida normalmente por la región constante ausente.
- 30 Se observará que en ciertas modalidades, los anticuerpos, sus fragmentos de unión al antígeno o proteínas anti-TNF (por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno o proteínas receptoras de TNF solubles) pueden modificarse por ingeniería genética para fusionar el dominio CH3 directamente a la región bisagra de los respectivos anticuerpos, fragmentos de unión al antígeno de los mismos o proteínas anti-TNF (por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno o proteínas receptoras de TNF solubles). En otras construcciones, puede ser deseable proporcionar un espaciador de péptidos entre la región bisagra y los dominios CH2 y/o CH3 modificados. Por ejemplo, podrían expresarse construcciones compatibles en las que el dominio CH2 se ha eliminado y el dominio CH3 restante (modificado o no modificado) se une a la región bisagra con un espaciador de 5-20 aminoácidos. Se puede añadir un espaciador de este tipo, por ejemplo, para garantizar que los elementos reguladores del dominio constante permanezcan libres y accesibles o que la región bisagra permanezca flexible. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los espaciadores de aminoácidos pueden, en algunos casos, resultar inmunogénicos y provocar una respuesta inmune no deseada contra la construcción. Por consiguiente, en determinadas modalidades, cualquier espaciador añadido a la construcción será relativamente no inmunogénico, o incluso se omitirá por completo, para mantener las cualidades bioquímicas deseadas de los anticuerpos, fragmentos de unión al antígeno de los mismos o proteínas anti-TNF (por
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

ejemplo anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos que se unen a antígenos o proteínas receptoras de TNF solubles).

Se apreciará que los anticuerpos, fragmentos de unión al antígeno de los mismos y proteínas anti-TNF (por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno o proteínas receptoras de TNF solubles) de la presente descripción pueden ser proporcionados por delección o sustitución de unos pocos o incluso de un solo aminoácido. Por ejemplo, la mutación de un solo aminoácido en áreas seleccionadas del dominio CH2 puede ser suficiente para reducir sustancialmente la unión del Fc y por tanto aumentar la localización del tumor.

De manera similar, puede ser deseable eliminar simplemente la parte de uno o más dominios de la región constante que controlan la función efectora (por ejemplo, la unión del complemento C1Q) que se va a modular. Tales delecciones parciales de las regiones constantes pueden mejorar las características seleccionadas del anticuerpo (vida media sérica) mientras dejan intactas otras funciones deseables asociadas con el dominio de la región constante sujeto. Además, como se mencionó anteriormente, las regiones constantes de los anticuerpos descritos, los fragmentos de unión al antígeno de los mismos y las proteínas anti-TNF (por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno o proteínas receptoras de TNF solubles) se pueden modificar mediante la mutación o sustitución de uno o más aminoácidos que potencia el perfil de la construcción resultante. A este respecto, puede ser posible interrumpir la actividad proporcionada por un sitio de unión conservado (por ejemplo, unión de Fc) mientras se mantiene sustancialmente la configuración y el perfil inmunogénico de los anticuerpos, los fragmentos de unión al antígeno de los mismos y las proteínas anti-TNF (por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno o proteínas receptoras de TNF solubles).

Ciertas modalidades pueden comprender la adición de uno o más aminoácidos a la región constante para mejorar las características deseables tales como disminuir o aumentar la función efectora o proporcionar mayor unión agonista del receptor de glucocorticoïdes. En tales modalidades, puede ser deseable insertar o replicar secuencias específicas derivadas de dominios de regiones constantes seleccionadas.

Se apreciará que los anticuerpos, fragmentos de unión al antígeno de los mismos y proteínas anti-TNF (por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno o proteínas receptoras de TNF solubles) de la presente descripción se pueden modificar para reducir la immunogenicidad, es decir, para reducir la respuesta inmune anti-fármacos (ADA). Los métodos para hacerlo se describen, por ejemplo, en el documento WO 2015/073884.

La presente descripción abarca además variantes y equivalentes que son sustancialmente homólogos a anticuerpos, fragmentos de unión al antígeno de los mismos y proteínas anti-TNF (por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno o proteínas receptoras de TNF solubles) expuestas en la presente descripción. Estos pueden contener, por ejemplo, mutaciones de sustitución conservativas, es decir, la sustitución de uno o más aminoácidos por aminoácidos similares. Por ejemplo, la sustitución conservativa se refiere a la sustitución de un aminoácido por otro dentro de la misma clase general como, por ejemplo, un aminoácido ácido por otro aminoácido ácido, un aminoácido básico por otro aminoácido básico o un aminoácido neutro por otro aminoácido neutro. Lo que se pretende con una sustitución conservativa de aminoácidos es bien conocido en la técnica.

Los polipéptidos de la presente descripción pueden ser polipéptidos recombinantes, polipéptidos naturales o polipéptidos sintéticos de un anticuerpo, fragmento de unión al antígeno del mismo o proteína anti-TNF. Se reconocerá en la técnica que algunas secuencias de aminoácidos de la descripción se pueden variar sin un efecto significativo de la estructura o función de la proteína. Por tanto, la descripción incluye además variaciones de los polipéptidos que muestran una actividad sustancial o que incluyen regiones de un anticuerpo, fragmento de unión al antígeno del mismo o proteína anti-TNF alfa. Dichos mutantes incluyen delecciones, inserciones, inversiones, repeticiones y sustituciones tipo.

Los polipéptidos y análogos se pueden modificar adicionalmente para contener restos químicos adicionales que normalmente no forman parte de la proteína. Esos restos derivatizados pueden mejorar la solubilidad, la vida media biológica o la absorción de la proteína. Los restos también pueden reducir o eliminar cualquier efecto secundario deseable de las proteínas y similares. Se puede encontrar una descripción general de esos restos en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 20<sup>a</sup> ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (2000).

Los polipéptidos aislados descritos en la presente descripción pueden producirse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Dichos métodos van desde métodos de síntesis de proteínas directos hasta la construcción de una secuencia de ADN que codifica secuencias polipeptídicas aisladas y que expresan esas secuencias en un huésped transformado adecuado. En algunas modalidades, se construye una secuencia de ADN mediante el uso de tecnología recombinante mediante el aislamiento o la síntesis de una secuencia de ADN que codifica una proteína de interés de tipo salvaje. Opcionalmente, la secuencia puede mutagenizarse mediante mutagénesis sitio-específica para proporcionar análogos funcionales de la misma. Vea, por ejemplo, Zoeller y otros, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 81:5662-5666 (1984) y la patente de Estados Unidos No. 4,588,585.

En algunas modalidades, se construiría una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de interés mediante síntesis química mediante el uso de un sintetizador de oligonucleótidos. Dichos oligonucleótidos pueden diseñarse basado en la secuencia de aminoácidos del polipéptido deseado y mediante la selección de aquellos codones que

- se favorecen en la célula huésped en la que se producirá el polipéptido recombinante de interés. Se pueden aplicar métodos estándar para sintetizar una secuencia polinucleotídica aislada que codifica un polipéptido aislado de interés. Por ejemplo, se puede usar una secuencia de aminoácidos completa para construir un gen retrotraducido. Además, se puede sintetizar un oligómero de ADN que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido aislado particular. Por ejemplo, varios oligonucleótidos pequeños que codifican porciones del polipéptido deseado pueden sintetizarse y luego ligarse. Los oligonucleótidos individuales contienen normalmente salientes 5' o 3' para el ensamblaje complementario.
- Una vez ensambladas (por síntesis, mutagénesis sitio-dirigida u otro método), las secuencias de polinucleótidos que codifican un polipéptido aislado particular de interés se insertarán en un vector de expresión y se unirán operativamente a una secuencia de control de expresión apropiada para la expresión de la proteína en un huésped deseado. El ensamblaje adecuado puede confirmarse mediante secuenciación de nucleótidos, mapeo de restricción y expresión de un polipéptido biológicamente activo en un huésped adecuado. Como es bien conocido en la técnica, para obtener altos niveles de expresión de un gen transfectado en un huésped, el gen debe estar operativamente ligado a secuencias de control de la expresión transcripcional y traduccional que sean funcionales en el huésped de expresión elegido.
- En determinadas modalidades, los vectores de expresión recombinantes se usan para amplificar y expresar ADN que codifica anticuerpos, fragmentos de unión al antígeno de los mismos o proteínas anti-TNF (por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno o proteínas receptoras de TNF solubles). Los vectores de expresión recombinantes son construcciones de ADN replicables que tienen fragmentos de ADN sintéticos o derivados de ADNc que codifican una cadena polipeptídica de un anticuerpo, fragmento de unión al antígeno del mismo o proteína anti-TNF (por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno, o proteínas receptoras de TNF solubles), operativamente enlazadas a elementos reguladores transcripcionales o de traducción adecuados derivados de genes de mamíferos, microbianos, virales o de insectos. Una unidad transcripcional generalmente comprende un ensamblaje de (1) un elemento o elementos genéticos que tienen un papel regulador en la expresión génica, por ejemplo, promotores o potenciadores transcripcionales, (2) una secuencia estructural o codificante que se transcribe en ARNm y se traduce en proteína, y (3) secuencias apropiadas de iniciación y terminación de la transcripción y traducción. Dichos elementos reguladores pueden incluir una secuencia de operador para controlar la transcripción. Se puede incorporar adicionalmente la capacidad de replicarse en un huésped, normalmente conferida por un origen de replicación, y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de los transformantes. Las regiones de ADN están unidas operativamente cuando están relacionadas funcionalmente entre sí. Por ejemplo, el ADN de un péptido señal (líder secretor) se une operativamente al ADN de un polipéptido si se expresa como un precursor que participa en la secreción del polipéptido; un promotor está operativamente ligado a una secuencia codificante si controla la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está operativamente ligado a una secuencia codificante si está posicionado para permitir la traducción. Los elementos estructurales previstos para su uso en sistemas de expresión de levadura incluyen una secuencia líder que permite la secreción extracelular de la proteína traducida por una célula huésped. Alternativamente, cuando la proteína recombinante se expresa sin una secuencia líder o de transporte, puede incluir un residuo de metionina N-terminal. Opcionalmente, este residuo se puede escindir posteriormente de la proteína recombinante expresada para proporcionar un producto final.
- La elección de la secuencia de control de la expresión y el vector de expresión dependerá de la elección del huésped. Puede emplearse una amplia variedad de combinaciones de vector/huésped de expresión. Los vectores de expresión útiles para huéspedes eucariotas incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden secuencias de control de la expresión de SV40, virus del papiloma bovino, adenovirus y citomegalovirus. Los vectores de expresión útiles para huéspedes bacterianos incluyen plásmidos bacterianos conocidos, tales como plásmidos de *Escherichia coli*, que incluyen pCR 1, pBR322, pMB9 y sus derivados, plásmidos de intervalo de huésped más amplio, tales como M13 y fagos de ADN monocatenario filamento.
- Las células huéspedes adecuadas para la expresión de anticuerpos, sus fragmentos de unión al antígeno y proteínas anti-TNF (por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno o proteínas receptoras de TNF solubles) incluyen procariotas, levaduras, insectos o células eucariotas superiores bajo el control de promotores apropiados. Los procariotas incluyen organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo *E. coli* o bacilos. Las células eucariotas superiores incluyen líneas celulares establecidas de origen mamífero. También se podrían emplear sistemas de traducción sin células. Pouwels y otros describen vectores de clonación y expresión apropiados para su uso con huéspedes celulares bacterianos, fúngicos, de levadura y de mamíferos. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., 1985). Se puede encontrar información adicional con respecto a los métodos de producción de proteínas, incluida la producción de anticuerpos, por ejemplo, en la publicación de patente de Estados Unidos No. 2008/0187954, las patentes de Estados Unidos No. 6,413,746 y 6,660,501 y la publicación de patente internacional No. WO 04009823.
- También se emplean ventajosamente varios sistemas de cultivo de células de mamíferos o insectos para expresar proteína recombinante. La expresión de proteínas recombinantes en células de mamíferos se puede realizar porque tales proteínas generalmente se pliegan correctamente, se modifican apropiadamente y son completamente funcionales. Ejemplos de líneas celulares huéspedes de mamíferos adecuadas incluyen HEK-293 y HEK-293T, las

líneas COS-7 de células de riñón de mono, descritas por Gluzman (Cell 23:175, 1981), y otras líneas celulares que incluyen, por ejemplo, células L C127, 3T3, líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO), HeLa y BHK. Los vectores de expresión de mamíferos pueden comprender elementos no transcritos tales como un origen de replicación, un promotor y potenciador adecuado ligado al gen que se va a expresar, y otras secuencias no transcritas flanqueantes 5 'o 3', y secuencias no traducidas 5 'o 3', tales como sitios de unión de ribosomas necesarios, un sitio de poliadenilación, sitios donantes y aceptores de empalme y secuencias de terminación de la transcripción. Luckow y Summers, Bio/Technology 6:47 (1988) revisan los sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de insectos.

10 Las proteínas producidas por un huésped transformado pueden purificarse de acuerdo con cualquier método adecuado. Dichos métodos estándar incluyen cromatografía (por ejemplo, cromatografía en columna de intercambio iónico, afinidad y tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Las etiquetas de afinidad tales como hexahistidina, dominio de unión a maltosa, secuencia de cubierta de influenza y glutatión-S-transferasa se pueden unir a la proteína para permitir una fácil purificación mediante el paso sobre una columna de afinidad apropiada. Las proteínas aisladas también se pueden caracterizar físicamente mediante el uso de técnicas tales como proteólisis, resonancia magnética nuclear y cristalográfica de rayos X.

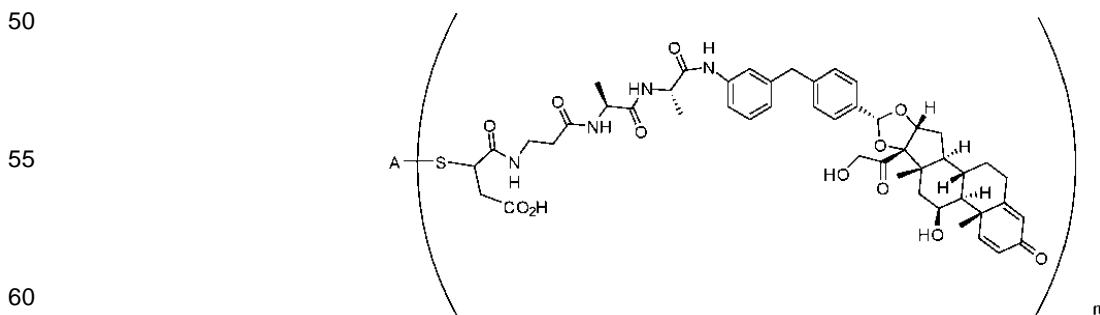
20 Por ejemplo, los sobrenadantes de sistemas que secretan proteína recombinante en medios de cultivo se pueden concentrar primero mediante el uso de un filtro de concentración de proteína disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Después de la etapa de concentración, el concentrado se puede aplicar a una matriz de purificación adecuada. Alternativamente, se puede emplear una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o sustrato que tiene grupos dietilaminoetilo (DEAE) colgantes. Las matrices pueden ser acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos comúnmente empleados en la purificación de proteínas. Alternativamente, se puede emplear una etapa de intercambio catiónico. Los intercambiadores catiónicos adecuados incluyen diversas matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. Finalmente, se pueden emplear una o más etapas de cromatografía líquida de alta resolución (RP-HPLC) en fase reversa que emplean medio RP-HPLC hidrófobo, por ejemplo, gel de sílice que tiene metilo colgante u otros grupos alifáticos, para purificar más proteínas anti-TNF (por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos que se unen al antígeno o proteínas receptoras de TNF solubles). Algunas o todas las etapas de purificación anteriores, en diversas combinaciones, también pueden emplearse para proporcionar una proteína recombinante homogénea.

35 La proteína recombinante producida en cultivo bacteriano puede aislarse, por ejemplo, mediante extracción inicial de sedimentos celulares, seguida de una o más etapas de concentración, desalinización, intercambio iónico acuoso o cromatografía de exclusión por tamaño. Puede emplearse cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para las etapas finales de purificación. Las células microbianas empleadas en la expresión de una proteína recombinante pueden romperse mediante cualquier método conveniente, incluyendo ciclos de congelación-descongelación, sonicación, alteración mecánica o uso de agentes de lisis celular.

40 Los métodos conocidos en la técnica para purificar anticuerpos, fragmentos de unión al antígeno de los mismos y proteínas anti-TNF alfa también incluyen, por ejemplo, los descritos en las publicaciones de patente de Estados Unidos No. 2008/0312425, 2008/0177048 y 2009/0187005.

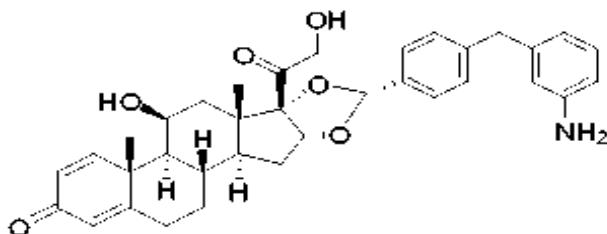
### 45 III. Inmunoconjungados que contienen agonistas del receptor de glucocorticoides

En la presente descripción se proporcionan inmunoconjungados que contienen agonistas del receptor de glucocorticoides. La invención proporciona inmunoconjungados con la fórmula:



65 en donde n es 2 o 4, y A es un anticuerpo que comprende las SEQ ID NO: 66 y SEQ ID NO: 73 o adalimumab. En otras modalidades de la invención, n es 4. En otras modalidades de la invención, n es 2. En otras modalidades de la invención, A es adalimumab.

En otra modalidad, se describe en la presente descripción un compuesto que tiene la Fórmula VIII, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, seleccionado del grupo que consiste en:



#### IV. Métodos para fabricar inmunoconjugados e intermedios sintéticos

15 De acuerdo con la presente descripción, los agonistas del receptor de glucocorticoides pueden unirse al anticuerpo, fragmento de unión al antígeno del mismo o proteínas anti-TNF alfa mediante cualquier método y en cualquier ubicación que no impida que el anticuerpo, fragmento de unión al antígeno del mismo o la proteína anti-TNF alfa se una al antígeno (por ejemplo, TNF alfa) o que prevenga la actividad del agonista del receptor de glucocorticoides. Los métodos para lograr tal enlace se han discutido, por ejemplo, en Panowski y otros, MAbs 6: 34-45 (2014), Jain y otros, Pharm. Res. 32: 3526-3540 (2015), Mack y otros, Seminars in Oncology 41: 637-652 (2014), Solicitud publicada de Estados Unidos No. 2008/0305044 y Solicitud publicada de Estados Unidos No. 2011/0097322.

20 25 El agonista del receptor de glucocorticoides también se puede unir a un residuo de cisteína. Se conocen métodos de conjugación mediante cisteína. Los anticuerpos IgG1 contienen cuatro enlaces disulfuro intercatenarios, y la conjugación a través de la cisteína puede ocurrir después de que la reducción de estos enlaces crea sulfhidrilos disponibles para la conjugación.

30 Los agonistas del receptor de glucocorticoides pueden unirse al anticuerpo, su fragmento de unión al antígeno o proteínas anti-TNF alfa mediante conjugación sitio-específica.

35 Un método de conjugación sitio-específica es la conjugación sitio-específica basada en cisteína. Un ejemplo de este método ha sido informado por Junutula y otros, Nat. Biotechnol 26: 925-935 (2008); vea también Junutula y otros, J. Immunol. Methods 332: 41-52 (2008). Mediante el uso de este método, los anticuerpos, los fragmentos de unión a antígeno de los mismos o las proteínas anti-TNF alfa pueden modificarse por ingeniería genética con cisteínas adicionales que proporcionen grupos tiol reactivos para conjugar el agonista del receptor de glucocorticoides. Estas publicaciones también brindan orientación sobre la selección de cisteínas reactivas que no interfieren con la unión del antígeno.

40 Otro método de conjugación sitio-específica usa selenocisteína. La selenocisteína es similar a la cisteína pero contiene un átomo de selenio más reactivo en lugar del átomo de azufre en la cisteína. Se pueden usar condiciones en las que las selenocisteínas se activen selectivamente. Hofer y otros, Biochemistry 48: 12047-12057 (2009) han ejemplificado esta técnica.

45 Otro método de conjugación sitio-específica hace uso de aminoácidos no naturales, por ejemplo, acetilfenilalanina (pAcPhe) o para-azido fenilalanina (pAF). Wang y otros Proc. Natl. Acad. Sci. 100: 56 - 61 (2003), Axup y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. 109:16101-16106 (2012), y Kern y otros, JACS 138: 1430-1445 (2016) han ejemplificado esta técnica.

50 Otro método de conjugación sitio-específica hace uso de enfoques enzimáticos, por ejemplo, a través de glicotransferasas o transglutaminasas. Pueden usarse glicotransferasas mutantes para unir un resto de azúcar químicamente activo a un sitio de glicosilación en un anticuerpo, fragmento de unión al antígeno del mismo o proteína anti-TNF alfa. Los anticuerpos IgG humanos contienen un sitio de N-glicosilación en el residuo Asn-297 del fragmento Fc. Los glicanos unidos a este residuo pueden desgalactosilarse de modo que una glicotransferasa mutante sea capaz de transferirse a ellos. Boeggeman y otros, Bioconjug. Chem. 20: 1228-1236 (2009) ha ejemplificado esta técnica. Las transglutaminasas, por ejemplo, de *Streptovorticillium mobaranse*, reconocen una etiqueta de glutamina, por ejemplo, LLQG, que puede modificarse por ingeniería genética en una proteína anti-TNF alfa. Jeger y otros, Angew Chem. En t. Ed. Engl. 49: 9995-9997 (2010) ha ejemplificado esta técnica.

55 60 También se puede usar la unión C-terminal mediante ligación de proteínas expresadas. Por ejemplo, la formación de tioéster C-terminal mediada por inteína puede usarse para la ligación quimioselectiva con una proteína anti-TNF alfa que contiene un péptido de cisteína N-terminal. Chiang y otros, J. Am. Chem. Soc. 136: 3370-3373 (2014) ha ejemplificado esta técnica.

V. Métodos de uso y composiciones farmacéuticas

En la presente descripción se proporciona un inmunoconjuguado agonista del receptor de glucocorticoides que puede usarse *in vitro* o *in vivo*. Por consiguiente, también se proporcionan en la presente descripción composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticas para ciertos usos *in vivo*, que comprenden un conjugado o un agonista del receptor de glucocorticoides descrito en la presente descripción que tiene el grado deseado de pureza en un vehículo, excipiente o estabilizador fisiológicamente aceptable (*Remington's Pharmaceutical Sciences* (1990)). Mack Publishing Co., Easton, PA). Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas.

Las composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) que se usarán para la administración *in vivo* pueden ser estériles. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través, por ejemplo, de membranas de filtración estériles. Las composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) que se utilizarán para la administración *in vivo* pueden comprender un conservante.

Una composición farmacéutica que comprende un agonista del receptor de glucocorticoides proporcionado en la presente descripción puede formularse, por ejemplo, como un aerosol nasal, un aerosol de inhalación (por ejemplo, para inhalación oral) o una cápsula, tableta o píldora (por ejemplo, para administración oral).

Los agonistas del receptor de glucocorticoides proporcionados en la presente descripción (por ejemplo, un ADC anti-TNF) son compuestos, en donde el número promedio de glucocorticosteroides por anticuerpo (DAR) en la composición es 2 o 4.

Los agonistas del receptor de glucocorticoides y las composiciones farmacéuticas que comprenden un agonista del receptor de glucocorticoides descrito en la presente descripción pueden ser útiles para inhibir la liberación de citocinas (*in vitro* o *in vivo*) y/o para el tratamiento de enfermedades autoinmunes o inflamatorias. Los agonistas del receptor de glucocorticoides y las composiciones farmacéuticas que comprenden un agonista del receptor de glucocorticoides descritos en la presente descripción pueden usarse para el tratamiento del asma (por ejemplo, asma bronquial), enfermedad de Crohn (por ejemplo, enfermedad de Crohn activa de leve a moderada en la que interviene el íleon y/o el colon ascendente y/o el mantenimiento de la remisión clínica de la enfermedad de Crohn de leve a moderada en la que interviene el íleon y/o el colon ascendente durante un máximo de 3 meses), colitis ulcerosa (por ejemplo, para la inducción de la remisión en pacientes con colitis ulcerosa activa, de leve a moderada), rinitis alérgica (por ejemplo, síntomas nasales asociados con rinitis alérgica estacional y/o rinitis alérgica perenne).

Para la administración a pacientes humanos, la dosis diaria total de agonistas del receptor de glucocorticoides proporcionada en la presente descripción está normalmente en el intervalo de 0,001 mg a 5000 mg, o en el intervalo de 0,01 mg a 1000 mg, en dependencia del modo de administración. Por ejemplo, la administración oral o intravenosa, intramuscular, intraarticular o periarticular puede requerir una dosis diaria total de 0,01 mg a 1000 mg, o de 0,1 mg a 100 mg. La dosis diaria total se puede administrar en dosis únicas o divididas.

Se puede formular una composición farmacéutica que comprende un conjugado proporcionado en la presente descripción, por ejemplo, para administración intravenosa o infusión.

Los conjugados y las composiciones farmacéuticas que comprenden conjugados descritos en la presente descripción pueden ser útiles para lisar una célula que exprese TNF-alfa de superficie (*in vitro* o *in vivo*), para el tratamiento de enfermedades o trastornos caracterizados por un aumento de TNF-alfa (por ejemplo, aumento de TNF-alfa en el fluido sinovial) y/o para el tratamiento de una enfermedad autoinmune o inflamatoria.

Una composición farmacéutica que comprende un agonista del receptor de glucocorticoides o un conjugado descrito en la presente descripción se usa para el tratamiento de la artritis reumatoide (RA), la artritis idiopática juvenil (JIA), artritis psoriásica (PSA), una espondiloartropatía tales como la espondilitis anquilosante (AS) o axial espondiloartritis (axSpA), enfermedad de Crohn del adulto (EC), enfermedad de Crohn pediátrica, colitis ulcerosa (CU), psoriasis en placas (Ps), hidradenitis supurativa (HS), uveítis, enfermedad de Behcet o psoriasis, incluida la psoriasis en placas.

Para la administración a pacientes humanos, la dosis diaria total de conjugado proporcionada en la presente descripción está normalmente en el intervalo de 0,01 mg a 100 mg por kg de peso corporal y se puede administrar una o más veces al día, semanalmente, mensualmente o anualmente.

Las modalidades de la presente descripción se pueden definir adicionalmente mediante referencia a los siguientes ejemplos no limitantes, que describen en detalle la preparación de ciertos anticuerpos de la presente descripción y métodos para usar anticuerpos de la presente descripción.

**Ejemplos**

Se entiende que los ejemplos y modalidades descritos en la presente descripción son solo para fines ilustrativos y que se sugerirán a los expertos en la técnica diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos y se incluirán dentro del espíritu y alcance de esta descripción.

Métodos analíticos para la síntesis y caracterización de compuestos

Los datos analíticos se incluyen dentro de los procedimientos siguientes, en las ilustraciones de los procedimientos generales o en las tablas de ejemplos. A menos que se indique lo contrario, todos los datos de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se recopilaron en un instrumento Varian Mercury Plus 400 MHz o Bruker AVIII 300 MHz; los cambios químicos se cotizan en partes por millón (ppm). Los datos analíticos de HPLC se detallan dentro del experimento o se refieren a la tabla de condiciones de LC/MS y HPLC, mediante el uso del método proporcionado en la Tabla 7.

Tabla 7: Lista de métodos LC/MS y GC/MS

<b>Método</b>	<b>Condiciones</b>
a	El gradiente fue 10-100 % de B en 3,4 min con una retención al 100 % de B durante 0,45 min, 100-10 % de B en 0,01 min, y luego se mantuvo al 10 % de B durante 0,65 min (velocidad de flujo de 0,8 mL/min). La fase móvil A fue ácido trifluoroacético al 0,0375 % en agua, la fase móvil B fue TFA al 0,018 % en MeCN. La columna usada para la cromatografía fue una columna de fenomenex Luna-C18 de 2,0 x 50 mm (partículas de 5 $\mu\text{m}$ ). Los métodos de detección son la detección por matriz de diodos (DAD) y la dispersión de luz evaporativa (ELSD), así como la ionización por electropulverización positiva (MS).
d	El gradiente fue de 5 % de B durante 0,2 min y de 95 % de B en 1,7 min y luego se mantuvo en 95 % de B durante 1,3 min, de nuevo a 5 % de B en 0,01 min (velocidad de flujo de 2,3 mL/min). La fase móvil A fue TFA al 0,01 % en agua y la fase móvil B fue TFA al 0,01 % en MeCN de calidad HPLC. La columna usada para la cromatografía fue una columna XBridge C18 (4,6 x 50 mm, partículas de 3,5 $\mu\text{m}$ ). Los métodos de detección son la matriz de diodos (DAD) y la detección de dispersión de luz evaporativa (ELSD), así como la ionización por electropulverización positiva/negativa
s	La UPLC-MS analítica se realizó en un espectrómetro de masas Waters SQD y un sistema Acquity UPLC que ejecutaba el software MassLynx 4.1 y OpenLynx 4.1. El espectrómetro de masas SQD se hizo funcionar en condiciones de ionización APCI positivas. La columna usada fue una Waters BEH C8, 1,7 $\mu\text{m}$ (2,1 mm x 30 mm) a una temperatura de 55 °C. Se usó un gradiente de acetonitrilo (A) al 10-100 % y acetato de amonio 10 mM en agua (B), a una velocidad de flujo de 1,0 mL/min (0-0,1 min 10 % de A, 0,1-1,1 min 10-100 % de A, 1,1-1,3 min 100 % de A, 1,3-1,4 min 100-10 % de A).

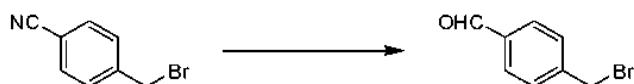
Las abreviaturas usadas en los ejemplos siguientes son:

APCI	Ionización química a presión atmosférica	HIC	Cromatografía de interacción hidrofóbica
BOC	terc- butiloxicarbonilo	HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
DCM	Diclorometano	MeCN	Acetonitrilo
DMF	Dimetilformamida	MeOH	Metanol
APCI	Ionización química a presión atmosférica	HIC	Cromatografía de interacción hidrofóbica
DMSO	Dimetilsulfóxido	Min	Minutos(s)
Eq	Equivalente	NaHCO <sub>3</sub>	Hidrógeno carbonato de sodio
EtOAc	Acetato de etilo	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de sodio
HATU	3-óxido de hexafluorofosfato de 1-RMN [Bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio	1-RMN	Resonancia magnética nuclear
HCl	Ácido clorhídrico	PBST	Solución salina tamponada con fosfato con Tween 20
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico	PE	Éter de petróleo
TFA	Ácido trifluoroacético	R <sub>t</sub>	Tiempo de retención

Ejemplo 2A: Síntesis de (6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-10-(4-(3-aminobencil)fenil)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a, 8a-dimetil-1,2,6a, 6b, 7,8,8a, 8b, 11a,12,12a,12b-dodecahidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3] dioxol-4-ona (Cpd. No. 41).

## Etapa 1: Síntesis de 4-(bromometil) benzaldehído

5



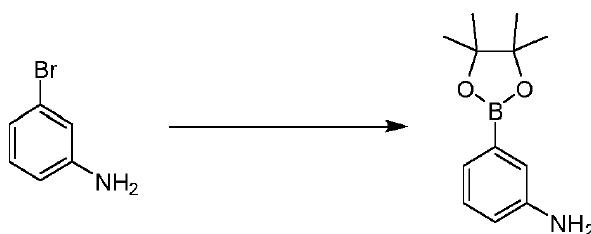
A una solución de 4-(bromometil) benzonitrilo (50 g, 255 mmol) en tolueno (1 L) se le añadió hidruro de diisobutilaluminio (383 mL, 383 mmol, 1 M en tolueno) gota a gota a 0 °C. La mezcla se agitó durante 1 hora. Se prepararon dos viales adicionales como se describió anteriormente. Se combinaron las tres mezclas de reacción. Se añadió HCl acuoso al 10 % (1,5 L) y luego se extrajo con DCM (3 x 1,5 L). La capa orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluido con éter de petróleo/acetato de etilo = 10/1) para producir el compuesto del título (120 g, 82 %) como un sólido blanco. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10,01 (s, 1H), 7,86 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,55 (d, J = 7,9 Hz, 2H), 4,51 (s, 2H).

15

## Etapa 2: Síntesis de 3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il) anilina

20

25



30

35

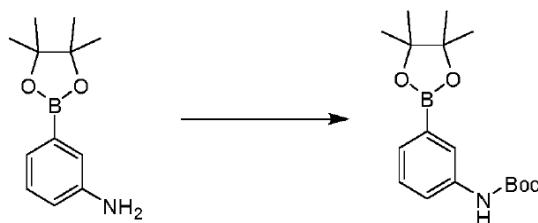
A una solución de 3-bromoanilina (80 g, 465 mmol) en 1,4-dioxano (960 mL) se le añadió 4,4,4',4',5,5,5',5'-octametil-2, 2'-bi (1,3,2-dioxaborolano) (177 g, 698 mmol), acetato de potasio (91 g, 930 mmol), 2-diciclohexilfosfino-2', 4', 6'-tri-i-propil-1,1'-bifenilo (13,45 g, 23,25 mmol) y tris (dibencilidenacetona) dipaladio (0) (17,03 g, 18,60 mmol). La mezcla se calentó a 80 °C durante 4 horas bajo nitrógeno. Se prepararon dos viales adicionales como se describió anteriormente. Se combinaron tres mezclas de reacción, se concentraron y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluido con éter de petróleo/acetato de etilo = 10/1) para producir el compuesto del título (150 g, 46,6 %) como un sólido amarillo claro. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,23 a 7,13 (m, 3H), 6,80 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 3,82 - 3,38 (m, 2H), 1,34 (s, 12H).

40

## Etapa 3: Síntesis de (3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)carbamato de terc-butilo

45

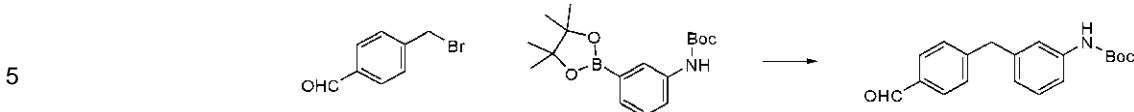
50



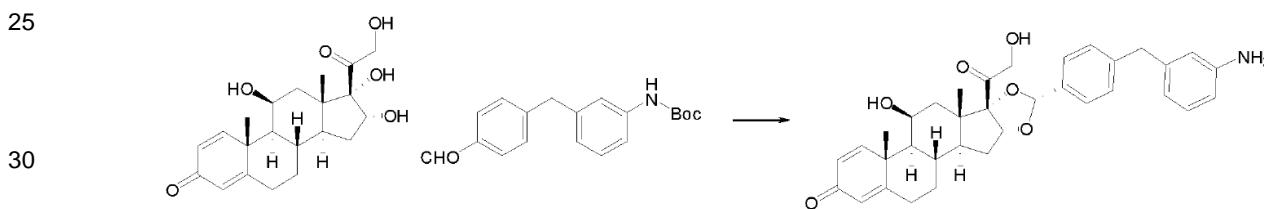
60

Se mezclaron 3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il) anilina (50 g, 228 mmol) y dicarbonato de di-terc-butilo (64,8 g, 297 mmol) en tolueno (500 mL) y la mezcla se agitó a 100 °C durante 24 horas. Se prepararon dos viales adicionales como se describió anteriormente. Se combinaron las tres mezclas de reacción. La mezcla marrón se concentró y el residuo se lavó con PE para producir el compuesto del título (120 g, 49,5 %) como un sólido blanco. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,62 (s, 2H), 7,48 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 7,35 - 7,29 (m, 1H), 6,46 (br. s., 1H), 1,52 (s, 9H), 1,34 (s, 12H).

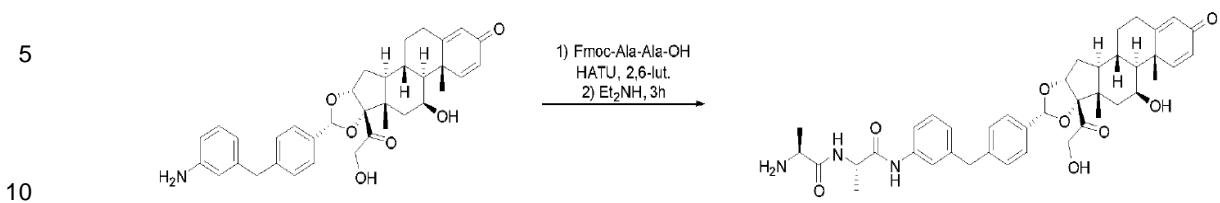
## Etapa 4: Síntesis de (3-(4-formilbencil) fenil) carbamato de terc-butilo



- 10 Una mezcla de 4-(bromometil) benzaldehido (29,9 g, 150 mmol), 1,1'-bis (difenilfosfino) ferrocenodicloro paladio (II) (20,63 g, 28,2 mmol), terc-butil (3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il) fenil) carbamato (30 g, 94 mmol) y carbonato de potasio (64,9 g, 470 mmol) en THF (600 mL) se calentó a 80 °C durante 12 horas. Se prepararon tres viales adicionales como se describió anteriormente. Se combinaron las cuatro mezclas de reacción. La mezcla de reacción se diluyó con agua (1 L). La capa acuosa se extrajo con EtOAc (3 X 800 mL). La capa orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluido con PE/EtOAc = 10/1) para producir el compuesto del título (35,5 g, 27,3 %) como un sólido blanco. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9,97 (s, 1H), 7,80 (d, J = 7,9 Hz, 2H), 7,35 (d, J = 7,9 Hz, 2H), 7,26 (s, 2H), 7,24 - 7,13 (m, 2H), 6,84 (d, J = 7,1 Hz, 1H), 6,43 (br.s., 1H), 4,02 (s, 2H), 1,50 (s, 9H).
- 15
- 20 **Etapa 5:** Síntesis de (6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-10-(4- (3-aminobencil)fenil) -7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil) -6a, 8a-dimetil-1,2,6a, 6b, 7,8,8a, 8b, 11a, 12,12a, 12b-dodecahidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4-ona

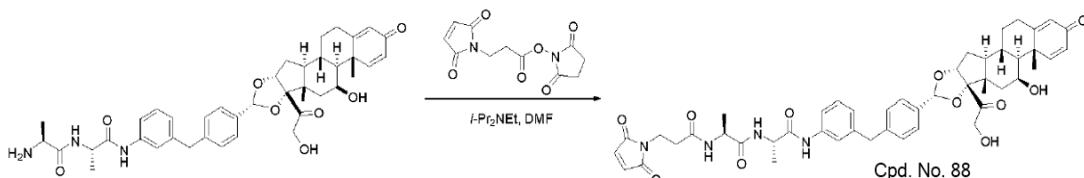


- 30
- 35 A una solución de (8S,9S,10R,11S,13S,14S,16R,17S)-11,16,17-trihidroxi-17-(2-hidroxiacetil)-10,13-dimetil-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahidro-3H-ciclopenta[a] fenantren-3-ona (6 g, 15,94 mmol) y terc-butil (3-(4-formilbencil) fenil) carbamato (4,96 g, 15,94 mmol) en MeCN (50 mL) se añadió gota a gota ácido perclórico (4,79 mL, 80 mmol) mientras se mantenía una temperatura interna por debajo de 25 °C mediante el uso de un baño de hielo. Después de la adición, la mezcla se agitó a 20 °C durante 2 horas. Se prepararon tres viales adicionales como se describió anteriormente. Se combinaron las cuatro mezclas de reacción. La mezcla de reacción se inactivó con NaHCO<sub>3</sub> saturado acuoso (500 mL) y se extrajo con diclorometano (3 X 800 mL). La fase orgánica se concentró y el residuo se purificó mediante Prep-HPLC para producir el compuesto del título (10 g, 27,0 %) como un sólido amarillo. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7,36 (d, J = 7,9 Hz, 2H), 7,31 (d, J = 10,1 Hz, 1H), 7,20 (d, J = 7,9 Hz, 2H), 6,89 (t, J = 7,9 Hz, 1H), 6,39 - 6,28 (m, 3H), 6,16 (dd, J = 1,5, 9,9 Hz, 1H), 5,93 (s, 1H), 5,39 (s, 1H), 5,08 (t, J = 5,7 Hz, 1H), 4,98 - 4,87 (m, 3 H), 4,78 (d, J = 3,1 Hz, 1H), 4,49 (dd, J = 6,2, 19,4 Hz, 1H), 4,29 (br. s., 1H), 4,17 (dd, J = 5,5, 19,6 Hz, 1H), 3,74 (s, 2H), 2,61 - 2,53 (m, 1H), 2,36 - 2,26 (m, 1H), 2,11 (d, J = 11,0 Hz, 1H), 2,07 (s, 1 H), 2,02 (d, J = 12,8 Hz, 1H), 1,83 - 1,54 (m, 5 H), 1,39 (s, 3H), 1,16 - 0,96 (m, 2H), 0,85 (s, 3H). LCMS: t<sub>R</sub> = 2,365 min, 98 % de pureza, m/z = 570,2 (M + H)<sup>+</sup> LC/MS (Tabla 7, método a)
- 40
- 45
- 50 Método de Prep-HPLC: Instrumento: Sistema de HPLC semipreparativo Gilson 281, Fase móvil: A: CF<sub>3</sub> COOH/H<sub>2</sub>O = 0,075 % v/v; B: CH<sub>3</sub> CN, Columna: Phenomenex Luna (2) C18 250 \* 50 10u, velocidad de flujo: 80 mL/min, longitud de onda del monitor: 220 y 254 nm, Tiempo B %, 0,0 28, 20,0 45, 20,1 45, 20,2 100, 30,2 100, 0,3 28, 31,5 28.
- 55 Ejemplo 34A: Síntesis de 3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-ilo)-N-((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a, 8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)propanamida (Cpd. No. 88)
- 60 Etapa 1: Síntesis de (S)-2-aminoN-((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a, 8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a, 6b, 7,8,8a, 8b, 11a, 12,12a, 12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5] indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)propanamida



Se añadió HATU (601 mg, 1,580 mmol) y 2,6-lutidina (0,37 mL, 3,16 mmol) a una solución a 0 °C de ácido ((S)-2-((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)propanoico (765 mg, 2,00 mmol), (6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobencil) fenil)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetyl) -6a, 8a-dimetil-6a, 6b, 7,8,8a, 8b,11a,12,12a,12b-decahidro-1H-nafto[2',1':4,5] indeno[1,2-d][1,3] dioxol-4(2H)-ona (600 mg, 1,053 mmol) en DCM (6 ml) y DMF (12 mL). Después de 30 min, la mezcla se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. Se añadió dietilamina (2,18 mL, 21,06 mmol) a la mezcla de reacción y se continuó la agitación a temperatura ambiente durante 3 h, después de lo cual se eliminaron los disolventes volátiles a presión reducida. El residuo se disolvió en DMSO:MeOH 1:1 (12 mL) y se purificó por HPLC de fase inversa en una columna Phenomenex C18 (2) de 10 micrómetros (columna de 250 x 50 mm). Se usó un gradiente de MeCN (A) y TFA al 0,1 % en agua (B), a una velocidad de flujo de 90 mL/min (0-5,0 min 15 % de A, 5,0-20 min gradiente lineal 15-85 % de A, mantener 5 minutos). Las fracciones de producto combinadas se liofilizaron para dar el compuesto del título como un sólido blanquecino (447 mg, 0,628 mmol, 60 % de rendimiento). CL-EM (Método r, Tabla 7) Rt = 0,78 min, m/z = 711,9 [M + H]. <sup>1</sup>H RMN (501 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10,03 (s, 1H), 8,63 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 8,07 (d, *J* = 5,4 Hz, 3H), 7,44 - 7,38 (m, 2H), 7,38 - 7,34 (m, 2H), 7,29 (d, *J* = 10,1 Hz, 1H), 7,23 - 7,16 (m, 3H), 6,90 (dt, *J* = 7,7, 1,3 Hz, 1H), 6,14 (dd, *J* = 10,1, 1,9 Hz, 1H), 5,90 (t, *J* = 1,6 Hz, 1H), 5,38 (s, 1H), 4,90 (d, *J* = 5,3 Hz, 1H), 4,52 - 4,37 (m, 2H), 4,27 (q, *J* = 3,3 Hz, 1H), 4,16 (d, *J* = 19,4 Hz, 1H), 3,87 (s, 2H), 2,58 - 2,49 (m, 1H), 2,28 (ddd, *J* = 13,4, 4,5, 2,1 Hz, 1H), 2,09 (dtd, *J* = 17,0, 10,6, 5,0 Hz, 1H), 2,00 (dd, *J* = 12,2, 5,7 Hz, 1H), 1,78 - 1,54 (m, 5H), 1,37 (s, 3H), 1,35 (s, 3H), 1,30 (d, *J* = 7,1 Hz, 3H), 1,01 (ddd, *J* = 22,1, 11,9, 4,2 Hz, 2H), 0,84 (s, 3H).

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



Se añadió *N,N*-diisopropiletilamina (0,33 mL, 1,875 mmol) a una solución a temperatura ambiente de *N*-succinimidil 3-maleimidopropionato (250 mg, 0,938 mmol) y (S)-2-amino-N - ((S)-1-((3-(4-((6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetyl)-6a, 8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a, 6b, 7,8,8a, 8b, 11a, 12,12a, 12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5] indeno[1,2-d][1,3] dioxol-10-il)bencil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il) propanamida (445 mg, 0,625 mmol) en DMF (12 mL). Después de 30 min a temperatura ambiente, los disolventes volátiles se eliminaron a presión reducida. El residuo se diluyó con DMSO:MeOH 1:1 (12 mL) y se purificó mediante HPLC de fase inversa en una columna Phenomenex C18 (2) de 10 micrómetros (columna de 250 x 50 mm). Se usó un gradiente de MeCN (A) y TFA al 0,1 % en agua (B), a una velocidad de flujo de 90 mL/min (0-5,0 min 25 % de A, 5,0-20 min gradiente lineal 25-90 % de A, mantener 5 minutos). Las fracciones de producto combinadas se liofilizaron para dar el compuesto del título como un sólido blanquecino (295,1 mg, 0,342 mmol, 55 % de rendimiento). CL-EM (Método r, Tabla 7) Rt = 0,85 min, m/z = 863,4 [M+H]. <sup>1</sup>H RMN (501 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9,71 (s, 1H), 8,17 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H), 8,03 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H), 7,43 (dd, *J* = 7,8, 1,1 Hz, 2H), 7,38 - 7,32 (m, 2H), 7,29 (d, *J* = 10,1 Hz, 1H), 7,22 - 7,15 (m, 3H), 6,96 (s, 2H), 6,88 (dt, *J* = 7,8, 1,3 Hz, 1H), 6,13 (dd, *J* = 10,1, 1,9 Hz, 1H), 5,90 (t, *J* = 1,6 Hz, 1H), 5,37 (s, 1H), 4,90 (d, *J* = 5,4 Hz, 1H), 4,48 (d, *J* = 19,4 Hz, 1H), 4,32 (p, *J* = 7,1 Hz, 1H), 4,27 (q, *J* = 3,3 Hz, 1H), 4,21 (p, *J* = 7,1 Hz, 1H), 4,16 (d, *J* = 19,4 Hz, 1H), 3,87 (s, 2H), 3,59 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H), 2,57 - 2,49 (m, 1H), 2,38 (dd, *J* = 8,0, 6,6 Hz, 2H), 2,32 - 2,24 (m, 1H), 2,15 - 2,04 (m, 1H), 2,04 - 1,95 (m, 1H), 1,80 - 1,54 (m, 5H), 1,37 (s, 3H), 1,26 (d, *J* = 7,1 Hz, 3H), 1,15 (d, *J* = 7,1 Hz, 3H), 1,02 (ddd, *J* = 21,2, 12,1, 4,2 Hz, 2H), 0,84 (s, 3H).

#### Ejemplo 35:

65

Los siguientes compuestos se prepararon mediante el uso de los métodos descritos anteriormente.

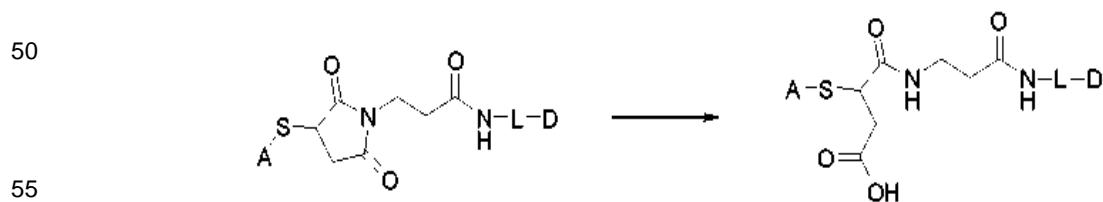
	Cpd. No.	Estructura						
5	71							
10	99							
15	88	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Cpd. No.</th> <th>Datos LC-MS</th> <th><sup>1</sup>H datos de RMN</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>88</td> <td>Método r, Tabla 7  R<sub>t</sub> = 0,87 min; m/z(s, 1H), 5,90 (t, J = 1,6 Hz, 1H), 6,13 (dd, J = 10,1, 1,8 Hz, 1H), 6,88 (dt, J = 7,9, 1,3 Hz, 1H), 6,96 (s, 2H), 7,14 - 7,22 (m, 3 H), 7,29 (d, J = 10,1 Hz, 1H), 7,33 - 7,38 (m, 2H), 7,43 (dd, J = 7,8, 1,1 Hz, 2H), 8,03 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 8,17 (d, J = 7,0 Hz, 1H), 9,71 (s, 1H)</td> <td><sup>1</sup>H RMN (<i>DMSO-d</i><sub>6</sub>) δ: 0,84 (s, 3H), 1,02 (ddd, <i>J</i> = 21,3, 12,1, 4,2 Hz, 2H), 1,15 (d, <i>J</i> = 7,1 Hz, 3H), 1,26 (d, <i>J</i> = 7,1 Hz, 3H), 1,37 (s, 3H), 1,53 - 1,81 (m, 4H), 2,00 (dd, <i>J</i> = 12,2, 5,5 Hz, 1H), 2,04 - 2,15 (m, 1H), 2,23 - 2,33 (m, 1H), 2,38 (dd, <i>J</i> = 8,0, 6,6 Hz, 2H), 2,51 (d, <i>J</i> = 18,2 Hz, 1H), 3,59 (t, <i>J</i> = 7,3 Hz, 2H), 3,87 (s, 2H), 4,16 (d, <i>J</i> = 19,4 Hz, 1H), 4,21 (p, <i>J</i> = 7,1 Hz, 1H), 4,27 (q, <i>J</i> = 3,3 Hz, 1H), 4,32 (p, <i>J</i> = 7,1 Hz, 1H), 4,48 (d, <i>J</i> = 19,4 Hz, 1H), 4,72 (s, 2 H), 4,90 (d, <i>J</i> = 5,4 Hz, 1H), 5,37 R<sub>t</sub> = 0,87 min; m/z(s, 1H), 5,90 (t, J = 1,6 Hz, 1H), 6,13 (dd, J = 10,1, 1,8 Hz, 1H), 6,88 (dt, J = 7,9, 1,3 Hz, 1H), 6,96 (s, 2H), 7,14 - 7,22 (m, 3 H), 7,29 (d, J = 10,1 Hz, 1H), 7,33 - 7,38 (m, 2H), 7,43 (dd, J = 7,8, 1,1 Hz, 2H), 8,03 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 8,17 (d, J = 7,0 Hz, 1H), 9,71 (s, 1H)</td> </tr> </tbody> </table>	Cpd. No.	Datos LC-MS	<sup>1</sup> H datos de RMN	88	Método r, Tabla 7  R <sub>t</sub> = 0,87 min; m/z(s, 1H), 5,90 (t, J = 1,6 Hz, 1H), 6,13 (dd, J = 10,1, 1,8 Hz, 1H), 6,88 (dt, J = 7,9, 1,3 Hz, 1H), 6,96 (s, 2H), 7,14 - 7,22 (m, 3 H), 7,29 (d, J = 10,1 Hz, 1H), 7,33 - 7,38 (m, 2H), 7,43 (dd, J = 7,8, 1,1 Hz, 2H), 8,03 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 8,17 (d, J = 7,0 Hz, 1H), 9,71 (s, 1H)	<sup>1</sup> H RMN ( <i>DMSO-d</i> <sub>6</sub> ) δ: 0,84 (s, 3H), 1,02 (ddd, <i>J</i> = 21,3, 12,1, 4,2 Hz, 2H), 1,15 (d, <i>J</i> = 7,1 Hz, 3H), 1,26 (d, <i>J</i> = 7,1 Hz, 3H), 1,37 (s, 3H), 1,53 - 1,81 (m, 4H), 2,00 (dd, <i>J</i> = 12,2, 5,5 Hz, 1H), 2,04 - 2,15 (m, 1H), 2,23 - 2,33 (m, 1H), 2,38 (dd, <i>J</i> = 8,0, 6,6 Hz, 2H), 2,51 (d, <i>J</i> = 18,2 Hz, 1H), 3,59 (t, <i>J</i> = 7,3 Hz, 2H), 3,87 (s, 2H), 4,16 (d, <i>J</i> = 19,4 Hz, 1H), 4,21 (p, <i>J</i> = 7,1 Hz, 1H), 4,27 (q, <i>J</i> = 3,3 Hz, 1H), 4,32 (p, <i>J</i> = 7,1 Hz, 1H), 4,48 (d, <i>J</i> = 19,4 Hz, 1H), 4,72 (s, 2 H), 4,90 (d, <i>J</i> = 5,4 Hz, 1H), 5,37 R <sub>t</sub> = 0,87 min; m/z(s, 1H), 5,90 (t, J = 1,6 Hz, 1H), 6,13 (dd, J = 10,1, 1,8 Hz, 1H), 6,88 (dt, J = 7,9, 1,3 Hz, 1H), 6,96 (s, 2H), 7,14 - 7,22 (m, 3 H), 7,29 (d, J = 10,1 Hz, 1H), 7,33 - 7,38 (m, 2H), 7,43 (dd, J = 7,8, 1,1 Hz, 2H), 8,03 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 8,17 (d, J = 7,0 Hz, 1H), 9,71 (s, 1H)
Cpd. No.	Datos LC-MS	<sup>1</sup> H datos de RMN						
88	Método r, Tabla 7  R <sub>t</sub> = 0,87 min; m/z(s, 1H), 5,90 (t, J = 1,6 Hz, 1H), 6,13 (dd, J = 10,1, 1,8 Hz, 1H), 6,88 (dt, J = 7,9, 1,3 Hz, 1H), 6,96 (s, 2H), 7,14 - 7,22 (m, 3 H), 7,29 (d, J = 10,1 Hz, 1H), 7,33 - 7,38 (m, 2H), 7,43 (dd, J = 7,8, 1,1 Hz, 2H), 8,03 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 8,17 (d, J = 7,0 Hz, 1H), 9,71 (s, 1H)	<sup>1</sup> H RMN ( <i>DMSO-d</i> <sub>6</sub> ) δ: 0,84 (s, 3H), 1,02 (ddd, <i>J</i> = 21,3, 12,1, 4,2 Hz, 2H), 1,15 (d, <i>J</i> = 7,1 Hz, 3H), 1,26 (d, <i>J</i> = 7,1 Hz, 3H), 1,37 (s, 3H), 1,53 - 1,81 (m, 4H), 2,00 (dd, <i>J</i> = 12,2, 5,5 Hz, 1H), 2,04 - 2,15 (m, 1H), 2,23 - 2,33 (m, 1H), 2,38 (dd, <i>J</i> = 8,0, 6,6 Hz, 2H), 2,51 (d, <i>J</i> = 18,2 Hz, 1H), 3,59 (t, <i>J</i> = 7,3 Hz, 2H), 3,87 (s, 2H), 4,16 (d, <i>J</i> = 19,4 Hz, 1H), 4,21 (p, <i>J</i> = 7,1 Hz, 1H), 4,27 (q, <i>J</i> = 3,3 Hz, 1H), 4,32 (p, <i>J</i> = 7,1 Hz, 1H), 4,48 (d, <i>J</i> = 19,4 Hz, 1H), 4,72 (s, 2 H), 4,90 (d, <i>J</i> = 5,4 Hz, 1H), 5,37 R <sub>t</sub> = 0,87 min; m/z(s, 1H), 5,90 (t, J = 1,6 Hz, 1H), 6,13 (dd, J = 10,1, 1,8 Hz, 1H), 6,88 (dt, J = 7,9, 1,3 Hz, 1H), 6,96 (s, 2H), 7,14 - 7,22 (m, 3 H), 7,29 (d, J = 10,1 Hz, 1H), 7,33 - 7,38 (m, 2H), 7,43 (dd, J = 7,8, 1,1 Hz, 2H), 8,03 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 8,17 (d, J = 7,0 Hz, 1H), 9,71 (s, 1H)						

## Ejemplo 73: Protocolos de conjugación

## Protocolo general de conjugación de cisteína

35 Se preparó una solución de aproximadamente 10 mg/mL del anticuerpo deseado en tampón PBS, pH 7,4, así como una solución de TCEP 10 mM en PBS (Pierce Bond-Breaker, cat. 77720). Los anticuerpos (anti-hTNF hIgG1 (D2E7) o anti-mTNF mIgG2a (8C11; McRae BL y otros J Crohns Colitis 10 (1): 69-76 (2016)) luego se redujeron parcialmente al añadir aproximadamente dos eq molares de TCEP 10 mM, al mezclar brevemente e incubar durante 60 min a 37 °C. A continuación, se añadió DMSO a los anticuerpos parcialmente reducidos en cantidad suficiente hasta un 15 % de DMSO total. Para las conjugaciones, se añadieron luego 8 eq molares de una solución de DL-maleimida 10 mM (en la que SM es un radical de un glucocorticosteroide y L es un enlazador) y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, se eliminó el exceso de combo y DMSO mediante el uso de columnas de desalación NAP-5 (GE Healthcare, cat. 17-0853-02) previamente equilibrado con tampón PBS, pH 7,4. A continuación, las muestras desaladas se analizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) y espectrometría de masas reducida.

## Hidrólisis de tiosuccinimida



60 La hidrólisis del anillo de tiosuccinimida de los ADC de la descripción se logró al incubar los ADC a un pH elevado. Brevemente, se preparó una solución de arginina 0,7 M, pH 9,0 y se añadió a cada ADC en tampón PBS para llevar la concentración total de arginina a 50 mM (pH ~ 8,9). A continuación, el material se incubó a 25 °C durante 72 horas. A continuación, se confirmó la hidrólisis del anillo de succinimida mediante espectrometría de masas reducida, después de lo cual, se interrumpió la hidrólisis con la adición de una solución de ácido acético 0,1 M a ácido acético total 12,5 mM (pH ~ 7,1).

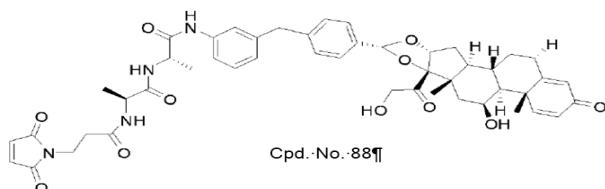
## Procedimientos analíticos de ADC

Cromatografía de interacción hidrofóbica. Los ADC se perfilaron mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) para determinar el grado de conjugación y calcular las proporciones aproximadas de fármaco a fármaco de anticuerpo (DAR). En resumen, se cargaron 100 mg de los ADC en un sistema Ultimate 3000 Dual LC (Thermo Scientific) equipado con una columna butil-NPR de 4,6 x 35 mm (Tosoh Bioscience, cat. 14947). Los ADC se cargaron en la columna equilibrada en tampón A al 100 % y se eluyeron mediante el uso de un gradiente lineal desde tampón A al 100 % hasta tampón B al 100 % durante 12 min a 0,8 mL/min, donde el tampón A es fosfato de sodio 25 mM, sulfato de amonio 1,5 M, pH 7,25 y el tampón B es fosfato de sodio 25 mM, isopropanol al 20 %, pH 7,25. El DAR se determinó al tomar la suma de cada área porcentual máxima multiplicada por su correspondiente carga de fármaco y al dividir la suma ponderada por 100.

Cromatografía de exclusión por tamaño. Las distribuciones de tamaño de los ADC se perfilaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) mediante el uso de un sistema Ultimate 3000 Dual LC (Thermo Scientific) equipado con una columna TSK-gel 3000SW<sub>XL</sub> de 7,8 x 300 mm (Tosoh Bioscience, cat. 08541). Se cargaron 20 ug de cada uno de los ADC en la columna y se eluyeron durante 17 min mediante el uso de un gradiente isocrático a 1 mL/min de sulfato de sodio 100 mM, fosfato de sodio 100 mM, pH 6,8 a 0,8 mL/min.

## Ejemplo 74: Preparación de adalimumab conjugado con un glucocorticosteroide para dar un ADC

20



25 El ADC esteroidal de adalimumab MP-ala-ala con un DAR promedio de 3,5 se preparó mediante un proceso químico de dos etapas: reducción con disulfuro de adalimumab seguida de alquilación (conjugación) con Cpd esteroidal maleimidopropil alanina-alanina. No. 88.

30 En la primera etapa, se reduce un número limitado de enlaces disulfuro intercatenarios de adalimumab con tris (2-carboxietil) fosfina ("TCEP") ( $\geq$  1,8 equiv.). A continuación, el adalimumab parcialmente reducido se conjuga con Cpd. No. 88 ( $\geq$  5 equiv.) en DMSO.

35 Con referencia a la Figura 5, que muestra una resolución cromatográfica de la preparación de ADC resultante, el ADC es una mezcla heterogénea que contiene anticuerpos sin moléculas enlazadoras de fármacos unidas (pico "E0"), dos moléculas enlazadoras de fármacos unidas (pico "E2"), cuatro moléculas enlazadoras unidas (pico "E4"), 40 seis moléculas enlazadoras de fármacos unidas (pico "E6") y ocho moléculas enlazadoras de fármacos unidas (pico "E8"), en dependencia del número de enlaces disulfuro intercatenarios reducidos. Hamblett y otros, Clin Cancer Res 2004; 10:7063-7070 describen métodos para separar y aislar cromatográficamente los picos homogéneos de E2 y E4. Las condiciones de HIC usadas en la Figura 5 fueron las siguientes:

45 La columna era TOSOH Tskgel Butyl-NPR, 4,6 mm x 3,5 cm, 2,5  $\mu$  y la temperatura de la columna era 30 °C. La longitud de onda fue de 280 nm, el tiempo de ejecución fue de 22 minutos, la inyección, el volumen fue de 40  $\mu$ L, la velocidad de flujo fue de 0,5 mL/minuto. Fase móvil A: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 25 mM, pH 7,0 y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,5 M, Fase móvil B: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 25 mM, pH 7,0/IPA = 75/25. Perfil de gradiente:

	Tiempo (minutos)	Fase móvil A	Fase móvil B
0	90	10	
2	85	15	
18	5	95	
18,1	90	10	
22	90	10	

50 Hamblett y otros, Clin Cancer Res 2004;10:7063-7070 describen métodos para separar y aislar cromatográficamente los picos homogéneos de E2 y E4. Brevemente, después de la hidrólisis y el ajuste a pH <7,4, la mezcla de distribución amplia se trató con tampón de sulfato de amonio 3 M/fosfato 50 mM para llevar la concentración general de la solución de sulfato de amonio a aproximadamente 0,8 M. Una columna de cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) pre-empacada (resina butil sefarosa HP) se preparó mediante desinfección con solución de NaOH 0,5 N (4 CV), enjuague con agua para inyección (WFI, 0,5 CV) y equilibrio con tampón sulfato amónico 0,8 M/fosfato 25 mM (4 CV). La solución tampón de sulfato de amonio/de distribución amplia se cargó en la columna HIC (carga aproximada, 30 mg de proteína por mL de resina) seguido de un lavado con tampón sulfato de amonio 0,8 M/fosfato

25 mM (2,5 CV). La elución del producto fue como sigue: tampón sulfato de amonio 0,72 M/fosfato 25 mM (3 CV), mAb no conjugado; tampón sulfato de amonio 0,56 M/fosfato 25 mM (4,5 CV), DAR2 ADC; Tampón sulfato de amonio 0,32 M/fosfato 25 mM (6,5 CV), DAR4 ADC. A continuación, las fracciones de producto DAR 2 y DAR4 se concentraron por separado hasta aproximadamente 30 mg/mL mediante ultrafiltración (Millipore Ultracel, corte de 30 kD) seguido de diafiltración en WFI (8 CV).

5 La succinimida del conjugado de E4 purificado se hidrolizó para proporcionar la unión estabilizada mediante el ajuste del pH de la solución de producto a  $\geq 9$  mediante el uso de un tampón de arginina. La solución se mantuvo a temperatura ambiente durante  $\geq 2$  días, momento en el que el análisis de LC-MS determinó que la hidrólisis era  $> 90$  % completa. Vea la Figura 6 para una parte del cromatograma LC-MS. Las condiciones SEC utilizadas en la Figura 6 fueron las siguientes:

10 La columna era TOSOH TSK-gel G3000SW<sub>XL</sub>, 5 $\mu$ , 250 $\text{\AA}$ , 7,8 x 300 mm, la columna estaba a temperatura ambiente, la longitud de onda era de 214 nm, el tiempo de ejecución era de 55 minutos, el volumen de inyección era de 10  $\mu\text{L}$ , la velocidad de flujo era de 0,25 mL/minuto, la temperatura del muestreador automático fue 4 °C. Fase móvil: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 mM, pH 6,8 / IPA = 90/10.

15 Datos de MS brutos (Figura 7) y deconvolucionados (Figura 8) de adalimumab conjugado con MP-ala-ala esteroide Cpd. No. 88. El cuadrado negro y el círculo representan el ADC con succinimida hidrolizada y no hidrolizada, respectivamente. La abundancia relativa de ADC hidrolizado y no hidrolizado se usa para determinar la conversión de hidrólisis.

#### Ejemplo 75: Actividad *in vitro* de esteroides de molécula pequeña

##### Ensayo de unión al receptor de glucocorticoides

20 Se ensayaron moléculas pequeñas para la unión del receptor de glucocorticoides (GR) mediante el uso del kit de ensayo de receptor de glucocorticoides Polarscreen™, Rojo (ThermoFisher A 15898) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, los compuestos se diluyeron en serie en DMSO y luego se transfirieron al tampón del kit de ensayo a una dilución 1:10. Los compuestos se diluyeron adicionalmente 1:5 en tampón del kit de ensayo y se transfirieron 10  $\mu\text{L}$  a una placa de paredes negras de volumen bajo de 384 pocillos (Corning 4514). Se añadieron 5  $\mu\text{L}$  de solución madre 4X Fluormone GS Rojo y 5  $\mu\text{l}$  de solución madre 4x GR de longitud completa a cada pocillo que contenía el compuesto de prueba, y las placas se incubaron protegidas de la luz a temperatura ambiente durante 4 horas. La polarización de fluorescencia (mP) se midió para cada placa mediante el uso de un lector de placas de etiquetas múltiples EnVision (PerkinElmer # 2104-0010), y los datos se analizaron mediante el uso de un ajuste de curva de cuatro parámetros para generar valores de EC50. Los resultados se muestran en la Tabla 10 a continuación.

##### Ensayo de células receptoras de mineralocorticoides

40 Se ensayaron moléculas pequeñas para determinar la actividad agonista del receptor de mineralocorticoides (MR) mediante el uso de la línea celular PathHunter® NHRPRO CHO-K1 MR (DiscoveRx cat# 93-0451C2) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, se sembraron 20 000 células/pocillo en medio de cultivo en una media placa de pocillo de 96 (Costar cat# 3885) durante la noche a 37 °C. El medio se retiró y se reemplazó con moléculas pequeñas diluidas en serie en medio del ensayo (30  $\mu\text{L}$ ; DMSO final al 0,3 %). Las placas se incubaron durante la noche a 37 °C. Se retiró el medio, se reemplazó con reactivo de detección (DiscoveRx cat# 93-0001; 12  $\mu\text{L}/\text{pocillo}$ ) y se incubó a temperatura ambiente (RT) durante 60 minutos. Se midió la luminiscencia para cada placa mediante el uso de un lector de placas de etiquetas múltiples EnVision (PerkinElmer # 2104-0010), y los datos se analizaron mediante el uso de un ajuste de curva de cuatro parámetros para generar valores de EC50. Los resultados se muestran en la Tabla 10 a continuación.

##### 50 Ensayo de unión al receptor de progesterona

55 Se analizaron moléculas pequeñas para la unión al receptor de progesterona (PR) mediante el uso de una modificación del ensayo del coactivador del receptor de progesterona LanthaScreen® TR-FRET (Thermofisher cat # A15903) donde el péptido coactivador marcado con fluoresceína se reemplazó con Fluormone AL-Red (Thermofisher cat # PV4294) para mejorar la señal del ensayo. Brevemente, los compuestos se diluyeron en serie en DMSO, luego se transfirieron a tampón de ensayo (Thermofisher cat # PV4301 + DTT 5 mM) a una dilución 1:10. Se transfirieron 10  $\mu\text{l}$  del compuesto a una placa de 96 pocillos negros de media área (Corning cat# 3694) por duplicado. Se añadieron a cada pocillo 5  $\mu\text{L}$  de proteína PR-LBD (stock 4 nM en tampón de ensayo; Thermofisher cat# P2899). Además, se añadieron a cada pocillo 5  $\mu\text{L}$  de una mezcla preparada de Fluormone AL-Red (12 nM) y anticuerpo monoclonal anti-GST (mAb) marcado con terbio (20 nM; Thermofisher cat # PV3550) en tampón de ensayo. Las placas se incubaron a temperatura ambiente (RT) durante 2 horas, y luego se midió la relación de emisión TR-FRET mediante el uso de un lector de placas de múltiples etiquetas EnVision (PerkinElmer # 2104-0010). Los datos se analizaron mediante el uso de un ajuste de curva de cuatro parámetros para generar valores de EC50. Los resultados se muestran en la Tabla 10 a continuación.

### Ensayo de unión al receptor de andrógenos

Se probaron moléculas pequeñas para la unión al receptor de andrógenos (AR) mediante el uso de una modificación del ensayo de coactivador de receptor de andrógenos LanthaScreen® TR-FRET (Thermofisher cat # A15878) donde el péptido coactivador marcado con fluoresceína se reemplazó con Fluormone AL-Red (Thermofisher cat # PV4294) para mejorar la señal del ensayo. Brevemente, los compuestos se diluyeron en serie en DMSO y luego se transfirieron al tampón de ensayo (Thermofisher cat# PV4295 + DTT 5 mM) a una dilución 1:10. Se transfirieron 10 µl del compuesto a una placa de 96 pocillos negros de media área (Corning cat#3694) por duplicado. Se añadieron a cada pocillo 5 µL de proteína AR-LBD (stock 5 nM en tampón de ensayo; Thermofisher cat#3009). Además, se añadieron a cada pocillo 5 µL de una solución madre preparada de Fluormone AL-Red (20 nM) y anticuerpo monoclonal anti-GST (mAb) marcado con terbio (30 nM; Thermofisher cat# PV3550) en tampón de ensayo. Las placas se incubaron a temperatura ambiente (TA) durante 6 horas y luego se midió la relación de emisión TR-FRET mediante el uso de un lector de placas de múltiples etiquetas EnVision (PerkinElmer # 2104-0010). Los datos se analizaron mediante el uso de un ajuste de curva de cuatro parámetros para generar valores de EC50. Los resultados se muestran en la Tabla 10 a continuación.

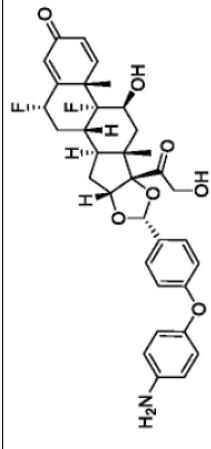
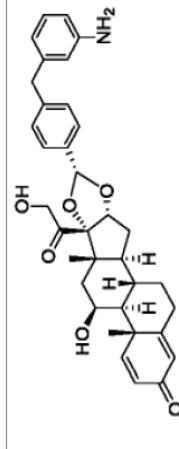
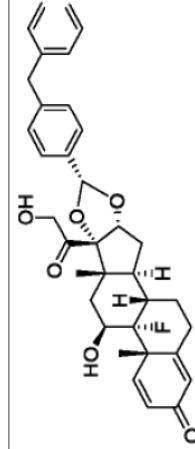
### Ensayo del Reportero GRE

Las células GRE parentales K562 (pGL4.36 [luc2P/MMTV/Hygro]) descritas en el Ejemplo 78 se sembraron en placas de 96 pocillos blancas de cultivo de tejidos tratadas (Costar: 3917) a 50 000 células por pocillo en 50 µL de medio de ensayo (RPMI, 1 % CSFBS, 1% de L-glutamina, 1% de piruvato de sodio y 1% de MEAA). Los compuestos agonistas de GR de molécula pequeña se diluyeron en serie a una concentración inicial de 100 µM y se diluyeron en serie 4 veces en DMSO al 100 %. Los compuestos de molécula pequeña se diluyeron más en medio de ensayo mediante la transferencia de 2 µl de compuestos diluidos en serie a 248 mL de medio de ensayo en una placa de dilución secundaria (dilución 1:125). Las células se trataron entonces con 25 µL del compuesto agonista GR diluido 1:125 para una concentración final de partida de 266,7 nM (1:3) o medio solo y se incubaron durante 24 horas a 37°, 5 % de CO<sub>2</sub>. Después de 24 horas de incubación, las células se trataron con 75 µL del Sistema de Ensayo de Luciferasa Dual-Glo (Promega-E2920) durante 10 minutos y se analizaron para determinar la luminiscencia mediante el uso de TopCount o MicroBeta2 (PerkinElmer).

### Ensayo de unión al receptor de estrógeno

Se analizaron moléculas pequeñas para la unión al receptor de estrógeno (ER) alfa mediante el uso de una modificación del ensayo de coactivador alfa del receptor de estrógeno LanthaScreen® TR-FRET (Thermofisher cat# A15885) donde el péptido coactivador marcado con fluoresceína se reemplazó con Fluormone ES2 Green (Thermofisher cat# PV6045) para mejorar la señal del ensayo. Brevemente, los compuestos se diluyeron en serie en DMSO y luego se transfirieron a tampón de ensayo (Thermofisher cat# PV4295 + DTT 5 mM) a una dilución 1:10. Se transfirieron 10 µl del compuesto a una placa de 96 pocillos negra de media área (Corning cat# 3694) por duplicado. Se añadieron a cada pocillo 5 µL de proteína ER-LBD (stock 5 nM en tampón de ensayo; Thermofisher cat # 4542). Además, se añadieron a cada pocillo 5 µL de una solución madre preparada de Fluormone ES2 Green (12 nM) y anticuerpo monoclonal anti-GST marcado con terbio (mAb) (8 nM; Thermofisher cat# PV3550) en tampón de ensayo. Las placas se incubaron a temperatura ambiente (TA) durante 4 horas, y luego se midió la relación de emisión TR-FRET mediante el uso de un lector de placas de múltiples etiquetas EnVision (PerkinElmer # 2104-0010). Los datos se analizaron mediante el uso de un ajuste de curva de cuatro parámetros para generar valores de EC50. Los resultados se muestran en la Tabla 10 a continuación.

Tabla 10: actividad *in vitro*

Cpd. No.	Estructura química	IC <sub>50</sub> de unión a GR (μM)	EC <sub>50</sub> del Reportero GRE ( μ M)	EC <sub>50</sub> de MR (agonista) (μM)	IC <sub>50</sub> de unión a PRB (μM)	EC <sub>50</sub> de unión a ER (μM)	EC <sub>50</sub> de unión a AR (μM)
3		0,0036	0,0002	0,0846	0,0026	30++	> 30
41		0,0028	0,0014	30++	0,076	30++	> 30
42		0,0124	0,0004	10,1	0,0873	9,75	> 30

++ indica que los datos reportados son un promedio de múltiples puntos de datos y los datos reportados pueden leerse como "mayores que" los datos reportados

NT indica no probado

## Ejemplo 76: Estabilidad de inmunoconjungados anti-TNF-alfa

*Estabilidad de la matriz*

- 5 Se probaron los ADC esteroidales anti-TNF $\alpha$  para determinar su susceptibilidad a liberar prematuramente una carga útil de moléculas pequeñas en condiciones fisiológicas. En estos experimentos, los ADC se diluyeron en el plasma (humano, mono, ratón o rata) o tampón por duplicado y se incubaron durante 6 días a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>. Cada muestra se inactivó en el tiempo 0 minutos y en varios puntos de tiempo durante el período de 6 días. A continuación, las muestras se analizaron mediante el uso de LC/MS/MS y se compararon con las curvas estándar para la molécula pequeña correspondiente. Se calculó el % de liberación máxima de carga útil de moléculas pequeñas a lo largo del tiempo. Los resultados se resumen en la Tabla 11 a continuación.
- 10

Tabla 11: Estabilidad de los ADC esteroides anti-TNF $\alpha$ 

		Estabilidad de la matriz (% máximo de liberación de SM)			
Cpd. No.	Tampón PBS	Plasma humano	Plasma de mono cynomolgous	Plasma de ratón	
145	0,00451	0	0	0	

15 Estos resultados demuestran que los ADC esteroidales anti-TNF $\alpha$  son estables en tampón y plasma de múltiples especies y que se observa una liberación mínima de moléculas pequeñas.

*Estabilidad proteolítica*

- 20 La susceptibilidad de los ADC esteroidales para liberar su carga útil a través del tratamiento con proteasa se comparó con un ADC generado mediante el uso del enlazador de fármacos vcmcMMAE conjugado con un anticuerpo CD-19 murino. Los ADC (DAR promedio de 4) se incubaron con catepsina B o proteinasa K, y la liberación de carga útil se analizó mediante LC-MS en varios puntos de tiempo (0, 1, 4, 7 y 24 horas).
- 25
- 30 Los resultados se muestran en la Figura 1 y demuestran que los ADC esteroidales son resistentes a la liberación de carga útil mediada por catepsina exógena desde el ADC. Esto contrasta con un ADC de enlazador de carga útil conocido (mcvcMMAE), donde MMAE se libera en cantidades significativas tras el tratamiento con catepsina. Estos datos indican que los ADC esteroidales son mucho menos susceptibles a la liberación prematura de carga útil que resulta de la actividad de la catepsina en circulación que los ADC conocidos. De hecho, la liberación de esteroides solo se observa con proteinasa K, una serina proteasa que muestra una amplia especificidad de escisión. Esto indica que la porción de anticuerpo del ADC esteroideal debe catabolizarse significativamente antes de la escisión del enlazador de esteroides y que la liberación de la carga útil puede restringirse a un entorno donde puede producirse la digestión del andamio del anticuerpo del ADC, como el lisosoma.
- 35

*Digestión con catepsina B*

- 40 Se preparó una solución madre de 0,2 mg/mL de catepsina B (Sigma) en tampón (Tris 25 mM, NaCl 50 mM y glicerol al 5 %). Para generar una solución de trabajo de 10  $\mu$ g/mL de catepsina B, se mezclaron 5  $\mu$ L de 0,2 mg/mL de stock de catepsina B con 95 ml de tampón de activación (acetato de sodio 50 mM pH 5, EDTA 1 mM y DTT 5 mM) y se incubaron a 37 °C durante 15 minutos. Para la digestión con ADC, se mezclaron 20  $\mu$ L de 100  $\mu$ g/mL de ADC y 20  $\mu$ L de solución de trabajo de catepsina B con 160  $\mu$ L de tampón de dilución (acetato de sodio 50 mM, EDTA 1 mM). La muestra se incubó a 37 °C con agitación y se retiraron alícuotas de 40  $\mu$ L después de 0, 1, 4, 7 y 24 horas. A cada alícuota se le añadieron 160  $\mu$ L de solución de inactivación (ácido fórmico al 0,1 %; MeOH: MeCN 1:1; carbutamida 100 nM) y se detectó la molécula pequeña liberada por LC-MS/MS como se describió anteriormente.
- 45

*Digestión con proteinasa K*

- 50 Se preparó una solución madre de 5 mg/mL de proteinasa K (Sigma) en agua desionizada (DI). Se preparó una solución de trabajo de 0,25 mg/mL de proteinasa K al mezclar 50 ml de proteinasa K de 5 mg/mL con 950  $\mu$ L de tampón de dilución (1x HBSS y EDTA 1 mM). Para la digestión de ADC, se mezclaron 20  $\mu$ L de 100  $\mu$ g/mL de ADC y 40  $\mu$ L de solución de trabajo de proteinasa K con 140  $\mu$ L de tampón de dilución. La muestra se incubó a 37 °C con agitación y se retiraron alícuotas de 40  $\mu$ L después de 0, 1, 4, 7 y 24 horas. A cada alícuota se le añadieron 160  $\mu$ L de solución de inactivación (ácido fórmico al 0,1 %; MeOH: MeCN 1:1; carbutamida 100 nM) y se detectó la molécula pequeña liberada por LC-MS/MS como se describió anteriormente.
- 55

60 Ejemplo 77: *Estabilidad in vivo* de inmunoconjungados anti-TNF-alfa

- 65 Se evaluó en ratones la susceptibilidad del ADC esteroideal a sufrir una pérdida de enlazador del fármaco. El esteroide MP-Ala-Ala se conjugó con mAb IgG1 humano (promedio DAR 4) y se incubó a pH 9 para catalizar la hidrólisis de la apertura del anillo de tiosuccinimida. Después de la neutralización, se injectó el esteroide ADC en ratones y se controló la cinética de la pérdida del enlazador del fármaco durante 7 días mediante LC-MS.

En estos experimentos, el ADC formulado en solución salina tampón fosfato se dosificó por vía intravenosa a 15 ratones macho DBA/1 a 5 mg /kg. Se sacrificaron tres ratones a 1 hora, 24 horas, 72 horas, 168 horas y 240 horas después de la dosis. Se recogió sangre entera con EDTA y se preparó suero para análisis DAR *in vivo* mediante espectrometría de masas.

- 5                   *Predilución de la muestra de suero*
- Las muestras de suero se diluyeron en suero de caballo (Life Technologies, 16050-122) en base a las concentraciones de anticuerpos totales de ADC medidas mediante el ensayo de unión de ligando de anticuerpo total.
- 10                  Las diluciones se basaron en estimaciones de la concentración final en un intervalo de 10-30 µg/mL, que es adecuado para el límite superior de capacidad de unión de las perlas magnéticas.

*Purificación por afinidad por inmunoafinidad*

- 15                  En un tubo de proteína LoBind (Eppendorf North America), se agregaron 350 µL de suero de caballo a 100 µL de cada muestra de suero ADC prediluido hasta un volumen total de 450 µL, seguido de la adición de 4 µg de biotina-anticuerpo Fc antihumano (2 µL de biotina-antihumano a 2 mg/mL de solución). Las muestras se incubaron durante 2 horas (h) a temperatura ambiente mediante agitación a 900 rpm en un agitador orbital. Para cada muestra de suero, se equilibraron 50 µL de suspensión de perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina (Pierce, Cat# 88817) con Tween al 0,1 % en tampón PBS (PBST) en un tubo LoBind. La solución salina tamponada con fosfato con tampón Tween 20 (PBST) se eliminó con una pipeta después de tirar de las perlas magnéticas hacia el lado del tubo LoBind colocando el tubo LoBind en una rejilla magnética. Las muestras de suero después de 2 horas de incubación con el reactivo de captura antihumano se transfirieron a los tubos LoBind que contenían perlas magnéticas equilibradas y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora a 900 rpm en un agitador orbital. El suero se eliminó después de la incubación de la perla magnética y la perla magnética se lavó minuciosamente con 500 µL de PBST (3 veces) seguido de 500 µL de MeOH al 5 % en agua MilliQ (3 veces). El ADC unido a perlas magnéticas se liberó mediante la incubación de las perlas magnéticas con 100 µL de ácido fórmico al 0,5 % en MeOH al 50 %/agua MilliQ durante 15 minutos.

30                  *Reducción de ADC purificado*

El ADC liberado se redujo mediante la adición de 10 µL del reactivo reductor (TCEP 10 mM recién preparado a partir de polvo comprado en Thermo Scientific, con EDTA 10 mM en tampón Tris 2 M pH 7,5) a 100 µL de muestra y se incubó a 37 °C durante 30 minutos.

35                  *Análisis LC/MS*

Se inyectaron muestras reducidas (10 µL) en un sistema LC/MS Agilent 6550 QToF a través de un muestreador automático CTC con temperatura controlada (5 °C). La elución de la muestra se logró en un Waters C-4, 3,5 µm, 300 Å, 2,1 x 50 mm i.d. Columna de HPLC. Las fases móviles fueron: A: ácido fórmico al 0,1 % en agua y B: ácido fórmico al 0,1 % en MeCN; la velocidad de flujo fue de 0,45 mL/min; y el compartimento de la columna se mantuvo a 40 °C.

45                  El gradiente de HPLC fue el siguiente:

	Tiempo (min)	% A	% B
40	0	95	5
	0,6	95	5
	1,1	10	90
50	2,2	10	90
	2,4	95	5
	3,5	95	5

- 55                  El análisis de MS de alta resolución del ADC reducido se realizó en un tiempo de vuelo cuádruple Agilent 6550 (Agilent Technology, San Clara, CA) equipado con una fuente de ionización por electropulverización (ESI) Dual Agilent Jet Stream operada en modo de iones positivos. El espectrómetro de masas se hizo funcionar en el modo de intervalo dinámico extendido (2G Hz) con un intervalo de MS de hasta 3200 m/z. La fuente de ESI primaria se usó para el análisis de LC/MS, y la sonda de ESI secundaria se usó para infundir la solución de calibración a 922 009 798 m/z para lograr la calibración de MS en tiempo real. El espectrómetro de masas se calibró diariamente. Los errores de masa típicos de los analitos en relación con las masas teóricas fueron menos de ± 5 partes por millón en operaciones diarias. Los datos de MS se procesaron mediante el uso de MassHunter Qual Browser Build 5.0.

65                  *Deconvolución del espectro de MS*

65                  Se usó el método de máxima entropía en el paquete de software MassHunter Bioconfirm para deconvolucionar los

espectros de masas de iones de carga múltiple para derivar espectros de peso molecular neutro. La intensidad del pico deconvolucionado se usó para calcular DAR.

*Cálculo del valor DAR a partir del espectro de MS deconvolucionado*

- 5 Los valores de DAR se calcularon mediante el uso de la intensidad máxima de MS deconvolucionado según las siguientes ecuaciones:
- 10 Valor DAR de la cadena ligera (LC): LC DAR =  $(2 \times \text{intensidad máxima de LC}^{\wedge}) / (\text{intensidad máxima de LC} + \text{intensidad máxima de LC}^{\wedge})$

15 LC y LC<sup>w</sup> son cadenas ligeras con cero y un enlazador de fármaco, respectivamente.

20 Valor DAR de la cadena pesada (HC):

- 25 HC DAR =  $2 \times (\text{intensidad máxima de HC}^{\wedge} + 2 \times \text{intensidad máxima de HC}^{\wedge\wedge} + 3 \times \text{intensidad máxima de HC}^{\wedge\wedge\wedge}) / (\text{intensidad máxima de HC} + \text{intensidad máxima de HC}^{\wedge} + \text{intensidad máxima de HC}^{\wedge\wedge} + \text{intensidad máxima de HC}^{\wedge\wedge\wedge})$
- 30 HC, HC<sup>w</sup>, HC<sup>\wedge</sup> y HC<sup>\wedge\wedge</sup> son cadenas pesadas con cero, uno, dos y tres enlazadores de fármacos, respectivamente.

$$\text{Total DAR} = \text{LC DAR} + \text{HC DAR}$$

25 *Resultados*

30 Los resultados se muestran en la Figura 2. Este ejemplo demuestra que se observa una pérdida mínima del enlazador de fármaco a partir de ADC esteroidales durante 7 días.

35 Ejemplo 78: Generación de líneas celulares del reportero GRE de TNF-alfa transmembrana humanas y de ratón

40 Para crear una línea celular parental, se sembraron células K562 en una placa de 6 pocillos (Costar: 3516) con 2 mL de medio de crecimiento completo (RPMI, 10 % FBS, 1 % L-glutamina, 1 % piruvato de sodio y 1% MEM NEAA) a 500 000 células por pocillo durante 24 horas a 37°, 5 % CO<sub>2</sub>. Al día siguiente, 1,5 µg de pGL4.36[Luc2P/MMTV/Hygro] (Promega: E316), 1,5 µg de pG14.75 [hRLuc/CMV] (Promega: E639A) y 3 µL de reactivo PLUS (Invitrogen: 10964-021) se diluyeron en 244 uL de Opti-MEM (Gibco: 31985-070) y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. El vector pGL4.36[Luc2P/MMTV/Hygro] contiene MMTV LTR (Repetición terminal larga del virus del tumor mamario murino) que dirige la transcripción del gen indicador de luciferasa *luc2P* en respuesta a la activación de varios receptores nucleares como el receptor de glucocorticoïdes y el receptor de andrógenos. El vector pGL4.75[hRLuc/CMV] codifica el gen indicador de luciferasa *hRLuc* (*Renilla reniformis*) y está diseñado para una alta expresión y una transcripción anómala reducida. Despues de la incubación, la solución de ADN diluida se preincubó con una solución de Lipofectamina LTX 1:1 (Invitrogen: 94756) (13,2 µL + 256,8 µL de Opti-MEM) y se incubó a temperatura ambiente durante 25 minutos para formar complejos de ADN-Lipofectamina LTX. Despues de la incubación, se añadieron directamente al pocillo que contenía las células 500 µL de complejos de ADN-lipofectamina. K562 células fueron transfecadas durante 24 horas a 37°, 5 % CO<sub>2</sub>. Despues de la incubación, las células se lavaron con 3 mL de PBS y se seleccionaron con medio de crecimiento completo que contenía 125 µg/mL de higromicina B (Invitrogen: 10687-010) durante dos semanas. Se produjeron células "K562 pGL4.36[Luc2P/MMTV/Hygro] \_pGL4.75 [hRLuc/CMV]".

- 50 Con el fin de crear una línea celular reportera de GRE de TNF-alfa transmembrana murina, las células parentales, K562 pGL4.36[Luc2P/MMTV/Hygro] \_pGL4.75 [hRLuc / CMV], se sembraron en una placa de 6 pocillos (Costar: 3516) con 2 mL de medio de crecimiento completo (RPMI, 10 % FBS, 1 % de L-glutamina, 1 % de piruvato de sodio y 1 % de MEM NEAA) a 500 000 células por pocillo durante 24 horas a 37°, 5 % CO<sub>2</sub>. Al día siguiente, se diluyeron 3 µg de ADN de mFL\_TNF<sub>a</sub> (Origene: MC208048), que codifica TNF de ratón no etiquetado, y 3 µL de reactivo PLUS (Invitrogen: 10964-021) en 244 uL de Opti-MEM (Gibco: 31985-070) e incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Despues de la incubación, la solución de ADN diluida se preincubó con una solución de Lipofectamina LTX 1:1 (Invitrogen: 94756) (13,2 uL + 256,8 uL de Opti-MEM) y se incubó a temperatura ambiente durante 25 minutos para formar complejos de ADN-Lipofectamina LTX. Despues de la incubación, se añadieron directamente al pocillo que contenía las células 500 µL de complejos de ADN-lipofectamina. Las células parentales K562 pGL4.36[Luc2P/MMTV/Hygro] \_pGL4.75 [hRLuc/CMV] se transfecaron durante 24 horas a 37 °, 5 % CO<sub>2</sub>. Despues de la incubación, las células se lavaron con 3 mL de PBS y se seleccionaron con medio de crecimiento completo que contenía 125 µg/mL de higromicina B (Invitrogen: 10687-010) y 250 µg/mL G418 (Gibco: 10131-027) durante dos semanas. Se produjeron células "K562 ratón FL-TNF<sub>a</sub> GRE (pGL4.36 [Luc2P/MMTV/Hygro])".
- 65 Para crear una línea celular reportera de GRE de TNF-alfa transmembrana humana, las células parentales, K562 pGL4.36[Luc2P/MMTV/Hygro] \_pGL4.75 [hRLuc/CMV], se transfecaron con la construcción del plásmido hTNF delta

1-12 C -Myc pcDNA3.1(-). Este plásmido es pcDNA 3.1 (Thermofisher cat# V79020) que codifica para TNF transmembrana resistente a tace (es decir, SEQ ID NO:1 que carece de los aminoácidos 77-88). (Vea Perez C y otros Cell 63 (2): 251-8 (1990) que discuten el TNF transmembrana resistente a tace). Estas líneas celulares se usaron luego en los ensayos reporteros de TNF-alfa descritos en los ejemplos siguientes.

- 5 Ejemplo 79: Actividad de inmunoconjungados anti-TNF-alfa en ensayos del reportero de GRE de TNF-alfa transmembrana
- 10 Se sembraron células GRE parentales K562 (pGL4.36[luc2P/MMTV/Hygro]) y células K562 mFL-TNF-a o hTNF delta 1-12 GRE (pGL4.36[luc2P/MMTV/Hygro]) en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos blancas tratadas (Costar: 3917) a 50 000 células por pocillo en 50 µL de medio de ensayo (RPMI, CSFBS al 1 %, L-glutamina al 1 %, piruvato de sodio al 1 % y MEAA al 1 %). Las células se trataron con 25 µL de 3x murino diluido en serie o-a anti-TNF de anticuerpos conjugados de fármacos humanos en medio de ensayo, compuesto esteroideal, o medio solo y se incubaron durante 48 horas a 37 °, 5 % de CO<sub>2</sub>. Después de 48 horas de incubación, las células se trataron con 75 µL de Sistema de Ensayo de Luciferasa Dual-Glo (Promega-E2920) durante 10 minutos y se analizaron para determinar la luminiscencia mediante el uso de TopCount (PerkinElmer). Los datos se analizaron mediante el uso de un ajuste de curva de cuatro parámetros para generar valores de EC50. El % de activación máxima se normalizó a dexametasona 100 nM, que se consideró activación máxima. Los resultados mediante el uso de la línea celular de TNF-alfa murino se muestran en la Tabla 12 a continuación, y los resultados mediante el uso de la línea celular de TNF-alfa humana se muestran en la Tabla 13 a continuación. En la Tabla 12 a continuación, A se refiere a 8C11. En la Tabla 13 a continuación, A se refiere a adalimumab (SEQ ID NO: 66 y 73). La SEC determinó el porcentaje (%) de monómero como se describió anteriormente (vea los procedimientos analíticos de ADC).

25

Tabla 12: Actividad *in vitro* de conjugados de fármaco de anticuerpo anti-TNF $\alpha$  murino en el ensayo indicador GRE de TNF $\alpha$  de transmembrana de ratón (A se refiere al anticuerpo anti-TNF $\alpha$  murino 8C11)

Cpd. No.	Estructura	n	% de monómero	mTNFa GRE (%)	EC <sub>50</sub> mTNFa GRE (ug/mL)	mTNFa GRE (%)	EC <sub>50</sub> K562 GRE (ug/mL)	K562 GRE (% máx)
137		4	99,9	0,0105	114	5,27		
139		4	96,6	0,0239	92	15,2		
143		2	97,7	0,0795	82	> 50		
145		4	98	0,0393	95	24,7		
								36

Tabla 13: Actividad *in vitro* de conjugados de fármaco de anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano en el ensayo reportero de GRE de TNF $\alpha$  transmembrana humana (A se refiere al anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano adalimumab (SEQ ID NO: 66 y 73)

Cpd. No.	Estructura	n	% de monómero	EC <sub>50</sub> hTNF $\alpha$ GRE (ug/mL)	hTNF $\alpha$ GRE (% máx)	EC <sub>50</sub> K562 GRE (ug/mL)	K562 GRE (% máx)
203		4	98,2	0,0482	118	> 50	35
204		2	99,4	0,0767	103	> 50	21

Ejemplo 81: Actividad de los ADC esteroidales alfa anti-hTNF en el ensayo de liberación de citocinas PBMC humanas estimuladas por lipopolisacáridos

Se adquirieron células mononucleares de sangre periférica humana primaria (PBMC) de Biological Specialty Corporation (# de cat. 214-00-10), se lavaron en 50 mL de PBS, se resuspendieron en FBS con DMSO al 5 %, se dividieron en alícuotas y se criopreservaron en nitrógeno líquido hasta su uso. Las PBMC se descongelaron, se resuspendieron en RPMI suplementado con FBS al 2 % y penicilina-estreptomicina al 1 %, y se colocaron en placas en una placa de ensayo celular (Costar # 3799). Las células se incubaron con concentraciones variables de ADC esteroide anti-hTNF alfa a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> durante 4 horas. A continuación, las células se estimularon con 100 ng/mL de LPS durante la noche. Al día siguiente, la placa se centrifugó durante cinco minutos a 1000 rpm, y 100 mL de medio sobrenadante se transfirieron directamente a una placa adicional de 96 pocillos y se analizaron para concentraciones de IL-6 (MSD, # K151AKB) e IL-1 beta (MSD, # K151AGB). Los datos de dosis-respuesta se ajustaron a una curva sigmoidal mediante el uso de una regresión no lineal, y los valores de IC<sub>50</sub> se calcularon con la ayuda de GraphPad 5.0 (GraphPad Software, Inc.). Los resultados mostrados en la Tabla 17 demuestran que los ADC esteroidales anti-hTNF alfa tienen una potente actividad en inhibir la liberación de las citocinas proinflamatorias IL-6 e IL-1beta de células inmunes activadas.

Tabla 17: Actividad *in vitro* de los ADC anti-TNF alfa humanos en el ensayo de liberación de citocinas PBMC humanas estimuladas con LPS (n = 2)

Cpd No.	IC <sub>50</sub> de liberación de citocinas (ng/mL)	
	IL-6	IL-1beta
203	14,3 ± 3,5	3,6 ± 1,2

Ejemplo 82: Actividad del inmunoconjuguado anti-TNF-alfa en el ensayo de citotoxicidad inducida por TNFa en células L929

L929 es una línea celular de fibrosarcoma aneuploide murino que se sensibiliza mediante el tratamiento previo con actinomicina D. El tratamiento con TNFa inicia la apoptosis y la posterior muerte celular. Las células L929 en fase logarítmica se recogieron mediante el uso de tripsina al 0,05 %, se lavaron dos veces con D-PBS y se contaron mediante CEDEX. Las células se resuspendieron a 1E6 células/mL en medio de ensayo que contenía 4 µg/mL de actinomicina D y se añadieron 50 µL a todos los pocillos. El ADC esteroide anti-TNF alfa murino (anti-TNF alfa 8C11 murino conjugado con Cpd 71; también conocido como ADC esteroide anti-mTNF alfa) y el mAb anti-TNF murino (8C11) se diluyeron a una concentración de 43 en el medio de ensayo y se realizaron diluciones seriadas 1:3. El TNFa de ratón se diluyó a una concentración 4x de 600 pg/mL. El ADC esteroide anti-mTNF y mAb anti-mTNF (125 mL) se añadieron al mTNFa (125 µL) en un esquema de dilución 1:2 y se dejaron incubar durante 1 hora a temperatura ambiente, y se agitó suavemente. La mezcla de anticuerpo/mTNFa (o ADC/ mTNFa) se añadió a los pocillos a 50 µL/pocillo por triplicado. Las placas se incubaron durante 20 horas a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>. Para cuantificar la viabilidad, se agregaron a los pocillos 10 mL del reactivo WST-1 (Roche cat# 11644807001). Las placas se incubaron en condiciones de ensayo durante 3,5 horas, se centrifugaron a 500 x g y se transfirieron 75 µL de sobrenadante a una placa ELISA (Costar cat#3369). Las placas se leyeron a una DO 420-600 nm mediante el uso de un lector de placas de ELISA Spectromax 190. Los datos se analizaron y los valores de IC<sub>50</sub> calculados mediante el uso de un ajuste de dosis-respuesta sigmoidal (pendiente variable) en GraphPad Prism 5.

El ADC esteroide anti-mTNF alfa tuvo una potencia neutralizante (IC<sub>50</sub> 1,9 nM) comparable al mAb anti-mTNF alfa no conjugado (IC<sub>50</sub> 1,5 nM).

Ejemplo 83: Unión de ADC esteroide anti-mTNF-alfa a receptores Fcgamma de ratón

Se usó un instrumento Biacore T200 basado en SPR (resonancia de plasmón superficial) (GE Healthcare) para evaluar la unión de ADC esteroide anti-mTNF-alfa (anti-mTNF 8C11 conjugado a Cpd 71) y mAb anti-mTNF-alfa a los FcgR de ratón recombinante (todos Sistemas R&D). Los FcgR se inmovilizaron directamente en la superficie de las células de flujo dos, tres y/o cuatro del chip(s) Biacore CM5 tipo S para lograr densidades de ~ 1000-2000 RU (unidades de resonancia). La superficie modificada en blanco de la célula de flujo, uno de cada chip Biacore, se usó como una superficie de referencia. Cada experimento constó de fases de asociación y disociación. La fase de asociación consistió en valorar mAb parental y ADC en todas las células de flujo a una velocidad de flujo de 50 ul/min y concentraciones de 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 y 0 nM para FcgRIIB y FcgRIII y 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56 y 0 nM para los receptores I y IV. La fase de disociación consistió en el flujo continuo del tampón de funcionamiento (HBS-EP +, pH 7,4, GE Healthcare) a una velocidad de flujo de 50 ul/min. Las fases de asociación y disociación se monitorearon durante 5 min cada una (receptores I y IV) o 1 min (receptores II y III). Las superficies de las virutas se regeneraron con un pulso de 5s de HCl 100 mM a una velocidad de flujo de 100 ul/min después de cada ciclo de unión. Se usó el software de evaluación Biacore para ajustar los datos crudos a modelos de unión 1:1 (FcgRI y IV) o de estado estacionario (receptores IIB y III). Los resultados se muestran en la Tabla 19.

$k_a$  es la constante de velocidad de asociación (1/Ms);  $k_d$  es la constante de velocidad de disociación (1/s);  $K_D$  es la constante de disociación de equilibrio (M).

5 Tabla 19: Afinidades de unión del inmunoconjuguado anti-TNF-alfa a los receptores Fcgamma de ratón

	muFcgrI			muFcgrIIb		muFcgrIII		muFcgrIV		
	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)	$K_D$ (M)	$K_D$ (M)	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)	$K_D$ (M)	
MAb anti-mTNF	7,4E + 05	1,6E-02	2,1E-08	3,7E-06	3,1E-06	1,2E + 05	5,3E-03	4,6E-08		
ADC anti-mTNF	3,2E + 05	8,7E-03	2,8E-08	5,9E-06	3,3E-06	8,4E+04	4,6E-03	5,5E-08		

10 Ejemplo 84: Actividad de ADC esteroidal anti mTNF-alfa en un modelo de hipersensibilidad por contacto

15 Los ADC esteroidales anti-mTNF alfa se evaluaron en un modelo de hipersensibilidad de contacto agudo, una estimulación de inflamación aguda de la piel mediante el uso de una respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) (impulsada por células T) mediante la aplicación de un agente sensibilizante (isotiocianato de fluoresceína (FITC)). La eficacia de los ADC esteroidales anti-mTNF alfa se midió por la capacidad de reducir la inflamación de la oreja. Los biomarcadores esteroidales corticosterona y propéptido N-terminal de procolágeno tipo 1 (P1NP) se incluyeron como lecturas para evaluar el impacto putativo del tratamiento con ADC esteroidales anti-mTNF alfa en el eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) y el recambio óseo, respectivamente.

20 *Inflamación de la oreja*

25 El día 0, los ratones se colocaron bajo anestesia general y se les afeitaron los abdómenes. Mediante el uso de una micropipeta, se sensibilizó a los ratones mediante la aplicación epicutánea de 400  $\mu$ L de solución de FITC (solución al 1,5 % en acetona:DBP 1:1) en el abdomen. Seis días después, los ratones fueron dosificados con vehículo o agente terapéutico 1 hora antes del estímulo de la oreja con FITC. Para el estímulo de la oreja, los ratones se colocaron bajo anestesia general y se estimularon con 20  $\mu$ L de FITC aplicados en la oreja derecha. 24 horas después de la exposición, los ratones se colocaron bajo anestesia general y se midió el grosor de sus orejas con un calibre. Se calculó la diferencia entre las orejas estimuladas y no estimuladas. 72 horas después de la estimulación de la oreja, los ratones fueron inyectados con ACTH a 1 mpk IP, y se les extrajo sangre terminal 30 minutos después de la ACTH. El plasma se recolectó y se analizaron los niveles moleculares de P1NP, corticosterona, esteroides libres y moléculas grandes.

30 *Cuantificación de esteroides libres liberados y corticosterona endógena*

35 La curva de calibración del esteroide se preparó en plasma de ratón con concentraciones finales de 0,03 nM a 0,1  $\mu$ M a 8 niveles de concentración diferentes. Se preparó una curva de calibración de corticosterona que varió de concentraciones finales de corticosterona de 0,3 nM a 1  $\mu$ M en 70 mg/mL de solución de albúmina de suero bovino en tampón PBS. Se añadió una solución de 160  $\mu$ L de MeCN con ácido fórmico al 0,1 % a 40  $\mu$ L de muestras de plasma de estudio o estándares de calibración. Los sobrenadantes se diluyeron con agua destilada y se inyectaron 30  $\mu$ L de solución de muestra final para análisis LC/MS.

40 La cuantificación del esteroide libre liberado y la corticosterona se realizó en un espectrómetro de masas triple cuádruple AB Sciex 5500 conectado a un sistema de HPLC Shimadzu AC20 interconectado con una fuente de ionización por electropulverización que funciona en modo positivo. Se usó una columna Waters XBridge BEH C18, 2,1 x 30 mm, 3,5  $\mu$ m para la separación por cromatografía. La fase móvil A fue ácido fórmico al 0,1 % en agua HPLC Milli Q, y la fase móvil B fue ácido fórmico al 0,1 % en MeCN. Se aplicó un gradiente lineal del 2 % de la fase móvil B al 98 % de la fase móvil B de 0,6 a 1,2 minutos. El tiempo de ejecución total fue de 2,6 min a una velocidad de flujo de 0,8 mL/min. El espectrómetro de masas se hizo funcionar en modo MRM positivo a una temperatura de la fuente de 700 °C.

45 *Cuantificación de P1NP en plasma*

50 La cuantificación de P1NP en plasma se realizó en una plataforma LC/MS basada en la digestión de proteínas con tripsina. Las muestras de plasma se precipitaron parcialmente y se redujeron completamente mediante la adición de una mezcla de MeCN/bicarbonato de amonio 0,1 M/DTT. El sobrenadante se recogió y se alquiló mediante la adición de ácido yodoacético. Las proteínas alquiladas se digirieron con tripsina y los péptidos tripticos resultantes se analizaron mediante LC/MS. La curva de calibración se generó mediante el uso del péptido triptico sintético añadido en suero de caballo (matriz sustituta que no interfiere). Se usó un péptido flanqueante marcado con isótopos estables (extensión de 3-6 aminoácidos en ambos extremos del péptido triptico) como patrón interno añadido en la mezcla de precipitación de proteínas MeCN/DTT para normalizar tanto la eficiencia de la digestión como la inyección LC/MS.

55 Se usó una columna Columnex Chromenta BB-C18, 2,1 x 150 mm, 5  $\mu$ m para la separación por cromatografía. La fase móvil A fue ácido fórmico al 0,1 % en agua HPLC Milli Q y la fase móvil B fue ácido fórmico al 0,1 % en MeCN. Se aplicó un gradiente lineal del 2 % de la fase móvil B al 65 % de la fase móvil B de 0,6 a 3 min. El tiempo de

ejecución total fue de 8 min a una velocidad de flujo de 0,45 mL/min. Se usó un espectrómetro de masas AB Sciex 4000Qtrap en modo MRM positivo para cuantificar los péptidos P1NP, a una temperatura de fuente de 700 °C.

#### *Cuantificación del ADC total en plasma*

Las concentraciones de anticuerpo total (ADC y mAb de la cadena principal) se midieron mediante un ensayo de unión de ligando mediante el uso de la plataforma Mesoscale Discovery (MSD). Se usó TNF de ratón marcado con biotina como reactivo de captura para ADC esteroidales anti-mTNF alfa y se usó un anticuerpo de detección anti-ratón de cabra conjugado con Sulfo-TAG para la detección. Se generó una curva de calibración mediante dilución en serie de la molécula de ADC en la matriz correspondiente y se usaron muestras de control de calidad para calificar el ensayo

#### *Resultados*

Los resultados se muestran en la Tabla 20 a continuación:

Tabla 20: Comparación de la actividad de ADC esteroidales anti-mTNF alfa sobre la inflamación de la oreja y los biomarcadores esteroidales en el modelo de inflamación de CHS

ADC	Inflamación de la oreja (% inhib @ 10mpk)	SEM	P1NP (% inhib. @ 10mpk)	SEM	Corticosterona (% inhib @ 10mpk)	SEM
Cpd. No. 145	87,8	3,4	19,2	6,3	15,1	9,9

Estos resultados demuestran que los ADC esteroidales anti-mTNF alfa pueden obtener una respuesta eficaz equivalente al tratamiento con esteroides de molécula pequeña mientras se evitan los efectos no deseados sobre corticosterona y P1NP.

Se realizó un estudio adicional de hipersensibilidad por contacto (CHS) para analizar si se requería la conjugación de la carga útil de esteroides con mAb anti-TNF para mejorar la eficacia. Los ratones se dosificaron ip una vez de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente con vehículo, mAb anti-mTNF alfa (10mpk), ADC esteroide anti-mTNF alfa (10mpk) (cpd no 139) o una mezcla de mAb anti-mTNF alfa codosificado (administrado simultáneamente en una sola inyección ip) con una cantidad equivalente de esteroide de molécula pequeña para igualar la estequiometría de ADC. Para una dosis de 10 mpk de ADC esteroide anti-mTNF alfa con un DAR de 4, se calculó que era 4 µg de esteroide de molécula pequeña (Cpd. No. 42). Los resultados mostrados en la Figura 9 demuestran que el tratamiento con ADC esteroide anti-mTNF alfa tuvo una eficacia significativamente mayor para reducir la inflamación de la oreja en comparación con la combinación de mAb anti-mTNF alfa y esteroide de molécula pequeña o mAb anti-mTNF alfa solo.

#### Ejemplo 85: Actividad de ADC esteroide anti-mTNF-alfa en artritis inducida por colágeno

La capacidad del ADC esteroide anti-mTNF alfa (Cpd. No. 137) para afectar a la enfermedad se evaluó en el modelo de artritis de artritis inducida por colágeno (CIA).

En estos experimentos, se obtuvieron ratones macho DBA/1J de Jackson Labs (Bar Harbor, ME). Los ratones se usaron entre las 6 y las 12 semanas de edad. Todos los animales se mantuvieron a temperatura y humedad constantes bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y se alimentaron con comida para roedores (Lab Diet 5010 PharmaServ, Framingham, MA) y agua *ad libitum*. AbbVie está acreditada por la AAALAC (Asociación para la Evaluación y Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio), y todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (IACUC) y monitoreados por un veterinario a cargo. Se controlaron el peso corporal y la condición, y los animales se sacrificaron si presentaban una pérdida de peso > 20 %.

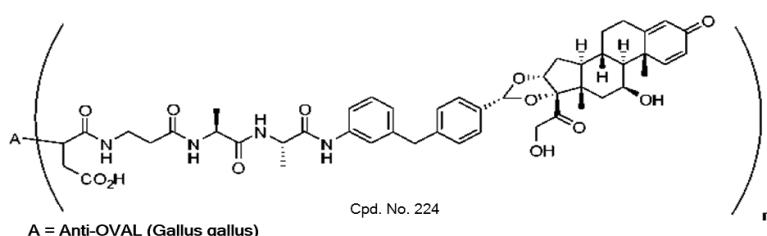
Los ratones macho DBA/J se inmunizaron por vía intradérmica (id) en la base de la cola con 100 µL de emulsión que contenía 100 µg de colágeno bovino tipo II (MD Biosciences) disuelto en ácido acético 0,1 N y 200 µg de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra inactivado por calor (adyuvante completo de Freund, Difco, Laurence, KS). Veintiún días después de la inmunización con colágeno, los ratones se reforzaron IP con 1 mg de Zymosan A (Sigma, St. Louis, MO) en PBS. Después del refuerzo, los ratones fueron monitoreados de 3 a 5 veces por semana para detectar artritis. Se evaluó la inflamación de las patas traseras mediante el uso de calibradores de resorte Dyer (Dyer 310-115)

Los ratones se inscribieron entre los días 24 y 28 ante los primeros signos clínicos de la enfermedad y se distribuyeron en grupos de gravedad artrítica equivalente. El tratamiento terapéutico temprano comenzó en el momento de la inscripción.

Los animales se dosificaron una vez por vía oral (p.o.) con esteroide (Cpd. No. 3) (10mpk) en un vehículo de HPMC al 0,5 %/Tween80 al 0,02 % [v/v] o intraperitoneal (i.p.) con mAb anti-mTNF alfa (10mpk) (8C11) o ADC esteroidal anti-mTNF alfa (10mpk) (Cpd. No. 137) en solución salina al 0,9 %. Se recogió sangre para la exposición al anticuerpo mediante una muesca en la cola a las 24 y 72 horas después de la dosis. Las patas se recogieron en el punto de tiempo terminal para histopatología. La sangre se recogió en el punto de tiempo terminal mediante punción cardíaca para realizar recuentos sanguíneos completos (Sysmex XT-2000iV). La significación estadística se determinó mediante ANOVA.

Los resultados se muestran en la Figura 3 y demuestran que una sola dosis de ADC esteroidal anti-mTNF alfa puede exhibir una duración de acción prolongada mediante la mejora de la inflamación de la pata durante ~ 6 semanas en comparación con mAb anti-mTNF alfa o esteroide de molécula pequeña solo.

En un estudio separado diseñado para abordar la funcionalidad de orientación al TNF del ADC esteroidal anti-mTNF alfa, los animales recibieron una dosis i.p. una vez con mAb anti-mTNF alfa (10mpk) o ADC esteroidal anti-mTNF alfa (10mpk) (Cpd. No. 145) o con ADC esteroidal isotipo (10mpk) (Cpd. No. 224):



que reconoce la proteína de huevo de gallina ovoalbúmina, un antígeno no expresado en ratones. Ambos ADC tuvieron una carga de fármaco equivalente. El esteroide de molécula pequeña (3mpk) se dosificó por vía oral una vez al día (q.d.). Los resultados se muestran en la Figura 10 y demuestran que una sola dosis de ADC esteroidal anti-mTNF alfa tiene una eficacia equivalente a la del esteroide de molécula pequeña dosificado diariamente durante un período de 21 días. Una dosis única del ADC esteroidal de isotipo no dirigido solo tuvo una eficacia parcial, similar al mAb anti-mTNF solo durante el mismo período de tiempo. Los porcentajes indican el % de inhibición en comparación con el vehículo. Una evaluación de los pesos corporales de los animales a lo largo del curso de este estudio (Figura 11) reveló que todos los grupos de tratamiento con la excepción del grupo de ADC esteroidales anti-mTNF alfa perdieron peso. Por el contrario, los ratones tratados con ADC esteroidales anti-mTNF alfa mostraron un aumento de peso normal durante los 21 días del estudio.

#### Ejemplo 86: Actividad de varios ADC esteroidales anti-mTNF alfa en artritis inducida por colágeno

Se probaron varios ADC esteroidales anti-mTNF alfa con diferentes cargas útiles de esteroides o razones de fármaco: anticuerpo (DAR) para determinar su eficacia en un modelo de artritis en ratón. Los estudios se realizaron de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 85. Los resultados se muestran en la Tabla 21 a continuación.

Tabla 21: Eficacia de los ADC esteroidales anti-mTNF alfa en un modelo de artritis

Cpd No.	DAR (n)	% de inhibición de la inflamación de la pata frente al vehículo (AUC <sub>0-21d</sub> ) (a 10mpk)	SEM
143	2	96	3,3
145	4	95	4

#### Ejemplo 87: Actividad de los inmunoconjungados anti-hTNF-alfa en un modelo de ratón inactivado para Tg1278TNF transgénico para TNF humano de artritis inducida por anticuerpos de colágeno

La eficacia de los ADC anti-TNF alfa humanos se evaluó en un modelo de artritis de ratón transgénico con TNFa humano.

El modelo de artritis inducida por anticuerpos de colágeno (CAIA) (Moore, AR J Transl Med 12:285 (2014)) se realizó mediante el uso de ratones inactivados para Tg1278TNF transgénicos para TNF humano como se describió anteriormente (Moore A y otros J Transl Med 12 (1): 285 (2014)). Se administraron ocho mg de un cóctel de anticuerpos monoclonales que se dirigen a diferentes epítopos de colágeno tipo II (ArthritoMab™) por vía intraperitoneal (i.p.) a los ratones el día 0. El día 3, se inyectaron a los ratones por vía i.p. 10 µg de LPS para potenciar la patología de la enfermedad. Se evaluó la puntuación articular de los animales diariamente desde el día 3 hasta el día 14 del estudio. Se usaron ocho ratones machos por grupo y se administraron artículos de prueba o vehículo PBS por vía i.p. dos veces por semana durante dos semanas.

Los resultados se muestran en la Figura 4 y demuestran que los ADC anti-TNF alfa humanos pueden reducir significativamente la puntuación de la enfermedad en comparación con un mAb anti-TNF alfa humano (adalimumab).

Ejemplo 88: Actividad de los ADC esteroidales anti-mTNF alfa en el pico de inflamación

5 Se llevó a cabo un experimento de CIA en ratón para establecer la eficacia del ADC esteroide anti-mTNF alfa en animales con inflamación máxima. Para la dosificación terapéutica tardía, los ratones se inscribieron en el estudio ante los primeros signos clínicos de la enfermedad y se dosificaron 6 días después de la inscripción. Se sacrificó un grupo de animales en el día 7 de la enfermedad para proporcionar un valor de referencia para los cambios artríticos  
10 mediante micro tomografía computarizada ( $\mu$ CT) y análisis histológico en el momento en que se dosificaron todos los demás grupos. Todos los animales se dosificaron una vez el día 6 con vehículo (solución salina al 0,9 %), mAb anti-mTNF alfa (10mpk) (8C11) o ADC esteroide anti-mTNF alfa (10mpk) (Cpd. No. 145) y sacrificado el día 21. Se recogieron las patas traseras artríticas y se realizó un análisis de  $\mu$ CT. A continuación, se usaron las mismas patas para la evaluación histológica. Al final del experimento, se recogió sangre completa mediante punción cardíaca para evaluar los recuentos sanguíneos completos (CBC).

15

*Tomografía microcomputarizada ( $\mu$ CT)*

20 Las patas traseras se retiraron intactas en la tibia/peroné y se fijaron en formalina al 10 %. Las patas se escanearon mediante  $\mu$ CT (Scanco Medical AG, Micro-CT40) a 55 kVp a 145  $\mu$ A en configuración de alta resolución (1000 proyecciones/ 180° a una reconstrucción de píxeles de 2048x2048) mediante el uso de vértices isotrópicos y un tiempo de integración de 300 milisegundos. Se dibujó manualmente un contorno cilíndrico alrededor de la región de interés desde la unión tibiotalar y se extendió hasta el tobillo en 100 rebanadas (1,8 mm). La evaluación se realizó mediante el software Scanco mediante el uso de sigma gauss 0,8, con un umbral superior de 1000 y un umbral inferior de 320.

25

*Evaluación histológica*

30 Las patas traseras de los ratones tratados se fijaron por inmersión en formalina tamponada neutra al 10 % y se descalcificaron parcialmente en solución de Calrite durante 48 horas para permitir el recorte de los bordes lateral y medial del tarso. Luego, las patas se volvieron a colocar en Calrite durante ~ 48 horas para completar la descalcificación. Las muestras se procesaron de forma rutinaria, se incluyeron en parafina en el plano sagital, se seccionaron a 5 micras y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Los portaobjetos se evaluaron microscópicamente para detectar la presencia de inflamación/formación de pannus, infiltración de neutrófilos, erosión ósea y daño del cartílago mediante el uso de una escala de 0-4: 0 = ninguno presente, 1 = leve, 2 = moderado, 3 = marcado, 4 = severo.

35

40 Los resultados mostrados en la Figura 12 demuestran que una dosis única de ADC esteroide anti-mTNF alfa puede revertir la enfermedad establecida y reducir la inflamación de la pata hasta casi el valor de referencia. Por el contrario, una sola dosis de mAb anti-mTNF alfa tuvo un efecto mínimo sobre la inflamación.

45 El efecto del tratamiento sobre la pérdida ósea del tarso medida por mCT se muestra en la Figura 13. Los resultados demuestran que una dosis única de ADC esteroide anti-mTNF alfa administrada en el pico de inflamación es capaz de inhibir significativamente la erosión ósea articular mediada por la enfermedad en comparación con mAb anti-mTNF alfa solo.

50 Los resultados de la evaluación histológica de las articulaciones de los ratones tratados con CIA se muestran en las Figuras 14-17. Demuestran que una sola dosis de ADC esteroide anti-mTNF alfa administrada en el pico de la enfermedad dio como resultado una disminución significativa de la inflamación, la formación de pannus, la erosión ósea y el daño del cartílago el día 21 en relación con los controles de vehículo de la misma edad ( $p <0,001$ ), y los niveles de la enfermedad fueron equivalentes a los niveles observados en los controles al inicio del estudio (vehículo d6). En dos de las seis patas evaluadas, no se detectó ninguna enfermedad en las articulaciones tarso/ falángicas de los animales tratados con ADC esteroide anti-mTNF alfa el día 21, en comparación con la incidencia del 100 % en ratones el día 6 de referencia (antes del tratamiento) y los ratones tratados con vehículo el día 21.

55

55 Por el contrario, una dosis única de mAb anti-mTNF alfa en el pico de la enfermedad no inhibió la inflamación, la erosión ósea, la formación de pannus o la destrucción del cartílago, en relación con los controles con vehículo de la misma edad el día 21. Los niveles de la enfermedad fueron más graves que los controles de referencia y se observó una leve tendencia a mejorar la inflamación.

60

60 Se analizó la sangre completa para evaluar los cambios en los subconjuntos de células sanguíneas periféricas con el tratamiento. Los resultados mostrados en las Figuras 18-23 demuestran que el aumento en algunas poblaciones de células sanguíneas periféricas observado en animales enfermos puede resolverse con una sola dosis de ADC esteroide anti-mTNF alfa. Se observaron reducciones estadísticamente significativas en los glóbulos blancos, neutrófilos y monocitos en general con el tratamiento con ADC esteroide anti-mTNF alfa.

65

Ejemplo 89: Comparación de ADC esteroidales anti-mTNF-alfa y ADC anti-CD 163

Para demostrar la eficacia terapéutica mejorada de un inmunoconjungado anti-TNF en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria, comparamos su actividad con un ADC dirigido al receptor removedor de hemoglobina CD163, un enfoque inmunoconjungado de glucocorticoïdes descrito en la literatura que tiene una funcionalidad antiinflamatoria dirigida (PCT Int. Appl. WO2011039510A2 de Graversen NJH, y otros; Graversen JH y otros, Mol. Ther. 20 (8): 1550-8 (2012)).

*Generación de una línea celular reportera de GRE CD163 de ratón*

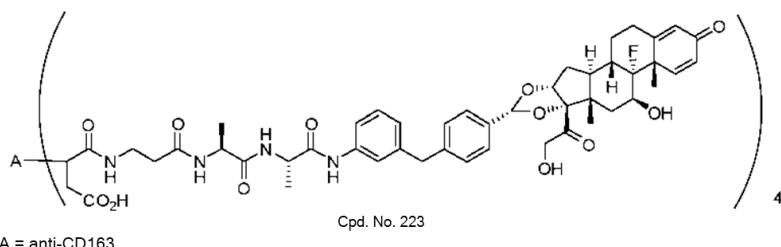
Se creó una línea celular parental similar a la descrita en el Ejemplo 78 pero con células CHO-K1 en lugar de células K562. La línea celular parental resultante CHO pGL4.36[Luc2P/MMTV/Hygro] \_PGL4.75[hRLuc/CMV] se transfeció luego con un plásmido que codifica para CD163 de ratón (Origene cat. No. MR216798) en las condiciones descritas en el Ejemplo 78. La línea celular resultante CHO mCD163 GRE (pGL4.36[Luc2P/MMTV/Hygro]) se usó para probar la actividad *in vitro* de inmunoconjungados anti-mTNF-alfa y anti-CD163 de ratón (también denominados inmunoconjungados anti-mCD163 o ADC esteroide anti-mCD163).

*Preparación de un inmunoconjungado anti-CD163 de ratón*

Se generó un anticuerpo quimérico de rata anti-ratón CD163 mlgG2a/k a partir de la secuencia VH y VL para el clon 3E10B10 como se describe (SEQ ID NO: 87/88 de PCT Int. Appl. WO 2011/039510A2). Este anticuerpo se conjugó con Cpd. No. 99 mediante el uso de las condiciones resaltadas bajo el protocolo general de conjugación de cisteína en el Ejemplo 36 para dar una razón fármaco: anticuerpo (DAR) de 4.

*Actividad de un inmunoconjungado anti-CD163 de ratón en el ensayo reportero de GRE de CD163 de ratón*

Se ensayó la actividad del inmunoconjungado anti-CD163 de ratón en la línea celular CHO mCD163 GRE (pGL4.36[Luc2P/MMTV/Hygro]) en las condiciones descritas en el Ejemplo 79. Un ADC esteroide anti-mTNF alfa (Cpd. No. 145) se incluyó como control negativo. Los resultados de la Tabla 22 demuestran el inmunoconjungado anti-CD163 de ratón (Cpd. No. 223):



muestra actividad dependiente de antígeno disociada del ADC esteroide anti-mTNF alfa en la línea celular CD163 GRE de ratón.

Cuadro 22

Cpd No.	DAR	% monómero	EC50 mCD163 GRE (ug/mL)	mCD163 GRE (% máx.)	EC50 CHO GRE (ug/mL)	CHO GRE (% máx.)
223	4	93	0,2	92	> 50	55
145	4	97	> 20	70	> 50	39

*Actividad del inmunoconjungado anti-CD163 de ratón en artritis inducida por colágeno en ratón*

La capacidad del inmunoconjungado esteroide anti-ratón CD163 para impactar la inflamación de la pata se evaluó en el modelo de artritis inducida por colágeno (CIA) de ADC esteroide anti-mTNF alfa control de RA A (cpd 139) con el mismo enlazador de fármacos y DAR que el ADC esteroide anti-mCD163 también se evaluó en el mismo estudio y los mAb parentales para ambos ADC también se incluyeron como grupos de tratamiento. El experimento se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 85. Los resultados se muestran en la Figura 24 y demuestran que aunque el ADC esteroide anti-mCD163 inicialmente reduce la inflamación de la pata en los primeros días después del tratamiento de dosis única, este efecto es transitorio. En comparación, una sola dosis de ADC esteroide anti-mTNF alfa es suficiente para suprimir completamente la inflamación durante la duración del estudio.

65

## LISTADO DE SECUENCIAS

ES 2 877 548 T3

	Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser			
	115	120	125	
5	Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly			
	130	135	140	
10	Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala			
	145	150	155	160
15	Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro			
	165	170	175	
	Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu			
	180	185	190	
20	Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu			
	195	200	205	
25	Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly			
	210	215	220	
	Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu			
30	225	230		
	<210> 2			
	<211> 235			
	<212> PRT			
	<213> murino			
35	<400> 2			
	Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala			
	1	5	10	15
40	Leu Pro Gln Lys Met Gly Gly Phe Gln Asn Ser Arg Arg Cys Leu Cys			
	20	25	30	
45	Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Leu Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe			
	35	40	45	
50	Cys Leu Leu Asn Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg Asp Glu Lys Phe			
	50	55	60	
	Pro Asn Gly Leu Pro Leu Ile Ser Ser Met Ala Gln Thr Leu Thr Leu			
	65	70	75	80
55	Arg Ser Ser Ser Gln Asn Ser Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val			
	85	90	95	

# ES 2 877 548 T3

Ala Asn His Gln Val Glu Glu Gln Leu Glu Trp Leu Ser Gln Arg Ala  
 100 105 110

5 Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Met Asp Leu Lys Asp Asn Gln Leu Val  
 115 120 125

10 Val Pro Ala Asp Gly Leu Tyr Leu Val Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys  
 130 135 140

15 Gly Gln Gly Cys Pro Asp Tyr Val Leu Leu Thr His Thr Val Ser Arg  
 145 150 155 160

20 Phe Ala Ile Ser Tyr Gln Glu Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Val Lys  
 165 170 175

25 Ser Pro Cys Pro Lys Asp Thr Pro Glu Gly Ala Glu Leu Lys Pro Trp  
 180 185 190

30 Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp  
 195 200 205

35 Gln Leu Ser Ala Glu Val Asn Leu Pro Lys Tyr Leu Asp Phe Ala Glu  
 210 215 220

40 Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Val Ile Ala Leu  
 225 230 235

<210> 3  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> adalimumab VH-CDR1  
 <400> 3

45 Asp Tyr Ala Met His  
 1 5

<210> 4  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> adalimumab VH-CDR2

50 <400> 4 Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Glu  
 1 5 10 15

Gly

<210> 5  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> adalimumab VH-CDR3

60 <400> 5 Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser  
 1 5

<210> 6  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

# ES 2 877 548 T3

<220>  
 <223> adalimumab VH-CDR1  
 <400> 6

	Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asp	Tyr	Ala	Met	His
5	1						5			10

<210> 7  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

10 <220>  
 <223> infliximab VH-CDR1  
 <400> 7

	Gly	Phe	Ile	Phe	Ser	Asn	His	Trp	Met	Asn
15	1					5				10

<210> 8  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> infliximab VH-CDR2  
 <400> 8

20 Glu Ile Arg Ser Lys Ser Ile Asn Ser Ala Thr His Tyr Ala Glu Ser

20	1				5			10		15
----	---	--	--	--	---	--	--	----	--	----

**Val Lys Gly**

<210> 9  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> infliximab VH-CDR3  
 <400> 9

30 Asn Tyr Tyr Gly Ser Thr Tyr Asp Tyr

30	1				5					
----	---	--	--	--	---	--	--	--	--	--

<210> 10  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>

35 <223> certolizumab VH-CDR1  
 <400> 10

35		Asp	Tyr	Gly	Met	Asn				
	1				5					

<210> 11  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>

40 <223> certolizumab VH-CDR2  
 <400> 11

40	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Ile	Gly	Glu	Pro	Ile	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
45	1				5					10					15	

**Gly**

<210> 12  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> certolizumab VH-CDR3  
 <400> 12

50		Gly	Tyr	Arg	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr						
	1					5										

<210> 13  
 <211> 10

55

<211> 5  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> ozoralizumab VH-CDR1  
 <400> 20  
**Asp Tyr Trp Met Tyr**  
 1                   5  
 <210> 21  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> ozoralizumab VH-CDR2  
 <400> 21

Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1                   5                   10                   15

20                   Gly  
 <210> 22  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> ozoralizumab VH-CDR3  
 <400> 22  
**Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg**  
 1                   5  
 <210> 23  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> ozoralizumab VH-CDR1  
 <400> 23  
**Ser Phe Gly Met Ser**  
 1                   5  
 <210> 24  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> ozoralizumab VH-CDR2  
 <400> 24

Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1                   5                   10                   15

50                   Gly  
 <210> 25  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> ozoralizumab VH-CDR3  
 <400> 25  
**Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser**  
 1                   5  
 <210> 26  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> ozoralizumab VH-CDR1  
 <400> 26



5 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> adalimumab VL-CDR2  
 <400> 33  
 10 <210> 34  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> adalimumab VL-CDR3  
 <400> 34  
 20 <210> 35  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> infliximab VL-CDR1  
 25 <400> 35  
 30 <210> 36  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> infliximab VL-CDR2  
 <400> 36  
 35 <210> 37  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> infliximab VL-CDR3  
 <400> 37  
 40 <210> 38  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> certolizumab VL-CDR1  
 <400> 38  
 45 <210> 39  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 50 <223> certolizumab VL-CDR2  
 <400> 39  
 55 <210> 40  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> certolizumab VL-CDR3  
 <400> 40  
 60 <210> 41  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 65 <223> certolizumab VL-CDR4  
 <400> 41

5 <220>  
 <223> certolizumab VL-CDR3  
 <400> 40 Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu Thr  
 1 5  
 <210> 41  
 <211> 11  
 10 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> afelimomab VL-CDR1  
 <400> 41 Lys Ala Ser Gln Ala Val Ser Ser Ala Val Ala  
 15 1 5 10  
 <210> 42  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> afelimomab VL-CDR2  
 <400> 42 Trp Ala Ser Thr Arg His Thr  
 20 1 5  
 25 <210> 43  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 30 <223> afelimomab VL-CDR3  
 <400> 43 Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe Thr  
 1 5  
 35 <210> 44  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 40 <223> nerelimumab VL-CDR1  
 <400> 44 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asn Asn Gln Lys Asn Tyr Leu  
 1 5 10 15  
 45 Ala  
 <210> 45  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 50 <223> nerelimumab VL-CDR2  
 <400> 45 Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser  
 1 5  
 55 <210> 46  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 60 <223> nerelimumab VL-CDR3  
 <400> 46 Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Trp Thr  
 1 5  
 65 <210> 47  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

ES 2 877 548 T3

5 <220>  
 <223> golimumab VL-CDR1  
 <400> 47

Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Tyr	Ser	Tyr	Leu	Ala
1						5				10

10 <210> 48  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> golimumab VL-CDR2  
 <400> 48

Asp	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr				
1						5				

15 <210> 49  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> golimumab VL-CDR3  
 <400> 49

Gln	Gln	Arg	Ser	Asn	Trp	Pro	Pro	Phe	Thr	
1					5				10	

20 <210> 50  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> adalimumab VH  
 <400> 50

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Ley	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1					5				10				15	

25 <210> 51  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>

30 <223> infliximab VH  
 <400> 51

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asp	Tyr
					20				25				30		

35 <210> 52  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>

40 <223> infliximab VH  
 <400> 52

Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Ley	Glu	Trp	Val
					35				40				45		

45 <210> 53  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>

50 <223> infliximab VH  
 <400> 53

Ser	Ala	Ile	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	His	Ile	Asp	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
					50				55				60		

55 <210> 54  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>

60 <223> infliximab VH  
 <400> 54

Glu	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr
65						70					75				80

65 <210> 55  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>

70 <223> infliximab VH  
 <400> 55

Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85				90				95		

75 <210> 56  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>

80 <223> infliximab VH  
 <400> 56

Ala	Lys	Val	Ser	Tyr	Leu	Ser	Thr	Ala	Ser	Ser	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly
					100					105				110	

85 <210> 57  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>

90 <223> infliximab VH  
 <400> 57

Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
					115										

95 <210> 58  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>

100 <223> infliximab VH  
 <400> 58

## ES 2 877 548 T3

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

5 Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn His  
 20 25 30

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

15 Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ser Ile Asn Ser Ala Thr His Tyr Ala Glu  
 50 55 60

20 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ala  
 65 70 75 80

25 Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Gly Val Tyr  
 85 90 95

30 Tyr Cys Ser Arg Asn Tyr Tyr Gly Ser Thr Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

35 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser  
 115

<210> 52  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> certolizumab VH  
 <400> 52

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

45 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30

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

55 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Ile Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60 80

60 Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

65 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

70 Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 53  
 <211> 117  
 <212> PRT

ES 2 877 548 T3

<213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> afelimomab VH  
 <400> 53

5	Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
	1 5 10 15
10	Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
	20 25 30
15	Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
	35 40 45
20	Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asp Ser Thr Leu Lys
	50 55 60
25	Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Ile Phe Leu
	65 70 75 80
30	Lys Asn Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala
	85 90 95
35	Arg Glu Trp His His Gly Pro Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
	100 105 110
40	Val Thr Val Ser Ala
	115
45	<210> 54 <211> 121 <212> PRT <213> secuencia artificial <220> <223> nerelimomab VH <400> 54
50	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ser
	1 5 10 15
55	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
	20 25 30
60	Asn Val Asp Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Ile
	35 40 45
65	Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
	50 55 60
70	Lys Gly Lys Gly Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
	65 70 75 80
75	Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
	85 90 95
80	Ala Arg Ser Ala Phe Tyr Asn Asn Tyr Glu Tyr Phe Asp Val Trp Gly
	100 105 110
85	Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
	115 120

ES 2 877 548 T3

## ES 2 877 548 T3

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

5 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

10 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

15 Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110

20 Val Ser Ser  
 115

<210> 57  
 <211> 115  
 20 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> ozoralizumab VH V3  
 <400> 57

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

30 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr  
 20 25 30

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

35 Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60

40 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

45 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110

50 Val Ser Ser  
 115

<210> 58  
 <211> 126  
 55 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> golimumab VH  
 <400> 58

60

# ES 2 877 548 T3

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

5 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

10 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

15 Ala Phe Met Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Lys Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

20 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

25 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

30 Ala Arg Asp Arg Gly Ile Ala Ala Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly  
 100 105 110

35 Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

40 <210> 59  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 45 <223> adalimumab VL  
 <400> 59

50 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

55 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr  
 20 25 30

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

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

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

75 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr  
 85 90 95

80 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

85 <210> 60  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 90 <223> infliximab VL  
 <400> 60

# ES 2 877 548 T3

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

5 Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Phe Val Gly Ser Ser  
 20 25 30

10 Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45

15 Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Met Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

20 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Thr Val Glu Ser  
 65 70 75 80

25 Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His Ser Trp Pro Phe  
 85 90 95

30 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Asn Leu Glu Val Lys  
 100 105

<210> 61  
 <211> 107  
 <212> PRT

35 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> certolizumab VL  
 <400> 61

40 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

45 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn  
 20 25 30

50 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile  
 35 40 45

55 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

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

65 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu  
 85 90 95

70 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 62  
 <211> 107  
 <212> PRT

75 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> afelimomab VL  
 <400> 62

# ES 2 877 548 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Thr Val Gly  
 1                    5                                    10                    15

5

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ala Val Ser Ser Ala  
 20                    25                                    30

10

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
 35                    40                                    45

15

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
 50                    55                                    60

20

Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile His Asn Leu Gln Ala  
 65                    70                                    75                    80

25

Glu Asp Leu Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe  
 85                    90                                    95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100    105

25

<210> 63  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

30

<220>  
 <223> nerelimomab VL  
 <400> 63

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

35

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser  
 20                    25                                    30

40

Asn Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35                    40                                    45

45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Ser Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50                    55                                    60

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

50

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

55

Tyr Tyr Asp Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
 100                    105                                110

60

Lys Arg

60

<210> 64  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> placulumab VL  
 <400> 64

# ES 2 877 548 T3

	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
5	1   5                                   10                                   15	
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ala Ile Asp Ser Tyr	
	20   25   30	
10	Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile	
	35   40                                   45	
	Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
15	50   55                                   60	
	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Leu Pro	
	65   70                                   75                                   80	
20	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Val Trp Arg Pro Phe	
	85   90                                   95	
	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
25	100                                       105	
	<210> 65	
	<211> 108	
	<212> PRT	
	<213> secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> golimumab VL	
	<400> 65	
	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly	
	1   5                                   10                                   15	
35	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Tyr Ser Tyr	
	20   25                                   30	
40	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile	
	35   40                                   45	
	Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly	
45	50   55                                   60	
	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro	
	65   70                                   75                                   80	
50	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro	
	85   90                                   95	
	Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys	
55	100                                       105	
	<210> 66	
	<211> 451	
	<212> PRT	
	<213> secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Adalimumab (D2E7) Cadena pesada de longitud completa	
	<400> 66	

ES 2 877 548 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
20 25 30

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

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys  
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

# ES 2 877 548 T3

	225	230	235	240
5	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met			
	245	250	255	
10	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His			
	260	265	270	
	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val			
	275	280	285	
15	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr			
	290	295	300	
20	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly			
	305	310	315	320
25	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile			
	325	330	335	
	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val			
	340	345	350	
30	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser			
	355	360	365	
35	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu			
	370	375	380	
40	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro			
	385	390	395	400
	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val			
	405	410	415	
45	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met			
	420	425	430	
50	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser			
	435	440	445	
	Pro Gly Lys			
	450			
55	<210> 67			
	<211> 450			
	<212> PRT			
	<213> secuencia artificial			
	<220>			
60	<223> infliximab Cadena pesada de longitud completa			
	<400> 67			

ES 2 877 548 T3

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

Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn His  
20 25 30

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

Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ser Ile Asn Ser Ala Thr His Tyr Ala Glu  
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ala  
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Thr Asp Leu Arg Thr Glu Asp Thr Gly Val Tyr  
85 90 95

Tyr Cys Ser Arg Asn Tyr Tyr Gly Ser Thr Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly

# ES 2 877 548 T3

	225	230	235	240
5	Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile			
	245	250	255	
10	Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu			
	260	265	270	
15	Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His			
	275	280	285	
20	Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg			
	290	295	300	
25	Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys			
	305	310	315	320
30	Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu			
	325	330	335	
35	Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr			
	340	345	350	
40	Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu			
	355	360	365	
45	Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp			
	370	375	380	
50	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val			
	385	390	395	400
55	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp			
	405	410	415	
60	Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His			
	420	425	430	
65	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro			
	435	440	445	
70	Gly Lys			
	450			
75	<210> 68			
	<211> 229			
	<212> PRT			
	<213> secuencia artificial			
	<220>			
	<223> certolizumab Cadena pesada de longitud completa			
	<400> 68			

## ES 2 877 548 T3

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

5  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30

10  
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

15  
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Ile Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

20  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

25  
 Ala Arg Gly Tyr Arg Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

30  
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
 115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly  
 130 135 140

35  
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 145 150 155 160

40  
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
 180 185 190

45  
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
 195 200 205

50  
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 210 215 220

55  
 His Thr Cys Ala Ala  
 225

60  
 <210> 69  
 <211> 447  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> afelimomab Cadena pesada de longitud completa  
 <400> 69

65

ES 2 877 548 T3

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr  
20 25 30

Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asp Ser Thr Leu Lys  
50 55 60

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

Lys Asn Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Glu Trp His His Gly Pro Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
100 105 110

Val Thr Val Ser Ala Ala Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu  
115 120 125

Val Pro Gly Cys Ser Asp Thr Ser Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys  
130 135 140

Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Lys Trp Asn Tyr  
145 150 155 160

Gly Ala Leu Ser Ser Gly Val Arg Thr Val Ser Ser Val Leu Gln Ser  
165 170 175

Gly Phe Tyr Ser Leu Ser Ser Leu Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp  
180 185 190

Pro Ser Gln Thr Val Ile Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Lys Thr  
195 200 205

## ES 2 877 548 T3

Glu Leu Ile Lys Arg Ile Glu Pro Arg Ile Pro Lys Pro Ser Thr Pro  
 210 215 220

5

Pro Gly Ser Ser Cys Pro Pro Gly Asn Ile Leu Gly Gly Pro Ser Val  
 225 230 235 240

10

Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Ala Leu Met Ile Ser Leu Thr  
 245 250 255

15

Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp  
 260 265 270

Val His Val Ser Trp Phe Val Asp Asn Lys Glu Val His Thr Ala Trp  
 275 280 285

20

Thr Gln Pro Arg Glu Ala Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser  
 290 295 300

25

Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Arg Gly Lys Glu Phe Lys  
 305 310 315 320

30

Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile  
 325 330 335

Ser Lys Pro Lys Gly Arg Ala Gln Thr Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro  
 340 345 350

35

Pro Pro Arg Glu Gln Met Ser Lys Lys Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 355 360 365

40

Val Thr Asn Phe Phe Ser Glu Ala Ile Ser Val Glu Trp Glu Arg Asn  
 370 375 380

45

Gly Glu Leu Glu Gln Asp Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Ile Leu Asp Ser  
 385 390 395 400

Asp Gly Thr Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Thr Asp Ser  
 405 410 415

50

Trp Leu Gln Gly Glu Ile Phe Thr Cys Ser Val Val His Glu Ala Leu  
 420 425 430

55

His Asn His His Thr Gln Lys Asn Leu Ser Arg Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445

<210> 70  
 <211> 363  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> ozoralizumab Cadena pesada de longitud completa  
 <400> 70

ES 2 877 548 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr  
20 25 30

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

Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu  
115 120 125

Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu  
130 135 140

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp  
145 150 155 160

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser  
165 170 175

Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe  
180 185 190

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn  
195 200 205

Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly  
210 215 220

## ES 2 877 548 T3

Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly  
 225 230 235 240

5 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly  
 245 250 255

10 Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala  
 260 265 270

15 Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala  
 275 280 285

20 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu  
 290 295 300

25 Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg  
 305 310 315 320

Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro  
 325 330 335

30 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn  
 340 345 350

Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 355 360

<210> 71  
 <211> 234  
 35 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> placulumab Cadena pesada de longitud completa  
 <400> 71

40 Arg Val Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 1 5 10 15

45 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 20 25 30

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 35 40 45

50 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 50 55 60

ES 2 877 548 T3

	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
65	70	75	80	
5	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
	85	90	95	
10	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
	100	105	110	
15	Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
	115	120	125	
	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu			
	130	135	140	
20	Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr			
	145	150	155	160
25	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn			
	165	170	175	
	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe			
	180	185	190	
30	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn			
	195	200	205	
35	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr			
	210	215	220	
40	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
	225	230		
<210>	72			
<211>	456			
<212>	PRT			
<213>	secuencia artificial			
<220>				
45	<223> golimumab Cadena pesada de longitud completa			
<400>	72			
	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg			
	1	5	10	15
50	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr			
	20	25	30	

ES 2 877 548 T3

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Phe Met Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Lys Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Asp Arg Gly Ile Ala Ala Gly Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly  
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser  
115 120 125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr  
130 135 140

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro  
145 150 155 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val  
165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser  
180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile  
195 200 205

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val  
210 215 220

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
225 230 235 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
245 250 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
260 265 270

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val  
275 280 285

ES 2 877 548 T3

	Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln			
	290	295	300	
5	Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln			
	305	310	315	320
10	Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala			
	325	330	335	
	Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro			
	340	345	350	
15	Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr			
	355	360	365	
20	Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser			
	370	375	380	
25	Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr			
	385	390	395	400
	Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr			
	405	410	415	
30	Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe			
	420	425	430	
35	Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys			
	435	440	445	
40	Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
	450	455		
<210>	73			
<211>	214			
<212>	PRT			
<213>	secuencia artificial			
<220>				
<223>	Adalimumab (D2E7) Cadena ligera de longitud completa			
<400>	73			
	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
	1	5	10	15
50	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr			
	20	25	30	

ES 2 877 548 T3

5	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile 35                                  40                                  45
10	Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly 50                                  55                                  60
15	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro 65                                  70                                  75                                  80
20	Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr 85                                  90                                  95
25	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala 100                                105                                  110
30	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly 115                                120                                  125
35	Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala 130                                135                                  140
40	Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln 145                                150                                  155                                  160
45	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser 165                                170                                  175
50	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr 180                                185                                  190
55	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser 195                                200                                  205
	Phe Asn Arg Gly Glu Cys 210
	<210> 74
	<211> 214
	<212> PRT
	<213> secuencia artificial
	<220>
	<223> infliximab Cadena ligera de longitud completa
	<400> 74
	Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly 1                                5    10                                  15
	Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Phe Val Gly Ser Ser

# ES 2 877 548 T3

	20	25	30
5	Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile 35	40	45
10	Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Met Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly 50	55	60
15	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Thr Val Glu Ser 65	70	75
20	Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His Ser Trp Pro Phe 85	90	95
25	Thr Phe Gly Ser Gly Thr Asn Leu Glu Val Lys Arg Thr Val Ala Ala 100	105	110
30	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly 115	120	125
35	Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala 130	135	140
40	Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln 145	150	155
45	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser 165	170	175
50	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr 180	185	190
55	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser 195	200	205
	Phe Asn Arg Gly Glu Cys 210		
	<210> 75		
	<211> 214		
	<212> PRT		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> certolizumab Cadena ligera de longitud completa		
	<400> 75		
	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly 1	5	10
			15

ES 2 877 548 T3

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn  
20 25 30

5 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile  
35 40 45

10 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

20 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu  
85 90 95

25 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

30 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

35 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

40 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

45 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190

50 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205

55 Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 76  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial  
<220>  
<223> afelimumab Cadena ligera de longitud completa  
<400> 76

# ES 2 877 548 T3

	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Thr Val Gly			
1	5	10	15	
5				
	Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ala Val Ser Ser Ala			
	20	25	30	
10				
	Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile			
	35	40	45	
15				
	Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly			
	50	55	60	
20				
	Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile His Asn Leu Gln Ala			
	65	70	75	80
25				
	Glu Asp Leu Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe			
	85	90	95	
30				
	Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala			
	100	105	110	
35				
	Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly			
	115	120	125	
40				
	Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile			
	130	135	140	
45				
	Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu			
	145	150	155	160
50				
	Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser			
	165	170	175	
55				
	Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr			
	180	185	190	
60				
	Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser			
	195	200	205	
	Phe Asn Arg Asn Glu Cys			
	210			
	<210> 77			
	<211> 108			
	<212> PRT			
	<213> secuencia artificial			
	<220>			
	<223> placulumab Cadena ligera de longitud completa			
	<400> 77			

ES 2 877 548 T3

	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15	
5				
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ala Ile Asp Ser Tyr			
	20	25	30	
10				
	Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
	35	40	45	
15				
	Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
	50	55	60	
	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Leu Pro			
	65	70	75	80
20				
	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Val Trp Arg Pro Phe			
	85	90	95	
25				
	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg			
	100	105		
	<210> 78			
	<211> 215			
	<212> PRT			
30	<213> secuencia artificial			
	<220>			
	<223> golimumab Cadena ligera de longitud completa			
	<400> 78			
35				
	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
	1	5	10	15
	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Tyr Ser Tyr			
	20	25	30	
40				
	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile			
	35	40	45	
45				
	Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly			
	50	55	60	
50				
	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro			
	65	70	75	80
	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro			

# ES 2 877 548 T3

	85	90	95	
5	Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala 100		105	110
10	Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser 115	120		125
15	Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu 130	135		140
20	Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser 145	150	155	160
25	Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu 165	170		175
30	Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val 180	185		190
35	Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys 195	200		205
40	Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys 210	215		
45	<210> 79 <211> 467 <212> PRT <213> secuencia artificial <220> <223> etanercept <400> 79			
50	Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser 1	5	10	15
55	Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys 20	25		30
	Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr 35	40	45	
	Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu 50	55	60	
	Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser 65	70	75	80

ES 2 877 548 T3

Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys  
85 90 95

Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys  
100 105 110

Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala  
115 120 125

Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro  
130 135 140

Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His  
145 150 155 160

Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala  
165 170 175

Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val  
180 185 190

His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr  
195 200 205

Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly  
210 215 220

Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp Glu Pro Lys Ser Cys  
225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

ES 2 877 548 T3

	325	330	335
5	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile 340	345	350
10	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val 355	360	365
15	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser 370	375	380
20	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu 385	390	395
25	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro 405	410	415
30	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val 420	425	430
35	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met 435	440	445
40	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser 450	455	460
45	Pro Gly Lys 465		
	<210> 80		
	<211> 587		
	<212> PRT		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> ABT-122 Cadena pesada		
	<400> 80		
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg 1	5	10
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr 20	25	30
	Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 35	40	45
	Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val 50	55	60

ES 2 877 548 T3

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
115 120 125

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
130 135 140

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Ser Phe  
145 150 155 160

Gly Gly Tyr Gly Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
165 170 175

Glu Trp Met Gly Gly Ile Thr Pro Phe Phe Gly Phe Ala Asp Tyr Ala  
180 185 190

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Thr  
195 200 205

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Gly Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val  
210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Asn Glu Phe Trp Asn Gly Tyr Tyr Ser  
225 230 235 240

Thr His Asp Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser  
245 250 255

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser  
260 265 270

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp  
275 280 285

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr  
290 295 300

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr

## ES 2 877 548 T3

	305	310	315	320
5	Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln 325 330 335			
10	Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp 340 345 350			
15	Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro 355 360 365			
20	Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro 370 375 380			
25	Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr 385 390 395 400			
30	Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn 405 410 415			
35	Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg 420 425 430			
40	Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val 435 440 445			
45	Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser 450 455 460			
50	Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys 465 470 475 480			
55	Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp 485 490 495			
60	Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe 500 505 510			
65	Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu <210> 81 <211> 331 <212> PRT <213> Secuencia Artificial	515	520	525
	Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe 530 535 540			
	Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly 545 550 555 560			
	Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr 565 570 575			
	Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 580 585			

## ES 2 877 548 T3

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ABT-122 Cadena Ligera

&lt;400&gt; 81

5	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly 1                   5                   10                   15
10	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr 20                   25                   30
15	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile 35                   40                   45
20	Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly 50                   55                   60
25	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro 65                   70                   75                   80
30	Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr 85                   90                   95
35	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Gly Gly Ser Gly 100                105                110
40	Gly Gly Gly Ser Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln 115                120                125
45	Ser Val Thr Pro Lys Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln 130                135                140
	Asp Ile Gly Ser Glu Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Pro 145                150                155                160
	Pro Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser His Ser Thr Ser Gly Val Pro 165                170                175
	Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

# ES 2 877 548 T3

	180	185	190
5	Asn Gly Leu Glu Ala Glu Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys His Gln Thr 195                    200                    205		
10	Asp Ser Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys 210                    215                    220		
15	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu 225                    230                    235                    240		
20	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe 245                    250                    255		
25	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln 260                    265                    270		
30	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser 275                    280                    285		
35	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu 290                    295                    300		
40	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser 305                    310                    315                    320		
45	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys 325                    330		
50	<210> 82 <211> 235 <212> PRT <213> Secuencia Artificial <220> <223> Certolizumab Cadena pesada <400> 82		
55	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly 1                        5                        10                        15		
60	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Asp Tyr 20                      25                      30		
65	Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met 35                      40                      45		
70	Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Ile Tyr Ala Asp Ser Val 50                      55                      60		

## ES 2 877 548 T3

5                   Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr  
        65                                      70                              75                              80  
  
 10                  Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
        85                                      90    95  
  
 15                  Ala Arg Gly Tyr Arg Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
        100                                      105                                      110  
  
 20                  Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
        115                                      120                                      125  
  
 25                  Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly  
        130                                      135                                      140  
  
 30                  Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
        145                                      150                                      155                              160  
  
 35                  Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
        165                                      170                                      175  
  
 40                  Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
        180                                      185                                      190  
  
 45                  Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
        195                                      200                                      205  
  
 50                  Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
        210                                      215                                      220  
  
 55                  His Thr Cys Ala Ala His His His His His His  
        225                                      230                                      235  
        <210> 83  
        <211> 214  
        <212> PRT  
        <213> Secuencia Artificial  
        <220>  
        <223> Certolizumab Cadena Ligera  
        <400> 83  
  
 50                  Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
        1                                      5                                      10                              15  
  
 55                  Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn  
        20                                      25                                      30

ES 2 877 548 T3

5	Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile 35 40 45
10	Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly 50 55 60
15	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro 65 70 75 80
20	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu 85 90 95
25	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala 100 105 110
30	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly 115 120 125
35	Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala 130 135 140
40	Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln 145 150 155 160
45	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser 165 170 175
50	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr 180 185 190
55	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser 195 200 205
60	Phe Asn Arg Gly Glu Cys 210
65	<210> 84
70	<211> 238
75	<212> PRT
80	<213> Secuencia Artificial
85	<220>
90	<223> Adalimumab Fab Cadena pesada
95	<400> 84
100	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg 1 5 10 15

ES 2 877 548 T3

	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr		
20	25	30	
5			
	Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45	
10			
	Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val		
50	55	60	
15			
	Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr		
65	70	75	80
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95	
20			
	Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly		
100	105	110	
25			
	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser		
115	120	125	
30			
	Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala		
130	135	140	
	Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val		
145	150	155	160
35			
	Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala		
165	170	175	
40			
	Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val		
180	185	190	
	Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His		
195	200	205	
45			
	Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys		
210	215	220	
50			
	Asp Lys Thr His Thr Cys Ala Ala His His His His His His		
225	230	235	
	<210> 85 <211> 214 <212> PRT 55 <213> Secuencia Artificial <220> <223> Adalimumab Fab Cadena Ligera <400> 85		
60			

# ES 2 877 548 T3

	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15	
5				
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr			
	20	25	30	
10	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
	35	40	45	
15	Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
	50	55	60	
	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
	65	70	75	80
20	Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr			
	85	90	95	
25	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala			
	100	105	110	
30	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly			
	115	120	125	
	Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala			
	130	135	140	
35	Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln			
	145	150	155	160
40	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser			
	165	170	175	
	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr			
	180	185	190	
45	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser			
	195	200	205	
50	Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
	210			
	<210> 86			
	<211> 60			
	<212> PRT			
55	<213> Secuencia Artificial			
	<220>			
	<223> Afficuerpo			
	<400> 86			
60				

## ES 2 877 548 T3

	Gly Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Asn Ile Ala Ala Met Thr Glu
	1 5 10 15
5	Ile Thr Arg Leu Pro Asn Leu Asn Pro Tyr Gln Arg Ala Ala Phe Ile
	20 25 30
10	Trp Ser Leu Ser Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu
	35 40 45
	Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Cys
	50 55 60
15	<210> 87
	<211> 382
	<212> PRT
	<213> Afficuerpo
	<220>
20	<223> Ozoralizumab Nanocuerpo
	<400> 87
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
	1 5 10 15
25	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
	20 25 30
30	Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
	35 40 45
	Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val
	50 55 60
35	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
	65 70 75 80
40	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
	85 90 95
45	Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
	100 105 110
	Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
	115 120 125

# ES 2 877 548 T3

Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu  
 130 135 140  
 5  
 Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp  
 145 150 155 160  
 10  
 Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser  
 165 170 175  
 15  
 Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe  
 180 185 190  
 Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn  
 195 200 205  
 20  
 Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly  
 210 215 220  
 25  
 Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly  
 225 230 235 240  
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly  
 245 250 255  
 30  
 Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala  
 260 265 270  
 35  
 Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala  
 275 280 285  
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu  
 290 295 300  
 40  
 Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg  
 305 310 315 320  
 45  
 Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro  
 325 330 335  
 50  
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn  
 340 345 350  
 Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Glu Gln Lys  
 355 360 365  
 55  
 Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Cys His His His His His His  
 370 375 380  
 <210> 88  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> placulumab VH-CDR1  
 <400> 88  
 65

	Arg Ala Ser Gln Ala Ile Asp Ser Tyr Leu His
	1   5   10
5	<210> 89 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia Artificial <220>
10	<223> placulumab VH-CDR2 <400> 89 Ser Ala Ser Asn Leu Glu Thr
15	1   5 <210> 90 <211> 9 <212> PRT <213> Secuencia Artificial <220>
20	<223> placulumab VH-CDR3 <400> 90 Gln Gln Val Val Trp Arg Pro Phe Thr
25	1   5 <210> 91 <211> 120 <212> PRT <213> Secuencia Artificial <220>
30	<223> infliximab VH <400> 91 Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
35	1   5   10   15
40	Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn His Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
45	20   25   30 35   40   45 Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ser Ile Asn Ser Ala Thr His Tyr Ala Glu
50	50   55   60 65   70   75   80 Val Tyr Leu Gln Met Thr Asp Leu Arg Thr Glu Asp Thr Gly Val Tyr
55	85   90   95 Tyr Cys Ser Arg Asn Tyr Tyr Gly Ser Thr Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
60	100   105   110 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser <210> 92 <211> 113 <212> PRT <213> Secuencia Artificial <220> <223> nerelimomab VL <400> 92
65	115   120

ES 2 877 548 T3

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

5 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser  
20 25 30

10 Asn Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
35 40 45

15 Ala Pro Lys Leu Leu Ile Ser Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
50 55 60

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

25 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln  
85 90 95

30 Tyr Tyr Asp Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
100 105 110

35 Lys  
<210> 93  
<211> 233  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> placulumab Cadena pesada de longitud completa  
<400> 93

## ES 2 877 548 T3

	Val Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro	
1	5	10
5		15
	Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys	
	20	25
10	30	
	Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val	
	35	40
15	45	
	Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr	
	50	55
20	60	
	Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu	
	65	70
25	75	80
20	Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His	
	85	90
30	95	
	Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys	
	100	105
35	110	
	Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln	
	115	120
30	125	
	Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu	
	130	135
40	140	
35	Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro	
	145	150
45	155	160
	Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn	
	165	170
40	175	
	Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu	
	180	185
45	190	
	Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val	
	195	200
50	205	
	Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln	
	210	215
55	220	
	Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
	225	230
55	<210> 94	
	<211> 12	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
60	<223> adalimumab VH-CDR3	
	<400> 94	
	Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr	
	1	5
60	10	

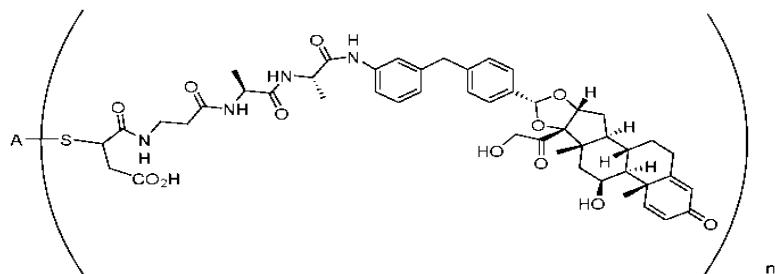
## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto:

5

10

15



en donde n es 2 o 4, y A es un anticuerpo que comprende SEQ ID NO: 66 y SEQ ID NO: 73 o adalimumab.

- 20 2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde n es 4.

3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde n es 2.

4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde A es adalimumab.

25

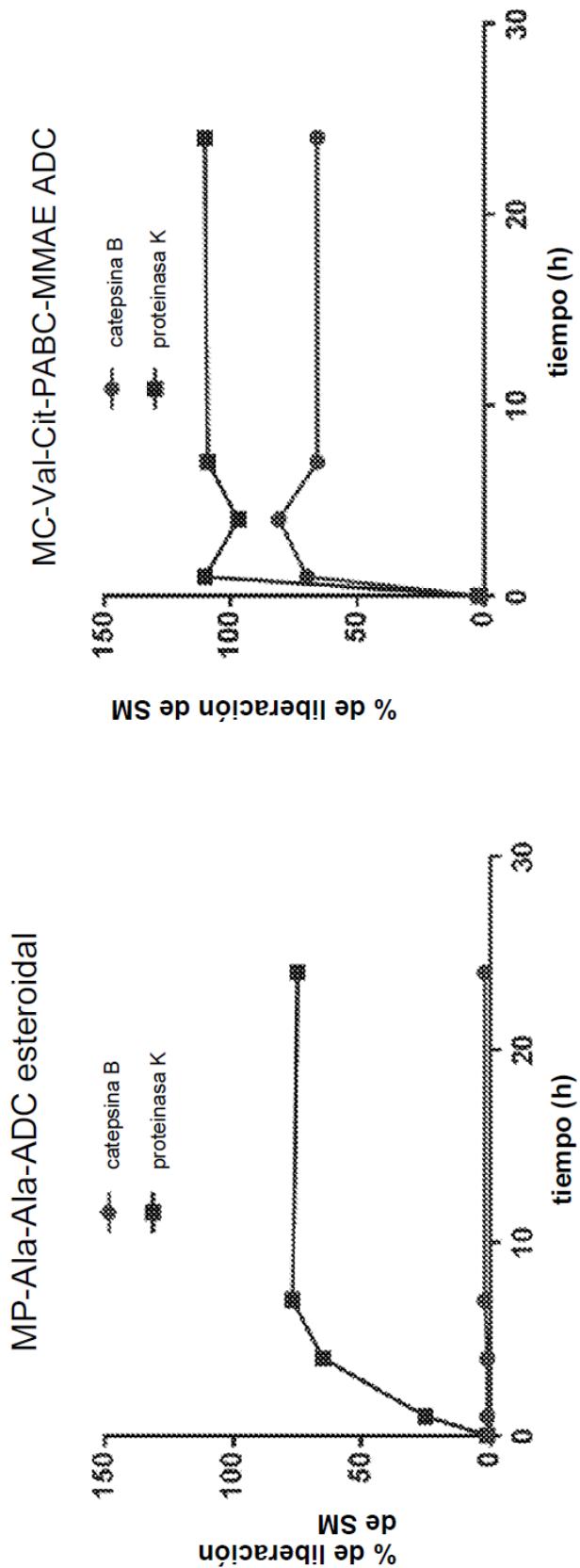


Figura 1

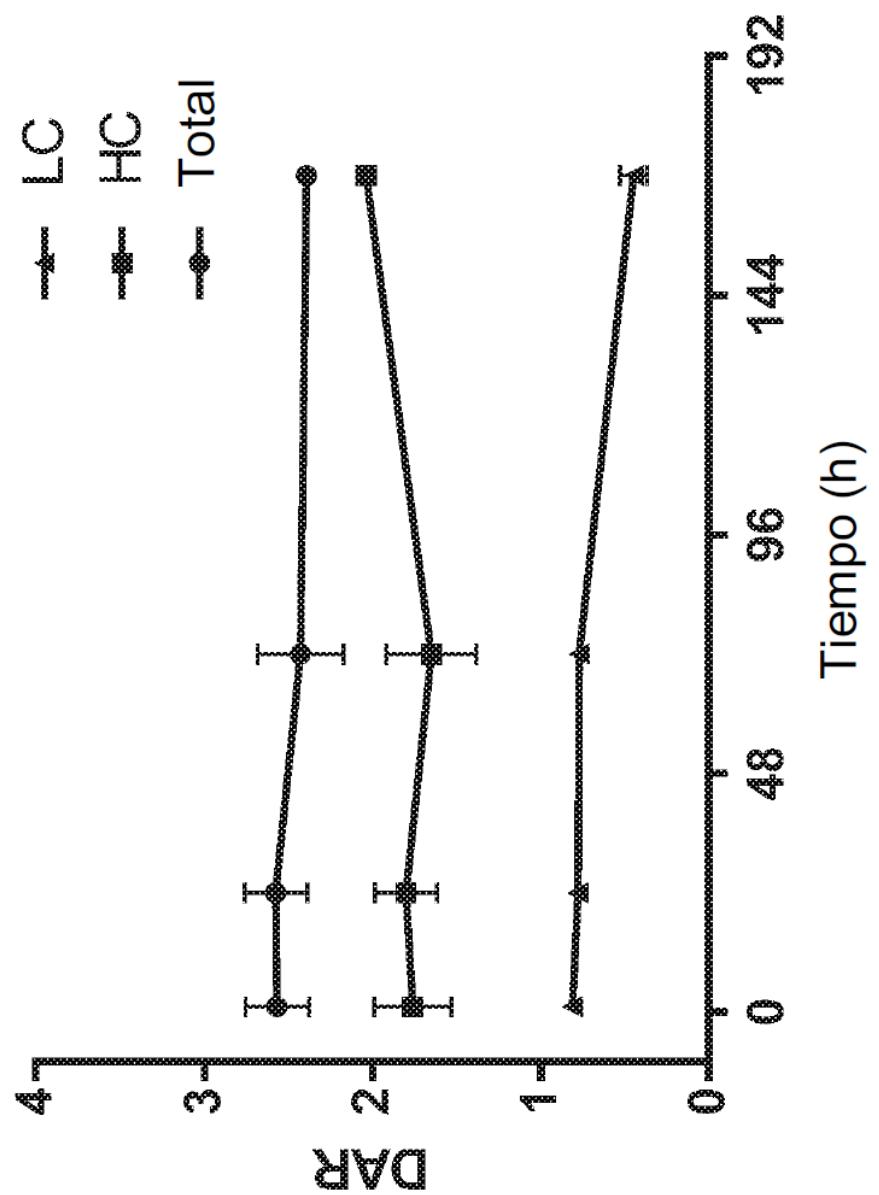
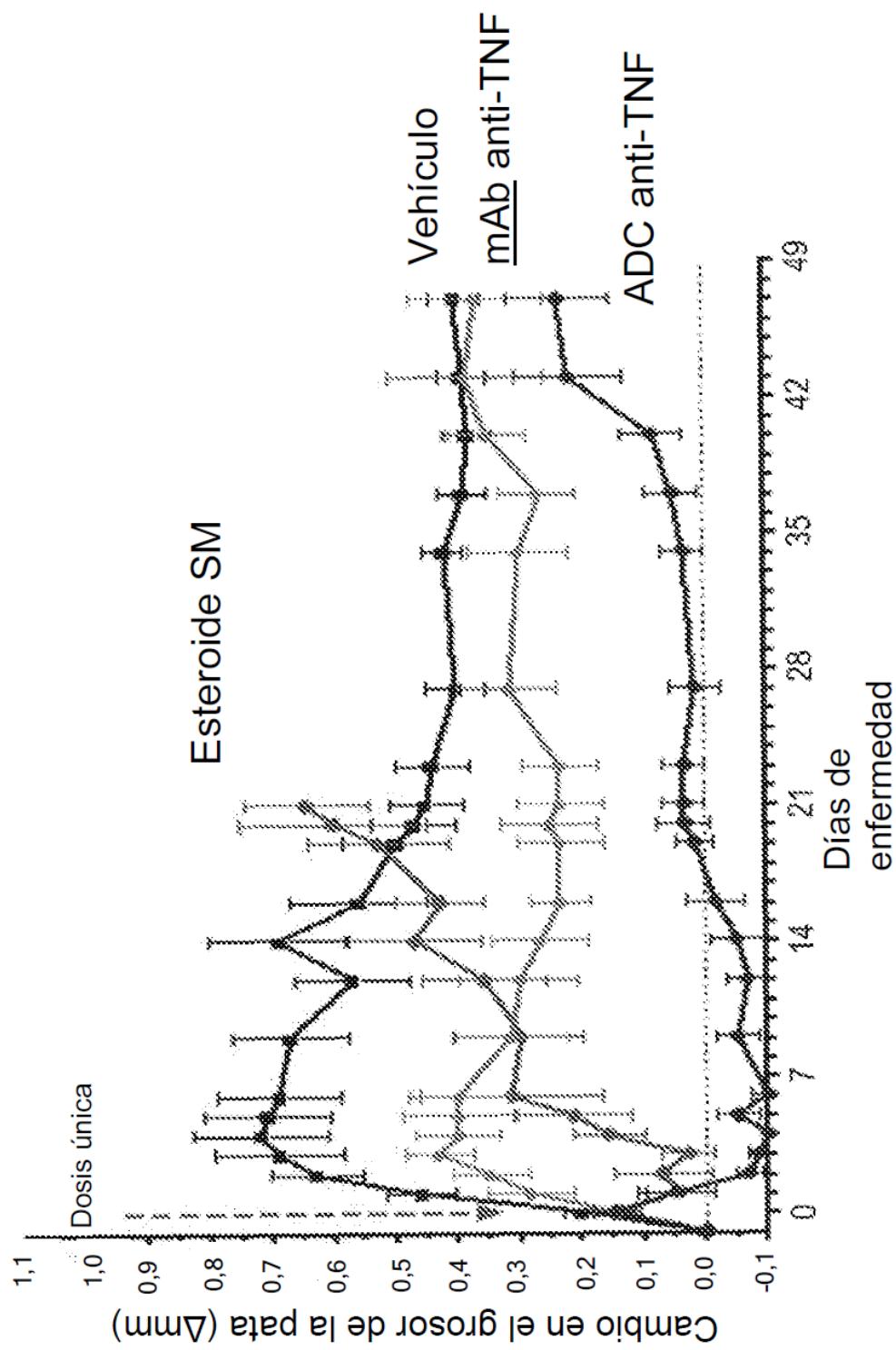
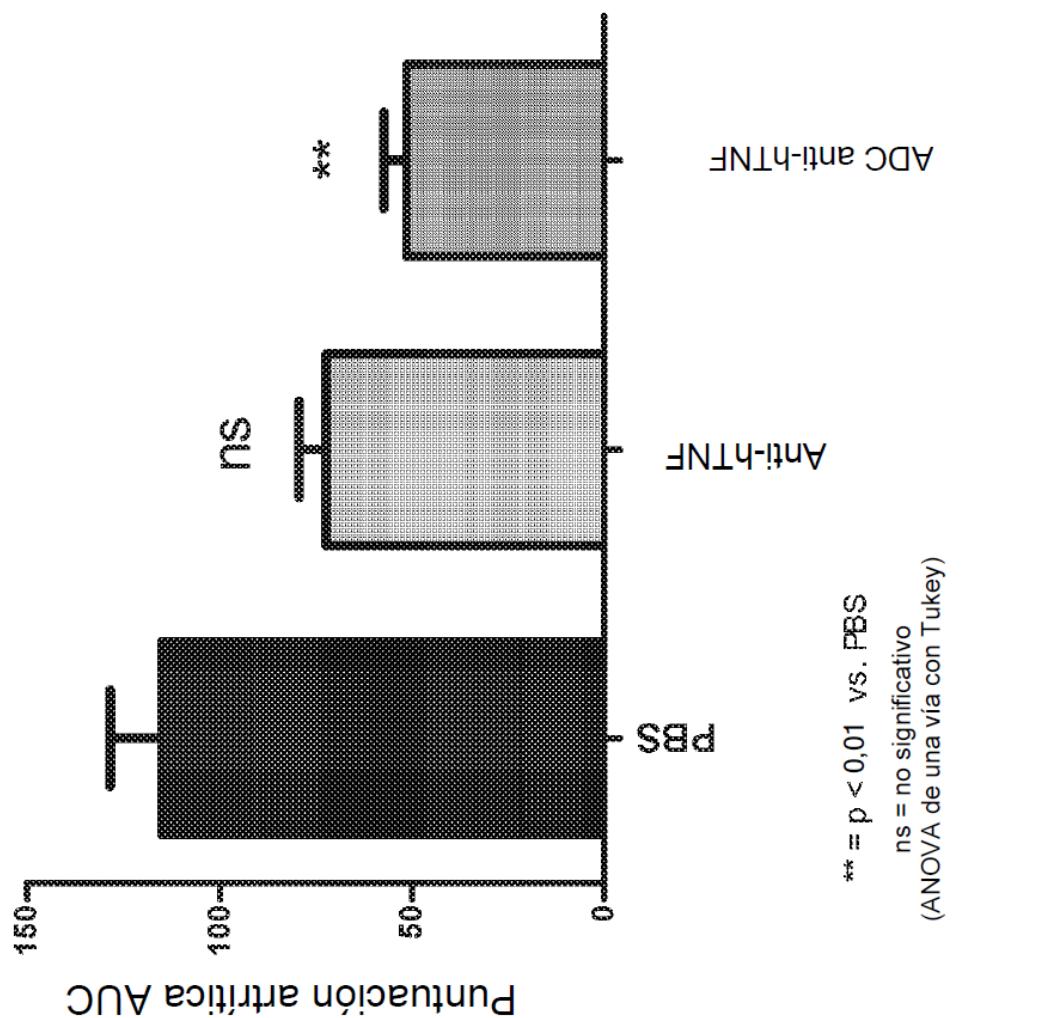


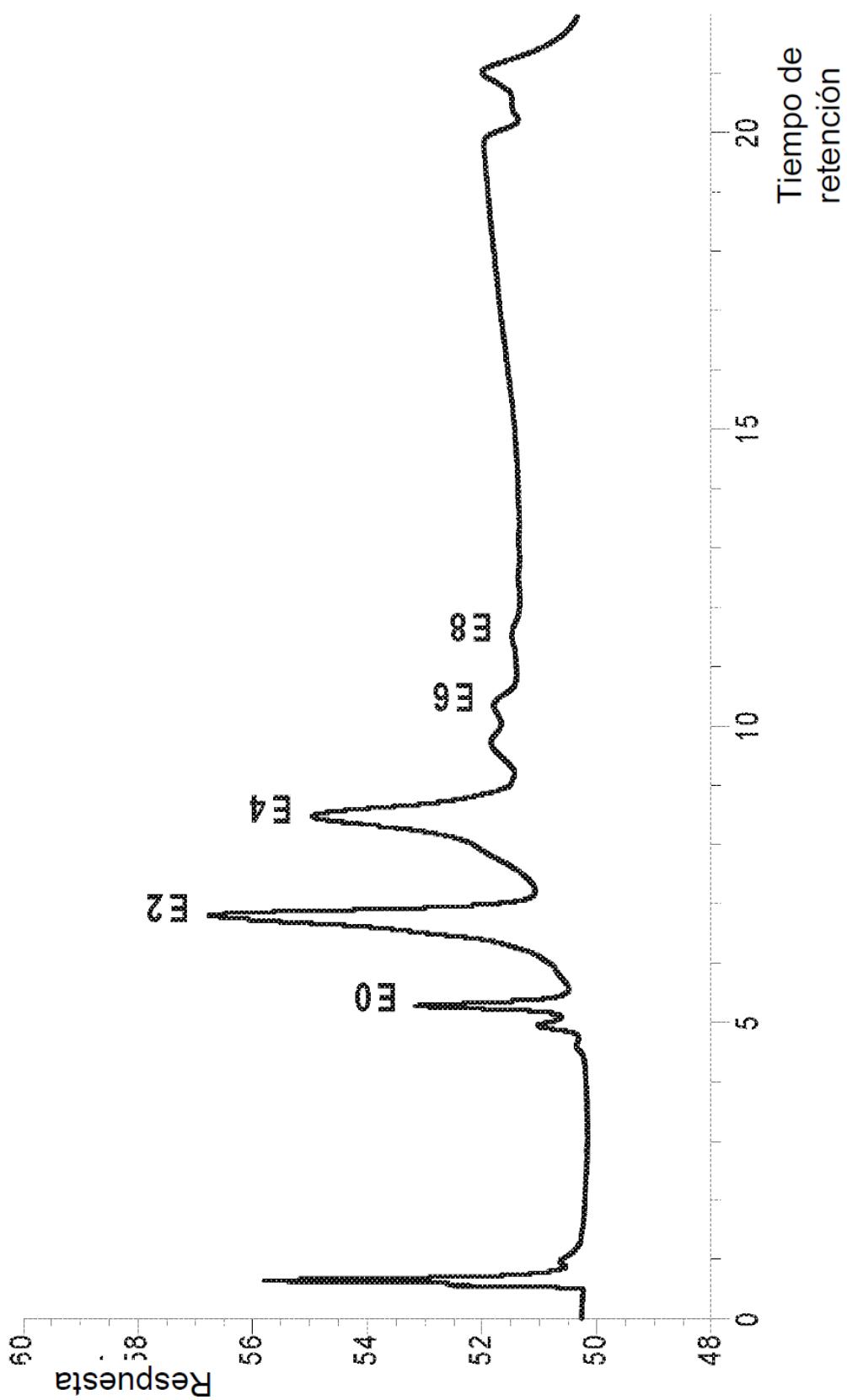
Figura 2

**Figura 3**

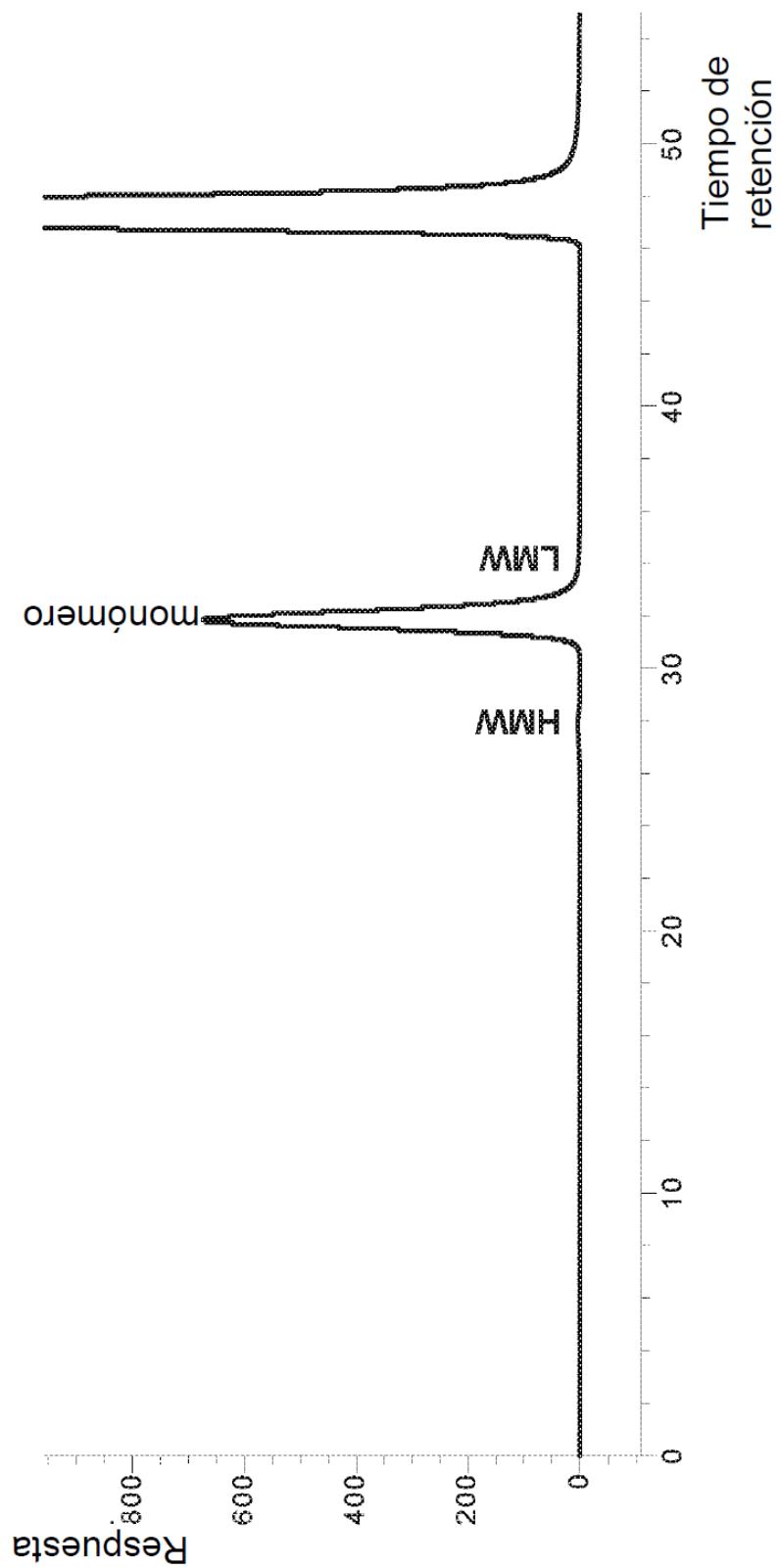


\*\* =  $p < 0,01$  vs. PBS  
ns = no significativo  
(ANOVA de una vía con Tukey)

**Figura 4**



**Figura 5**



**Figura 6**

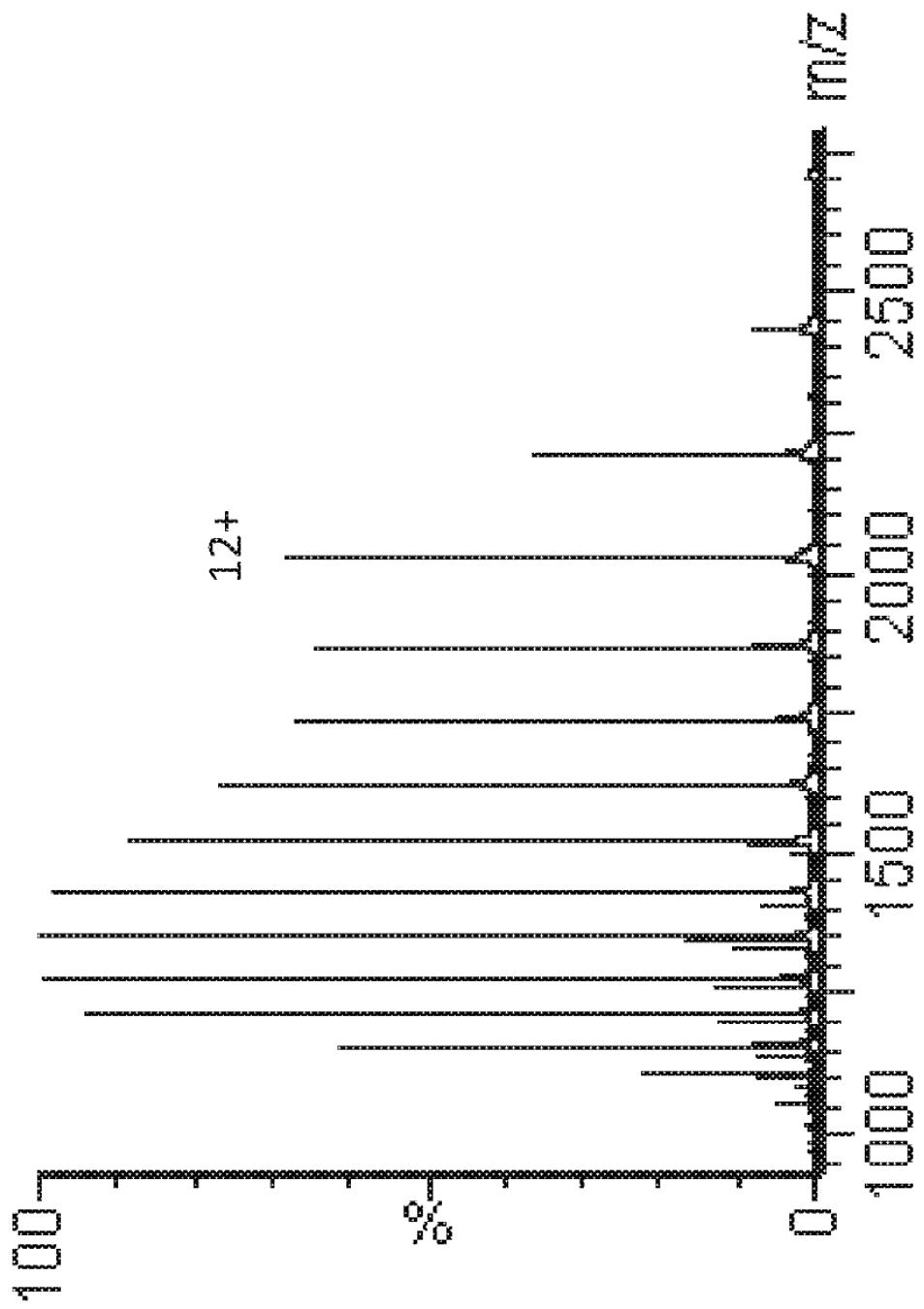
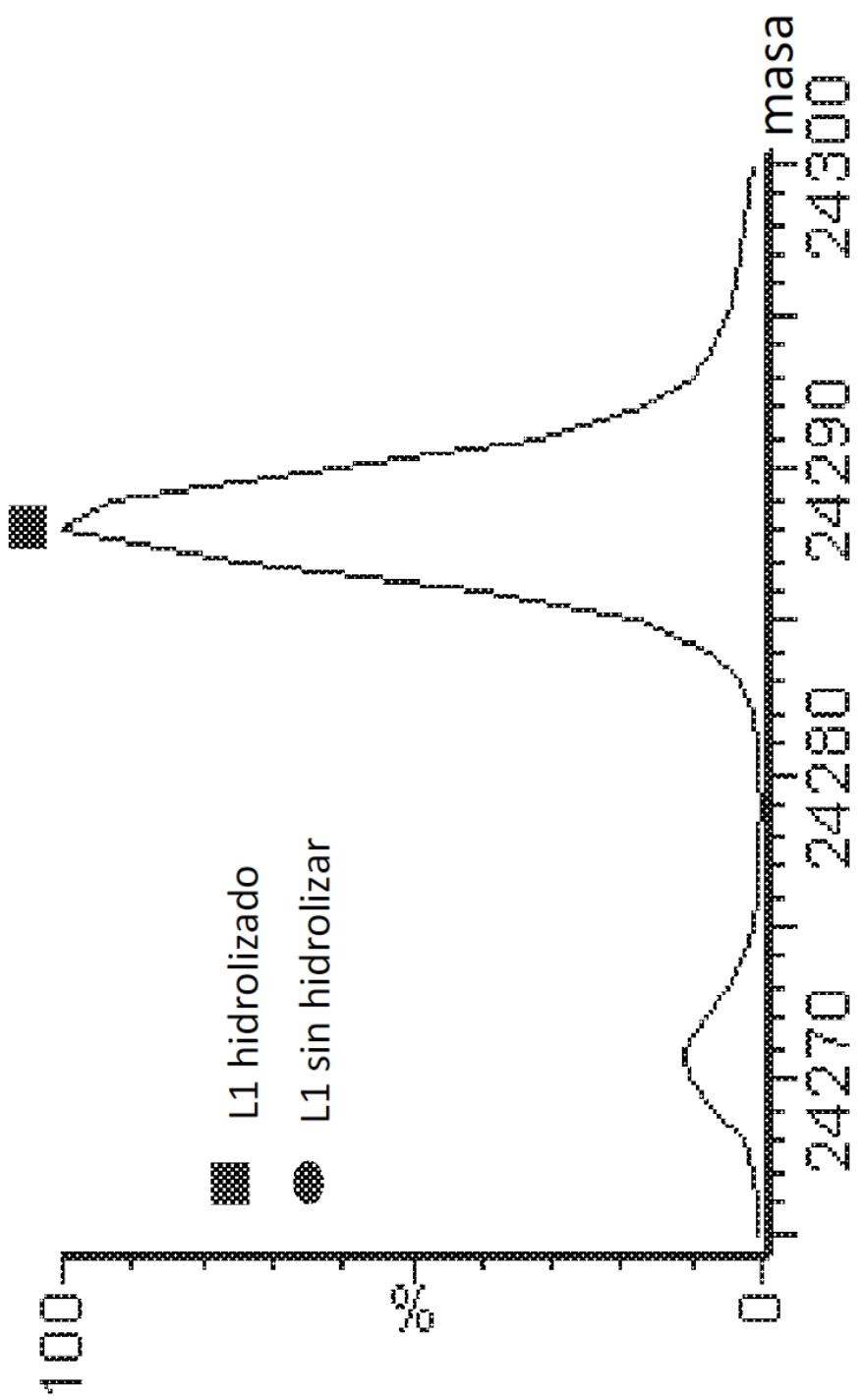
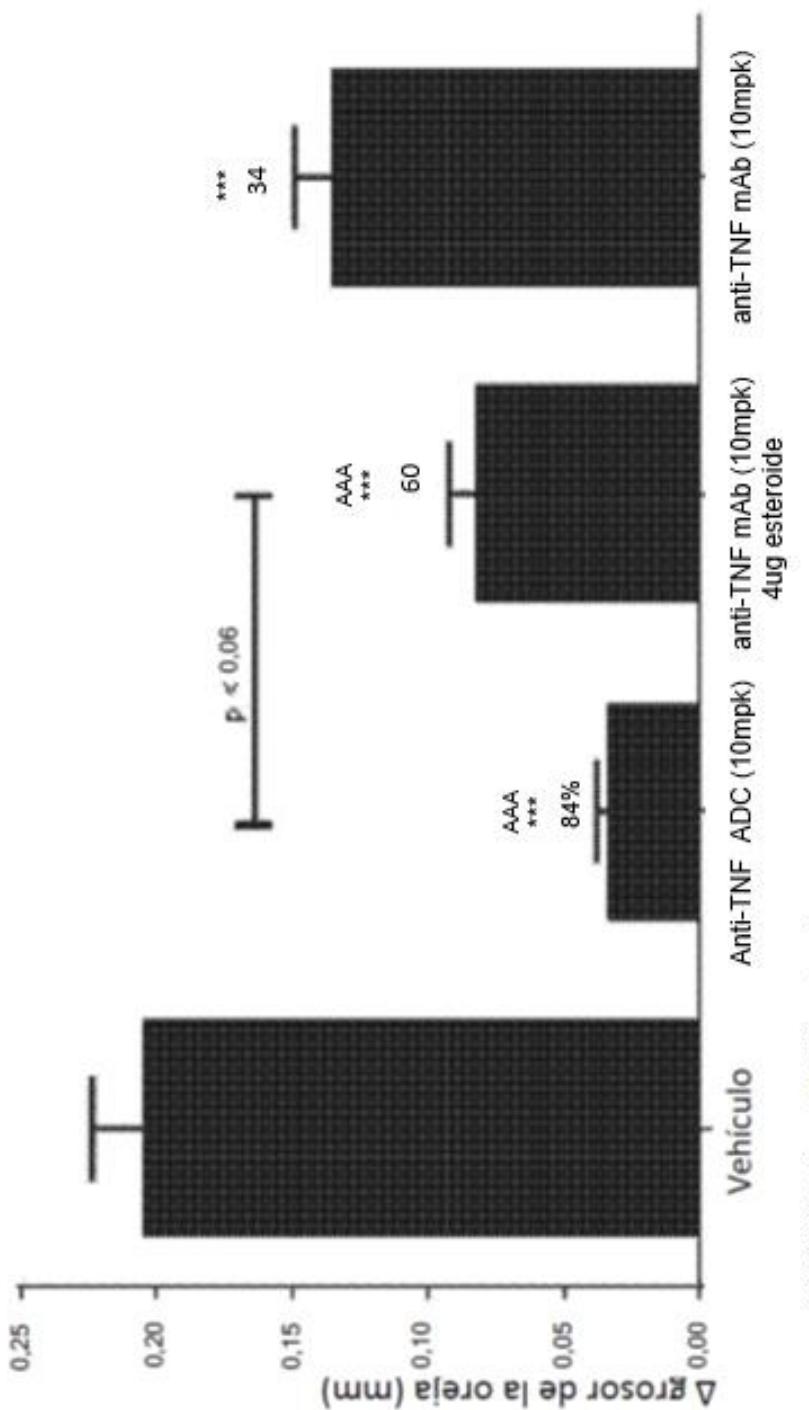


Figura 7



**Figura 8**

**Figura 9**

O: ANOVA 1 vía w a Q: %Btts post prueba  
 \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs %  
 \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs SC 11 solo

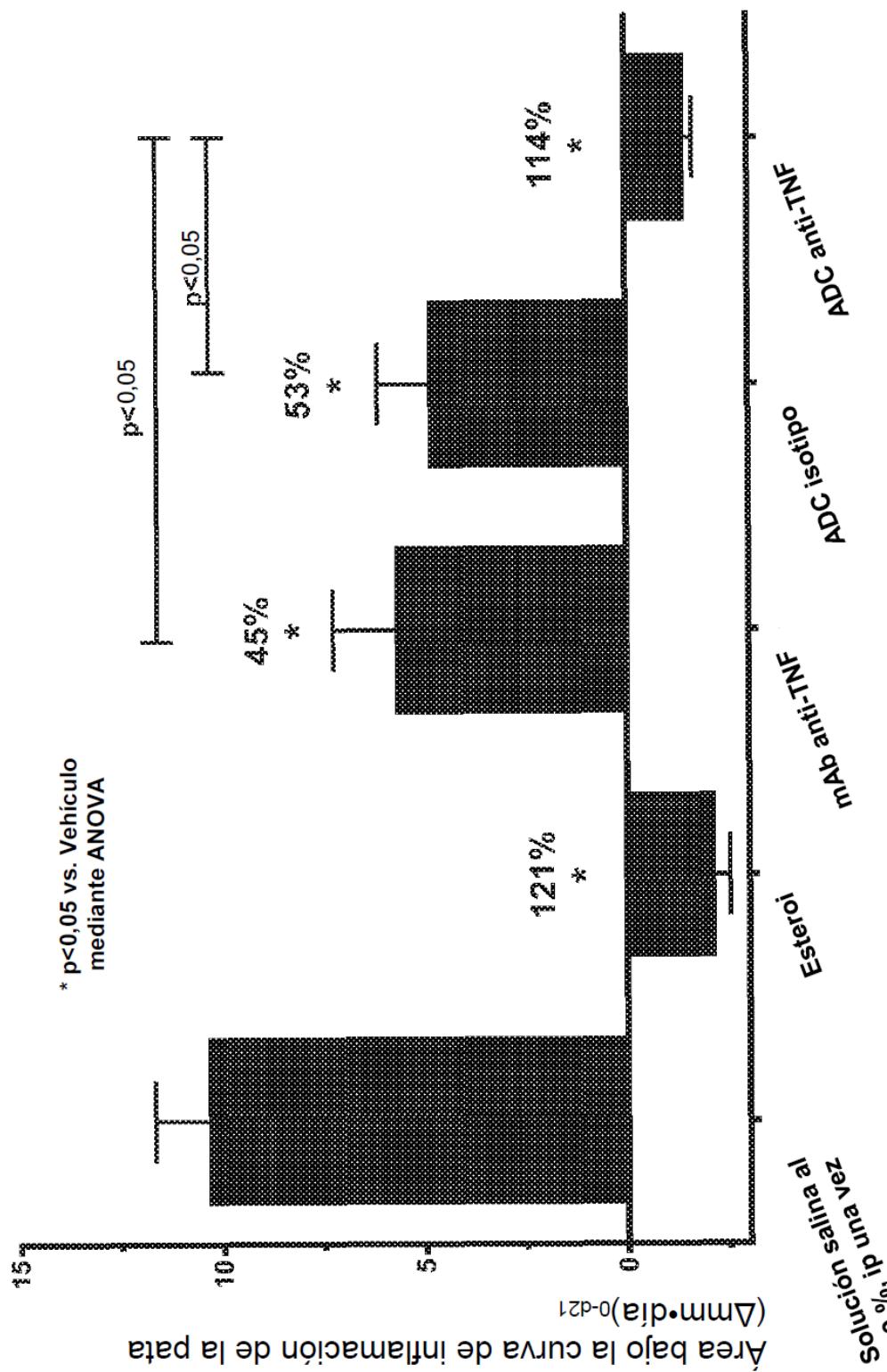
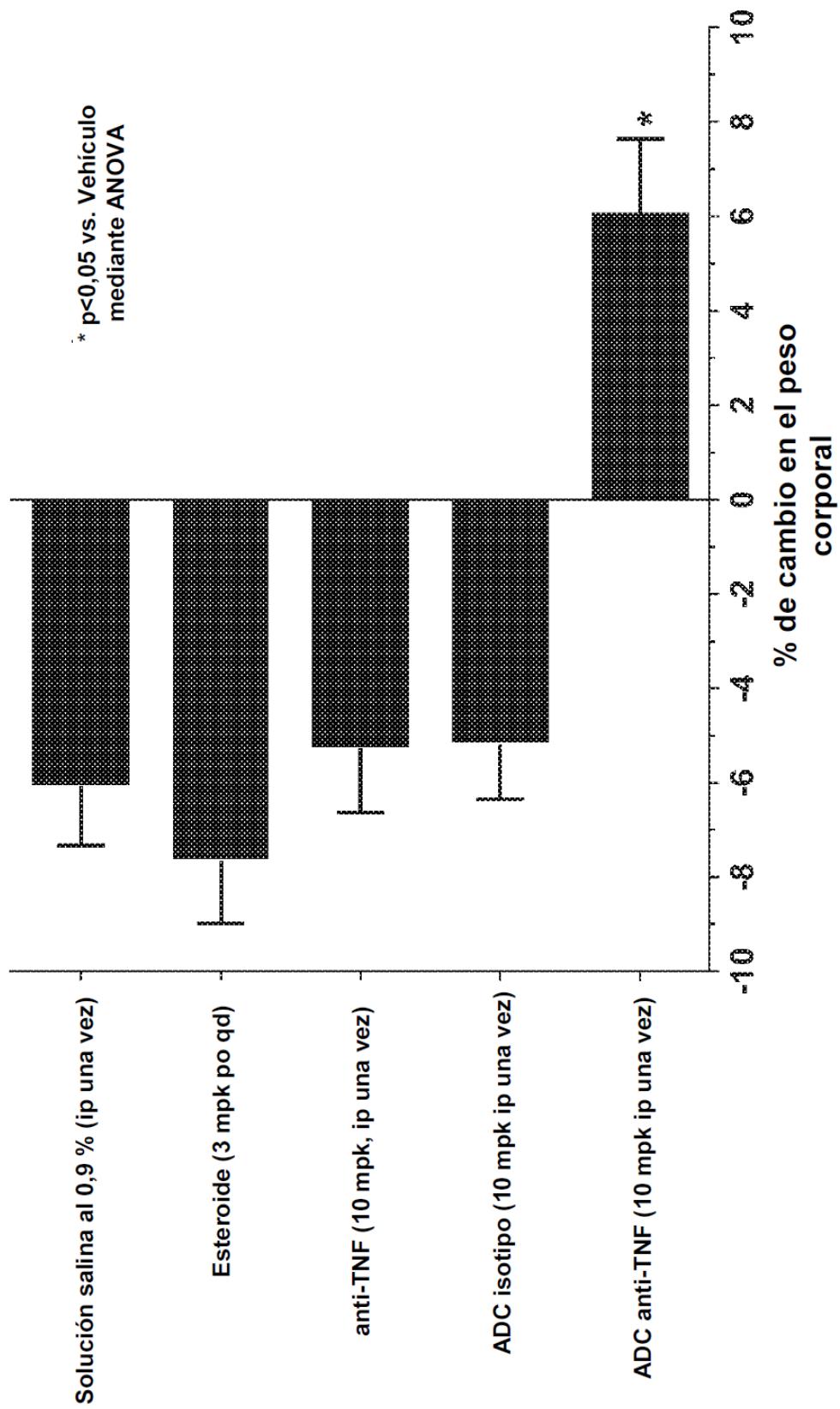
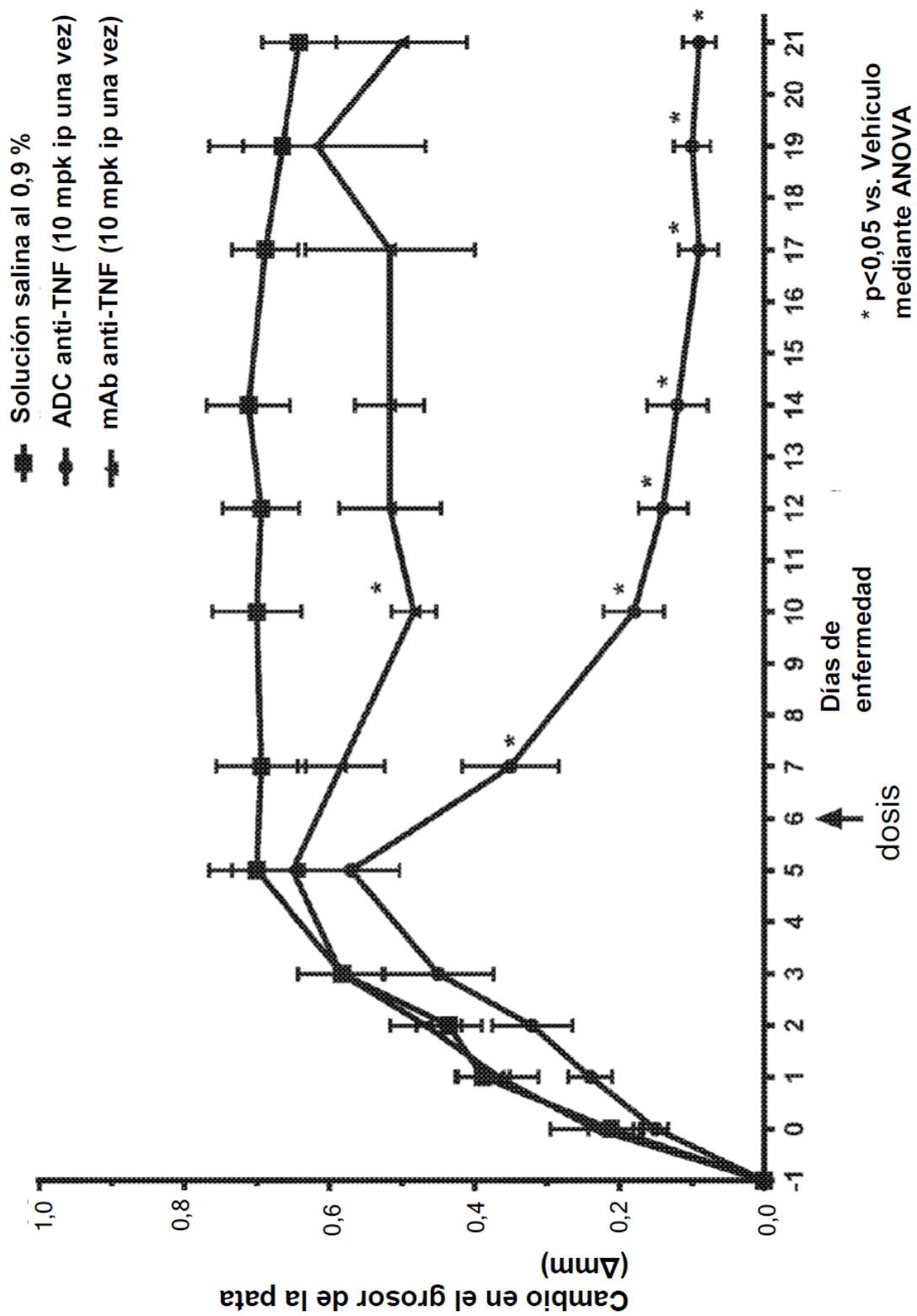
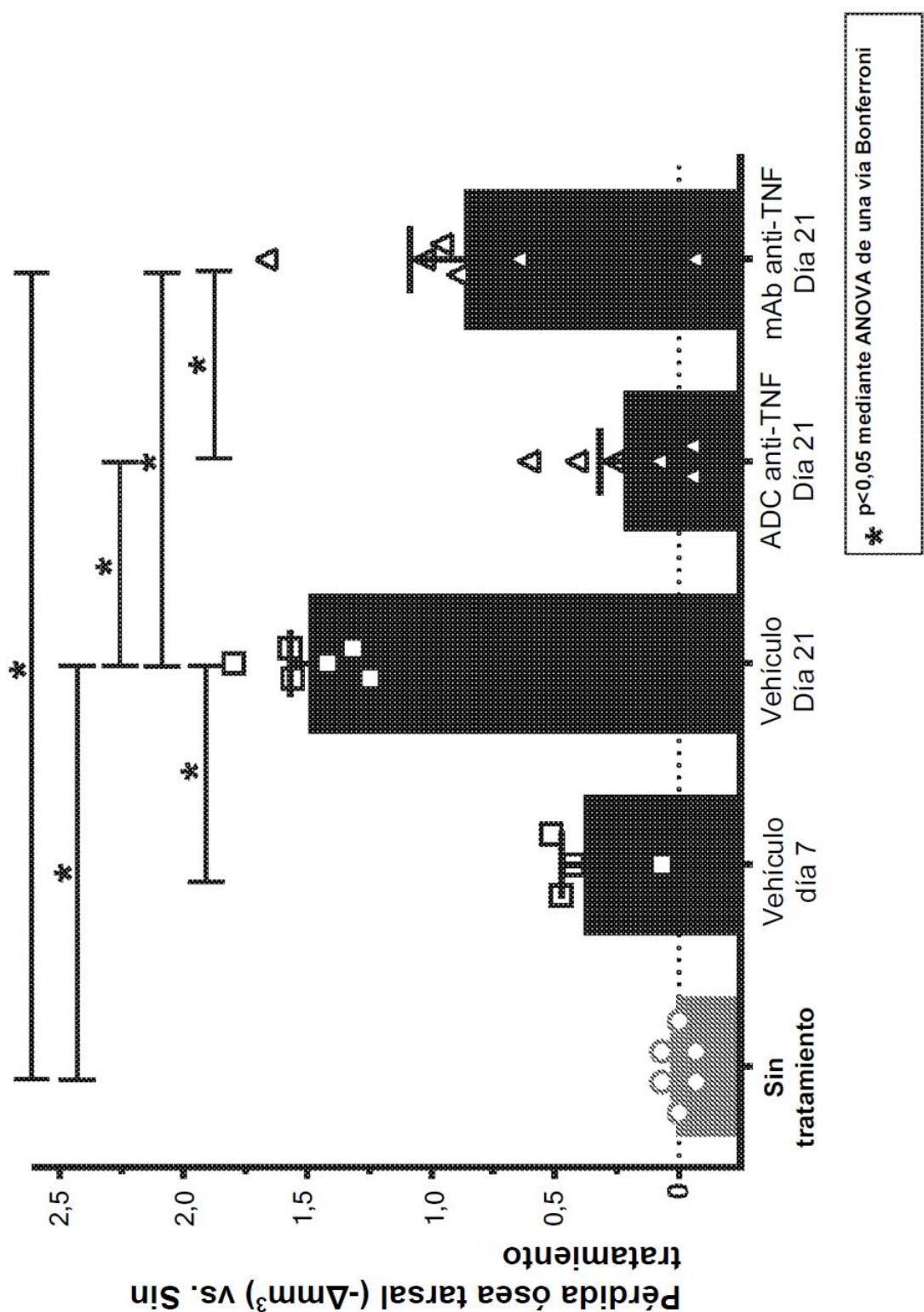


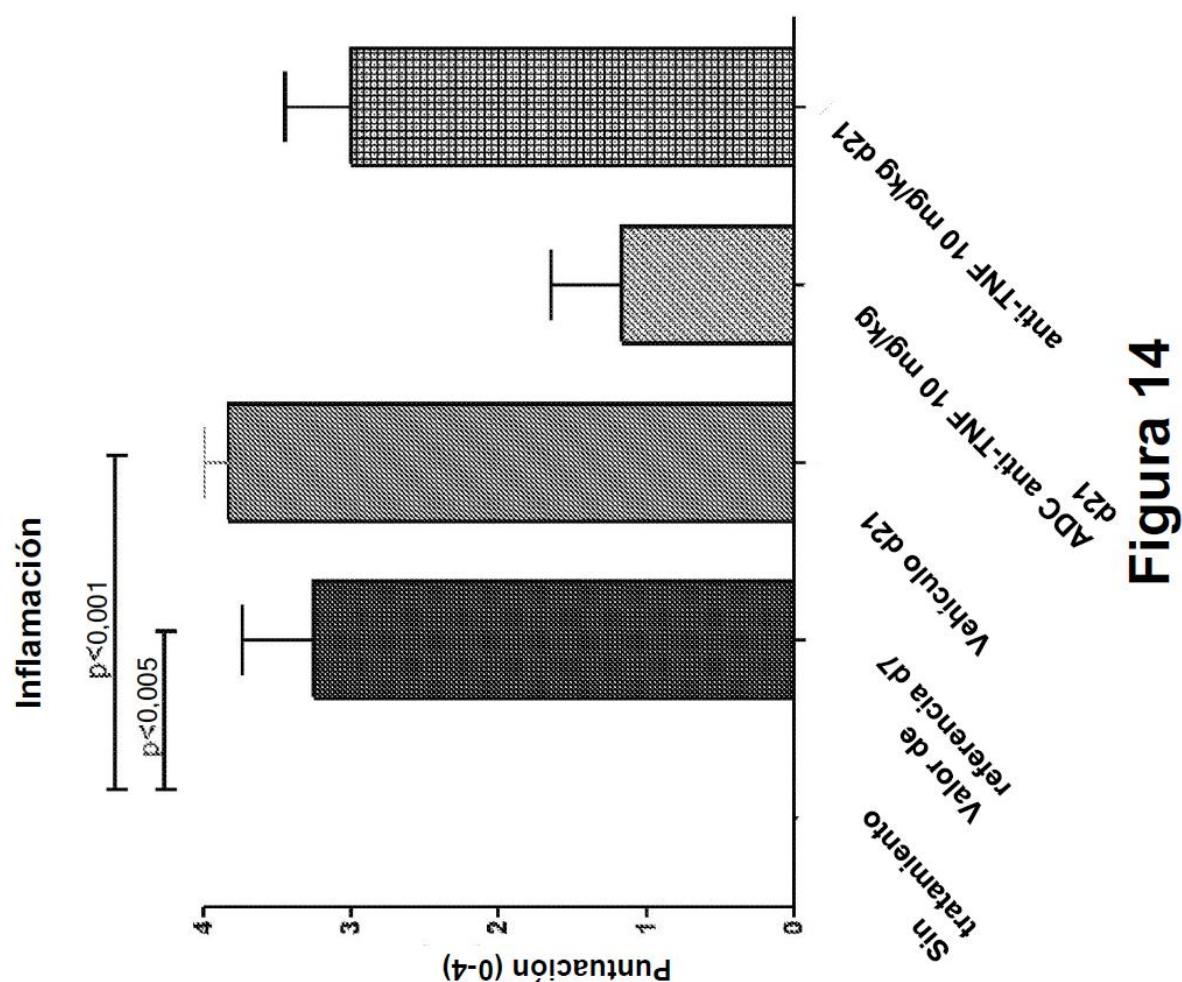
Figura 10

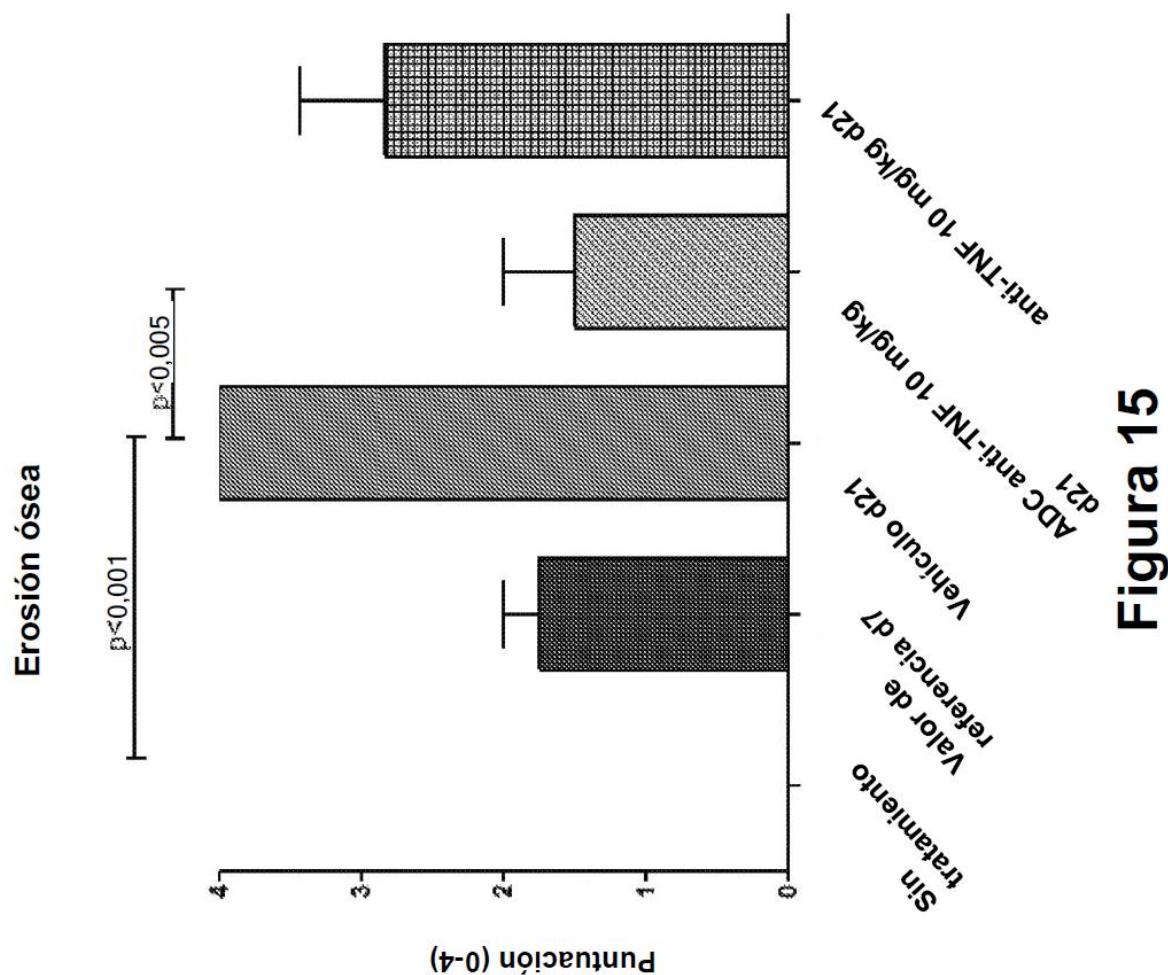


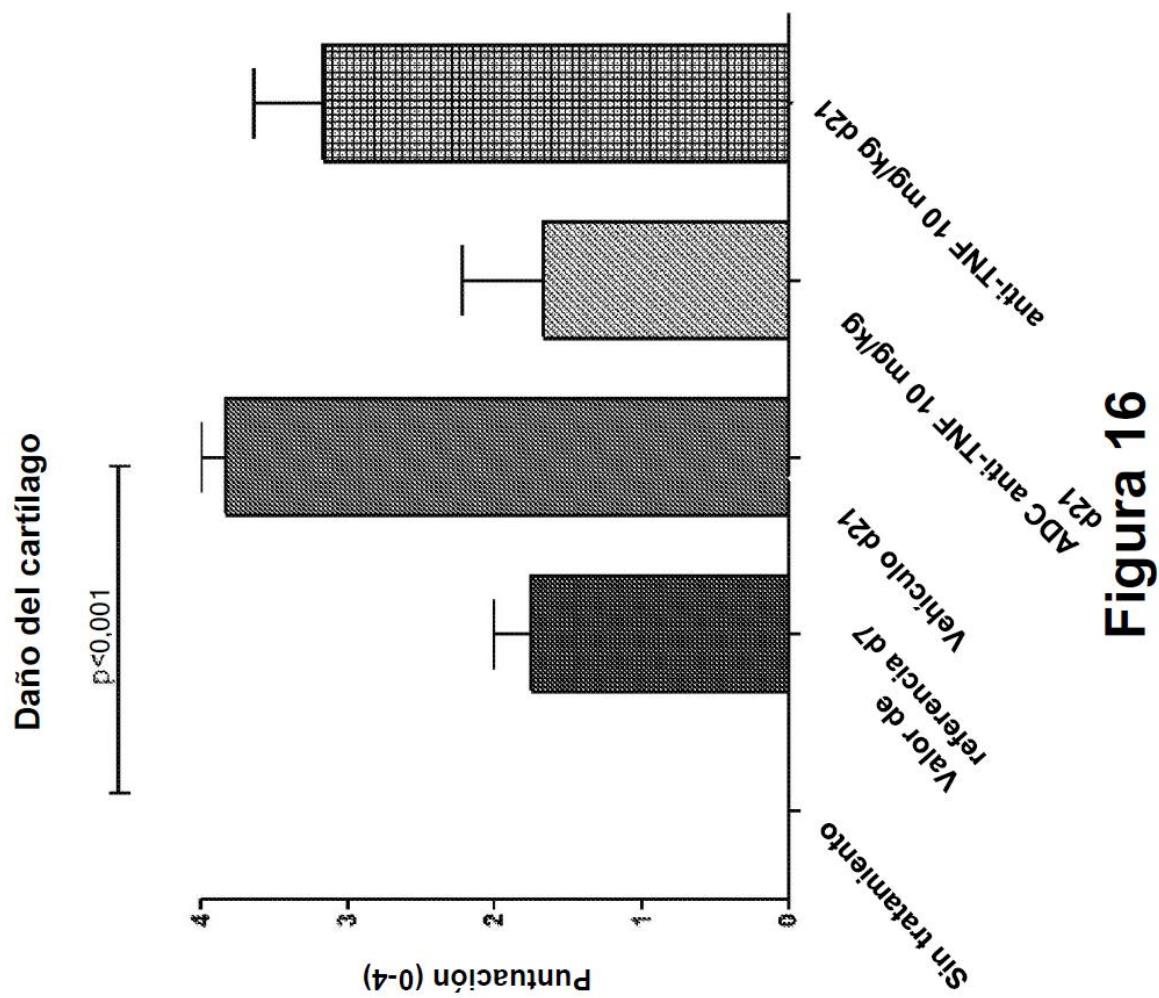
**Figura 11**

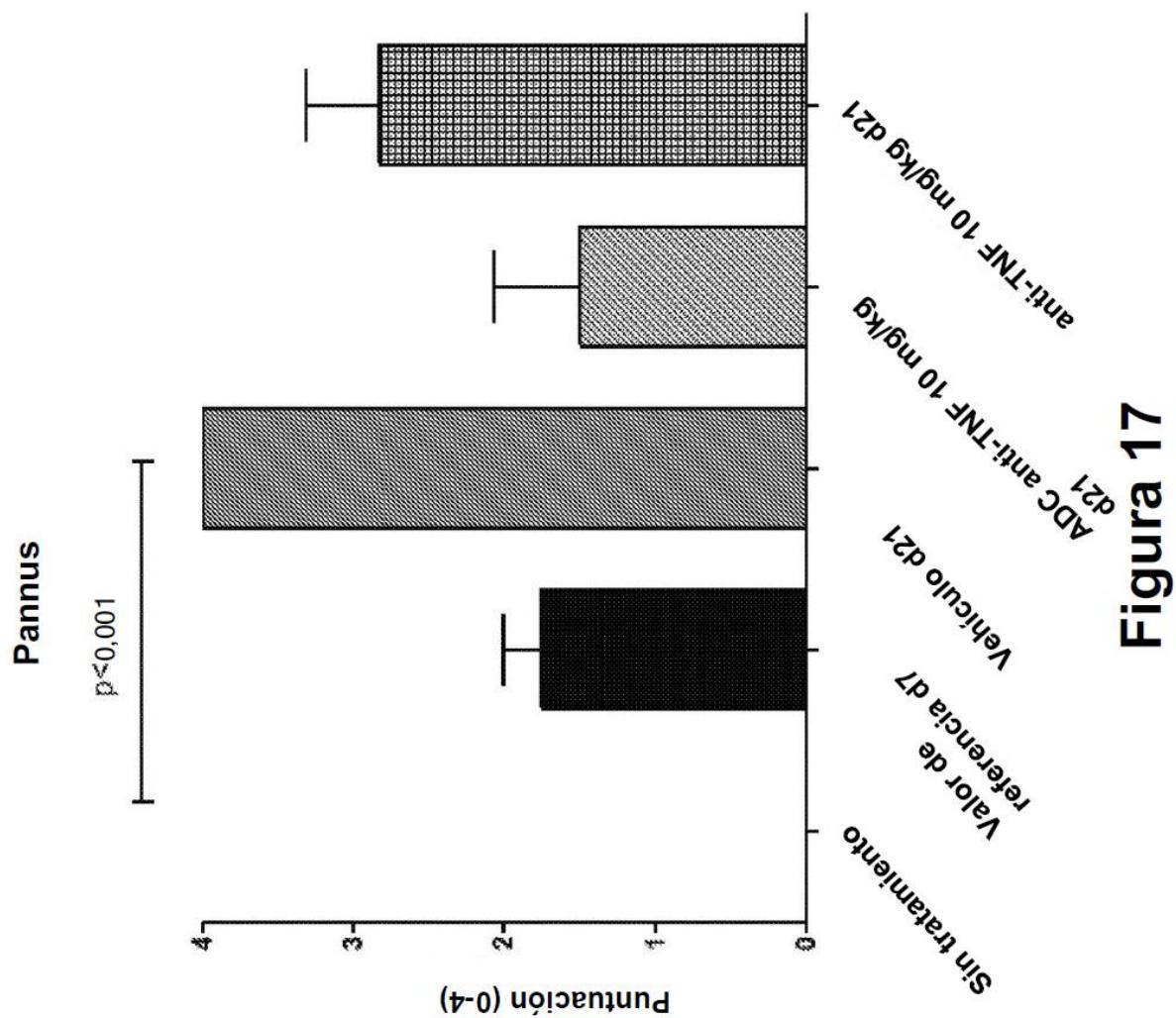


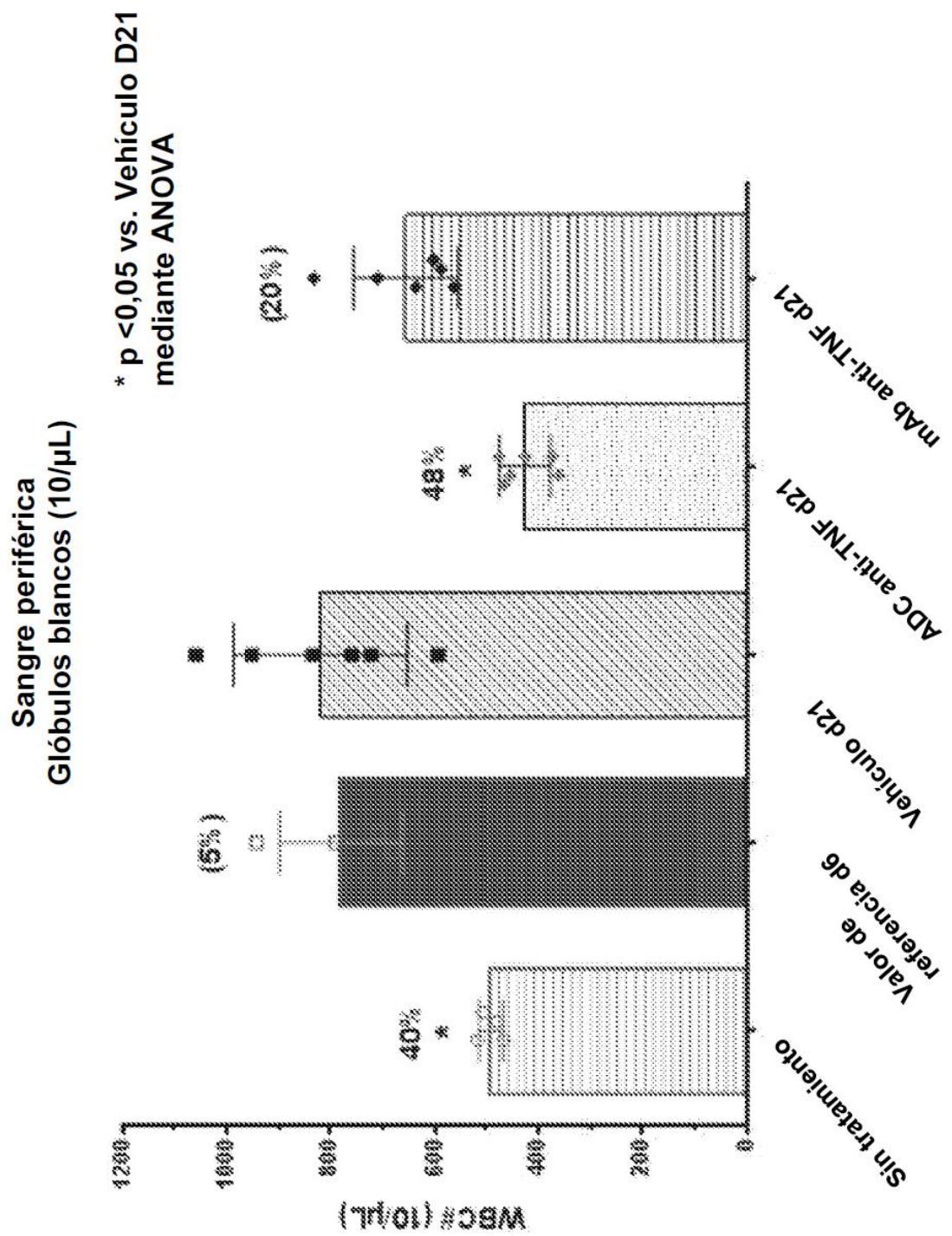


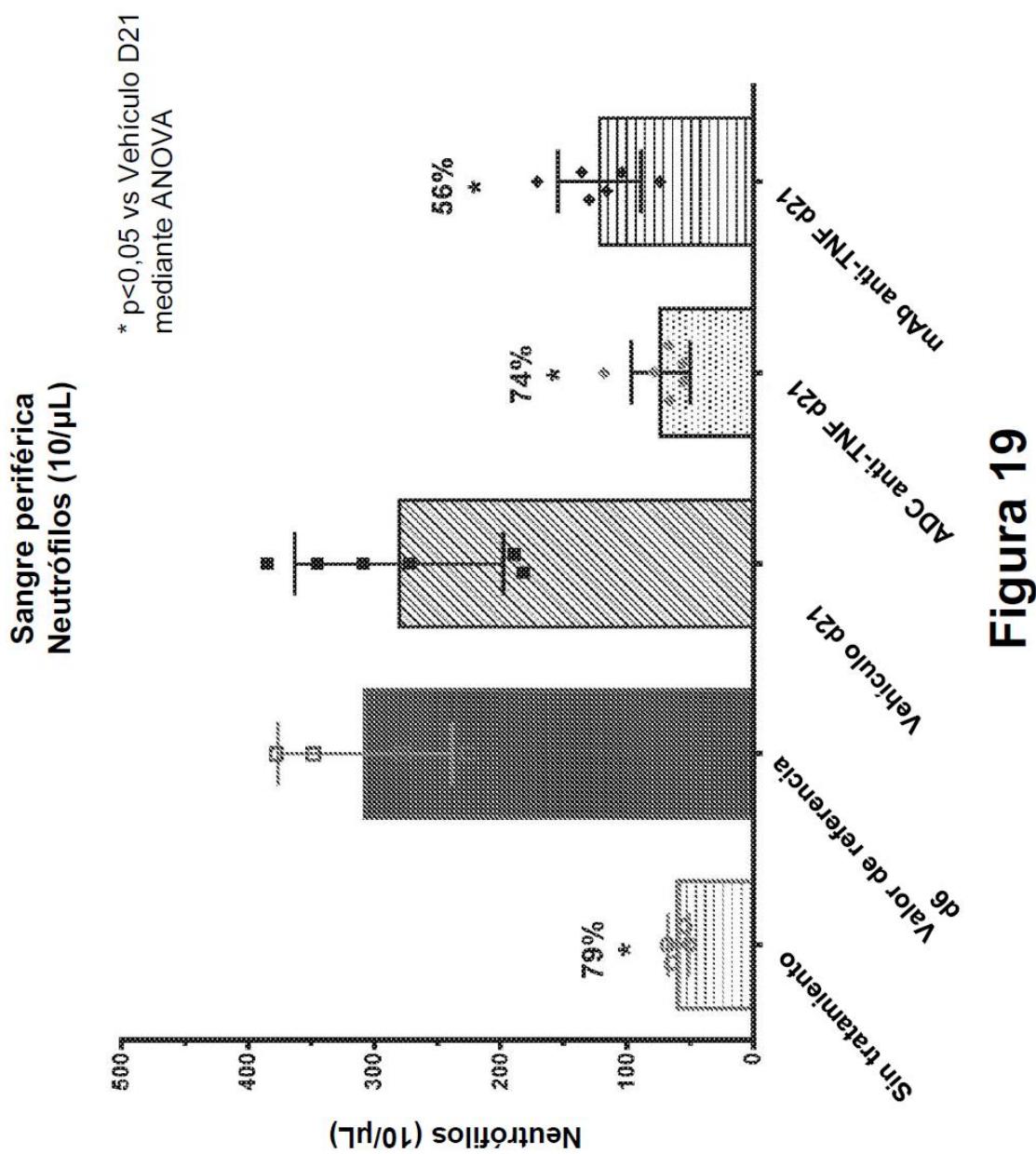


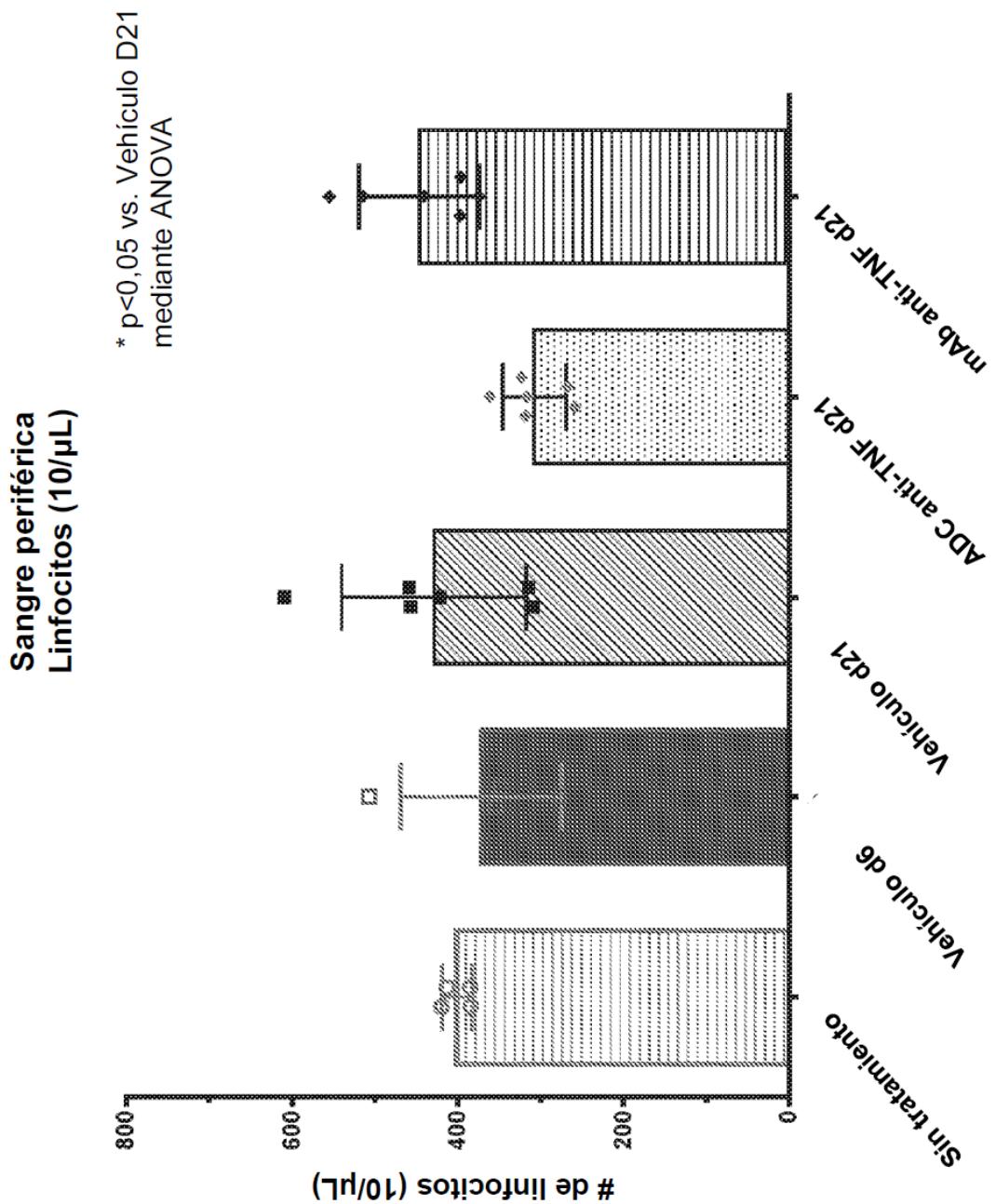


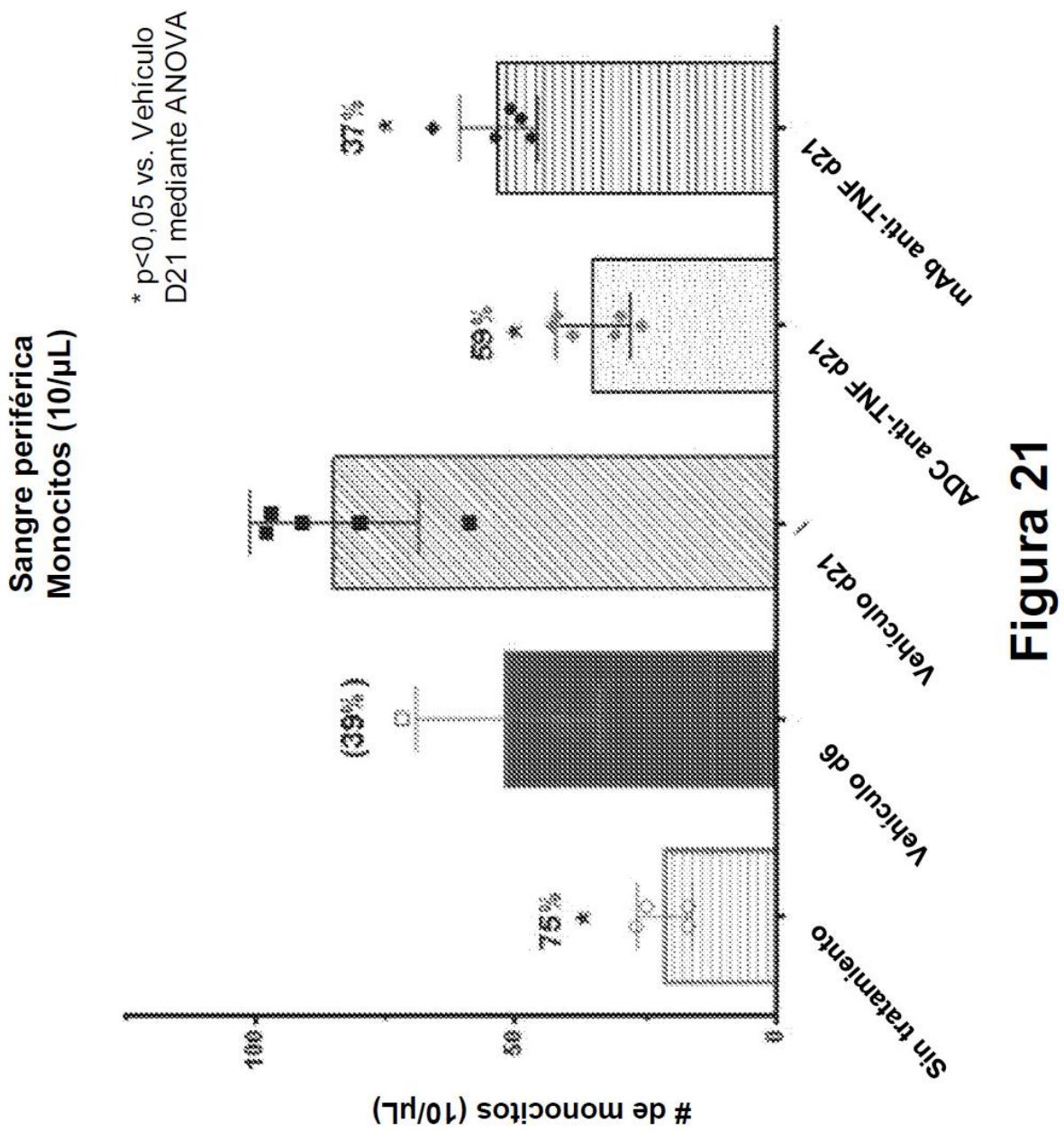


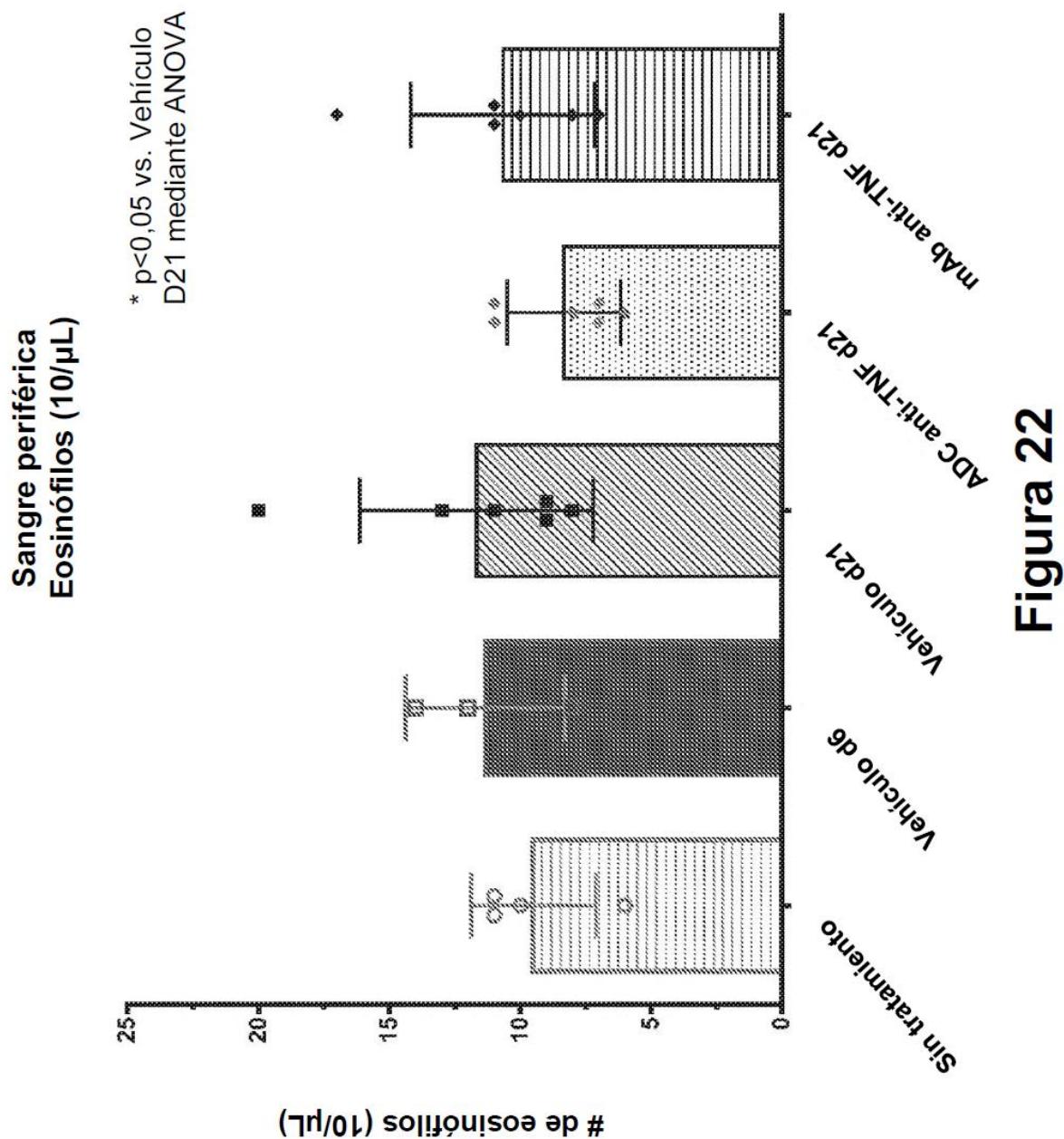
**Figura 17**

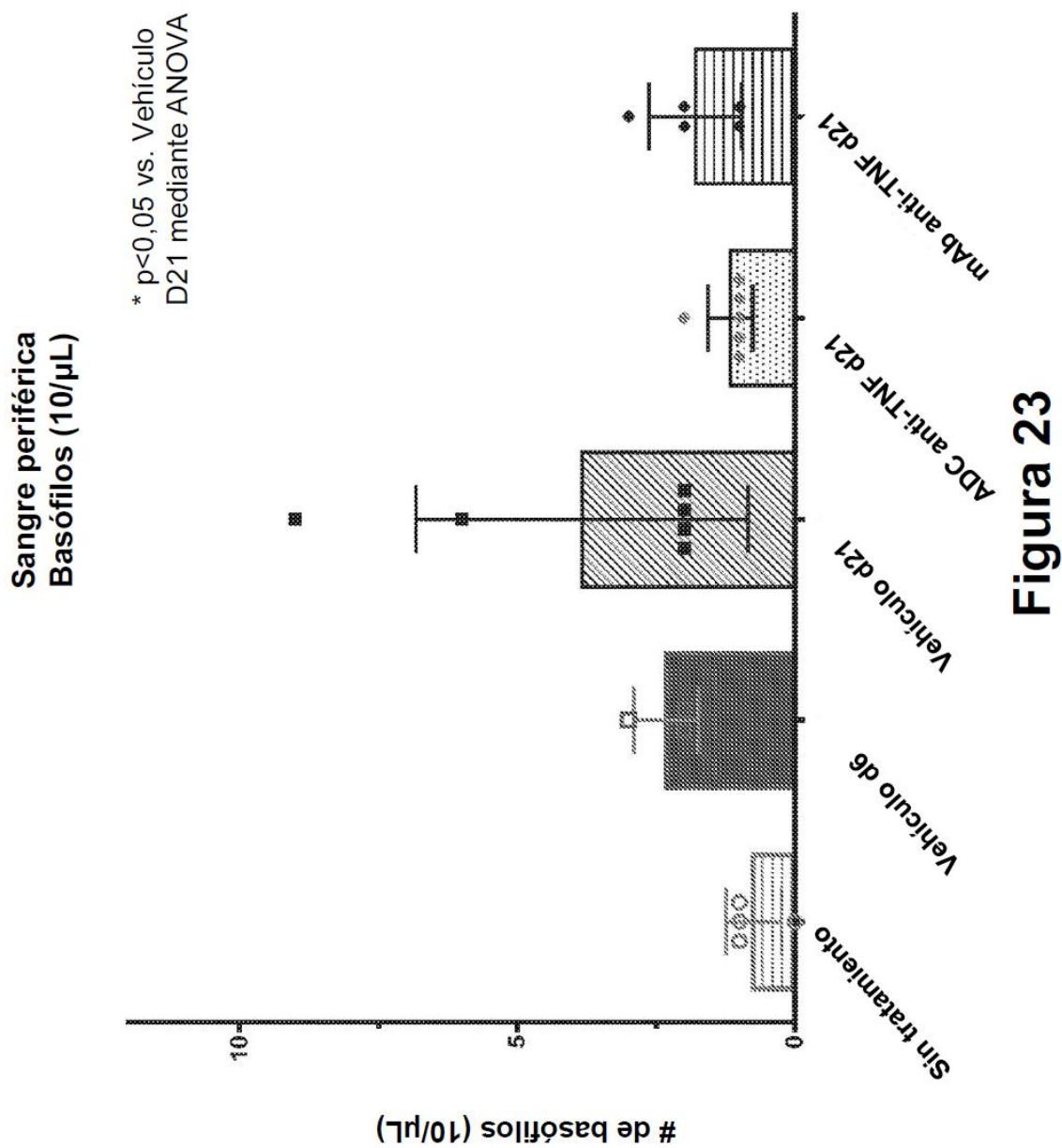
**Figura 18**

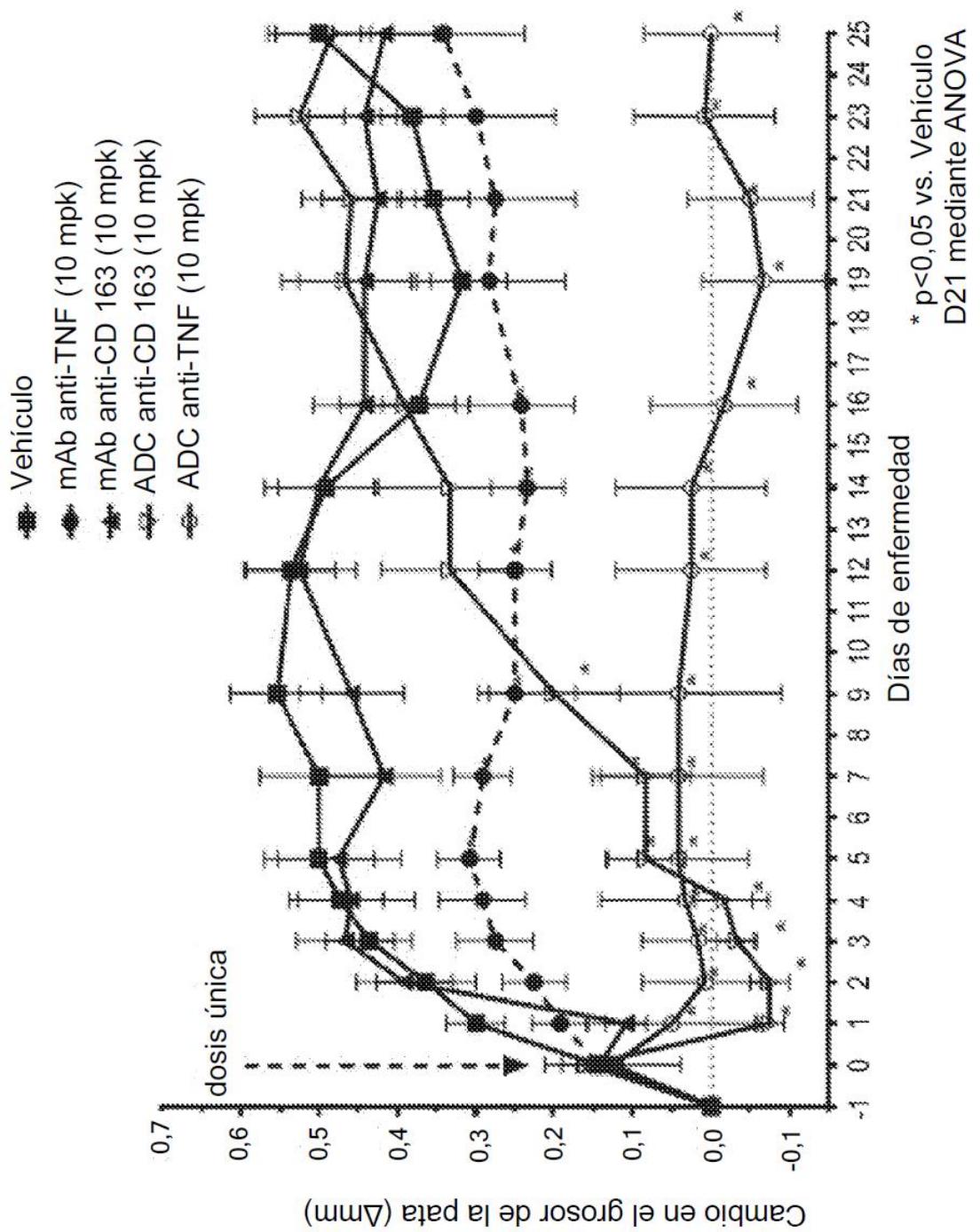


**Figura 20**

**Figura 21**

**Figura 22**



**Figura 24**