



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 940 903**

⑮ Int. Cl.:

A61K 47/60 (2007.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.03.2015 PCT/US2015/021342**

⑯ Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2015 WO15143091**

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2015 E 15714117 (7)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2023 EP 3129067**

⑭ Título: **Glucomanipulación específica del sitio de restos orientadores**

⑩ Prioridad:

**19.03.2014 US 201461955682 P
08.10.2014 US 201462061556 P**

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.05.2023

⑬ Titular/es:

**GENZYME CORPORATION (100.0%)
450 Water Street
Cambridge, MA 02141, US**

⑭ Inventor/es:

**AVILA, LUIS;
PAN, CLARK;
QIU, HUAWEI y
ZHOU, QUN**

⑭ Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

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

ES 2 940 903 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

Glucomanipulación específica del sitio de restos orientadores

ANTECEDENTES

5 El uso de anticuerpos específicos para tratar a las personas y otros animales es una poderosa herramienta que ha sido muy eficaz para tratar muchas afecciones y trastornos. Sin embargo, existe una gran demanda de terapias orientadas más eficaces, especialmente terapias específicas orientadas con una eficacia superior y mayores márgenes terapéuticos. Uno de estos tratamientos específicos orientados emplea conjugados de anticuerpo-resto efector en los que un resto orientador dirige un anticuerpo específico a una zona de tratamiento deseada. Estas moléculas han mostrado un índice terapéutico mejorado – una eficacia superior y/o perfiles de toxicidad inferiores que el anticuerpo no orientado en un entorno clínico. Sin embargo, el desarrollo de estas terapias puede suponer un reto, ya que muchos factores, incluyendo las propiedades físicas y/o estructurales del propio anticuerpo así como la estabilidad del enlace, pueden tener un impacto significativo sobre la especificidad para la enfermedad elegida (p. ej. tumor), reduciendo de ese modo la eficacia. Con una alta unión inespecífica y baja estabilidad en circulación, el conjugado anticuerpo-resto efector se depura típicamente a través de tejidos normales antes de alcanzar la zona diana. Por otra parte, los conjugados de anticuerpo-resto efector con subpoblaciones significativas de alta carga de fármaco podrían generar agregados que serían eliminados por macrófagos, conduciendo a una semivida más corta. Así, existen necesidades crecientes de un control crítico del procedimiento así como de prevenir complicaciones, tales como agregación del anticuerpo y toxicidad inespecífica mediada por el anticuerpo.

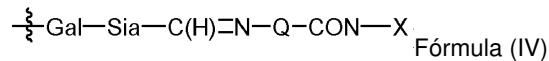
10 20 Aunque los conjugados de anticuerpo-resto efector generados según los métodos actuales pueden ser eficaces, el desarrollo de estas terapias supone un reto, ya que las mezclas heterogéneas a menudo son una consecuencia de las químicas de conjugación usadas. Por ejemplo, la conjugación de un resto efector a residuos de lisina del anticuerpo es complicada por el hecho de que hay muchos residuos de lisina (~30) en un anticuerpo disponibles para la conjugación. Puesto que el número óptimo de la relación de resto efector a anticuerpo conjugados (DAR) es mucho menor para minimizar la pérdida de función del anticuerpo (p. ej., alrededor de 4:1), la conjugación a lisina a menudo genera un perfil muy heterogéneo. Por otra parte, muchas lisinas están situadas en parátopos críticos de la región CDR, y la conjugación al fármaco puede conducir a un reducción en la afinidad del anticuerpo. La conjugación mediada por tiol se orienta principalmente a las ocho cisteínas implicadas en enlaces disulfuro de bisagra. Sin embargo, todavía es difícil predecir e identificar cuáles cuatro de las ocho cisteínas se conjugan coherentemente entre las diferentes 25 30 35 preparaciones. Más recientemente, la manipulación genética de residuos de cisteína libres ha permitido la conjugación específica del sitio con químicas basadas en tiol, pero estos enlaces a menudo exhiben una estabilidad muy variable, sufriendo el enlazador reacciones de intercambio con albúmina y otras moléculas séricas que contienen tiol. Por lo tanto, una estrategia de conjugación específica del sitio que genere un conjugado de anticuerpo con un sitio de conjugación definido y un enlace estable sería útil para permitir la conjugación del resto efector mientras que minimizaría efectos adversos sobre la estructura o la función del anticuerpo.

40 Un método para la conjugación anticuerpo-fármaco específica de un sitio a través de glucomanipulación es descrito por Zhou y cols. (Bioconjugate Chem. (2014) 25:510-520). Zhou y cols. no describen la conjugación de un polipéptido con un resto orientador que se une a una célula. Otros métodos de conjugación específica de un sitio a polipéptidos tales como anticuerpos se describen en las publicaciones de patente internacionales WO2014/164534 A2, WO2014/164503 A1 y WO2014/043361 A1 (todas de Genzyme Corporation), que tampoco muestran la conjugación de un polipéptido con un resto orientador según la presente invención.

SUMARIO

45 La actual divulgación proporciona polipéptidos (p. ej., anticuerpos) de unión y sus conjugados con restos orientadores. En ciertos casos, los conjugados comprenden un enlace resto orientador-glucano manipulado específicamente para un sitio dentro de glucanos naturales o modificados del polipéptido de unión. La actual divulgación también proporciona secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos de unión a antígeno, vectores de expresión recombinantes y células anfitrionas para elaborar estos polipéptidos que se unen a antígeno. También se proporcionan métodos para usar los polipéptidos que se unen a antígeno divulgados en este documento para tratar una enfermedad.

50 55 Según esto, en un aspecto, la invención proporciona un polipéptido de unión que comprende al menos un glucano modificado, donde el glucano comprende al menos un resto de Fórmula (IV):

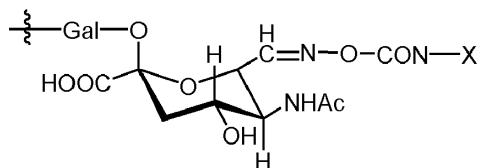


donde:

A) Q es NH u O;

- B) CON es un resto conector;
- C) X es un resto orientador que se une a una célula, donde el resto orientador es un resto de glucano GalNAc trivalente o un glucopéptido trigalactosilado;
- D) Gal es un resto de galactosa; y
- 5 E) Sia es un resto de ácido siálico;

donde el glucano comprende al menos un resto de la siguiente fórmula estructural:



10 En una realización, la célula es una célula de mamífero. En una realización adicional, la célula se selecciona de una célula inmunitaria, una célula hepática, una célula tumoral, una célula vascular, una célula epitelial o una célula mesenquimal. En otra realización más, la célula se selecciona de una célula B, una célula T, una célula dendrítica, una célula agresora natural (NK), un macrófago, un neutrófilo, un hepatocito, una célula endotelial sinusoidal hepática o una célula de hepatoma.

15 En una realización, el polipéptido de unión es internalizado por la célula. En otra realización, la cantidad del polipéptido de unión internalizada por la célula es mayor que la cantidad de un polipéptido de unión de referencia que carece de un resto orientador internalizado por la célula.

20 En una realización, el resto orientador se une a un receptor de 6-fosfato de manosa sobre la célula. En otra realización, el resto orientador comprende un resto de 6-fosfato de manosa (Man 6-P).

25 En una realización, el resto orientador se une a una Siglec sobre la célula. En una realización adicional, la Siglec es sialoadhesina (Siglec-1), CD22 (Siglec-2), CD33 (Siglec-3), MAG (Siglec-4), Siglec-5, Siglec-6, Siglec-7, Siglec-8, Siglec-9, Siglec-10, Siglec-11, Siglec-12, Siglec-14 o Siglec-15. En otra realización, el resto orientador comprende un residuo de ácido siálico enlazado en α 2,3, α 2,6 o α 2,8. En una realización adicional, el resto orientador comprende un resto de α 2,3-sialil-lactosa o un resto de α 2,6-sialil-lactosa.

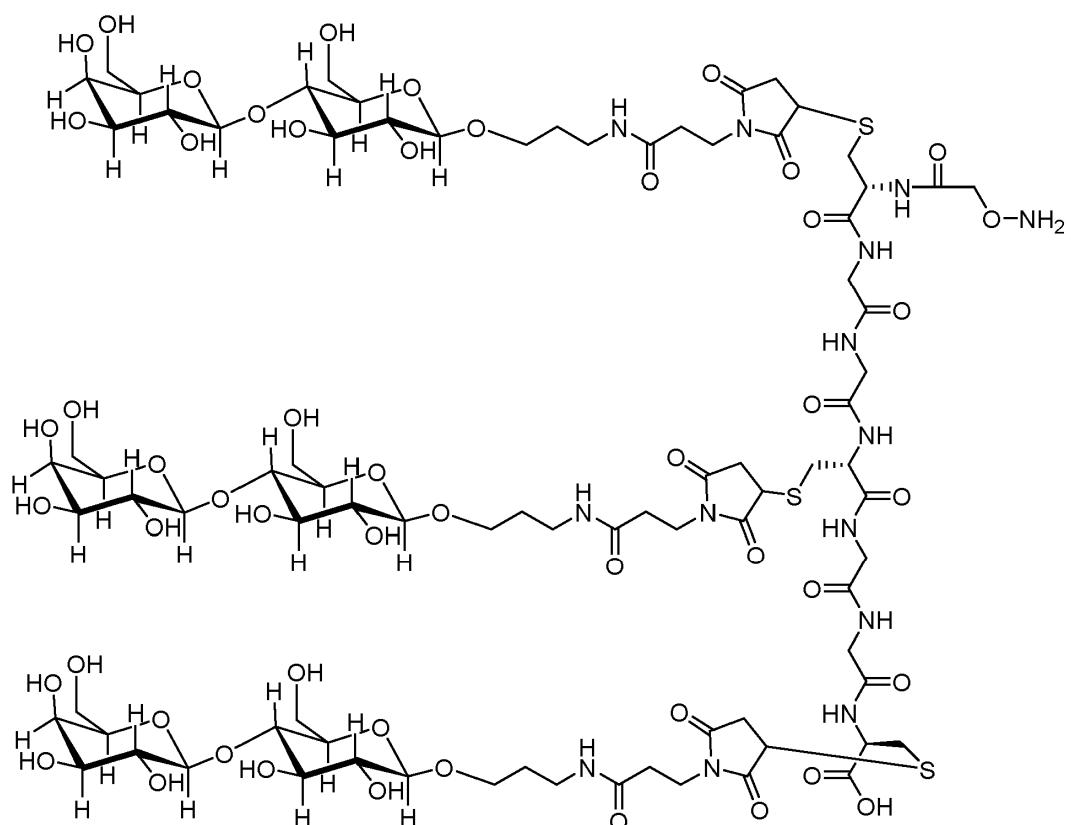
30 En una realización, el resto orientador se une a un receptor de lectina tipo C, una galectina, un receptor de lectina tipo L u otros receptores de carbohidratos. En una realización adicional, el resto orientador se une a DEC-205 (CD205; antígeno linfocítico 75), receptor de manosa de macrófagos (MMR; CD206), lectina-1, lectina-2, lectina tipo C inducible por macrófagos (Mincle), nointegrina de asimiento a ICAM3 específica de células dendríticas (DC-SIGN; CD209), receptor 1 del grupo de lectina DC NK (DNGR-1), langerina (CD207), un lectícano, un receptor de asialoglucoproteína (ASGPR), inmunorreceptor de células dendríticas del receptor de lectina C (CLEC4A; CLECSF6; DCIR), lectina de tipo galactosa de macrófagos (MGL), un receptor de DC, una colectina, una selectina, un receptor de células NK, un receptor endocítico del dominio de lectina tipo multi-C (CTLD), una lectina del grupo Reg (tipo VII), 35 condrolectina, tetranectina, policistina, atractina (ATRN), proteína básica principal de eosinófilos (EMBP), gen 2 de la región crítica del síndrome de DiGeorge (DGCR2), trombomodulina, Bimlec, una lectina del grupo XVI (SEEC) o una lectina del grupo XVII (CBCP/Frem1/QBRICK).

40 En una realización, Q es O.

En una realización, el resto orientador es un resto de glucano GalNAc trivalente.

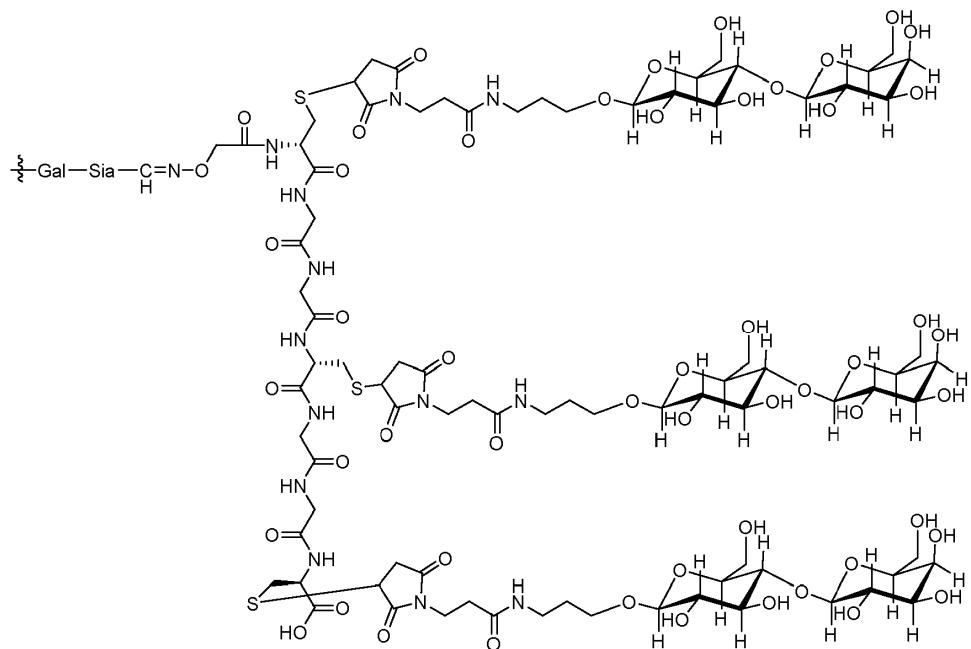
En una realización adicional, el resto orientador es un glucopéptido trigalactosilado, p. ej., lactosa₃-Cys₃Gly₄.

45 En una realización, el resto lactosa₃-Cys₃Gly₄ está representado por la Fórmula V:

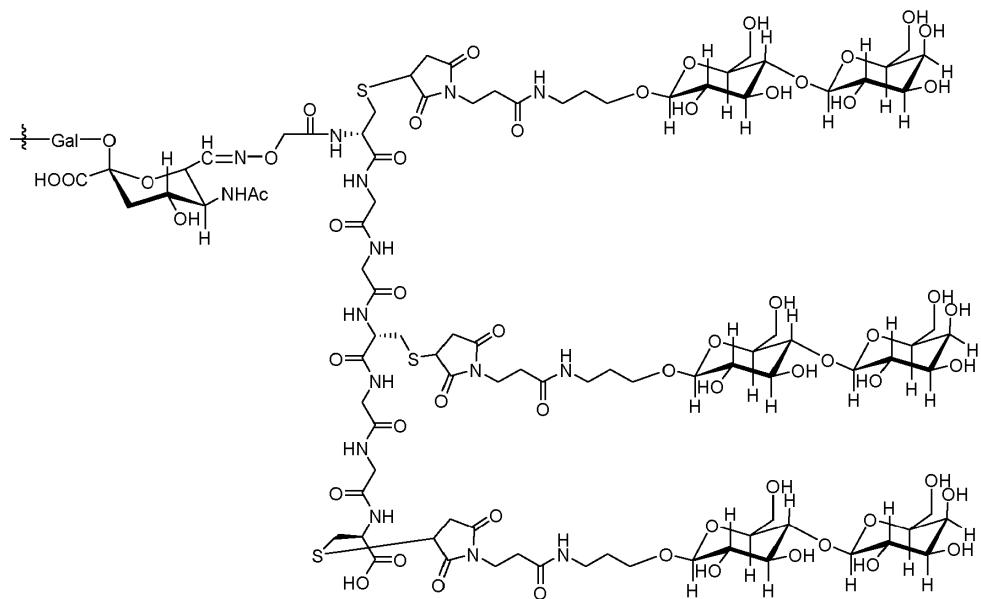


[Fórmula V]

En una realización, el glucano comprende al menos un resto de la siguiente fórmula estructural:



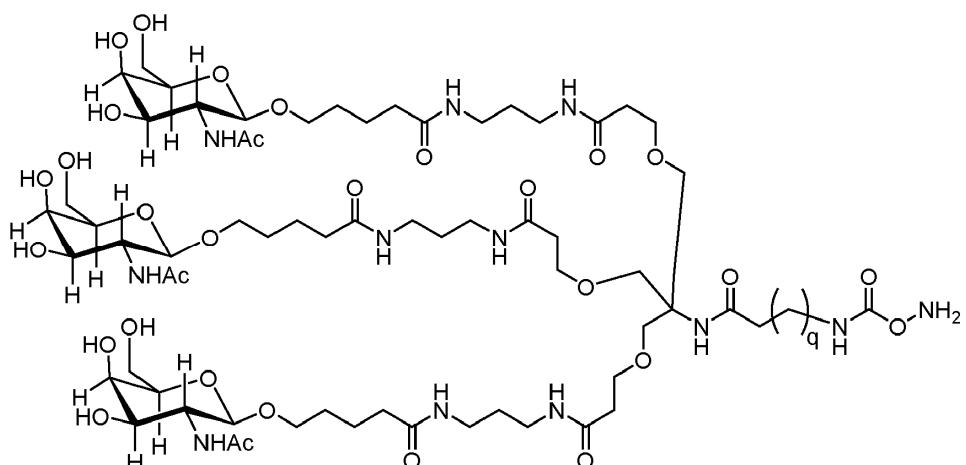
5 En una realización, el glucano comprende al menos un resto de la siguiente fórmula estructural:



En una realización, el resto orientador es un resto de glucano GalNAc trivalente.

En una realización, el resto de glucano GalNAc trivalente está representado por la Fórmula VIII:

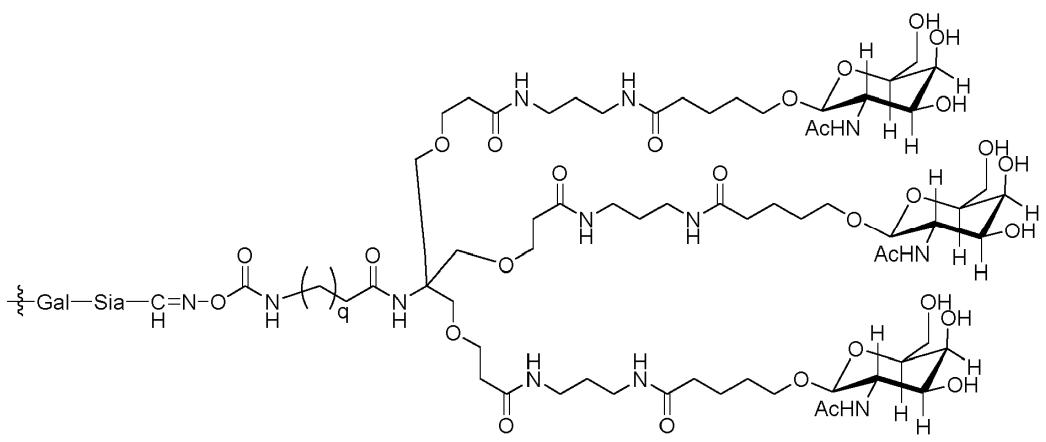
5



[Fórmula VIII],

donde q es un número entero entre 1 y 29 inclusive.

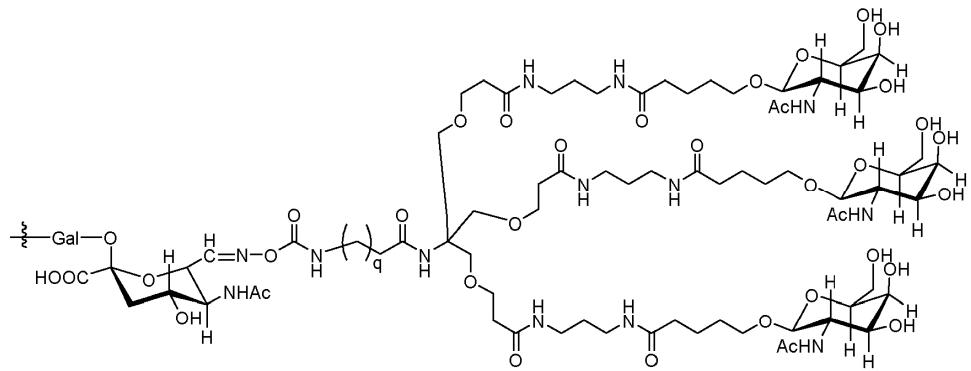
- 10 En otra realización, el glucano comprende al menos un resto que tiene la siguiente fórmula estructural:



donde q es un número entero entre 1 y 29 inclusive.

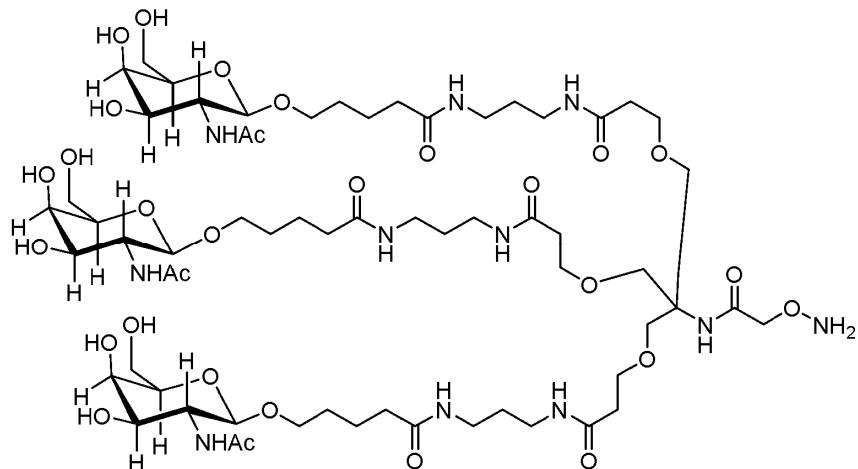
En otra realización, el glucano comprende al menos un resto que tiene la siguiente fórmula estructural:

5

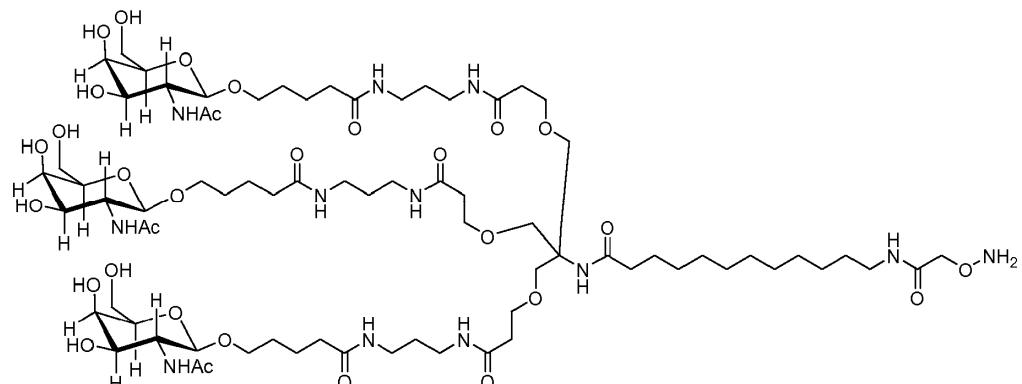


donde q es un número entero entre 1 y 29 inclusive.

10 En una realización, el resto de glucano GalNAc trivalente está representado por la Fórmula VII, la Fórmula XIII o la Fórmula XIV:



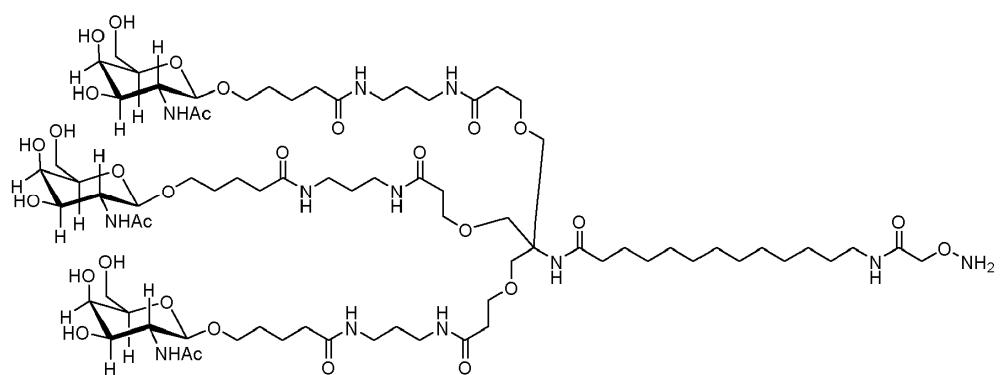
[Fórmula VII];



15

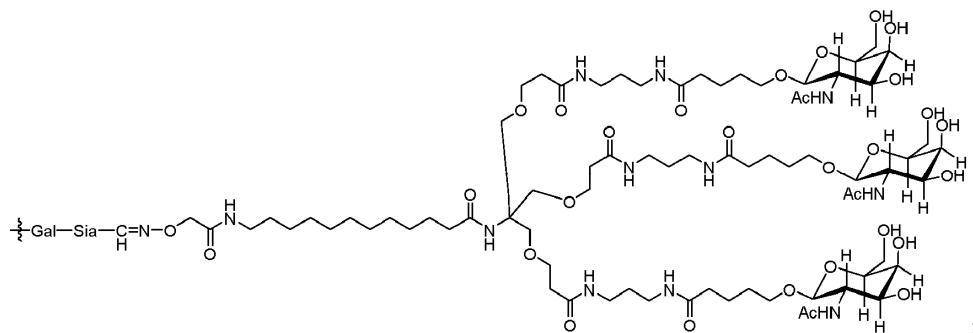
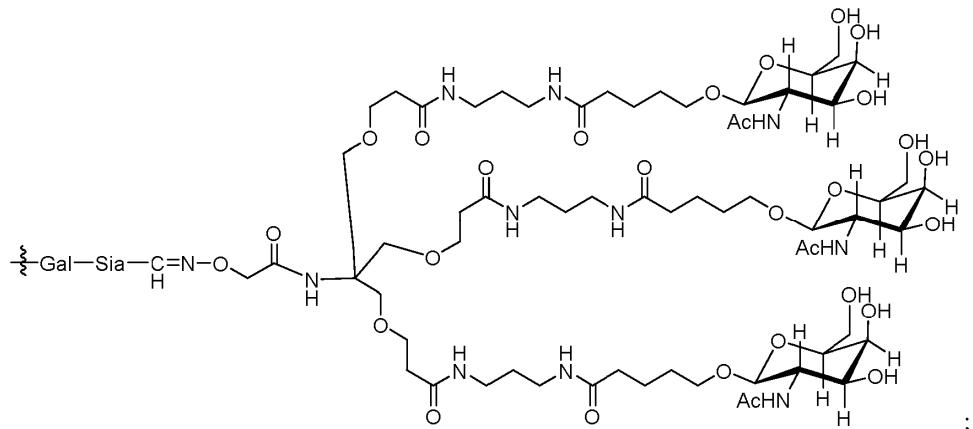
[Fórmula XIII];

0

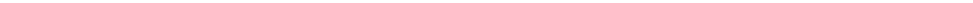
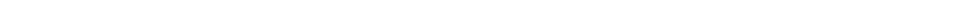
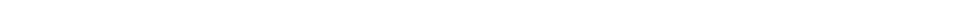
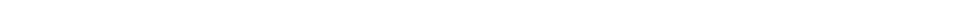
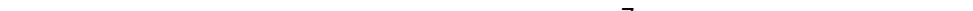
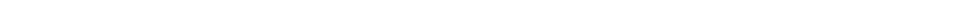
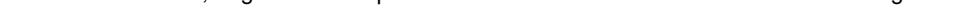
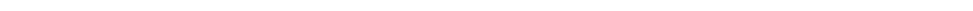
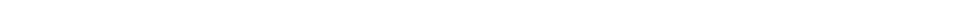
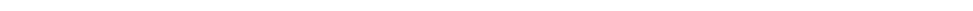
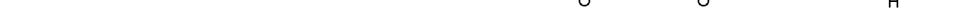
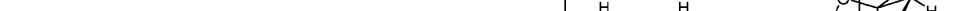
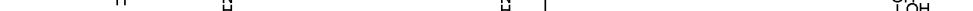
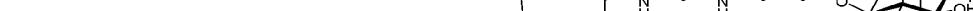
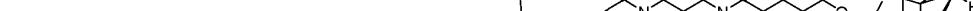
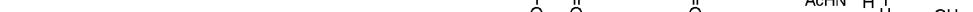
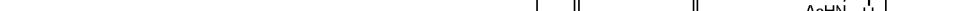
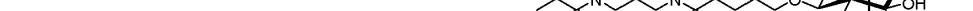
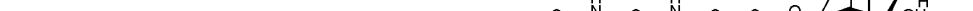
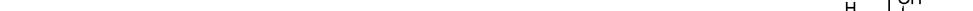
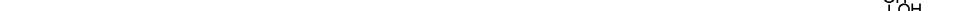
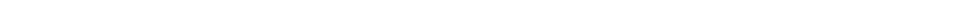
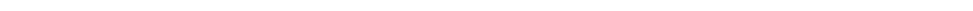
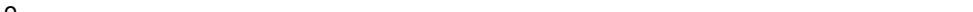
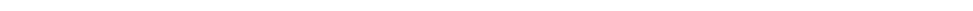
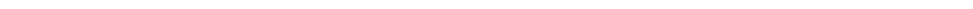
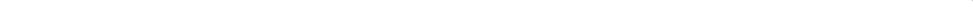


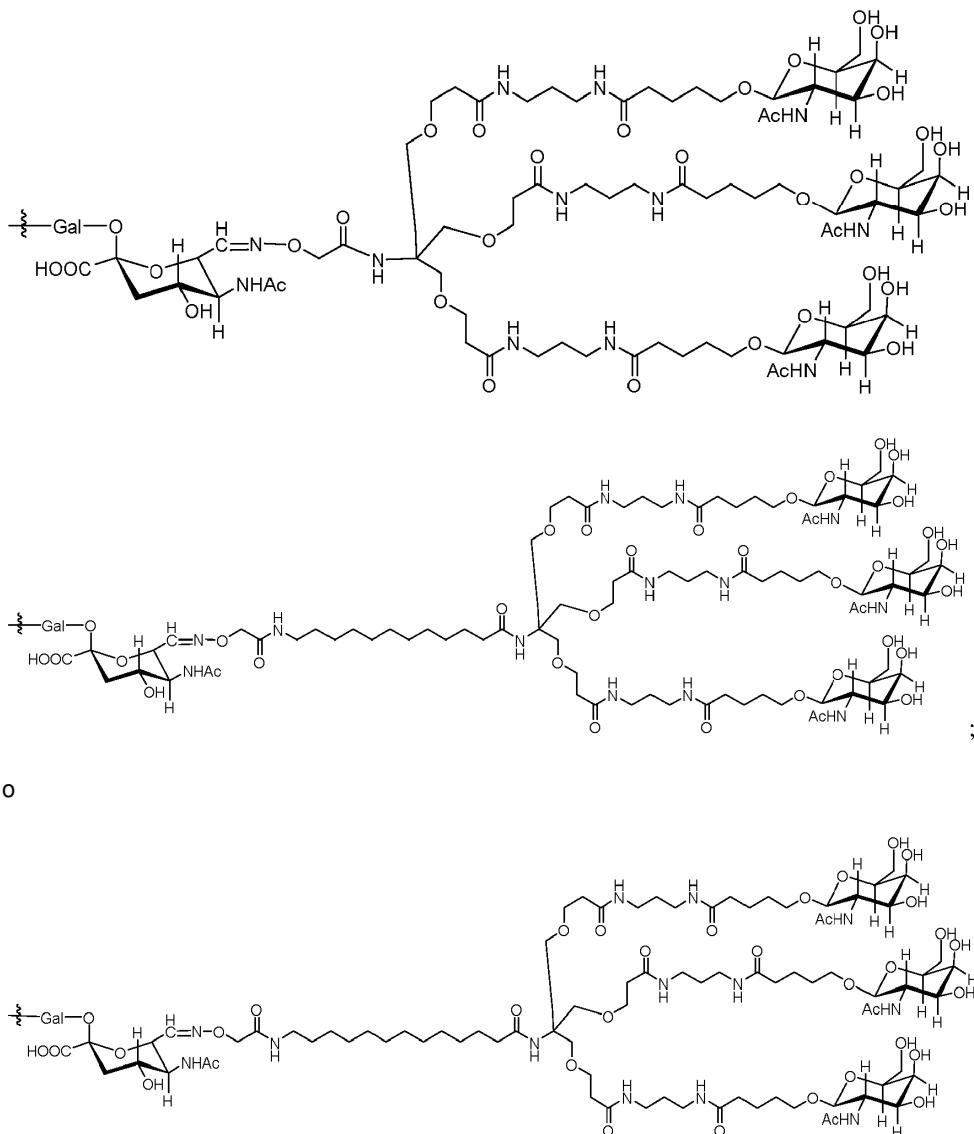
[Fórmula XIV]

En una realización, el glucano comprende al menos un resto seleccionado de las siguientes fórmulas estructurales:



5





- 5 En una realización, el polipéptido de unión comprende un dominio Fc. En una realización adicional, el glucano modificado está enlazado por N al polipéptido de unión a través de un residuo de asparagina en la posición del aminoácido 297 del dominio Fc, según la numeración de EU. En otra realización, el glucano modificado está enlazado por N al polipéptido de unión a través de un residuo de asparagina en la posición del aminoácido 298 del dominio Fc, según la numeración de EU
- 10 En una realización, el dominio Fc es humano. En otra realización, el polipéptido de unión comprende un dominio CH1. En una realización adicional, el glucano modificado está enlazado por N al polipéptido de unión a través de un residuo de asparagina en la posición del aminoácido 114 del dominio CH1 según la numeración de Kabat.
- 15 En una realización, el resto conector comprende un enlazador sensible al pH, un enlazador de disulfuro, un enlazador sensible a enzimas u otro resto enlazador escindible. En una realización, el resto conector que comprende un resto enlazador se selecciona del grupo de restos enlazadores representados en la Tabla 2 o 14.
- 20 En una realización, el polipéptido de unión es un anticuerpo o una inmunoadhesina.
- En un aspecto, la presente invención proporciona un método para elaborar el polipéptido de unión de la invención, comprendiendo el método hacer reaccionar un resto efector de Fórmula (I):

NH₂-Q-CON-X

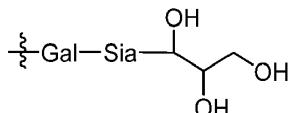
Fórmula (I),

25

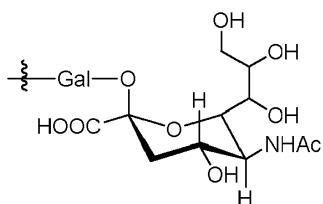
donde:

- A) Q es NH u O;
 - B) CON es un resto conector; y
 - C) X es un resto orientador que se une a una célula, donde el resto orientador es un resto de glucano GalNAc trivalente o un glucopéptido trigalactosilado,

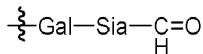
En una realización, el polipéptido de unión inicial comprende al menos un resto de la siguiente fórmula estructural:



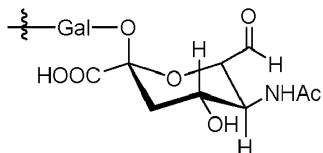
- 10 En una realización, el polipéptido de unión inicial comprende al menos un resto de la siguiente fórmula estructural:



En una realización, el polipéptido de unión precursor comprende un glucano oxidado comprende al menos un resto de la siguiente fórmula estructural:



- 15 En una realización, el polipéptido de unión precursor comprende un glucano oxidado comprende al menos un resto de la siguiente fórmula estructural:



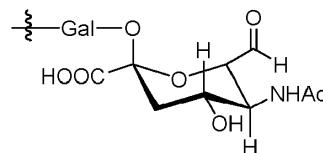
- En una realización, el polipéptido de unión precursor que comprende un glucano oxidado se genera al hacer reaccionar un polipéptido de unión inicial que comprende un glucano con un agente suavemente oxidante. En una realización adicional, el agente suavemente oxidante es peryodato sódico. En otra realización, no se emplea peryodato sódico más de 1 mM. En otra realización, el agente suavemente oxidante es galactosa oxidasa.

- En una realización, el método para elaborar una proteína de unión comprende hacer reaccionar un resto efector de la siguiente fórmula estructural:

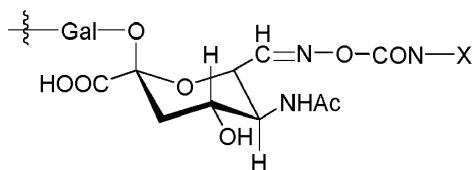
25



con el polipéptido de unión precursor que comprende un glucano oxidado que comprende al menos un resto de la siguiente fórmula estructural:



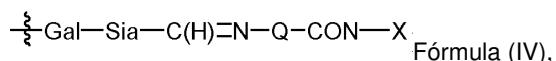
- 30 para formar un polipéptido de unión de la siguiente fórmula estructural:



En una realización, el resto orientador es un resto de glucano GalNAc trivalente. En una realización, la etapa de reacción se efectúa en presencia de una sal que comprende un ion metálico. En una realización adicional, donde el ion metálico es un ion cobre. En una realización, la sal es acetato de cobre. En otra realización, la sal que comprende un ion metálico está presente en una concentración de al menos 0,1 mM.

5 En otra realización, el polipéptido de unión que comprende el glucano comprende uno o dos residuos de ácido siálico terminales. En una realización adicional, los residuos de ácido siálico terminales se introducen mediante el tratamiento del polipéptido de unión con una sialiltransferasa o una combinación de sialiltransferasa y galactosiltransferasa. En 10 una realización, un polipéptido de unión inicial se pone en contacto con un agente suavemente oxidante a fin de producir un polipéptido de unión precursor o proteína de unión precursora. En una realización, el polipéptido de unión precursor o proteína de unión precursora comprende un resto de ácido siálico oxidado que comprende un aldehído terminal.

15 La presente divulgación también se refiere a un polipéptido de unión que comprende al menos un glucano modificado que comprende al menos un resto de Fórmula (IV):



donde:

20 A) Q es NH u O;

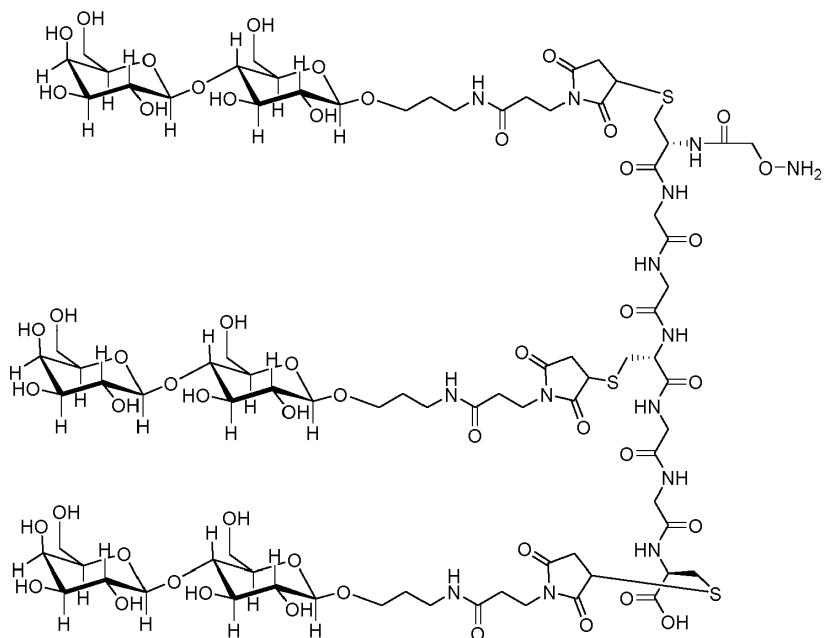
B) CON es un resto conector; y

C) X es un resto de lactosa₃-Cys₃Gly₄;

D) Gal es un componente derivado de galactosa;

E) Sia es un componente derivado de ácido siálico; y

25 donde Sia está presente y el resto de lactosa₃-Cys₃Gly₄ está representado por la Fórmula V:



[Fórmula V].

5 La presente divulgación también proporciona una composición que comprende un polipéptido de unión descrito anteriormente y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. En un caso, la relación de resto orientador a polipéptido de unión es igual a o mayor quee aproximadamente 4. En otro caso, la relación de resto orientador a polipéptido de unión es al menos aproximadamente 2. La presente divulgación se refiere además a un método para tratar a un paciente que lo necesite, que comprende administrar una cantidad eficaz de la composición.

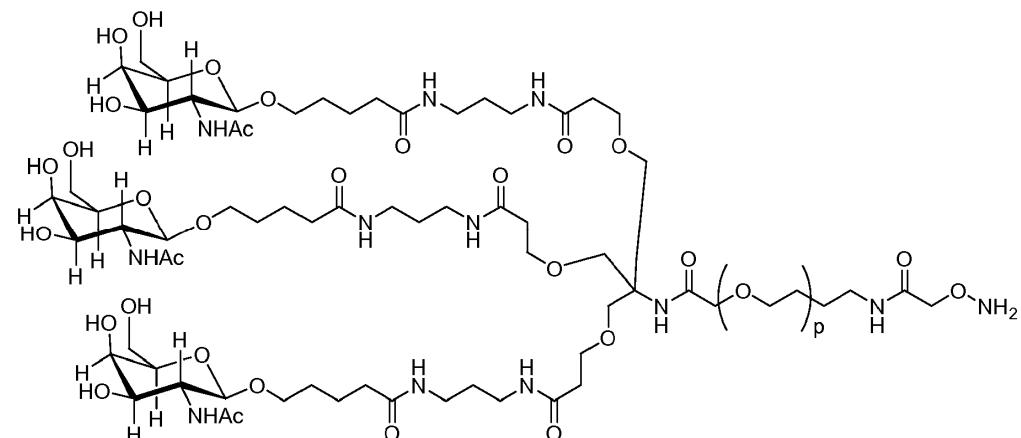
10 La presente divulgación también se refiere a un polipéptido de unión que comprende al menos un glucano modificado que comprende al menos un resto de Fórmula (IV):

donde:

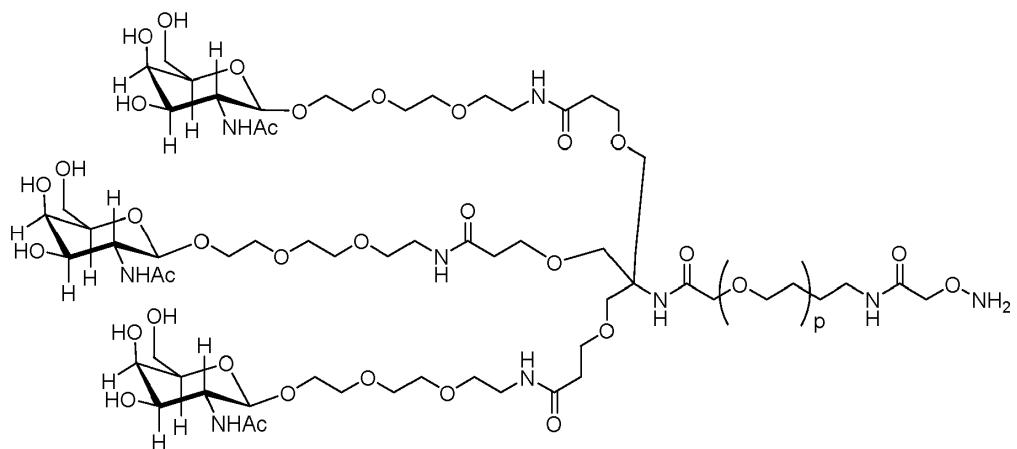
- A) Q es NH u O;
- B) CON es un resto conector; y
- 15 C) X es un resto que comprende PEG;
- D) Gal es un componente derivado de galactosa; y
- E) Sia es un componente derivado de ácido siálico;

donde Sia está presente o ausente.

20 En una realización, el glucano comprende al menos un resto representado por la Fórmula IX o la Fórmula XI:



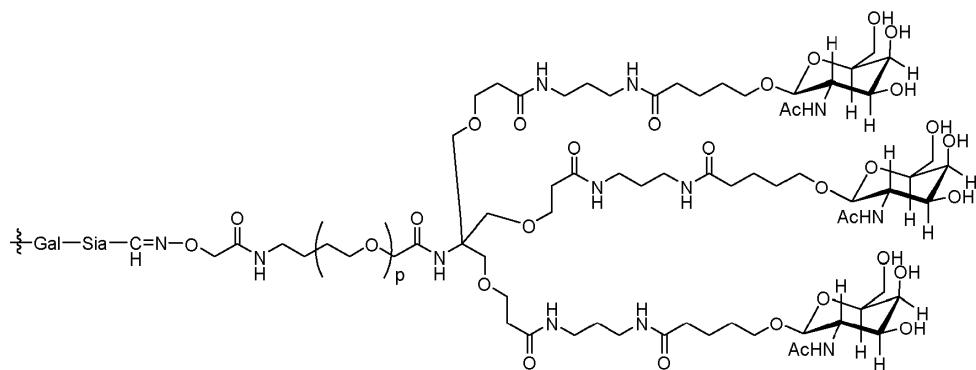
25 donde p tiene un valor de 1 a 32; o



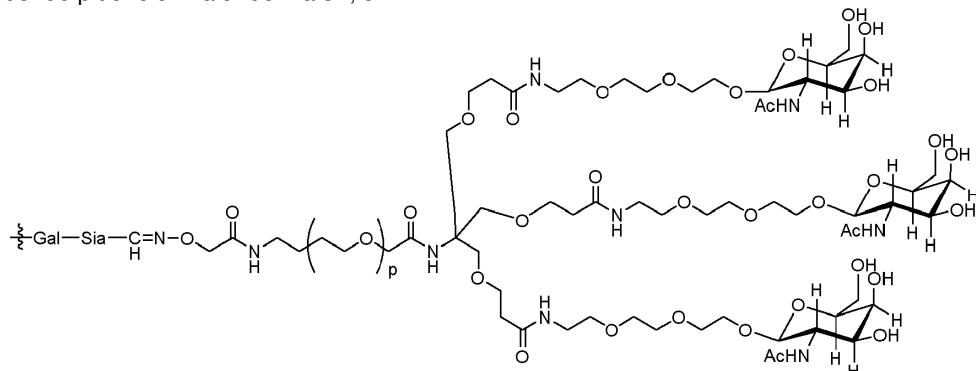
[Fórmula XI],

5 donde p tiene un valor de 1 a 32.

En una realización, el glucano comprende al menos un resto seleccionado de las siguientes fórmulas estructurales:

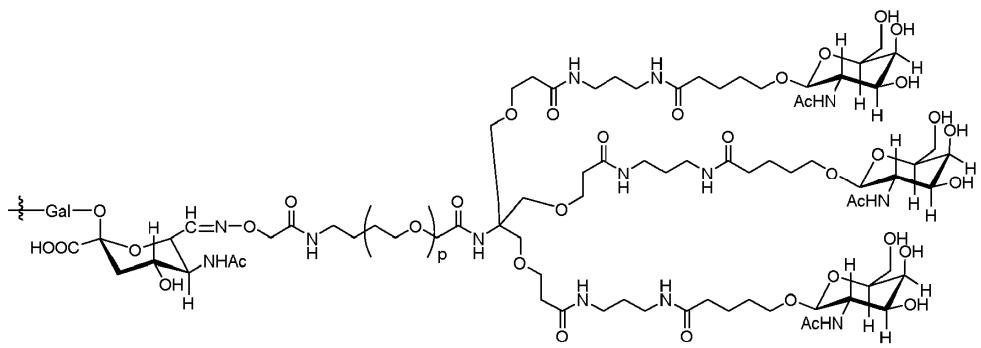


10 donde p tiene un valor de 1 a 32; o

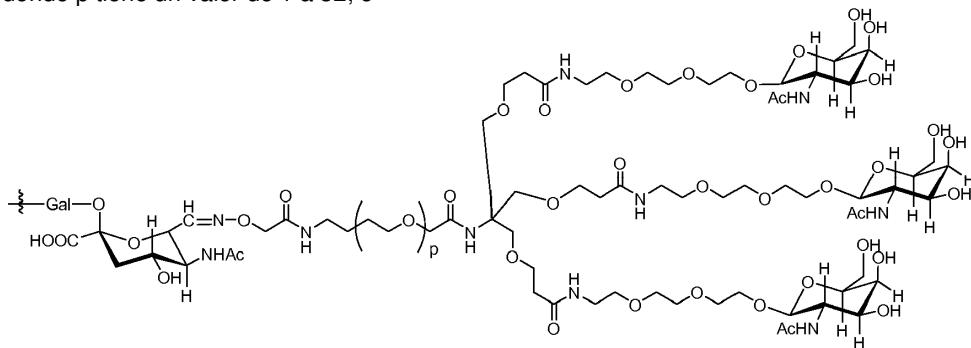


donde p tiene un valor de 1 a 32.

En una realización, el glucano comprende al menos un resto seleccionado de las siguientes fórmulas estructurales:



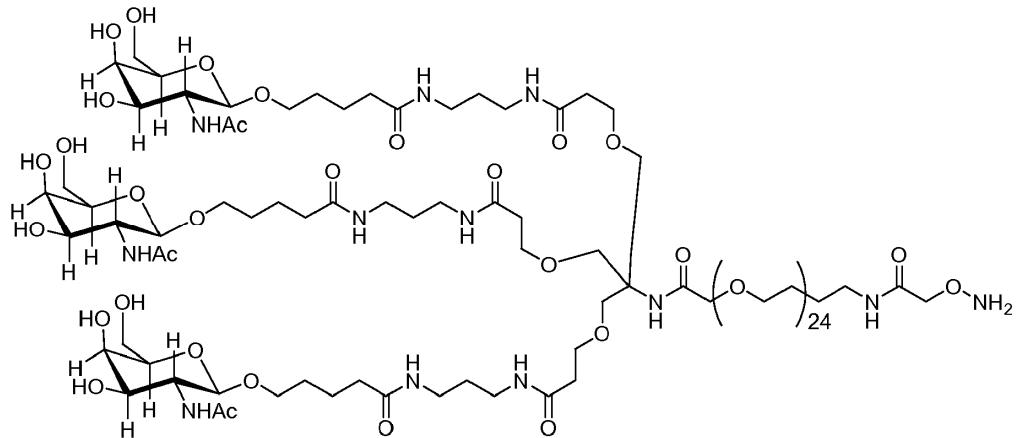
donde p tiene un valor de 1 a 32; o



donde p tiene un valor de 1 a 32.

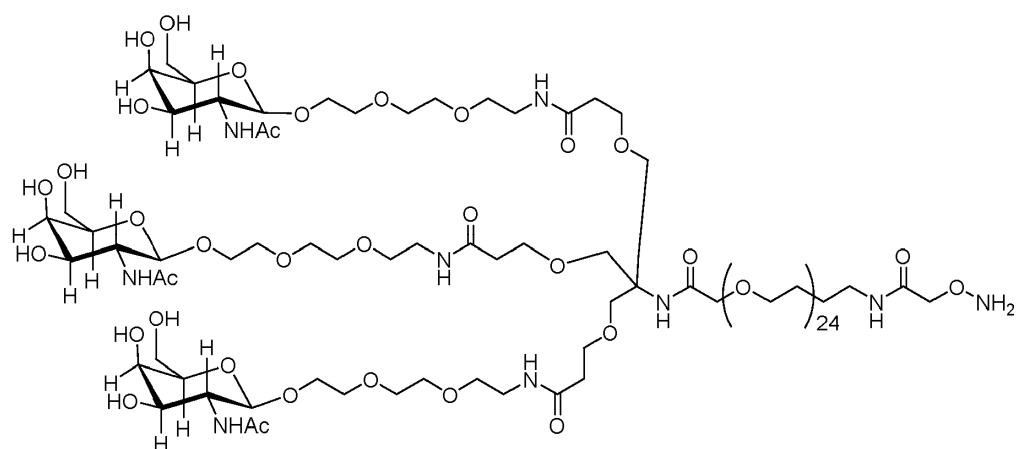
5

En una realización, el resto orientador comprende PEG y está representado por la Fórmula X o la Fórmula XII:



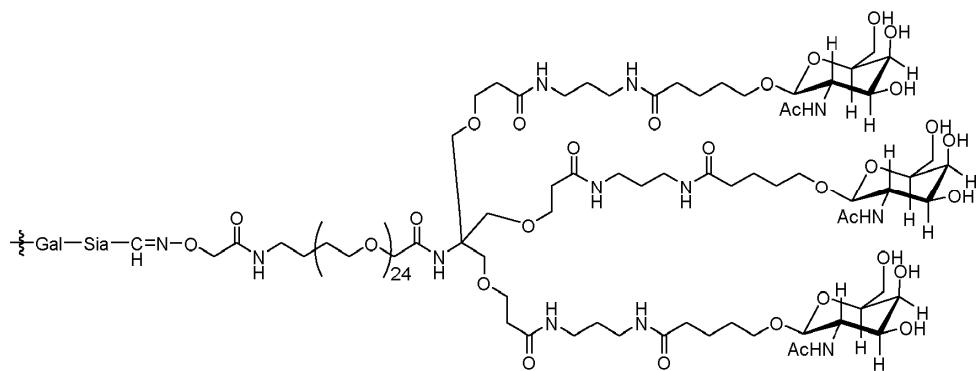
[Fórmula X];

10 o

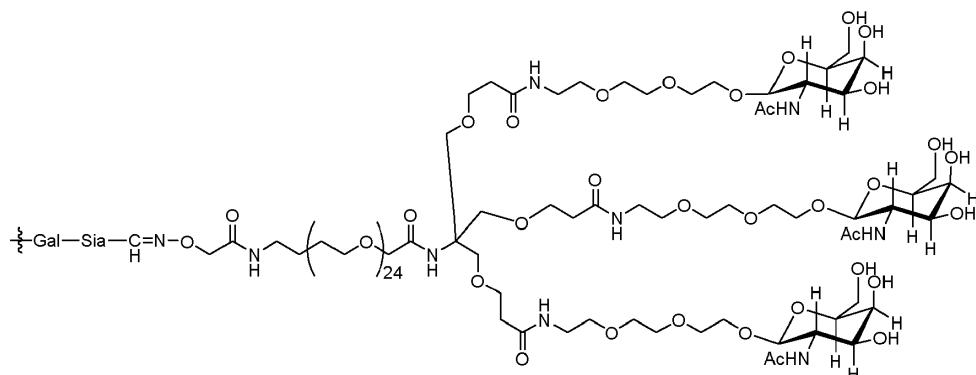


[Fórmula XII].

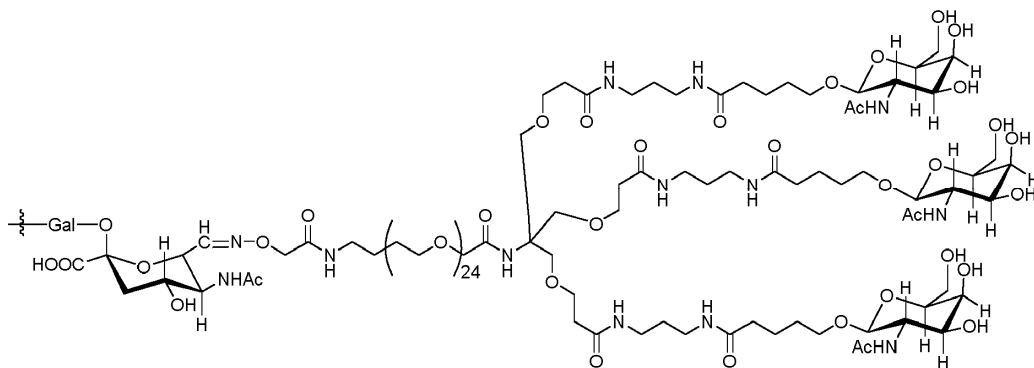
En una realización, el glucano comprende al menos un resto seleccionado de las siguientes fórmulas estructurales:



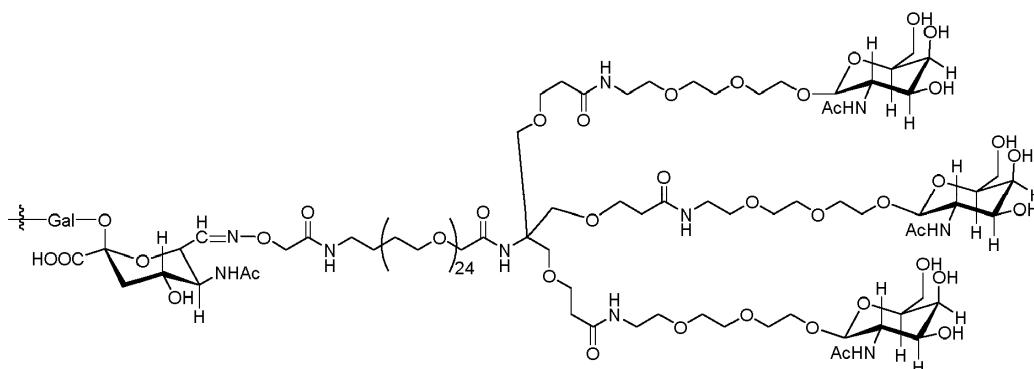
5 o



En una realización, el glucano comprende al menos un resto seleccionado de las siguientes fórmulas estructurales:



0



5 En una realización, el resto PEG comprende mono-PEG, bi-PEG o tri-PEG. En otra realización, el resto PEG comprende de 3 a 3,5 PEG. En otra realización, el polipéptido de unión es un anticuerpo o una inmunoadhesina.

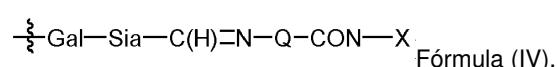
La presente divulgación se refiere además a un método para elaborar un polipéptido de unión PEGilado que comprende al menos un glucano oxidado, donde el método comprende:

10 (a) hacer reaccionar un polipéptido de unión que comprende al menos un glucano con un agente suavemente oxidante en presencia de una sal que comprende un ion metálico, y (b) conjugar el polipéptido de unión oxidado con al menos un resto que comprende PEG.

15 En un caso, el ion metálico es un ion cobre. En otro caso, la sal es acetato de cobre. En otro caso, la sal que comprende un ion metálico está presente a una concentración de al menos 0,1 mM. En otro caso, el agente suavemente oxidante es peryodato o galactosa oxidasa. En otro caso, el al menos un glucano es un glucano modificado.

20 En un caso, el método para elaborar un polipéptido de unión comprende: a) hacer reaccionar un polipéptido de unión que comprende al menos un glucano modificado con un agente suavemente oxidante en presencia de una sal que comprende un ion metálico; y b) conjugar el polipéptido de unión oxidado con el resto que comprende PEG. En un caso adicional, el resto PEG comprende mono-PEG, bi-PEG o tri-PEG.

La presente divulgación también se refiere a un polipéptido de unión que comprende al menos un glucano modificado que comprende al menos un resto de Fórmula (IV):



25 donde:

A) Q es NH u O;

B) CON es un resto conector; y

C) X es un glucano GalNAc trivalente;

D) Gal es un componente derivado de galactosa; y

E) Sia es un componente derivado de ácido siálico;

donde Sia está presente y el resto de glucano GalNAc trivalente está representado por la Fórmula VI.

- 5 La proteína de unión puede comprender una glucoforma de N-glucano seleccionada del grupo que consiste en: una glucoforma G0, una glucoforma G1 y una glucoforma G2. La glucoforma de N-glucano se puede seleccionar además del grupo que consiste en: una glucoforma G1S1, una glucoforma G2S 1, una glucoforma G2S2, una glucoforma G1F, una glucoforma G2F, una glucoforma G1S1F, una glucoforma G2S1F y una glucoforma G2S2F.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 10 Las características y ventajas precedentes y otras de la presente divulgación se entenderán más a fondo a partir de la siguiente descripción detallada de realizaciones ilustrativas tomadas junto con los dibujos adjuntos.

Las **Figuras 1 (A-C)** son una ilustración esquemática de la síntesis de un conjugado de anticuerpo-fármaco donde un resto de toxina se enlaza a un residuo de ácido siálico oxidado de un glucano de anticuerpo usando un enlace oxíma. La **Figura 1A** reproduce anticuerpos con carbohidratos silvestres (existentes) en la posición Asn297 y con sitios de glicosilación manipulados en las posiciones 114 (según la numeración de Kabat) y 298 (según es sistema de numeración de EU). La **Figura 1B** reproduce tanto la estructura canónica del glucano G1F (izquierda, observada en la posición Asn297 en los anticuerpos mostrados en la **Figura 1A**) como la estructura G2S1F (derecha, observada en las posiciones Ala114 y Asn298 en los anticuerpos mostrados en la **Figura 1A**). Las estructuras de glucano mostradas en la **Figura 1B** tienen varias subunidades diferentes: las cajas cuadradas blancas representan GlcNAc, el triángulo blanco invertido representa fucosa, los círculos blancos representan manosa, los círculos sombreados representan galactosa y el triángulo derecho sombreado representa ácido siálico. La **Figura 1C** reproduce la preparación de un conjugado de la actual divulgación. A la izquierda hay una proteína de unión inicial con un resto Gal y Sia. Después de la oxidación con NaIO4, el resto siálico se oxida para formar una proteína de unión precursora y a continuación se hace reaccionar con un resto que contiene toxina para formar un péptido de unión que comprende al menos un resto de Fórmula IV.

La **Figura 2** es un gel teñido con azul de Coomassie que muestra la expresión y la purificación de mutantes de glucosilación.

La **Figura 3** reproduce los resultados de experimentos de resonancia plasmónica superficial usados para valorar la unión de mutantes de anticuerpo $\alpha\beta$ TCR HEBE1 IgG a Fc γ RIIIa humano recombinante (V158 & F158).

- 30 La **Figura 4** reproduce los resultados de experimentos de resonancia plasmónica superficial usados para valorar la unión de mutantes de anticuerpo $\alpha\beta$ TCR HEBE1 IgG a Fc γ RI humano recombinante.

La **Figura 5** reproduce el perfil de liberación de citocinas desde PBMC para TNFa, GM-CSF, IFNy e IL10 en presencia de anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR mutantes (día 2).

- 35 La **Figura 6** reproduce el perfil de liberación de citocinas desde PBMC para IL6, IL4 e IL2 en presencia de anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR mutantes (día 2).

La **Figura 7** reproduce el perfil de liberación de citocinas desde PBMC para TNFa, GM-CSF, IFNy e IL10 en presencia de anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR mutantes (día 4).

La **Figura 8** reproduce el perfil de liberación de citocinas desde PBMC para IL6, IL4 e IL2 en presencia de anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR mutantes (día 4).

- 40 Las **Figuras 9 (A-B)** reproducen los resultados de experimentos que investigan el nivel de expresión de mutantes 2C3 mediante transferencia Western (**Figura 9A**) y resonancia plasmónica superficial (**Figura 9B**).

La **Figura 10** reproduce los resultados de experimentos que investigan la glucosilación de mutantes 2C3 antes y después del tratamiento con PNGasa F.

- 45 La **Figura 11** reproduce los resultados de experimentos de SDS-PAGE que investigan sitios de glucosilación sobre mutantes 2C3 aislados de cultivo celular.

5 Las **Figuras 12 (A-C)** reproducen los resultados de experimentos de resonancia plasmónica superficial usados para valorar la unión de anti-CD52 modificado a FcyRIIIa humano recombinante (V158). Se usaron anti-CD52 que comprenden mutaciones S298N/Y300S en el dominio Fc para valorar la función efectora de la molécula modificada, la unión al péptido CD52 (**Figura 12A**), la unión a FcyRIIIa (V158, **Figura 12B**) y la unión de control a FcRn de ratón (**Figura 12C**).

La **Figura 13** reproduce los resultados de experimentos de resonancia plasmónica superficial que investigan las propiedades de unión a Fc de mutantes 2C3.

10 Las **Figuras 14 (A-B)** reproducen los resultados de experimentos de resonancia plasmónica superficial que investigan la unión de anti-CD52 modificado tanto a FcyRIIIa (Val158) (como anteriormente) como a FcyRIIIa (Phe158). Se usaron anticuerpos anti-CD52 que comprenden mutaciones S298N/Y300S en el dominio Fc para valorar la función efectora de la molécula modificada que se une a FcyRIIIa (Val158, Figura 14A) y FcyRIIIa (Phe58, Figura 14B).

Las **Figuras 15 (A-B)** reproducen el análisis de la unión a C1q en el mutante S298N/Y300S y el control WT 2C3 (**Figura 15A**) y los resultados de un análisis de Eliza que confirma el revestimiento equivalente de los pocillos (**Figura 15B**).

15 La **Figura 16** reproduce los resultados de experimentos de resonancia plasmónica que miden la cinética de unión de mutantes 2C3 al péptido 741 de CD-52.

La **Figura 17** reproduce los resultados de experimentos de resonancia plasmónica que comparan la afinidad de unión a antígeno de WT anti-CD-52 2C3 y el mutante de hiperglucosilación A114N.

20 Las **Figuras 18 (A-D)** reproducen los resultados de experimentos de caracterización de carga por enfoque isoelectrónico y espectrometría de masas para determinar el contenido de glucano de mutantes 2C3.

Las **Figuras 19 (A-B)** reproducen los resultados de experimentos de concentración (Octet) y resonancia plasmónica que comparan la afinidad de unión a antígeno de WT anti-CD52 2C3 y mutantes.

La **Figura 20** reproduce los resultados de experimentos de SDS-PAGE para demostrar la glucosilación adicional del mutante anti-TEM1 A114N.

25 La **Figura 21** reproduce los resultados de SDS-PAGE y análisis por cromatografía de interacción hidrófoba del mutante A114N de anti-Her2.

La **Figura 22** reproduce los resultados de experimentos de SDS-PAGE para demostrar la conjugación de PEG al mutante 2C3 A114N a través de un enlace amiooxi.

30 La **Figura 23** reproduce los resultados de experimentos de LC-MS para determinar el contenido de glucano del mutante de hiperglucosilación anti-TEM1 A114N.

La **Figura 24** reproduce los resultados de experimentos de LC-MS para determinar el contenido de glucano de un anticuerpo HER2 silvestre y un mutante de hiperglucosilación A114N de anti-Her2.

Las **Figuras 25 (A-C)** reproducen un método ejemplar para realizar la conjugación específica del sitio de un anticuerpo.

35 La **Figura 26** reproduce una síntesis de restos efectores ejemplares: amiooxi-Cys-MC-VC-PABC-MMAE y amiooxi-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Dol10.

Las **Figuras 27 (A-C)** reproducen información de caracterización para un anticuerpo HER2 sialilado. Las **Figuras 28 (A-D)** reproducen información de caracterización para un anticuerpo anti-HER 2 sialilado oxidado.

La **Figura 29** reproduce cromatografías de interacción hidrófoba de glucoconjungados preparados con tres anticuerpos sialilados diferentes con dos grupos amiooxi diferentes.

40 La **Figura 30** muestra una cromatografía de HIC de un conjugado del mutante de glucosilación antiHer2 A114 con AO-MMAE preparado usando química GAM(+).

Las **Figuras 31 (A-D)** reproducen una comparación de la potencia *in vitro* de un glucoconjunto y un conjugado tiólico de anti-HER2.

La **Figura 32** reproduce una comparación de la potencia *in vitro* de un glucoconjunto y un conjugado tiólico de anti-FAP B11.

5 Las **Figuras 33 (A-D)** reproducen una comparación de la eficacia *in vivo* de glucoconjuntos y conjugados tiólicos de anti-HER2 en un modelo de xenoinjerto de células tumorales Her2+.

La **Figura 34** reproduce los resultados de experimentos de LC-MS para determinar el contenido de glucano de un anticuerpo anti- $\alpha\beta$ TCR mutante que contiene la mutación S298N/Y300S.

10 La **Figura 35** reproduce los resultados de experimentos de dicroísmo circular para determinar la estabilidad térmica relativa de un anticuerpo anti- $\alpha\beta$ TCR silvestre y un anticuerpo anti- $\alpha\beta$ TCR mutante que contiene la mutación S298N/Y300S.

La **Figura 36** reproduce los resultados de un ensayo de proliferación celular para ADC preparadas con el anticuerpo anti-HER que tiene la mutación de hiperglucosilación A114N y AO-MMAE.

15 La **Figura 37** es una ilustración esquemática de la síntesis de un conjugado de anticuerpo-fármaco donde un resto orientador se enlaza a un residuo de ácido siálico oxidado del glucano del anticuerpo usando un enlace oxima.

La **Figura 38** es una ilustración esquemática que representa un método ejemplar para realizar la conjugación específica del sitio de un anticuerpo a un glucopéptido a través de un enlace oxima según los métodos descritos.

La **Figura 39** es una ilustración esquemática que representa la conjugación específica del sitio de neoglucanos a anticuerpo a través de ácido siálico en glucanos Fc naturales.

20 La **Figura 40** es una serie de glucanos ejemplares que se pueden usar para conjugación incluyendo lactosa aminooxi y bis Man-6-P (o bisM6P) hexamanosa aminooxi (para la conjugación con aminooxi).

La **Figura 41** es una reproducción esquemática de la preparación de Man-6-P hexamanosa-maleimida.

La **Figura 42** reproduce la caracterización por SDS-PAGE y MALDI-TOF de conjugados de Man-6-P hexamanosa aminooxi elaborados con anticuerpo políclonal de conejo.

25 La **Figura 43** reproduce los resultados de experimentos de resonancia plasmónica superficial usados para valorar la unión de anticuerpos de IgG de conejo de control y conjugados a Man-6-P hexamanosa al receptor de Man-6-P.

La **Figura 44** reproduce la captación de anticuerpo IgG de conejo conjugado a Man-6-P en células HepG2 y RAW.

La **Figura 45** reproduce la caracterización de anticuerpos de control, conjugados a Man-6-P y conjugados a lactosa a través de SDS-PAGE y transferencia de lectina.

30 La **Figura 46** reproduce los resultados de análisis de proteína intacta por MALDI-TOF para anticuerpos de control, conjugados a Man-6-P y conjugados a lactosa.

La **Figura 47** reproduce la caracterización de anticuerpo políclonal conjugado a Man-6-P hexamanosa-maleimida (conjugación a tiol en las cisteínas de bisagra) a través de SDS-PAGE (no reductora y reductora), transferencia de lectina (reductora) y cuantificación de Man-6-P.

35 La **Figura 48** reproduce la caracterización de anticuerpo políclonal conjugado a lactosa-maleimida (conjugación a tiol en las cisteínas de bisagra) a través de SDS-PAGE y cuantificación de galactosa.

La **Figura 49** reproduce la caracterización de anticuerpo monoclonal conjugado a Man-6-P hexamanosa-maleimida (conjugación a tiol en las cisteínas de bisagra) a través de SDS-PAGE (no reductora y reductora) y cuantificación de glucano (bis Man-6-P).

La **Figura 50** reproduce los resultados de un análisis de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) de un conjugado cisteína de bisagra-anticuerpo policlonal.

La **Figura 51** reproduce los resultados de un análisis de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) de un conjugado cisteína de bisagra-anticuerpo monoclonal.

5 La **Figura 52** reproduce los resultados de la titulación de sialidasa y la cuantificación de ácido siálico para determinar la cantidad de liberación de ácido siálico de anticuerpos NNAS, NNAS sialilados y NNAS desialilados y galactosilados.

La **Figura 53** reproduce los resultados del análisis por MALDI-TOF MS para determinar las estructuras de glucano de un anticuerpo NNAS de ratón y un anticuerpo NNAS desialilado y galactosilado.

10 La **Figura 54** reproduce los resultados del análisis por MALDI-TOF MS para determinar las estructuras de glucano de un anticuerpo NNAS de ratón y un anticuerpo NNAS sialilado.

La **Figura 55** reproduce la caracterización de receptor de Man-6-P (CI-MPR) unido a anticuerpos policloniales y monoclonales conjugados a glucano Man-6-P a través de glucano Fc natural o disulfuros de bisagra usando PAGE natural.

15 La **Figura 56** reproduce la caracterización de anticuerpos NNAS modificados enzimáticamente y conjugados a glucopéptido mediante SDS-PAGE (4-12% NuPAGE; reductora y no reductora) y transferencia de lectina ECL (reductora).

La **Figura 57** reproduce los resultados de la cuantificación de galactosa terminal en un anticuerpo NNAS, un anticuerpo NNAS desialilado/galactosilado, y un anticuerpo NNAS conjugado en moles de galactosa o moles de glucopéptido por mol de anticuerpo.

20 La **Figura 58** reproduce el examen de lactosa-maleimida que se ha modificado con alfa-2,3-sialiltransferasa y eluido de columnas de purificación QAE con NaCl 20 mM. El eluido resultante se caracterizó usando MALDI-TOF MS y HPLC Dionex.

Las **Figuras 59 (A-B)** reproducen la caracterización de anticuerpo policlonal de conejo conjugado con sialil-lactosa-maleimida (reacción con tiol) usando SDS-PAGE y HPLC Dionex (cuantificación de ácido siálico).

25 Las **Figuras 60 (A-D)** reproducen la caracterización de lactosa-maleimida sialilada con alfa-2,6-sialiltransferasa y purificada usando una columna de QAE-sepharose. El análisis usando HPLC Dionex se muestra para (**Figura 60A**) un estándar de lactosa; (**Figura 60B**) un estándar de alfa-2,6-sialil-lactosa; (**Figura 60C**) un estándar de lactosa-maleimida; y (**Figura 60D**) una fracción de alfa-2,6-sialil-lactosa-maleimida eluida de un columna de QAE-sepharose.

30 La **Figura 61** reproduce la caracterización de una fracción de alfa-2,6-sialil-lactosa-maleimida eluida de una columna de QAE-sepharose usando MALDI-TOF MS.

Las **Figuras 62 (A-B)** reproducen la caracterización de un anticuerpo de control, un anticuerpo policlonal conjugado a glucano alfa-2,3-sialil-lactosa y un anticuerpo policlonal conjugado a glucano alfa-2,6-sialil-lactosa a través de SDS-PAGE y HPLC Dionex (se muestra la gráfica del análisis de ácido siálico).

35 La **Figura 63** reproduce la caracterización de anticuerpos de control y mutantes de NNAS modificados enzimáticamente (desialilados/galactosilados) usando SDS-PAGE y transferencia de lectina.

La **Figura 64** reproduce la caracterización a través de SDS-PAGE reductora y no reductora del anticuerpo de control PEGilado y Gal NNAS con diversas cantidades de galactosa oxidasa.

La **Figura 65** reproduce los resultados de la PEGilación estimada de una cadena pesada de anticuerpo a partir de la titulación previa de galactosa oxidasa usando ProteinSimple.

40 La **Figura 66** reproduce la caracterización a través de SDS-PAGE reductora y no reductora del anticuerpo de control PEGilado y Gal NNAS con diverso exceso molar de PEG sobre el anticuerpo.

La **Figura 67** reproduce los resultados de la PEGilación estimada de una cadena pesada de anticuerpo a partir de la titulación previa de PEG usando ProteinSimple

La **Figura 68** es un dibujo estructural del aminooxiglucopéptido, lactosa₃-Cys₃Gly₄.

Las **Figuras 69 (A-B)** reproducen la caracterización a través de SDS-PAGE reductora del anticuerpo de control PEGilado y Gal NNAS con galactosa oxidasa en ausencia de acetato de cobre (**Figura 69A**) y en presencia de cantidades variables de acetato de cobre (**Figura 69A** y **Figura 69B**).

5 La **Figura 70** reproduce la caracterización de Herceptin silvestre, A114N, NNAS y A114N/NNAS modificada enzimáticamente mediante SDS-PAGE (4-12% NuPAGE; reductora y no reductora) y transferencia de lectina ECL (reductora) junto con los resultados de la cuantificación de galactosa terminal en moles de galactosa por mol de anticuerpo.

10 La **Figura 71** es una tabla que reproduce el contenido de ácido siálico (en mol/mol) de anticuerpos silvestres y mutantes según se mide usando HPLC Dionex.

La **Figura 72** reproduce la caracterización de la PEGilación de anticuerpos silvestres y mutantes a través de SDS-PAGE reductora y no reductora.

La **Figura 73** es una tabla que reproduce la PEGilación (en mol/mol) de anticuerpos silvestres y mutantes estimada usando ProteinSimple.

15 La **Figura 74** es una serie de fotografías que reproducen la tinción por inmunofluorescencia de la captación por células HepG2 de anticuerpos de control, modificados enzimáticamente (con galactosiltransferasa) o conjugados (con lactosaaminoxí o lactosa-maleimida).

La **Figura 75** es una reproducción de un glucano GalNAc trivalente ejemplar.

20 La **Figura 76** reproduce los resultados de experimentos de resonancia plasmónica superficial usados para valorar la unión de anticuerpos conjugados a glucano GalNAc trivalente a la subunidad HI de ASGPR.

La **Figura 77** es una representación de un glucano que contiene GalNAc trivalente y un glucopéptido que contiene galactosa trivalente usados para conjugación.

25 La **Figura 78** reproduce los resultados de experimentos de resonancia plasmónica superficial usados para valorar la unión de enzimas lisosómicas recombinantes conjugadas a GalNAc trivalente y conjugadas a glucopéptido que contiene galactosa trivalente a la subunidad HI de ASGPR.

Las **Figuras 79 (A-D)** son una representación de glucanos GalNAc trivalentes adicionales.

La **Figura 80** es una representación de los resultados de la conjugación de la enzima lisosómica recombinante rhGAA oxidada con peryodato con un exceso de glucano GalNAc trivalente C12 (en un exceso molar de glucano de 20, 40, 80 y 200 veces sobre rhGAA). Se representa el glucano resultante conjugado por rhGAA.

30 La **Figura 81** reproduce la unión a ASGPR de enzimas lisosómicas recombinantes conjugadas con glucano GalNAc trivalente C12 en Biacore. Las enzimas conjugadas con un exceso de 20 (conjugado 1), 40, 80 y 200 veces (conjugado 4) de glucano muestran todas una fuerte unión a la subunidad 1 de ASGPR. No existe una diferencia significativa en la unión entre los conjugados (conjugados 1 a 4).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

35 La actual divulgación proporciona polipéptidos (p. ej., anticuerpos) de unión y sus conjugados con restos efectores (p. ej., conjugados con restos orientadores). En ciertos casos, los conjugados comprenden un enlace fármaco-glucano manipulado específicamente para un sitio dentro de glucanos naturales o modificados de un polipéptido de unión a antígeno tal como una molécula de IgG. La actual divulgación también proporciona ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de unión a antígeno, vectores de expresión recombinantes y células anfítrionas para elaborar polipéptidos de unión a antígenos. También se describen métodos para usar los polipéptidos de unión a antígeno divulgados en este documento para tratar una enfermedad.

I. Definiciones

A menos que se defina lo contrario en este documento, los términos científicos y técnicos usados en este documento tienen los significados que son entendidos comúnmente por los expertos normales en la técnica. En caso de cualquier ambigüedad latente, las definiciones proporcionadas en este documento tienen prioridad sobre cualquier definición de diccionario o extrínseca. A menos que se requiera lo contrario por el contexto, los términos singulares incluirán los plurales y los términos plurales incluirán el singular. El uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. El uso del término "que incluye", así como otras formas tales como "incluye" e "incluido", no es limitativo.

Generalmente, las nomenclaturas usadas en relación con el cultivo celular y tisular, la biología molecular, la inmunología, la microbiología, la genética y la química de las proteínas y los ácidos nucleicos y la hibridación descritas en este documento son las bien conocidas y comúnmente usadas en la técnica. Los métodos y las técnicas proporcionados en este documento se realizan generalmente según métodos convencionales bien conocidos en la técnica y que se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan y analizan a lo largo de la presente memoria descriptiva a menos que se indique otra cosa. Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan según las especificaciones del fabricante, según se efectúa comúnmente en la técnica o según se describe en este documento. Las nomenclaturas usadas en relación con, y los procedimientos y las técnicas de laboratorio de, la química analítica, la química orgánica sintética y la química médica y farmacéutica descritas en este documento son las bien conocidas y usadas comúnmente en la técnica. Se usan técnicas estándar para las síntesis químicas, los análisis químicos y la preparación, la formulación y el aporte farmacéuticos y el tratamiento de los pacientes.

Para que la divulgación se pueda entender más fácilmente, se definen posteriormente términos seleccionados.

El término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena polimérica de aminoácidos y abarca proteínas, análogos polipeptídicos o variantes naturales o artificiales de una secuencia proteínica, o fragmentos de los mismos, a menos que se contradiga de otro modo por el contexto. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico. Para un polipéptido antigénico, un fragmento de un polipéptido contiene opcionalmente al menos un epítopo contiguo o no lineal de un polipéptido. Los límites precisos del al menos un fragmento epítópico se pueden confirmar usando la experiencia normal en la técnica. Un fragmento polipeptídico comprende al menos aproximadamente 5 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 10 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 15 aminoácidos contiguos o al menos aproximadamente 20 aminoácidos contiguos, por ejemplo.

El término "proteína aislada" o "polipéptido aislado" se refiere a una proteína o un polipéptido que en virtud de su origen o fuente de derivación no está asociado con componentes naturalmente asociados que lo acompañan en su estado natural; está sustancialmente libre de otras proteínas de la misma especie; es expresado por una célula de una especie diferente; o no está presente en la naturaleza. Así, una proteína o un polipéptido que se sintetiza químicamente o se sintetiza en un sistema celular diferente de la célula de la que se origina naturalmente estará "aislado" de sus componentes naturalmente asociados. Una proteína o polipéptido se puede liberar sustancialmente de componentes naturalmente asociados mediante aislamiento usando técnicas de purificación de proteínas muy conocidas en la técnica.

Según se usa en este documento, el término "proteína de unión" o "polipéptido de unión" se referirá a una proteína o un polipéptido (p. ej., un anticuerpo o fragmento del mismo) que contiene al menos un sitio de unión que es responsable de unirse selectivamente a un antígeno diana de interés (p. ej., un antígeno humano). Sitios de unión ejemplares incluyen un dominio variable de anticuerpo, un sitio de unión al ligando de un receptor o un sitio de unión al receptor de un ligando. En ciertos aspectos, las proteínas de unión o los polipéptidos de unión comprenden múltiples (p. ej., dos, tres, cuatro o más) sitios de unión. En ciertos aspectos, la proteína de unión o polipéptido de unión no es una enzima terapéutica.

Según se usa en este documento, el término "residuo natural" se referirá a un residuo de aminoácido que está presente en la naturaleza en una posición de aminoácido particular de un polipéptido de unión (p. ej., un anticuerpo o fragmento del mismo) y que no se ha modificado, introducido o alterado por la mano del hombre. Según se usa en este documento, el término "proteína de unión alterada", "polipéptido de unión alterado", "proteína de unión modificada" o "polipéptido de unión modificado" se referirá a polipéptidos de unión y/o proteínas de unión (p. ej., un anticuerpo o fragmento del mismo) que comprende al menos una sustitución, eliminación y/o adición de aminoácidos con relación a la secuencia de aminoácidos natural (es decir, silvestre) y/o una mutación que da como resultado una glucosilación alterada (p. ej., hiper glucosilación, hipoglucosilación y/o aglucosilación) en una o más posiciones de aminoácido con relación a la secuencia de aminoácidos natural (es decir, silvestre).

Según se usa en este documento, el término "polipéptido de unión inicial" o "proteína de unión inicial" se referirá a un polipéptido de unión o proteína de unión que se pone en contacto con un agente suavemente oxidante para producir un "polipéptido de unión precursor" o una "proteína de unión precursora", respectivamente, (véanse las **Figuras 1A-C**). Según se usa en este documento, el término "polipéptido de unión precursor" o "proteína de unión precursora" se referirá a un polipéptido o una proteína suavemente oxidados que se pueden hacer reaccionar con uno o más de los restos efectores descritos en este documento. En ciertos casos, un polipéptido de unión inicial, una proteína de unión inicial, un polipéptido de unión precursor y/o una proteína de unión precursora (p. ej., un anticuerpo o fragmento del mismo) contiene al menos un sitio de unión que es responsable de unirse selectivamente a un antígeno diana de

interés (p. ej., un antígeno humano). Sitios de unión ejemplares incluyen un dominio variable de anticuerpo, un sitio de unión a ligando de un receptor o un sitio de unión a receptor de un ligando. En ciertos aspectos, un polipéptido de unión inicial, una proteína de unión inicial, un polipéptido de unión precursor y/o una proteína de unión precursora comprende múltiples (p. ej., dos, tres, cuatro o más) sitios de unión. En ciertos aspectos, el polipéptido de unión inicial,

5 la proteína de unión inicial, el polipéptido de unión precursor y/o la proteína de unión precursora no es una enzima terapéutica. Un polipéptido de unión inicial, una proteína de unión inicial, un polipéptido de unión precursor y/o una proteína de unión precursora puede tener una secuencia silvestre o puede comprender al menos una sustitución, eliminación y/o adición de aminoácidos con relación a la secuencia de aminoácidos natural (es decir, silvestre), y/o una mutación que dé como resultado una glucosilación alterada (p. ej., hiperglucosilación, hipoglucosilación y/o aglucosilación) en una o más posiciones de aminoácido con relación a la secuencia de aminoácidos natural (es decir, silvestre).

10 El término "ligando" se refiere a cualquier sustancia capaz de unión, o de unirse, a otra sustancia. De forma similar, el término "antígeno" se refiere a cualquier sustancia para la que se pueda generar un anticuerpo. Aunque "antígeno" se usa comúnmente en referencia a un sustrato de unión a anticuerpo y "ligando" se usa a menudo cuando se hace referencia a sustratos de unión a receptor, estos términos no se distinguen uno de otro, y abarcan una amplia gama de entidades químicas que se solapan. Para evitar dudas, antígeno y ligando se usan indistintamente a lo largo de este documento. Los antígenos/ligandos pueden ser un péptido, un polipéptido, una proteína, un aptámero, un polisacárido, una molécula de azúcar, un carbohidrato, un lípido, un oligonucleótido, un polinucleótido, una molécula sintética, una molécula inorgánica, una molécula orgánica, y cualquier combinación de los mismos.

15 El término "se une específicamente", según se usa en este documento, se refiere a la capacidad de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo para unirse a un antígeno con una constante de disociación (K_d) de como mucho aproximadamente 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, 1×10^{-12} M, o menos, y/o para unirse a un antígeno con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad para un antígeno inespecífico.

20 Según se usa en este documento, el término "anticuerpo" se refiere a estos ensamblajes (p. ej., moléculas de anticuerpo intactas, fragmentos de anticuerpo, o variantes de los mismos) que tienen actividad inmunorreactiva específica conocida significativa para un antígeno de interés (p. ej., un antígeno asociado a un tumor). Los anticuerpos y las inmunoglobulinas comprenden cadenas ligeras y pesadas, con o sin un enlace covalente intercatenario entre ellas. Las estructuras inmunoglobulínicas básicas en sistemas de vertebrados se entienden relativamente bien.

25 Como se entenderá con más detalle posteriormente, el término genérico "anticuerpo" comprende cinco clases distintas de anticuerpo que se pueden distinguir bioquímicamente. Aunque las cinco clases de anticuerpos están claramente dentro del alcance de la actual divulgación, el siguiente análisis se dirigirá generalmente a la clase IgG de moléculas de inmunoglobulina. Con respecto a IgG, las inmunoglobulinas comprenden dos cadenas ligeras idénticas de peso molecular aproximadamente 23.000 daltons, y dos cadenas pesadas idénticas de peso molecular 53.000-70.000. Las cuatro cadenas estas empalmadas por uniones disulfuro en una configuración en "Y" en la que las cadenas ligeras encuadran a las cadenas pesadas partiendo de la boca de la "Y" y continuando a través de la región variable.

30 Las cadenas ligeras de inmunoglobulina se clasifican bien como kappa o bien como lambda (κ , λ). Cada clase de cadena pesada puede estar unida con una cadena ligera bien kappa o bien lambda. En general, las cadenas ligeras y pesadas están unidas covalentemente entre sí, y las porciones de "cola" de las dos cadenas pesadas están unidas entre sí por enlaces disulfuro covalentes o enlaces no covalentes cuando las inmunoglobulinas son generadas bien por hibridomas, bien por células B o bien por células anfítrionas genéticamente manipuladas. En la cadena pesada, las secuencias de aminoácidos van desde un extremo N en las puntas bifurcadas de la configuración de Y hasta el extremo C en la parte inferior de cada cadena. Los expertos en la técnica apreciarán que las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o epsilon (γ , μ , α , δ , ϵ) con algunas subclases entre ellas (p. ej., $\gamma 1$ - $\gamma 4$). Es la naturaleza de esta cadena lo que determina la "clase" del anticuerpo como IgG, IgM, IgA IgG o IgE, respectivamente. Las subclases de isotipos de inmunoglobulina (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, etc.) están bien caracterizadas y se sabe que confieren especialización funcional. Las versiones modificadas de cada una de estas clases e isotipos son fácilmente discernibles por el experto a la vista de la actual divulgación y, según esto, están dentro del alcance de la actual divulgación.

35 45 50 55 Tanto las cadenas ligeras como las pesadas se dividen en regiones de homología estructural y funcional. El término "región" se refiere a una parte o porción de una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo e incluye región constante o regiones variables, así como partes o porciones más discretas de dichas regiones. Por ejemplo, las regiones variables de las cadenas ligeras incluyen "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR" intercaladas entre "regiones marco" o "FR", según se definen en este documento.

60 65 Las regiones de una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina se pueden definir como región "constante" (C) o regiones "variables" (V), basándose en la falta relativa de variación de secuencia dentro de las regiones de diversos miembros de la clase en el caso de una "región constante", o la variación significativa dentro de las regiones de diversos miembros de una clase en el caso de "regiones variables". Los términos "región constante" y "región variable" también se pueden usar funcionalmente. A este respecto, se apreciará que las regiones variables de una

5 inmunoglobulina o un anticuerpo determinan el reconocimiento y la especificidad para el antígeno. A la inversa, las regiones constantes de una inmunoglobulina o un anticuerpo confieren importantes funciones efectoras tales como secreción, movilidad transplacentaria, unión a receptores de Fc, unión al complemento, y similares. Las estructuras subunitarias y las configuraciones tridimensionales de las regiones constantes de las diversas clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

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

15 Por convención, la numeración de los dominios de las regiones constantes variables se incrementa a medida que se hacen más distales del sitio de unión al antígeno o el extremo amino de la inmunoglobulina o el anticuerpo. El extremo N de cada cadena pesada y ligera de inmunoglobulina es una región variable y en el extremo C es una región constante; los dominios CH3 y CL comprenden realmente el extremo carboxi de la cadena pesada y ligera, respectivamente. Según esto, los dominios de una inmunoglobulina de cadena ligera están dispuestos en una orientación VL-CL, mientras que los dominios de la cadena pesada están dispuestos en la orientación VH-CH1-bisagra-CH2-CH3.

20 25 Las posiciones de los aminoácidos en una región constante de la cadena pesada, incluyendo las posiciones de los aminoácidos en los dominios CH1, bisagra, CH2, CH3 y CL, se pueden numerar según el sistema de numeración del índice de Kabat (véase Kabat y cols., en "Sequences of Proteins of Immunological Interest", U.S. Dept. Health and Human Services, 5^a edición, 1991). Alternativamente, las posiciones de los aminoácidos de un anticuerpo se pueden numerar según el sistema de numeración del índice EU (véase Kabat y cols, ibíd.).

30 35 Según se usa en este documento, el término "dominio VH" incluye el dominio variable aminoterminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, y el término "dominio VL" incluye el dominio variable aminoterminal de una cadena ligera de inmunoglobulina.

40 45 Según se usa en este documento, el término "dominio CH1" incluye el primer (el más aminoterminal) dominio de la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina que se extiende, p. ej., desde aproximadamente las posiciones 114-223 en el sistema de numeración de Kabat (posiciones EU 118-215). El dominio CH1 es adyacente al dominio VH y aminoterminal a la región de bisagra de una molécula de la cadena pesada de inmunoglobulina, y no forma parte de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina.

50 55 Según se usa en este documento, el término "región de bisagra" incluye la porción de una molécula de la cadena pesada que empalma el dominio CH1 al dominio CH2. Esta región de bisagra comprende aproximadamente 25 residuos y es flexible, permitiendo así que las dos regiones de unión a antígeno N-terminales se muevan independientemente. Las regiones de bisagra se pueden subdividir en tres dominios distintos: dominios de bisagra superior, medio e inferior (Roux y cols. J. Immunol. 1998, 161 :4083).

60 65 Según se usa en este documento, el término "dominio CH2" incluye la porción de una molécula de inmunoglobulina de cadena pesada que se extiende, p. ej., desde aproximadamente las posiciones 244-360 en el sistema de numeración de Kabat (posiciones EU 231-340). El dominio CH2 es único en que no está estrechamente apareado con otro dominio. En cambio, dos cadenas de carbohidrato enlazadas por N están interpuestas entre los dos dominios CH2 de una molécula de IgG natural intacta. En una realización, un polipéptido de unión de la actual divulgación comprende un dominio CH2 derivado de una molécula de IgG1 (p. ej. una molécula de IgG1 humana).

70 75 Según se usa en este documento, el término "dominio CH3" incluye la porción de una molécula de inmunoglobulina de cadena pesada que se extiende aproximadamente 110 residuos desde el extremo N del dominio CH2, p. ej., desde aproximadamente las posiciones 361-476 del sistema de numeración de Kabat (posiciones EU 341-445). El dominio CH3 forma típicamente la porción C-terminal del anticuerpo. Sin embargo, en algunas inmunoglobulinas, dominios adicionales se pueden extender desde el dominio CH3 para formar la porción C-terminal de la molécula (p. ej. el dominio CH4 en la cadena μ de IgM y la cadena e de IgE). En una realización, un polipéptido de unión de la actual divulgación comprende un dominio CH3 derivado de una molécula de IgG1 (p. ej. una molécula de IgG1 humana).

80 85 Según se usa en este documento, el término "dominio CL" incluye el dominio de la región constante de una cadena ligera de inmunoglobulina que se extiende, p. ej., desde aproximadamente la posición Kabat 107A-216. El dominio CL es adyacente al dominio VL. En una realización, un polipéptido de unión de la actual divulgación comprende un dominio CL derivado de una cadena ligera kappa (p. ej., una cadena ligera kappa humana).

Según se usa en este documento, el término "región Fc" se define como la porción de una región constante de la cadena pesada que comienza en la región de bisagra justo aguas arriba del sitio de escisión de papaína (es decir, el residuo 216 en IgG, considerando que el primer residuo de la región constante de la cadena pesada es 114) y que termina en el extremo C del anticuerpo. Según esto, una región Fc completa comprende al menos un dominio de bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3.

El término "Fc natural", según se usa en este documento, se refiere a una molécula que comprende la secuencia de un fragmento que no se une a antígeno resultante de la digestión de un anticuerpo o producido por otros medios, ya esté en forma monómera o multímera, y puede contener la región de bisagra. La fuente de inmunoglobulina original del Fc natural es típicamente de origen humano y puede ser cualquiera de las inmunoglobulinas, tales como IgG1 e IgG2. Las moléculas Fc naturales están constituidas por polipéptidos monómeros que pueden estar enlazados en formas dímeras o multímeras mediante asociación covalente (es decir, uniones disulfuro) y no covalente. El número de uniones disulfuro intermoleculares entre subunidades monómeras de moléculas de Fc natural varía de 1 a 4 dependiendo de la clase (p. ej., IgG, IgA y IgE) o subclase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgA1 y IgGA2). Un ejemplo de un Fc natural es un dímero unido por disulfuro resultante de la digestión con papaína de una IgG. El término "Fc natural", según se usa en este documento, es genérico para las formas monómeras, dímeras y multímeras.

El término "variante de Fc", según se usa en este documento, se refiere a una molécula o secuencia que está modificada con respecto a un Fc natural pero todavía comprende un sitio de unión para el receptor de rescate, FcRn (receptor de Fc neonatal). Se conocen en la técnica variantes de Fc ejemplares, y su interacción con el receptor de rescate. Así, el término "variante de Fc" puede comprender una molécula o secuencia que se humaniza a partir de un Fc natural no humano. Por otra parte, un Fc natural comprende regiones que se pueden retirar debido a que proporcionan rasgos estructurales o actividad biológica que no se requieren para polipéptidos de unión de tipo anticuerpo presentados en esta divulgación. Así, el término "variante de Fc" comprende una molécula o secuencia que carece de uno o más sitios o residuos de Fc natural, o en la que uno o más sitios o residuos de Fc se han modificado, que afectan o están implicados en: (1) la formación de uniones disulfuro, (2) incompatibilidad con una célula anfítriona seleccionada, (3) heterogeneidad N-terminal tras la expresión en una célula anfítriona seleccionada, (4) glicosilación, (5) interacción con el complemento, (6) unión a un receptor de Fc distinto al receptor de rescate, o (7) citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

El término "dominio Fc", según se usa en este documento, abarca Fc natural y variantes y secuencias de Fc según se definen anteriormente. Como con las variantes de Fc y las moléculas de Fc natural, el término "dominio Fc" incluye moléculas en forma monómera o multímera, ya sea digeridas a partir del anticuerpo entero o producidas por otros medios.

Según se indica anteriormente, las regiones variables de un anticuerpo le permiten reconocer selectivamente y unirse específicamente a epítopos sobre antígenos. Esto es, el dominio VL y el dominio VH de un anticuerpo se combinan para formar la región variable (Fv) que define un sitio de unión a antígeno tridimensional. Esta estructura cuaternaria del anticuerpo forma el sitio de unión a antígeno presente al final de cada brazo de la Y. Más específicamente, el sitio de unión a antígeno está definido por tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) sobre cada una de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras. Según se usa en este documento, el término "sitio de unión a antígeno" incluye un sitio que se une específicamente a (inmunorreacciona con) un antígeno (p. ej., un antígeno de la superficie celular o soluble). El sitio de unión a antígeno incluye una región variable de la cadena pesada y la cadena ligera de inmunoglobulina y el sitio de unión formado por estas regiones variables determina la especificidad del anticuerpo. Un sitio de unión a antígeno está formado por regiones variables que varían de un anticuerpo a otro. Los anticuerpos alterados de la actual divulgación comprenden al menos un sitio de unión a antígeno.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos de unión de la actual divulgación comprenden al menos dos dominios de unión a antígeno que proporcionan la asociación del polipéptido de unión con el antígeno seleccionado. Los dominios de unión a antígeno no necesitan derivarse de la misma molécula de inmunoglobulina. A este respecto, la región variable puede derivarse o se deriva de cualquier tipo de animal que pueda ser inducido para montar una respuesta humoral y generar inmunoglobulinas contra el antígeno deseado. Como tal, la región variable del un polipéptido de unión puede ser, por ejemplo, de origen mamífero, p. ej., puede ser humana, murina, de rata, cabra, oveja, primate no humano (tal como macaco de Java, macacos, etc.), lupina o de camélido (p. ej., de camellos, llamas y especies relacionadas).

En anticuerpos presentes en la naturaleza, las seis CDR presentes sobre cada anticuerpo monomérico son secuencias no contiguas cortas de aminoácidos que están situadas específicamente para formar el sitio de unión a antígeno cuando el anticuerpo asume su configuración tridimensional en un ambiente acuoso. El resto de los dominios variables pesados y ligeros muestra menos variabilidad intermolecular en la secuencia de aminoácidos y se denominan las regiones marco. Las regiones marco adoptan en gran parte una conformación de lámina β y las CDR forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de la lámina β . Así, estas regiones marco actúan para formar un andamiaje que proporciona la colocación de las seis CDR en orientación correcta mediante interacciones no covalentes intercatenarias. El dominio de unión a antígeno formado por las CDRs colocadas define una superficie

complementaria al epítopo sobre el antígeno inmunorreactivo. Esta superficie complementaria promueve la unión no covalente del anticuerpo al epítopo antigénico inmunorreactivo.

5 Polipéptidos de unión ejemplares incluyen variantes de anticuerpo. Según se usa en este documento, el término "variante de anticuerpo" incluye formas sintéticas y manipuladas de anticuerpos que se alteran de modo que no sean anticuerpos presentes en la naturaleza, p. ej., que comprenden al menos dos porciones de cadena pesada pero no dos cadenas pesadas completas (tales como anticuerpos con dominios eliminados o minicuerpos); formas multiespecíficas de anticuerpos (p. ej., biespecíficas, triespecíficas, etc.) alteradas para unirse a dos o más antígenos diferentes o a diferentes epítopos sobre un solo antígeno; moléculas de cadena pesada empalmadas a moléculas de 10 scFv y similares. Además, el término "variante de anticuerpo" incluye formas multivalentes de anticuerpos (p. ej., anticuerpos trivalentes, tetravalentes, etc., que se unen a tres, cuatro o más copias del mismo antígeno).

15 Según se usa en este documento, el término "valencia" se refiere al número de sitios de unión a una diana potenciales en un polipéptido. Cada sitio de unión a una diana se une específicamente a una molécula diana o un sitio específico sobre una molécula diana. Cuando un polipéptido comprende más de un sitio de unión a una diana, cada sitio de unión a una diana puede unirse específicamente a moléculas iguales o diferentes (p. ej., se puede unir a diferentes ligandos o diferentes antígenos, o diferentes epítopos sobre el mismo antígeno). Los polipéptidos de unión en cuestión típicamente tiene al menos un sitio de unión específico para una molécula de antígeno humano.

20 20 El término "especificidad" se refiere a la capacidad para unirse específicamente (p. ej., inmunorreaccionar con) un antígeno diana dado (p. ej., un antígeno diana humano). Un polipéptido de unión puede ser monoespecífico y contener uno o más sitios de unión que se unen específicamente a una diana o un polipéptido puede ser multiespecífico y contener dos o más sitios de unión que se unen específicamente a dianas iguales o diferentes. En ciertas realizaciones, un polipéptido de unión es específico para dos porciones diferentes (p. ej., no solapadas) de la misma diana. En ciertas 25 realizaciones, un polipéptido de unión es específico para más de una diana. Se conocen en la técnica polipéptidos de unión (p. ej., anticuerpos) ejemplares que comprenden sitios de unión a antígeno que se unen a antígenos expresados sobre células tumorales y una o más CDR procedentes de estos anticuerpos se pueden incluir en un anticuerpo caracterizado en esta divulgación.

30 30 El término "resto de enlace" incluye restos que son capaces de enlazar el resto efector a los polipéptidos de unión divulgados en este documento. El resto de enlace se puede seleccionar de modo que sea escindible (p. ej., escindible enzimáticamente o sensible al pH) o no escindible. Restos de enlace ejemplares se indican en la Tabla 2 en este documento.

35 35 Según se usa en este documento, el término "resto efector" comprende agentes (p. ej. proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos, glucopéptidos, y fragmentos de los mismos) con actividad biológica u otra funcional. Por ejemplo, un polipéptido de unión modificado que comprende un resto efector conjugado a un polipéptido de unión tiene al menos una función o propiedad adicional en comparación con el anticuerpo no conjugado. Por ejemplo, la conjugación de un fármaco citotóxico (p. ej., un resto efector) a un polipéptido de unión da como resultado la formación 40 de un polipéptido de unión con citotoxicidad farmacológica como segunda función (es decir además de la unión a antígeno). En otro ejemplo, la conjugación de un segundo polipéptido de unión al polipéptido de unión puede conferir propiedades de unión adicionales. En ciertos casos, cuando el resto efector es una proteína o un ácido nucleico terapéutico o diagnóstico codificado genéticamente, el resto efector se pueden sintetizar o expresar mediante métodos bien de síntesis de péptidos o bien de ADN recombinante que son bien conocidos en la técnica. En otro aspecto, 45 cuando el resto efector sea un péptido no codificado genéticamente, o un resto farmacológico, el resto efector se puede sintetizar artificialmente o purificar a partir de una fuente natural. Según se usa en este documento, el término "resto farmacológico" incluye agentes terapéuticos antiinflamatorios, anticancerosos, antiinfecciosos (p. ej., antifúngicos, antibacterianos, antiparasitarios, antivirales, etc.), y agentes terapéuticos anestésicos. En un caso adicional, el resto farmacológico es un agente anticanceroso o citotóxico. Restos farmacológicos compatibles también 50 pueden comprender profármacos. Restos efectores ejemplares se indican en la Tabla 1 en este documento.

55 55 Según se usa en este documento, el término "suavemente oxidante" se refiere a un reactivo que acepta un electrón de otra especie (y por lo tanto se reduce), pero no atrae esos electrones muy fuertemente. Ejemplos de agentes suavemente oxidantes incluyen, pero no se limitan a, peryodato oxidasa y galactosa oxidasa.

60 60 En ciertos casos, un "resto efector" comprende un "resto orientador." Según se usa en este documento, el término "resto orientador" se refiere a un resto efector que se une a una molécula diana. Restos orientadores pueden comprender, sin limitación, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos (p. ej., glucanos), y combinaciones de los mismos (p. ej., glucoproteínas, glucopéptidos y glucolípidos).

65 65 Según se usa en este documento, el término "profármaco" se refiere a una forma precursora o derivada de un agente farmacéuticamente activo que es menos activa, reactiva o propensa a efectos secundarios en comparación con el fármaco original y es capaz de activarse enzimáticamente o convertirse de otro modo en una forma más activa *in vivo*. Profármacos compatibles con las composiciones de la actual divulgación incluyen, pero no se limitan a, profármacos que contienen fosfatos, profármacos que contienen aminoácidos, profármacos que contienen tiofosfatos, profármacos que contienen sulfatos, profármacos que contienen péptidos, profármacos que contienen β-lactamas, profármacos

que contienen fenoxiacetamidas opcionalmente sustituidas o profármacos que contienen fenilacetamidas opcionalmente sustituidas, profármacos de 5-fluorocitosina y otras 5-fluorouridinas que se pueden convertir en el fármaco libre citotóxico más activo. Un experto en la técnica puede realizar modificaciones químicas en el resto farmacológico deseado o su profármaco a fin de hacer a las reacciones de ese compuesto más convenientes con los fines de preparar polipéptidos de unión modificados de la actual divulgación. Los restos farmacológicos también incluyen derivados, sales farmacéuticamente aceptables, ésteres, amidas y éteres de los restos farmacológicos descritos en este documento. Los derivados incluyen modificaciones en los fármacos identificados en este documento que pueden mejorar o no reducir significativamente una actividad terapéutica deseada de un fármaco particular.

5 10 Según se usa en este documento, el término "agente anticanceroso" incluye agentes que son perjudiciales para el crecimiento y/o la proliferación de células neoplásicas o tumorales y pueden actuar para reducir, inhibir o destruir la neoplasia maligna. Ejemplos de estos agentes incluyen, pero no se limitan a, agentes citostáticos, agentes alquilantes, antibióticos, nucleósidos citotóxicos, agentes que se unen a tubulina, hormonas, antagonistas de hormonas, agentes citotóxicos, y similares. Agentes citotóxicos incluyen derivados de tomaimicina, derivados de maitansina, derivados de criptoficina, derivados de antraciclina, derivados de bisfosfonato, derivados de leptomicina, derivados de estreptonigrina, derivados de auristatina y derivados de duocarmicina. Cualquier agente que actúe para retardar o frenar el crecimiento de células inmunorreactivas o células malignas está dentro del alcance de la actual divulgación.

15 20 El término "antígeno" o "antígeno diana", según se usa en este documento, se refiere a una molécula o una porción de una molécula que es capaz de ser unida por el sitio de unión de un polipéptido de unión. Un antígeno diana puede tener uno o más epítopos.

25 25 El término "sal" comprende un ion metálico. Por ejemplo, un ion metálico incluye, pero no se limita a, un metal alcalino (Grupo Ia), p. ej. litio, sodio y potasio, un metal alcalinotérreo (Grupo IIa), p. ej., magnesio y calcio, un metal de transición, p. ej., cobre, cinc, níquel, hierro y manganeso en valencias habituales. Valencias habituales ejemplares de metales incluyen, por ejemplo, sodio(I), calcio(II), magnesio(II), cinc(II), cobre(I) y cobre(II). Sales ejemplares que comprenden un ion metálico incluyen, pero no se limitan a, acetato de cobre(II) ($Cu_2(OAc)_4$), acetato de cinc(II) ($Zn_2(OAc)_4$), cloruro de hierro (Fe_3Cl_3) y cloruro cálcico ($CaCl_2$).

II. Polipéptidos de unión

30 35 En un aspecto, la actual divulgación proporciona polipéptidos (p. ej., anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, variantes de anticuerpo y proteínas de fusión) de unión que comprenden un dominio glucosilado, p. ej., un dominio constante glucosilado. Los polipéptidos de unión divulgados en este documento abarcan cualquier polipéptido de unión que comprende un dominio que tiene un sitio de glucosilación enlazado por N. En ciertas realizaciones, el polipéptido de unión es un anticuerpo o un fragmento o derivado del mismo. Cualquier anticuerpo procedente de cualquier fuente o especie se puede emplear en los polipéptidos de unión divulgados en este documento. Anticuerpos adecuados incluyen, sin limitación, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados o anticuerpos quiméricos.

40 45 En ciertas realizaciones, el dominio glucosilado es un dominio Fc. En ciertas realizaciones, el dominio de glucosilación es un dominio de glucosilación natural en N297, según la numeración de EU.

45 50 En otras realizaciones, el dominio de glucosilación es un dominio de glucosilación manipulado. Dominios de glucosilación manipulados ejemplares en el dominio Fc comprenden un residuo de asparagina en la posición de aminoácido 298, según la numeración de EU y/o un residuo de serina o treonina en la posición de aminoácido 300, según la numeración de EU.

55 60 Dominios de Fc procedentes de cualquier clase de inmunoglobulina (p. ej., IgM, IgG, IgD, IgA e IgE) y especie se pueden usar en los polipéptidos de unión divulgados en este documento. También se pueden emplear dominios Fc quiméricos que comprenden porciones de dominios Fc de diferentes especies o clases de Ig. En ciertas realizaciones, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG1 humana. En el caso de un dominio Fc de IgG1 humana, la mutación del aminoácido silvestre en la posición de Kabat 298 por una asparagina y la posición de Kabat 300 por una serina o treonina da como resultado la formación de un sitio de consenso de glucosilación enlazado por N (es decir, el secuón N-X-T/S, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina). Sin embargo, en el caso de dominios Fc de otras especies y/o clases o isotipos de Ig, el experto apreciará que puede ser necesario mutar la posición de Kabat 299 del dominio Fc si está presente un residuo de prolina para recrear un secuón N-X-T/S.

65 70 En otras realizaciones, la actual divulgación proporciona polipéptidos de unión (p. ej., anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, variantes de anticuerpo y proteínas de fusión) que comprenden al menos un dominio CH1 que tiene un sitio de glucosilación enlazado por N. Estos polipéptidos de unión ejemplares pueden comprender, por ejemplo, y sitio de glucosilación manipulado en la posición 114, según la numeración de Kabat.

75 80 Se pueden usar dominios CH1 procedentes de cualquier clase de inmunoglobulina (p. ej., IgM, IgG, IgD, IgA e IgE) y especie en los polipéptidos de unión divulgados en este documento. También se pueden emplear dominios CH1 quiméricos que comprenden porciones de dominios CH1 procedentes de diferentes especies o clases de Ig. En ciertas

realizaciones, el dominio CH1 es un dominio CH1 de IgG1 humana. En el caso de un dominio de IgG1 humana, la mutación del aminoácido silvestre en la posición 114 por una asparagina da como resultado la formación de un sitio de consenso de glucosilación enlazado por N (es decir, el secuón N-X-T/S, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina). Sin embargo, en el caso de otros dominios CH1 de otras especies y/o clases o isotipos de Ig, el experto apreciará que puede ser necesario mutar las posiciones 115 y/o 116 del dominio CH1 para crear un secuón N-X-T/S.

5 En ciertas realizaciones, el polipéptido de unión de la actual divulgación puede comprender un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo. El término "fragmento de unión a antígeno" se refiere a un fragmento polipeptídico de una inmunoglobulina o un anticuerpo que se une al antígeno o compite con el anticuerpo intacto (es decir, con el anticuerpo intacto del que se derivaban) con respecto a la unión al antígeno (es decir, unión específica). Los fragmentos de unión a antígeno se pueden producir mediante métodos recombinantes o bioquímicos que son muy conocidos en la técnica. Fragmentos de unión a antígeno ejemplares incluyen Fv, Fab, Fab' y (Fab')2. En realizaciones ejemplares, el fragmento de unión a antígeno de la actual divulgación es un fragmento de unión a antígeno alterado que comprende al menos un sitio de glucosilación manipulado. En una realización ejemplar, un fragmento de unión a antígeno alterado de la actual divulgación comprende un dominio VH alterado descrito anteriormente. En otra realización ejemplar, un fragmento que se une a antígeno alterado de la actual divulgación comprende un dominio CH1 alterado descrito.

10 En realizaciones ejemplares, el polipéptido de unión comprende una secuencia de la región variable monocatenaria (ScFv). Las secuencias de la región variable monocatenarias comprenden un solo polipéptido que tiene uno o más sitios de unión a antígeno, p. ej., un dominio VL enlazado por un enlazador flexible a un dominio VH. Las moléculas de ScFv se pueden construir en una orientación VH-enlazador-VL o una orientación VL-enlazador-VH. La bisagra flexible que enlaza los dominios VL y VH que constituyen el sitio de unión a antígeno incluye de aproximadamente 10 a 25 aproximadamente 50 residuos de aminoácido. Se conocen en la técnica péptidos de conexión. Los polipéptidos de unión pueden comprender al menos una scFv y/o al menos una región constante. En una realización, un polipéptido de unión de la actual divulgación puede comprender al menos una scFv enlazada o fusionada a un anticuerpo o fragmento que comprende un dominio CH1 (p. ej. un dominio CH1 que comprende un residuo de asparagina en la posición de Kabat 114/la posición de EU 118) y/o un dominio CH2 (p. ej. un dominio CH2 que comprende un residuo de asparagina en la posición de EU 298 y un residuo de serina o treonina en la posición de EU 300).

15 20 25 30 35 En ciertas realizaciones ejemplares, un polipéptido de unión de la actual divulgación es un anticuerpo multivalente (p. ej., tetravalente) que se produce al fusionar una secuencia de ADN que codifica un anticuerpo con una molécula de ScFv (p. ej., una molécula de ScFv alterada). Por ejemplo, en una realización, estas secuencias se combinan de modo que la molécula de ScFv (p. ej., una molécula de ScFv alterada) esté enlazada en su extremo N o extremo C a un fragmento Fc de un anticuerpo a través de un enlazador flexible (p. ej., un enlazador de gly/ser). En otra realización, un anticuerpo tetravalente de la actual divulgación se puede elaborar al fusionar una molécula de ScFv a un péptido de conexión, que está fusionado a un dominio CH1 (p. ej., un dominio CH1 que comprende un residuo de asparagina en la posición de Kabat 114/la posición de EU 118) para construir una molécula tetravalente de ScFv-Fab.

40 45 En otra realización, un polipéptido de unión de la actual divulgación es un minicuerpo alterado. Un minicuerpo alterado de la actual divulgación es una molécula dímera constituida por dos cadenas polipeptídicas que comprenden cada una una molécula de ScFv (p. ej., una molécula de ScFv alterada que comprende un dominio VH alterado descrita anteriormente) que está fusionada a un dominio CH3 o una porción del mismo a través de un péptido de conexión. Los minicuerpos se pueden elaborar al construir un componente de ScFv y conectar los componentes péptido-CH3 usando métodos descritos en la técnica (véanse, p. ej., la patente de EE. UU. 5.837.821 o el documento WO 94/09817A1). En otra realización, se puede construir un minicuerpo tetravalente. Los minicuerpos tetravalentes se pueden construir del mismo modo que los minicuerpos, excepto que dos moléculas de ScFv se enlazan usando un enlazador flexible. La construcción scFv-scFv enlazada se empalma entonces a un dominio CH3.

50 55 En otra realización, un polipéptido de unión de la actual divulgación comprende un diacuerpo. Los diacuerpos son moléculas tetravalentes dímeras que tienen cada una un polipéptido similar a moléculas de scFv, pero que habitualmente tienen un enlazador de residuos de aminoácido corto (menos de 10, p. ej., 1-5) que conecta ambos dominios variables, de modo que los dominios VL y VH sobre la misma cadena polipeptídica no puedan interactuar. En cambio, el dominio VL y VH de una cadena polipeptídica interactúa con el dominio VH y VL (respectivamente) sobre una segunda cadena polipeptídica (véase, por ejemplo, el documento WO 02/02781). Los diacuerpos de la actual divulgación comprenden una molécula de scFv fusionada a un dominio CH3.

60 65 En otras realizaciones, los polipéptidos de unión comprenden anticuerpos multiespecíficos o multivalentes que comprenden uno o más dominios variables en serie sobre la misma cadena polipeptídica, p. ej., polipéptidos de dominios variables en tándem (TVD). Polipéptidos de TVD ejemplares incluyen la configuración de "doble cabeza" o "Fv dual" descrita en la Patente de EE. UU. N° 5.989.830. En la configuración de Fv dual, los dominios variables de dos anticuerpos diferentes se expresan en una orientación en tándem sobre dos cadenas separadas (una cadena pesada y una cadena ligera), donde una cadena polipeptídica tiene dos dominios VH en serie separados por un enlazador peptídico (VH1-enlazador-VH2) y la otra cadena polipeptídica consiste en dominios VL complementarios conectados en serie por un enlazador peptídico (VL1-enlazador-VL2). En la configuración de doble cabeza transversal, los dominios variables de dos anticuerpos diferentes se expresan en una orientación en tándem sobre dos cadenas polipeptídicas separadas (una cadena pesada y una cadena ligera), donde una cadena polipeptídica tiene dos

dominios VH en serie separados por un enlazador peptídico (VH1-enlazador-VH2) y la otra cadena polipeptídica consiste en dominios VL complementarios conectados en serie por un enlazador peptídico en la orientación opuesta (VL2-enlazador-VL1). Variantes de anticuerpo adicionales basadas en el formato de "Fv dual" incluyen el anticuerpo biespecífico de IgG de dominio variable dual (DVD-IgG) (véase la Patente de EE. UU. N° 7.612.181 y el formato TBTI (véase el documento US 2010/0226923 A1). La adición de dominios constantes a cadenas respectivas de la Fv dual (CH1-Fc a la cadena pesada y el dominio contante kappa o lambda a la cadena ligera) conduce a anticuerpos biespecíficos funcionales sin la necesidad de modificaciones adicionales (es decir, adición obvia de dominios constantes para potenciar la estabilidad).

- 5 10 En otra realización exemplar, el polipéptido de unión comprende un anticuerpo biespecífico de IgG de dominio variable dual transversal (CODV-IgG) basado en una configuración de "doble cabeza" (véase el documento US20120251541 A1). Las variantes de anticuerpo de CODV-IgG tienen una cadena polipeptídica con dominios VL conectados en serie a un dominio CL (VL1-L1-VL2-L2-CL) y una segunda cadena polipeptídica con dominios VH complementarios conectados en serie en la orientación opuesta a un dominio CH1 (VH2-L3-VH1-L4-CH1), donde las cadenas polipeptídicas forman un par cadena ligera-cadena pesada transversal. En cierta realización, el segundo polipéptido puede estar conectado además a un dominio Fc (VH2-L3-VH1-L4-CH1-Fc). En ciertas realizaciones, el enlazador L3 es al menos dos veces más largo que el enlazador L1 y/o el enlazador L4 es al menos más largo que el enlazador L2. Por ejemplo, L1 y L2 pueden tener una longitud de 1-3 residuos de aminoácido, L3 puede tener una longitud de 2 a 6 residuos de aminoácido y L4 puede tener una longitud de 4 a 7 residuos de aminoácido. Ejemplos de enlazadores adecuados incluyen un residuo de una sola glicina (Gly); un péptido de diglicina (Gly-Gly); un tripéptido (Gly-Gly-Gly); un péptido con cuatro residuos de glicina (Gly-Gly-Gly-Gly) (SEQ ID NO: 40); un péptido con cinco residuos de glicina (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly) (SEQ ID NO: 41); un péptido con seis residuos de glicina (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly) (SEQ ID NO: 42); un péptido con siete residuos de glicina (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly) (SEQ ID NO: 43); un péptido con ocho residuos de glicina (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly) (SEQ ID NO: 44). Se pueden usar otras combinaciones de residuos de aminoácidos tales como el péptido Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 45) y el péptido Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 46).
- 15 20 25 30 35 40

En ciertas realizaciones, el polipéptido de unión comprende una molécula de inmunoadhesina que comprende una región que no es de unión a anticuerpo (p. ej., un receptor, un ligando o una molécula de adhesión celular) fusionada a una región constante de anticuerpo (véase, p. ej., Ashkenazi y cols., Methods, 1995 8(2), 104-115)

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

III. Glucanos enlazados por N

En ciertas realizaciones, los polipéptidos de unión presentados en la invención emplean glucanos que están "enlazados por N" a través de un residuo de asparagina a un sitio de glucosilación en el esqueleto polipeptídico del polipéptido de unión. El sitio de glucosilación puede ser un sitio de glucosilación natural o manipulado. Adicionalmente o alternativamente, el glucano puede ser un glucano natural o un glucano manipulado (p. ej., un glucano modificado) que contiene uno o más enlaces no naturales. Los "N-glucanos" o "glucanos enlazados por N" están ligados a un nitrógeno amídico de una residuo de asparagina o arginina en una proteína a través de un residuo de N-acetilglucosamina. Estos "sitios de glucosilación enlazados por N" se presentan en la estructura primaria del péptido que contiene, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos asparagina-X-serina/treonina, donde X es cualquier residuo de aminoácido excepto prolina y ácido aspártico. Estos N-glucanos se describen a fondo, por ejemplo, en Drickamer K, Taylor ME (2006). Introduction to Glycobiology, 2nd ed..

En ciertas realizaciones, se proporcionan proteínas de unión y/o polipéptidos de unión glucomanipulados y métodos para elaborar proteínas de unión y/o polipéptidos de unión glucomanipulados. Según se usa en este documento, el término "glucomanipulación" se refiere a cualquier método reconocido en la técnica para alterar el perfil de la glucoforma de una composición de proteína de unión para generar un "glucano modificado."

Según se usan en el presente documento, los términos "glucoforma G0", "glucoforma G1" y "glucoforma G2" se refieren a glucoformas de N-glucano que tienen cero, uno o dos residuos de galactosa terminales, respectivamente.

- 55 60
- Estos términos incluyen glucoformas G0, G1 y G2 que están fucosiladas o comprenden un residuo de N-acetilglucosamina bisector.

En ciertas realizaciones, las glucoformas G1 y G2 comprenden además residuos de ácido siálico enlazados a uno o ambos de los residuos de galactosa terminales para formar las glucoformas G1S1, G2S1 y G2S2. Según se usan en este documento, los términos "glucoforma G1S1", "glucoforma G2S1" y "glucoforma G2S2" se refieren a glucoformas de N-glucano que tienen un residuo de ácido siálico enlazado al único residuo de galactosa terminal en una glucoforma G1, uno del residuo de galactosa terminal en una glucoforma G2 o ambos residuos de galactosa terminales en una glucoforma G2, respectivamente. Estos términos incluyen glucoformas G1S1, G2S1 y G2S2 que están fucosiladas o comprenden un residuo de N-acetilglucosamina bisector. En ciertas realizaciones, los residuos de ácido siálico de las glucoformas G1S1, G2S1 y G2S2 están enlazados por enlaces de ácido alfa-2,6-siálico al residuo de galactosa terminal de cada glucoforma a fin de potenciar la actividad antiinflamatoria de la molécula de unión (véase p. ej., Anthony y cols., PNAS 105: 19571-19578, 2008).

Según se usan en este documento, los términos "glucoforma G1F", "glucoforma G2F", "glucoforma G1S1F", "glucoforma G2S1F" y "glucoforma G2S2F" se refieren a la "glucoforma G1", la "glucoforma G2", la "glucoforma G1S1", la "glucoforma G2S1" y la "glucoforma G2S2" que están fucosiladas, respectivamente.

En ciertas realizaciones ejemplares, el polipéptido de unión comprende el sitio de glucosilación natural de un dominio Fc de anticuerpo. Este sitio de glucosilación natural comprende un residuo de asparagina silvestre en la posición 297 del dominio Fc (N297), según la numeración de EU. El glucano enlazado por N natural que reside en esta posición generalmente está enlazado a través de un enlace de β -glucosilamida al grupo nitrógeno de la cadena lateral de N297.

Sin embargo, también se pueden emplear otros enlaces reconocidos en la técnica. Un glucano enlazado por N a N297 puede contener una manosa, N-acetilglucosamina, galactosa o ácido siálico terminal.

En otras realizaciones ejemplares, los polipéptidos de unión comprenden uno o más sitios de glucosilación manipulados. Estos sitios de glucosilación manipulados comprenden la sustitución de uno o más aminoácidos silvestres en el esqueleto polipeptídico del polipéptido de unión por un residuo de asparagina que es capaz de ser N-glucosilado por las enzimas de glucosilación de una célula. Sitios de glucosilación manipulados ejemplares incluyen la introducción de mutación de asparagina en la posición de aminoácido 298 del dominio Fc (298N) según la numeración de EU o la posición de aminoácido 114 de un dominio CH1 (114N) según la numeración de Kabat (posición 118 de un dominio CH1 según la numeración de EU).

Cualquier tipo de glucano enlazado por N presente en la naturaleza o sintético (es decir, no natural o modificado) se puede enlazar a un sitio de glucosilación de un polipéptido de unión presentado en esta divulgación. En ciertos casos, el glucano comprende un sacárido (p. ej., un residuo de sacárido situado en el extremo de un oligosacárido) que se puede oxidar (p. ej., mediante tratamiento con peryodato o galactosa oxidasa) para producir un grupo adecuado para la conjugación a un resto efector (p. ej., un grupo aldehído reactivo). Sacáridos oxidables adecuados incluyen, sin limitación, galactosa y ácido siálico (p. ej., ácido N-acetilneuramínico). En ciertos casos, el glucano es un glucano biantenario. En ciertos casos, el glucano es una glucoforma de mamífero presente en la naturaleza.

La glucosilación se puede conseguir a través de cualquier medio conocido en la técnica. En ciertas realizaciones, la glucosilación se consigue mediante la expresión de los polipéptidos de unión en células capaces de glucosilación enlazada por N. Cualquier célula natural o manipulada (p. ej., se pueden emplear procaríóticas o eucarióticas (p. ej., células CHO o NSO)). En general, se emplean células de mamífero para efectuar la glucosilación. Los N-glucanos que se producen en células de mamífero se denominan comúnmente N-glucanos de tipo híbrido complejos con alto contenido de manosa (véase p. ej., Drickamer (2006)). Estos N-glucanos complejos tienen una estructura que típicamente tiene de dos a seis ramificaciones externas con una secuencia de sialil-lactosamina enlazada a una estructura central interna $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. Un N-glucano complejo tiene al menos una ramificación, y/o al menos dos ramificaciones, de residuos de GlcNAc y galactosa (Gal) alternos que terminan en oligosacáridos tales como, por ejemplo: NeuNAc- α ; NeuAc a2,6 GalNAc α 1-; NeuAc a2,3 Gal β 1,3 GalNAc α 1-; y NeuAc a2,3/6 Gal β 1,4 GlcNAc β 1. Además, se pueden presentar ésteres de sulfato sobre residuos de galactosa, GalNAc, y GlcNAc. NeuAc puede estar O-acetilado o se puede reemplazar por NeuGI (ácido N-glicolilneuramínico). Los N-glucanos complejos también pueden tener sustituciones intracatenarias de GlcNAc bisector y fucosa (Fuc) central.

Adicionalmente o alternativamente, la glucosilación se puede conseguir o modificar a través de medios enzimáticos, *in vitro*. Por ejemplo, se pueden emplear una o más glucosiltransferasas para añadir residuos de sacárido específicos al N-glucano natural o manipulado de un polipéptido de unión, y se pueden emplear una o más glucosidasas para retirar sacáridos no deseados del glucano enlazado por N. Estos medios enzimáticos son muy conocidos en la técnica (véase. p. ej., el documento WO2007/005786).

IV Funciones Efectoras Inmunológicas y Modificaciones de Fc

En ciertas realizaciones, los polipéptidos de unión pueden comprender una región constante de anticuerpo (p. ej., una región constante de IgG p. ej., una región constante de IgG humana, p. ej., una región constante de IgG1 o IgG4 humanas) que media en una o más funciones efectoras. Por ejemplo, la unión del complejo C1 a una región constante de anticuerpo puede activar el sistema del complemento. La activación del sistema del complemento es importante en la opsonización y la lisis de patógenos celulares. La activación del sistema del complemento también estimula la

5 respuesta inflamatoria y también puede estar implicada en la hipersensibilidad autoinmunitaria. Además, los anticuerpos se unen a los receptores sobre diversas células a través de la región Fc (sitios de unión a receptores Fc sobre la región Fc del anticuerpo se unen a receptores de Fc (FcR) sobre una célula). Existe un número de receptores de Fc que son específicos para diferentes clases de anticuerpo, incluyendo IgG (receptores gamma), IgE (receptores epsilon), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). La unión del anticuerpo a receptores de Fc sobre superficies celulares desencadena un número de respuestas biológicas importantes y diversas incluyendo la fagocitación y la destrucción de partículas revestidas con anticuerpo, la depuración de complejos inmunitarios, la lisis de células diana revestidas con anticuerpo por células agresoras (llamada citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, o ADCC), la liberación de mediadores inflamatorios, la transferencia placentaria y el control de la producción de inmunoglobulinas. En algunas realizaciones, los polipéptidos de unión (p. ej., anticuerpos o sus fragmentos de unión a抗ígenos) se unen a un receptor gamma de Fc. En realizaciones alternativas, los polipéptidos de unión pueden comprender una región constante que carece de una o más funciones efectoras (p. ej., actividad ADCC) y/o es incapaz de unirse a un receptor de Fcγ.

10 15 Ciertas realizaciones incluyen anticuerpos en los que al menos un aminoácido en uno o más de los dominios de la región constante se han eliminado o alterado de otro modo a fin de proporcionar características bioquímicas deseadas tales como una reducción o potenciación de las funciones efectoras, la capacidad para dimerizarse no covalentemente, un incremento en la capacidad para localizarse en la zona de un tumor, una reducción en la semivida sérica o un incremento en la semivida sérica en comparación con un anticuerpo inalterado entero de aproximadamente la misma inmunogenicidad. Por ejemplo, ciertos anticuerpos para el uso en métodos de diagnóstico y tratamiento descritos en este documento son anticuerpos con dominios eliminados, que comprenden una cadena polipeptídica similar a una cadena pesada de inmunoglobulina, pero que carecen de al menos una porción de uno o más dominios de la cadena pesada. A modo de ejemplo, en ciertos anticuerpos, se eliminará un dominio completo de la región constante del anticuerpo modificado, por ejemplo, se eliminará la totalidad o parte del dominio CH2.

20 25 30 En ciertas otras realizaciones, los polipéptidos de unión comprenden regiones constantes derivadas de diferentes isótipos de anticuerpo (p. ej., regiones constantes procedentes de dos o más de una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana). En otras realizaciones, los polipéptidos de unión comprenden una bisagra químérica (es decir, una bisagra que comprende porciones de la bisagra derivadas de dominios de bisagra de diferentes isótipos de anticuerpo, p. ej., un dominio de bisagra superior procedente de una molécula de IgG4 y un dominio de bisagra medio IgG1). En una realización, los polipéptidos de unión comprenden una región Fc o porción de la misma procedente de una molécula de IgG4 humana y una mutación Ser228Pro (numeración de EU) en la región de bisagra central de la molécula.

35 40 45 En ciertas realizaciones, la porción Fc se puede mutar para incrementar o disminuir una función efectora usando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, la eliminación o inactivación (a través de mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de la región constante puede reducir la unión al receptor de Fc del anticuerpo modificado circulante incrementando de ese modo la localización del tumor. En otros casos, puede ser que modificaciones de la región constante de acuerdo con la actual divulgación moderen la unión al complemento y así reduzcan la semivida sérica y la asociación inespecífica de una citotoxina conjugada. Sin embargo, se pueden usar otras modificaciones de la región constante para modificar enlaces disulfuro o restos de oligosacárido que permitan la potenciación de la localización debido a un incremento en la especificidad o flexibilidad del antígeno. El perfil fisiológico, la biodisponibilidad y otros efectos bioquímicos resultantes de las modificaciones, tales como localización tumoral, biodistribución y semivida sérica, se pueden medir y cuantificar fácilmente usando técnicas inmunológicas bien conocidas sin una experimentación excesiva.

50 En ciertas realizaciones, un dominio Fc empleado en un anticuerpo es una variante de Fc. Según se usa en este documento, el término "variante de Fc" se refiere a un dominio Fc que tiene al menos una sustitución de aminoácido con relación al dominio Fc silvestre del que se deriva dicho dominio Fc. Por ejemplo, cuando el dominio Fc se derive de un anticuerpo de IgG1 humana, la variante de Fc de dicho dominio Fc de IgG1 humana comprende al menos una sustitución de aminoácido con relación a dicho dominio Fc.

55 60 La sustitución o las sustituciones de aminoácidos de una variante de Fc pueden estar situadas en cualquier posición (es decir, cualquier posición de aminoácido de la convención de EU) dentro del dominio Fc. En una realización, la variante de Fc comprende una sustitución en una posición de aminoácido situada en un dominio de bisagra o una porción del mismo. En otra realización, la variante de Fc comprende una sustitución en una posición de aminoácido situada en un dominio CH2 o una porción del mismo. En otra realización, la variante de Fc comprende una sustitución en una posición de aminoácido situada en un dominio CH3 o una porción del mismo. En otra realización, la variante de Fc comprende una sustitución en una posición de aminoácido situada en un dominio CH4 o una porción del mismo.

65 Los polipéptidos de unión pueden emplear cualquier variante de Fc reconocida en la técnica conocida por impartir una mejora (p. ej., reducción o potenciación) en una función efectora y/o la unión a FcR. Dichas variantes de Fc pueden incluir, por ejemplo, una cualquiera de las sustituciones de aminoácido divulgadas en las Publicaciones PCT Internacionales WO88/07089A1, WO96/14339A1, WO98/05787A1, WO98/23289A1, WO99/51642A1, WO99/58572A1, WO00/09560A2, WO00/32767A1, WO00/42072A2, WO02/44215A2, WO02/060919A2, WO03/074569A2, WO04/016750A2, WO04/029207A2, WO04/035752A2, WO04/063351A2, WO04/074455A2, WO04/099249A2, WO05/040217A2, WO05/070963A1, WO05/077981A2, WO05/092925A2, WO05/123780A2,

WO06/019447A1, WO06/047350A2 y WO06/085967A2 o las Pat. EE. UU. Nº 5.648.260, 5.739.277, 5.834.250, 5.869.046, 6.096.871, 6.121.022, 6.194.551, 6.242.195, 6.277.375, 6.528.624, 6.538.124, 6.737.056, 6.821.505, 6.998.253 y 7.083.784. En una realización ejemplar, un polipéptido de unión puede comprender una variante de Fc que comprende una sustitución de aminoácido en la posición 268 de EU (p. ej., H268D o H268E). En otra realización ejemplar, un polipéptido de unión puede comprender una sustitución de aminoácido en la posición 239 de EU (p. ej., S239D o S239E) y/o la posición 332 de EU (p. ej., I332D o I332Q).

En ciertas realizaciones, un polipéptido de unión puede comprender una variante de Fc que comprende una sustitución de aminoácido que altera las funciones efectoras independientes de antígeno del anticuerpo, en particular la semivida circulatoria del polipéptido de unión. Estos polipéptidos de unión exhiben bien un incremento o bien una reducción en la unión a FcRn en comparación con polipéptidos de unión que carecen de estas sustituciones, por lo tanto, tienen un incremento o una disminución en la semivida en suero, respectivamente. Se anticipa que las variantes de Fc con afinidad mejorada para FcRn tienen semividas séricas más prolongadas, y estas moléculas tienen aplicaciones útiles en métodos para tratar a mamíferos en los que se desee una semivida prolongada del anticuerpo administrado, p. ej., para tratar una enfermedad o trastorno crónicos. En contraste, se espera que las variantes de Fc con una disminución en la unión a FcRn tengan semividas más breves, y estas moléculas también son útiles, por ejemplo, para la administración a un mamífero cuando pueda ser deseable un tiempo de circulación abreviado, p. ej. para diagnóstico por imagen in vivo o en situaciones en las que el anticuerpo de partida tenga efectos secundarios tóxicos cuando esté presente en la circulación durante períodos prolongados. Las variantes de Fc con una disminución en la afinidad de unión a FcRn también son menos propensas a cruzar la placenta y, así, también son útiles en el tratamiento de enfermedades o trastornos en mujeres embarazadas. Además, otras aplicaciones en las que se puede desear una reducción en la afinidad de unión a FcRn incluyen aplicaciones localizadas en el cerebro, el riñón y/o el hígado. En una realización ejemplar, los polipéptidos de unión (p. ej., anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) alterados exhiben una reducción en el transporte a través del epitelio de los glomérulos renales desde la vasculatura.

En otra realización, los polipéptidos de unión (p. ej., anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) alterados exhiben una reducción en el transporte a través de la barrera hematoencefálica (BBB) desde el cerebro hasta el interior del espacio vascular. En una realización, un anticuerpo con una alteración en la unión a FcRn comprende un dominio Fc que tiene una o más sustituciones de aminoácidos dentro del "bucle de unión a FcRn" de un dominio Fc. El bucle de unión a FcRn está comprendido por los residuos de aminoácido 280-299 (según la numeración de EU). Sustituciones de aminoácidos ejemplares que alteran la actividad de unión a FcRn se divultan en la Publicación PCT Internacional Nº WO05/047327. En ciertas realizaciones ejemplares, los polipéptidos de unión (p. ej., anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) comprenden un dominio Fc que tiene una o más de las siguientes sustituciones: V284E, H285E, N286D, K290E y S304D (numeración de EU). En otras realizaciones ejemplares adicionales, las moléculas de unión comprenden un dominio de Fc humano con la mutación doble H433K/N434F (véase, p. ej., la Patente de EE. UU. Nº 8.163.881).

En otras realizaciones, los polipéptidos de unión, para el uso en los métodos de diagnóstico y tratamiento descritos en este documento tienen una región constante, p. ej., una región constante de la cadena pesada de IgG1 o IgG4, que se altera para reducir o eliminar la glucosilación. Por ejemplo, los polipéptidos de unión (p. ej., anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) también pueden comprender una variante de Fc que comprende una sustitución de aminoácido que altere la glucosilación del Fc del anticuerpo. Por ejemplo, dicha variante de Fc puede tener una reducción en la glucosilación (p. ej., glucosilación enlazada por N u O). En realizaciones ejemplares, la variante de Fc comprende una reducción en la glucosilación del glucano enlazado por N normalmente encontrado en la posición de aminoácido 297 (numeración de EU). En otra realización, el anticuerpo tiene una sustitución de aminoácido cerca de o dentro de un motivo de glucosilación, por ejemplo, un motivo de glucosilación enlazado por N que contiene la secuencia de aminoácidos NXT o NXS. En una realización particular, el anticuerpo comprende una variante de Fc con una sustitución de aminoácido en la posición de aminoácido 228 o 299 (numeración de EU). En realizaciones más particulares, el anticuerpo comprende una región constante de IgG1 o IgG4 que comprende una mutación S228P y una T299A (numeración de EU).

Sustituciones de aminoácidos ejemplares que confieren una reducción o alteración en la glucosilación se divultan en la Publicación PCT Internacional Nº WO05/018572. En algunas realizaciones, los polipéptidos de unión se modifican para eliminar la glucosilación. Estos polipéptidos de unión se pueden denominar polipéptidos de unión "aglu" (p. ej. anticuerpos "aglu"). Aunque sin limitarse por una teoría, se cree que los polipéptidos de unión "aglu" pueden tener una mejora en el perfil de seguridad y estabilidad *in vivo*. Los polipéptidos de unión aglu pueden ser de cualquiera de sus isotipos o subclases, p. ej., IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En ciertas realizaciones, los polipéptidos de unión aglu comprenden una región Fc aglucosilada de un anticuerpo de IgG4 que carece de la función efectora de Fc, eliminando de ese modo el potencial de toxicidad mediada por Fc para los órganos vitales normales que expresan IL-6. En otras realizaciones adicionales, los polipéptidos de unión comprenden un glucano alterado. Por ejemplo, el anticuerpo puede tener un número reducido de residuos de fucosa sobre un N-glucano en Asn297 de la región Fc, es decir, está afucosilado. La afucosilación incrementa a unión a FcγRII sobre las células NK e incrementa potencialmente la ADCC. Se ha mostrado que un diacuerpo que comprende una scFv anti-IL-6 y una scFv anti-CD3 induce la destrucción de células que expresan IL-6 mediante ADCC. Según esto, en una realización, se usa un anticuerpo anti-IL-6 afucosilado para orientarse a y destruir células que expresan IL-6. En otra realización, el polipéptido de unión puede tener un número alterado de residuos de ácido siálico sobre el N-glucano en Asn297 de la región Fc. Están disponibles numerosos métodos reconocidos en la técnica para elaborar anticuerpos "aglu" o anticuerpos con glucanos alterados.

Por ejemplo, se pueden usar células anfítrionas manipuladas genéticamente (p. ej., levadura, p. ej., *Pichia*, o células CHO, modificadas) con rutas de glucosilación modificadas (p. ej., eliminaciones de glicosil-transferasa) para producir estos anticuerpos.

V. Restos Efectores

- 5 En ciertos casos, los polipéptidos de unión de la actual divulgación comprenden restos efectores (p. ej., restos orientadores). En general, estos restos efectores se conjugan (bien directamente o bien a través de un resto enlazador) a un glucano enlazado por N sobre el polipéptido de unión, (p. ej., un glucano enlazado por N enlazado a N298 (numeración de EU) del dominio CH2 y/o N114 (numeración de Kabat) de un dominio CH1). En ciertos casos, el polipéptido de unión es un anticuerpo de longitud completa que comprende dos dominios CH1 con un glucano en la posición de Kabat 114 (posición 118 de EU), donde ambos glucanos se conjugan a uno o más restos efectores.

10 Cualquier resto efector se puede añadir a los polipéptidos de unión divulgados en este documento. Los restos efectores pueden añadir una función no natural a un anticuerpo alterado o sus fragmentos sin alterar significativamente la actividad intrínseca del polipéptido de unión. En ciertos casos ejemplares, un resto efector es un resto orientador (p. ej., un glucopéptido o neoglucano). Un polipéptido de unión (p. ej., un anticuerpo) modificado de la actual divulgación puede comprender uno o más restos efectores, que pueden ser iguales o diferentes.

15 En un caso, el resto efecto puede ser de Fórmula (I):

20 $\text{H}_2\text{N-Q-CON-X}$ Fórmula (I),

en la que:

- A) Q es NH u O; y
 B) CON es un resto conector; y
 25 C) X es un resto efecto (p. ej., un resto orientador según se define en este documento).

30 El resto conector conecta el agente terapéutico a $\text{H}_2\text{N-Q-}$. El resto conector puede incluir al menos uno de cualquier componente adecuado conocido por los expertos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, un componente de alquilenilo, un componente de polietilenglicol, un componente de poli(glicina), un componente de poli(oxazolina), un componente de carbonilo, un componente derivado de cisteinamida, un componente derivado de valina acoplada con citrulina, y un componente derivado de carbamato de 4-aminobencilo, o cualquiera de sus combinaciones.

En otro caso, el resto efecto de Fórmula (I) puede ser de Fórmula (Ia):

35 $\text{H}_2\text{N-Q-CH}_2\text{-C(O)-Z-X}$ Fórmula (Ia),
 en la que:

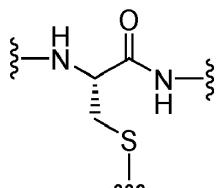
- A) Q es NH u O; y
 B) Z es $-\text{Cys-(MC)}_a\text{-(VC)}_b\text{-(PABC)}_c\text{-(C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_8\text{C}_2\text{H}_4)_f$,
 donde
 40 i. Cys es una cisteinamida derivada componente;
 ii. MC es un componente derivado de maleimida;
 iii. VC es un componente derivado de valina acoplada con citrulina;
 iv. PABC es un componente derivado de carbamato de 4-aminobencilo;
 v. X es un resto efecto (p. ej., un resto orientador según se define en este documento);
 45 vi. a es 0 o 1;

vii. b es 0 o 1;

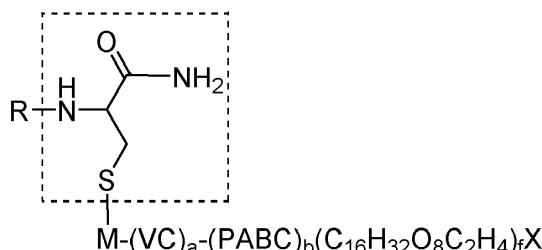
viii. c es 0 o 1; y

ix. f es 0 o 1

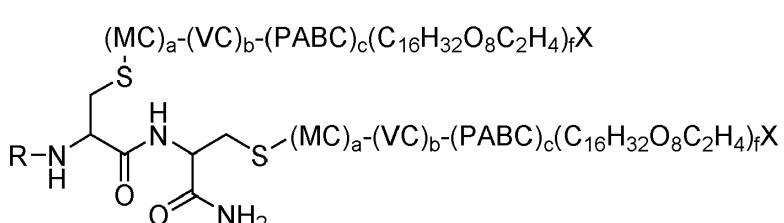
- 5 El "componente derivado de cisteinamida" es el punto de ligazón a $\text{H}_2\text{N}-\text{Q}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$. En un caso, el "componente derivado de cisteinamida" se puede referir a una o más porciones del resto efector que tiene la estructura:



En un caso, el componente "Cys" de un resto efector puede incluir una de estas porciones. Por ejemplo, la siguiente estructura muestra un resto efector con una de estas porciones (donde el componente de "Cys" está indicado con la caja de línea de puntos):

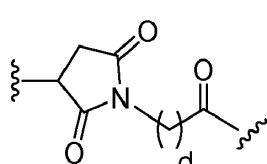


- 10 10 En otro caso, el componente "Cys" de un resto efector puede incluir dos o más de estas porciones. Por ejemplo, el siguiente resto contiene dos de estas porciones:



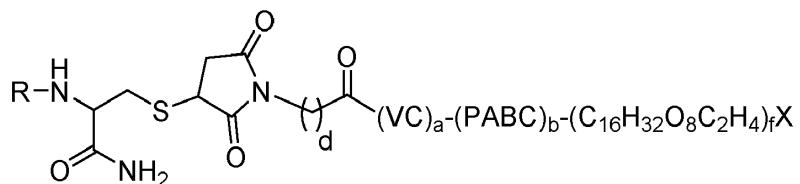
- 15 15 Como se puede observar a partir de la estructura, cada componente "Cys" tiene un grupo $-(\text{MC})_a-(\text{VC})_b-(\text{PABC})_c-(\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_8\text{C}_2\text{H}_4)_f-\text{X}$.

- 20 20 En un caso, la expresión "componente derivado de maleimida" se puede referir a cualquier porción del resto efector que tenga la estructura:

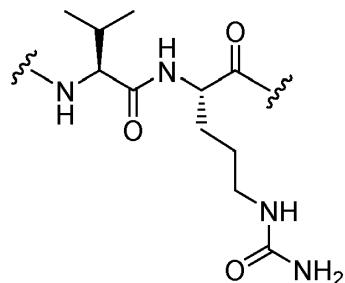


- 25 25 donde d es un número entero de 2 a 5. El número de componentes MC incluido en cualquier grupo $\text{Cys}-(\text{MC})_a-(\text{VC})_b-(\text{PABC})_c-(\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_8\text{C}_2\text{H}_4)_f-\text{X}$ en el resto efector está indicado por el subíndice "a", y puede ser 0 o 1. En un caso, a es 1. En otro caso, b es 0.

- 30 30 En un caso, el componente "Cys" puede estar conectado al componente "MC" a través del átomo de azufre del componente "Cys", según se indica por la caja de línea de puntos de la estructura posterior:



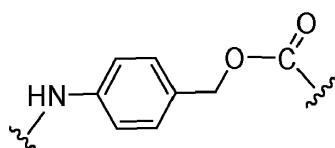
En un caso, la expresión "componente derivado de valina acoplada con citrulina" se puede referir a cualquier porción del resto efector con la siguiente estructura:



5

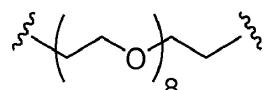
El número de componentes VC incluido en cualquier grupo Cys-(MC)a-(VC)b-(PABC)c-(C₁₆H₃₂O₈C₂H₄)_f-X en el resto efector está indicado por el subíndice "b", y puede ser 0 o 1. En un caso, b es 1. En otro caso, b es 0.

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



- 15 El número de componentes PABC incluido en cualquier grupo Cys-(MC)a-(VC)b-(PABC)c-(C₁₆H₃₂O₈C₂H₄)_f-X en el resto efector está indicado por el subíndice "c", y puede ser 0 o 1. En un caso, c es 1. En otro caso, c es 0.

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



20

El número de unidades $C_{16}H_{32}O_8$ incluido en cualquier grupo Cys-(MC) a -(VC) b -(PABC) c -($C_{16}H_{32}O_8C_2H_4$) f -X en el resto efector está indicado por el subíndice " f ". En un caso, f es 1. En otro caso, f es 0.

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

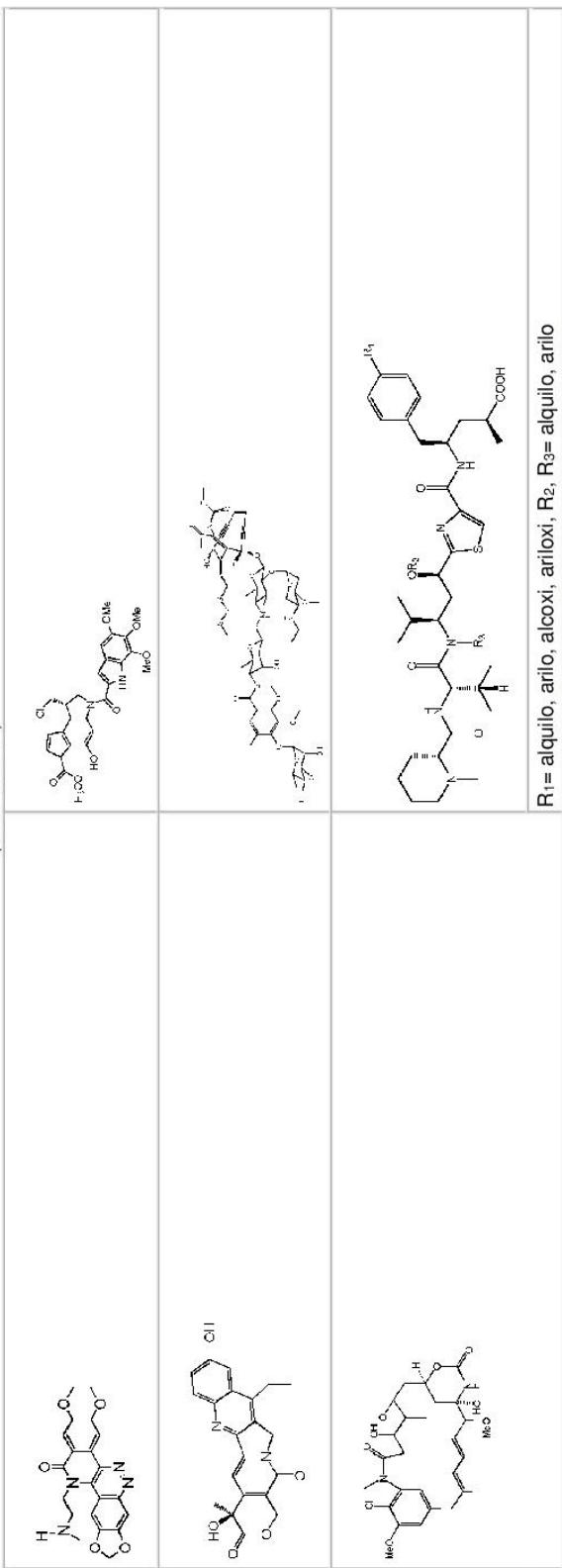
25 a) Restos Efectores Terapéuticos

En ciertas realizaciones, los polipéptidos de unión de la actual divulgación están conjugados a un resto efector que comprende un agente terapéutico, p. ej. un resto farmacológico (o su profármaco) o un compuesto radiomarcado. En una realización el agente terapéutico es una citotoxina. Agentes terapéuticos citotóxicos ejemplares se indican en la Tabla 1 en este documento.

30

Tabla 1. Agentes terapéuticos citotóxicos ejemplares

(continuación)



R₁= alquilo, arilo, ariloxi, arillo; R₂, R₃= alquilo, arilo

- Restos farmacológicos ejemplares adicionales incluyen agentes terapéuticos antinflamatorios, anticancerosos, antiinfecciosos (p. ej., antifúngicos, antibacterianos, antiparasitarios, antivirales, etc.) y anestésicos. En una realización adicional, el resto farmacológico es un agente anticanceroso. Agentes anticancerosos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, citostáticos, inhibidores enzimáticos, reguladores génicos, nucleósidos citotóxicos, agentes de unión a tubulina o inhibidores de tubulina, inhibidores del proteasoma, hormonas y antagonistas de hormonas, agentes antiangiogénicos, y similares. Agentes anticancerosos citostáticos ejemplares incluyen agentes alquilantes tales como la familia de fármacos de antraciclina (p. ej. adriamicina, carminomicina, ciclosporina-A, cloroquina, metopterina, mitramicina, porfiromicina, estreptonigrina, porfiromicina, antracenodiones y aziridinas). Otros agentes anticancerosos citostáticos incluyen inhibidores de la síntesis de ADN (p. ej., metotrexato y dclorometotrexato, 1,4-dióxido de 3-amino-1,2,4-benzotriazina, aminopterina, β -D-arabinofuranósido de citosina, 5-fluoro-5'-desoxiuridina, 5-fluorouracilo, ganciclovir, hidroxiurea, actinomicina-D y mitomicina C), intercaladores o reticuladores de ADN (p. ej., bleomicina, carboplatino, carmustina, clorambucilo, ciclofosfamida, dcloruro de cisdiaminoplatino(II) (cisplatino), melfalano, mitoxantrona y oxaliplatino), y reguladores de la transcripción de ADN-ARN (p. ej., actinomicina D, daunorrubicina, doxorrbubicina, homoharringtonina e idarrubicina). Otros agentes citostáticos ejemplares que son compatibles con la presente divulgación incluyen ansamycinabenzquinonas, derivados quinonoides (p. ej. quinolonas, genisteína, bactaciclina), busulfano, ifosfamida, mecloretamina, triaziquona, diaziquona, carbaziquona, indoloquinona EO9, diaziridinil-benzquinona metil DZQ, trietilenfosforamida y compuestos de nitrosourea (p. ej. carmustina, lomustina, semustina).
- Agentes anticancerosos de nucleósido citotóxicos ejemplares incluyen, pero no se limitan a: arabinósido de adenosina, citarabina, arabinósido de citosina, 5-fluorouracilo, fludarabina, floxuridina, fторafur y 6-mercaptopurina. Agentes de unión a tubulina anticancerosos ejemplares incluyen, pero no se limitan a: taxoides (p. ej. paclitaxel, docetaxel, taxano), nocodazol, rizoxina, dolastatinas (p. ej. dolastatina-10, -11 o -15), colchicina y colchicinoides (p. ej. ZD6126), combretastatinas (p. ej. combretastatina A-4, AVE-6032) y alcaloides de las vincas (p. ej. vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina (navelbina)). Hormonas y antagonistas hormonales anticancerosos ejemplares incluyen, pero no se limitan a: corticosteroides (p. ej. prednisona), progestinas (p. ej. hidroxiprogesterona o medroprogeserona), estrógenos, (p. ej. dietilestilbestrol), antiestrógenos (p. ej. tamoxifeno), andrógenos (p. ej. testosterona), inhibidores de aromatasas (p. ej. aminoglutetimida), 17-(alilamino)-17-desmetoxigeldanamicina, 4-amino-1,8-naftalimida, apigenina, brefeldina A, cimetidina, ácido dclorometilendifosfónico, leuprolida (leuprorelina), hormona liberadora de la hormona luteinizante, pifitrina-a, rapamicina, globulina de unión a hormonas sexuales, y tapsigargina. Compuestos antiangiogénicos anticancerosos ejemplares incluyen, pero no se limitan a: angiostatina KI-3, DL-a-difluorometilornitina, endostatina, fumagilina, genisteína, minociclina, estaurosponia y (\pm)-talidomida.
- Inhibidores enzimáticos anticancerosos ejemplares incluyen, pero no se limitan a: S(+)-camptotecina, curcumina, (-)-deguelina, 1- β -D-ribofuranósido de 5,6-diCH1orobencimidazol, etopósido, formestano, fostriecina, hispidina, ácido 2-imino-1-imidazolidinacético (ciclocreatina), mevinolina, tricostatina A, tifostina AG 34 y tifostina AG 879.
- Reguladores génicos anticancerosos ejemplares incluyen, pero no se limitan a: 5-aza-2'-desoxicitidina, 5-azacitidina, colecalciferol (vitamina D3), 4-hidroxitamoxifeno, melatonina, mifepristona, raloxifeno, trans-retinal (aldehídos de vitamina A), ácido retinoico, vitamina A ácida, ácido 9-cis-retinoico, ácido 13-cis-retinoico, retinol (vitamina A), tamoxifeno y troglitazona.
- Otras clases de agentes anticancerosos incluyen, pero no se limitan a: la familia de fármacos de pteridina, diinenos y las podofilotoxinas. Miembros de esas clases particularmente útiles incluyen, por ejemplo, metopterina, podofilotoxina o derivados de podofilotoxina tales como etopósido, fosfato de etopósido, leurosidina, vindesina, leurosina y similares.
- Otros agentes anticancerosos adicionales que son compatibles con las enseñanzas del presente documento incluyen auristatinas (p. ej. auristatina E y monometilauristana E), geldanamicina, calicheamicina, gramicidina D, maitansanoides (p. ej. maitansina), neocarzinostatina, topotecano, taxanos, citocalasina B, bromuro de etidio, emetina, tenopósido, colchicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, puromicina, y análogos u homólogos de los mismos.
- Otros agentes anticancerosos adicionales que son compatibles con las enseñanzas del presente documento incluyen derivados de tomaimicina, derivados de maitansina, derivados de criptoficina, derivados de antraciclina, derivados de bisfosfonato, derivados de leptomicina, derivados de estreptonigrina, derivados de auristatina y derivados de duocarmicina.
- Otra clase de agentes anticancerosos compatibles que se pueden usar como restos farmacológicos son fármacos radiosensibilizadores que se pueden dirigir eficazmente a células tumorales o inmunorreactivas. Estos restos farmacológicos potencian la sensibilidad a la radiación ionizante, incrementando de ese modo la eficacia de la radioterapia. Sin limitarse a una teoría, un anticuerpo modificado con un resto farmacológico radiosensibilizador e internalizado por la célula tumoral aportaría el radiosensibilizador más cerca del núcleo en el que la radiosensibilización sería máxima. Los anticuerpos que perdieran el resto radiosensibilizador se depurarían rápidamente de la sangre, localizando el agente de radiosensibilización restante en el tumor diana y proporcionando una captación mínima en tejidos normales. Después de la depuración de la sangre, se podría administrar radioterapia adyuvante mediante

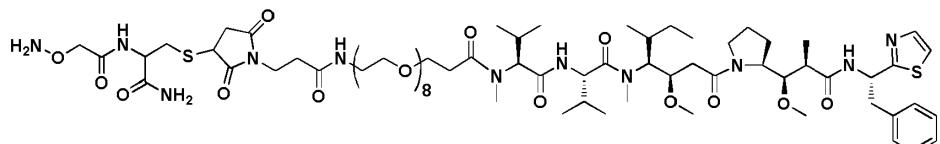
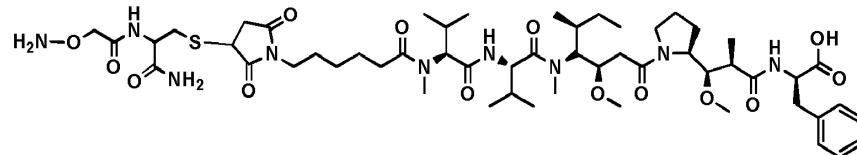
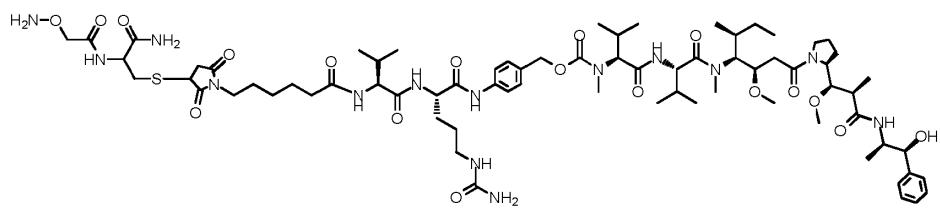
radiación de haz externo dirigida específicamente al tumor, radiactividad implantada directamente en el tumor o radioinmunoterapia sistémica con el mismo anticuerpo modificado.

En una realización, el agente terapéutico comprende radionúclidos o radiomarcadores con radiación ionizante de alta energía que son capaces de provocar múltiples roturas de cadena en ADN nuclear, conduciendo a muerte celular. Radionúclidos de alta energía ejemplos incluyen: ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{123}I , ^{111}In , ^{103}Rh , ^{153}Sm , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re y ^{188}Re . Estos isótopos producen típicamente partículas α o β de alta energía que tienen una longitud de recorrido corta. Estos radionúclidos destruyen células con las que están en estrecha proximidad, por ejemplo células neoplásicas a la que se ha ligado el conjugado o en las que ha entrado. Tienen poco o ningún efecto sobre células no localizadas y son esencialmente ininmungénicos. Alternativamente, se pueden generar isótopos de alta energía mediante la irradiación térmica de un isótopo por lo demás estable, por ejemplo como en la terapia de captura de neutrones del boro (Guan y cols., PNAS, 95: 13206-10, 1998).

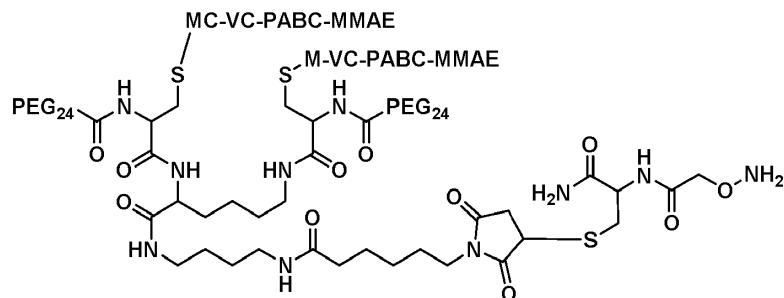
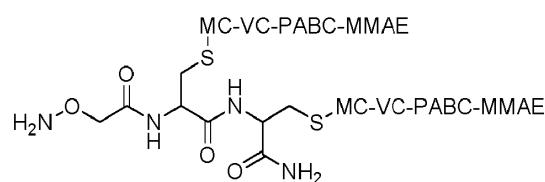
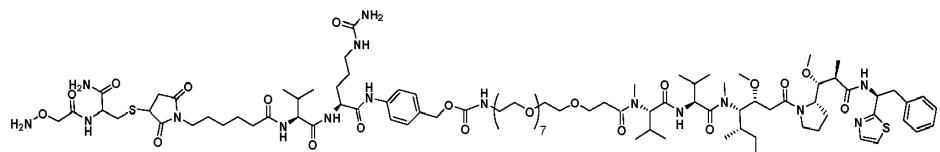
En una realización, el agente terapéutico se selecciona de MMAE, MMAF y PEG8-Do110.

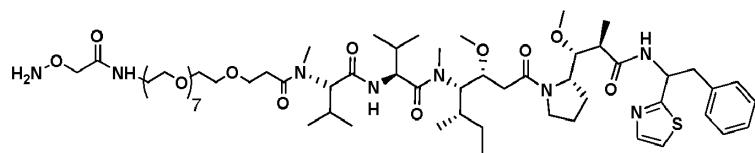
15

Restos efectores terapéuticos ejemplares incluyen las estructuras:

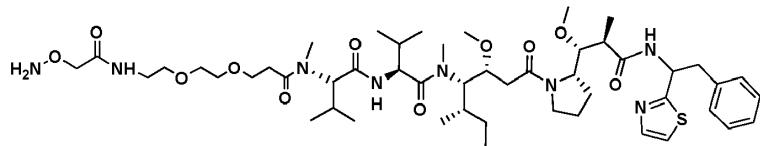


20

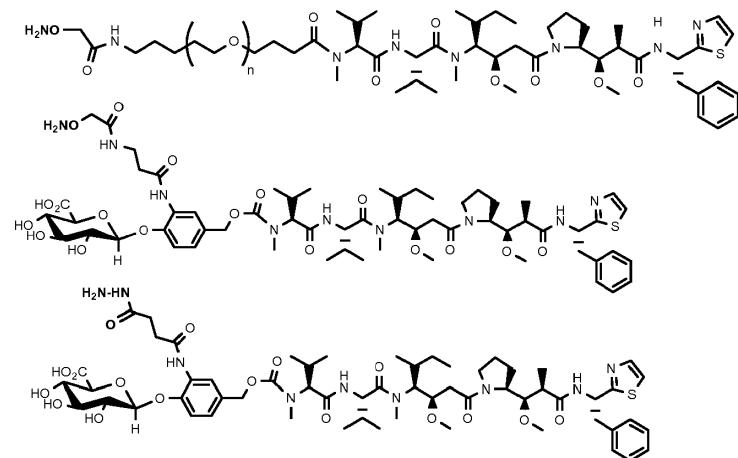




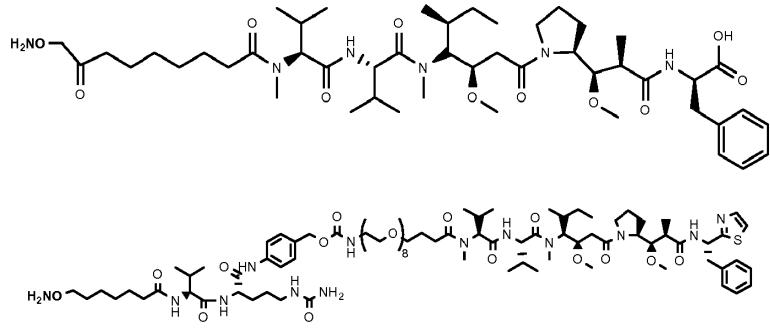
y



En una realización, el resto efector se selecciona de:



5



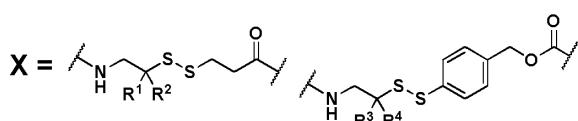
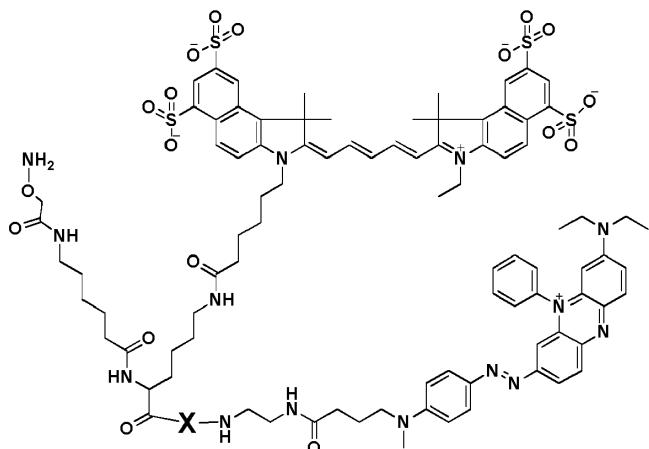
En ciertas realizaciones, el resto efector contiene más de un agente terapéutico. Estos múltiples agentes terapéuticos pueden ser iguales o diferentes.

10 **b) Restos efectores diagnósticos**

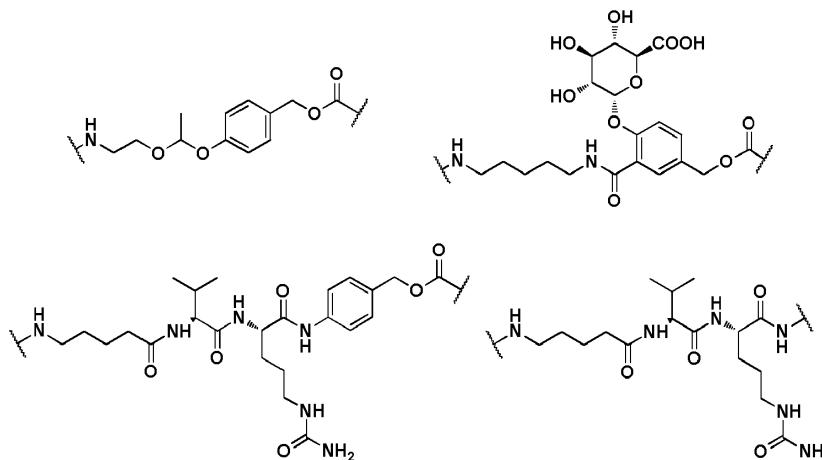
En ciertas realizaciones, los polipéptidos de unión de la actual divulgación están conjugados a un resto efector que comprende un agente diagnóstico. En una realización, el agente diagnóstico es un marcador de molécula pequeña detectable, p. ej. biotina, fluoróforos, cromóforos, sondas de resonancia de espín o radiomarcadores. Fluoróforos ejemplares incluyen colorantes fluorescentes (p. ej. fluoresceína, rodamina, y similares) y otras moléculas luminiscentes (p. ej. luminal). Un fluoróforo puede ser ambientalmente sensible de modo que su fluorescencia cambie si se sitúa cerca de uno o más residuos en el polipéptido de unión modificado que sufre cambios estructurales al unirse a un sustrato (p. ej. sondas de dansilo). Radiomarcadores ejemplares incluyen moléculas pequeñas que contienen átomos con uno o más núcleos de baja sensibilidad (^{13}C , ^{15}N , ^{2}H , ^{125}I , ^{124}I , ^{99}Tc , ^{43}K , ^{52}Fe , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{111}In y similares). El radionúclido puede ser, p. ej., un radionúclido emisor de partículas gamma, fotones o positrones con una semivida adecuada para permitir la actividad o detección después del tiempo transcurrido entre la administración y la localización en la zona de obtención de imágenes.

- En una realización, el agente diagnóstico es un polipéptido. Polipéptidos diagnósticos ejemplares incluyen enzimas con actividad fluorogénica o cromogénica, p. ej. la capacidad para escindir un sustrato que forma un fluoróforo o cromóforo como un producto (es decir proteínas indicadoras tales como luciferasa). Otras proteínas diagnósticas pueden tener actividad fluorogénica o cromogénica intrínseca (p. ej., proteínas aequorina bioluminiscentes fluorescentes verde, roja y amarilla procedentes de organismos marinos bioluminiscentes) o pueden comprender una proteína que contiene uno o más núcleos radiactivos de baja energía (^{13}C , ^{15}N , ^{2}H , ^{125}I , ^{123}I , ^{99}Tc , ^{43}K , ^{52}Fe , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{111}In y similares).
- 5 Con respecto al uso de conjugados radiomarcados junto con la presente divulgación, los polipéptidos de unión de la actual divulgación se pueden marcar directamente (tal como a través de yodación) o se pueden marcar indirectamente a través de uso de un agente quelante. Según se usan en este documento, las expresiones "marcaje indirecto" y "enfoque de marcaje indirecto" significan ambas que un agente quelante se liga covalentemente a un polipéptido de unión y al menos un radionúclido se asocia con el agente quelante. Estos agentes quelantes se denominan típicamente agentes quelantes bifuncionales ya que se unen tanto al polipéptido como al radioisótopo. Agentes quelantes ejemplares comprenden derivados de ácido 1-isotiocicmatobencil-3-metildiotelentriaminopentaacético ("MX-DTPA") y ácido ciclohexildietilentriaminopentaacético ("CHX-DTPA"). Otros agentes quelantes comprenden derivados de P-DOTA y EDTA. Radionúclidos ejemplares para el marcaje indirecto incluyen ^{111}In y ^{90}Y . La mayor parte de los estudios de obtención de imágenes utilizan anticuerpo marcado con 5 mCi de ^{111}In , debido a que esta dosis tanto es segura como tiene un incremento en la eficacia de obtención de imágenes en comparación con dosis inferiores, produciéndose la obtención de imágenes óptima a de tres a seis días después de la administración del anticuerpo. Véanse, por ejemplo, Murray, (1985), J. Nuc. Med. 26: 3328 y Carraguirro y cols, (1985), J. Nuc. Med. 26: 67. Un radionúclido ejemplar para el marcaje directo es ^{131}I . Los expertos en la técnica apreciarán que también se pueden ensamblar conjugados no radiactivos dependiendo del agente seleccionado que se vaya a conjugar.
- 10 15 20 25 30
- En ciertas realizaciones, el resto efector diagnóstico es una sonda de FRET (transferencia de energía fluorescente mediante resonancia). FRET se ha usado para una variedad de aplicaciones diagnósticas incluyendo el diagnóstico del cáncer. Una sonda de FRET puede incluir un enlazador escindible (enlazador sensible a enzimas o de pH) que conecta los restos donante y acceptor de la sonda de FRET, donde la escisión da como resultado una potenciación en la fluorescencia (incluyendo el infrarrojo cercano) (véase, p. ej., A. Cobos-Correa y cols. Membrane-bound FRET probe visualizes MMP12 activity in pulmonary inflammation, Nature Chemical Biology (2009), 5(9), 628-63; S. Gehrig y cols. Spatially Resolved Monitoring of Neutrophil Elastase Activity with Ratiometric Fluorescent Reporters (2012) Angew. Chem. Int. Ed. , 51, 6258 -6261).

En una realización, el resto efector se selecciona de:



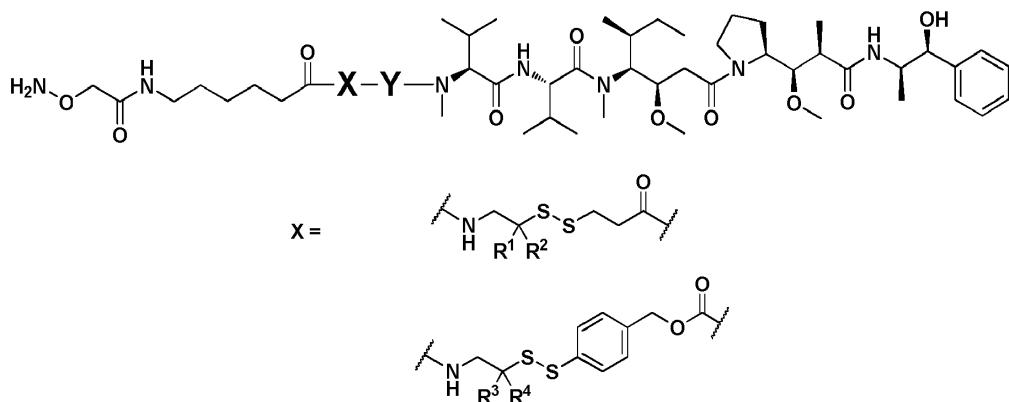
$\text{R}^{1-4} = \text{H} \text{ o } \text{CH}_3 \text{ o } \text{C}_2\text{H}_6 \text{ u otros grupos alifáticos}$



c) Restos efectores funcionalizados

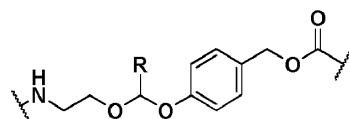
En ciertas realizaciones, los restos efectores se pueden funcionalizar para contener uno o más grupos adicionales además del propio resto efecto. Por ejemplo, el resto efecto puede contener enlazadores escindibles que liberan el resto efecto del polipeptido de unión bajo condiciones particulares. En realizaciones ejemplares, el resto efecto puede incluir un enlazador que es escindible por enzimas celulares y/o es sensible al pH. Adicionalmente o alternativamente, el resto efecto puede contener una unión disulfuro que se escinde mediante glutatona intracelular tras la captación en la célula. Enlazadores sensibles a disulfuro y pH ejemplares se proporcionan posteriormente:

10



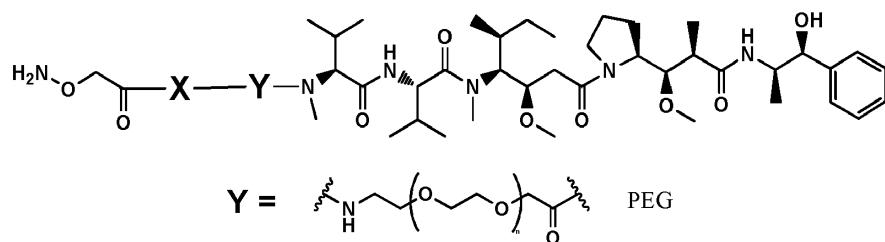
$R^{1-4} = H$ o CH_3 o C_2H_6 u otros grupos alifáticos

15

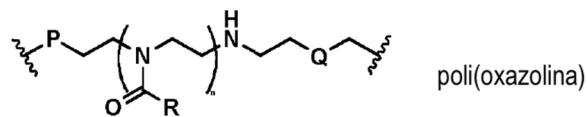
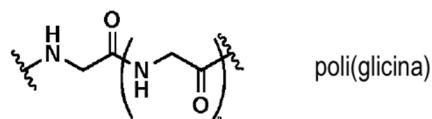


$R = H$ o grupos alquilo, alquilarilo sustituidos o no sustituidos

20 En otras realizaciones adicionales, el resto efecto puede incluir restos hidrófilos y biocompatibles tales como restos poli(glicina), poli(oxazolina) y/o PEG. Estructuras ("Y") ejemplares se proporcionan posteriormente:



25



R = H, grupo no sustituido o funcional que contiene grupos alquilo

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

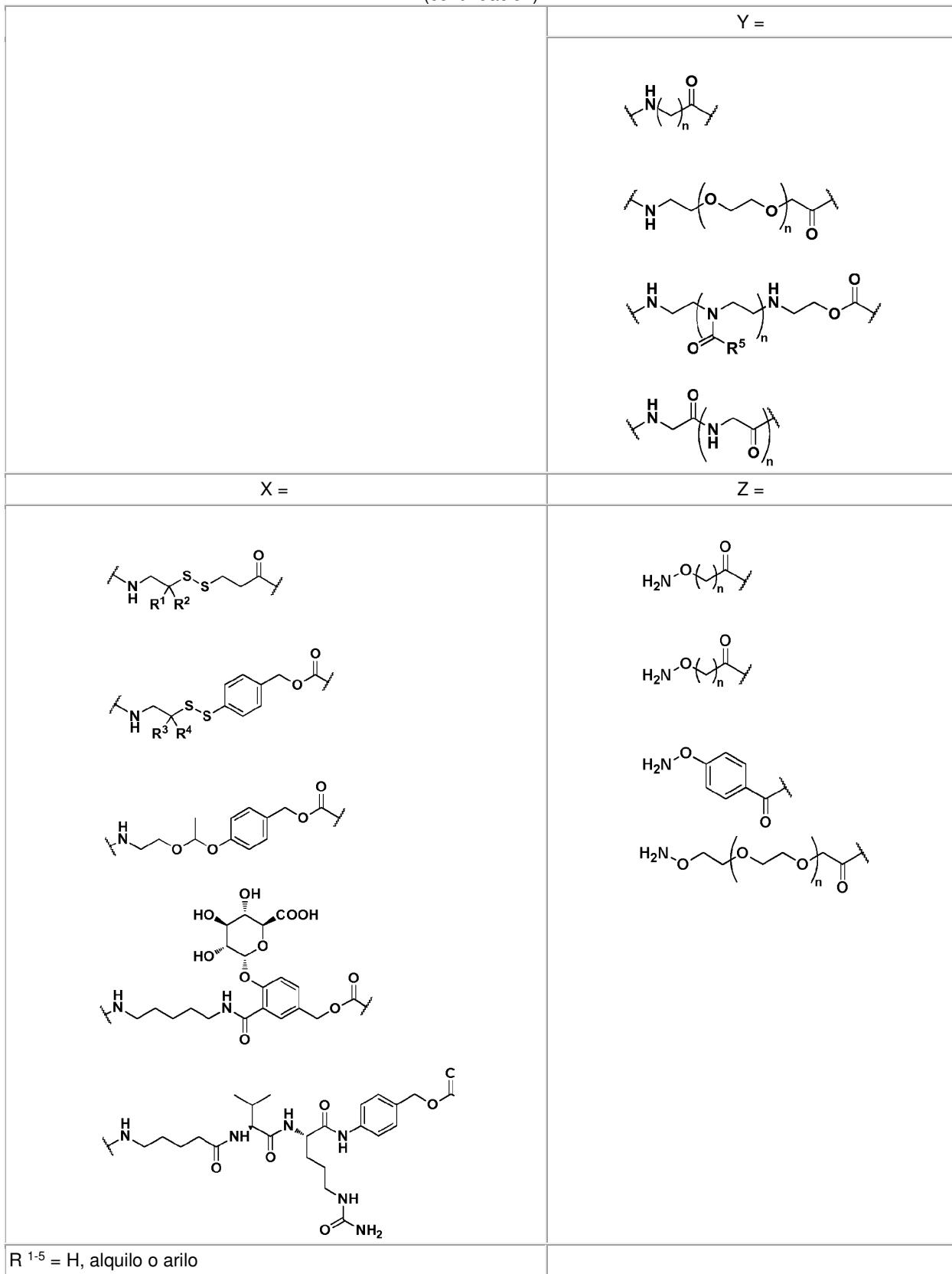
5 En ciertas realizaciones, el resto efector contiene un grupo aminoxy que facilita la conjugación a un polipéptido de unión a través de un enlace oxima estable. Restos efectores ejemplares que contienen grupos aminoxy se indican en la Tabla 2 en este documento.

Tabla 2. Restos efectores de aminoxy ejemplares (donde X puede ser cualquier enlazador, Y es cualquier espaciador y donde X y/o Y son opcionales)

10

Z-Y-X-Fármaco	

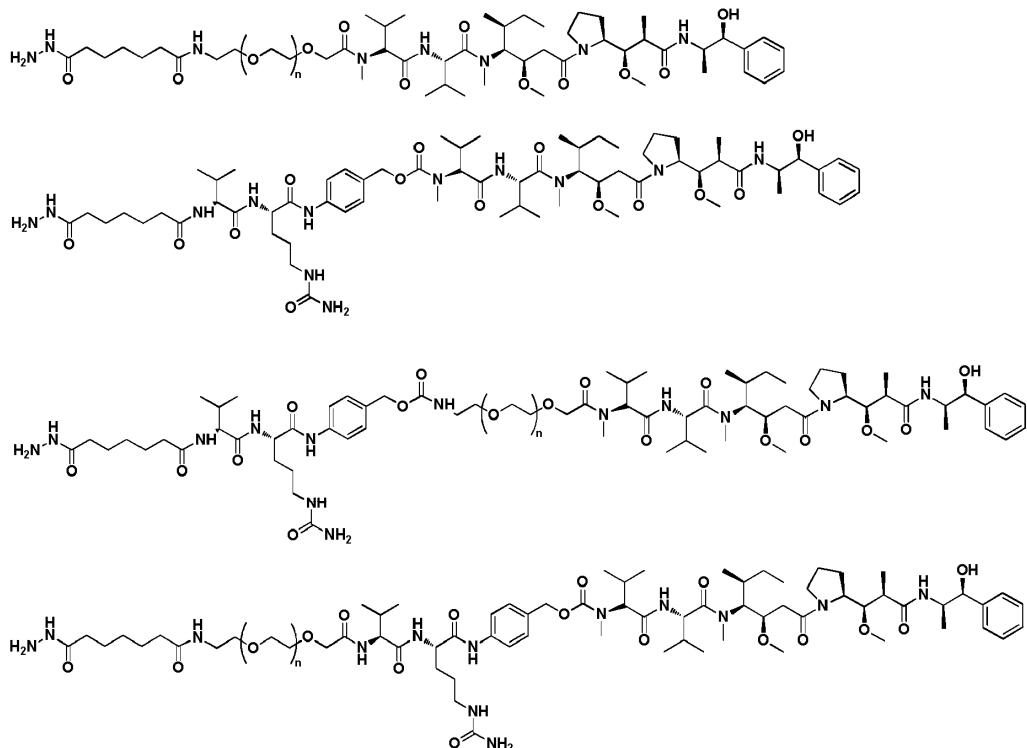
(continuación)



R¹⁻⁵ = H, alquilo o arilo

En otras realizaciones, el resto efector contiene un grupo hidrazida y/o hidrazida alquilada en N para facilitar la conjugación a un polipéptido de unión a través de un enlace hidrazona estable. Restos efectores que contienen grupos aminoxxi ejemplares se indica en la **Tabla 14** en este documento.

Tabla 14. restos efectores de hidracina y/o hidrazida ejemplares



d) Restos orientadores

El polipéptido de unión de la presente invención comprende un resto orientador que se une a una célula, donde el resto orientador es un resto de glucano GalNAc trivalente o un glucopéptido trigalactosilado. Más generalmente, sin embargo, la presente divulgación describe restos efectores que comprenden restos orientadores que se unen específicamente a una o más moléculas diana. Se puede emplear cualquier tipo de resto orientador incluyendo, sin limitación, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos (p. ej., glucanos), y sus combinaciones (p. ej., glucoproteínas, glucopéptidos y glucolípidos). En ciertos casos, el resto orientador es un carbohidrato o un glucopéptido. En ciertos casos, el resto orientador es un glucano. Los restos orientadores pueden ser moléculas presentes o no en la naturaleza. Restos orientadores adecuados para la conjugación pueden incluir los que contienen enlazadores de aminoxxi (véanse, p. ej., la **Figura 40 y 41**).

Los restos orientadores descritos en la presente invención se pueden unir a cualquier tipo de célula, incluyendo células de animales (p. ej., mamíferos), plantas o insectos bien *in vitro* o bien *in vivo*, sin limitación. Las células pueden ser de orígenes endodérmico, mesodérmico o ectodérmico, y pueden incluir cualquier tipo de célula. En ciertas realizaciones, el resto orientador se une a una célula, p. ej., una célula de mamífero, una facilita el aporte de un polipéptido de unión a la célula elegida, p. ej., para mejorar la orientación a la célula y/o la captación. Células diana ejemplares incluyen, sin limitación, células inmunitarias (p. ej., linfocitos tales como células B, células T, células agresoras naturales (NK), basófilos, macrófagos o células dendríticas), células hepáticas (p. ej., hepatocitos o células no parenquimales tales como células endoteliales sinusoidales hepáticas, células de Kupffer o células estrelladas hepáticas), células tumorales (p. ej., cualquier célula maligna o benigna incluyendo células de hepatoma, células de cáncer de pulmón, células de sarcoma, células de leucemia o células de linfoma), células vasculares (p. ej., células endoteliales aórticas o células endoteliales de la arteria pulmonar), células epiteliales (p. ej., células epiteliales escamosas simples, células epiteliales columnares simples, células epiteliales columnares seudoestratificadas células epiteliales escamosas estratificadas) o células mesenquimales (p. ej., células de los sistemas linfático y circulatorio, células de hueso y cartílago).

En una realización, el polipéptido de unión que comprende uno o más restos orientadores es internalizado por la célula. En otra realización, la cantidad del polipéptido de unión que comprende uno o más restos orientadores internalizados

por la célula es mayor que la cantidad de un polipéptido de unión de referencia que carece de un resto orientador internalizado por la célula.

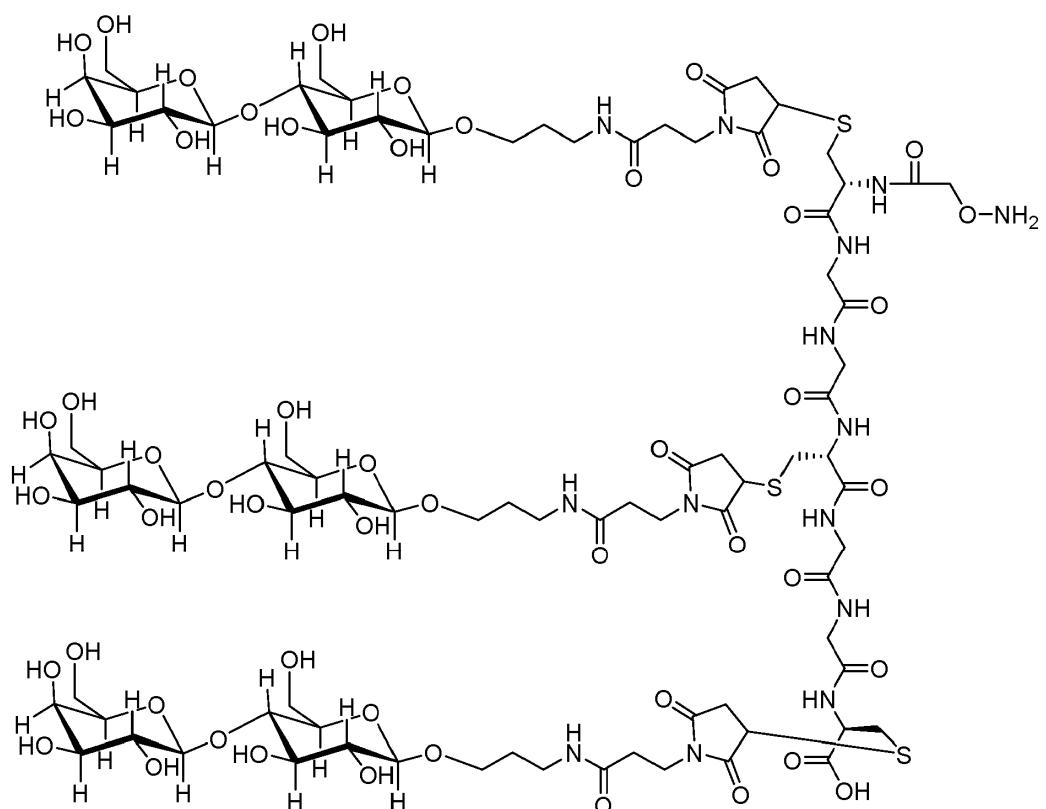
En una realización, el resto orientador se une a un receptor sobre la célula diana. Por ejemplo, el resto orientador puede comprender un resto 6-fosfato de manosa que se une a un receptor de 6-fosfato de manosa sobre la célula. En otras realizaciones ejemplares, el resto orientador se une a una Siglec sobre una célula diana. Sigecls ejemplares incluyen sialoadhesina (Siglec-1), CD22 (Siglec-2), CD33 (Siglec-3), MAG (Siglec-4), Siglec-5, Siglec-6, Siglec-7, Siglec-8, Siglec-9, Siglec-10, Siglec-11, Siglec-12, Siglec-14 o Siglec-15. En otras realizaciones adicionales, el resto orientador comprende un residuo de ácido siálico enlazado en α 2,3, α 2,6 o α 2,8. En una realización adicional, el resto orientador comprende un resto de α 2,3-sialil-lactosa o un resto de α 2,6-sialil-lactosa. Otros receptores ejemplares incluyen receptores de lectina, incluyendo, pero no limitados a, receptores de lectina tipo C, galectinas y receptores de lectina tipo L. Receptores de lectina ejemplares incluyen: DEC-205 (CD205; antígeno linfocítico 75), receptor de manosa de macrófagos (MMR; CD206), dectina-1, dectina-2, lectina tipo C inducible por macrófagos (Mincle), ICAM3 no asociada a integrina específica de células dendríticas (DC-SIGN, CD209), receptor-1 del grupo de lectina DC NK (DNLR-1), langerina (CD207), un lectícano, un receptor de asialoglucoproteína, inmunorreceptor de células dendríticas del receptor de lectina C (CLEC4A; CLECSF6; DCIR), lectina de tipo galactosa de macrófagos (MGL), un receptor de DC, una colectina, una selectina, un receptor de células NK, un receptor endocítico del dominio de lectina tipo multi-C (CTLD), una lectina del grupo Reg (tipo VII), condrolectina, tetranectina, policistina, atractina (ATRN), proteína básica principal de eosinófilos (EMBP), gen 2 de la región crítica del síndrome de DiGeorge (DGCR2), trombomodulina, Bimlec, una lectina del grupo XVI (SEEC) y una lectina del grupo XVII (CBP/Frem1/QBRICK).

Los polipéptidos de unión de la presente invención se pueden usar para retirar compuestos tóxicos y sustancias nocivas del hígado en múltiples enfermedades al orientarse a receptores de carbohidratos (p. ej., receptor de 6-fosfato de manosa, receptor de manosa y receptor de asialoglucoproteína). Por favor, véanse: Ganesan, L.P. y cols: Rapid and Efficient Clearance of Blood-borne Virus by Liver Sinusoidal Endothelium. PLoS Pathogens 2011, 9: 1; y Monnier, V.M. y cols: Glucosepane: a poorly understood advanced glycation end product of growing importance for diabetes and its complications. Clin Chem Lab Med 2014; 52: 21.

Los polipéptidos de unión de la presente invención también se pueden usar para orientarse a células tumorales a través de la orientación a uno o más receptores celulares diferentes incluyendo, pero no limitados a: receptores de carbohidratos, receptores de asialoglucoproteína y/o Sigecls. Por favor, véanse: Chen, W.C. y cols: In vivo targeting of B-cell lymphoma with glycan ligands of CD22. Blood 2010, 115: 4778; Chen, W.C. y cols: Targeting B lymphoma with nanoparticles bearing glycan ligands of CD22. Leuk Lymphoma 2012, 53: 208; Hatakeyama, S. y cols: Targeted drug delivery to tumor vasculature by a carbohydrate mimetic peptide. PNAS, 2011, 108: 19587; Hong, F. y cols: β -Glycan Functions as an Adjuvant for Monoclonal Antibody Immunotherapy by Recruiting Tumoricidal Granulocytes as Killer Cells. Cancer Res. 2003, 23: 9023; Kawasaki, N. y cols: Targeted delivery of lipid antigen to macrophages via the CD169/sialoadhesin endocytic pathway induces robust invariant natural killer T cell activation. PNAS 2013, 110: 7826; y Medina, S.H. y cols: N-acetylgalactosamine-functionalized dendrimers as hepatic cancer cell-targeted carriers. Biomaterials 2011, 32: 4118.

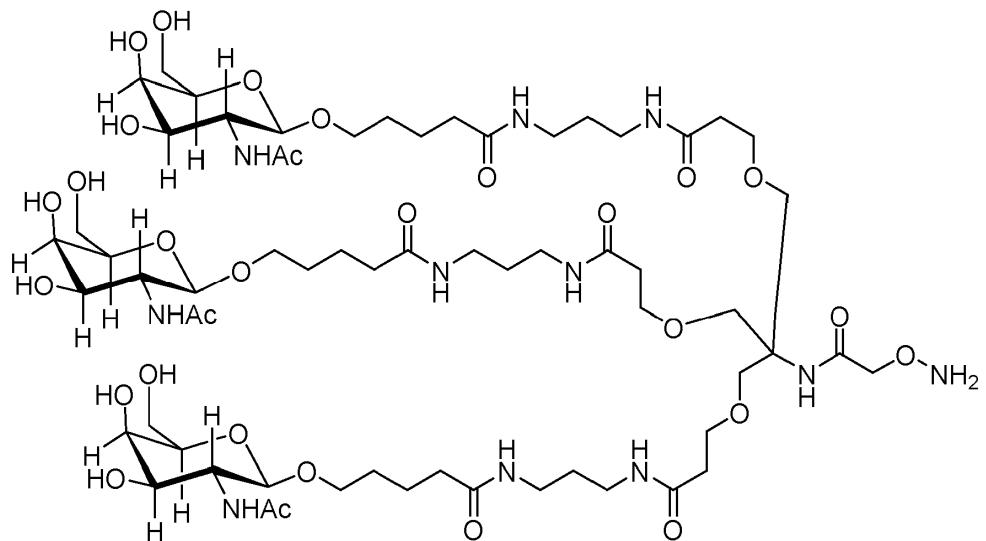
Los péptidos de unión de la presente invención también se pueden usar para regular la respuesta inmunitaria a través de diversos receptores incluyendo, pero no limitados a, receptores de carbohidratos, DC-SIGNs y/o Sigecls. Por favor, véanse: Anthony, R.M. y cols: Recapitulation of IVIG Anti-Inflammatory Activity with a Recombinant IgG Fc. Science 2008, 320: 373; Anthony, R.M. y cols: Identification of a receptor required for the anti-inflammatory activity of IVIG. PNAS 2008, 105: 19571; Kaneko, Y. y cols: Anti-Inflammatory Activity of Immunoglobulin G Resulting from Fc Sialylation. Science 2006, 313: 670; y Mattner, J. y cols: Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. Nature 2005, 434: 525.

En una realización, el resto orientador es un glucopéptido. En una realización adicional, el resto orientador es un glucopéptido trigalactosilado, p. ej., lactosa₃-Cys₃Gly₄ (mostrada en la Fórmula V, posteriormente):



[Fórmula V].

En algunas realizaciones, el resto orientador se puede representar mediante la Fórmula VII:



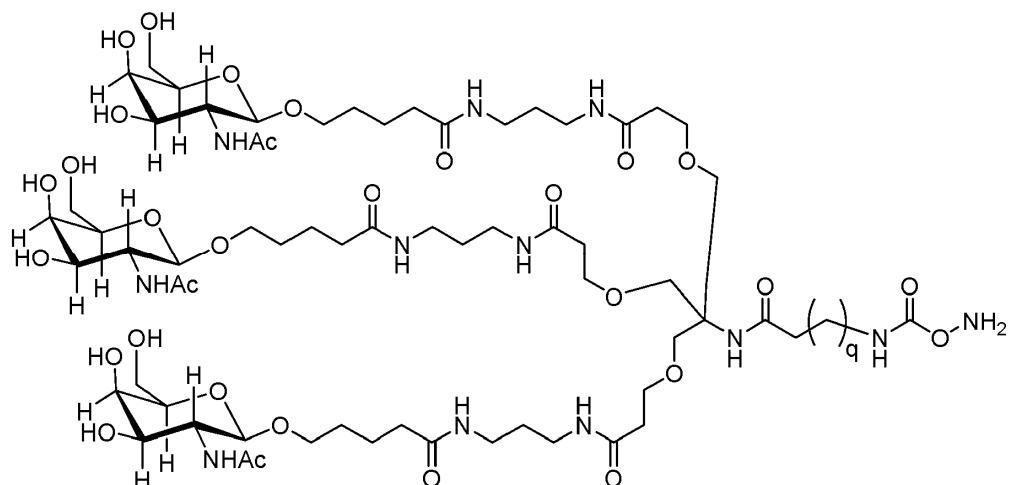
5

[Fórmula VII].

En algunas realizaciones, el resto conector del resto efector de Fórmula (I) comprende un espaciador, incluyendo, pero no limitado a, un alquilo C₂-30 o de 1 a 32 PEG. En algunas realizaciones, el resto conector del resto efector se elige basándose en la longitud aproximada (**Figura 79**). Longitudes del espaciador apropiadas incluyen, pero no se limitan a, ~12 Å, ~16 Å, ~20 Å, ~31 Å, ~45 Å, ~60 Å, ~80 Å y ~88 Å.

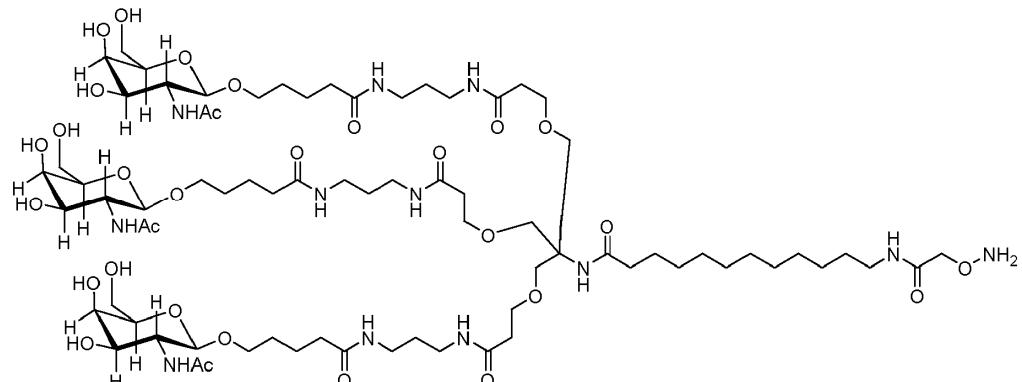
10

En ciertas realizaciones, el resto efector de Fórmula (I) se puede representar mediante la Fórmula VIII:



[Fórmula VIII],

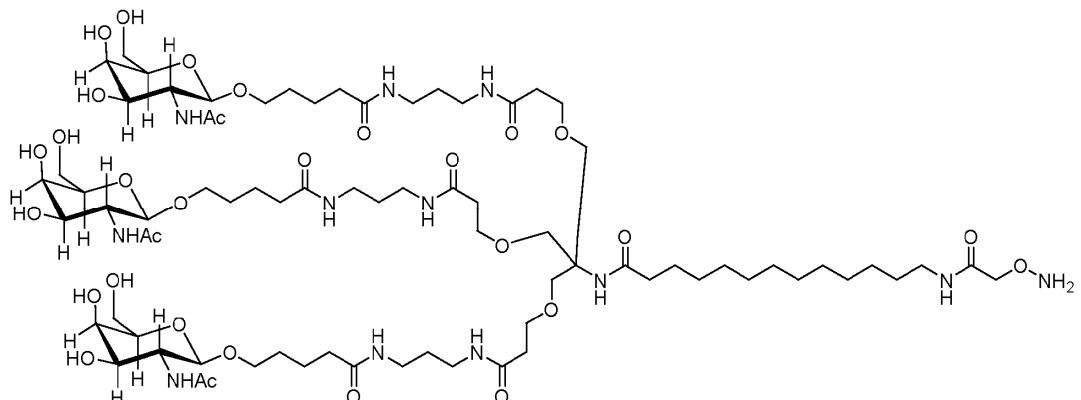
donde q es un número entero entre 1 y 29, inclusive. Por ejemplo, q puede ser 6, 8, 10, 11, 12, 16, 18 o 22. En realizaciones ejemplares, el resto efector de Fórmula VIII se puede representar mediante:



5

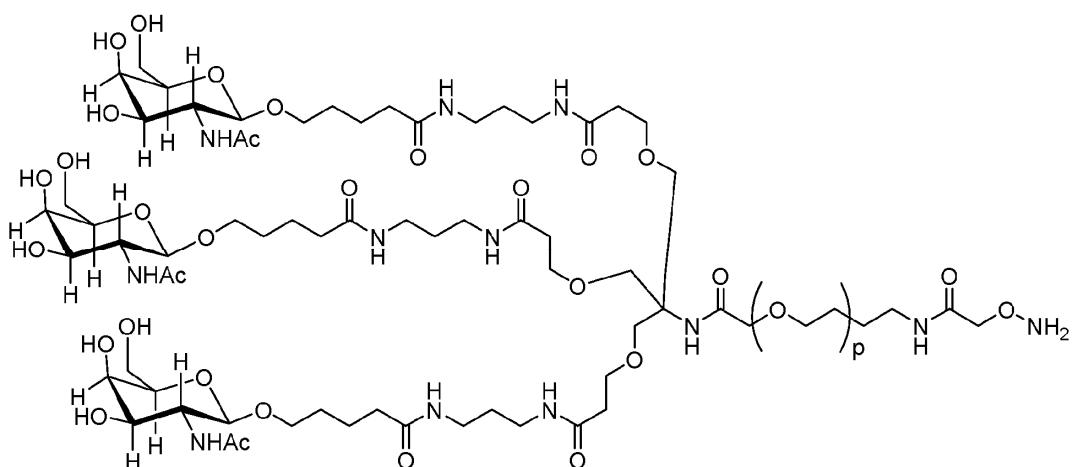
[Fórmula XIII]

0



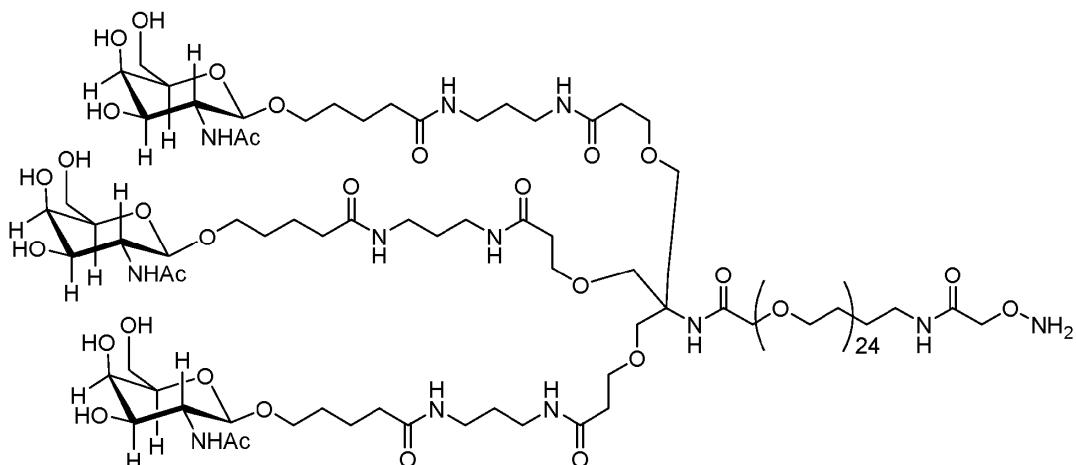
[Fórmula XIV].

10 En otras realizaciones, el resto efecto de Fórmula (I) se puede representar mediante la Fórmula IX:



[Fórmula IX],

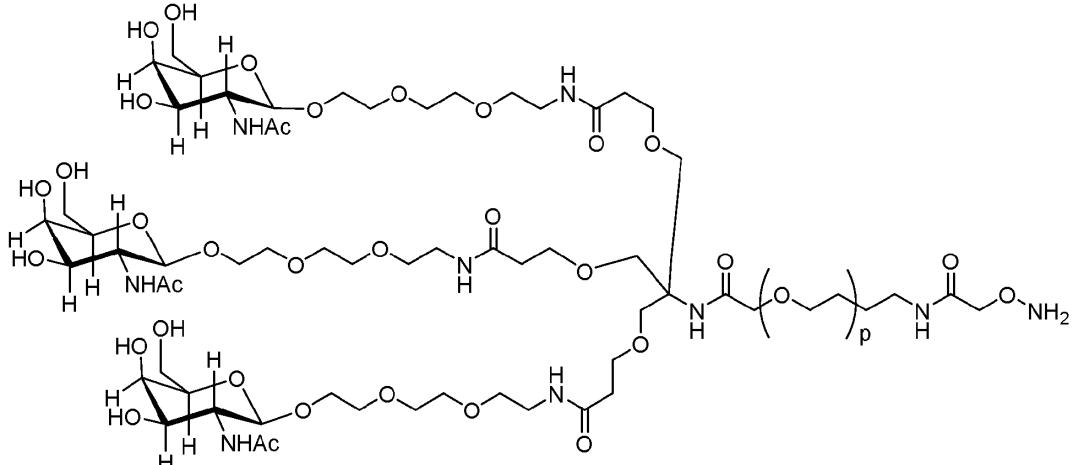
donde p tiene un valor de 1 a 32. Por ejemplo, p puede ser 2, 4, 6, 8, 11, 12 o 24. En realizaciones ejemplares, el resto efector de Fórmula IX se puede representar mediante la Fórmula X:



5

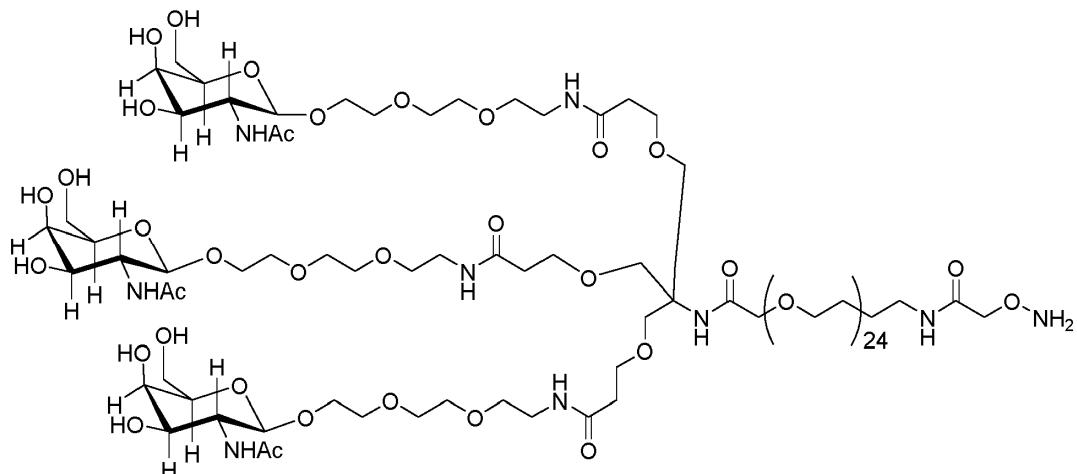
[Fórmula X].

En otras realizaciones, el resto efector de Fórmula (I) se puede representar mediante la Fórmula XI:



[Fórmula XI],

donde p tiene un valor de 1 a 32. Por ejemplo, p puede ser 2, 4, 6, 8, 11, 12 o 24. En realizaciones ejemplares, el resto efectivo de Fórmula XI se puede representar mediante la Fórmula XII:



[Fórmula XIII].

5 e) Restos de PEG

En otros casos, el resto efector es un resto que comprende poli(etilenglicol) (PEG, PEO o POE). El PEG es un oligómero o polímero de óxido de etileno y tiene la estructura química $H-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$ en la que el elemento entre paréntesis se repite. La PEGilación (o pegilación) es un procedimiento en el que cadenas poliméricas de PEG se ligan a otra molécula (p. ej., un polipéptido de unión), que se describe entonces como PEGilada (o pegilada). La PEGilación puede servir para reducir la inmunogenicidad y la antigenicidad así como para incrementar el tamaño hidrodinámico (tamaño en solución) de la molécula a la que se liga, reducir la depuración renal y prolongar el tiempo de circulación. La PEGilación también puede hacer a las moléculas más solubles en agua. En un caso, el resto de PEG puede comprender mono-PEG, bi-PEG o tri-PEG. En otro caso, el resto de PEG comprende de 3 a 3,5 PEG.

VI. Conjugación de restos efectores a polipéptidos de unión

15 En ciertos casos, los restos efectores se conjugan (bien directamente o bien a través de un resto enlazador) a un glucano oxidado (p. ej., un glucano enlazado por N oxidado) de un polipéptido de unión alterado (p. ej., un glucano manipulado en N114 de un dominio CH1 de anticuerpo o un glucano natural en N297 de un dominio F de anticuerpo). El término "glucano oxidado" significa que un sustituyente alcohol en el glucano se ha oxidado, proporcionando un sustituyente carbonilo. El sustituyente carbonilo puede reaccionar con un nucleófilo nitrogenado adecuado para formar un doble enlace carbono-nitrógeno. Por ejemplo, la reacción del grupo carbonilo con un grupo aminoxy o una hidrazina formaría una oxima o hidrazina, respectivamente. En un caso, el sustituyente carbonilo es un aldehído. Glucanos oxidados adecuados incluyen galactosa oxidada y ácido siálico oxidado.

20

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

25 Ab(Gal-C(O)H)_x(Gal-Sia-C(O)H)_y Fórmula (II).

en la que

- 30 A) Ab es un anticuerpo u otro polipéptido de unión según se define en este documento;

B) Gal es un componente derivado de galactosa;

C) Sia es un componente derivado de ácido siálico;

D) x es de 0 a 5; y

E) y es de 0 a 5,

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

Se puede emplear cualquier química reconocida en la técnica para conjugar un resto efector (p. ej., un resto efector que comprende un resto enlazador) a un glucano (véase p. ej., Hermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*. Academic Press (1996)). En ciertas realizaciones, se oxida en primer lugar un residuo de sacárido (p. ej., un residuo de ácido siálico o galactosa) (p. ej., usando tratamiento de ácido siálico con peryodato sódico o tratamiento de galactosa con galactosa oxidasa) para generar un grupo aldehído reactivo. Este grupo aldehído se hace reaccionar con resto efector un grupo aminoxy o un grupo hidrazina para formar un enlazador de oxíma o hidrazona, respectivamente. Métodos ejemplares que emplean este esquema de reacción general se indican en los Ejemplos 10 a 15.

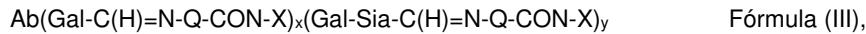
- 5 10 En ciertas realizaciones, los glucanos naturales o manipulados de un polipéptido de unión se pretratan en primer lugar con enzimas glucosiltransferasa *in vitro* para proporcionar un residuo de sacárido terminal que es adecuadamente reactivo. Por ejemplo, la sialilación se puede conseguir en primer lugar usando una combinación de galactosiltransferasa (Gal T) y sialiltransferasa (Sial T). En ciertas realizaciones, glucanos biantenarios que carecen de galactosa (GOF o GO) o que contienen una galactosa (G1F o G1) se pueden convertir en estructuras galactosiladas o sialiladas de orden superior adecuadas para la conjugación (G1F, G1, G2F, G2, G1S1F, G1S1, G2S1F, G2S1, G2S2F o G2S2).

15 20 Un esquema de conjugación ejemplar para producir glucoconjungados sialilados se muestra en la **Figura 25C**. En una realización ejemplar, se introducen residuos de ácido siálico enzimáticamente y específicamente para un sitio en el glucano de un anticuerpo (p. ej., un glucano natural en Asn-297) usando una combinación de galactosiltransferasa (Gal T) y sialiltransferasa (Sial T). Los residuos de ácido siálico introducidos se oxidan posteriormente con una baja concentración de peryodato sódico para dar aldehídos de ácido siálico reactivos, adecuadamente reactivos con enlazadores (p. ej., enlazadores de aminoxy) para generar conjugados de anticuerpo-resto efector (p. ej., conjugados enlazados por oxíma de anticuerpo-resto efector). Al controlar el número de glucano y el número de residuos siálicos con remodelación *in vitro*, el experto tiene un control preciso sobre la relación fármaco-anticuerpo (DAR) de los conjugados de anticuerpo-resto efector. Por ejemplo, si se añade ~1 ácido siálico sobre un solo glucano biantenario (A1F) en cada cadena pesada, se puede obtener homogéneamente un anticuerpo o polipéptido de unión con una DAR de 2.

VII. Polipéptidos de unión modificados

- 25 30 En ciertos casos, la divulgación proporciona polipéptidos modificados que son el producto de que se conjuguen restos efectores conjugantes (bien directamente o bien a través de un resto enlazador) a uno o más glucanos oxidados (p. ej., un glucano enlazado por N oxidado) de un polipéptido de unión alterado (p. ej., un glucano manipulado en N114 de un dominio de CH1 de anticuerpo o un glucano natural en N297 de un dominio F de anticuerpo).

35 En un caso, el polipéptido de unión puede ser de Fórmula (III):



en la que:

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

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

- 50 50 En un caso, el polipéptido de unión de Fórmula (III) puede ser de Fórmula (IIIa):

Ab(Gal-C(H)=N-Q-CH₂-C(O)-Z-X)_x(Gal-Sia-C(H)=N-Q-CH₂-C(O)-Z-X)_y,

Fórmula (IIIa),

en la que:

A) Ab es un anticuerpo;

5 B) Q es NH u O;

C) Z es Cys-(MC)_a-(VC)_b-(PABC)_c-(C₁₆H₃₂O₈ C₂H₄)_f -, donde

i. Cys es una cisteinamida derivada componente;

ii. MC es un componente derivado de maleimida;

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

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

v. X es un resto efector (p. ej., un resto orientador según se define en este documento);

vi. a es 0 o 1;

vii. b es 0 o 1;

viii. c es 0 o 1; y

15 ix. f es 0 o 1;

D) X es un agente terapéutico según se define en este documento;

E) Gal es un componente derivado de galactosa;

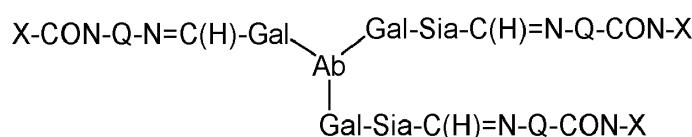
F) Sia es un componente derivado de ácido siálico;

G) x es de 0 a 5; y

20 H) y es de 0 a 5,

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

Se debe entender que la Fórmula (III) no está destinada a implicar que el anticuerpo, el sustituyente Gal y el sustituyente Gal-Sia estén conectados en forma de cadena. En cambio, cuando están presentes estos sustituyentes, el anticuerpo está conectado directamente a cada sustituyente. Por ejemplo, un polipéptido de unión de Fórmula (III) en la que x es 1 e y es 2 podría tener la disposición mostrada posteriormente:



Fórmula (III)

30 El sustituyente CON en la Fórmula (III) y los componentes de la misma son como se describen con respecto a la Fórmula (I) para los restos efectores.

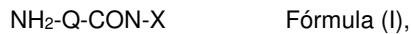
En un caso, Q es NH. En otro caso, Q es O.

35 En un caso, x es 0.

El anticuerpo Ab de Fórmula (III) puede ser cualquier anticuerpo adecuado según se describe en este documento.

En un caso, se proporciona un método para preparar el polipéptido de unión de Fórmula (III), comprendiendo el método de hacer reaccionar un resto efector de Fórmula (I):

5



en la que:

- 10 A) Q es NH u O;
B) CON es un resto conector; y
C) X es un resto efector (p. ej., un resto orientador según se define en este documento).

con un anticuerpo modificado de Fórmula (II)



15

en la que

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

20 En un caso, se proporciona un método para preparar el polipéptido de unión de Fórmula (III), comprendiendo el método hacer reaccionar un resto efector de Fórmula (I):



en la que:

- 25 A) Q es NH u O;
B) CON es un resto conector; y
C) X es un resto efector (p. ej., un resto orientador según se define en este documento),

con un anticuerpo modificado de Fórmula (IIa)

30



en la que

- 35 A) Ab es un anticuerpo según se describe en este documento;

B) Gal es un componente derivado de galactosa;

C) Sia es un componente derivado de ácido siálico;

D) x es de 0 a 5; y

E) y es de 0 a 5,

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

VII. Métodos de tratamiento con anticuerpos modificados

La divulgación proporciona métodos para tratar o diagnosticar a un paciente que lo necesite que comprenden administrar una cantidad eficaz de un polipéptido de unión divulgado en este documento. En ciertos casos, la presente divulgación proporciona estuches y métodos para el diagnóstico y/o el tratamiento de trastornos, p. ej., trastornos neoplásicos en un sujeto mamífero que necesite este tratamiento. En ciertos casos ejemplares, el sujeto es un ser humano.

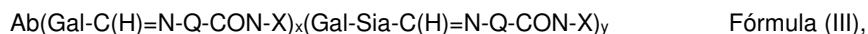
Los polipéptidos de unión de la actual divulgación son útiles en un número de diferentes aplicaciones. Por ejemplo, en un caso, los polipéptidos de unión en cuestión son útiles para reducir o eliminar células que soportan un epítopo reconocido por el dominio de unión del polipéptido de unión. En otro caso, los polipéptidos de unión en cuestión son eficaces para reducir la concentración de o eliminar antígeno soluble en la circulación. En un caso, los polipéptidos de unión pueden reducir el tamaño del tumor, inhibir el crecimiento tumoral y/o prolongar el tiempo de supervivencia de animales que tienen tumores. Según esto, esta divulgación también se refiere a un método para tratar tumores en un ser humano u otro animal al administrar a este ser humano o animal una cantidad atóxica eficaz de anticuerpo modificado. Un experto en la técnica podría, mediante experimentación habitual, determinar qué cantidad atóxica eficaz de polipéptido de unión modificado tendría el fin de tratar neoplasias malignas. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente activa de un anticuerpo modificado o uno o más fragmentos del mismo puede variar según factores tales como el estadio de enfermedad (p. ej., estadio I frente a estadio IV), la edad, el sexo, las complicaciones médicas (p. ej., afecciones o enfermedades inmunsuprimidas) y el peso del sujeto, y la capacidad del anticuerpo modificado para provocar una respuesta deseada en el sujeto. El régimen de dosificación se puede ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se pueden administrar varias dosis divididas diariamente, o la dosis se puede reducir proporcionalmente según esté indicado por las exigencias de la situación terapéutica.

En general, las composiciones proporcionadas en la actual divulgación se pueden usar para tratar profilácticamente o terapéuticamente cualquier neoplasia que comprenda un marcador antigénico que permita la elección de las células cancerosas por el anticuerpo modificado.

VIII. Métodos para administrar anticuerpos modificados o fragmentos de los mismos

Métodos para preparar y administrar polipéptidos de unión de la actual divulgación a un sujeto son bien conocidos o son determinados fácilmente por los expertos en la técnica. La vía de administración de los polipéptidos de unión de la actual divulgación puede ser oral, parenteral, mediante inhalación o tópica. El término parenteral según se usa en este documento incluye la administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, rectal o vaginal. Aunque se contempla claramente que todas estas formas de administración estén dentro del alcance de la actual divulgación, una forma para la administración sería una solución para inyección, en particular para inyección o goteo intravenosos o intraarteriales. Habitualmente, una composición adecuada para inyección puede comprender un tampón (p. ej. un tampón de acetato, fosfato o citrato), un tensioactivo (p. ej. polisorbato), opcionalmente un agente estabilizante (p. ej. albúmina humana), etc. Sin embargo, en otros métodos compatibles con las enseñanzas de este documento, los anticuerpos modificados se pueden aportar directamente a la zona de la población celular adversa incrementando de ese modo la exposición del tejido enfermo al agente terapéutico.

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



en la que:

- 45 A) Ab es un anticuerpo según se define en este documento;
- B) Q es NH u O;
- C) CON es a resto conector según se define en este documento;
- D) X es un resto efector (p. ej., a resto orientador según se define en este documento);
- E) Gal es un componente derivado de galactosa;
- F) Sia es un componente derivado de ácido siálico;
- G) x es de 0 a 5; y

H) y es de 0 a 5,

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

- 5 Preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Portadores acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medios tamponados. En las composiciones y los métodos de la actual divulgación, portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, tampón de fosfato 0,01-0,1 M, p. ej., 0,05 M, o solución salina al 0,8%. Otros vehículos parenterales comunes incluyen soluciones de fosfato sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, medio de Ringer con lactato, o aceites fijos. Vehículos intravenosos incluyen reponedores de líquidos y nutrientes, reponedores de electrolitos, tales como los basados en dextrosa de Ringer, y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares. Más particularmente, composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones (cuando sean solubles en agua) o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En estos casos, la composición tiene que ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que exista una fácil administración con jeringa. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y típicamente estará conservada contra la acción contaminante de los microorganismos, tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (p. ej., glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidex apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos.
- 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60
- La prevención de la acción de microorganismos se puede alcanzar mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, se incluirán agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, o cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede llevar a cabo al incluir en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.
- En cualquier caso, se pueden preparar soluciones inyectables estériles al incorporar un compuesto activo (p. ej., un polipéptido de unión modificado por sí mismo o en combinación con otros agentes activos) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados en este documento, según se requiera, seguido por esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan al incorporar el compuesto activo en un vehículo estéril, que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, métodos de preparación ejemplares incluyen secado a vacío y liofilización, que da un polvo de un ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional procedente de una solución del mismo previamente filtrada estérilmente. Las preparaciones para inyecciones se procesan, se cargan en recipientes tales como ampollas, bolsas, jeringas o viales, y se sellan bajo condiciones asépticas según métodos conocidos en la técnica. Además, las preparaciones se pueden envasar y vender en forma de estuche tal como los descritos en los documentos en tramitación junto con el presente U.S.S.N. 09/259.337 y U.S.S.N. 09/259.338. Estos artículos de fabricación tendrán típicamente etiquetas o prospectos que indiquen que las composiciones asociadas son útiles para tratar a un sujeto que sufra, o esté predisposto a, trastornos autoinmunitarios o neoplásicos.
- Dosis eficaces de las composiciones de la presente divulgación, para el tratamiento de las afecciones descritas anteriormente, varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo los medios de administración, la zona elegida, el estado fisiológico del paciente, si el paciente es un ser humano o un animal, otras medicaciones administradas y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Habitualmente, el paciente es un ser humano pero también se pueden tratar mamíferos no humanos incluyendo mamíferos transgénicos. Las dosificaciones de tratamiento se pueden titular usando métodos habituales conocidos por los expertos en la técnica para optimizar la seguridad y la eficacia.

Para la inmunización pasiva con un polipéptido de unión, la dosificación puede variar, p. ej., de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg (p. ej., 0,02 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1mg/kg, 2 mg/kg, etc.), del peso corporal del enfermo. Por ejemplo, las dosificaciones puede ser 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg, p. ej., al menos 1 mg/kg. Dosis intermedias en los intervalos anteriores también pretenden estar dentro del alcance de la actual divulgación. Estas dosis de pueden administrar a los sujetos diariamente, en días alternos, semanalmente o según cualquier otro esquema determinado mediante análisis empírico. Un tratamiento ejemplar implica la administración en múltiples dosificaciones a lo largo de un período prolongado, por ejemplo, de al menos seis meses. Regímenes de tratamiento ejemplares adicionales implican la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada de 3 a 6 meses. Esquemas de dosificación ejemplares incluyen 1-10 mg/kg o 15 mg/kg en días consecutivos, 30 mg/kg en días alternos o 60 mg/kg semanalmente. En algunos métodos, se administran simultáneamente dos o más anticuerpos monoclonales con

diferentes especificidades de unión, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado se encuentra dentro de los intervalos indicados.

- 5 Los polipéptidos de unión de la actual divulgación se pueden administrar en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosificaciones individuales pueden ser semanales, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares según se indique al medir los niveles en sangre de polipéptido o antígeno de unión modificado en el paciente. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para alcanzar una concentración en plasma de polipéptido de unión modificado de 1-1000 µg/ml y en algunos métodos 25-300 µg/ml. Alternativamente, los polipéptidos de unión se pueden administrar como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. Para los anticuerpos, la dosificación y la frecuencia varían dependiendo de la semivida del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanizados muestran la semivida más larga. seguidos por los anticuerpos quiméricos y los anticuerpos no humanos.
- 10 15 La dosificación y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen los presentes anticuerpos o un cóctel de las mismas se administran a un paciente que todavía no está enfermo para potenciar la resistencia del paciente. Se define que esta cantidad es una "dosis profilácticamente eficaz". En este uso, las cantidades precisas dependen de nuevo del estado de salud y la inmunidad general del paciente, pero generalmente varían de 0,1 a 25 mg por dosis, especialmente de 0,5 a 2,5 mg por dosis. Una dosificación relativamente baja se administra a intervalos relativamente 20 infrecuentes durante un período largo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, a veces se requiere una dosificación relativamente alta (p. ej., de aproximadamente 1 a 400 mg/kg de anticuerpo por dosis, usándose más comúnmente dosificaciones de 5 a 25 mg para radioinmunoconjungados y dosis superiores para anticuerpos modificados con fármacos citotóxicos) a intervalos relativamente cortos hasta que se reduce o termina la progresión de la enfermedad, ohasta que el paciente muestre 25 una mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Posteriormente, se puede administrar al paciente un régimen profiláctico.
- 30 35 Los polipéptidos de unión de la actual divulgación se pueden administrar opcionalmente en combinación con otros agentes que son eficaces para tratar el trastorno o la afección que necesita tratamiento (p. ej., profiláctico o terapéutico). Dosificaciones de tratamiento individuales eficaces (es decir, cantidades terapéuticamente eficaces) de anticuerpos modificados marcados con 90Y de la actual divulgación varían entre aproximadamente 5 y aproximadamente 75 mCi, tal como entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40 mCi. Dosificaciones de tratamiento individuales no ablativas de la médula eficaces de anticuerpos modificados con ^{131}I varían de entre 30 35 40 45 aproximadamente 5 y aproximadamente 70 mCi, oentre aproximadamente 5 y aproximadamente 40 mCi. Dosificaciones de tratamiento individuales ablativas eficaces (es decir, pueden requerir trasplante autólogo de médula ósea) de anticuerpos marcados con ^{131}I varían de entre aproximadamente 30 y aproximadamente 600 mCi, tal como entre aproximadamente 50 y menos de aproximadamente 500 mCi. Junto con un anticuerpo químérico, debido a la semivida en circulación más prolongada con relación a los anticuerpos murinos, las dosificaciones de tratamiento individuales no ablativas de la médula eficaces de anticuerpos químéricos marcados con yodo-131 varían de entre 40 45 50 55 600 mCi, tal como menos de aproximadamente 30 mCi. Los criterios de obtención de imágenes para, p. ej., el marcador de ^{111}In , son típicamente menos de aproximadamente 5 mCi.
- 50 55 60 Aunque los polipéptidos de unión se pueden administrar como se describe inmediatamente antes, se debe enfatizar que en otros casos los polipéptidos de unión se pueden administrar a pacientes por lo demás sanos como una terapia de primera línea. En estos casos, los polipéptidos de unión se pueden administrar a pacientes que tengan reservas de médula roja normales o promedio y/o a pacientes que no se han sometido, y no se están sometiendo, a terapia. Según se usa en este documento, la administración de anticuerpos modificados o fragmentos de los mismos junto o en combinación con una terapia adyuvante significa la administración o aplicación secuencial, simultánea, coextensiva, paralela, concomitante o contemporánea de la terapia y los anticuerpos divulgados. Los expertos en la técnica apreciarán que la administración o aplicación de los diversos componentes del régimen terapéutico combinado se puede temporizar para potenciar la eficacia global del tratamiento. Por ejemplo, los agentes quimioterapéuticos se podrían administrar en ciclos de tratamiento bien conocidos seguidos en unas pocas semanas por radioinmunoconjungados de la presente divulgación. A la inversa, polipéptidos de unión asociados a citotoxinas se podrían administrar intravenosamente seguido por radiación de haz externo localizada en el tumor. En otros casos adicionales, el polipéptido de unión modificado se puede administrar paralelamente con uno o más agentes quimioterapéuticos seleccionados en una única visita a la consulta. Un experto (p. ej. un oncólogo experimentado) podría discernir fácilmente regímenes terapéuticos combinados eficaces sin experimentación excesiva basándose en la terapia adyuvante seleccionada y las enseñanzas de la actual memoria descriptiva.
- 65 60 A este respecto, se apreciará que la combinación de los polipéptidos de unión y el agente quimioterapéutico se puede administrar en cualquier orden y dentro de cualquier espacio de tiempo que proporcione un beneficio terapéutico al paciente. Esto es, el agente quimioterapéutico y los polipéptidos de unión se pueden administrar en cualquier orden o paralelamente. En casos seleccionadoslos polipéptidos de unión de la presente divulgación se administrarán a pacientes que se han sometido previamente a quimioterapia. En otros casos adicionaleslos polipéptidos de unión y el tratamiento quimioterapéutico se administrarán sustancialmente simultáneamente o paralelamente. Por ejemplo, se le pueden dar al paciente los polipéptidos de unión mientras se somete a un ciclo de quimioterapia. En algunos casosel

anticuerpo modificado se administrará dentro de un año de cualquier agente quimioterapéutico o tratamiento. En otros casos los polipéptidos de unión se administrarán dentro de los 10, 8, 6, 4 o 2 meses de cualquier agente quimioterapéutico o tratamiento. En otros casos adicionales el polipéptido de unión se administrará dentro de las 4, 3, 2 o 1 semana(s) de cualquier agente quimioterapéutico o tratamiento. En otros casos adicionales los polipéptidos de unión se administrarán dentro de los 5, 4, 3, 2 o 1 día(s) del agente quimioterapéutico o tratamiento seleccionados. Se apreciará además que los dos agentes o tratamientos se pueden administrar al paciente dentro de una cuestión de horas o minutos (es decir sustancialmente simultáneamente).

Se apreciará además que los polipéptidos de unión de la actual divulgación se pueden usar junto o en combinación con cualquier agente o agentes quimioterapéuticos (p. ej. para proporcionar un régimen terapéutico combinado) que eliminen, reduzcan, inhiban o controlen el crecimiento de células neoplásicas *in vivo*. Agentes quimioterapéuticos ejemplares que son compatibles con la actual divulgación incluyen agentes alquilantes, alcaloides de las vincas (p. ej., vincristina y vinblastina), procarbazina, metotrexato y prednisona. La combinación de cuatro fármacos MOPP (meclétamina (mostaza nitrogenada), vincristina (Oncovin), procarbazina y prednisona) es muy eficaz para tratar diversos tipos de linfoma. En pacientes resistentes, se pueden usar las combinaciones MOPP, ABVD (p. ej., adriamicina, bleomicina, vinblastina y dacarbazine), CHIVPP (clorambucilo, vinblastina, procarbazina y prednisona), CABS (lomustina, doxorrubicina, bleomicina y estreptozotocina), MOPP más ABVD, MOPP más ABV (doxorrubicina, bleomicina y vinblastina) o BCVPP (carmustina, ciclofosfamida, vinblastina, procarbazina y prednisona). Arnold S. Freedman y Lee M. Nadler, Malignant Lymphomas, en HARRISON'S PRINCIPLES OF INTERNAL MEDICINE 1774-1788 (Kurt J. Isselbacher y cols, eds., 13^a ed. 1994) y V. T. DeVita y cols, (1997) y las referencias citadas en las mismas para una dosificación y planificación estándar. Estas terapias se pueden usar inalteradas o alterarse según sea necesario para un paciente particular, en combinación con uno o más polipéptidos de unión de la actual divulgación según se describe en este documento.

Regímenes adicionales que son útiles en el contexto de la presente divulgación incluyen el uso de agentes alquilantes individuales tales como ciclofosfamida o clorambucilo, o combinaciones tales como CVP (ciclofosfamida, vincristina y prednisona), CHOP (CVP y doxorrubicina), C-MOPP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona y procarbazina), CAP-BOP (CHOP más procarbazina y bleomicina), m-BACOD (CHOP más metotrexato, bleomicina y leucovorina), ProMACE-MOPP (prednisona, metotrexato, doxorrubicina, ciclofosfamida, etopósido y leucovorina más MOPP estándar), ProMACE-CytaBOM (prednisona, doxorrubicina, ciclofosfamida, etopósido, citarabina, bleomicina, vincristina, metotrexato y leucovorina) y MACOP-B (metotrexato, doxorrubicina, ciclofosfamida, vincristina, prednisona en dosis fija, bleomicina y leucovorina). Los expertos en la técnica podrán determinar fácilmente dosificaciones y una programación estándar para cada uno de estos regímenes. CHOP también se ha combinado con bleomicina, metotrexato, procarbazina, mostaza nitrogenada, arabinósido de citosina y etopósido. Otros agentes quimioterapéuticos compatibles incluyen, pero no se limitan a, 2-clorodesoxiadenosina (2-CDA), 2'-desoxicoforomicina y fludarabina.

Para pacientes con NHL (linfoma no hodgkiniano) de grado intermedio y alto, que no consiguen alcanzar la remisión o recaen, se usa una terapia de rescate. Las terapias de rescate emplean fármacos tales como arabinósido de citosina, carboplatino, cisplatino, etopósido e ifosfamida administrados solos o en combinación. En formas recidivantes o agresivas de ciertos trastornos neoplásicos, a menudo se usan los siguientes protocolos: IMVP-16 (ifosfamida, metotrexato y etopósido), MIME (metil-gag, ifosfamida, metotrexato y etopósido), DHAP (dexametasona, citarabina en dosis altas y cisplatino), ESHAP (etopósido, metilpredisolona, citarabina HD, cisplatino), CEPP(B) (ciclofosfamida, etopósido, procarbazina, prednisona y bleomicina) y CAMP (lomustina, mitoxantrona, citarabina y prednisona) cada uno con grados y esquemas de dosificación bien conocidos.

La cantidad de agente quimioterapéutico a usar en combinación con los anticuerpos modificados de la actual divulgación puede variar por sujeto o se puede administrar según lo que se conoce en la técnica. Véase, por ejemplo, Bruce A Chabner y cols, Antineoplastic Agents, en GOODMAN & GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS 1233-1287 ((Joel G. Hardman y cols, eds., 9^a ed. 1996).

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

Una composición farmacéutica según la presente divulgación puede comprender un portador estéril atóxico farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina fisiológica, tampones atóxicos, conservantes y similares. Para los fines de la actual solicitud, una cantidad farmacéuticamente eficaz del polipéptido de unión modificado, el fragmento inmunorreactivo o el recombinante del mismo, conjugado o no conjugado a un agente terapéutico, se considerará una cantidad suficiente para conseguir la unión eficaz a un antígeno y para conseguir un beneficio, p. ej., para mejorar los síntomas de una enfermedad o un trastorno o para detectar una sustancia o una célula. En el caso de células tumorales, el polipéptido de unión modificado puede interactuar con antígenos inmunorreactivos seleccionados sobre células neoplásicas o inmunorreactivas y proporcionar un incremento en la muerte de esas células. Por supuesto, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden administrar en dosis individuales o múltiples para proporcionar una cantidad farmacéuticamente eficaz del polipéptido de unión modificado.

De acuerdo con el alcance de la presente divulgación, los polipéptidos de unión de la divulgación se pueden administrar a un ser humano u otro animal según los susodichos métodos de tratamiento en una cantidad suficiente para producir un efecto terapéutico o profiláctico. Los polipéptidos de unión de la divulgación se pueden administrar a este ser humano u otro animal en una forma de dosificación convencional preparada al combinar el anticuerpo de la divulgación con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable convencional según técnicas conocidas. Será identificado por un experto en la técnica que la forma y el carácter del portador o diluyente farmacéuticamente aceptable están dictados por la cantidad de ingrediente activo con la que se ha de combinar, la vía de administración y otras variables bien conocidas. Los expertos en la técnica apreciarán además que un cóctel que comprenda una o más especies de polipéptidos de unión descritos en la actual divulgación puede resultar ser particularmente eficaz.

IX. Expresión de polipéptidos de unión

En un caso, la divulgación proporciona polinucleótidos que codifican los polipéptidos de unión divulgados en este documento. También se proporciona un método para elaborar un polipéptido de unión que comprende expresar estos polinucleótidos.

Polinucleótidos que codifican los polipéptidos de unión divulgados en este documento se insertan típicamente en un vector de expresión para la introducción en células anfitrionas que se pueden usar para producir la cantidad deseada de los anticuerpos reivindicados, o fragmentos de los mismos. Según esto, en ciertos aspectos, la divulgación proporciona vectores de expresión que comprenden los polinucleótidos divulgados en este documento y células anfitrionas que comprenden estos vectores y polinucleótidos.

El término "vector" o "vector de expresión" se usa en este documento con los fines de la memoria descriptiva y las reivindicaciones para indicar vectores usados según la presente divulgación como un vehículo para introducirse en y expresar un gen deseado en una célula. Como es sabido por los expertos en la técnica, estos vectores se pueden seleccionar fácilmente del grupo que consiste en plásmidos, fagos, virus y retrovirus. En general, los vectores compatibles con la actual divulgación comprenderán un marcador de selección, sitios de restricción apropiados para facilitar la clonación del gen deseado y la capacidad para entrar y/o replicarse en células eucarióticas o procarióticas.

Se pueden emplear numerosos sistemas de vectores de expresión para los fines de esta divulgación. Por ejemplo, una clase de vector utiliza elementos de ADN que se derivan de virus animales tales como el virus del papiloma bovino, el virus del poliomielitis, virus variolovacunal, un baculovirus, retrovirus (RSV, MMTV o MMLV), o virus SV40. Otros implican el uso de sistemas policistrónicos con sitios internos de unión al ribosoma. Adicionalmente, células que tienen integrado el ADN en sus cromosomas se pueden seleccionar al introducir uno o más marcadores que permiten la selección de células anfitrionas transfectadas. El marcador puede proporcionar prototrofía a un anfitrión auxótrofo, resistencia a biocidas (p. ej., antibióticos) o resistencia a metales pesados tales como cobre. El gen marcador seleccionable bien se puede enlazar directamente a las secuencias de ADN que se van a expresar, o bien se introduce en la misma célula mediante cotransformación. También pueden ser necesarios elementos adicionales para la síntesis óptima de ARNm. Estos elementos pueden incluir secuencias de señalización, señales de corte y empalme, así como promotores, potenciadores y señales de terminación de la transcripción. En algunos casos los genes de la región variable clonados se insertan en un vector de expresión junto con los genes de la región constante de la cadena pesada y ligera (tales como genes humanos) sintetizados según se analiza anteriormente.

En otros casos los polipéptidos de unión presentados en la divulgación se pueden expresar usando construcciones policistrónicas. En estos sistemas de expresión, se pueden producir múltiples productos génicos de interés tales como cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos a partir de una sola construcción policistrónica. Estos sistemas usan ventajosamente un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) para proporcionar niveles relativamente altos de polipéptidos en células anfitrionas eucarióticas. Secuencias de IRES compatibles se divulgán en la Pat. EE. UU. Nº 6.193.980. Los expertos en la técnica apreciarán que estos sistemas de expresión se pueden usar para producir eficazmente toda la gama de polipéptidos divulgados en la actual solicitud.

Más generalmente, una vez que se ha preparado un vector o una secuencia de ADN que codifica un anticuerpo, o un fragmento del mismo, el vector de expresión se puede introducir en una célula anfitriona apropiada. Esto es, las células anfitrionas se pueden transformar. La introducción del plásmido en la célula anfitriona se puede realizar mediante diversas técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Estas incluyen, pero no se limitan a, transfección (incluyendo electroforesis y electroporación), fusión de protoplastos, precipitación de fosfato cálcico, fusión celular con ADN envuelto, microinyección e infección con virus intacto. Véase Ridgway, A. A. G. "Mammalian Expression Vectors" Capítulo 24.2, pp. 470-472 Vectors, Rodríguez y Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, Mass. 1988). Las células transformadas se hacen crecer bajo condiciones apropiadas para la producción de las cadenas ligera y las cadenas pesadas, y se ensayan con respecto a la síntesis de proteínas de la cadena pesada y/o ligera. Técnicas de ensayo ejemplares incluyen ensayo de inmunoadsorción con enzimas ligadas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) o análisis de clasificación celular activado por fluorescencia (FACS), inmunohistoquímica y similares.

Según se usa en este documento, el término "transformación" se usará en un sentido amplio para referirse a la introducción de ADN en una célula anfitriona receptora que cambia el genotipo y por consiguiente da como resultado un cambio en la célula receptora.

- 5 A lo largo de esas mismas líneas, "células anfitrionas" se refiere a células que se han transformado con vectores construidos usando técnicas de ADN recombinante y que codifican al menos un gen heterólogo. En las descripciones de procedimientos para el aislamiento de polipéptidos a partir de anfitriones recombinantes, los términos "célula" y "cultivo celular" se usan indistintamente para indicar la fuente de anticuerpo a menos que se especifique claramente lo contrario. En otras palabras, la recuperación de polipéptido de las "células" puede significar bien a partir de células enteras centrifugadas o bien a partir de cultivo celular que contiene tanto el medio como las células suspendidas.

10 En un caso, la línea celular anfitriona usada para la expresión del anticuerpo es de origen mamífero; los expertos en la técnica pueden determinar líneas celulares anfitrionas particulares que son las más adecuadas para el producto genético deseado que se va a expresar en las mismas. Líneas celulares anfitrionas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, DG44 y DUXB11 (líneas de ovario de hámster chino, DHFR menos), HEA (carcinoma de cuello uterino humano), CVI (línea renal de mono), COS (un derivado de CVI con antígeno T de SV40), R1610 (fibroblasto de hámster chino) BALBC/3T3 (fibroblasto de ratón), HAK (línea renal de hámster), SP2/O (mieloma de ratón), BFA-1c1BPT (células endoteliales bovinas), RAJI (linfocito humano), 293 (riñón humano). En un caso, la línea celular proporciona una glucosilación alterada, p. ej., afucosilación, del anticuerpo expresado a partir de la misma (p. ej., PER.C6.RTM. (Crucell) o líneas celulares CHO con inactivación de FUT8 (Potelligent.RTM. Cells) (Biowa, Princeton, N.J.)). En un caso, se pueden usar células NSO. Las líneas celulares anfitrionas están disponibles típicamente de servicios comerciales, the American Tissue Culture Collection o de bibliografía publicada.

15 20 25 La producción *in vitro* permite el aumento a escala para dar grandes cantidades de los polipéptidos deseados. Técnicas para el cultivo de células de mamífero bajo condiciones de cultivo tisular son conocidas en la técnica e incluyen cultivo en suspensión homogénea, p. ej. en un reactor neumático o en un reactor agitador continuo, o cultivo celular inmovilizado o atrapado, p. ej. en fibras huecas, microcápsulas, sobre microcuentas de agarosa o cartuchos cerámicos. Si es necesario y/o se desea, las soluciones de polipéptidos se pueden purificar mediante los métodos cromatográficos habituales, por ejemplo filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía sobre DEAE-celulosa y/o 30 cromatografía de (inmuno)afinidad.

35 Uno o más genes que codifican polipéptidos de unión también se pueden expresar células que no son de mamífero tales como bacterias o levaduras o células vegetales. A este respecto, se apreciará que diversos microorganismos unicelulares no mamíferos tales como bacterias también se pueden transformar; es decir los capaces de hacerse 40 crecer en cultivos o fermentación. Las bacterias, que son sensibles a la transformación, incluyen miembros de las enterobacteriaceae, tales como cepas de *Escherichia coli* o *Salmonella*; *Bacillaceae*, tales como *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus*, y *Haemophilus influenzae*. Se apreciará adicionalmente que, cuando se expresan en bacterias, los polipéptidos pueden volverse parte de cuerpos de inclusión. Los polipéptidos se deben aislar, purificar y a continuación ensamblar en moléculas funcionales.

45 50 Además de los procariotas, también se pueden usar microbios eucarióticos. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura común de los panaderos, es el más comúnmente usado entre los microorganismos eucarióticos, aunque está disponible un número de otras cepas. Para la expresión en *Saccharomyces*, se usa comúnmente el plásmido YRp7, por ejemplo, (Stinchcomb y cols., *Nature*, 282:39 (1979); Kingsman y cols., *Gene*, 7:141 (1979); Tschemper y cols., *Gene*, 10:157 (1980)). Este plásmido ya contiene el gen TRP1 que proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad para crecer en triptófano, por ejemplo ATCC Nº 44076 o PEP4-1 (Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)). La presencia de la lesión trp1 como una característica del genoma de la célula anfitriona de levadura proporciona un ambiente eficaz para detectar la transformación mediante crecimiento en ausencia de triptófano.

50 EJEMPLOS

La presente divulgación se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no se deben considerar limitativos de la invención reivindicada.

Ejemplo 1. Diseño, preparación y caracterización de mutantes de anticuerpo de hiperglucosilación anti-CD-52 2C3

55 60 Se diseñaron múltiples mutaciones de hiperglucosilación en la cadena pesada del anticuerpo anti-CD-52, 2C3, con el fin de añadir un grupo voluminoso a una interfase de interacción (p. ej., el sitio de unión a FcRn para modular la farmacocinética del anticuerpo), para modular la función efectora del anticuerpo al cambiar su interacción con FcγRs, o para introducir una nueva modificación química de la subsecuencia del sitio de reticulación para la conjugación al resto efector, incluyendo, pero no limitado a, fármacos, toxinas, agentes citotóxicos, radionucleótidos y similares. Los mutantes 2C3 hiperglucosilados se indican en la Tabla 3.

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

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

1A. Creación de mutantes de hiperglicosilación del anticuerpo anti-CD-52 2C3

5 La mutación A114N, diseñada basándose en el sistema de numeración de Kabat (equivalente a la posición de EU 118), se introdujo en el dominio CH1 de 2C3 mediante PCR mutagénica. Para crear el anticuerpo de longitud completa, el dominio VH más el residuo A114N mutado se insertó mediante clonación independiente de ligación (LIC) en el vector pENTR-LIC-IgG1 que codifica los dominios CH de anticuerpo 1-3. Todas las otras mutaciones se introdujeron en pENTR-LIC-IgG1 mediante mutagénesis dirigida al sitio con un estuche de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, EE. UU. de A.). El WT 2C3 VH se clonó en vectores mutados mediante LIC. Los mutantes de longitud completa se clonaron en el vector de expresión pCEP4(-E+I)Dest mediante clonación de Gateway. Las mutaciones Fc se diseñaron basándose en el sistema de numeración de EU. Las mutaciones se confirmaron mediante secuenciación de ADN. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de WT 2C3 y las cadenas pesadas de 2C3 mutadas se indican en la Tabla 4. Los aminoácidos mutados están sombreados y los sitios diana de glucosilación de consenso creados por la mutación están subrayados.

10 15

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

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia de aminoácidos
1	Cadena ligera WT de anti-CD-52	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSNGKTY LNWLLQKPGQSPQRLLYLVSKLDGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEADVGVYYCVQGTHLHTFGQGTRL EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS STLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC

2	Cadena pesada WT de anti-CD-52	<p>VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYWMN WVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGR FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFW GQGTTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPALQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
3	Cadena pesada de A114N de anti-CD-52	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYWMN WVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGR FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFW GQGTTVTVSS<u>NST</u>KGPSVFLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPALQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
4	Cadena pesada de Y436S de anti-CD-52	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYWMN WVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGR FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFW GQGTTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPALQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHN<u>HN</u>TQKSLSLSPGK</p>
5	Cadena pesada de S440N de anti-CD-52	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYWMN WVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGR FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFW GQGTTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPALQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQK<u>N</u>LSLSPGK</p>

6	Cadena pesada de S442N de anti-CD-52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYWMN WVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGR FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFW GQGTTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
7	Cadena pesada de NGT de anti-CD-52	LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK NCI
8	Cadena pesada de S298N / Y300S de anti-CD-52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYWMN WVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGR FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFW GQGTTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYN NTSR RVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK NCI

Los mutantes y el control WT se transfecaron en células HEK293-EBNA en un formato de placa de 6 pocillos. Como se muestra en la Figura 9A, se encontró que el nivel de expresión era ~0,1 µg/ml, según se analizaba mediante SDS-PAGE y transferencia Western. La expresión de mutantes en medios acondicionados también se midió mediante

5 captura de proteína A sobre Biacore. La concentración se determinó usando la respuesta de disociación 6 minutos después de la inyección en proteína A inmovilizada. WT 2C3 producido por CHO diluido en serie en medio de 90 µg/ml a 1,5 ng/ml L se usó como una curva estándar. Las concentraciones se calcularon hasta ~0,2 µg/ml mediante una curva de calibración usando un ajuste de 4 parámetros. Según se muestra en la Figura 9B, los niveles de expresiones relativos eran bajos y generalmente correspondían a los resultados de la transferencia Western.

10 1B. Verificación de la hiperglucosilación

Para determinar si se introducían sitios de glucosilación adicionales mediante mutación, el mutante 2C3 y proteínas silvestres se trataron con la enzima desglucosilante universal PNGasa F y las muestras de proteína se analizaron mediante SDS-PAGE y transferencia Western. Según se muestra en la Figura 10, solo el mutante A114N tenía un incremento del peso molecular aparente, indicando la presencia de un carbohidrato enlazado por N adicional.

15 Se produjeron preparaciones de anticuerpo a pequeña escala para purificar los mutantes 2C3 para una verificación adicional de la introducción de sitios de glucosilación. Según se muestra en la Figura 11, se confirmaba mediante SDS-PAGE que sólo el mutante A114N tenía sitios de glucosilación adicionales introducidos.

1C. Propiedades de unión de mutantes de anti-CD-52 2C3

Se usó Biacore para comparar las propiedades de unión de las proteínas purificadas. FcRn-HPC4 de ratón y ser humano purificado por SEC se inmovilizaron sobre un chip CM5 a través de acoplamiento a amina. Cada anticuerpo se diluyó hasta 200, 50 y 10 nM y se inyectó sobre los receptores de Fc inmovilizados. Se incluyeron Campath, WT 2C3 producido por CHO y Campath tratado con DEPC como controles positivos y negativos. Según se muestra en la **Figura 13**, el mutante Y436S presentaba aproximadamente una disminución de 2 veces en la unión a FcRn humano. De forma interesante, la unión de este mutante a FcRn de ratón no se veía afectada. Ninguna de las otras mutaciones 2C3 tenía efecto considerable sobre la unión a FcRn de ser humano o ratón.

Se usó Biacore para comparar las propiedades de unión a antígeno de las proteínas purificadas usando el ensayo de unión a Biacore del péptido 741 de CD-52. El péptido 741 de CD-52 y el péptido 777 de control se inmovilizaron a un chip CM5. Los anticuerpos se diluyeron en serie 2 veces de 60 a 0,2 nM en HBS-EP y se inyectaron por duplicado durante 3 min seguido por una disociación de 5 min en tampón a un caudal de 50 μ l/min. El lote de GLD52 17200-084 se incluyó como un control. La superficie se regeneró con 1 pulso de HC1 40 mM. Se usó un modelo de unión 1:1 para ajustar las curvas de 7,5 a 0,2 nM. Según se muestra en la **Figura 16**, el mutante A114N tenía una afinidad de unión a CD-52 ligeramente inferior mientras que el mutante NGT tenía una afinidad ligeramente superior que el resto de los mutantes en este ensayo. El ensayo de unión a Biacore del péptido 741 de CD-52 se repitió con proteína purificada de una preparación a mayor escala. Según se muestra en la **Figura 17**, el mutante A114N exhibía una unión al péptido CD-52 que era comparable a WT 2C3.

1D. Caracterización de carga del mutante A114N

Se realizó enfoque isoelectrónico (IEF) para caracterizar la carga de los mutantes 2C3. Se hizo correr proteína purificada sobre geles de acrilamida de gradiente de pH (pH 3-10) inmovilizados (IPG). Según se muestra en la **Figura 18A**, se encontró que A114N tenía cargas más negativas, probablemente debido a residuos de ácido siálico. Los datos de MS intactos confirmaban la estructura compleja con ácidos siálicos sobre el mutante A114N. En contraste, se mostró que el WT 2C3 tenía G0F y G1F como la especie de glucosilación dominante (**Figuras 18C y 18D**, respectivamente).

Ejemplo 2. Preparación de mutantes de hiperglucosilación en varios esqueletos de anticuerpo

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

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

Mutación	Anticuerpo	Beneficios deseados	Aplicaciones
A114N	anti-TEM1	Sitio de glucosilación adicional en la bisagra del codo de la cadena pesada para la conjugación mediada por carbohidratos específica del sitio	1) Control 2) Conjugación a aminooxitoxina a través de un grupo ácido siálico o galactosa (SAM o GAM) expuesto
	anti-FAP		
	anti-Her2		
S298N / T299A / Y300S (NNAS)	anti-Her2	Cambio de la glucosilación de Asn297 a un Asn298 manipulado. Disolvente esperado expuesto y carbohidratos complejos en S298N, ofreciendo un sitio de conjugación y medios para retirar la función efectora	1) Conjugación a aminooxitoxina a través de un grupo ácido siálico o galactosa (SAM o GAM) expuesto 2) Función efectora reducida
A114N / NNAS	anti-Her2	Potencial para un incremento en el rendimiento de conjugación con dos sitios de conjugación	1) Control 2) Conjugación a aminooxitoxina a través de un grupo ácido siálico o galactosa (SAM o GAM) expuesto

2A. Creación de mutantes de hiperglucosilación de anticuerpos anti-TEM1 y anti-FAP

La mutación A114N, diseñada basándose en el sistema de numeración de Kabat, se introdujo en el dominio CH1 de anti-TEM1 y anti-FAP mediante PCR mutagénica. Para crear el anticuerpo de longitud completa, el VH mutado más el residuo 114 se insertó mediante clonación independiente de ligación (LIC) en los dominios CH 1-3 de anticuerpo que codifican el vector pENTR-LIC-IgG1. A continuación, se clonaron mutantes de longitud completa en el vector de expresión pCEP4(-E+I)Dest mediante clonación de Gateway. Las mutaciones se confirmaron mediante secuenciación

de ADN. Secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera mutadas silvestres de anti-TEM1 se indican en la Tabla 6. Los aminoácidos mutados están sombreadas y los sitios diana de glucosilación de consenso creados por la mutación están subrayados.

5

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

<u>SEQ ID NO</u>	<u>Nombre</u>	<u>Secuencia de aminoácidos</u>
9	Cadena ligera WT de anti-TEM1 WT (clon nº 187)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQYQSSPWTFGQGTKEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
10	Cadena pesada WT de anti-TEM 1 (clon nº 187)	QVQLQESAPGLVKPSETSLTCTVSGGSIRSYWWSW IRQPPGKGLEYIGYIYTGSAIYNPSLQSRVTISVDT KNQFSLKLNSVTAADTAVYYCAREGVRGASGYYY YGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSLGTQTYICNVNWKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTQNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
11	A114N de anti-TEM 1	QVQLQESAPGLVKPSETSLTCTVSGGSIRSYWWSW IRQPPGKGLEYIGYIYTGSAIYNPSLQSRVTISVDT KNQFSLKLNSVTAADTAVYYCAREGVRGASGYYY YGMDVWGQGTTVTVSS <u>STKGPSVFPLAPSSKSTS</u> GGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSLGTQTYICNVNWKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTQNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

Los mutantes y el control silvestre se transfecaron en células HEK293-EBNA en un formato de triple matraz y se purificaron sobre columnas de proteína A HiTrap (GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA, EE. UU. de A.). Según se analiza mediante A280 en un espectrofotómetro NanoDrop, la expresión de A114N de anti-FAP y A114N de anti-FAP era aproximadamente 3 µg/ml y aproximadamente 1 µg/ml, respectivamente. La expresión de A114N de anti-TEM1 era aproximadamente 0,04 µg/ml.

10

11 Los mutantes y el control silvestre se transfecaron en células HEK293-EBNA en un formato de triple matraz y se purificaron sobre columnas de proteína A HiTrap (GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA, EE. UU. de A.). Según se analiza mediante A280 en un espectrofotómetro NanoDrop, la expresión de A114N de anti-FAP y A114N de anti-FAP era aproximadamente 3 µg/ml y aproximadamente 1 µg/ml, respectivamente. La expresión de A114N de anti-TEM1 era aproximadamente 0,04 µg/ml.

2B. Verificación de la hiperglucosilación

Para confirmar que el sitio de glucosilación adicional se introducía en los mutantes A114C, se analizó proteína purificada procedente de los mutantes A114N con SDS-PAGE reductora junto con la proteína de control silvestre. Un sitio de glucosilación adicional añadiría 2000-3000 daltons al peso molecular de la cadena pesada. Según se muestra en la **Figura 20**, SDS-PAGE indicaba que las bandas de cadena pesada de los mutantes de anti-FAP y anti-TEM1 A114N habían incrementado el peso molecular aparente, de acuerdo con una introducción satisfactoria de un sitio de glucosilación adicional en ambos anticuerpos.

2C. Creación de mutantes de hiperglucosilación del anticuerpo anti-Her2

20 Se crearon los anticuerpos Her-2 A114N, Her-2 A114N/NNAS y WT Her-2 mediante clonación independiente de ligación. El dominio VH de Herceptin se sintetizó y se amplificó por PCR con dos grupos de cebadores compatibles con LIC, bien WT o bien con la mutación A114N. Para obtener un anticuerpo de longitud completa, inserciones de VH amplificadas (WT o A114N) se clonaron en dos vectores pENTR que codificaban los dominios CH 1-3, pENTR-LIC-

IgG1 WT y pENTR-LIC-IgG1 NNAS, dando como resultado tres mutantes de longitud completa (A114N, NNAS, A114N/NNAS) y control WT como clones de entrada sobre pENTR. Estos mutantes se clonaron en el vector de expresión pCEP4(-E+)Dest, mediante clonación de Gateway. Las mutaciones se confirmaron mediante secuenciación de ADN. Secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras silvestres y mutadas de anti-Her-2 se indican en la **Tabla 7**. Los aminoácidos mutados están sombreados y las secuencias diana de glucosilación de consenso creadas por la mutación están subrayadas.

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

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia de aminoácidos
12	Cadena ligera WT de anti-Her-2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSRSRGTDFT LTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
13	Cadena pesada WT de anti-Her-2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRTFIS ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHIKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPVY LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
14	Cadena pesada de A114N de anti-Her-2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRTFIS ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSS <u>AS</u> TKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHIKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPVY LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
15	Cadena pesada de NNAS de anti-Her2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRTFIS ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHIKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYN <u>NNAS</u> RVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPVY LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

<u>SEQ ID NO</u>	<u>Nombre</u>	<u>Secuencia de aminoácidos</u>
16	Cadena pesada de A114N / NNAS de anti-Her2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS NNAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDVFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPALVQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETVCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN NNAS RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

2D. Expresión del mutante de hiperglucosilación del anticuerpo A114N de anti-Iller2

Las construcciones de anti-Her2 A114N y silvestre se transfecaron con Lipofectamine-2000 (relación 2,5:1 de reactivo a ADN) y XtremeGene HP (relación 3:1 de reactivo a ADN) en células HEK293-EBNA en 12 matraces triples. La medición por Octet de partes alícuotas a partir de medios acondicionados (CM) 3 días mostraba que la expresión de proteína era coherente en 6 matraces tanto para Lipofectamine-2000 como para XtremeGene HP. Según se muestra en la Tabla 8, la eficacia de transfección global era aproximadamente 30% superior con XtremeGene HP. Los medios acondicionados recogidos el día 3 se reunieron entre sí para ambas condiciones de transfección y se purificaron mediante una columna de proteína A. La medición con Octet mostraba 1,8 ug/ml de anticuerpo en el medio simulado que contiene suero frente a 0 ug/ml en medios simulados sin suero.

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

		Lipofectamine-2000	XtremeGene HP
Proteína purificada procedente de la columna de proteína A	Concentración (mg/ml)	1,72	3,18
	Volumen (ml)	3,5	3,5
	Proteína total (mg)	6,02	11,13
Proteína intercambiada con tampón	Concentración (mg/ml)	15,59	16,86
	Volumen (ml)	0,2	0,36
	Proteína total (mg)	3,1	6,07
	% Recuperación	51,8	54,5

Medios acondicionados desde el día 6 se recogieron y se purificaron separadamente para cada condición de transfección. Ambos eluatos se intercambiaron con tampón separadamente en PBS, pH 7,2, y se concentraron -15 veces usando columnas Amicon-4 (corte 50 kD). Los CM del día 6 mostraban un nivel de expresión superior en comparación con CM del día 3. Según se muestra en la Tabla 8, un total de 3 mg de Herceptin A114N 15,59 mg/ml (procedentes de transfección de Lipofectamine) y 6 mg de Herceptin A114N 16,86 mg/ml (procedente de transfección de XtremeGene HP) se produjeron a partir de medios acondicionados el día 6 para aplicaciones posteriores adicionales, tales como conjugación de anticuerpo-fármaco.

2E. Análisis por SDS-PAGE y HIC del mutante de anti-Her2 A114N

Antes de la conjugación, Herceptin A114N purificada se caracterizó por SDS-PAGE y HIC (cromatografía de interacción hidrófoba). Como se muestra en la **Figura 21**, se determinó que la calidad de la Herceptin A114N purificada era adecuada para aplicaciones posteriores adicionales.

2F. Conjugación a glucosilación manipulada

Se demostró que: a) se introducía un sitio de glucosilación en el sitio de la posición 114 de Kabat (posición 118 de EU) en anti-TEM1; b) el mutante A114N tenía hiperglucosilación en la cadena pesada mediante SDS-PAGE reductora;

5 y c) el mutante de hiperglucosilación A114N tenía estructura de carbohidrato complejo mediante LC/MS intacta, incluyendo ácidos siálicos y galactosa terminales, que son ideales para conjugación SAM y GAM. Para confirmar que el sitio de glucosilación manipulado era adecuado para la conjugación, anti-TEM1 A114N se conjugó con un PEG de 5 kDa a través de química de aminooxi. Según se muestra en la **Figura 22**, el PEG se conjugaba satisfactoriamente a anti-TEM1 A114N a través de un enlace aminooxi. Este mutante también se preparaba satisfactoriamente sobre los esqueletos de 2C3 de anti-FAP y anti-CD-52 (no mostrados). Estos datos demuestran que el sitio de glucosilación en N114 es útil para la conjugación de restos efectores.

Ejemplo 3: Generación de mutantes de Fc S298N/Y300S

10 Se diseñaron y generaron variantes de Fc manipuladas en las que se introducía un nuevo sitio de glucosilación en la posición EU Ser 298, posteriormente en el sitio Asn297 presente en la naturaleza. La glucosilación en Asn297 bien se mantenía o bien se suprimía mediante mutación. Las mutaciones y los resultados de glucosilación deseados se indican en la Tabla 9.

Tabla 9: Estados de glucosilación de diversas variantes de anticuerpo

Nº	Mutación	Estado de Glucosilación Deseado	Aplicaciones
17	N297Q	Sin glucosilación (aglu)	Control aglu
18	T299A	Sin glucosilación (aglu)	Control aglu, función efectora desconocida
19	N297Q/S298N/Y300S (NSY)	Sin glucosilación en 297 pero sitio de glucosilación manipulado en 298	Reducción en la función efectora; Conjugación a través de grupos ácido siálico o galactosa expuestos.
20	S298N/T299A/Y300S (STY)	Sin glucosilación en 297 pero sitio de glucosilación manipulado en 298	Reducción en la función efectora; Conjugación a través de grupos ácido siálico o galactosa expuestos.
21	S298N/Y300S (SY)	Dos sitios de glucosilación potenciales en 297 y 298; Alteraciones en el patrón de glucosilación.	Reducción en la función efectora; Conjugación a través de grupos ácido siálico o galactosa expuestos.
22	Silvestre	297	control

15 **3A. Creación de variantes de glucosilación alterados del anticuerpo $\alpha\beta$ -TCR H66**

20 Se realizaron mutaciones sobre la cadena pesada del clon nº 66 del anticuerpo receptor de células T $\alpha\beta$ mediante Quikchange usando una plantilla de pENTR_LIC_IgG1. El dominio VH de HEBE1 Δ ab IgG1 nº 66 se amplificó con cebadores de LIC antes de clonarse en pENTR_LIC_IgG1 mutado o silvestre mediante LIC para crear anticuerpos mutantes o silvestres de longitud completa. La subclonación se verificó con digestión doble con DralII/Xhol, produciendo una inserción de aproximadamente 1250 pb de tamaño en los clones satisfactorios. A continuación, los mutantes de longitud completa se clonaron en un vector de expresión, pCEP4(-E+)Dest, a través de clonación de Gateway. Las mutaciones se confirmaron mediante secuenciación de ADN. Secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de WT H66 anti- $\alpha\beta$ TCR y las cadenas pesadas mutadas H66 se indican en la Tabla 10. Los aminoácidos mutados están sombreados y las secuencias diana de glucosilación de consenso creadas por la mutación están subrayadas.

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

<u>SEQ ID NO</u>	<u>Nombre</u>	<u>Secuencia de aminoácidos</u>
23	Cadena ligera del clon H66 de anti- $\alpha\beta$ TCR	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWYQQ KPGQAPRRLIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYTLTIS SLEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGGGTKEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDKSTYSLSSLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
24	Cadena pesada del clon H66 de anti- $\alpha\beta$ TCR	EVQLLQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKFTSYVMHW VRQAPGKGLEWVGYINPYNDVTKYNEFKGRFTLSR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYDDYDGF VYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA LGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPVALQSSG LYSLSVVTPVSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK*
25	Cadena pesada de clon H66 S298N/Y300S de anti- $\alpha\beta$ TCR	EVQLLQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKFTSYVMHW VRQAPGKGLEWVGYINPYNDVTKYNEFKGRFTLSR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYDDYDGF VYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA LGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPVALQSSG LYSLSVVTPVSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN TKPREEQYNNTSRVVSVLT SNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK*
26	Cadena pesada del clon H66 S298N/ T299A/ Y300S de anti- $\alpha\beta$ TCR	EVQLLQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKFTSYVMHW VRQAPGKGLEWVGYINPYNDVTKYNEFKGRFTLSR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYDDYDGF VYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA LGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPVALQSSG LYSLSVVTPVSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN TKPREEQYNNTSRVVSVLT SNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK*
		TKPREEQYNNTSRVVSVLT SNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK*

<u>SEQ ID NO</u>	<u>Nombre</u>	<u>Secuencia de aminoácidos</u>
27	Cadena pesada del clon H66 N297Q/ S298N/ Y300S de anti- $\alpha\beta$ TCR	EVQLLQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKFTSYVMHW VRQAPGKGLEWVGYINPYNDVTKYNEFKGRFTLSR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYDDYDGF VYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQNTSRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNYTQKSLSLSPGK*

Las construcciones mutante, silvestre y dos aglucosiladas de (HEBE1 Agly IgG4 y HEBE1 Δab IgG1 en pCEP4) se transfecaron en células HEK293-EBNA en matraces triples para la expresión. Se purificaron proteínas de 160 ml de medio acondicionado (CM) con 1 ml de columnas de proteína A HiTrap (GE) usando una bomba peristáltica de múltiples canales. Se analizaron cinco microgramos de cada sobrenadante resultante sobre geles de SDS-PAGE 5 reductores y no reductores con tris-glicina al 4-20% (véase la **Figura 2**). Las cadenas pesadas de los mutantes aglucosilados (N297Q, T299A y controles aglu), han migrado adicionalmente (punta de flecha), de acuerdo con la pérdida de los glucanos en estos anticuerpos. Sin embargo, las cadenas pesadas de los anticuerpos glucosilados manipulados (NSY, STY, SY, Δab y control wt, flechas) migran de forma similar al control silvestre. Este resultado está 10 de acuerdo con la existencia de un sitio de glucosilación manipulado en la posición EU 298. El análisis por SEC-HPLC indicaba que todos los mutantes se expresan como monómeros.

3B. Análisis de glucosilación mediante LC-MS

Las variantes de Fc de IgG1 H66 manipuladas se redujeron parcialmente con DTT 20 mM a 37°C durante 30 min. A continuación, las muestras se analizaron mediante LC/MS capilar en un sistema de HPLC capilar Agilent 1100 acoplado con un sistema híbrido QSTAR qq TOF (Applied Biosystems). Se usó una reconstrucción bayesiana de 15 proteínas con corrección de referencia y modelado informático en Analyst QS 1.1 (Applied Biosystem) para el análisis de datos. En el mutante de anticuerpo S298N/T299A/Y300S H66, se observó un sitio de glucosilación en el aminoácido 20 298 con glucanos de tipo complejo biantenario y triantenario detectados como las especies principales junto con G0F, G1F y G2F (véase la **Figura 34**). Este perfil de glucosilación alterado está de acuerdo con una glucosilación cambiada en N298 en lugar del sitio de glucosilación silvestre en N297.

3C. Propiedades de unión de mutantes de anticuerpo $\alpha\beta$ TCR a FcyRIIIa y FcyRI humanos usando Biacore

Se usó Biacore para valorar la unión a FcyRIIIa (V158 & F158) y FcyRI humanos recombinantes. Las cuatro células de flujo de un chip CM5 se inmovilizaron con anticuerpo anti-HPC4 a través del procedimiento de acoplamiento a 25 amina estándar proporcionado por Biacore. El anticuerpo anti-HPC4 se diluyó hasta 50 µg/ml en acetato sódico 10 mM pH 5,0 para la reacción de acoplamiento y se inyectó durante 25 min en 5 µl/min. Se inmovilizaron aproximadamente 12.000 RU de anticuerpo en la superficie del chip. Se diluyeron FcyRIIIa-V158 y FcyRIIIa-F158 humanos recombinantes hasta 0,6 µg/ml en tampón de unión (HBS-P con CaCl₂ 1 mM) y se inyectaron en las células de flujo 2 y 4, respectivamente, durante 3 min a 5 µl/min para capturar 300 - 400 RU de receptor sobre el chip de anti-HPC4. A fin de distinguir entre los aglutinantes inferiores, se capturaron tres veces más rhFcyRIIIa sobre la superficie 30 de anti-HPC4 que lo usado habitualmente en este ensayo. Las células de flujo 1 y 3 se usaron como controles de referencia. Cada anticuerpo se diluyó hasta 200 nM en tampón de unión y se inyectó en las cuatro células de flujo durante 4 min, seguido por 5 min de disociación en tampón. Las superficies se regeneraron con EDTA 10 mM en 40 tampón HBS-EP durante 3 min a 20 µl/min. Los resultados de estos experimentos se muestran en la **Figura 3**.

También se usó Biacore para comparar la unión a FcyRI. Anticuerpo anti-tetra His se intercambió con tampón en acetato sódico 10 mM pH 4,0 usando una columna de desalación Zeba y se diluyó hasta 25 µg/ml en el tampón de acetato para el acoplamiento a amina. Dos células de flujo de un chip CM5 se inmovilizaron con -9000 RU del anticuerpo anti-tetra-His después de 20 min de inyección a 5 µl/min. Como en el experimento previo, se capturaron diez veces más FcyRI a la superficie de anti-tetra-His a fin de comparar muestras con unión débil. FcyRI humano recombinante se diluyó 10 µg/ml en tampón de unión de HBS-EP y se inyectó en la célula de flujo 2 durante 1 min a 5 µl/min para capturar -1000 RU de receptor en el chip de anti-tetra-His. Se inyectó una sola concentración de anticuerpo, 100 nM, durante 3 min a 30 µl/min sobre el receptor capturado y la superficie de control. Posteriormente, la disociación se comprobó durante tres minutos. A continuación, la superficie se regeneró con dos inyecciones de 30 segundos de glicina 10 mM pH 2,5 a 20 µl/min. Los resultados de estos experimentos se muestran en la **Figura 4**.

Estos resultados demuestran una notable disminución en la unión de los mutantes glucomanipulados a FcγRIIIa o FcγRI. H66 S298N/T299A/Y300S, en particular, tiene una unión casi completamente suprimida a ambos receptores. Este mutante se eligió para un análisis más detallado.

5 **3D. Caracterización de la estabilidad usando dicroísmo circular (CD)**

La estabilidad del mutante de anticuerpo S298N/T299A/Y300S se comprobó mediante un experimento de termofusión Far-UV CD en el que se comprobó la señal de CD a 216 nm y 222 nm ya que el incremento de la temperatura conduce al despliegue del anticuerpo (desnaturalización).

10 La temperatura se controló mediante una célula de Peltier termoeléctrica (Jasco modelo AWC100) y se incrementó a una velocidad de 1°C/min desde 25-89°C. Los espectros de CD se recogieron en un espectrofotómetro Jasco 815 a una concentración de proteína de aproximadamente 0,5 mg/ml en tampón de PBS en una cubeta de cuarzo (Hellma, Inc) con una longitud de recorrido de 10 mm. La velocidad de barrido era 50 nm/min y un campo de datos de 0,5 nm. Se usó una anchura de banda de 2,5 nm con una graduación de sensibilidad de media. La señal de CD y el voltaje HT 15 se recogieron de 210-260 nm con intervalos de datos de 0,5 nm y a intervalos de temperatura de 1°C y se realizaron cuatro barridos de réplica para cada muestra. Los resultados demuestran que tanto delta AB H66 como el mutante S298N/T299A/Y300S H66 exhiben comportamientos térmicos similares y tienen aproximadamente la misma temperatura de inicio para la degradación (alrededor de 63°C) (**Figura 35**), sugiriendo adicionalmente que tienen una estabilidad comparable.

20 **Ejemplo 4: Análisis funcional de mutantes con Fc manipulado**

Mutantes con Fc manipulado se valoraron a través de un ensayo de proliferación de PBMC y un ensayo de liberación de citocinas. En el ensayo de proliferación de PBMC, se cultivaron PBMC humanas con concentraciones crecientes de anticuerpo terapéutico durante 72 horas, se añadió ³H-timidina y las células se recogieron 18 horas más tarde. Para el ensayo de agotamiento de células T/liberación de citocinas, se cultivaron PBMC humanas con concentraciones crecientes de anticuerpo terapéutico y se analizaron diariamente con respecto a recuentos y viabilidad celulares (Vi-Cell, Beckman Coulter) hasta el día 7. También se recogieron los sobrenadantes celulares, se almacenaron a -20°C y se analizaron en un grupo de 8 citocinas (Bio-Rad).

30 PBMC de donantes normales se descongelaron y se trataron bajo las siguientes condiciones (todas en medios que contienen complemento): Sin tratar; BMA031, molgG2b 10 ug/ml; OKT3, molgG2a 10 ug/ml; H66, hulgG1 deltaAB 10 ug/ml, 1 ug/ml y 0,1 ug/ml; H66, hulgG1 S298N/T299A/Y300S 10 ug/ml, 1 ug/ml y 0,1 ug/ml.

35 Las citocinas se recogieron el día 2 (D2) y el día 4 (D4) para el análisis Bioplex (IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, GM-CSF, IFNg, TNFa). Las células se tiñeron el D4 con respecto a la expresión de CD4, CD8, CD25 y abTCR.

40 Los resultados, mostrados las **Figuras 5-8**, demuestran que H66 S298N/T299A/Y300S se comportaba de forma similar al H66 deltaAB en todos los ensayos basados en células realizados, mostrando una activación mínima de células T por expresión de CD25, unión a abTCR (con cinética ligeramente diferente a deltaAB) y liberación mínima de citocinas en los momentos tanto D2 como D4. El mutante S298N/T299A/Y300S eliminaba así la función efectora tan eficazmente como la mutación deltaAB.

Ejemplo 5: Preparación y caracterización de una variante de Fc manipulada en el esqueleto de anticuerpo anti-CD52.

45 Además del anticuerpo H66 anti- $\alpha\beta$ TCR, también se manipuló la mutación S298N/Y300S en un esqueleto de anticuerpo anti-CD52 (clon 2C3). A continuación, este mutante se examinó a fin de determinar si la modulación de la función efectora observada apreciada en el anticuerpo S298N/Y300S H66 anti- α TCR era coherente en otro esqueleto de anticuerpo.

5A. Creación de variantes de glucosilación alteradas de anticuerpo anti-CD52 2C3

50 En primer lugar, se preparó ADN de la variante S298N/Y300S 2C3 mediante mutagénesis de cambio rápido usando pENTR_LIC_IgG1, y WT 2C3 VH se clonó en el vector mutado mediante LIC. Se clonaron mutantes de longitud completa en el vector de expresión pCEP4 (-E+I)Dest usando tecnología Gateway. Posteriormente, las mutaciones se confirmaron mediante secuenciación de ADN y las secuencias se indican en la Tabla 11. Los aminoácidos mutados están sombreados y las secuencias diana de glucosilación de consenso creadas por la mutación están subrayadas. A continuación, los mutantes se transfecaron en células HEK293-EBNA en un formato de placa de 6 pocillos y la proteína se purificó a partir de medios acondicionados. Anticuerpo silvestre anti-CD52 2C3 se produjo en paralelo como un control. Se encontró que el nivel de expresión era 0,1 μ g/ml usando análisis de SD-PAGE y transferencia

5 Western (**Figura 9A**). La expresión de mutantes en medio acondicionado puro también se midió mediante captura de proteína A sobre Biacore. La concentración se determinó usando la respuesta de disociación después de una inyección de seis minutos a proteína A inmovilizada. Se usó WT 2C3 producido por CHO diluido en serie en medio de 90 µg/ml a 1,5 ng/ml como una curva estándar. Las concentraciones se calcularon dentro de aproximadamente 0,2 µg/ml mediante una curva de calibración usando un ajuste de 4 parámetros. Los niveles de expresión relativos eran bajos y generalmente coincidían con los datos de la transferencia Western (**Figura 9B**).

Tabla 11: Secuencias del anticuerpo anti-CD52 clon 2C3

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia de aminoácidos
28	Cadena ligera de anti-CD-52 2C3 WT	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWL LQKPGQSPQRLLVSKLDGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYYCVQGTHLHTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDQSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC*
29	Cadena pesada de anti-CD-52 2C3 WT	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYWMNWVR QAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDS KNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFWGQGTTVTVSSAS TKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK*
30	Cadena pesada de anti-CD-52 2C3 S298N/Y300S	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYWMNWVR QAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDS KNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFWGQGTTVTVSSAS TKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAAKTKPREEQYNNTSRVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK*

10 5B. Análisis de glucosilación usando PNGasa F

15 Para evaluar los sitios de glucosilación adicionales introducidos por la mutación, el mutante S298N/Y300S enriquecido se desglucosiló con PNGasa F. La desglucosilación no demostraba ningún cambio aparente en el peso molecular, lo que indica que no estaba presente carbohidrato adicional (**Figura 10**). Se realizaron preparaciones a pequeña escala a fin de purificar estos mutantes para una caracterización adicional y los resultados reconfirmaron que no había carbohidrato adicional presente en el mutante **S298N/Y300S** (**Figura 11**).

5C. Propiedades de unión de anticuerpo anti-CD52 2C3 a Fc_YRIIIa humano usando Biacore

20 También se usó Biacore para caracterizar la unión a antígeno, Fc_YRIII, y las propiedades de unión de los anticuerpos purificados (véanse las **Figuras 12, 13 y 14**). La variante S298N/Y300S 2C3 se unía al péptido CD52 estrechamente y el sensorgrama de unión era indistinguible del control silvestre, demostrando que esta mutación no afecta a su unión a antígeno (**Figura 12A**).

Para ensayar la función efectora de Fc, se uso el receptor Fc_YRIII (Val158) en estudios de unión. El anticuerpo mutante y de control silvestre se diluyeron hasta 200 nM y se inyectaron en Fc_YRIIIa capturado con marcador HPC4. La unión a Fc_YRIII era casi indetectable para el mutante S298N/Y300S, lo que indicaba una pérdida de función efectora por

esta variante (**Figura 12B** y **Figura 14A**). Para ensayar adicionalmente la función efectora de Fc, también se usó el receptor FcγRIII (Phe158) en estudios de unión. Los anticuerpos mutante y de control silvestre se diluyeron hasta 200 nM y se inyectaron a FcγRIIIa capturado con marcador HPC4. La unión a FcγRIII era casi indetectable para el mutante S298N/Y300S, lo que indica una pérdida de función efectora con la variante Phe158 (**Figura 14B**). Finalmente, se usó 5 Biacore para comparar las propiedades de unión a FcRn de las proteínas purificadas. FcRn-HPC4 de ratón y ser humano purificado por SEC se inmovilizaron en un chip CM5 a través de acoplamiento amílico. Cada anticuerpo se diluyó hasta 200, 50 y 10 nM y se inyectó sobre los receptores. Campath, WT 2C3 producido por CHO y Campath tratado con DEPC se incluyeron como controles positivos y negativos. Estos datos muestran que el mutante se une a receptor de FcRn tanto humano como murino con la misma afinidad que el control de anticuerpo silvestre y que probablemente no tiene alteraciones en su semivida en circulación u otras propiedades farmacocinéticas. (véanse la 10 **Figura 12C**, **Figura 13A** y **B**). Según esto, la mutación S298N/Y300S es aplicable a anticuerpos en general, para reducir o eliminar la función efectora no deseada de Fc, por ejemplo a través de asociación de receptores de Fcγ humanos.

Ejemplo 6: Detección del complejo inmunitario en circulación en el mutante S298N/Y300S.

15 También se investigó la detección del complejo inmunitario en circulación usando un ensayo de unión a C1q para el mutante S298N/Y300S y el control WT. Placas de pocillos Costar 96 de alta capacidad de unión se revistieron durante la noche a 4°C con 100 µl de Abs 2C3 diluidos en serie 2 veces a concentraciones que varían de 10 – 0,001 µg/ml en tampón de revestimiento (NaCHO₃ 0,1 M pH 9,2). El análisis por ELISA mostraba que la unión a C1q se reduce para el mutante S298N/Y300S en comparación con WT (**Figura 15A**). La unión de Ab anti-Fab a los Abs 2C3 revestidos 20 confirmaba un revestimiento equivalente de los pocillos (**Figura 15B**).

Ejemplo 7: Separación y análisis del mutante S298N/Y300S usando enfoque isoeléctrico.

25 Un gel de enfoque isoeléctrico (IEF) de pH 3-10 se recorrió para caracterizar los mutantes S298N/Y300S. Se encontró que S298N/Y300S tenía cargas más negativas y, por lo tanto, probablemente más moléculas de ácido siálico (**Figura 18A**). Se observó mediante MS intacta que tanto el mutante S298N/Y300S como WT 2C3 tenían G0F y G1F como la especie de glucosilación dominante (**Figura 18 B y D**, respectivamente).

Ejemplo 8: Afinidad de unión a antígenos de S298N/Y300S.

30 Se usó Biacore para comparar la afinidad de unión a antígenos del Ab WT anti-CD52 2C3 y el mutante S298N/Y300S que se habían preparado y purificado a partir de expresiones tanto a escala menor (**Figura 16**) como mayor (**Figura 17**). Se obtuvieron chips CM5 inmovilizados con péptido 741 de CD52 y péptido 777 de control. Los anticuerpos se diluyeron en serie 2 veces de 60 a 0,2 nM en HBS-EP y se inyectaron sobre la superficie de los chips durante 3 min seguido por una disociación de 5 min en tampón a un caudal de 50 µl/min. A continuación, la superficie se regeneró con un pulso de HCl 40 mM. Estos análisis se realizaron por duplicado y demuestran que los anticuerpos mutante S298N/Y300S y WT 2C3 muestran una unión comparable al péptido de CD52.

35 Se diseñó una plataforma de cribado de medios para probar las propiedades de unión funcionales antes de la purificación a fin de cribar anticuerpos creados durante transfecciones a pequeña escala. Estas pruebas se realizaron usando Octet (**Figura 19A**) para determinar la concentración y usaban biosensores de proteína A y una curva estándar de GLD52. Las muestras se diluyeron hasta 7,5 y 2 nM en HBS-EP para una comparación de la unión a CD52 usando Biacore (**Figura 19B**). Los resultados del ensayo de unión a péptido mostraban que los anticuerpos tanto mutante 40 S298N/Y300S como WT 2C3 tienen unión comparable al péptido de CD52. Por otra parte, estos análisis demuestran que Octet y Biacore funcionan bien para predecir la unión a antígeno por anticuerpos a partir de transfecciones a pequeña escala.

Ejemplo 9: Preparación de mutantes de glucosilación alterada S298N/Y300S, S298N/T299A/Y300S y N297Q/S298N/Y300S en esqueletos de anticuerpo adicionales.

45 Además del anticuerpo anti-αβ-TCR y el anticuerpo 2C3 anti-CD-52, las mutaciones S298N/Y300S, S298N/T299A/Y300S y N297Q/S298N/Y300S se manipularon en otros esqueletos de anticuerpo para confirmar que podía introducirse el sitio de glucosilación en tandem adicional en secuencias del dominio variable de la cadena pesada no relacionadas. Los mutantes anti-CD-52 12G6 y anti-Her2 glucosilados alternativamente se indican en las Tablas 12 y 13. Los aminoácidos mutados están sombreados y las secuencias diana de glucosilación de consenso creadas 50 por la mutación están subrayadas.

Tabla 12: Secuencias del anticuerpo anti-CD52 clon 12G6

<u>SEQ ID NO</u>	<u>Nombre</u>	<u>Secuencia de aminoácidos</u>
31	Cadena ligera de anti-CD-52 12G6 WT	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWVLQKPGQPQRILYLVSKLDSGVPDFRSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGSHFHTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCVLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
32	Cadena pesada de anti-CD-52 12G6 WT	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSNYWMNWVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPIDYWQGQITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
33	Cadena pesada de anti-CD-52 12G6 S298N/Y300S	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSNYWMNWVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPIDYWQGQITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNNTSRVSVLTQLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
34	Cadena pesada de anti-CD-52 12G6 S298N/ T299A/ Y300S	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSNYWMNWVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPIDYWQGQITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNNTSRVSVLTQLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
35	Cadena pesada de anti-CD-52 12G6 N297Q/ S298N/ Y300S	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSNYWMNWVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPIDYWQGQITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCTCPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNTSRVSVLTQLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

Tabla 13: Secuencias del anticuerpo anti-Her2

<u>SEQ ID NO</u>	<u>Nombre</u>	<u>Secuencia de aminoácidos</u>
36	Cadena ligera de anti-Her2 WT	DIQMTQSPSSLASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKP GKAPKLLIYIASFLYSGVPSRSGRSRGTDFTLTISLQPEDF ATYYCQQHYTTPPTFGQGKTVKEIKRTVAAPSVIFPPSDEQL KSGTASVUVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC*
37	Cadena pesada de anti-Her2 WT	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVGRFTISADTSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY ICNVNHPKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSDEL KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK*
38	Cadena pesada de anti-Her2 S298N/T299A/ Y300S	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVGRFTISADTSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY ICNVNHPKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNNA RA RVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSDEL KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD SDGSIFLYSKLTVDKSRWQQGVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK*

Ejemplo 10. Generación de anticuerpos alterados que contienen restos glucano reactivos

- A fin de generar anticuerpos que contienen restos glucano capaces de reaccionar con restos efectores derivados, un anticuerpo anti-HER se glucosiló en primer lugar in vitro usando glucosiltransferasa y donantes de nucleótidos glucídicos pertinentes. Por ejemplo, para introducir los residuos de ácido siálico, los anticuerpos donantes se galactosilaron en primer lugar con β -galactosiltransferasa, seguido por sialilación con α 2,6-sialiltransferasa según los métodos de Kaneko y cols. (Kaneko, Y., Nimmerjahn, F., y Ravetch, J. V. (2006) Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science* 313, 670-3). La reacción se realizó en una etapa de síntesis en un recipiente usando β -galactosiltransferasa (50 mU/mg, Sigma) y α 2,6-sialiltransferasa (5 ug/mg, R&D system) 5 con sustratos nucleótidos glucídicos donantes, UDP-galactosa (10 mM) y CMP-ácido siálico (10 mM) en tampón de MES 50 mM (pH 6,5) que contenía $MnCl_2$ 5 mM. La mezcla de reacción que contenía 5 mg/ml de anticuerpo anti-HER2 se incubó durante 48 horas a 37°C. La sialilación se verificó usando análisis por MALDI-TOF MS de glucanos 10 permitilados liberados del anticuerpo con PNGasa F, análisis del contenido de ácido siálico usando HPLC Dionex y transferencia de lectina con SNA, una lectina específica para al ácido α 2,6-siálico.
- 15 El análisis por MALDI-TOF de glucanos liberados por tratamiento con PNGasa F del anticuerpo anti-HER2 sialilado indicaba que los glucanos naturales se han remodelado completamente con una estructura biantenaria principalmente monosialilada, A1F (**Figura 27A**), junto con una pequeña cantidad de especie disialilada. El tratamiento del anticuerpo con cantidades superiores de α 2,6-sialiltransferasa producía poblaciones más homogéneas de la glucoforma A1F, 20 sugiriendo que bien la actividad enzimática o bien la localización del glucano pueden evitar la sialilación total. Se determinó que el contenido de ácido siálico era ~2 mol por mol de anticuerpo, lo que está de acuerdo con un glucano A1F como la principal especie de glucoforma (**Figura 27B**). La transferencia de lectina con una lectina de SAN, aglutinina de *Sambucus nigra* específica para ácido siálico enlazado en α 2,6, confirmaba que el ácido siálico estaba 25 presente en una configuración de enlace α 2,6 (**Figura 27C**).
- En conclusión, aunque los glucanos proteínicos naturales son algo heterogéneos, la remodelación a través de galactosil- y sialiltransferasas da un anticuerpo casi homogéneo con glucanos biantenarios monosialilados pero

totalmente galactosilados (A1F). La introducción de solo ~1 ácido siálico en los dos aceptores de galactosa en cada glucano ramificado se puede deber a una accesibilidad limitada de una de las galactosas procedentes de glucanos que a menudo están enterradas en el anticuerpo o las interacciones no covalentes de los glucanos con la superficie de la proteína.

5 **Ejemplo 11. Oxidación de anticuerpos alterados que contienen restos de glucano reactivos**

Una vez que se verificaba la sialilación, se investigó la oxidación en el procedimiento de anticuerpo anti-HER2 sialilado con diversas concentraciones de peryodato (de 0,25 a 2 mM). El anticuerpo sialilado se intercambio con tampón en primer lugar en Tris-HCl 25 mM (pH 7,5) que contenía EDTA 5 mM seguido por intercambio con tampón con tampón de PBS. La mezcla de anticuerpo tamponada se aplicó a continuación a columna Sepharose de proteína A 10 preequilibrada con tampón de PBS. Después de que la columna se lavara con 15 volúmenes de columna de PBS, 15 volúmenes de columna de PBS que contenía EDTA 5 mM y 30 volúmenes de columna de PBS, se eluyó a continuación con tampón de citrato-fosfato 25 mM (pH 2,9). Los eluatos se neutralizaron inmediatamente con tampón de fosfato dibásico y el anticuerpo se concentró usando Amicon ultra de Millipore. Después de la purificación, el anticuerpo anti-HER2 sialilado se oxidó a continuación con peryodato sódico (Sigma) en tampón de acetato sódico 100 mM (pH 5,6) 15 sobre hielo en la oscuridad durante 30 minutos, y la reacción se desactivó con glicerol al 3% sobre hielo durante 15 minutos. El producto se desaló y se intercambió en acetato sódico 100 mM (pH 5,6) mediante 5 rondas de ultrafiltración 20 sobre Amicons de 50 kDa. La **Figura 28A** muestra el análisis del contenido de ácido siálico de anticuerpo sialilado titulado con diversas cantidades de peryodato. La oxidación completa de los residuos de ácido siálico se consiguió a una concentración de peryodato por encima de 0,5 mM. En efecto, una concentración de peryodato tan baja como 0,5 mM era suficiente para oxidar totalmente el ácido siálico introducido. Según esto, se eligió una concentración de peryodato de 1 mM para la oxidación de anticuerpo sialilado para la conjugación del fármaco.

La oxidación puede tener efectos adversos sobre la integridad de un anticuerpo. Por ejemplo, se sabe que la oxidación 25 de residuos de metionina, incluyendo Met-252 y Met-428, situados en la región CH3 de Fc, cerca del sitio de unión a FcRn afecta a la unión a FcRn que es crítica para prolongar la semivida en suero del anticuerpo (Wang, W., y cols. (2011) Impact of methionine oxidation in human IgG1 Fc on serum half-life of monoclonal antibodies. Mol Immunol 48, 860-6). Según esto, para examinar los efectos secundarios potenciales de la oxidación con peryodato sobre residuos 30 de metionina (p. ej., Met-252) críticos para la interacción con FcRn, el estado de oxidación del anticuerpo sialilado se determinó mediante análisis de LC/MS de un digesto de péptido tripsinado. Este análisis revelaba ~30% de oxidación de Met-252 y < 10% de oxidación de Met-428 después del tratamiento del trastuzumab sialilado con peryodato 1 mM. Para determinar el impacto de este grado de oxidación de metionina sobre la unión a FcRn, se evaluó la cinética de 35 unión a FcRn para cada anticuerpo usando resonancia plasmónica superficial (BIACORE). Este análisis revelaba que el estado de oxidación se correlacionaba con una pequeña pérdida en la unión a FcRn (12% y 26% de reducción a FcRn de ratón y ser humano, véanse las **Figuras 28B y 28C**, respectivamente). Notablemente, se ha presentado que una reducción de ~25% en la Ka para FcRn humano no tiene efecto sobre la semivida en suero en un ratón transgénico con FcRn humano, puesto que un solo sitio FcRn intacto en cada anticuerpo es suficiente para proporcionar 40 funcionalidad y la ventaja PK (Wang y cols., *Id.*)

En resumen, estos datos indican que la introducción de residuos de ácido siálico sensibles a peryodato mediante 45 tratamiento con sialiltransferasa permite el uso de concentraciones muy inferiores de peryodato, dando como resultado efectos secundarios mínimos sobre las interacciones anticuerpo-FcRn e integridad del anticuerpo según se valora mediante agregación ($\leq 1\%$). Así, el uso de anticuerpos sialilados proporciona un margen más amplio de las condiciones de oxidación a emplear, permitiendo la generación reproducible de glucoconjungados activos sin efecto sobre la semivida en suero.

45 La galactosa en un mutante de anticuerpos hiperglucosilado también se puede oxidar específicamente usando galactosa oxidasa para generar un grupo aldehído para la conjugación. Para confirmar este enfoque, un anticuerpo anti-TEM1 A114N se concentró hasta 13-20 mg/ml y a continuación se trató con 20 mU/mg de sialidasa en PBS durante 6 horas a 37°C. A continuación, el producto desialilado se oxidó con galactosa oxidasa ("GAO"), en primer 50 lugar con 5 ug de GAO/mg de proteína durante la noche a 37°C, seguido por adición de 2 ug de GAO/mg de proteína e incubación durante 5 horas adicionales. Se añadió acetato sódico para ajustar el pH hasta 5,6 (0,1 v/v, pH 5,6) y se añadió DMSO para conseguir una concentración de reacción final de 16%, se añadieron antes de la conjugación. El anticuerpo anti-HER mutante de hiperglucosilación A114N (15 mg/ml) se desialiló de forma similar con sialidasa (20 mU/mg) y se oxidó con 5 ug de GAO por mg de proteína en una sola reacción durante la noche a 37°C.

55 **Ejemplo 12. Síntesis de restos efectores reactivos**

A fin de facilitar la conjugación con glucoformas de anticuerpo derivadas con aldehído, restos efectores de los posibles fármacos (p. ej., momometilauristatina E (MMAE) y dolastatina 10 (Dol10)) se derivaron con aminooxicistamida para 65 contener grupos funcionales (p. ej., aminooxi-cys) específicamente reactivos con el aldehído.

Brevemente, para generar aminooxicistamida como una materia prima, se añadió S-tritil-L-cisteinamida (362 mg, 1 mmol) a 3 ml de una solución en DMF de éster de *N*-hidroxisuccinimida de ácido t-BOC-aminooxiacético (289 mg, 1 mmol). La reacción era completa después de 3 h como era evidente a partir del análisis por HPLC. Posteriormente, la mezcla de reacción se diluyó con 30 ml de diclorometano y se lavó con solución de bicarbonato sódico 0,1 M (2 x 20 ml), agua (2 x 20 ml) y salmuera (2 x 20 ml). La solución se secó sobre sulfato sódico anhídrico, se filtró y se concentró hasta sequedad. Se añadieron a este residuo secado 3 ml de TFA seguido por 150 µl de trietilsilano. La solución resultante se precipitó en t-butil-metil-éter y el procedimiento se repitió tres veces. Después de la filtración, el residuo se secó bajo presión reducida dando 205 mg de un sólido blanquecino (67% de rendimiento). El compuesto se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional.

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

Para generar Dol10 derivada con aminooxi (aminooxi-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Dol10), se combinaron 7,4 mg (0,024 mmol, 3 eq.) de aminooxicistamida, 12 mg (0,008 mmol) de MC-VC-PABC-PEG8-Dol10 y 30 µl de trietilamina en 3 ml de DMF. La reacción se completaba en 15 minutos según el análisis por HPLC. La purificación por HPLC preparativa daba como resultado 6,2 mg (46%) del producto deseado como un sólido blanquecino. El análisis HPLC en fase inversa sugiere que la pureza del compuesto es >96%. ESI calc. para C₈₀H₁₂₄N₁₆O₁₉S₂ (MH)⁺ 1678,0664; encontrado, m/z 1678,0613.

Ejemplo 13. Conjugación mediada por ácido siálico (SAM) de restos efectores reactivos

Después del desalado, los enlazadores de fármacos del Ejemplo 11 se combinaron con los anticuerpos sialilados oxidados del Ejemplo 10 con DMSO al 75% (0,167 v/v) a una concentración de 25 mM para conseguir una relación molar de 24:1 de enlazador de fármaco a anticuerpo y una concentración de anticuerpo final a 5 mg/ml. La mezcla se incubó durante la noche a temperatura ambiente. Los enlazadores de fármacos no incorporados y cualquier fármaco libre se recogieron usando BioBeads. El producto se intercambio con tampón adicionalmente en tampón de histidina-Tween usando columnas PD-10 y se filtró estérilmente. Se determinaron los niveles de endotoxinas y consiguió menos de 0,1 EU/mg de ADC para el estudio in vivo.

La **Figura 29A-C** muestra un cromatógrafo de interacción hidrófoba (HIC) de diferentes anticuerpos sialilados (anti-FAP B11 y G11 y el anticuerpo anti-HER2 del Ejemplo 11) glucoconjungados a AO-MMAE. El anticuerpo de HER2 sialilado también se conjugó con el enlazador de fármaco, AO-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Dol10 (**Figura 29D**). Este análisis revela que existen principalmente uno o dos conjugados de fármaco por anticuerpo con una relación de fármaco a anticuerpo (DAR) que varía de 1,3-1,9. El incremento en el tiempo de retención del glucoconjungado de Dol10 (**Figura 29D**) en comparación con el glucoconjungado de MMAE (**Figura 29C**) se debe probablemente a la mayor hidrofobia de Dol10.

También se efectuó un análisis por LC-MS con un anticuerpo anti-HER conjugado con dos enlazadores de fármaco diferentes (AO-MMAE o AO-PEG8-Dol10) a una escala de 30 mg. Este análisis mostraba valores de DAR similares de 1,7 y 1,5 después de la conjugación, lo que es comparable con el análisis por HIC. La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) mostraba niveles muy bajo (1%) de agregados en estos conjugados.

Ejemplo 14. Conjugación mediada por galactosa (GAM) de restos efectores reactivos

El aldehído de galactosa generado con galactosa oxidasa en el anticuerpo mutante de hiperglucosilación anti-TEM1 A114N según se describe en el Ejemplo 11 se conjugó con un exceso molar de 24 de enlazador de fármaco aminooxi-MC-VC-PABC-MMAE sobre el anticuerpo mediante incubación durante la noche a 25°C, dando un conjugado de ADC con una DAR de 1,72.

Al anticuerpo tratado con galactosa oxidasa preparado según se describe en el Ejemplo 11 se añadió un volumen de reacción de un décimo de acetato sódico 1 M, pH 5,6, para ajustar el pH hasta 5,6 y se añadió DMSO para hacer la concentración final 14% antes de añadir 24 eq. de enlazador de fármaco aminooxi-MC-VC-PABC-MMAE. Las reacciones se incubaron durante la noche a temperatura ambiente. El fármaco y el enlazador de fármaco libres se recogieron con Biobeads y el tampón del producto se intercambió mediante SEC (65% de rendimiento). El conjugado del producto se analizó mediante HIC. Según se muestra en la **Figura 30**, AO-MMAE se había conjugado a ~60% de las moléculas.

Ejemplo 15. Ensayos de proliferación de células ADC *in vitro*

La actividad *in vitro* de las moléculas de glucoconjungado de anti-HER y anti-FAP también se compararon con los correspondientes conjugados tiólicos que contienen el mismo resto farmacológico enlazado a través de enlaces tiol a cisteínas de la región de bisagra del mismo anticuerpo donante. Los conjugados tiólicos contenían aproximadamente dos veces el número de fármacos por anticuerpo (DAR) que los glucoconjungados. La conjugación basada en tiol se

5 realizó según se describe por Stefano y cols (Methods in Molecular Biology 2013, en prensa). A continuación, se emplearon las líneas celulares Her2+ SK-BR-3 y Her2- MDA-MB-231 para evaluar la eficacia relativa de cada ADC. Los resultados de este análisis se presentan en la Tabla 15 a continuación.

Tabla 15. Comparación de EC₅₀ de glucoconjungados y conjugados tiólicos

	DAR	EC ₅₀ (ng/ml)
Anti-HER-MC- VC-P ABC-MMAE (Thiol MMAE)	3,8*	2,3
AntiHER-AO-Cys-MC-VC-PABC-MMAE (Glyco MMAE)	1,7*	4,7
Anti-HER-MC- VC-P ABC-PEG8-Dol10 (Thiol Dol10)	3,9*	0,45
Anti-HER-AO-Cys-MC- VC-PABC-PEG8-Dol10 (Glyco Dol10)	1,5*	0,97
Anti FAP B11-MC-VC-PABC-MMAE (Thiol MMAE), CHO+FAP	3,3**	382,4
Anti FAP B11-AO-Cys-MC-VC-PABC-MMAE (Glyco MMAE), CHO+FAP	1,5**	682,4

Nota: * DAR determinada mediante LC-MS; ** DAR determinada mediante HIC

- 10 **Las Figuras 31(A-D)** muestran una comparación de la potencia *in vitro* de glucoconjungado de anti-HER y su conjugado tiólico homólogo. La viabilidad celular se determinó después de 72 h de exposición de los conjugados a antígeno de Her2 que expresa células (SK-BR-3) (**Figuras 31A y C**) o que no expresa (MDA-MB-231) células (**Figuras 31B y D**). Las ADCs contenían bien MMAE o bien PEG8-Dol10 enlazados a los glucanos ("glyco") o mediante química convencional a las cisteínas de la región de bisagra ("thiol"). Según se muestra en las **Figuras 31A y C**, se observaba una EC₅₀ ~2 veces menor para los conjugados tiólicos en comparación con los glucoconjungados, lo que es coherente con una DAR 2 veces superior en los primeros que en los últimos. No se observó toxicidad con la línea celular Her2- con un anticuerpo hasta 100 ug/ml.
- 15 20 También se observaron tendencias similares en la proliferación celular para ADC preparadas con anticuerpos contra un antígeno tumoral (FAP) que es altamente expresado por fibroblastos estromáticos reactivos en cánceres epiteliales incluyendo cáncer de colon, pancreático y de mama (Teicher, B. A. (2009) Antibody-drug conjugate targets. Curr Cancer Drug Targets 9, 982-1004). Estos conjugados se prepararon de nuevo al conjugar bien enlazador de fármaco de aminooxi-MMAE o bien enlazador de fármaco de maleimido-MMAE a glucanos o un grupo tiol. Ensayos de proliferación celular de estos conjugados mostraban que la EC₅₀ del conjugado tiólico tenía una potencia ~100 veces superior sobre las células CHO transfectadas con FAP humano que las mismas células que carecen de expresión de FAP según se representa en la **Figura 32**, que muestra una comparación de la potencia *in vitro* de glucoconjungado y conjugado tiólico de anti FAP B11. La viabilidad celular se determinó después de la exposición de los conjugados a células CHO transfectadas con o sin antígeno FAP. Las ADC contenían MMAE enlazada a los glucanos ("glyco") o mediante química convencional a cisteínas de la región de bisagra ("thiol"). Nótese que la EC₅₀ ~2 veces inferior para el tiol en comparación con los glucoconjungados es coherente con las cantidades relativas de fármaco aportadas por anticuerpo suponiendo eficacias similares para la unión a la diana y la internalización en células CHO que expresan antígeno. En paralelo, se ensayó un glucoconjungado de ADC anti FAP (B11) con una DAR de 1,5 según se describe previamente y mostraba una EC₅₀ ~2 veces superior que el conjugado tiólico de comparación (DAR 3,3).
- 25 30 35 40 45 Según se muestra en la **Figura 36**, se observaban tendencias similares en el ensayo de proliferación celular para ADC preparadas con el anticuerpo anti-HER que tiene la mutación de hiperglucosilación A114N y AO-MMAE según se describe en el Ejemplo 14, cuando se ensayan sobre células que expresan SK-BR-3 o células MDA-MB-231. El glucoconjungado de A114N muestra claramente una potenciación de la toxicidad celular contra la línea celular que expresa Her2 sobre la línea sin expresión. La toxicidad relativa comparada con el glucoconjungado de SialT preparado con el mismo anticuerpo es coherente con la carga de fármaco inferior de esta preparación.
- También se realizó un ensayo de proliferación celular para ADC preparadas con el anticuerpo anti-TEM1 que tiene la mutación de hiperglucosilación A114N y AO-MMAE preparada como se describe en el Ejemplo 14. Se observó una toxicidad superior con las líneas de células que expresan TEM1 SJSA-1 y A673 en comparación con la línea MDA-MB-231 sin expresión. El nivel de toxicidad en comparación con un conjugado tiólico convencional con el mismo anticuerpo estaba de acuerdo con la carga de fármaco (DAR) de esta preparación.

	SJSA-1	A673-RPMI	A673-DMEM-RPMI	MDA-MB-231
	IC50	IC50	IC50	IC50
andTEM1 A114N-AO-MC-VC-PABC-MMAE	3 µg/ml	3,2 µg/ml	2,2 µg/ml	40 µg/ml
antiTEM1-MC-VC-PABC-MMAE	4 µg/ml	1 µg/ml	0,9 µg/ml	20 µg/ml

5 En resumen, la conjugación específica del sitio de los fármacos a través de los glucanos con enlaces escindibles produce ADC con toxicidades y eficacia *in vitro* que son equivalentes a conjugados basados en tiol convencionales, según se demuestra usando diferentes anticuerpos y diferentes enlazadores de fármacos. Por otra parte, por debajo de 2 mM de peryodato, el nivel de conjugación de fármaco se correlaciona con la reducción de ácido siálico. Incrementar la concentración de peryodato por encima de 2 mM produce poco beneficio, según se espera de la 10 conversión completa de ácido siálico en la forma oxidada. Sin embargo, bajo todas las condiciones, el número de fármacos por anticuerpo era ligeramente inferior que el contenido de ácido siálico, indicando que algunos de los ácidos 15 siálicos oxidados pueden de forma similar no estar disponibles para el acoplamiento, bien debido a estar enterrados o bien de otro modo debido a impedimento estérico que surge del volumen del enlazador de fármaco.

Ejemplo 16. Caracterización *in vivo* de conjugados de anticuerpo-fármaco

15 También se evaluó la eficacia de glucoconjungados de anti-HER en un modo de xenoinjerto tumoral Her2+ y se comparó con comparadores de conjugados tiólicos que tienen una DAR ~2 veces superior. A ratones beige/SCID se les implantaron células tumorales SK-OV-3 Her2+ que se dejó que establecieran tumores de ~150 mm³ antes del inicio 20 del tratamiento. Se inyectaron ADC en dosis de 3 o 10 mg/kg a través de la vena caudal los días 38, 45, 52 y 59. Había ~10 ratones por grupo. Se midió el volumen del tumor de los ratones en un grupo diferente y se registró su supervivencia. La curva de supervivencia se representó basándose en el método de Kaplan-Meier.

25 Las **Figuras 33(A-D)** muestran una comparación de la eficacia *in vivo* de los glucoconjungados de anti-HER y los conjugados tiólicos en un modelo de xenoinjerto de células tumorales Her2+. A ratones beige/SCID implantados con células tumorales SK-OV-3 Her2+ se les dosificaron MMAE (**Figuras 33 A y B**) y PEG8-Dol10 (**Figuras 33 C y D**) que contenían glucoconjungados o comparadores de conjugado tiólico con una DAR ~2 veces superior. La cinética de crecimiento tumoral de los conjugados de MMAE se muestra en la **Figura 33A**. En este caso, el glucoconjungado mostraba una eficacia significativamente superior que el anticuerpo desnudo solo (negro) pero menos que un comparador de conjugado tiólico que tenía una DAR ~2 veces superior (verde). El glucoconjungado de MMAE mostraba una regresión tumoral significativa y un retraso de ~20 días en el crecimiento tumoral (**Figura 33A**) y un incremento de ~2 veces en el tiempo de supervivencia desde la primera dosis (**Figura 33B**). El conjugado tiol-MMAE mostraba una supresión tumoral casi completa a la misma dosis de ADC (10 mg/kg).

35 La eficacia *in vivo* de un glucoconjungado de PEG8-Dol10 ("Gluco Dol10") y un comparador de conjugado tiólico con una DAR ~2 veces superior ("Tiol Dol10") también se determinó en el mismo modelo de xenoinjerto de células tumorales Her2+. Ambos conjugados mostraban una eficacia inferior que conjugados de MMAE como los descritos 40 previamente. Sin embargo, el glucoconjungado de aminooxi-PEG8-Dol10 ("Glyco Dol10") a 10 mg/kg mostraba un retraso de 15 días en el crecimiento tumoral (**Figura 33C**) y un incremento de ~20 días (1,7 veces) en el tiempo de supervivencia después de la primera administración (**Figura 33D**). El conjugado tiólico era más eficaz a la misma dosis, mostrando un incremento de 2 veces en la supervivencia. A una dosis inferior (3 mg/kg), el conjugado tiólico mostraba una eficacia menor que el glucoconjungado a 10 mg/kg. Esta dosis corresponde a 80 umol de fármaco PEG8-Dol10 por kg de dosis, en comparación con 110 umol de fármaco de PEG8-Dol10 por kg de dosis para el glucoconjungado.

45 Estos datos demuestran que la conjugación específica del sitio de fármacos sobre ácido siálico de glucanos de anticuerpo da moléculas con potencia comparable a ADC generadas a través de química basada en tiol. La eficacia *in vivo* algo inferior surge probablemente del menor número de fármacos que son soportados por cada anticuerpo a las células tumorales mediante la internalización de cada antígeno unido a anticuerpo. Aunque los presentes inventores no han comparado estos glucoconjungados con conjugados tiólicos de la misma DAR, la eficacia observada a diferentes dosis de las dos ADC que representan niveles comparables de fármaco administrado muestra que los glucoconjungados tienen eficacia intrínseca comparable con sus homólogos tiólicos, indicando ausencia de efecto perjudicial de la conjugación en este sitio. Por otra parte, una dosis de 10 mg/kg del glucoconjungado de Dol10 que introducía solo 28% más fármaco proporcionaba un incremento de 2 veces en la supervivencia sobre el conjugado tiólico (a 3 mg/kg), sugiriendo que estos conjugados incluso pueden proporcionar eficacias superiores a la misma DAR. Dada la limitación aparente en la incorporación de ácido siálico en glucanos naturales, se podría conseguir una carga 50 de fármaco superior mediante un número de estrategias diferentes incluyendo el uso de enlazadores de fármaco ramificados o la introducción de sitios de glucosilación adicionales y usando el mismo método.

Ejemplo 17. Conjugación de restos orientadores

La **Figura 37** muestra el esquema global para la conjugación de restos orientadores a carbohidratos existentes o sitios de glucosilación manipulados. Esta conjugación se puede realizar a través de la ligación de neoglucanos, glucopéptidos u otros restos orientadores a anticuerpos sialilados oxidados (**Figuras 38 y 39**). Restos adecuados para la conjugación pueden incluir los que contienen enzimas de aminooxi (**Figura 40 y 41**).

Ejemplo 18. Conjugación a través de ácido siálico en glucanos Fc naturales

Man-6-P hexamanosa-aminooxi se conjugó bien a anticuerpo polyclonal o bien a anticuerpo monoclonal que se dirige específicamente a un receptor de Man-6-P. Los análisis de SDS-PAGE y MALDI-TOF MS de la conjugación del anticuerpo polyclonal de conejo con Man-6-P hexamanosa-aminooxi se muestran en la **Figura 42**. La **Figura 43**

reproduce los resultados de experimentos de resonancia plasmónica superficial usados para valorar la unión de anticuerpos IgG policlónicos de conejo de control y conjugados a Man-6-P hexamanosa a receptor de Man-6-P independiente de cationes (CI-MPR). Los análisis *in vitro* de este anticuerpo conjugado demuestran un incremento en la captación en líneas celulares tanto HepG2 (carcinoma hepatocelular hepático de *Homo sapiens*) como RAW (leucemia murina de *Mus musculus*) (**Figura 44**). Los cultivos se tiñeron con anticuerpo anti-Alexa 488 de conejo teñido por contraste con DAPI.

Los anticuerpos conjugados con Man-6-P o restos lactosa-aminooxi se probaron adicionalmente a través de SDS-PAGE y transferencia de lectina y se compararon con anticuerpos no conjugados (**Figura 45**). Los análisis de proteínas intactas por MALDI-TOF de los anticuerpos de control y conjugados demuestran que los conjugados tienen aproximadamente dos restos de glucano por anticuerpo, mientras que los anticuerpos de control no tienen ninguno (**Figura 46**).

Ejemplo 19. Conjugación a través de ácido siálico a residuos de cisteína de la bisagra en un anticuerpo

Man-6-P hexamanosa-maleimida (**Figura 41**) se conjugó bien a anticuerpo polyclonal o bien a anticuerpo monoclonal.

La conjugación de un anticuerpo polyclonal con Man-6-P hexamanosa-maleimida a través de cisteínas de bisagra se examinó a través de SDS-PAGE, transferencia de lectina y cuantificación de Man-6-P (para determinar el número de glucanos conjugados por anticuerpo) (**Figura 47**). La conjugación de un anticuerpo polyclonal con lactosa-maleimida también se examinó a través de uno de SDS-PAGE y cuantificación de galactosa del anticuerpo de control, el anticuerpo conjugado y el filtrado se muestran en la **Figura 48**. Se observaba poco incremento de la agregación en anticuerpos policlónicos conjugados a cisteína de bisagra mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) (**Figura 50**).

La conjugación de un anticuerpo monoclonal con Man-6-P hexamanosa-maleimida a través de cisteínas de bisagra también se examinó a través de SDS-PAGE y cuantificación de glucano (para determinar el número de glucanos conjugados por anticuerpo) (**Figura 49**). Se observaba por incremento de la agregación en anticuerpos policlónicos conjugados a cisteínas de bisagra mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) (**Figura 51**).

La unión de receptor de Man-6-P (CI-MPR) a anticuerpos policlónicos y monoclonales conjugados a bis Man-6-P hexamanosa a través de glucanos de Fc naturales o disulfuros de bisagra también se demostró a través de desplazamiento en gel sobre una PAGE natural (**Figura 55**).

Ejemplo 20. Preparación de anticuerpo monoclonal completamente galactosilado y conjugación de un glucopéptido trigalactosilado al anticuerpo sialilado

Un mutante de anticuerpo monoclonal de ratón con una mutación STY (NNAS) se modificó con sialidasa y galactosiltransferasa para elaborar glucanos trigalactosilados principalmente naturales (2 glucanos por anticuerpo). El mismo mutante también se sialiló con sialiltransferasa y se conjugó con un glucopéptido que contiene galactosa trivalente (**Figura 68**) usando el enfoque SAM. Se examinó el contenido de ácido siálico de los anticuerpos modificados con enzima (**Figura 52**). Además, se examinaron el análisis por MALDI-TOF de los glucanos liberados de NNAS de control y desialilado/galactosilado (**Figura 53**) así como los glucanos liberados de NNAS de control y sialilado (**Figura 54**). SDS-PAGE (NuPAGE al 4-12%) y transferencia de lectina de NNAS modificado con enzima y conjugado se muestran en (**Figura 56**). También se midió la cuantificación de galactosa terminal para el anticuerpo NNAS de control, anticuerpo NNAS desialilado/galactosilado y anticuerpo NNAS conjugado a glucopéptido (**Figura 57**).

Ejemplo 21. Preparación de lactosa-maleimida sialilada en α 2,3 usando un enfoque de quimioenzima y la conjugación posterior a IgG de conejo no inmunitaria a través de disulfuros de bisagra.

Las proteínas de unión a carbohidratos (incluyendo proteínas Siglec) son capaces de unirse más eficazmente a zonas con mayor densidad de ácido siálico. Así, los glucanos monosialilados en un anticuerpo dado pueden no proporcionar suficiente densidad de ácido siálico para facilitar la unión a otras proteínas Siglec. Por lo tanto, se investigó un enfoque de conjugación a disulfuro de bisagra para introducir múltiples copias de glucanos sialilados. Para producir glucanos

- 5 sialilados para la conjugación, se sialiló lactosa-maleimida (5 mg) in vitro con α 2,3-sialiltransferasa de *Photobacterium damsela* en tampón de Tris (pH 7,5) durante 2 h a 37°C. Un glucano de control se incubó sin sialiltransferasa y se comparó con los glucanos originales. El análisis por MALDI-TOF MS mostraba que la incubación de lactosa-maleimida sin enzima en tampón de Tris (pH 7,5) durante 2 h a 37°C no cambiaba el peso molecular esperado de la molécula, sugiriendo que la condición examinada no da como resultado hidrólisis de maleimida. El análisis por MALDI-TOF y 10 HPLC Dionex de glucanos modificados con α 2,3-sialiltransferasa indican la presencia de sialil-lactosa, aunque no como pico principal (datos no mostrados). Por lo tanto, la sialil-lactosa-maleimida se purificó adicionalmente usando 15 columnas de QAE-sepharose y cada fracción se analizó posteriormente usando MALDI-TOF y HPLC Dionex. Estos análisis indicaban que la sialil-lactosa-maleimida existía como especie principal en el eluato de NaCl 20 mM procedente de la columna de QAE (**Figura 58**). La cantidad de glucanos sialilados purificados se estimó usando análisis de cuantificación de ácido siálico de las muestras, indicando una recuperación de ~1,8 mg de sialil-lactosa-maleimida.

La conjugación posterior de un anticuerpo policlonal de conejo con esta sialil-lactosa-maleimida se probó usando química de tiol-maleimida. Un anticuerpo IgG de conejo (1 mg) se redujo con TCEP a un exceso molar de 4 (sobre el anticuerpo) durante 2 h a 37°C antes de conjugarse a un exceso molar de 24 de sialil-lactosa durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, el conjugado se intercambió con tampón en PBS para el análisis en SDS-PAGE (**Figura 59A**). También se realizó una cuantificación de ácido siálico usando HPLC Dionex (**Figura 59B**). Partes alícuotas de conjugado de control y tiólico se trataron con o sin sialidasa (1 U por mg) durante la noche a 37°C antes de que los sobrenadantes se recuperaran a través de filtración (MWCO 10 kDa). El contenido de ácido siálico de los sobrenadantes se midió y se comparó con muestras tratadas sin sialidasa. Hay aproximadamente 4 restos de α 2,3-sialil-lactosa por anticuerpo.

Ejemplo 22. Preparación de α 2,6-sialil-lactosa-maleimida mediante sialilación de lactosa-maleimida y conjugación a disulfuros de bisagra de un anticuerpo policlonal de conejo a través de enlaces α 2,3 o α 2,6 que da como resultado alta sialilación

30 También se investigó la conjugación de múltiples copias de glucanos sialilados en α 2,6 a los disulfuros de bisagra de un anticuerpo policlonal de conejo. Puesto que la α 2,3-sialil-lactosa-maleimida se producía satisfactoriamente usando un enfoque de quimioenzima (véase anteriormente, Ejemplo 21), se usó un método similar para producir α 2,6-sialil-lactosa-maleimida (pequeñas modificaciones del protocolo incluían el uso de una sialiltransferasa diferente). Para producir glucano sialilado en α 2,6 para la conjugación, se sialiló lactosa-maleimida (~5 mg) in vitro con 0,5 U de una 35 α 2,6-sialiltransferasa bacteriana de *Photobacterium damsela* en tampón de Tris (pH 8) durante 1 h a 37°C. Después de la reacción enzimática, el producto se aplicó a una columna de QAE-sepharose. La columna se lavó con 10 fracciones de 1 ml de Tris 2 mM (pH 8), 5 fracciones de 1 ml de tampón de Tris que contiene NaCl 20 mM y 5 fracciones de 1 ml de tampón de Tris que contiene NaCl 70 mM. Las partes alícuotas procedentes de cada fracción se analizaron 40 usando HPLC Dionex junto con patrones de lactosa y α 2,6-sialil-lactosa. Los perfiles de oligosacáridos de los patrones y una de las fracciones eluidas se muestran en las **Figuras 60 (A-D)**. También se analizaron las fracciones que contenían α 2,6-sialil-lactosa-maleimida y se conformaron mediante MALDI-TOF. El glucano en una de las fracciones se puede observar en la **Figura 61**.

45 La cantidad de α 2,6-sialil-lactosa-maleimida purificada se estimó a continuación usando análisis de cuantificación de ácido siálico que indicaba una recuperación de ~1,5 mg de sialil-lactosa-maleimida. Una vez que se preparaba el glucano, la conjugación de anticuerpo bien con α 2,6-sialil-lactosa-maleimida o bien α 2,3-sialil-lactosa-maleimida se probó usando química de tiol. Un anticuerpo IgG policlonal de conejo (1 mg) se intercambió con tampón y se redujo con TCEP en un exceso molar de 4 (sobre el anticuerpo) durante 2 h a 37°C. A continuación, el anticuerpo reducido 50 se dividió por la mitad: una porción se conjugó a un exceso molar de 24 de α 2,6-sialil-lactosa-maleimida, y la otra a α 2,3-sialil-lactosa-maleimida durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, los dos conjugados se intercambiaron con tampón en PBS antes del análisis por SDS-PAGE (**Figura 62A**) y la cuantificación de ácido siálico usando HPLC Dionex (**Figura 62B**). La cuantificación de ácido siálico se usó para estimar el número de glucano conjugado. Partes alícuotas del anticuerpo de control y el anticuerpo conjugado a tiol se trataron con o sin sialidasa (1 U por mg) durante la noche a 37°C antes de que los sobrenadantes se recuperaran a través de filtración (MWCO 10 kDa). El contenido de ácido siálico de los sobrenadantes se midió y se comparó con muestras tratadas sin sialidasa (control). El análisis demostraba que aproximadamente 7 glucanos (glucanos bien de α 2,3 o bien de α 2,6-sialil-lactosa) 55 se conjugaban al anticuerpo policlonal por este método.

Ejemplo 23. PEGilación de NNAS usando química de GAM

60 Un anticuerpo monoclonal mutante NNAS de ratón (S298N/T299A/Y300S) se galactosiló y desialiló, generando un anticuerpo monoclonal Gal NNAS sin ninguna degradación por proteasa. Este anticuerpo se modificó con galactosa

oxidasa (GAO) para generar aldehído de galactosa. A continuación, el aldehído de galactosa se conjugó con 2 o 5 kDa de aminooxipolietilenglicol (PEG). La **Figura 63** reproduce la caracterización de anticuerpos de control y mutantes NNAS modificado enzimáticamente (desialilado/galactosilado) usando SDS-PAGE y transferencia de lectina. La **Figura 64** reproduce la caracterización a través de SDS-PAGE reductora de la PEGilación de un anticuerpo de control y Gal NNAS con diversas cantidades de galactosa oxidasa. Estos resultados demuestran que Gal NNAS se puede PEGilar eficazmente con cantidades significativas de mono-, bi- y tri-PEG conjugados por cadena pesada. La **Figura 66** reproduce la caracterización a través de SDS-PAGE reductora de la PEGilación de un anticuerpo de control y Gal NNAS con diverso exceso molar de PEG sobre el anticuerpo. Barridos con ProteinSimple que caracterizan la PEGilación de los anticuerpos demuestran que aproximadamente 1,5-1,7 restos de PEG se conjugan por cadena pesada (o aproximadamente 3-3,4 PEG por anticuerpo) (**Figuras 65 y 67**).

Ejemplo 24. PEGilación de NNAS usando química de GAM

Un anticuerpo NNAS se galactosiló con 50 mU/mg de galactosiltransferasa y posteriormente se desialiló con 1 U/mg de sialidasa en tampón de MES 50 mM (pH 6,5). A continuación, fetuña desialilada y NNAS así como NNAS galactosilado se trataron con galactosa oxidasa 57 mU/mg)/catalasa en presencia o ausencia de acetato de cobre 0,5 mM antes de la conjugación con un exceso molar de 25 de aminoxy-PEG de 5 kDa (**Figura 69A**). En otro experimento, se trató NNAS galactosilado con galactosa oxidasa (57 mU/mg)/catalasa en presencia de acetato de cobre 0, 0,02, 0,1 y 0,5 mM antes de la conjugación con un exceso molar de 25 de aminoxy-PEG de 5 kDa (**Figura 69B**). El anticuerpo oxidado con galactosa oxidasa en presencia de acetato de cobre mostraba un grado superior de PEGilación que el mismo anticuerpo hecho reaccionar con galactosa oxidasa en ausencia de acetato de cobre. De manera significativa, se observaban niveles superiores de PEGilación cuando la conjugación se realizaba en una reacción que contenía sulfato de cobre en concentraciones por encima de 0,1 mM.

Ejemplo 25. Modificación de Herceptin silvestre y mutante usando sialidasa/galactosiltransferasa

Anticuerpos de Herceptin silvestres y mutantes (A114N, NNAS y A114N/NNAS) se modificaron enzimáticamente con 50 mU/mg de galactosiltransferasa y posteriormente se desialilaron con 1 U/mg de sialidasa en tampón de MES 50 mM (pH 6,5). Los anticuerpos modificados se analizaron usando SDS-PAGE (reductora y no reductora), transferencia de lectina con ECL (una lectina vegetal específica para galactosa terminal) y cuantificación de galactosa terminal usando análisis por HPLC Dionex de galactosa liberada por galactosidasa (**Figura 70**). Se obtuvieron anticuerpos modificados enzimáticamente que contenían aproximadamente de tres a nueve galactosas terminales con los mutantes NNAS y NNAS/A114N doble demostrando un nivel superior de galactosa terminal que el silvestre y el mutante A114N.

Ejemplo 26. PEGilación de anticuerpos silvestres y mutantes usando el método de conjugación SAM

Anticuerpos de Herceptin silvestres y mutantes (A114N, NNAS y A114N/NNAS) se PEGilaron usando conjugación mediada por ácido siálico (SAM). Posteriormente, los anticuerpos se oxidaron con peryodato 2 mM. Después del intercambio con tampón, los anticuerpos oxidados se PEGilaron con un exceso molar de 25 de aminoxy-PEG de 5 kDa. El contenido de ácido siálico de los anticuerpos silvestres y mutantes se midió usando HPLC Dionex (**Figura 71**). A continuación, los anticuerpos PEGilados se analizaron usando SDS-PAGE reductora y no reductora (**Figura 72**). Además, la PEGilación (PAR, número de PEG por anticuerpo) se estimó al analizar los geles barridos usando ProteinSimple (**Figura 73**). Los mutantes NNAS, A114N y A114N/NNAS muestran todos un PAR superior (2,7-4,6) que los anticuerpos de Herceptin silvestres (1,4).

Ejemplo 27. Investigación de la captación de anticuerpos glucomanipulados con ligandos de glucano que contiene galactosa

Un anticuerpo policlonal bien se modificó enzimáticamente con galactosiltransferasa (Gal Transferasa), bien se conjugó a lactosa-aminoxy (Gal-Glc hasta 297: se conjugó a ácido siálico en glucanos a partir de Asn-297 de anticuerpo sialilado) o bien se conjugó a lactosa-maleimida (Gal-Glc hasta bisagra: se conjugó a cisteínas en disulfuros de bisagra). Los anticuerpos de control, modificados o conjugados se incubaron a continuación con células HepG2 (una línea celular de hepatocitos que expresa ASGPR) durante 1-2 h a 37°C antes de que los anticuerpos captados se midieran usando tinción por inmunofluorescencia (**Figura 74**). Los resultados mostraban un incremento de la captación de células HepG2 de anticuerpos modificados enzimáticamente o conjugados a lactosa.

Ejemplo 28. Conjugación de un glucano GalNAc trivalente a Herceptin

Herceptin (anti-Her2) se sialiló y conjugó con un glucano GalNAc trivalente (**Figura 75**) para orientarse a ASGPR usando el método de conjugación SAM. Posteriormente, se usaron experimentos de resonancia plasmónica superficial

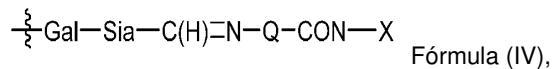
(Biacore) para valorar la unión de estos anticuerpos conjugados a glucano GalNAc trivalente a la subunidad H1 de ASGPR (**Figura 76**).

Ejemplo 29. Conjugación de glucano GalNAc trivalente y glucopéptido que contiene galactosa trivalente a una enzima lisosómica recombinante

- 5 Una enzima lisosómica recombinante se conjugó bien con glucano GalNAc trivalente o bien con glucopéptidos que contienen galactosa trivalentes (**Figura 77**) para orientarse a ASGPR usando el método de conjugación SAM. Posteriormente, se usaron experimentos de resonancia plasmónica superficial (Biacore) para valorar la unión de estas enzimas conjugadas a glucano GalNAc trivalente y conjugadas a glucopéptido que contiene galactosa trivalente a la subunidad H1 de ASGPR (**Figura 78**). Los resultados mostraban una unión fuerte a ASGPR de la enzima lisosómica recombinante conjugada a glucano GalNAc trivalente. Las **Figuras 79(A-D)** muestran un número de restos GalNAc trivalentes ejemplares. Se muestran ejemplos que no tienen espaciador, un espaciador de 12 Å, un espaciador de 1 kDa (aproximadamente 80 Å) y tanto un espaciador de -20 Å como un espaciador de 1 kDa (aproximadamente 80 Å). Una segunda enzima lisosómica recombinante (rhGAA) también se conjugó con glucano GalNAc trivalente C12. La **Figura 80** muestra una gráfica que representa los resultados de la conjugación de enzima lisosómica recombinante rhGAA oxidada con peryodato con un exceso de glucano GalNAc trivalente C12. El glucano por GAA conjugado resultante se representa con un exceso de molar de glucano de 20, 40, 80 y 200 veces sobre el rhGAA. La **Figura 81** reproduce la unión a ASGPR de enzimas lisosómicas recombinantes conjugadas con glucano GalNAc trivalente C12 sobre Biacore. Las enzimas conjugadas con un exceso de 20 (conjugado 1), 40, 80, y 200 veces (conjugado 4) de glucano muestran todas una unión fuerte a la subunidad 1 de ASGPR. No existe una diferencia significativa en la unión entre los conjugados (conjugados 1 a 4).

REIVINDICACIONES

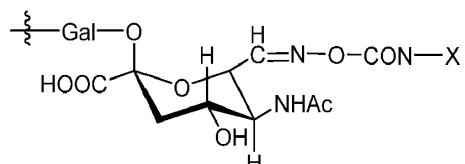
1. Un polipéptido de unión que comprende al menos un glucano modificado, donde el glucano comprende al menos un resto de Fórmula (IV):



donde:

- A) Q es NH u O;
- B) CON es un resto conector;
- C) X es un resto orientador que se une a una célula, donde el resto orientador es un resto de glucano GalNAc trivalente o un glucopéptido trigalactosilado;
- D) Gal es un residuo de galactosa; y
- E) Sia es un resto de ácido siálico;

donde el glucano comprende al menos un resto de la siguiente fórmula estructural:



2. El polipéptido de unión según la reivindicación 1, donde el resto orientador se une a un receptor de lectina tipo C o a un receptor de asialoglucoproteína (ASGPR).

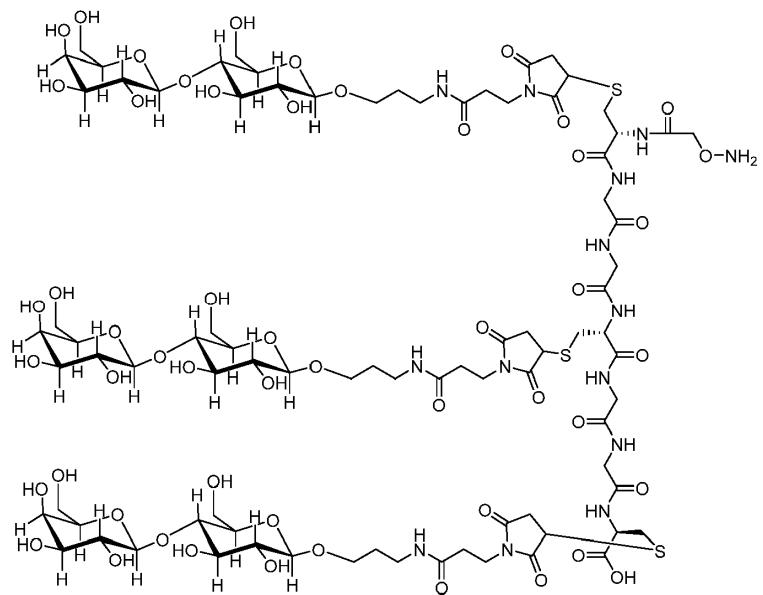
20 3. El polipéptido de unión según la reivindicación 1, donde el polipéptido de unión es internalizado por la célula, y donde la cantidad del polipéptido de unión internalizado por la célula es mayor que la cantidad de un polipéptido de unión de referencia que carece de un resto orientador internalizado por la célula.

25 4. El polipéptido de unión según la reivindicación 1, donde el resto orientador es un glucopéptido trigalactosilado.

5. El polipéptido de unión según la reivindicación 4, donde el glucopéptido trigalactosilado es un resto de lactosa₃-Cys₃Gly₄.

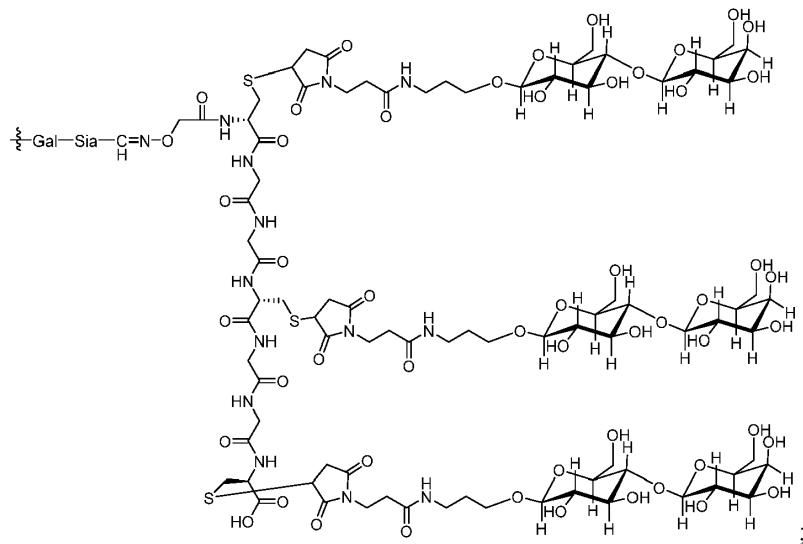
30 6. El polipéptido de unión según la reivindicación 4, donde el glucano modificado comprende un resto seleccionado del grupo que consiste en:

- a) un resto representado por la Fórmula V:



[Fórmula V];

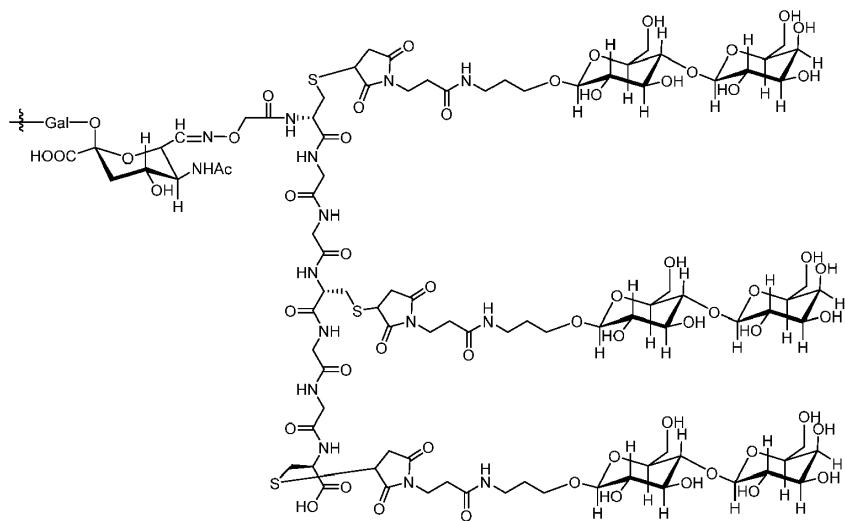
b) un resto de la siguiente fórmula estructural:



5

y

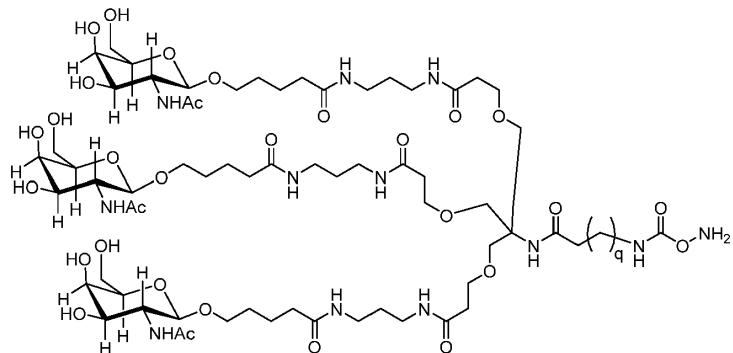
c) un resto de la siguiente fórmula estructural:



7. El polipéptido de unión según la reivindicación 1, donde el resto orientador es un resto de glucano GalNAc trivalente.

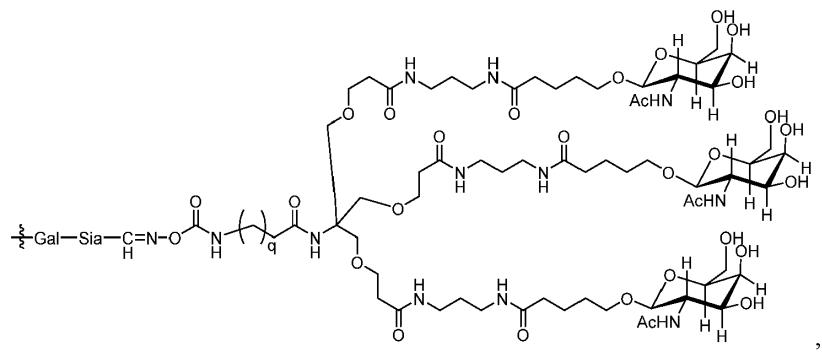
5 8. El polipéptido de unión según la reivindicación 7, donde el glucano modificado comprende un resto seleccionado del grupo que consiste en:

a) un resto de glucano GalNAc trivalente como el representado por la Fórmula VIII:



[Fórmula VIII], donde q es un número entero entre 1 y 29 inclusive;

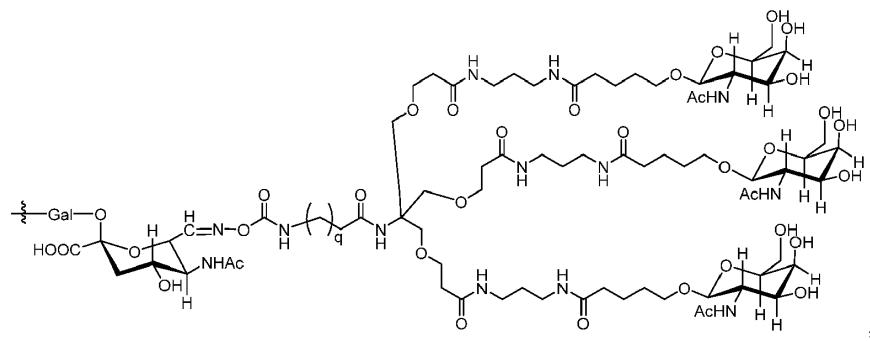
b) un resto que tiene la siguiente fórmula estructural:



10

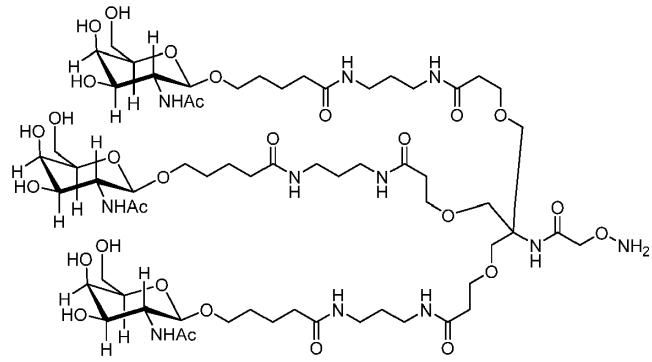
donde q es un número entero entre 1 y 29 inclusive;

c) un resto que tiene la siguiente fórmula estructural:



donde q es un número entero entre 1 y 29 inclusive;

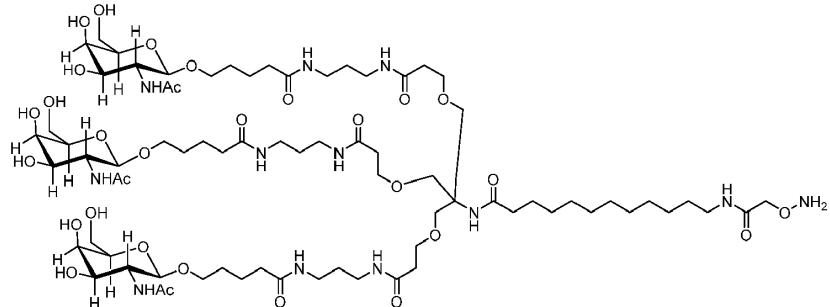
d) un resto de glucano GalNAc trivalente como el representado por la Fórmula VII:



5

[Fórmula VII];

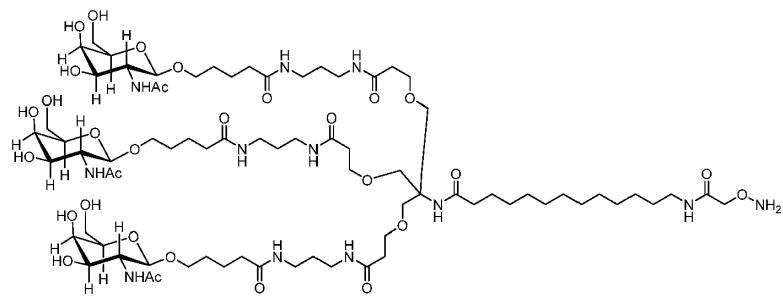
e) un resto de glucano GalNAc trivalente como el representado por la Fórmula XIII:



[Fórmula XIII];

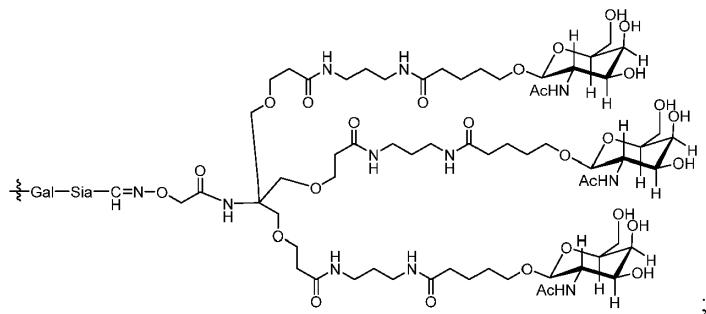
10

f) un resto de glucano GalNAc trivalente como el representado por la Fórmula XIV:



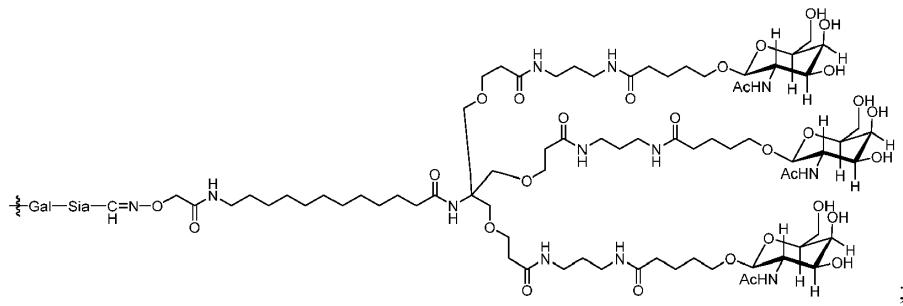
[Fórmula XIV];

g) un resto que tiene la siguiente fórmula estructural:

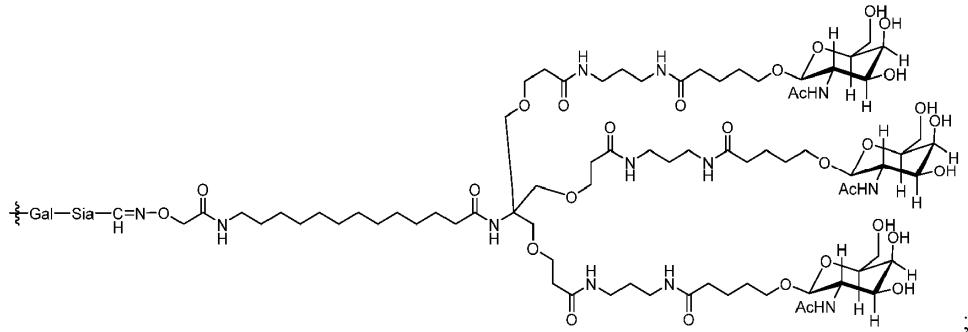


5

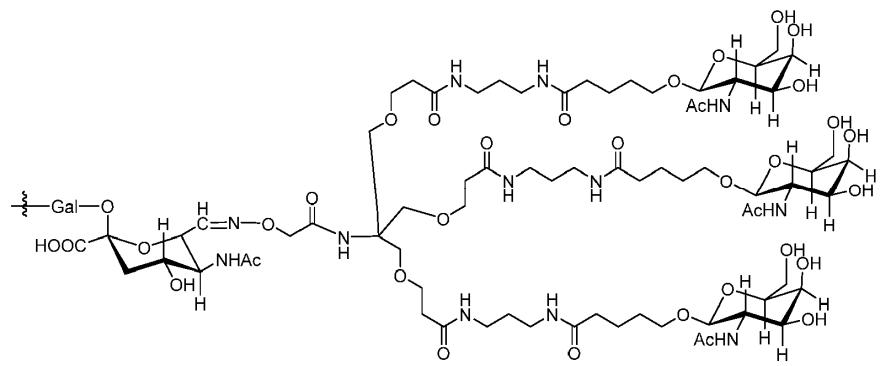
h) un resto que tiene la siguiente fórmula estructural:



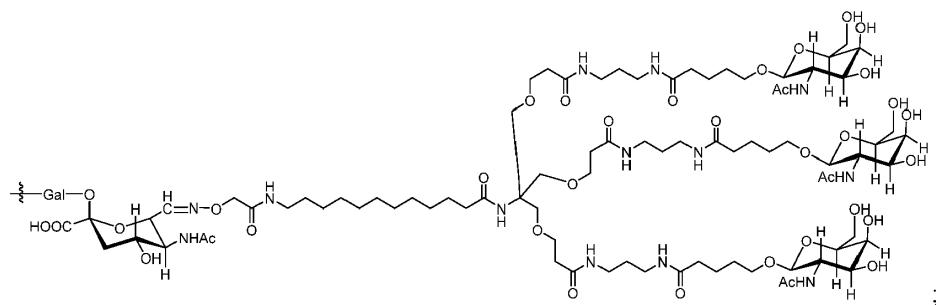
i) un resto que tiene la siguiente fórmula estructural:



j) un resto que tiene la siguiente fórmula estructural:

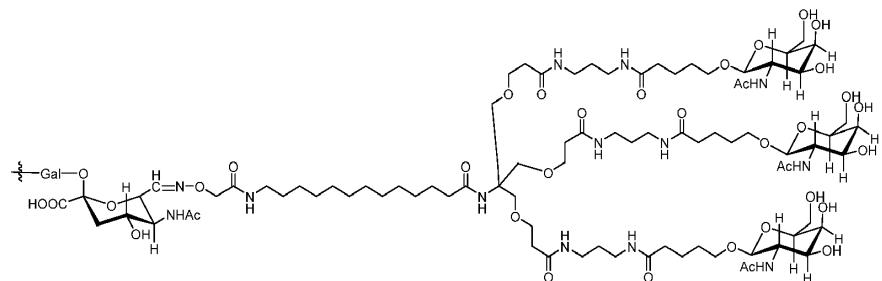


k) un resto que tiene la siguiente fórmula estructural:



y

5 l) un resto que tiene la siguiente fórmula estructural:



9. El polipéptido de unión según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde se cumplen una o más de las siguientes condiciones:

- a) el polipéptido de unión comprende un dominio Fc, donde el dominio Fc es opcionalmente humano;
- 10 b) el polipéptido de unión comprende un dominio CH1;
- c) el resto conector comprende un enlazador sensible al pH, un enlazador de disulfuro, un enlazador sensible a enzimas u otro resto enlazador escindible;
- d) el resto conector comprende un resto enlazador seleccionado del grupo que consiste en los restos enlazadores representados en la Tabla 2 y 14; y
- 15 e) el polipéptido de unión es un anticuerpo o una inmunoadhesina.

10. El polipéptido de unión según la reivindicación 9, donde el glucano modificado está enlazado por N al polipéptido de unión a través de un residuo de asparagina en la posición de aminoácido 297 del dominio Fc, según la numeración

de EU, o donde el glucano modificado está enlazado por N al polipéptido de unión a través de un residuo de asparagina en la posición de aminoácido 298 del dominio Fc, según la numeración de EU.

5 11. El polipéptido de unión según la reivindicación 9, donde el glucano modificado está enlazado por N al polipéptido de unión a través de un residuo de asparagina en la posición de aminoácido 114 del dominio CH1, según la numeración de Kabat.

10 12. Un método para elaborar el polipéptido de unión según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo el método hacer reaccionar un resto efector de Fórmula (I):



donde:

A) Q es NH u O;

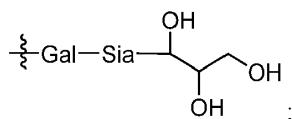
15 B) CON es un resto conector; y

C) X es un resto orientador que se une a una célula, donde el resto orientador es un resto de glucano GalNAc trivalente o un glucopéptido trigalactosilado,

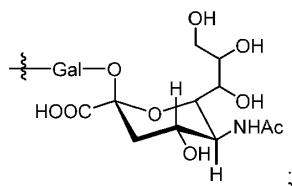
con un polipéptido de unión precursor que comprende un glucano oxidado.

20 13. El método según la reivindicación 12, donde se cumplen una o más de las siguientes condiciones:

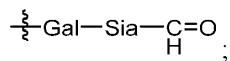
a) el polipéptido de unión inicial comprende al menos un resto de la siguiente fórmula estructural:



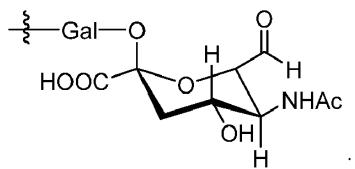
b) el polipéptido de unión inicial comprende al menos un resto de la siguiente fórmula estructural:



25 c) el polipéptido de unión precursor comprende un glucano oxidado comprende al menos un resto de la siguiente fórmula estructural:



d) el polipéptido de unión precursor comprende un glucano oxidado comprende al menos un resto de la siguiente fórmula estructural:



30

y

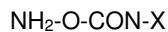
e) el polipéptido de unión precursor que comprende un glucano oxidado se genera al hacer reaccionar un polipéptido de unión inicial que comprende un glucano con un agente suavemente oxidante,

opcionalmente donde el agente suavemente oxidante es peryodato sódico,

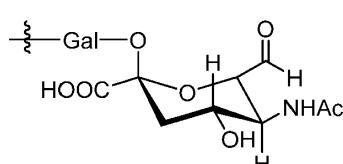
donde se emplea menos de 1 mM de peryodato sódico, o

5 donde el agente suavemente oxidante es peryodato o galactosa oxidasa.

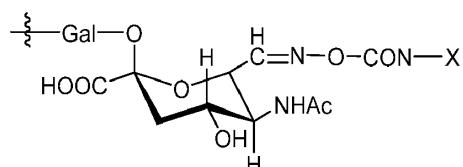
14. El método según la reivindicación 12, que comprende hacer reaccionar un resto efector de la siguiente fórmula estructural:



10 con el polipéptido de unión precursor que comprende un glucano oxidado que comprende al menos un resto de la siguiente fórmula estructural:



15 para formar un polipéptido de unión de la siguiente fórmula estructural:



20 15. El método según la reivindicación 13, donde la etapa de reacción se efectúa en presencia de una sal que comprende un ion metálico, opcionalmente donde

el ion metálico es un ion cobre,

la sal es acetato de cobre, o

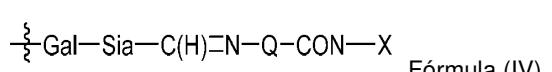
la sal comprende un ion metálico presente en una concentración de al menos 0,1 mM.

25 16. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 12-15, donde el polipéptido de unión que comprende el glucano comprende uno o dos residuos de ácido siálico terminales, opcionalmente donde el uno o dos residuos de ácido siálico terminales se introducen mediante el tratamiento del polipéptido de unión con una sialiltransferasa o una combinación de sialiltransferasa y galactosiltransferasa.

30 17. Una composición que comprende un polipéptido de unión según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, opcionalmente donde la relación de resto orientador a polipéptido de unión es al menos aproximadamente 2 o igual a o mayor de aproximadamente 4.

18. Una composición según la reivindicación 17, para el uso como un medicamento.

35 19. Un polipéptido de unión que comprende al menos un glucano modificado que comprende al menos un resto de Fórmula (IV):



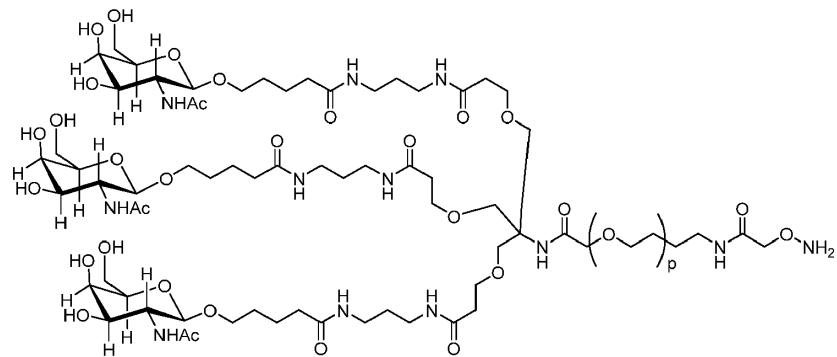
40 donde:

A) Q es NH u O;

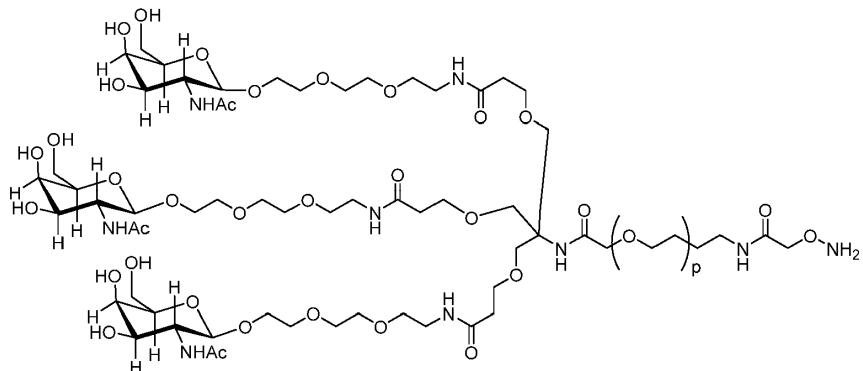
- B) CON es un resto conector;
- C) X es un resto orientador que se une a una célula, donde el resto orientador comprende un resto de glucano GalNAc trivalente o un glucopéptido trigalactosilado y comprende además PEG;
- D) Gal es un resto de galactosa; y
- 5 E) Sia es un resto de ácido siálico.

20. El polipéptido de unión según la reivindicación 19, donde se cumplen una o más de las siguientes condiciones:

- a) el glucano comprende al menos un resto representado por la Fórmula IX o la Fórmula XI:



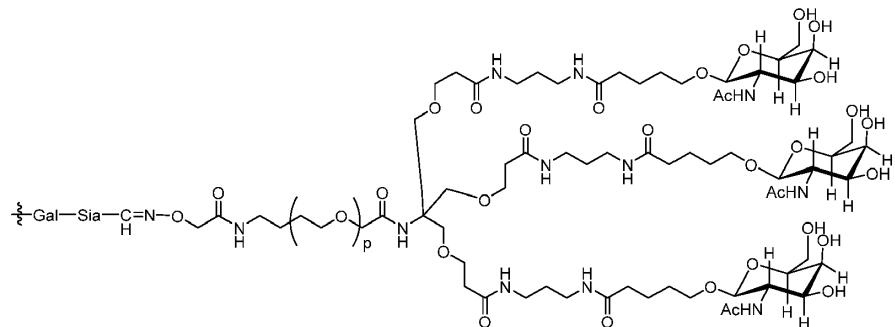
[Fórmula IX], donde p tiene un valor de 1 a 32; o



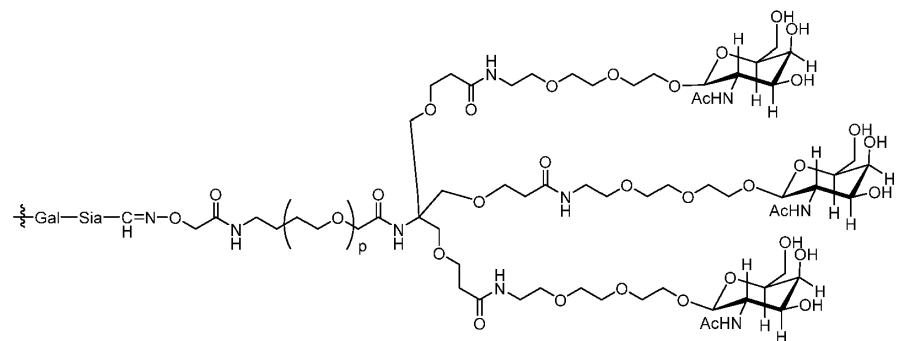
10

[Fórmula XI], donde p tiene un valor de 1 a 32;

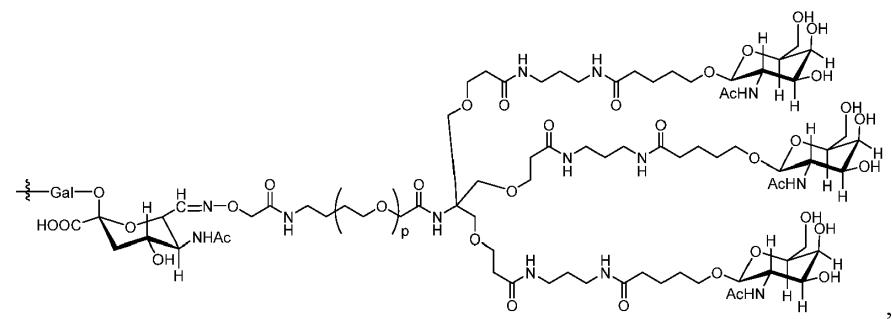
- b) el glucano comprende al menos un resto seleccionado de las siguientes fórmulas estructurales:



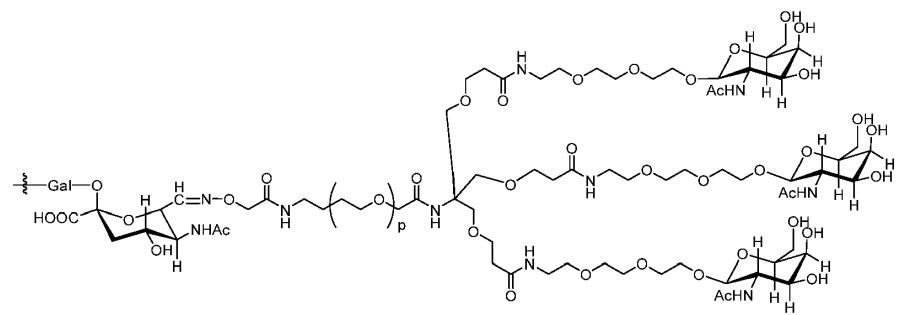
donde p tiene un valor de 1 a 32;



donde p tiene un valor de 1 a 32;



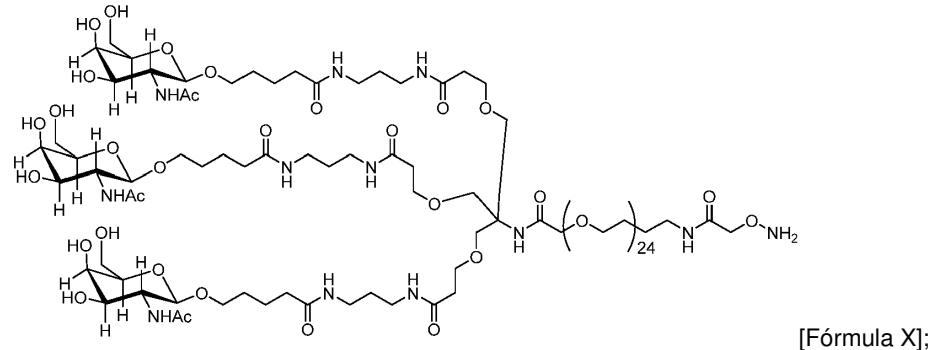
donde p tiene un valor de 1 a 32; o



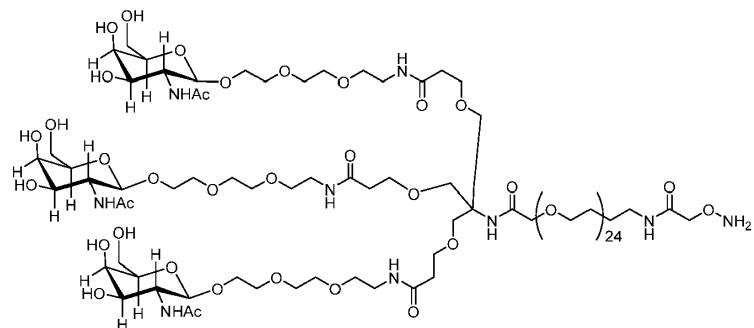
5

donde p tiene un valor de 1 a 32;

c) el resto orientador comprende PEG y está representado por la Fórmula X o la Fórmula XII:

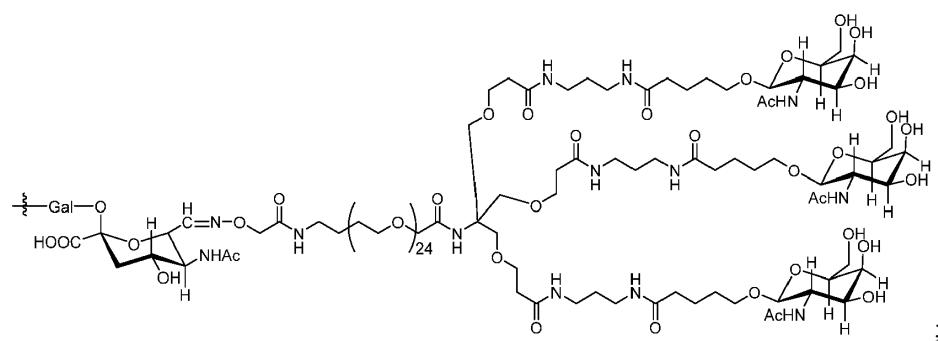
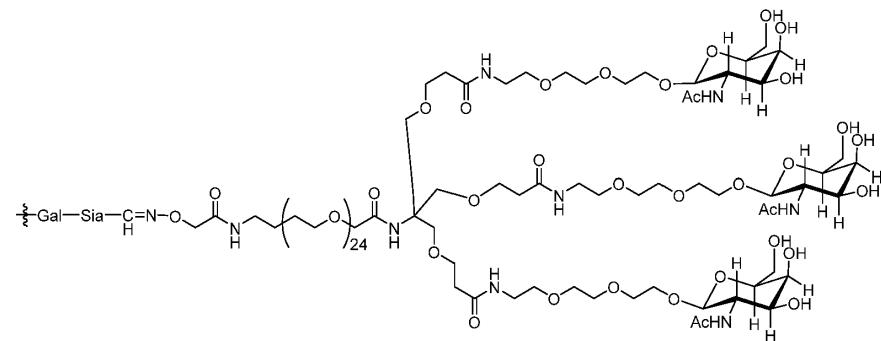
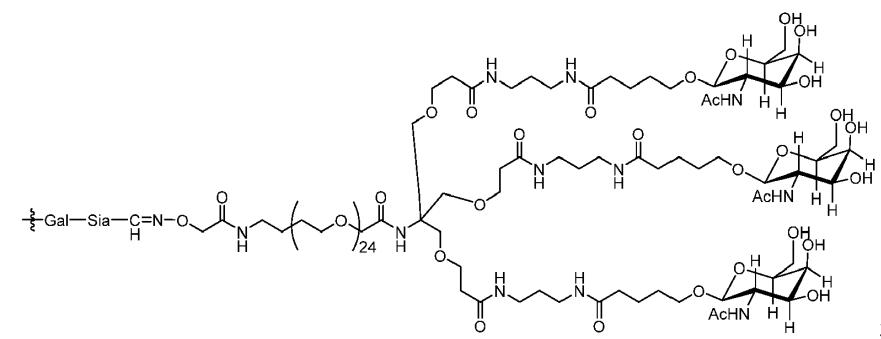


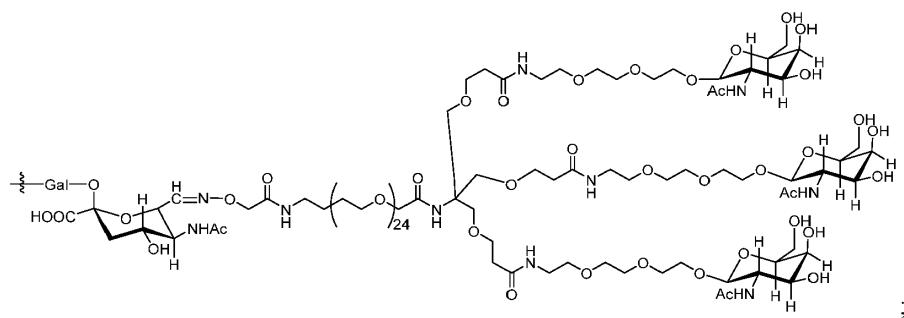
o



[Fórmula XIII];

d) el glucano comprende al menos un resto seleccionado de las siguientes fórmulas estructurales:





- e) el PEG comprende mono-PEG, bi-PEG o tri-PEG, donde el PEG comprende opcionalmente de 3 a 3,5 PEG; y
- f) el polipéptido de unión es un anticuerpo o una inmunoadhesina.

5 21. Un método para elaborar un polipéptido de unión PEGilado según la reivindicación 19 o 20, donde el método comprende:

(a) hacer reaccionar un polipéptido de unión que comprende al menos un glucano con un agente suavemente oxidante en presencia de una sal que comprende un ion metálico para generar un polipéptido de unión oxidado que comprende al menos un glucano oxidado, y

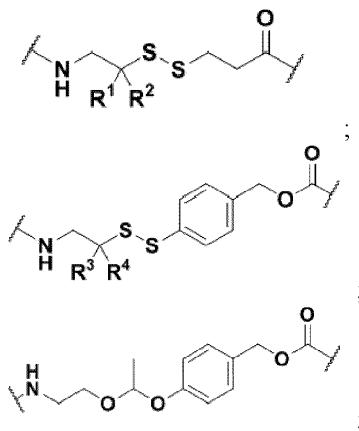
10 (b) conjugar el polipéptido de unión oxidado con al menos un resto que comprende PEG, generando de ese modo el polipéptido de unión PEGilado.

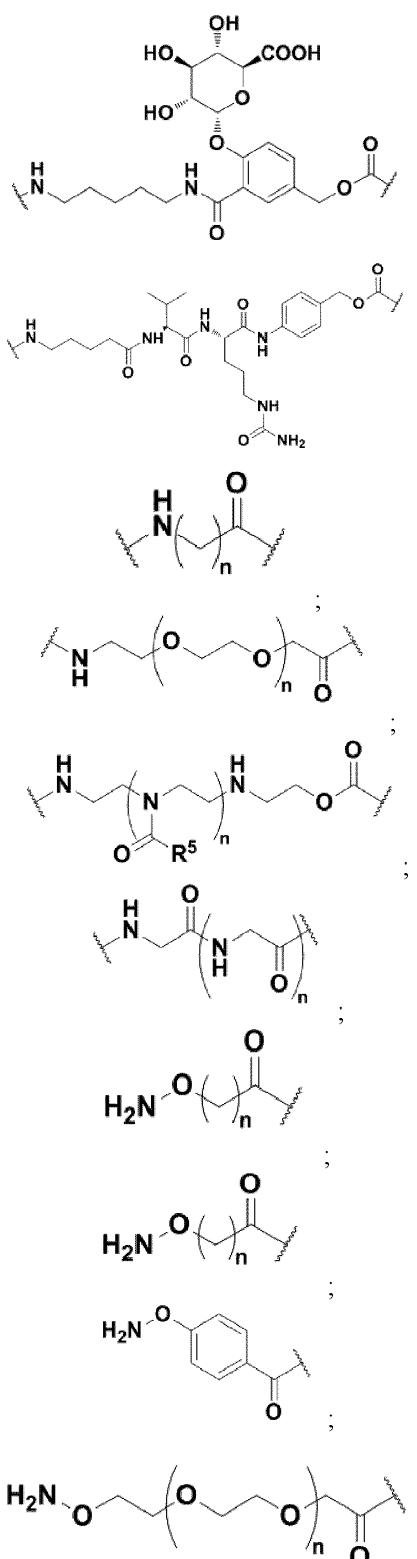
22. El método según la reivindicación 21, donde se cumplen una o más de las siguientes condiciones:

- a) el ion metálico es un ion cobre;
- b) la sal es acetato de cobre;
- 15 c) la sal que comprende un ion metálico está presente en una concentración de al menos 0,1 mM;
- d) el agente suavemente oxidante es peryodato oxidasa o galactosa oxidasa; y
- e) el al menos un glucano es un glucano modificado.

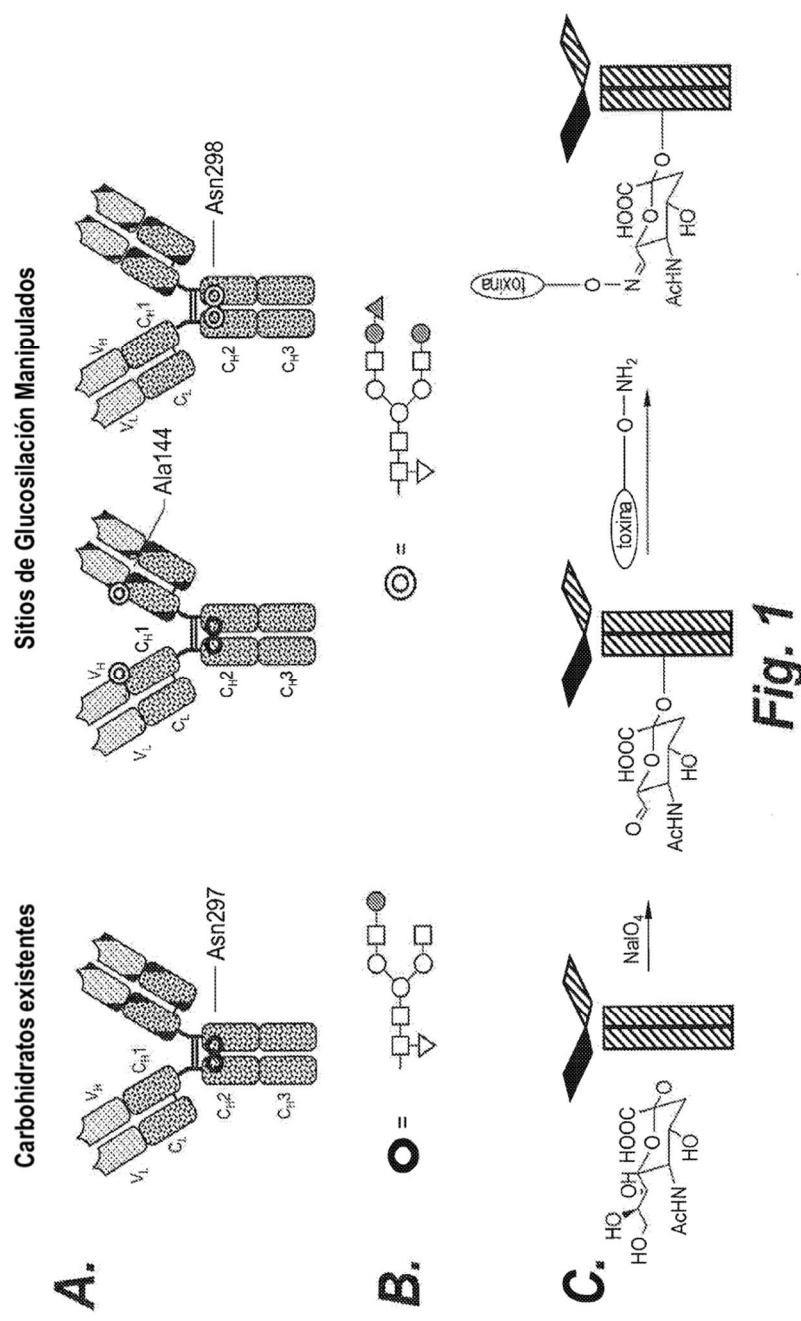
23. El polipéptido de unión según la reivindicación 1 o 19, donde el resto conector comprende un resto enlazador seleccionado del grupo que consiste en:

20





donde R^1-R^5 se seleccionan cada uno independientemente de un grupo que consiste en: H, un resto alquilo o un resto arilo.



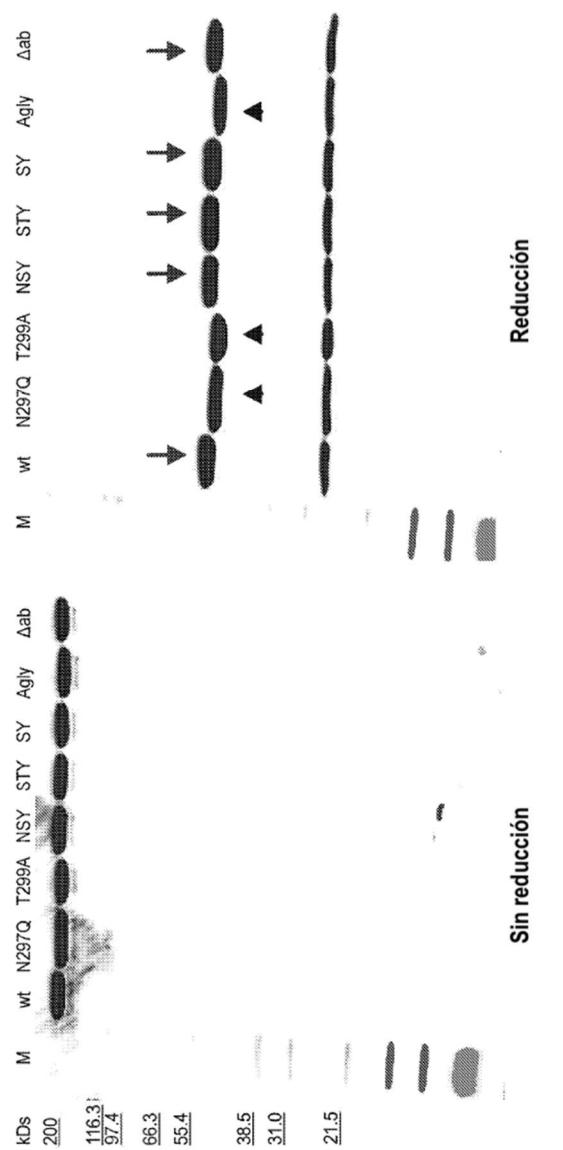
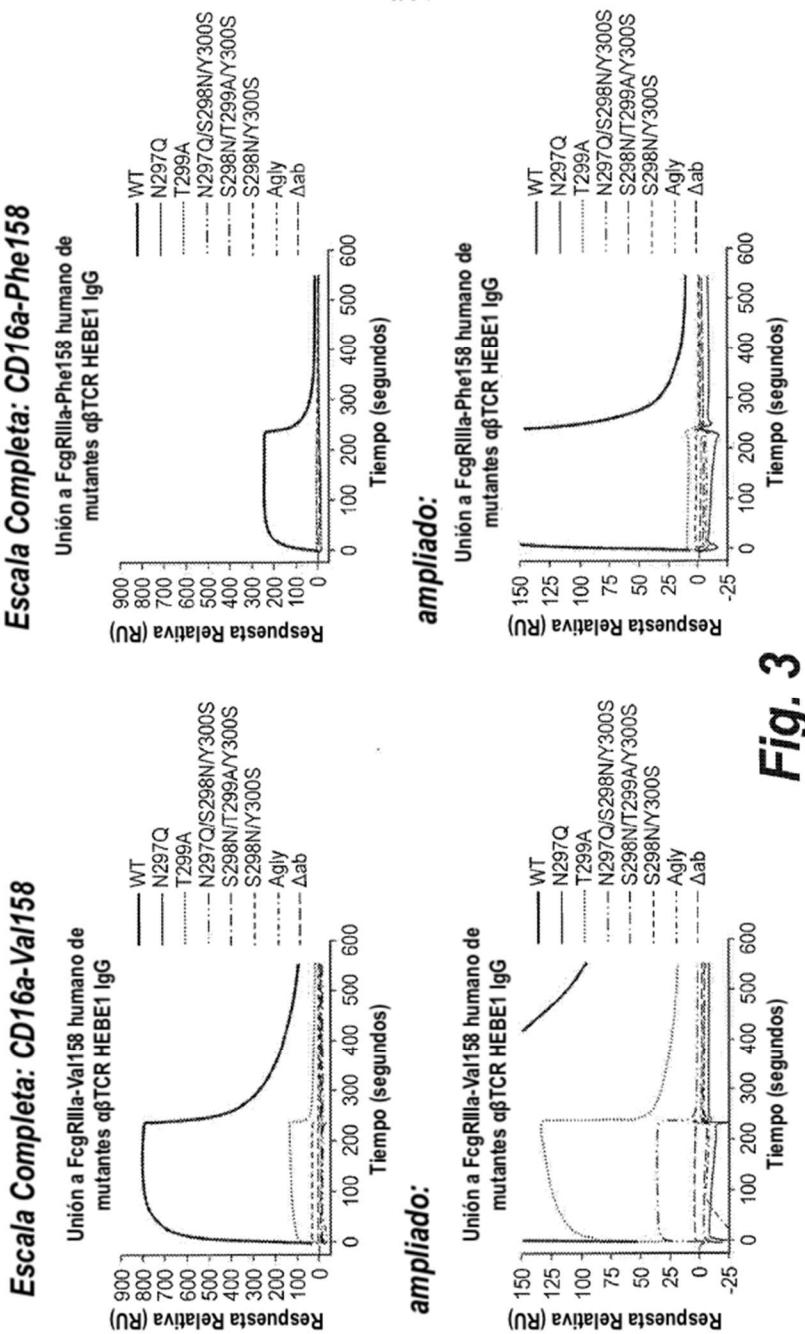
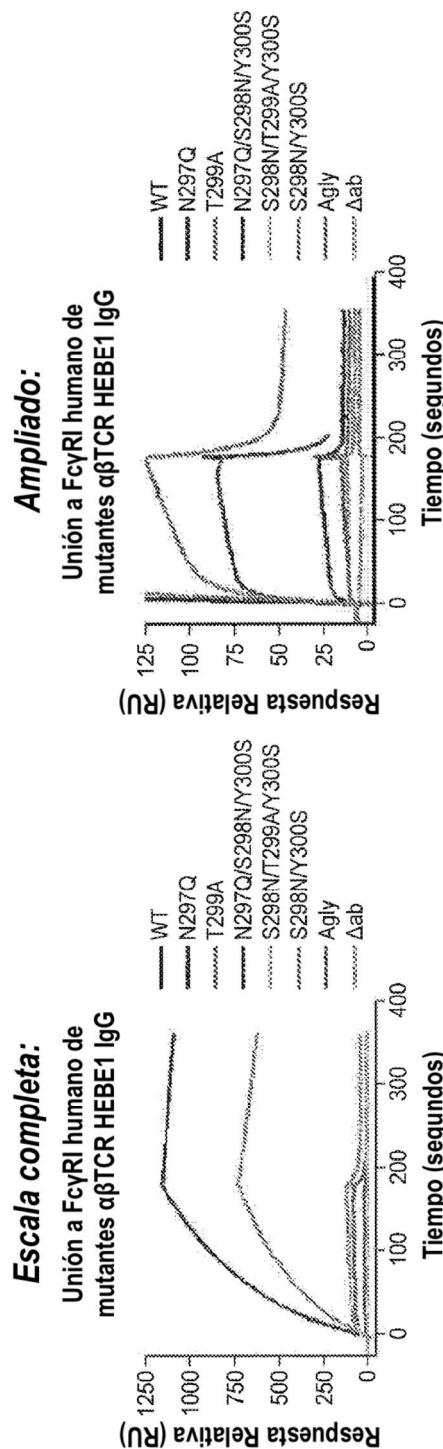


Fig. 2

**Fig. 3**



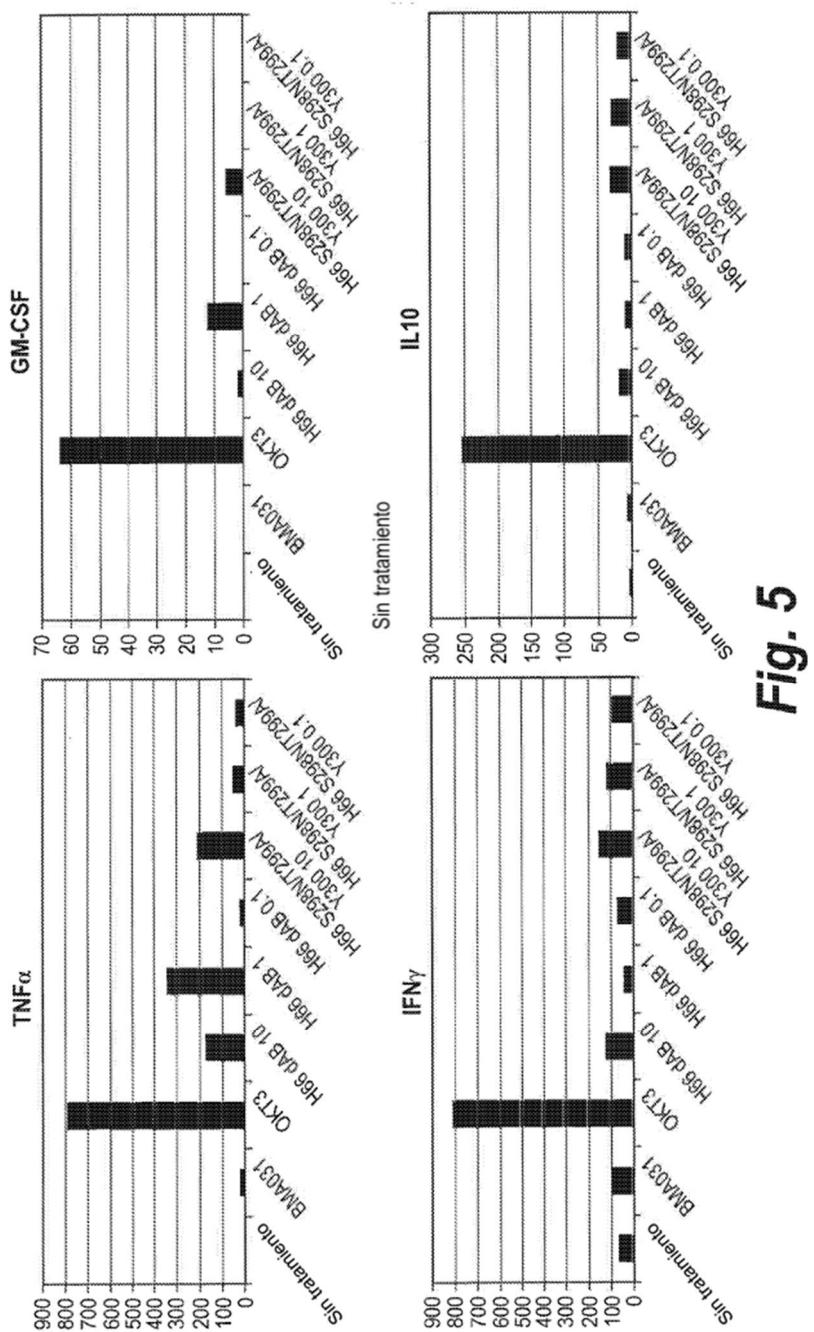
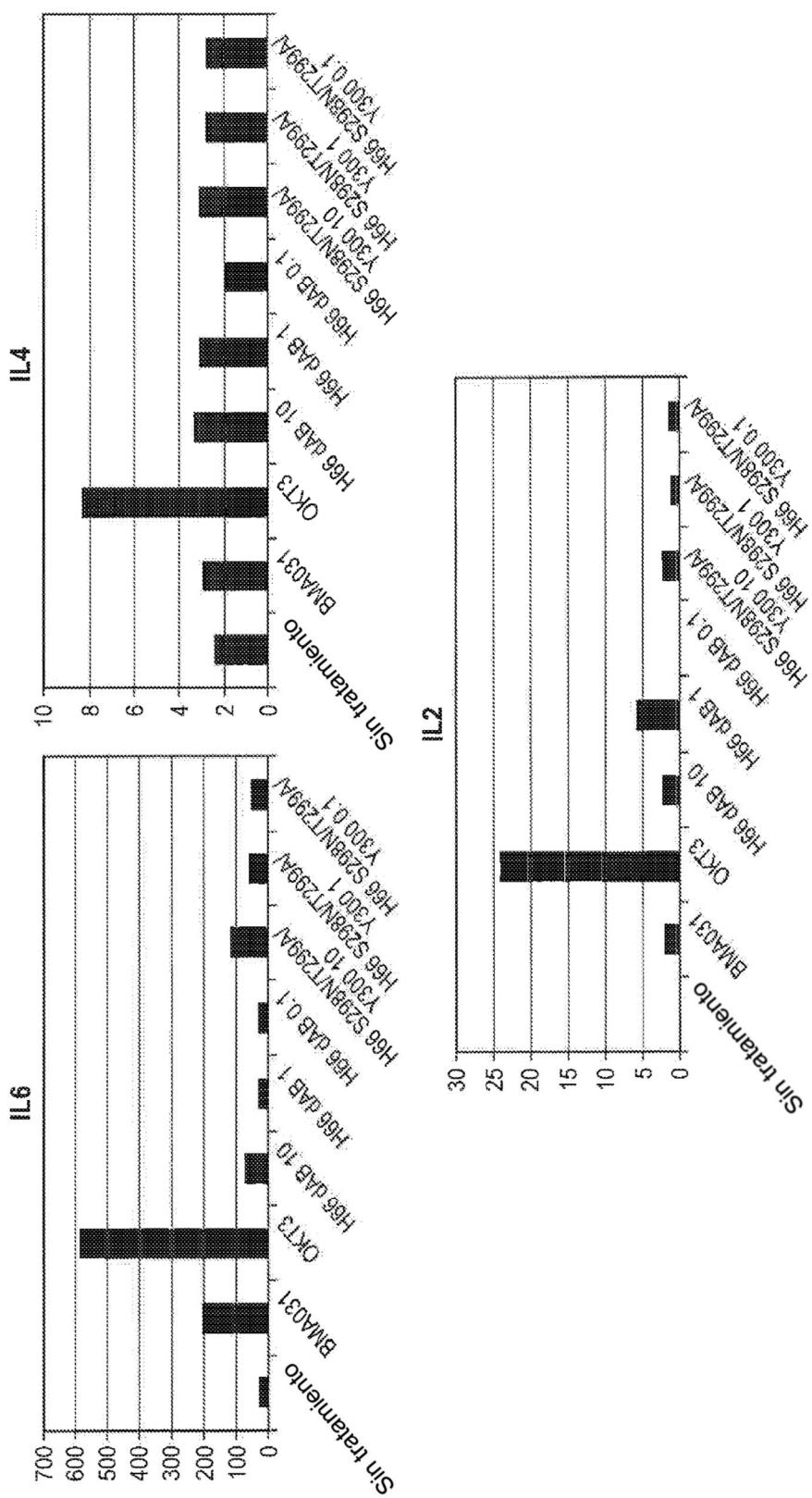


Fig. 6



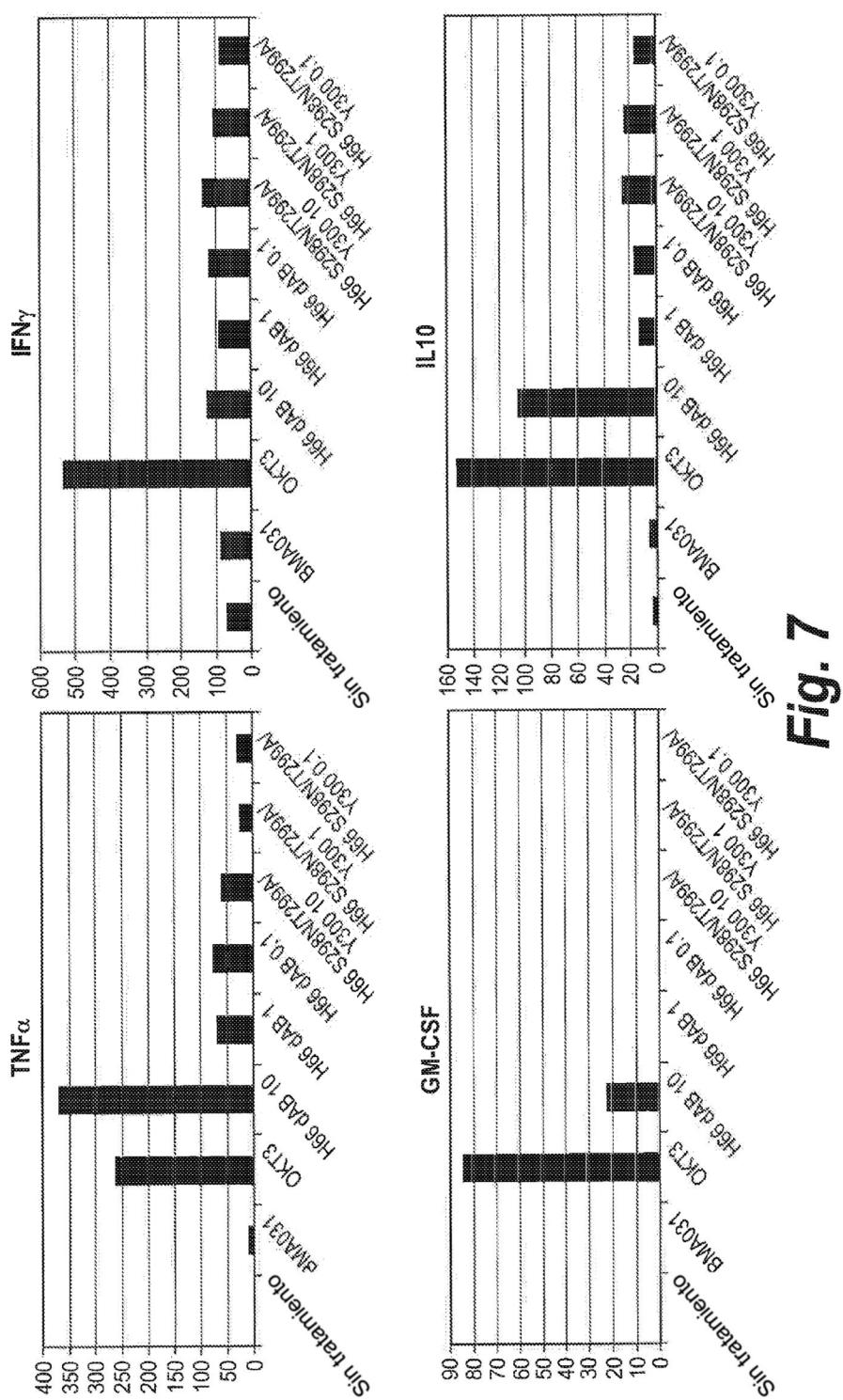
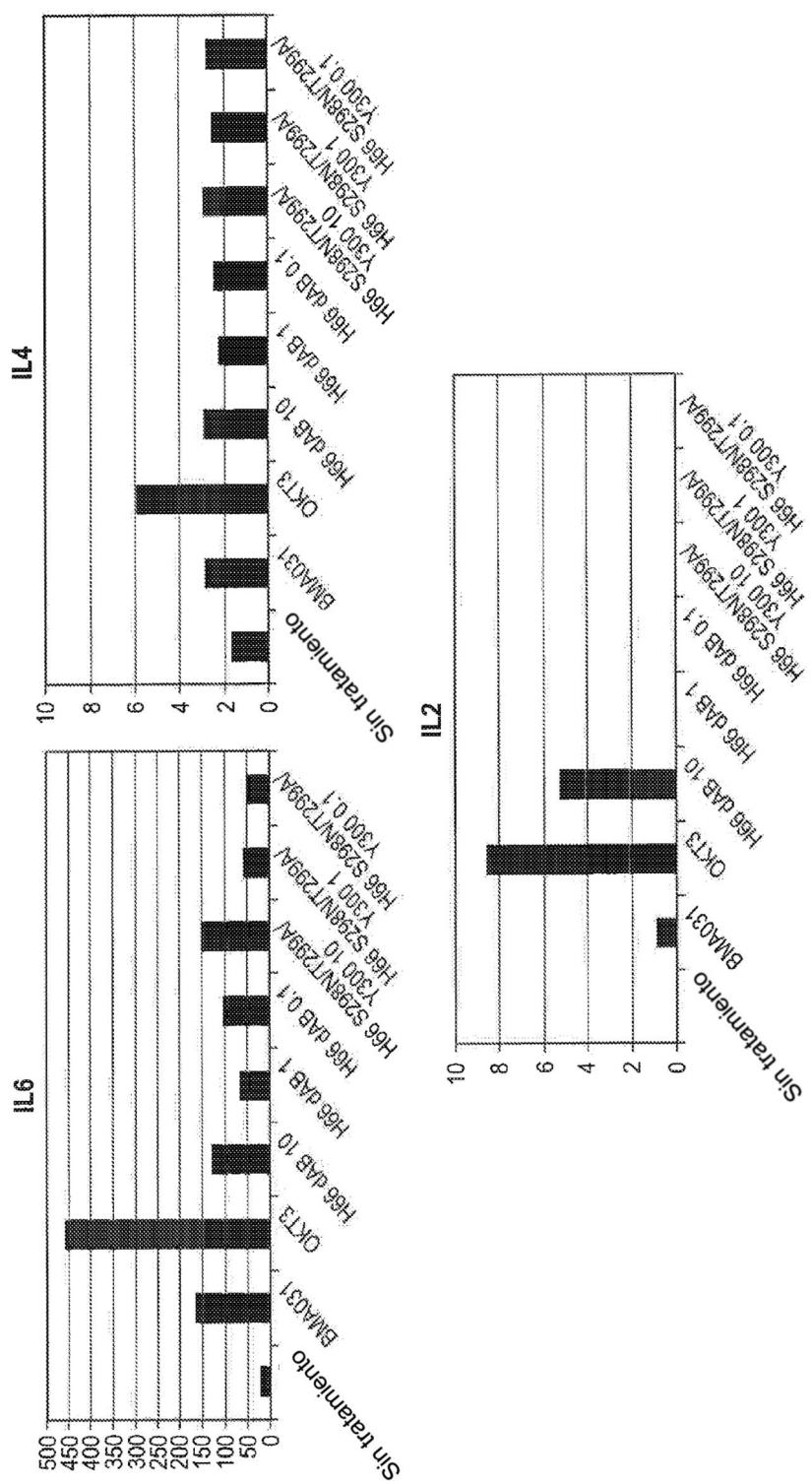
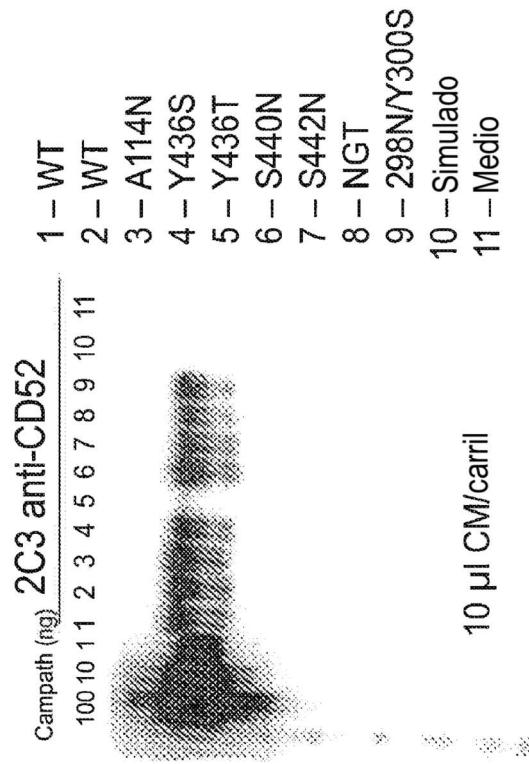


Fig. 7

Fig. 8



A. Transferencia Western**B.** Biacore

Desconocido	Conc (µg/ml)	Respuesta Relativa (RU)	Conc Calc (M)	Conc Calc (µg/ml)
2C3 en medio	3.00	855.75	2.45E-08	3.669
2C3 en medio	3.00	860.96	2.47E-08	3.710
2C3 en medio	3.00	866.89	2.51E-08	3.758
A114N		146.5	1.60E-09	0.240
Simulado		87.84	8.62E-10	0.129
NGT		124.52	1.30E-09	0.196
S298NY300S		112.14	1.15E-09	0.172
S440N		146.36	1.60E-09	0.240
S442N		121.21	1.26E-09	0.189
WT (Katy)		148.41	1.63E-09	0.244
WT (Tim)		148.08	1.62E-09	0.244
Y436S		158.72	1.78E-09	0.267
Y436T		84.27	8.23E-10	0.123
Medio incubado		87.38	8.57E-10	0.129

Fig. 9

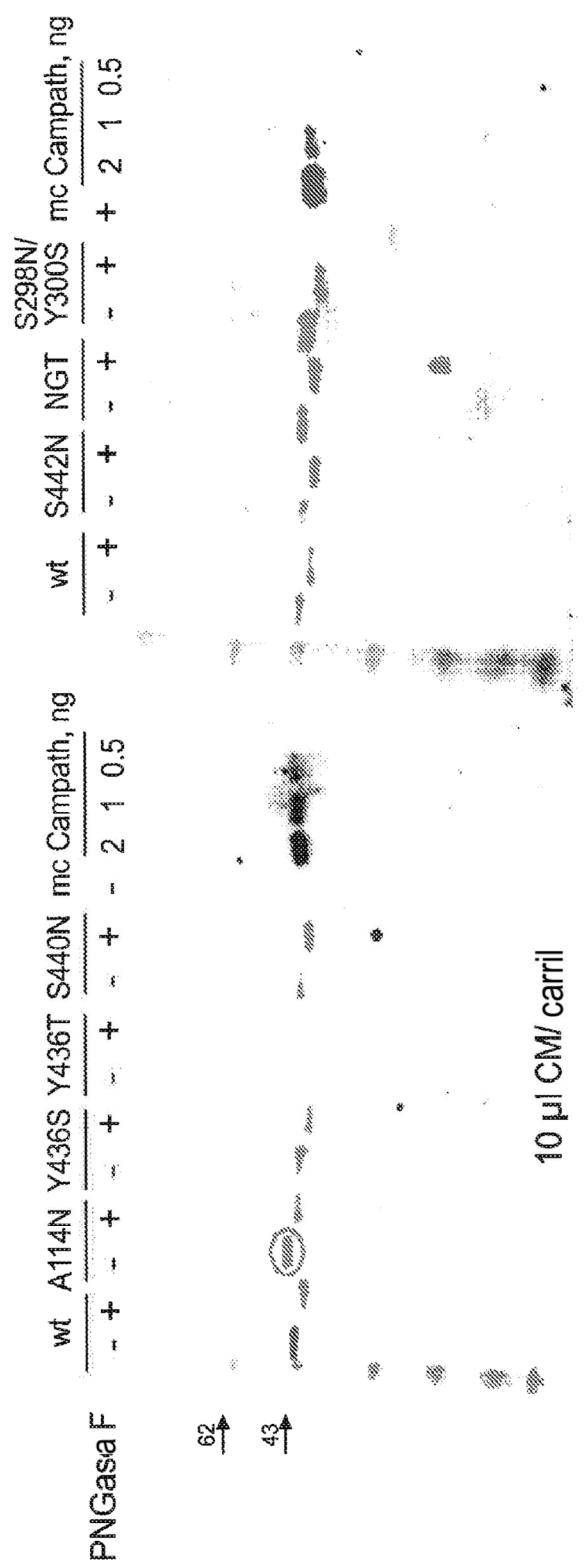


Fig. 10

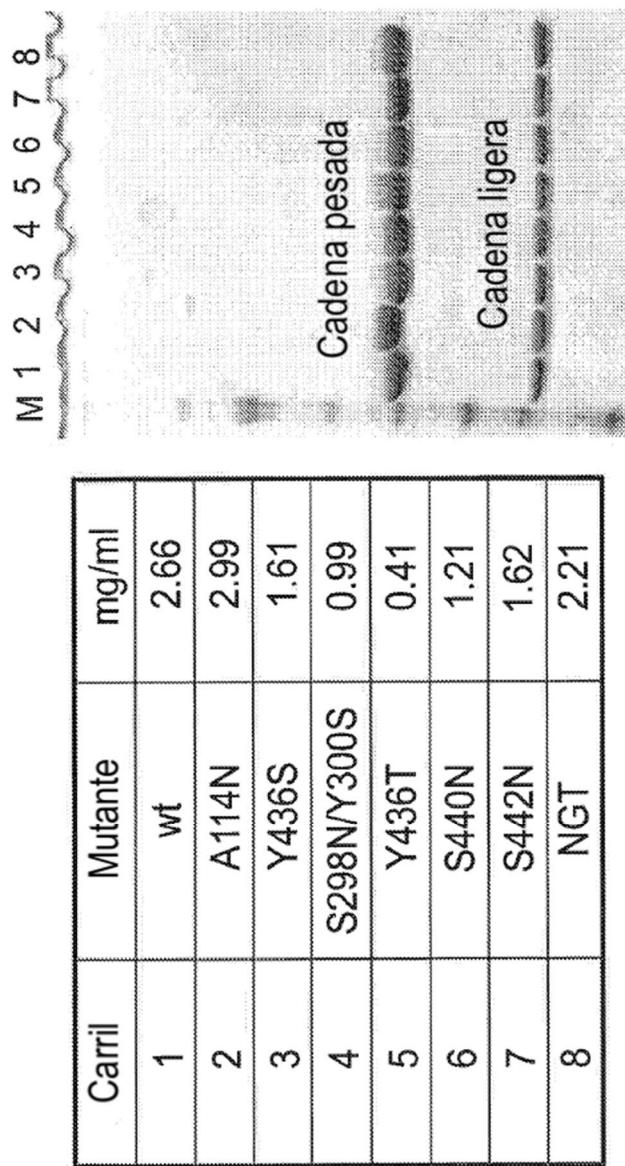
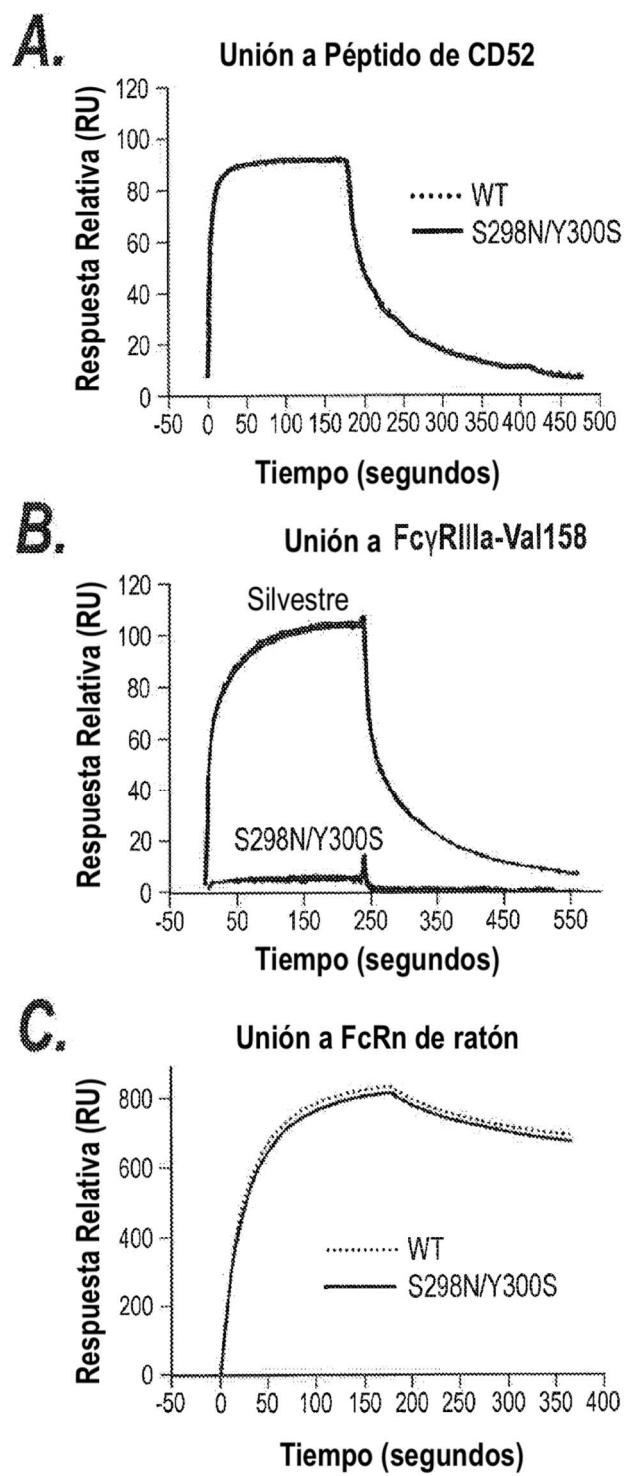


Fig. 11

**Fig. 12**

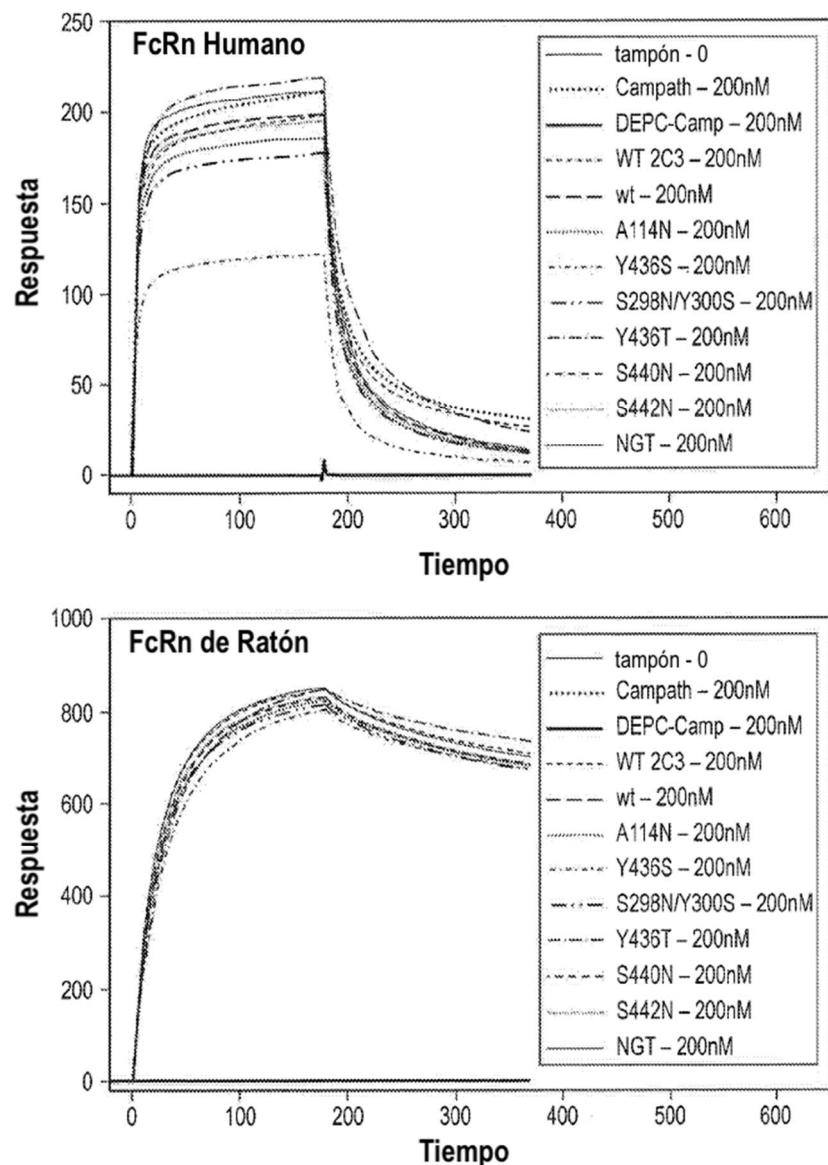
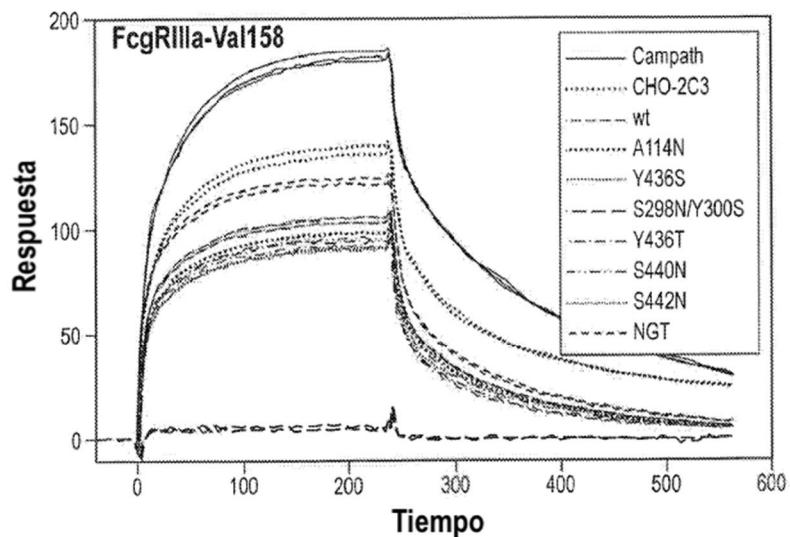


Fig. 13

A.



B.

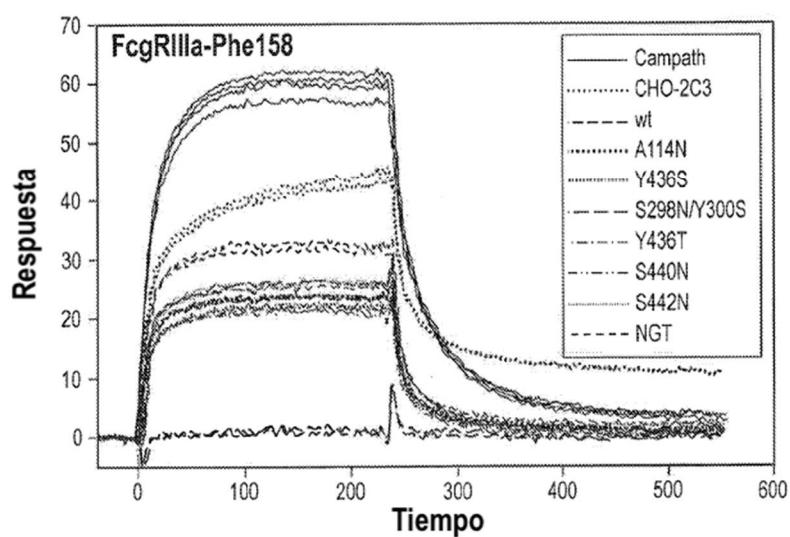
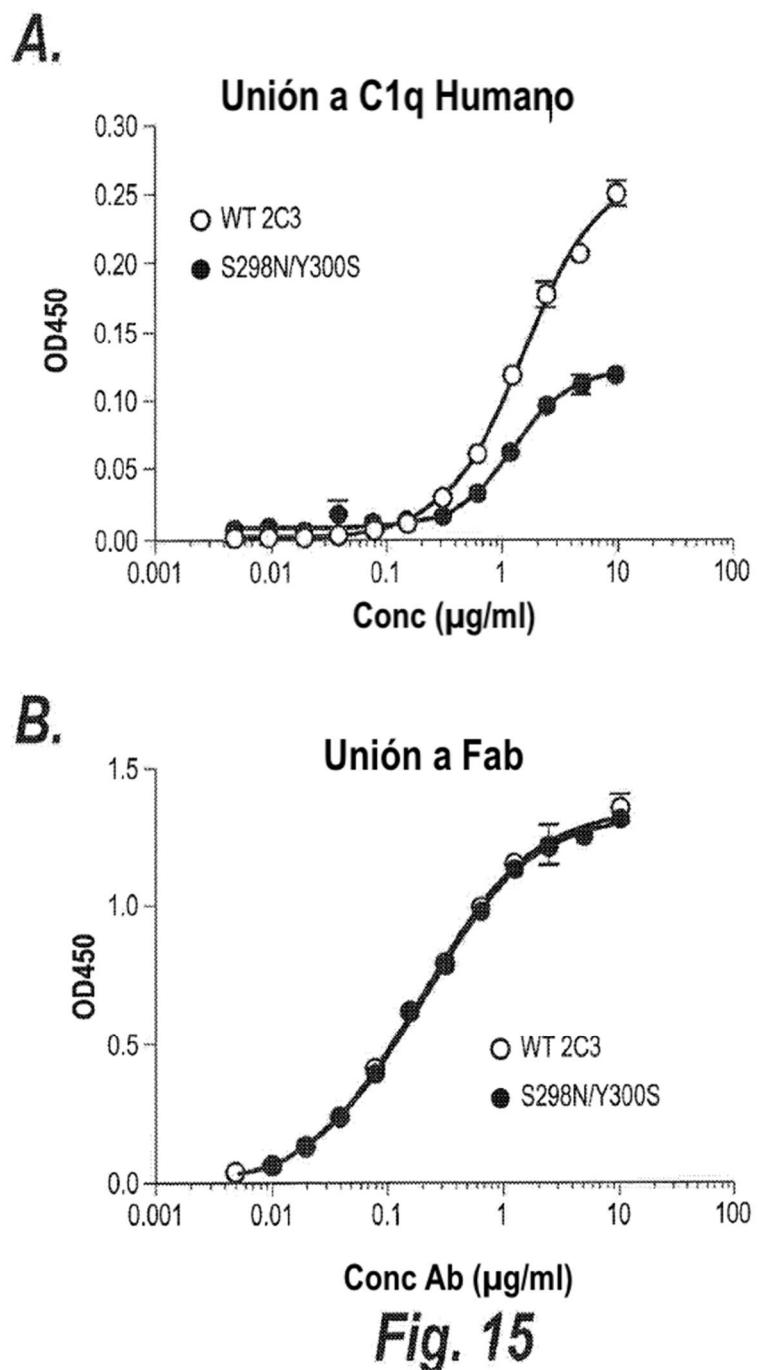


Fig. 14



Muestra	k_a ($\times 10^6$ /Ms)	k_d ($\times 10^{-2}$ /s)	R_{max} (RU)	K_D (nM)
GLD52	7.0	1.7	67.0	2.44
WT 2C3	6.0	1.1	64.2	1.75
A114N	4.7	1.1	59.5	2.45
Y436S	5.9	1.0	66.9	1.73
S298N/Y300S	5.7	1.0	63.3	1.80
Y436T	4.8	0.9	65.7	1.95
S440N	5.8	1.1	66.8	1.84
S442N	5.7	1.1	66.2	1.85
NGT	7.9	1.1	70.2	1.35

Fig. 16

ES 2 940 903 T3

Muestra	Kon ($\times 10^6 M^{-1}s^{-1}$)	Koff ($\times 10^{-2}s^{-1}$)	KD (nM)
WT 2C3	5.2	1.1	2.1
A114N	5.3	1.3	2.4

Fig. 17

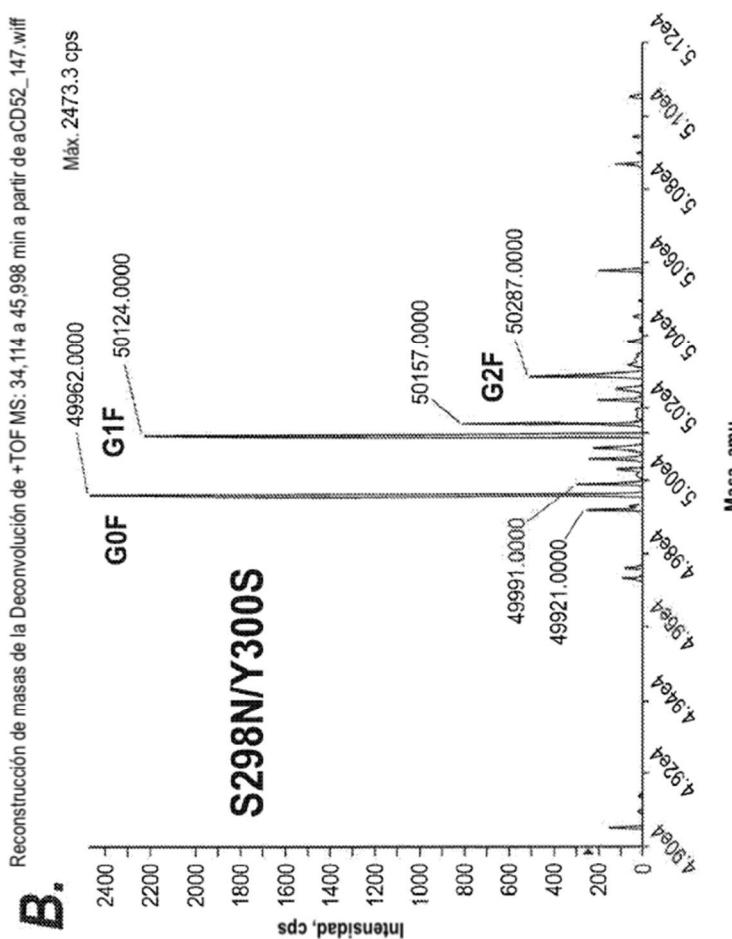
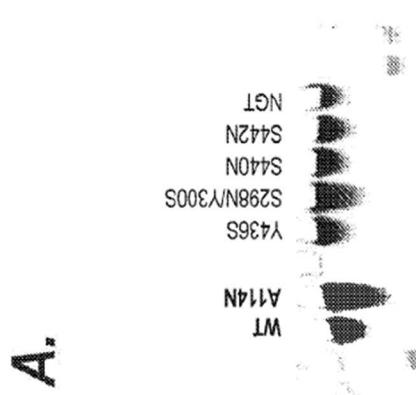
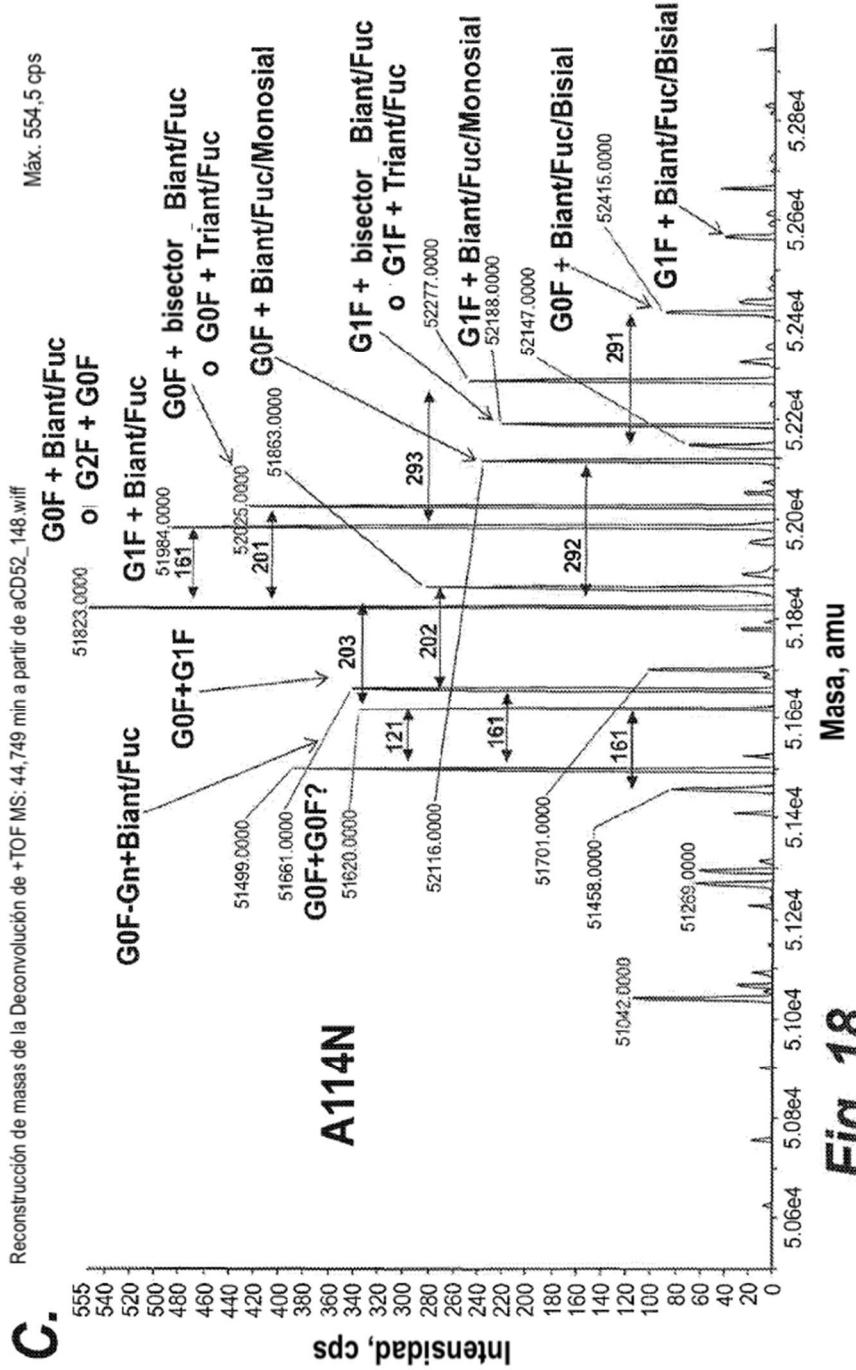


Fig. 18



**Fig. 18**

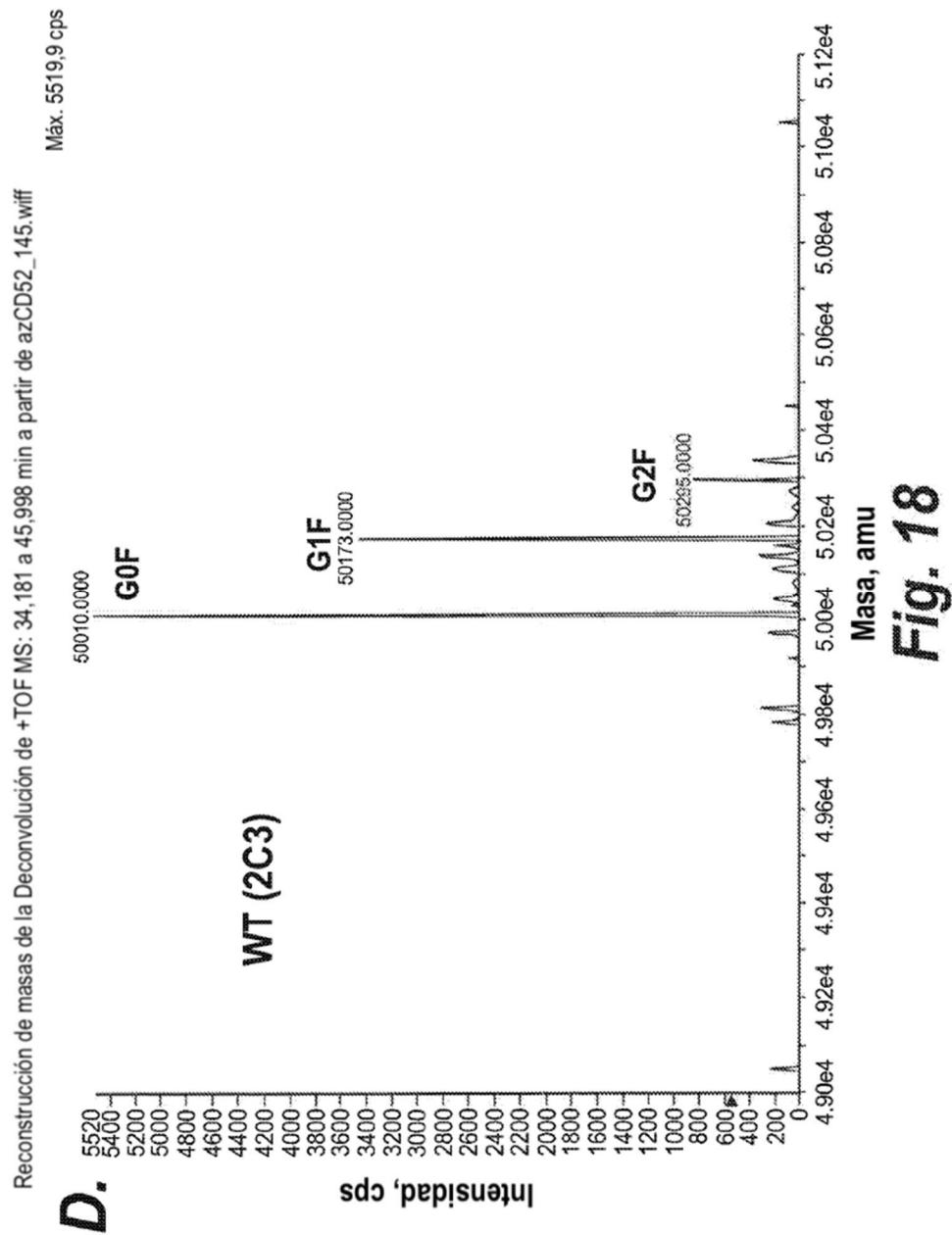
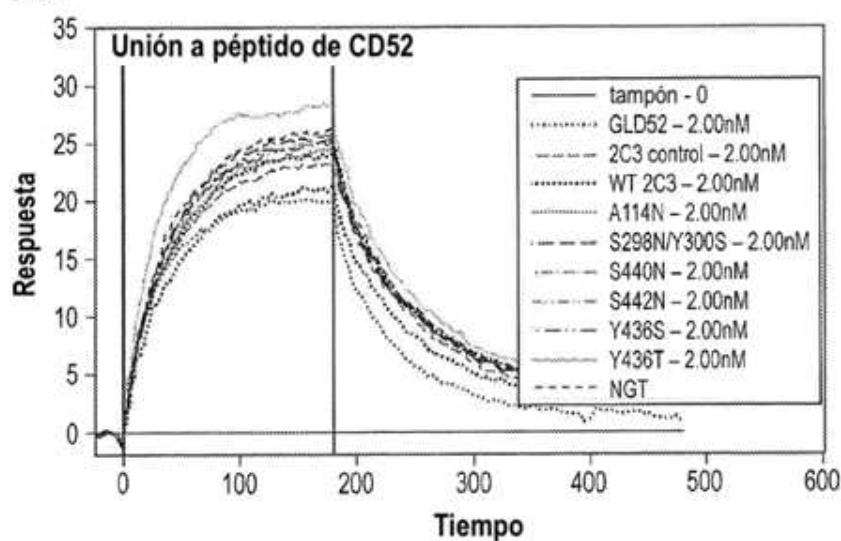


Fig. 18

A.

Muestra	lote n°	Conc Octet (μ g/ml)
Medio simulado	11/23/2009	demasiado bajo
wt 2C3	11/23/2009	2.54
A114N	11/23/2009	2.83
S298N/Y300S	11/23/2009	1.36
S440N	11/23/2009	1.32
S442N	11/23/2009	1.21
Y436S	11/23/2009	1.92
Y436T	11/23/2009	0.34
NGT	11/23/2009	1.90

B.**Fig. 19**

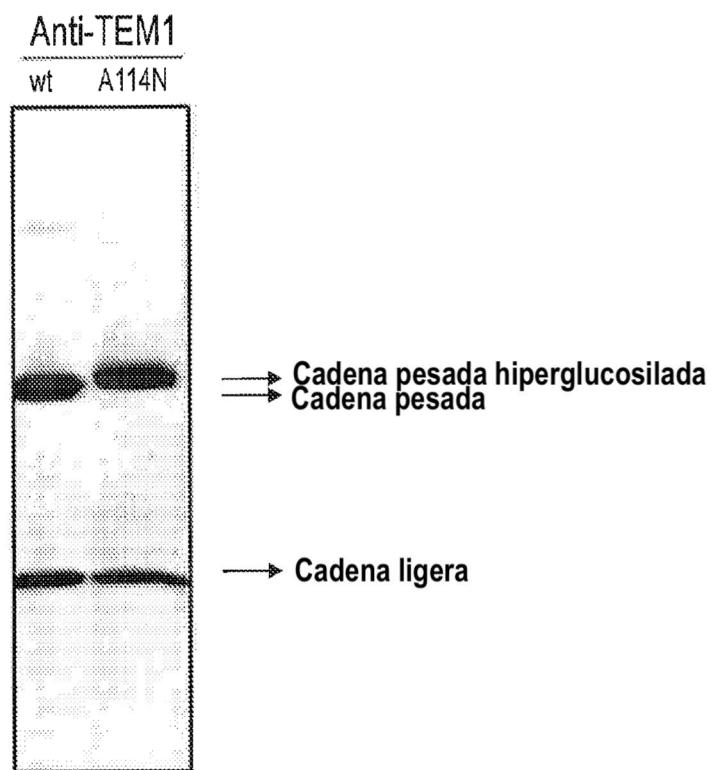


Fig. 20

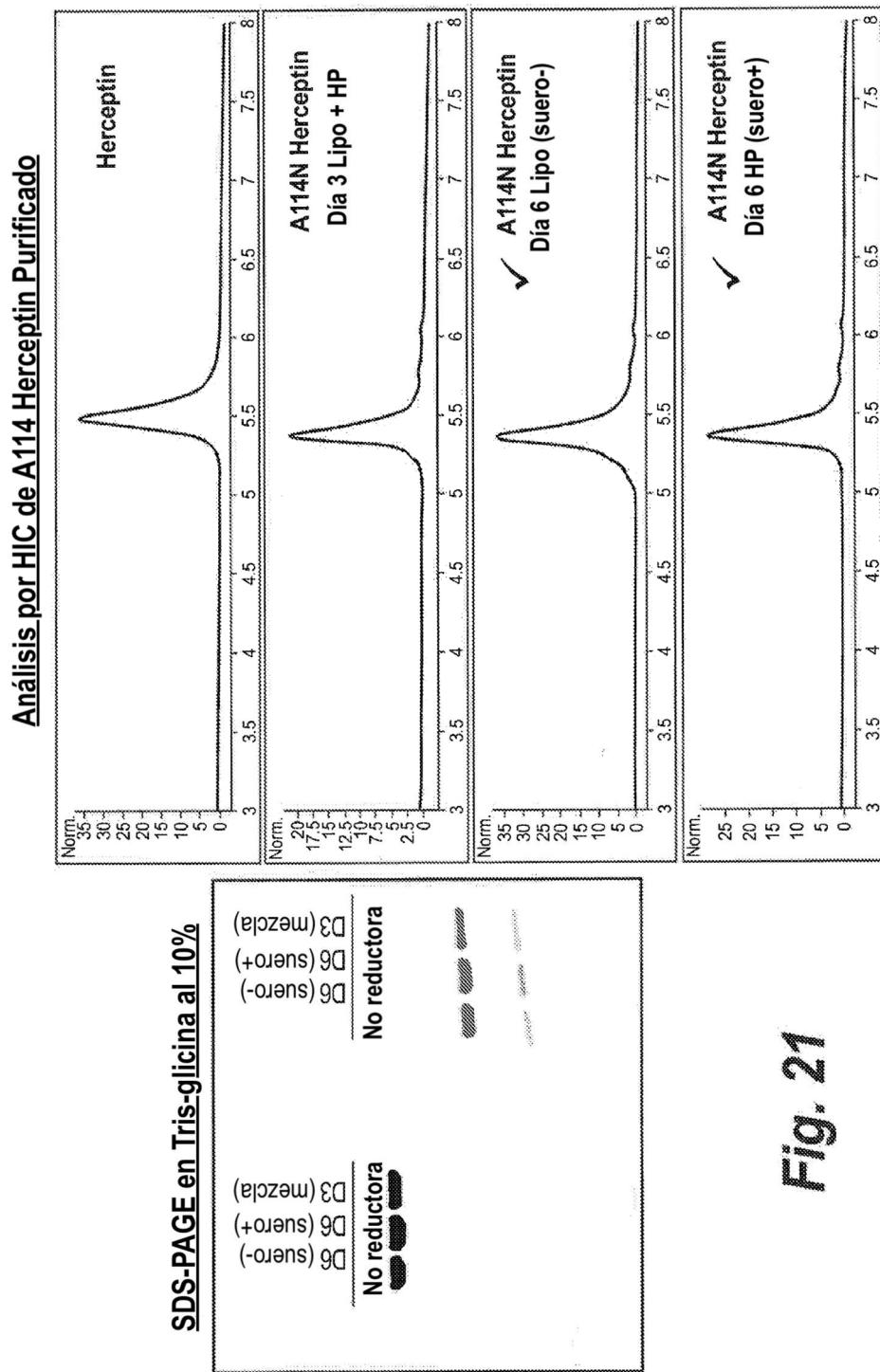


Fig. 21

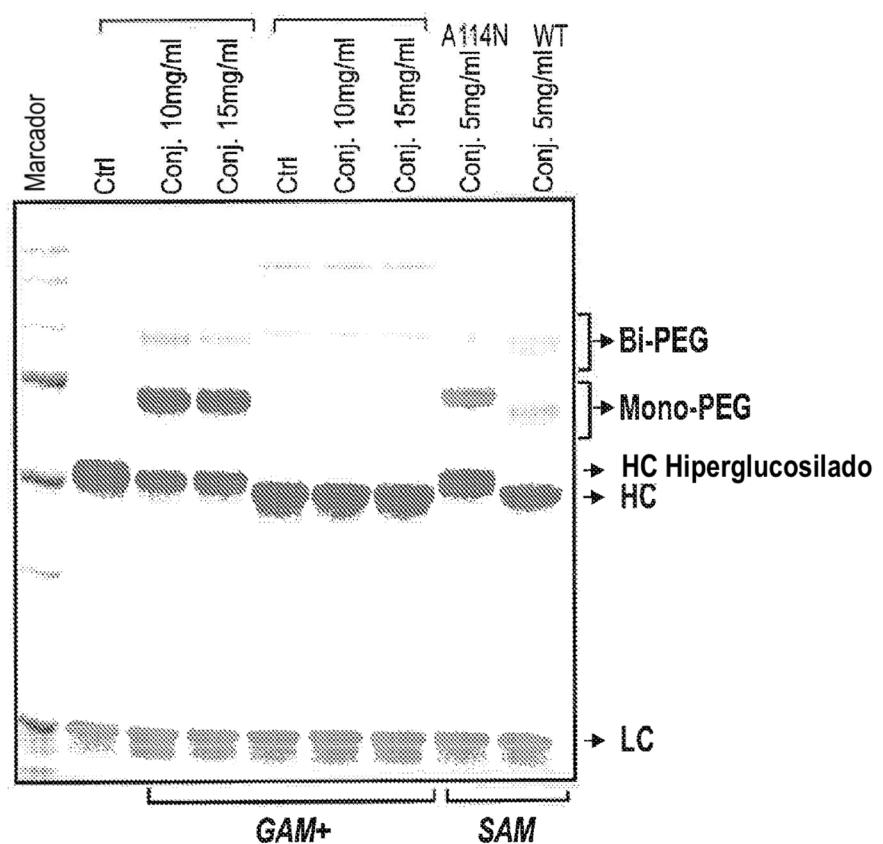


Fig. 22

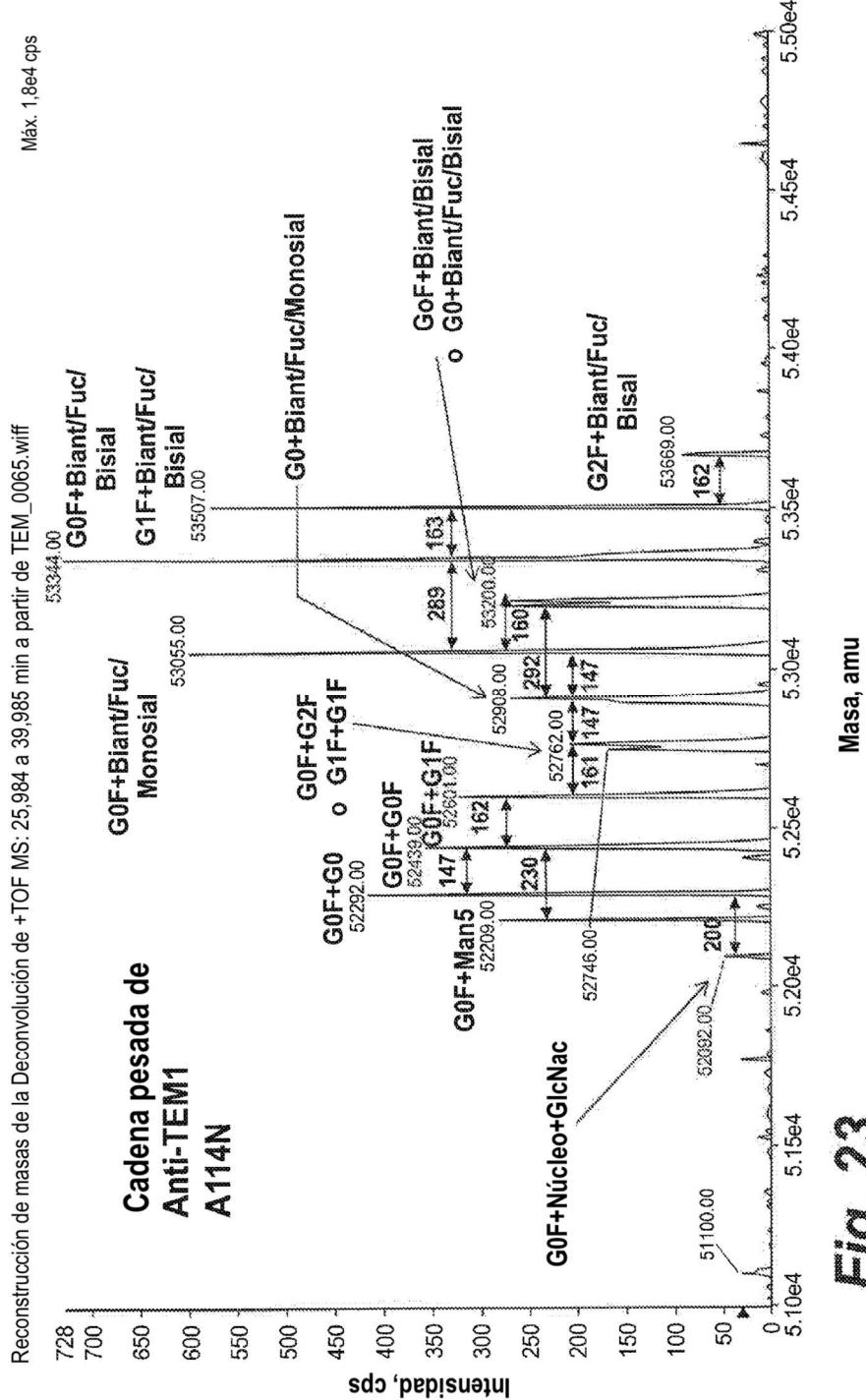
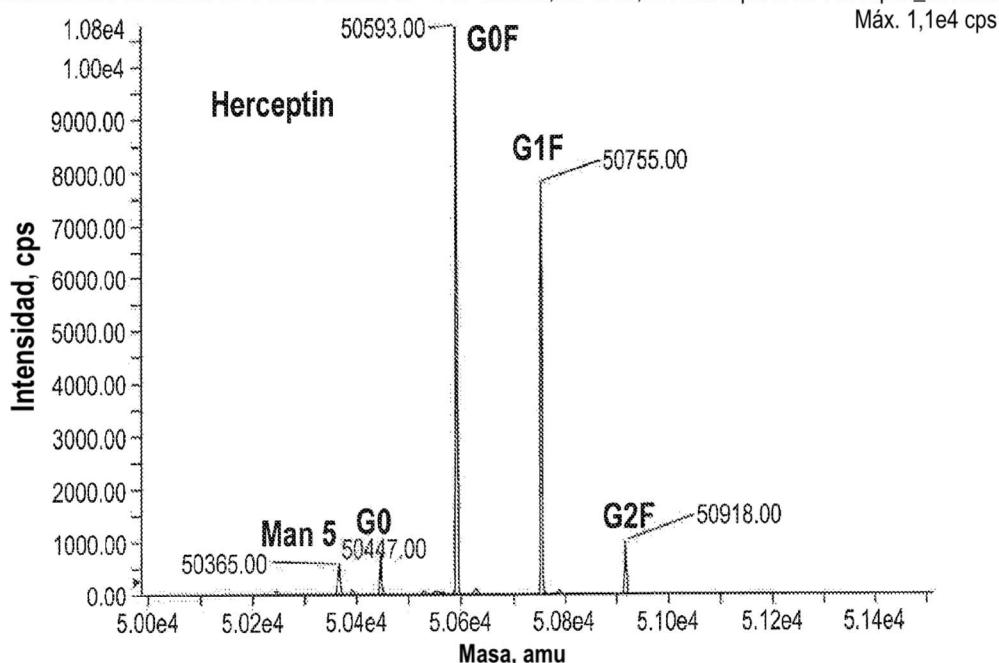


Fig. 23

Reconstrucción de masas de Deconvolución de +TOF MS: 26,217 a 37,001 min a partir de Herceptin_001.wiff



Reconstrucción de masas de Deconvolución de +TOF MS: 26,401 a 37,051 min a partir de Herceptin_002.wiff

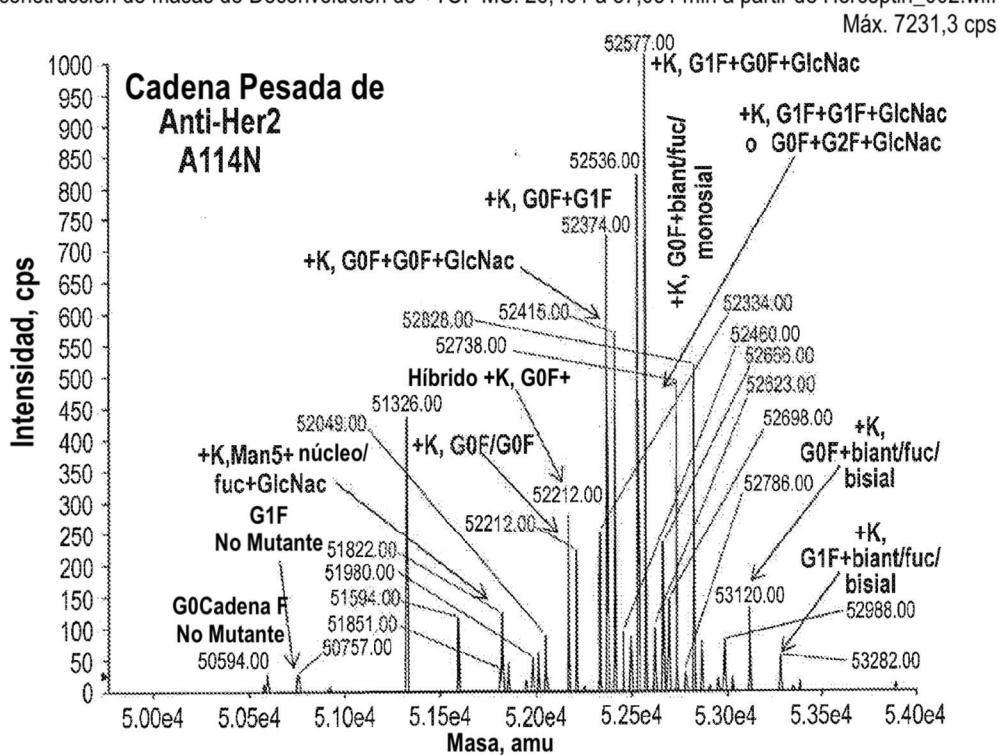


Fig. 24

A.

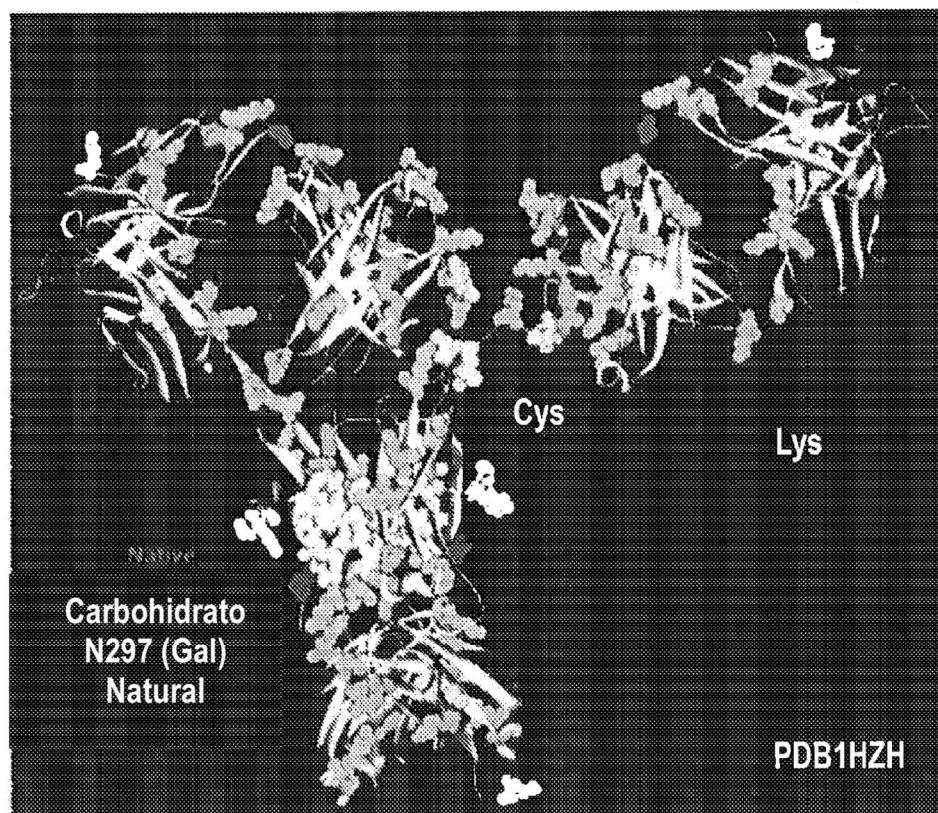
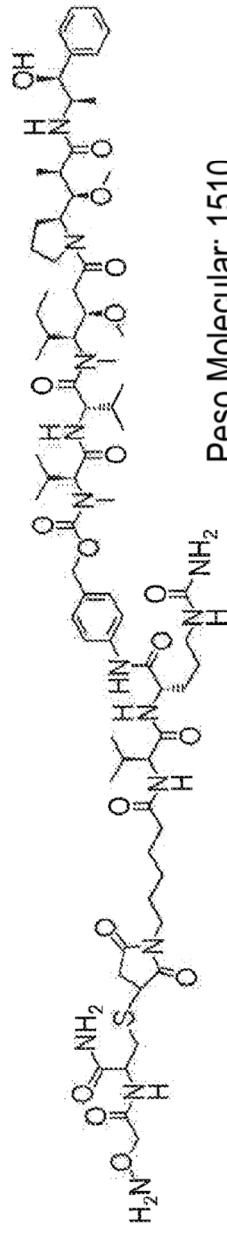


Fig. 25

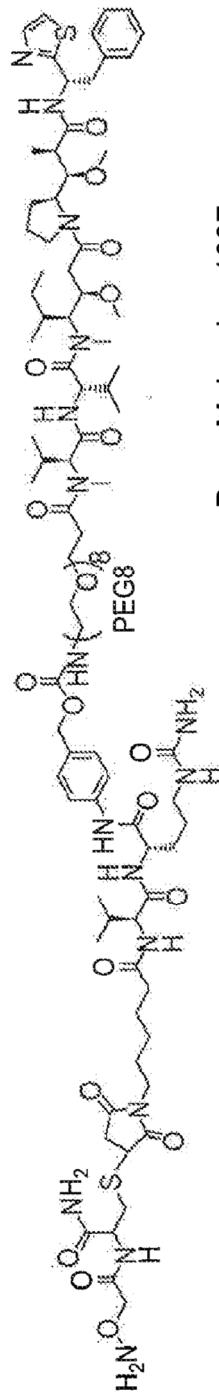
6

Aminooxi-Cys-MC-VC-PABC-MMAE



Peso Molecular: 1510

Aminooxi-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Dol10



Peso Molecular: 1987

Fig. 25

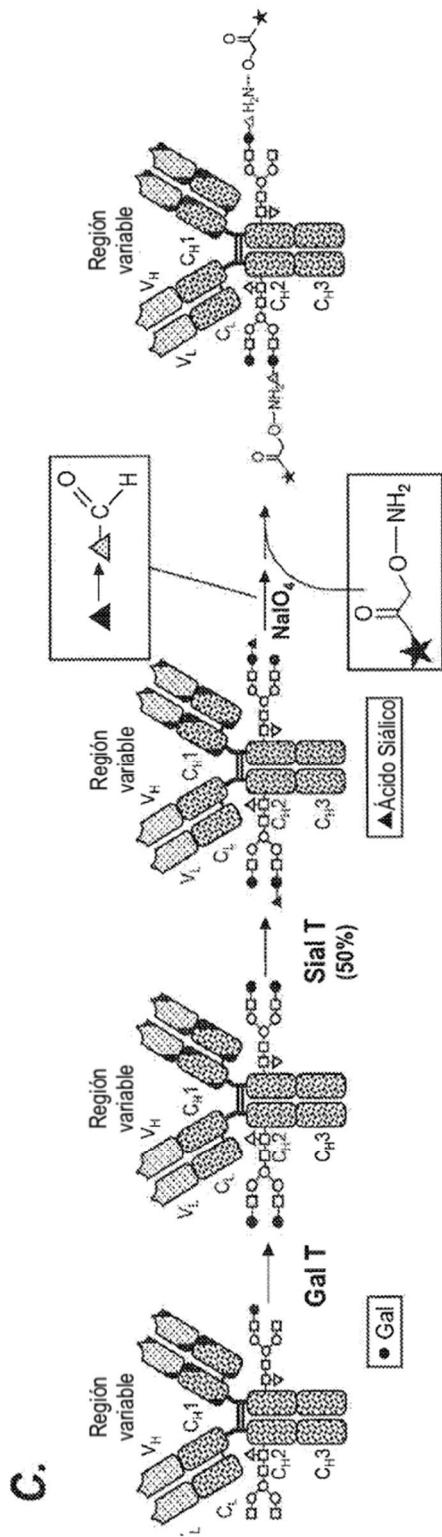


Fig. 25

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

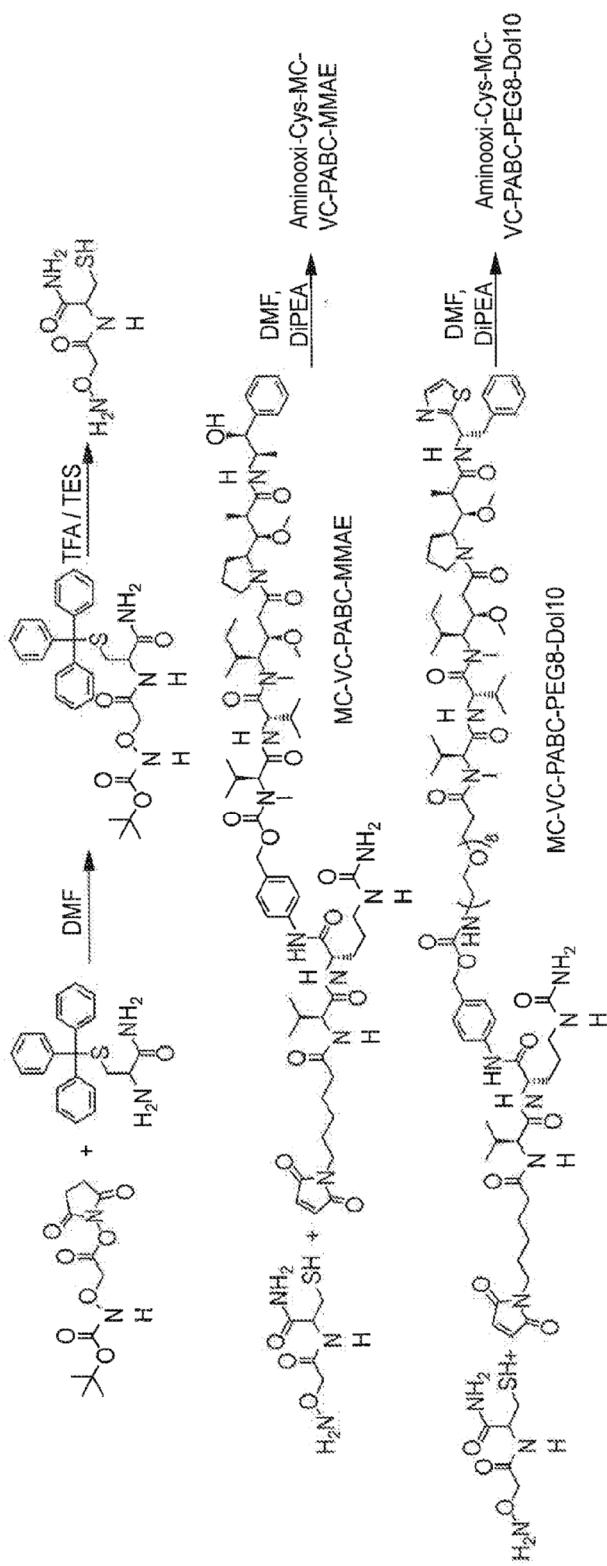
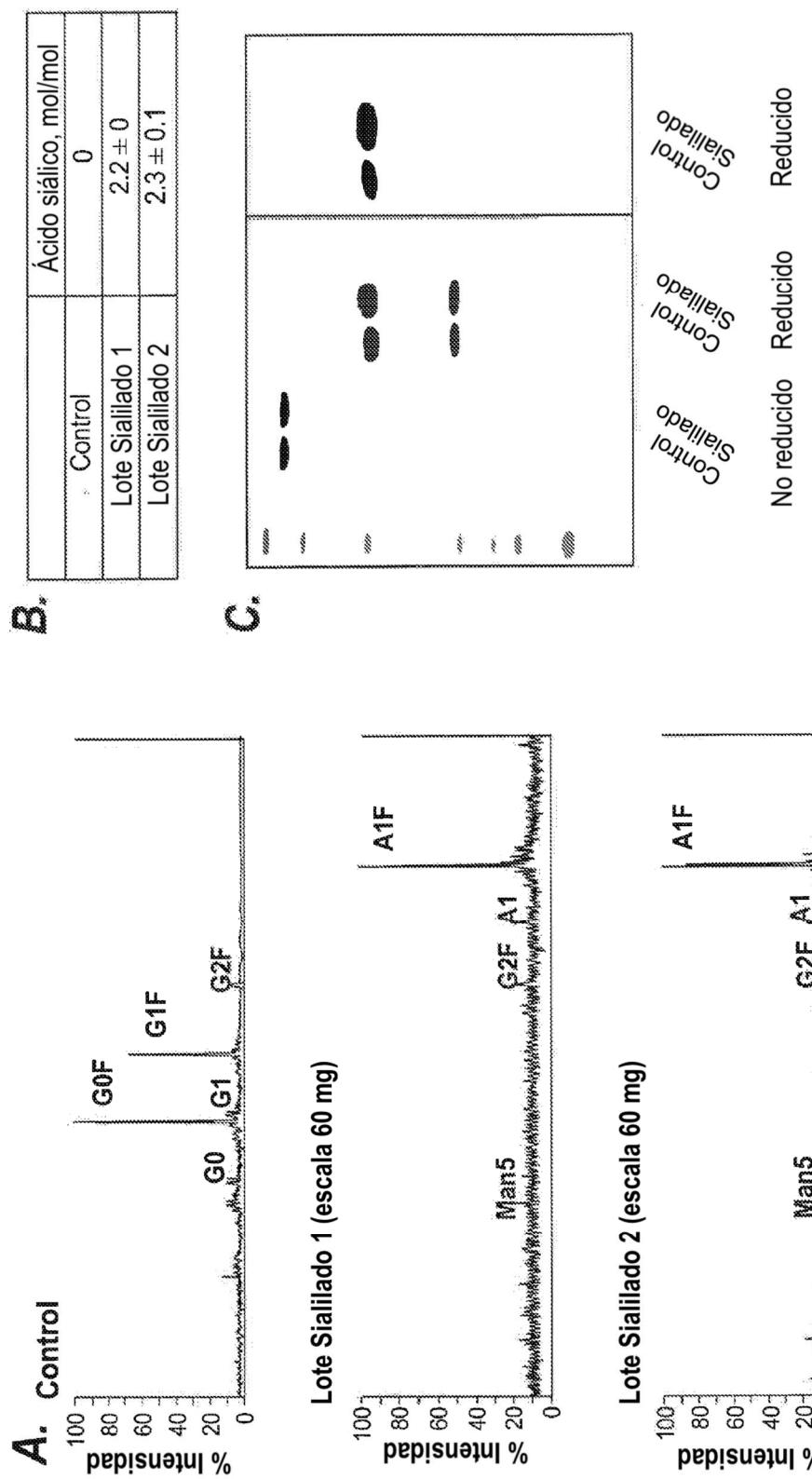


Fig. 26

**Fig. 27**

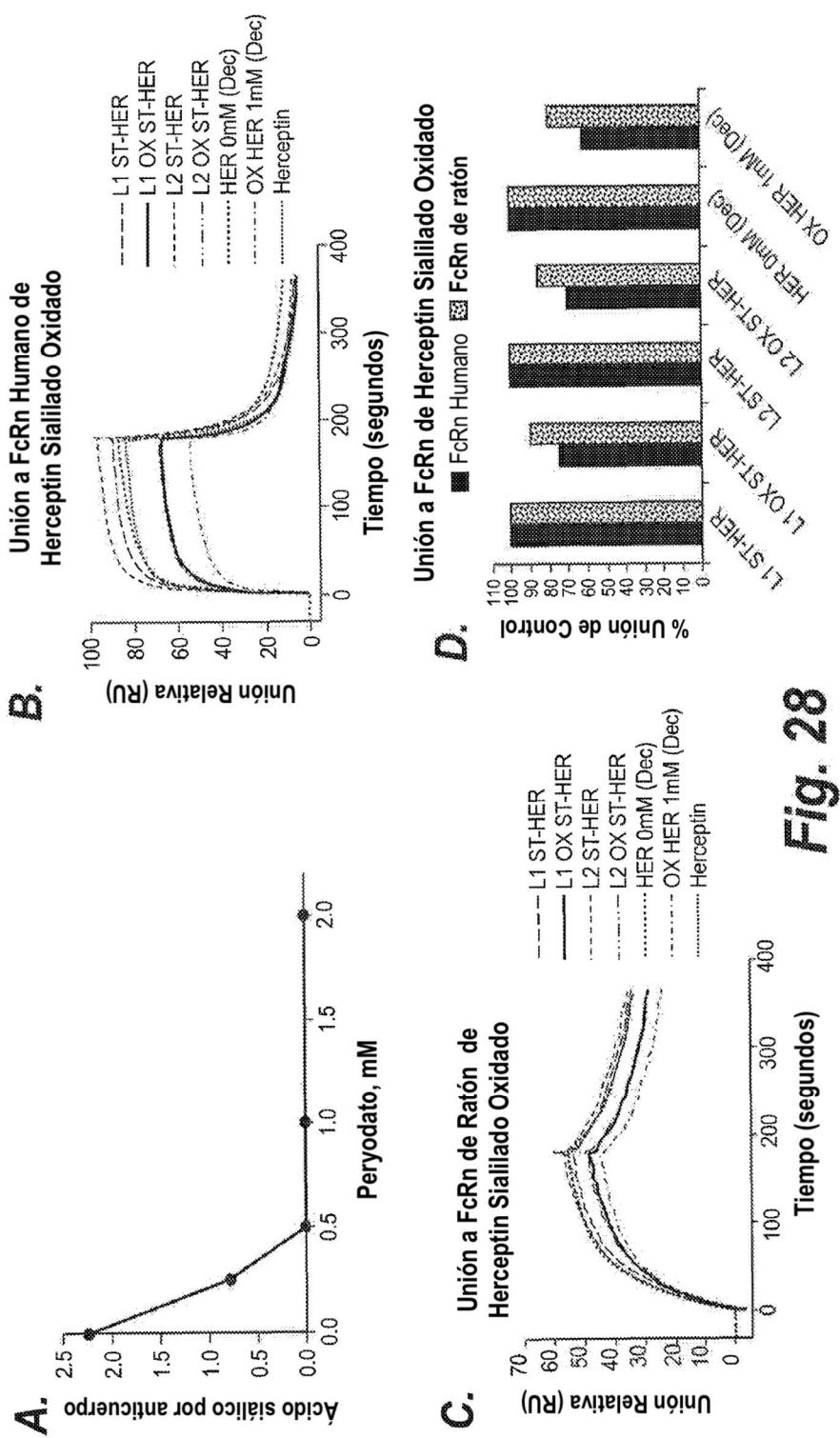


Fig. 28

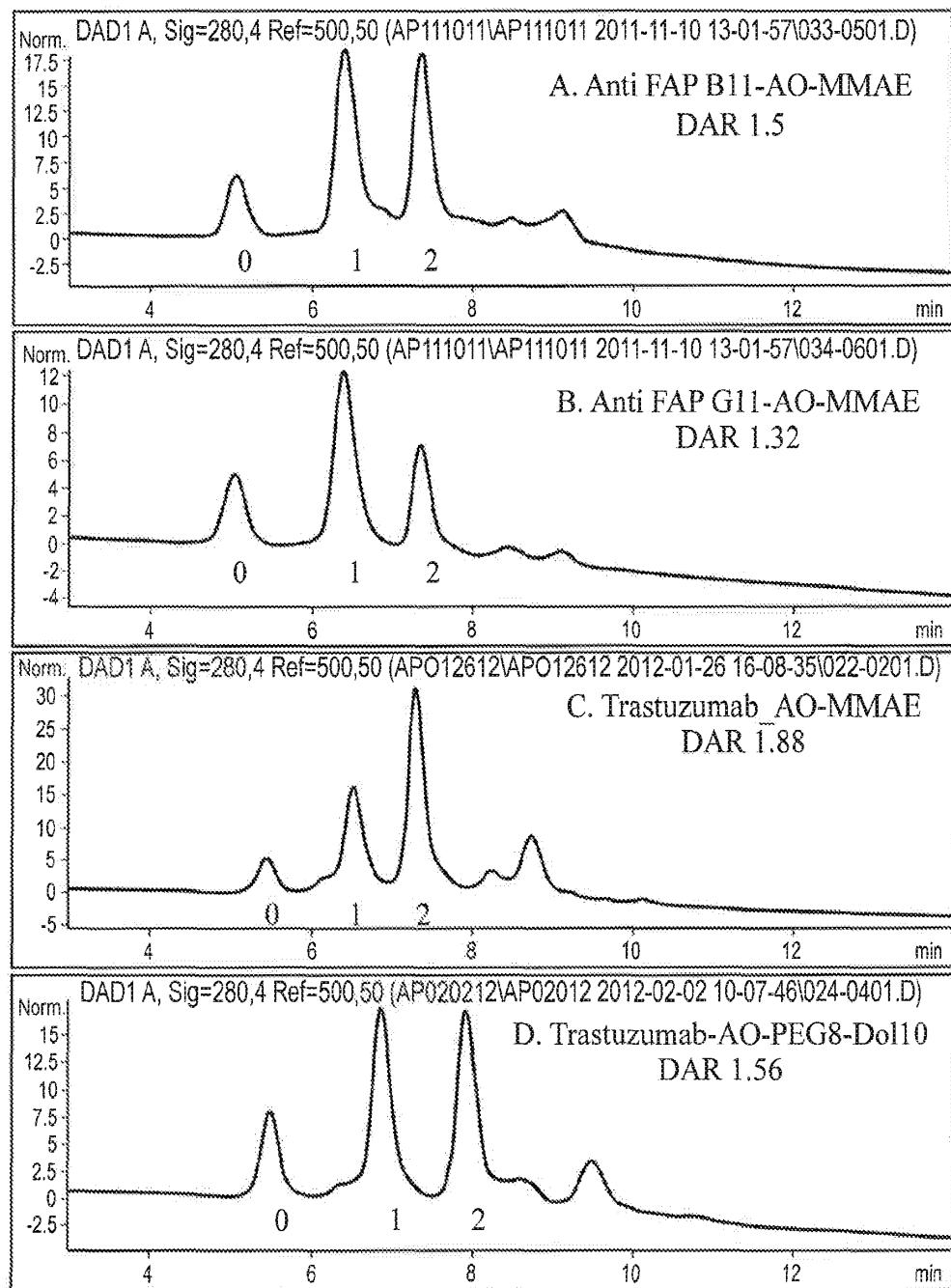
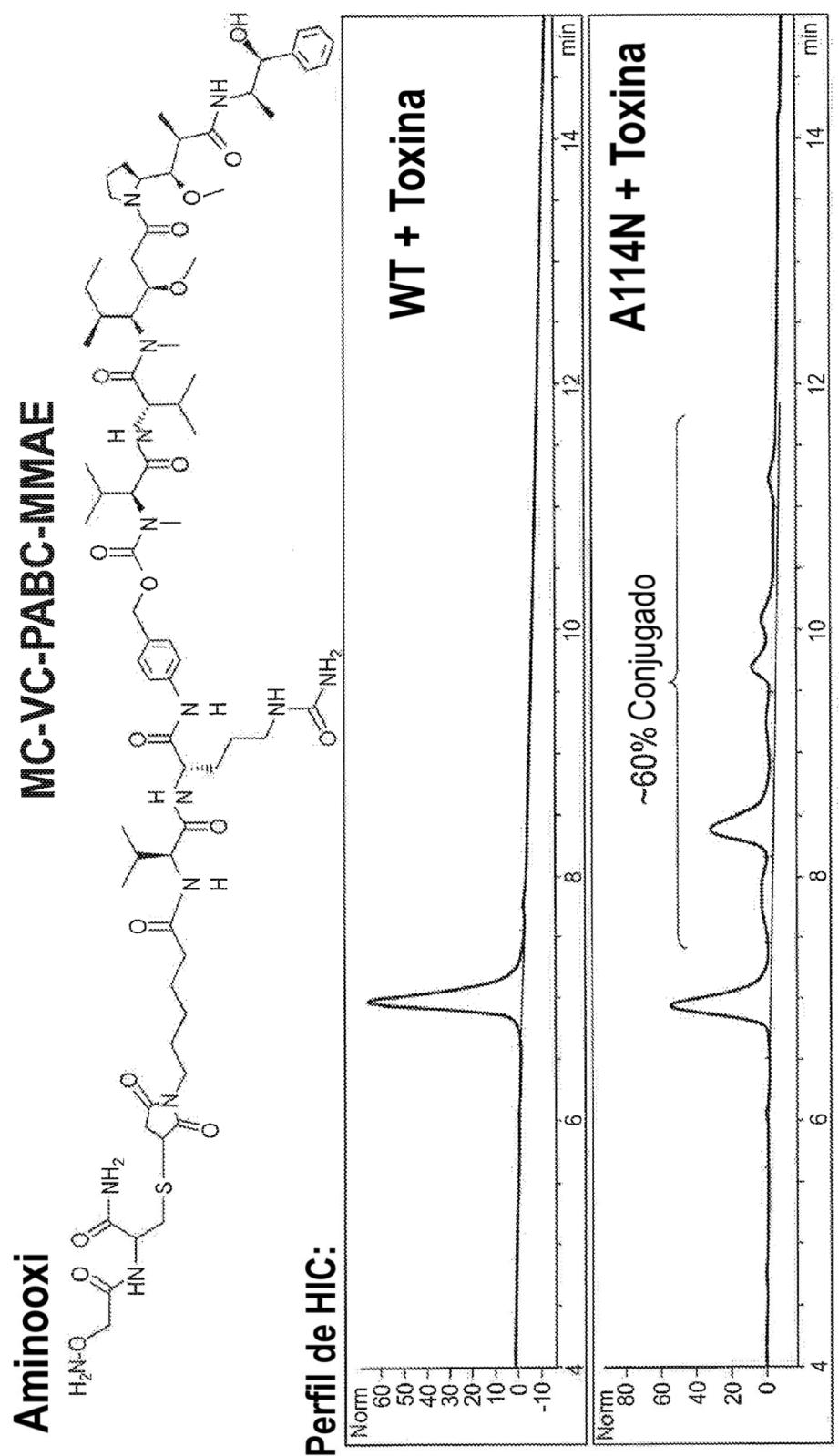


Fig. 29



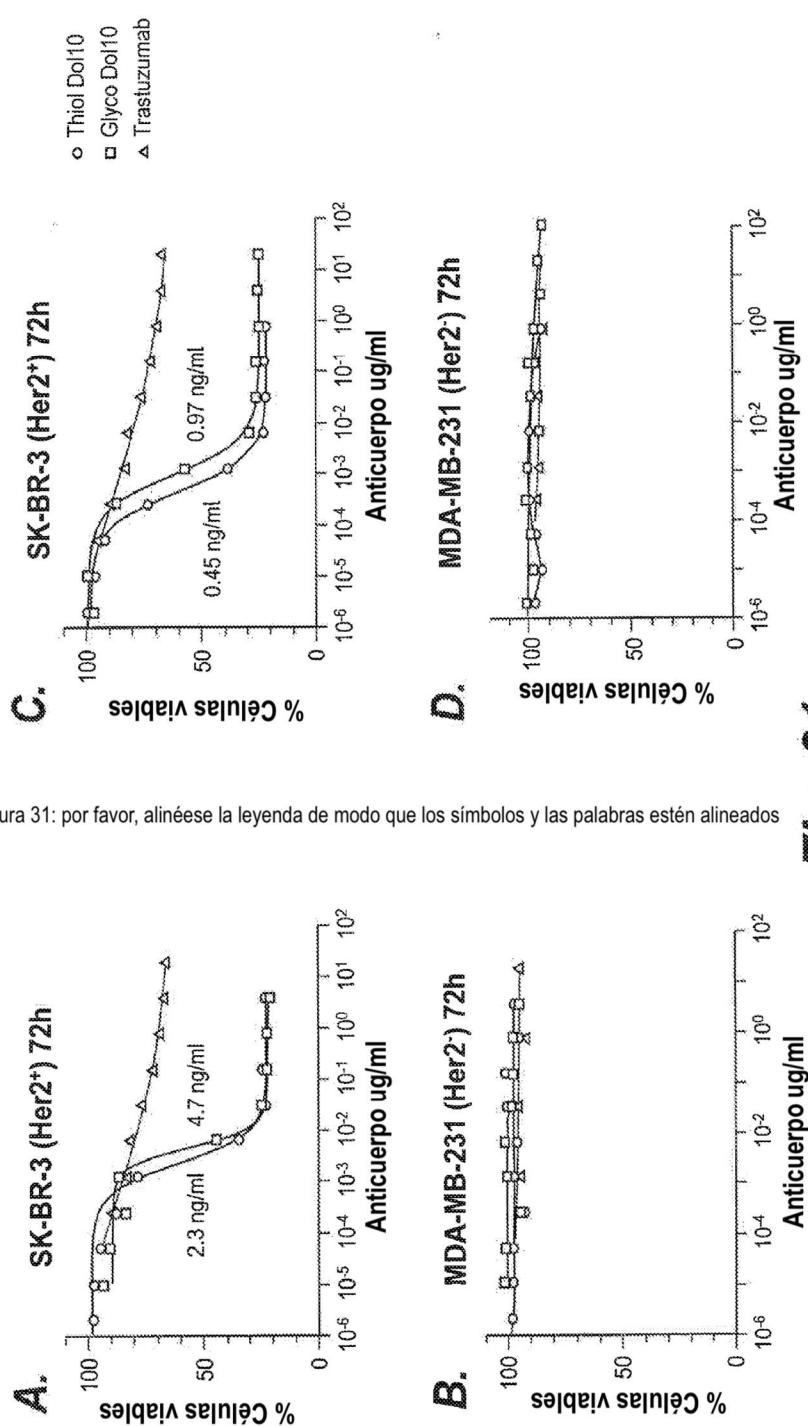


Figura 31: por favor, alinéese la leyenda de modo que los símbolos y las palabras estén alineados

Proliferación celular de CHO±FAP

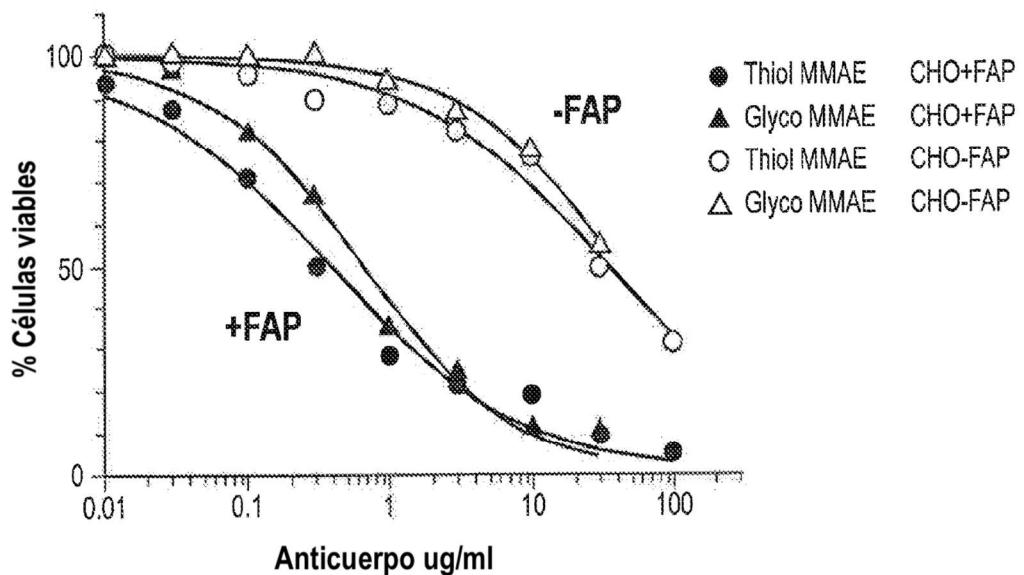


Fig. 32

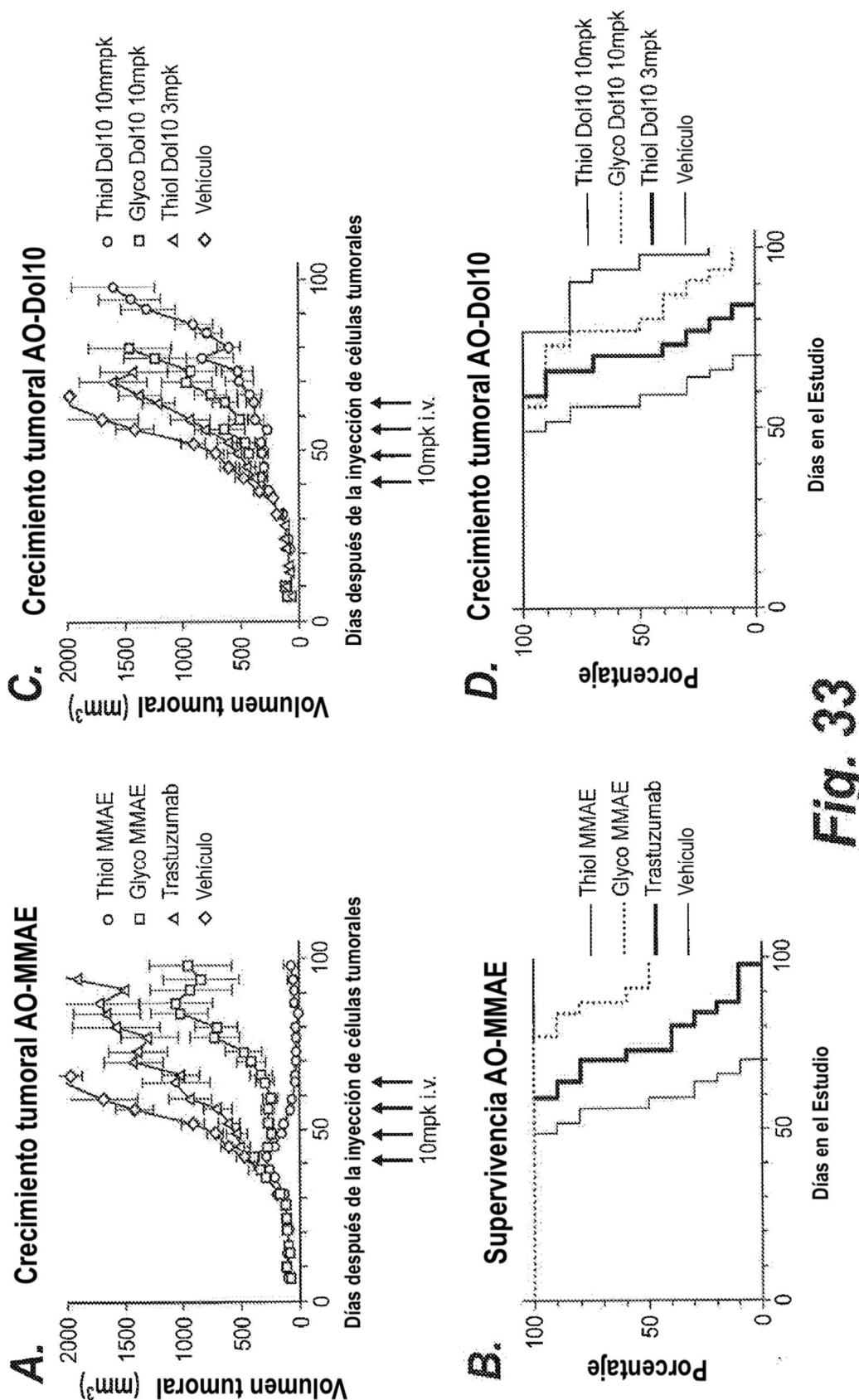
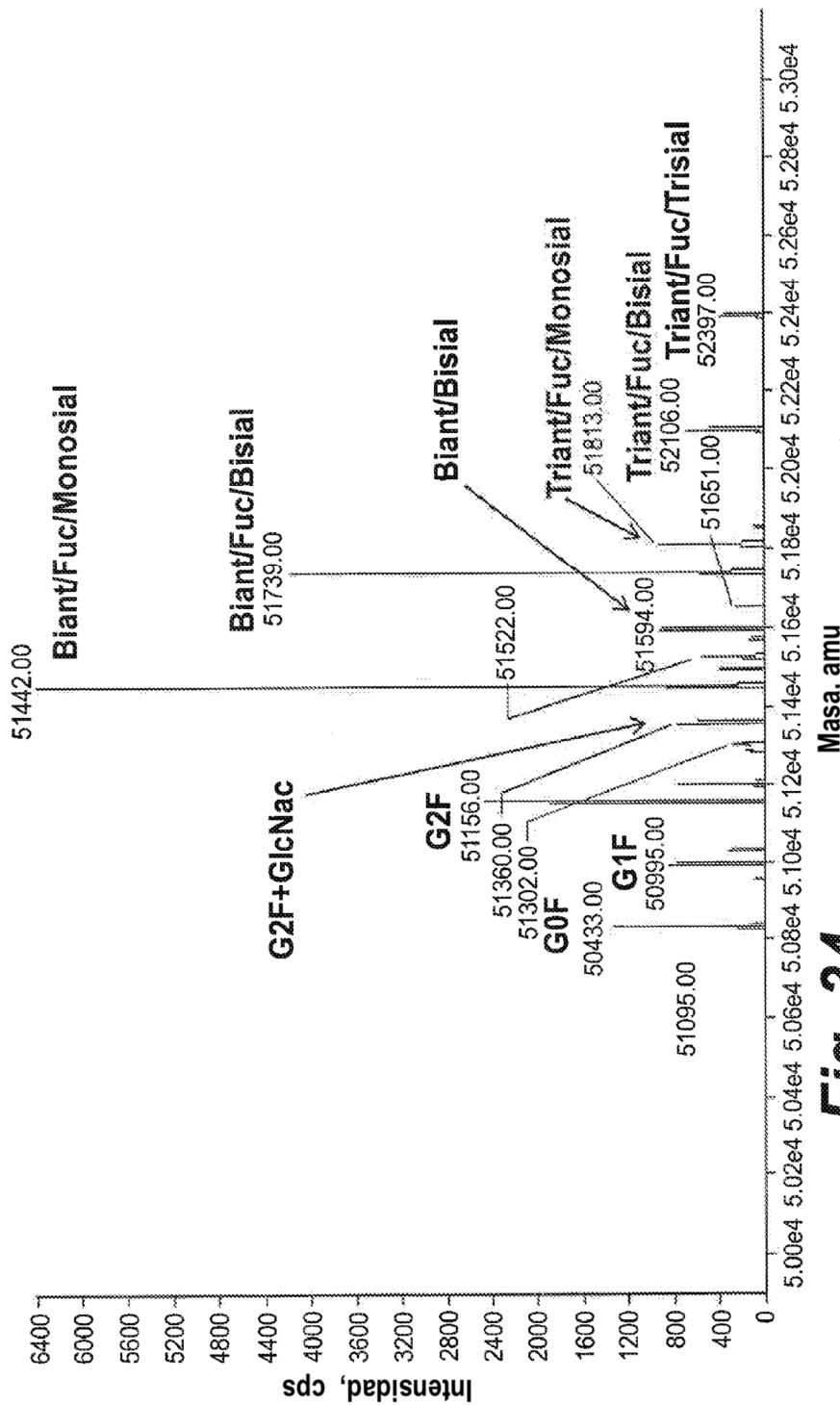


Fig. 33

LC/MS de la cadena pesada de S298N/T299A/Y300S (NNAS)

**Fig. 34**

Masa, amu

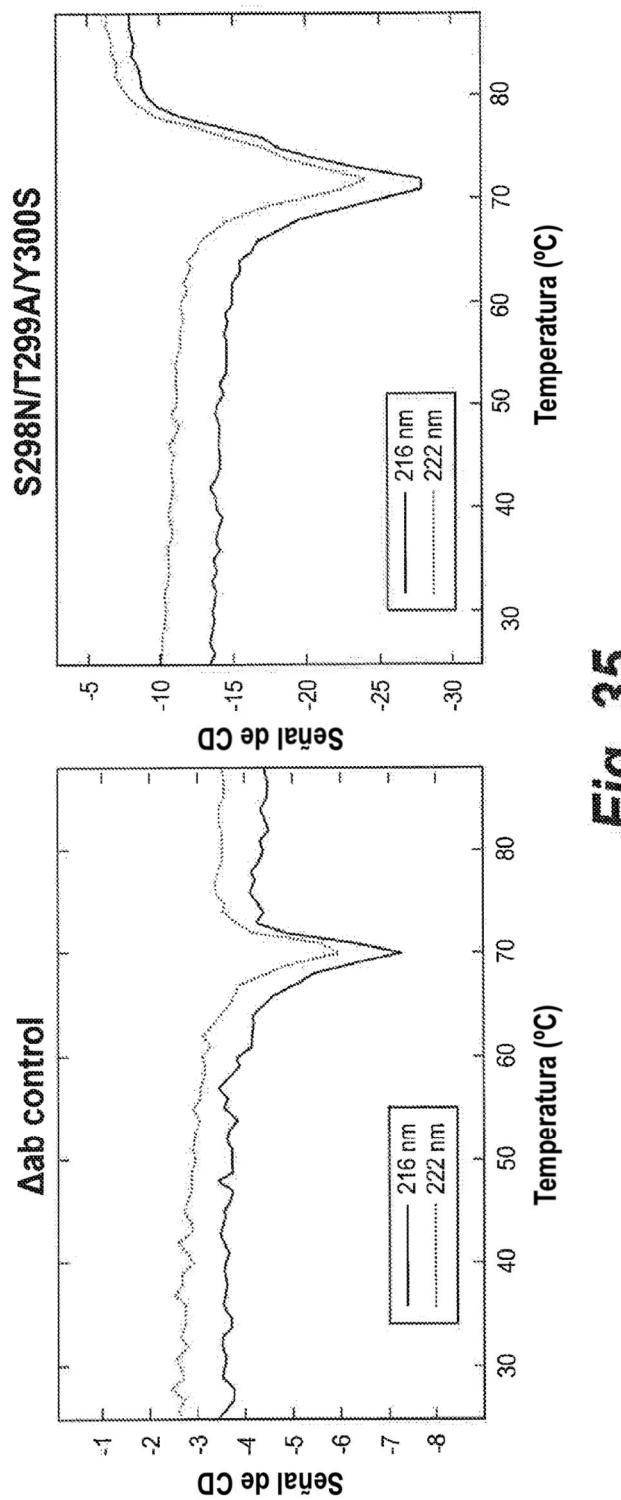


Fig. 35

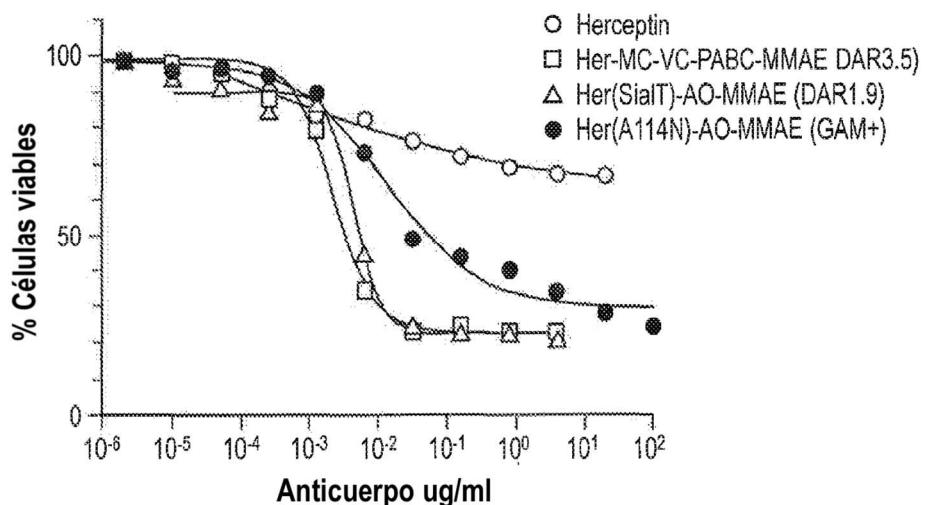
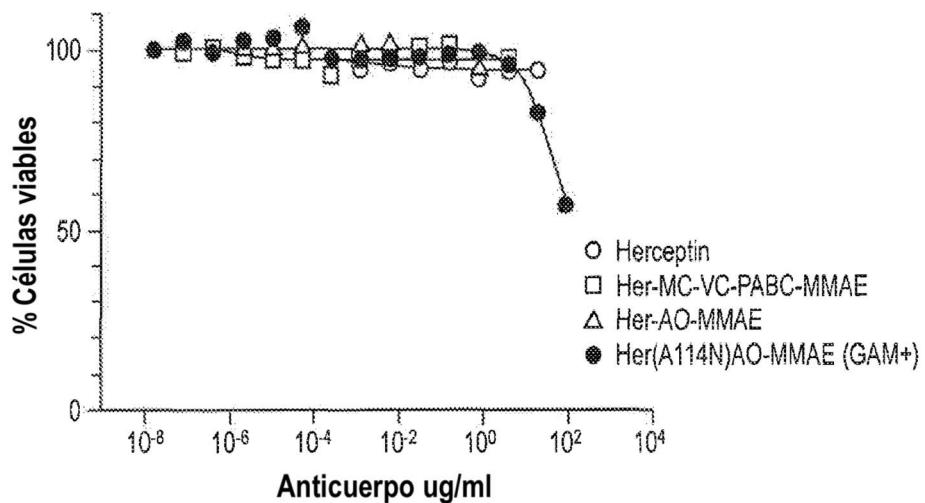
SK-BR-3 (Her2⁺) 72hMDA-MB-231 (HER2^{neg}) 72h

Fig. 36

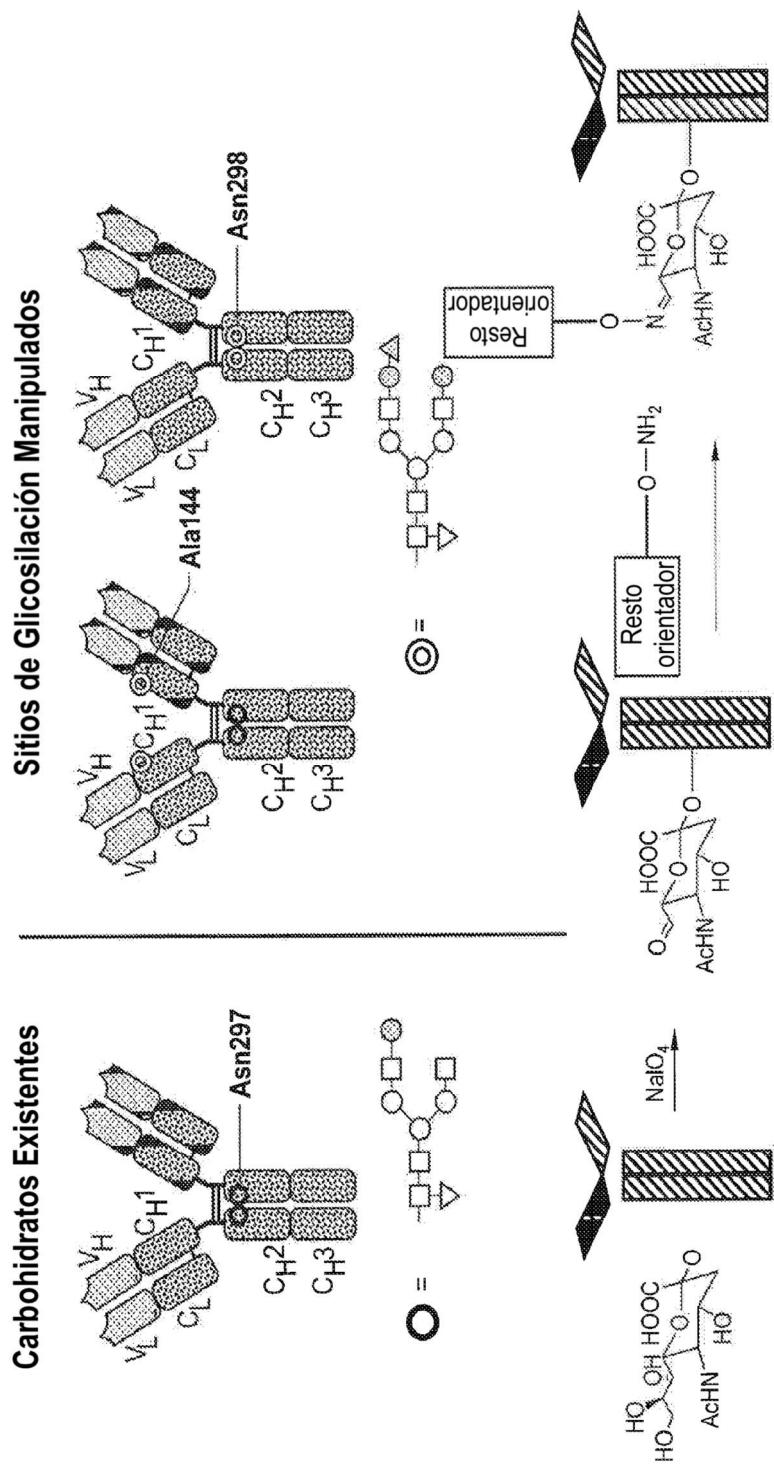
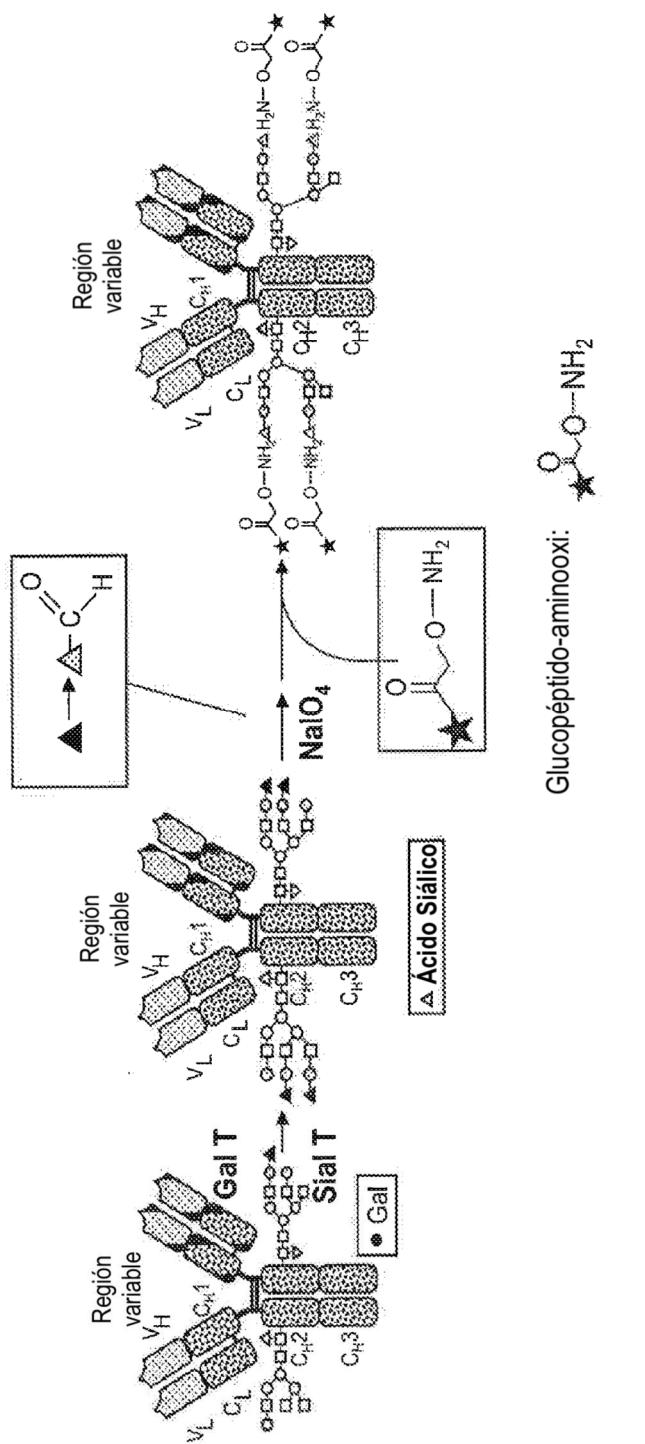


Fig. 37



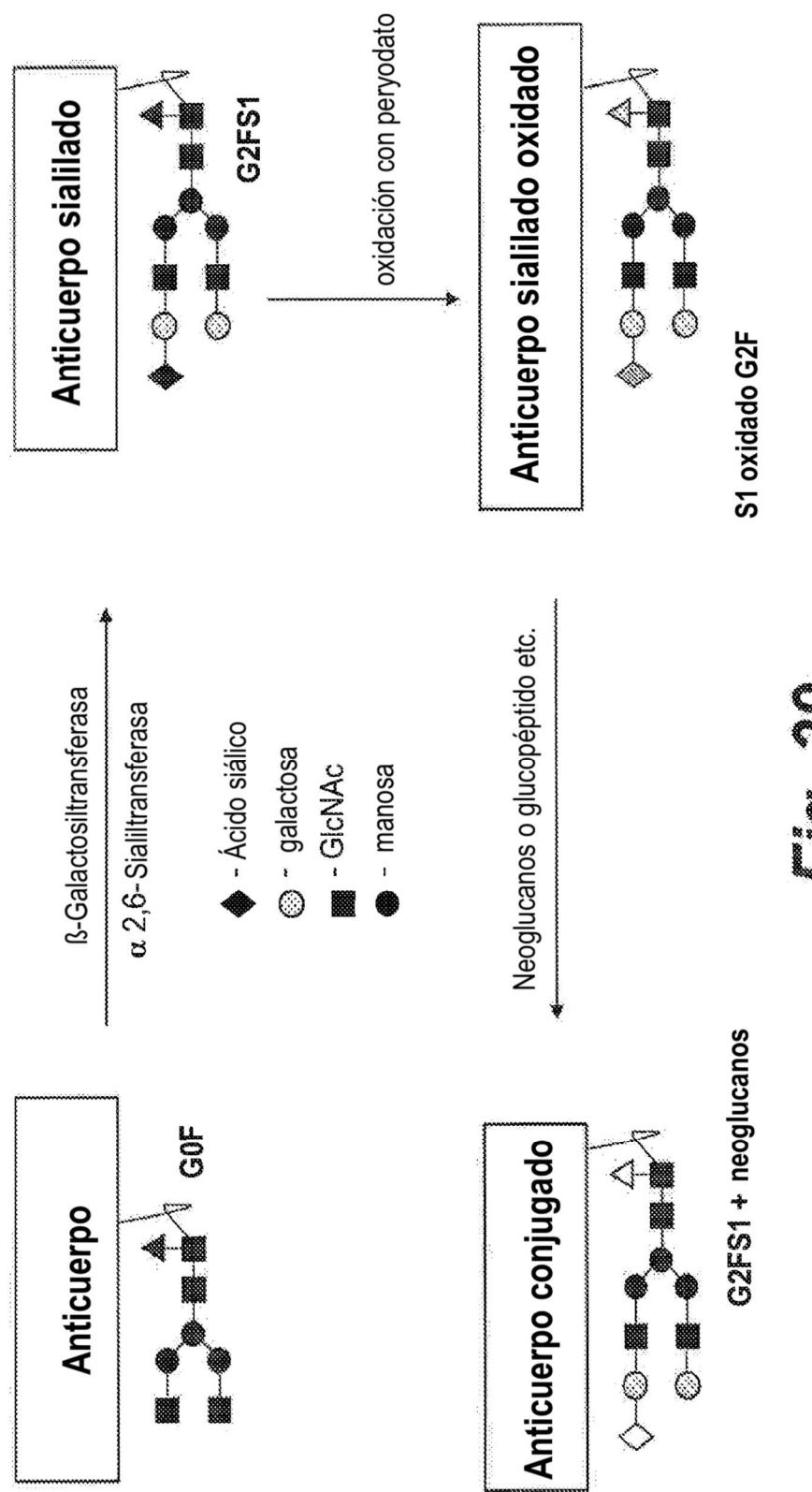
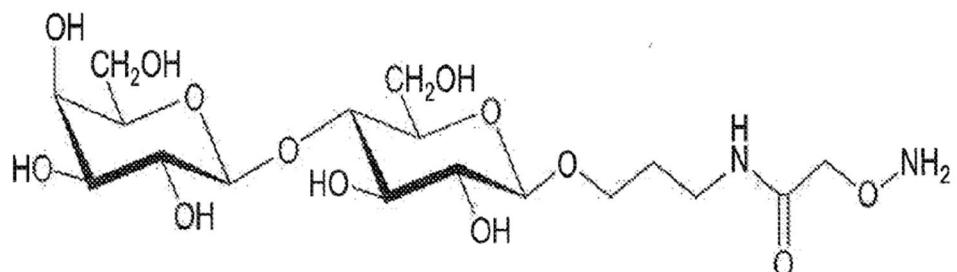


Fig. 39

Lactosa-aminooxi para glucanos naturales (SAM o GAM)



Masa Exacta: 472,19
Peso Molecular: 472,44

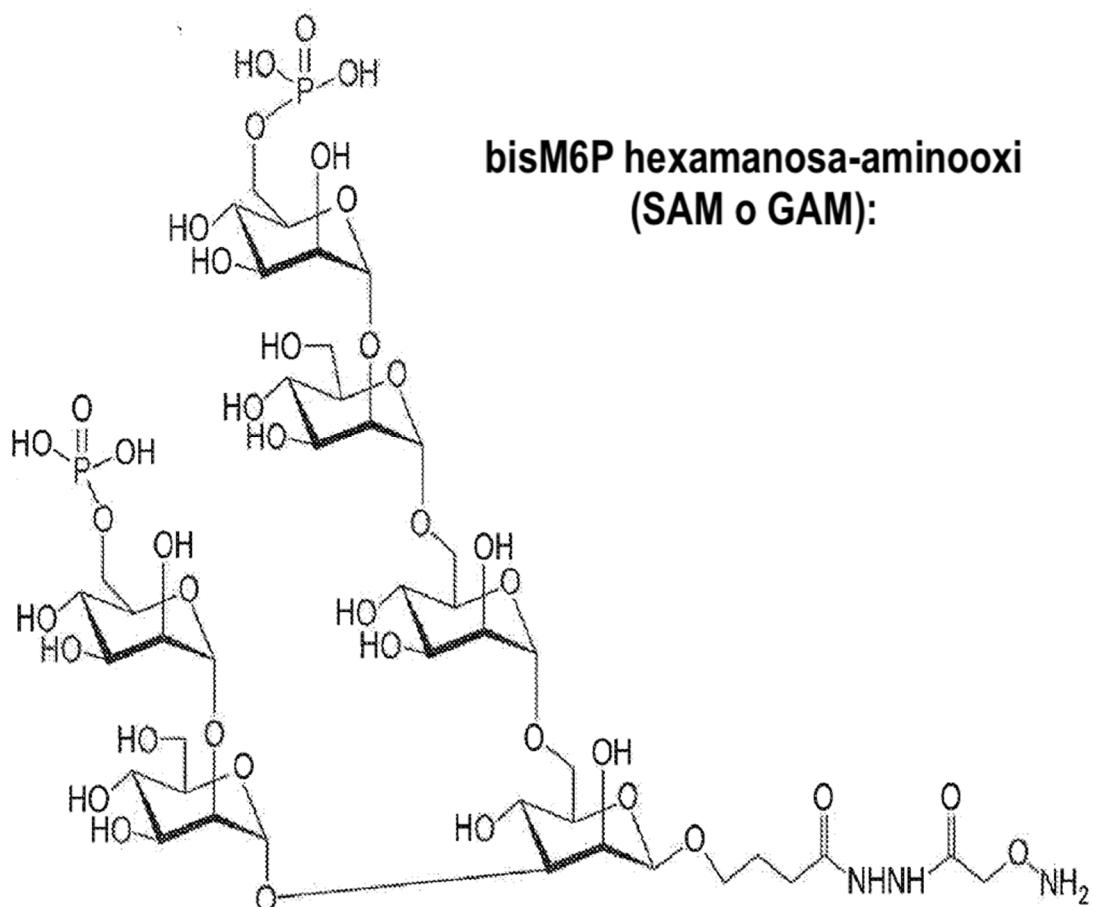
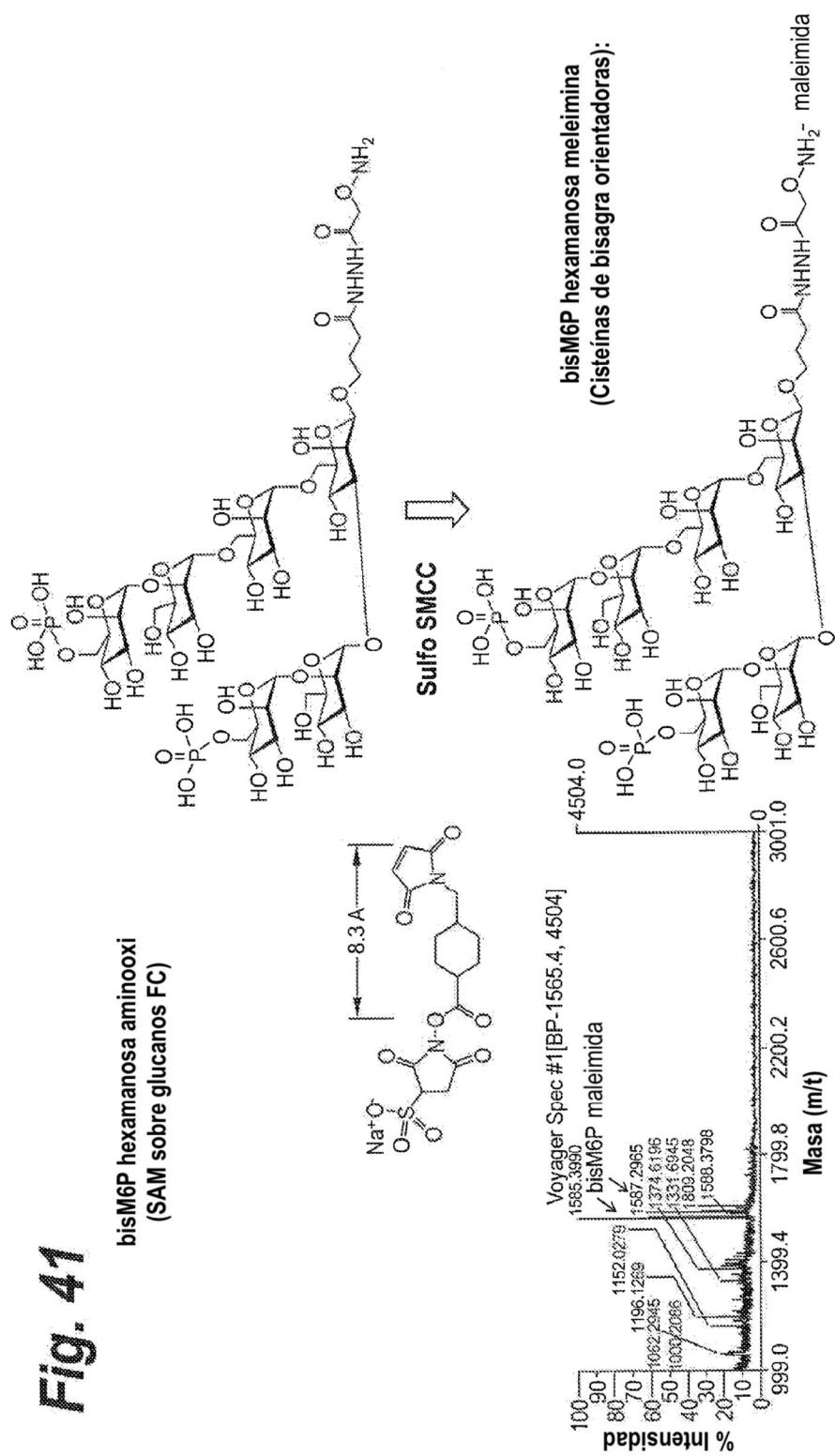


Fig. 40

Fig. 41
 bisM6P hexamanaosa aminoxi
 (SAM sobre glucanos FC)



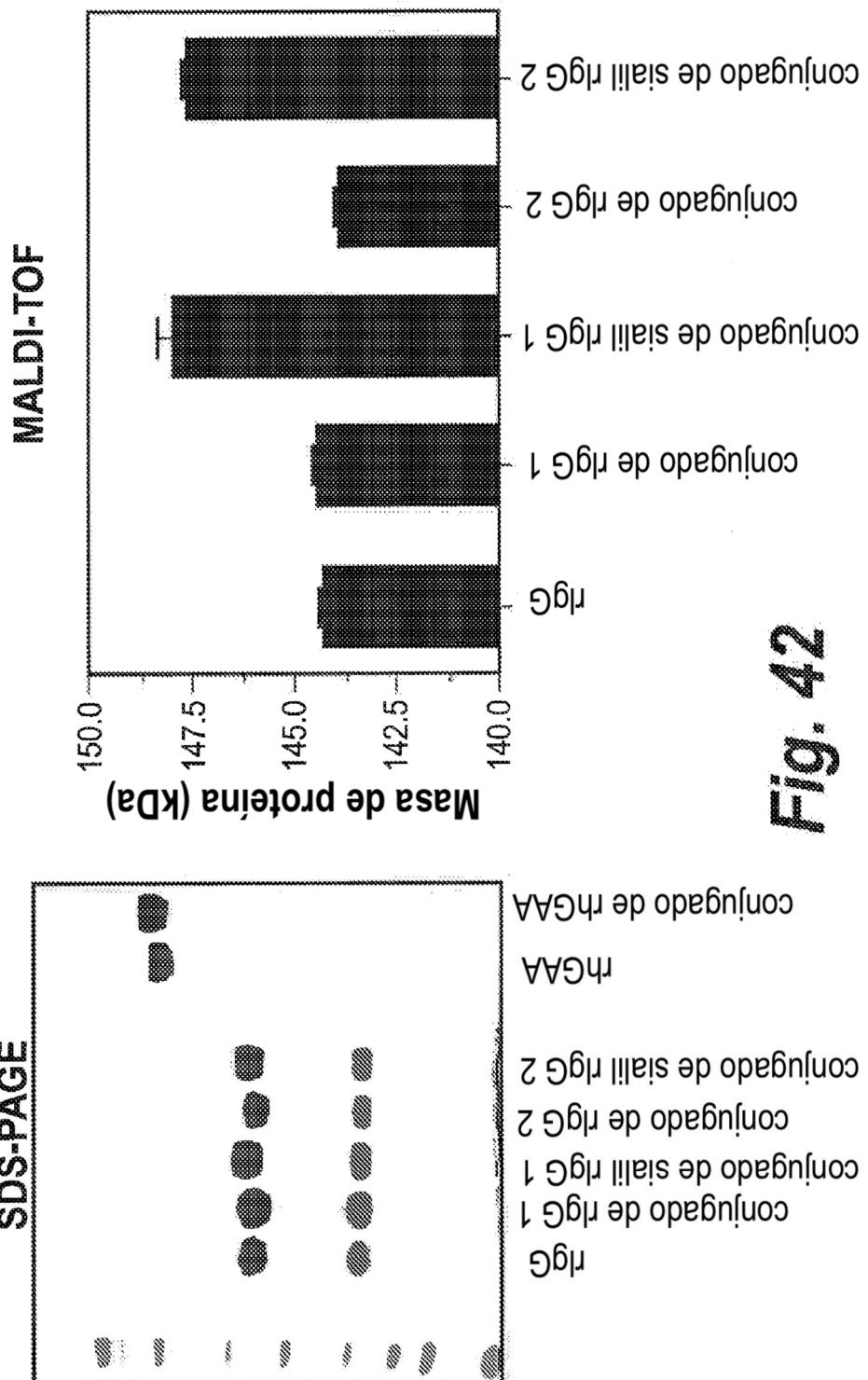


Fig. 42

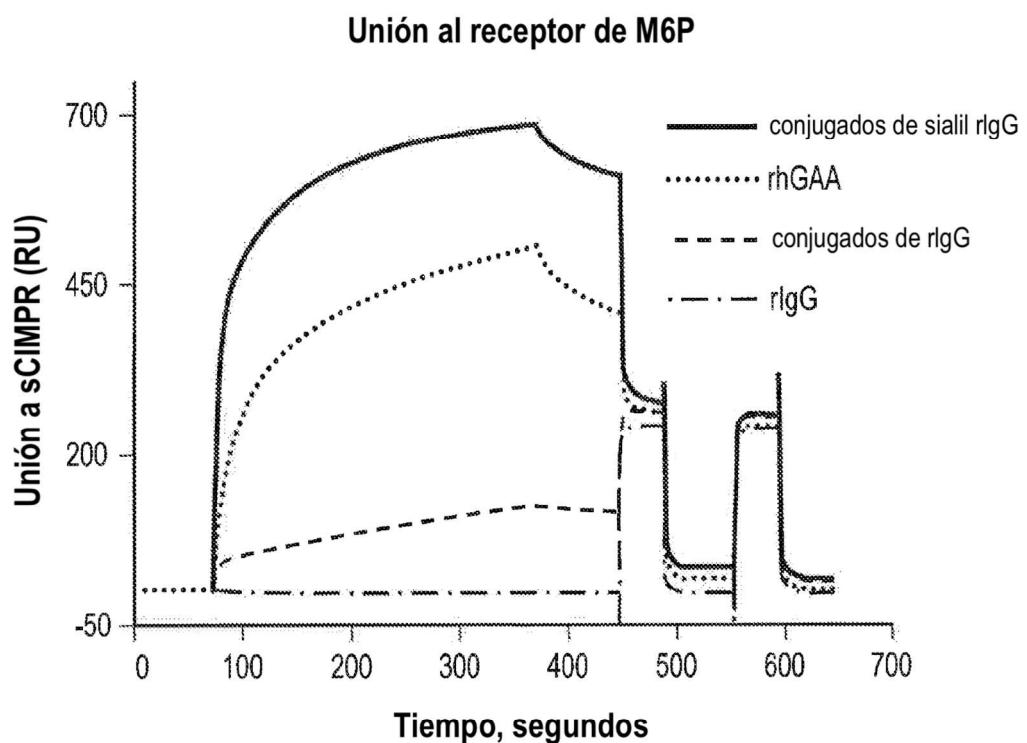


Fig. 43

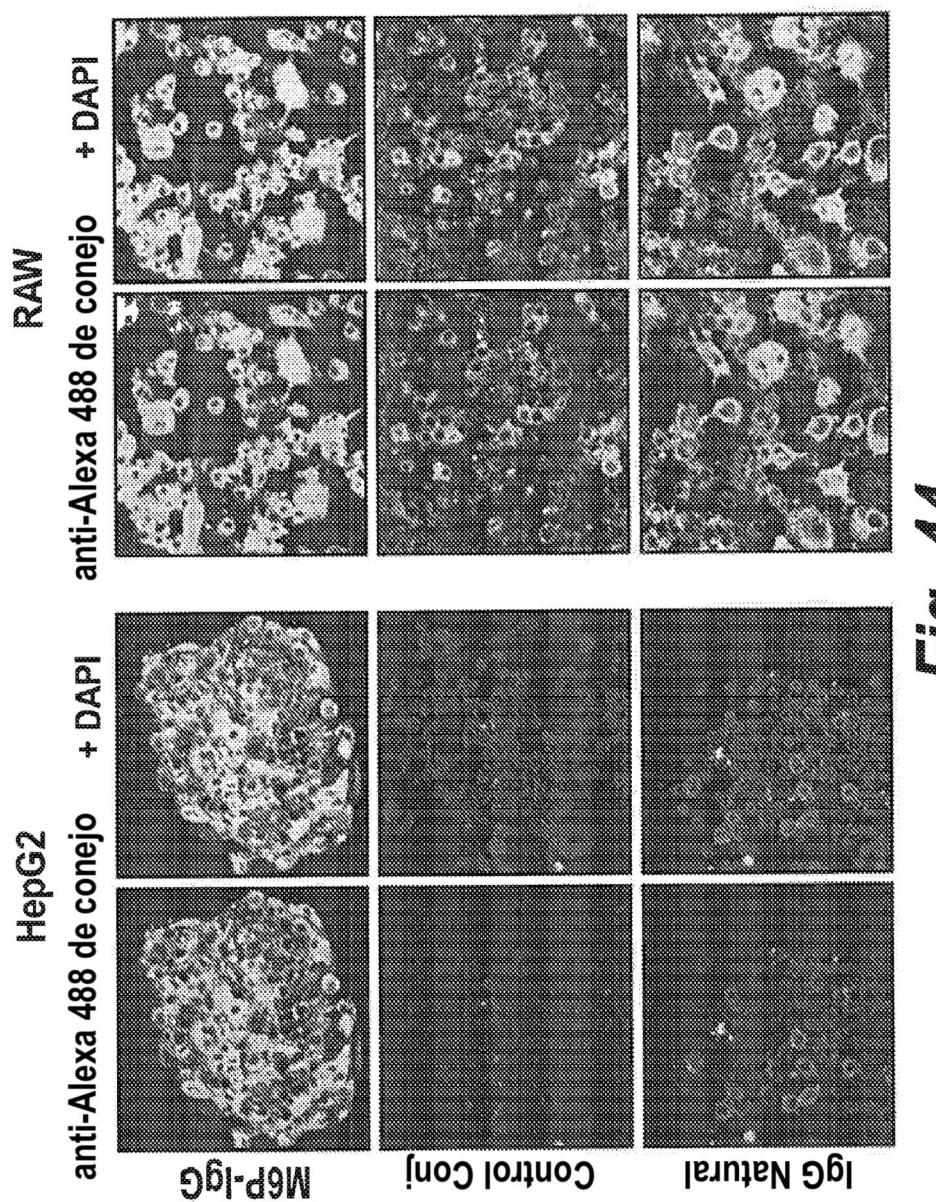
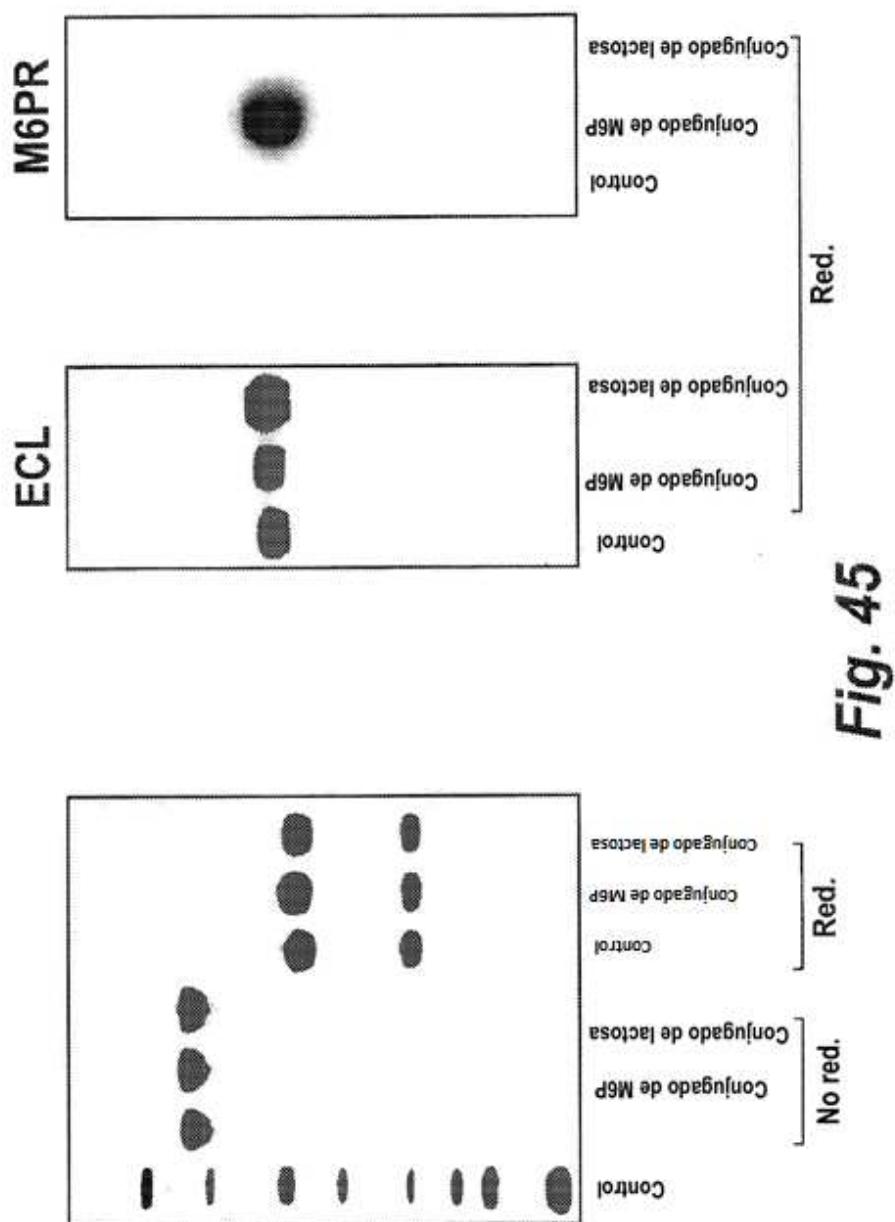


Fig. 44



Muestras	PM (kDa)	Nº Glucano
Control	$145,42 \pm 0,24$	0,00
Conjugado de M6P	$147,95 \pm 0,09$	1,92
Conjugado de lactosa	$146,35 \pm 0,36$	1,96

Fig. 46

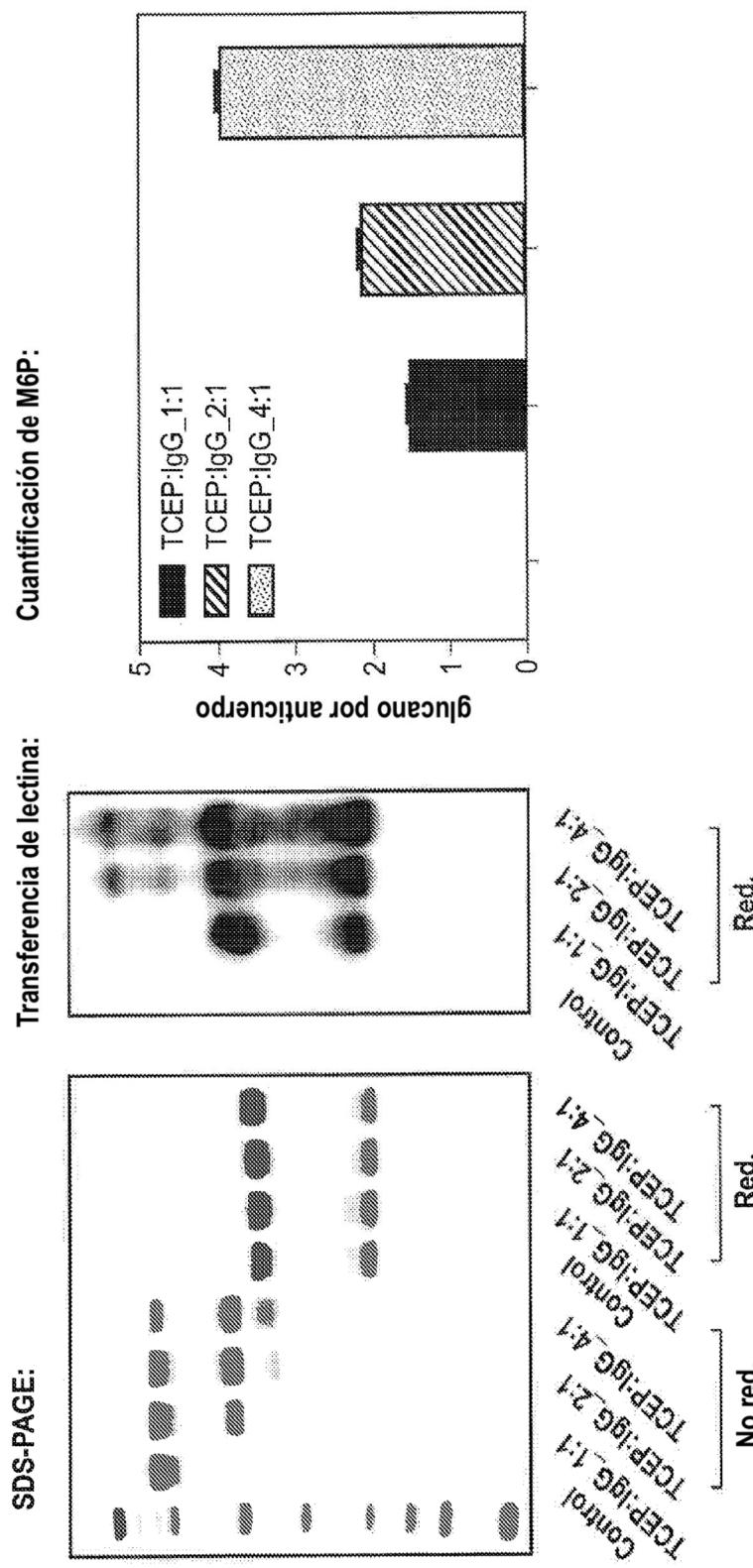


Fig. 47

Cuantificación de galactosa:

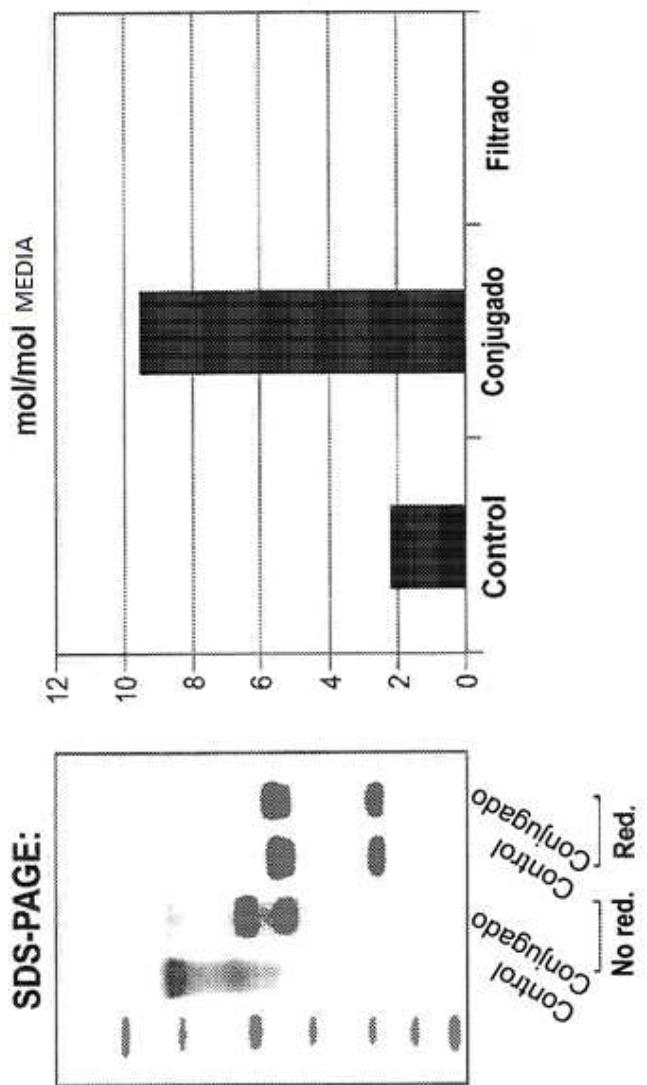


Fig. 48

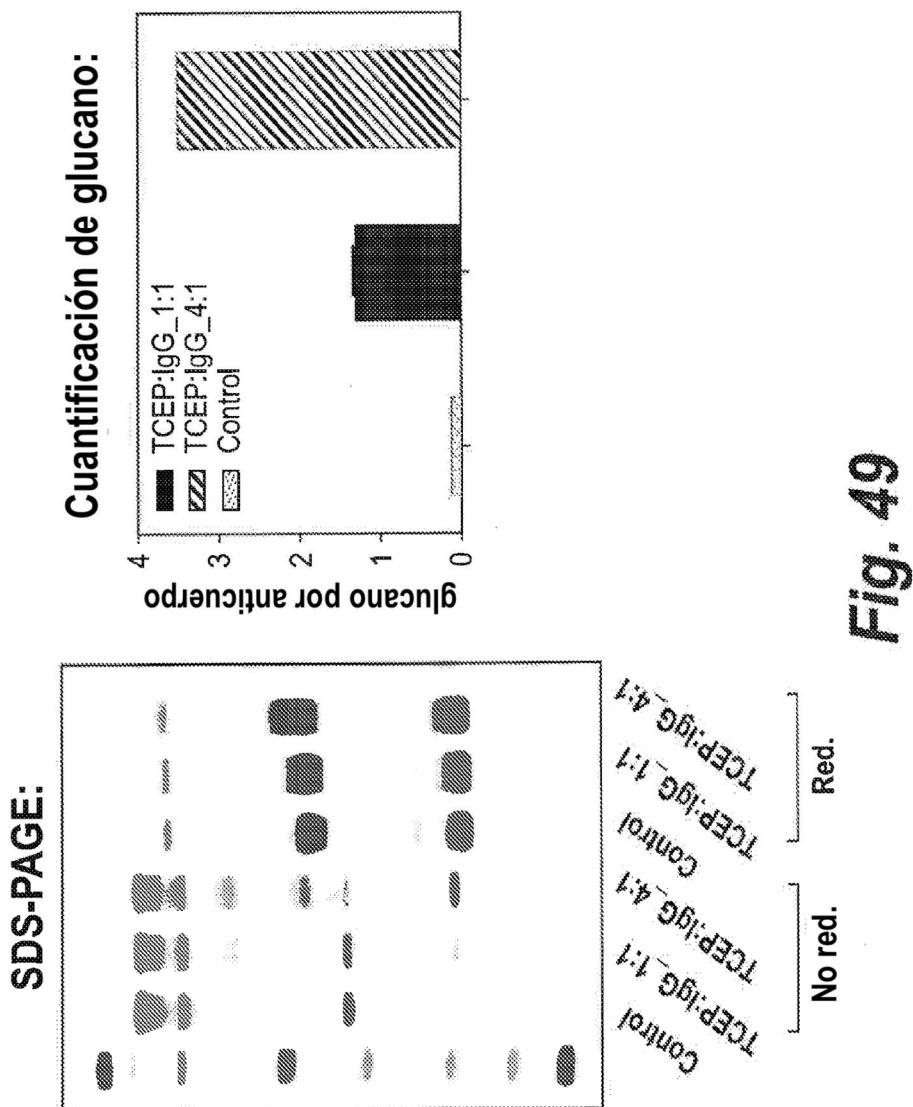
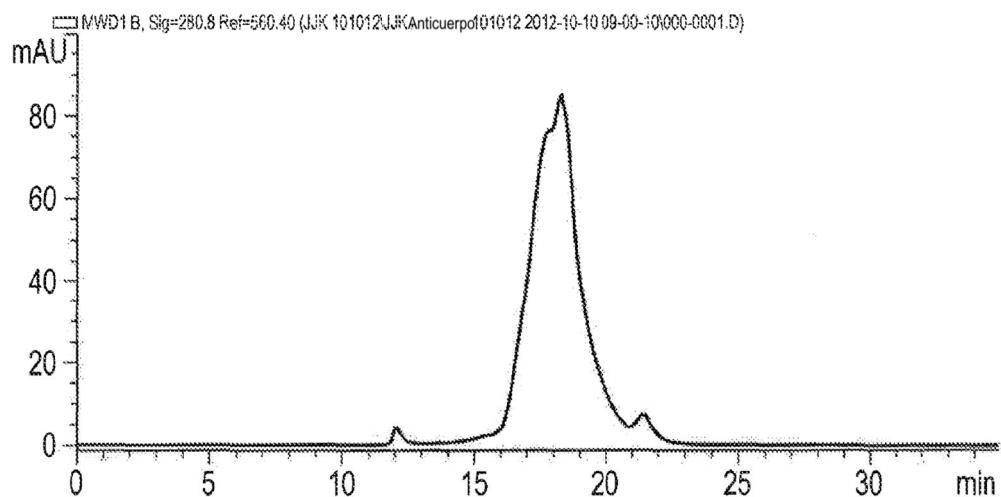


Fig. 49

Control:



Conjugado de lactosa-maleimida:

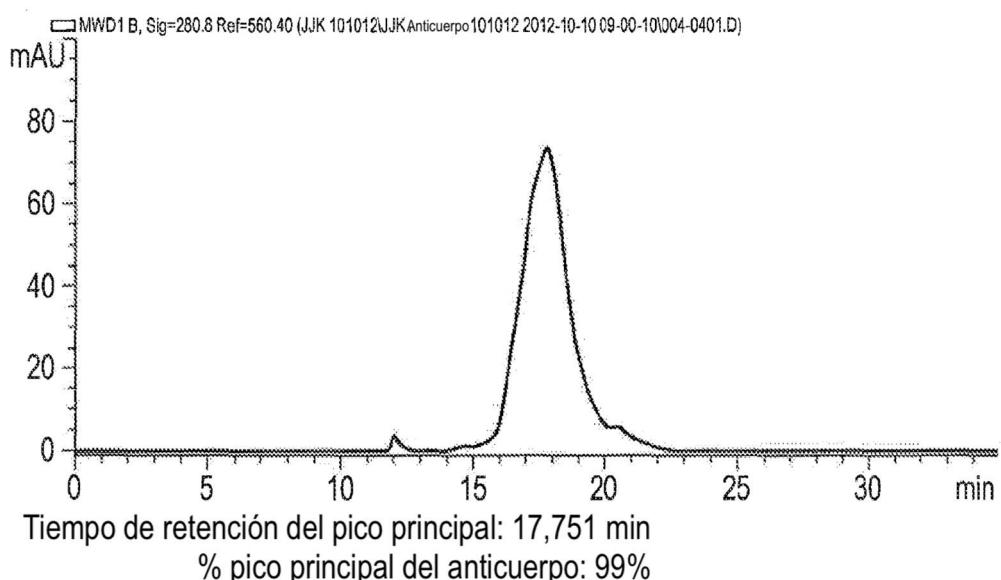
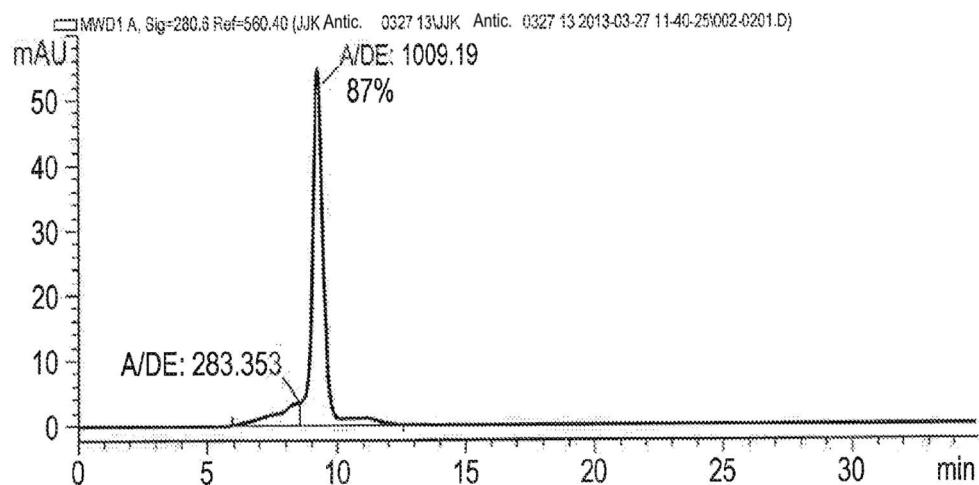


Fig. 50

Control:



Conjugado de M6P:

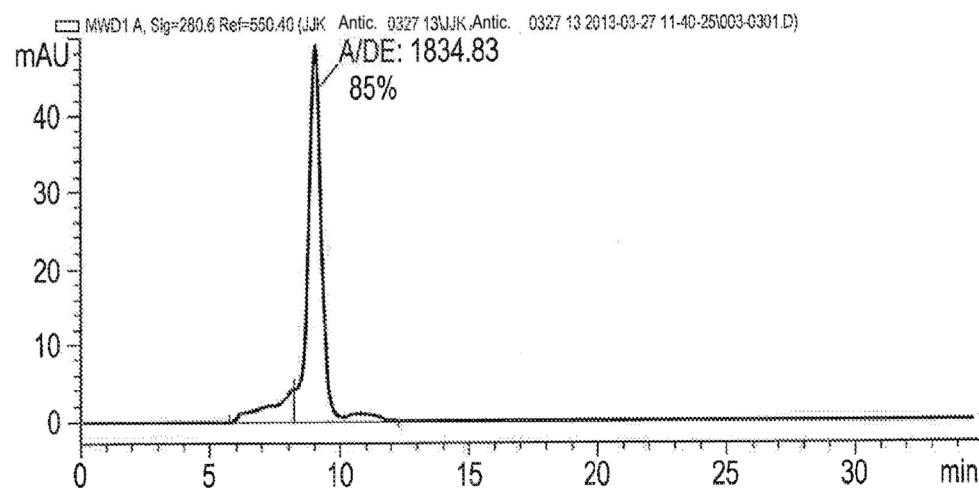
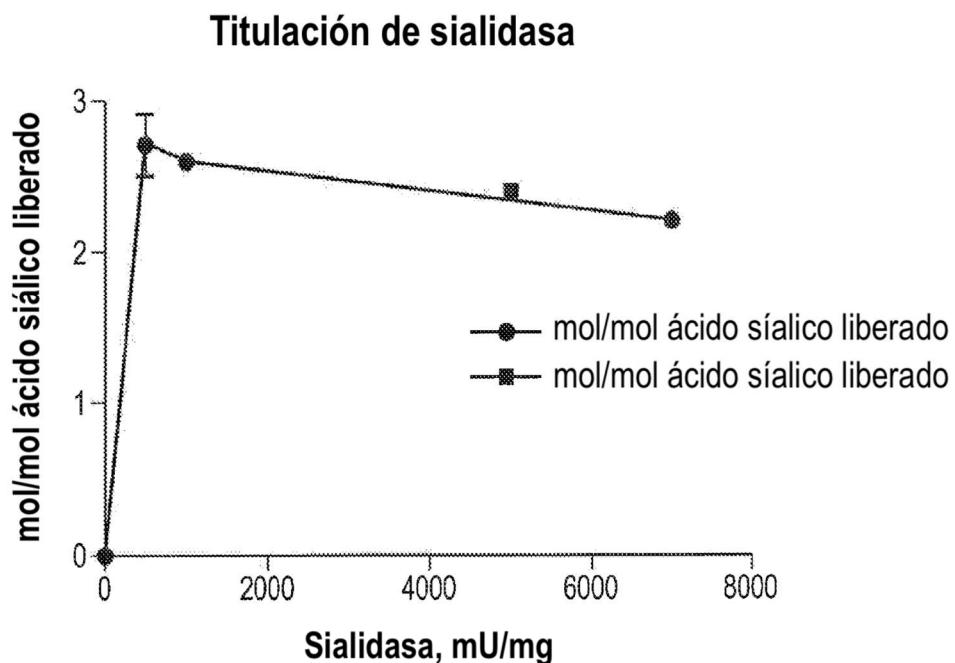
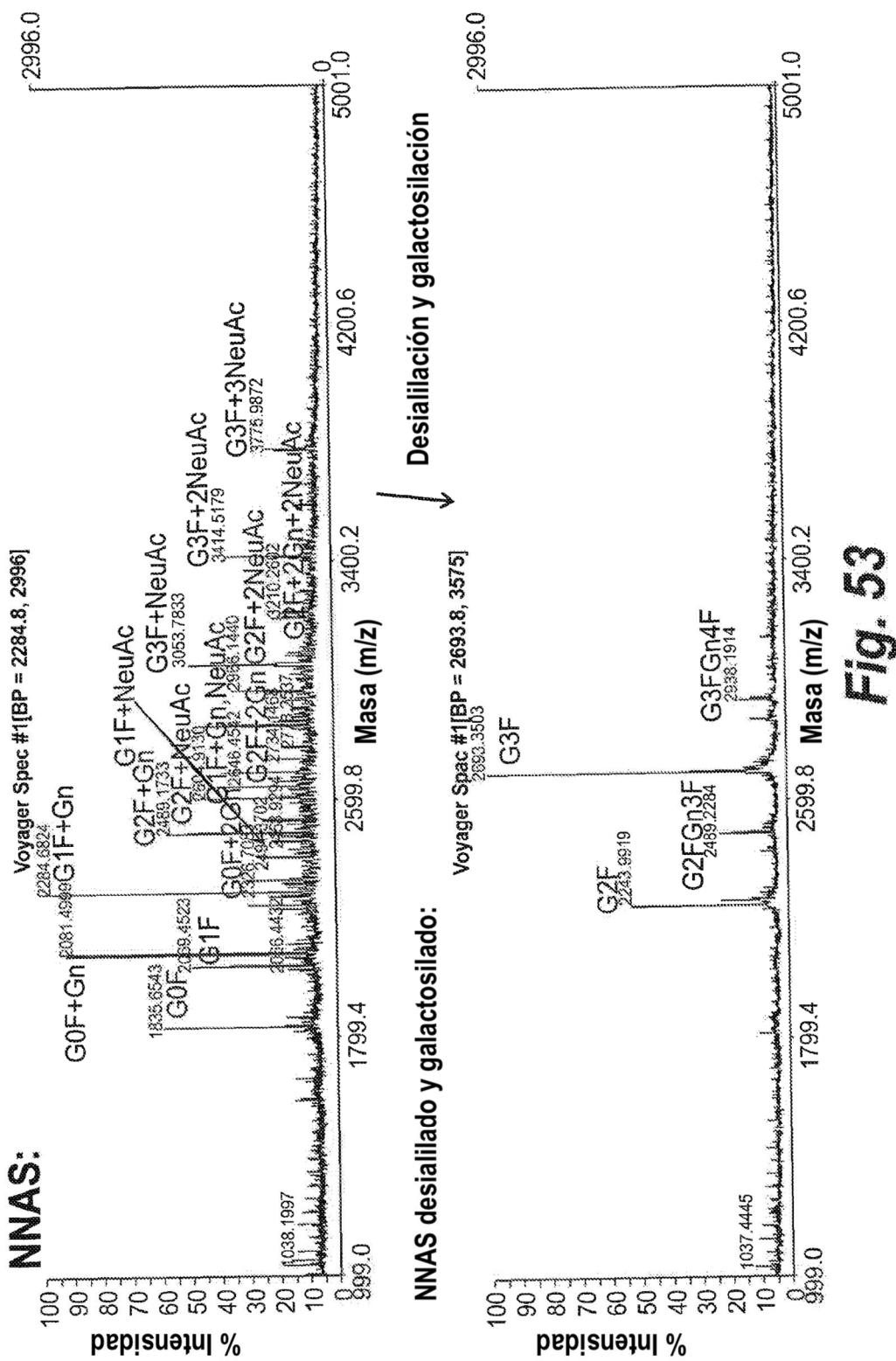


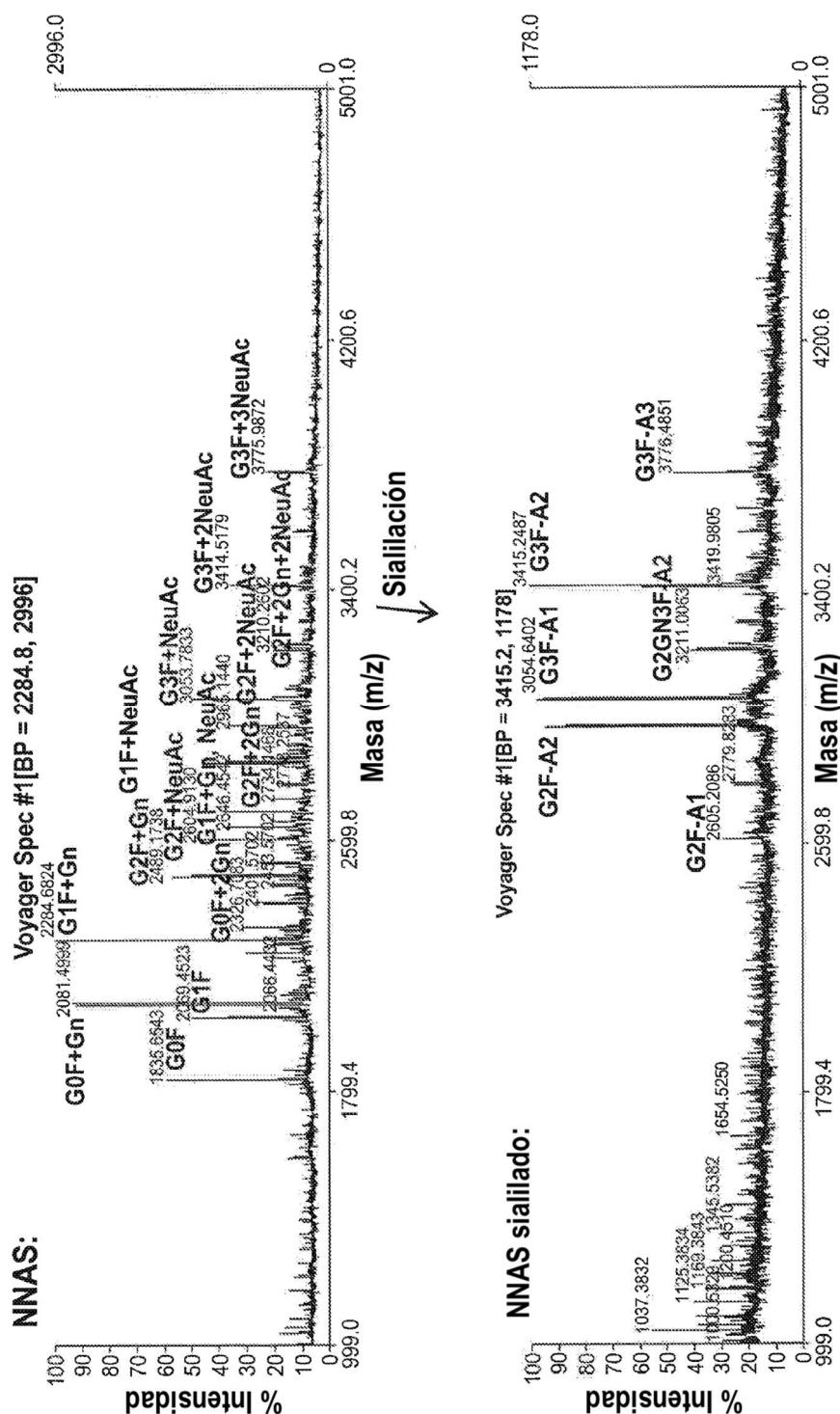
Fig. 51

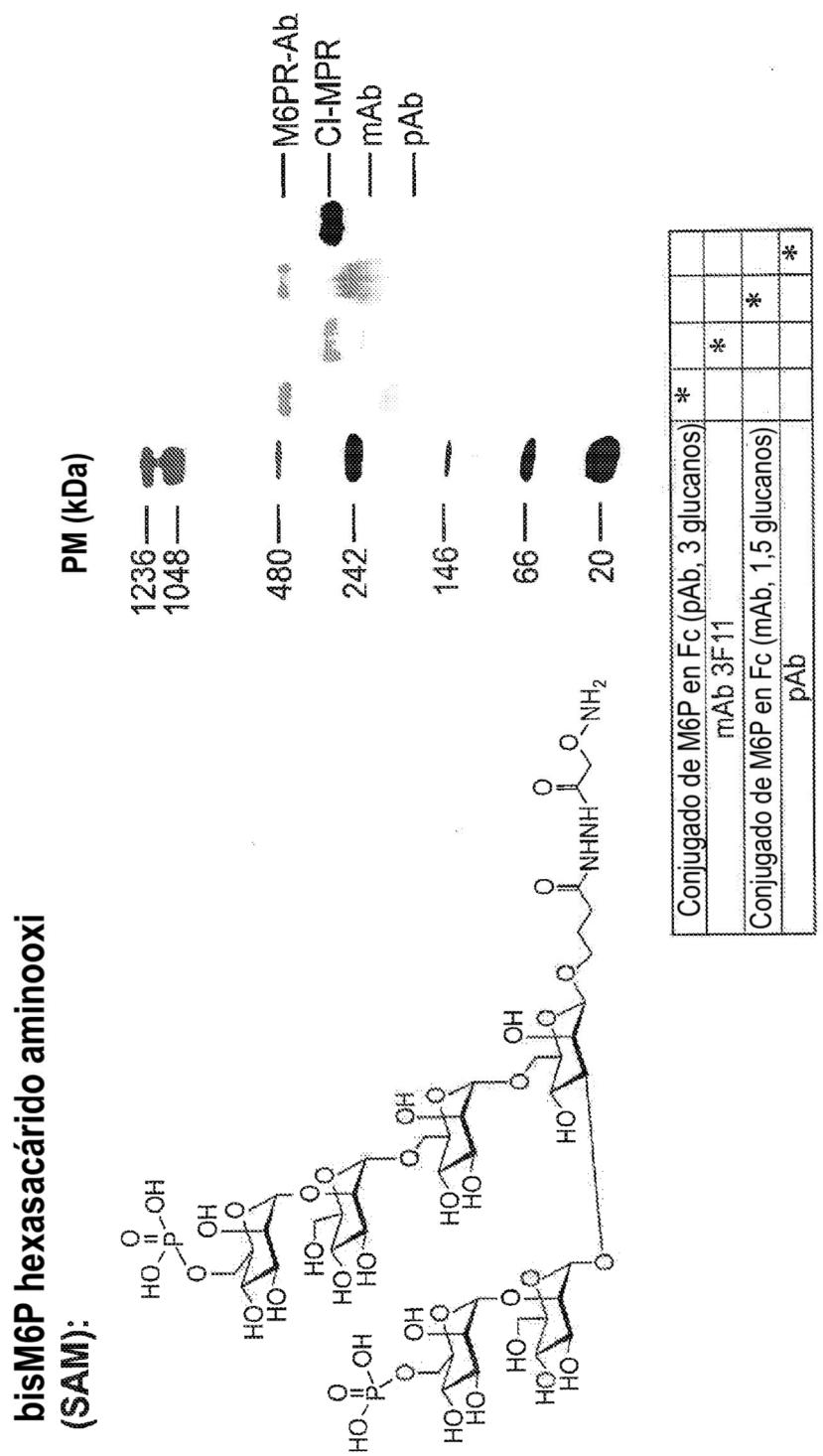


	mol por mol ácido siálico
NNAS	2.4 ± 0
NNAS sialilado	3.7 ± 0.2
NNAS desialilado y galactosilado	0 ± 0

Fig. 52

**Fig. 53**

**Fig. 54**

**Fig. 55**

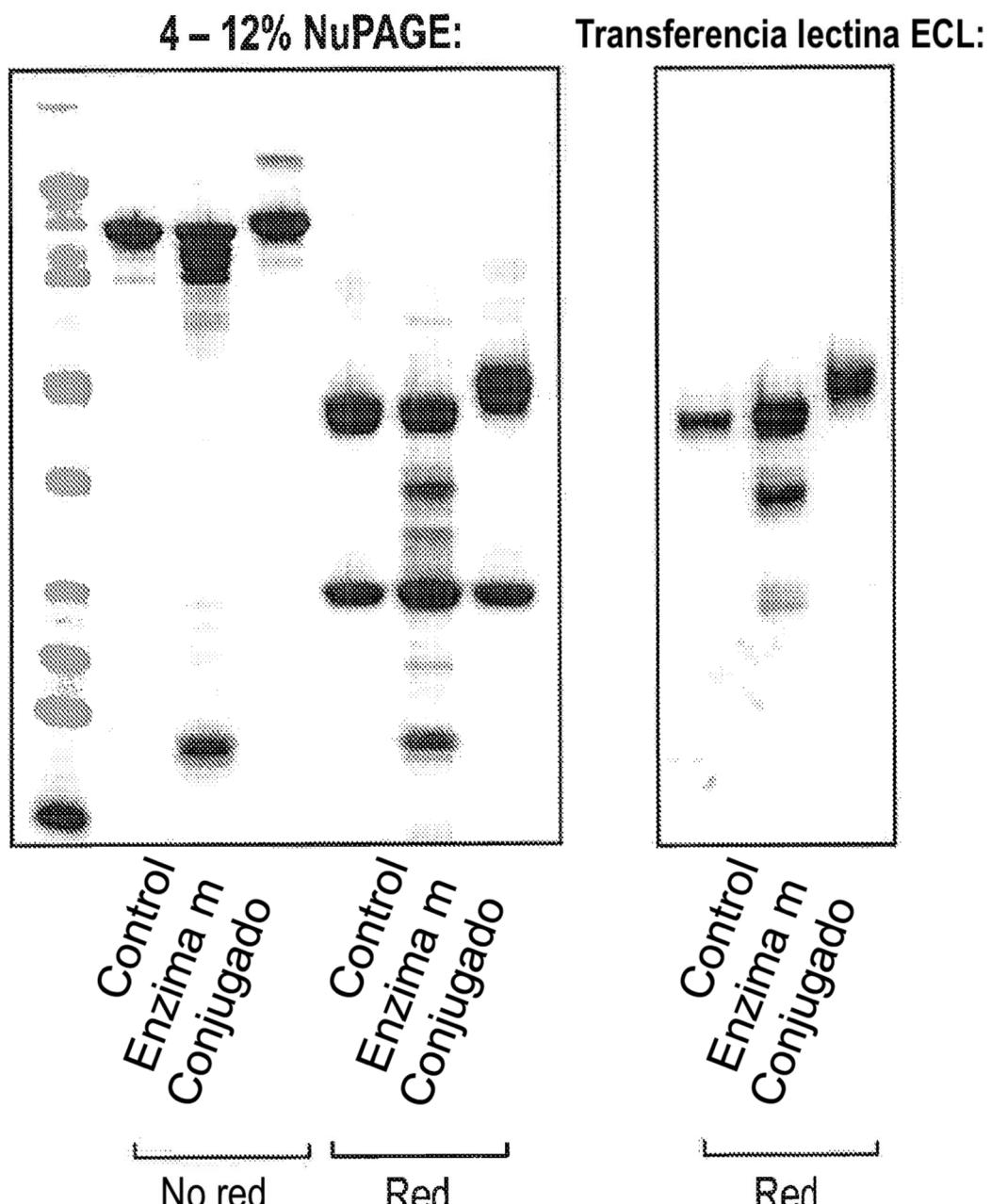
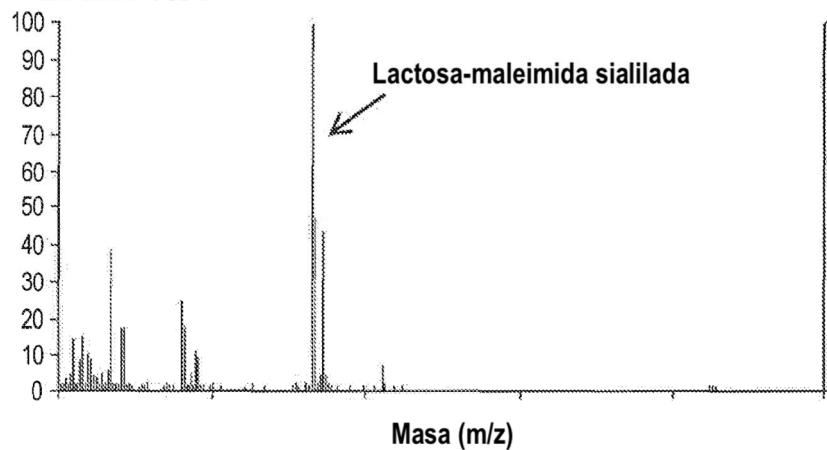
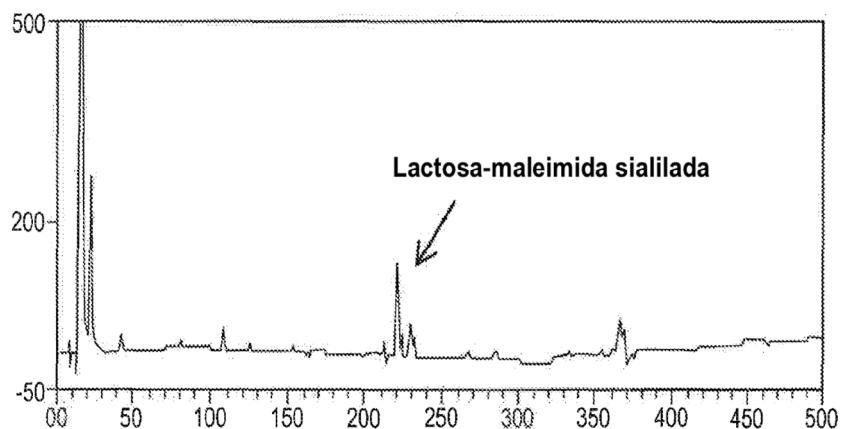


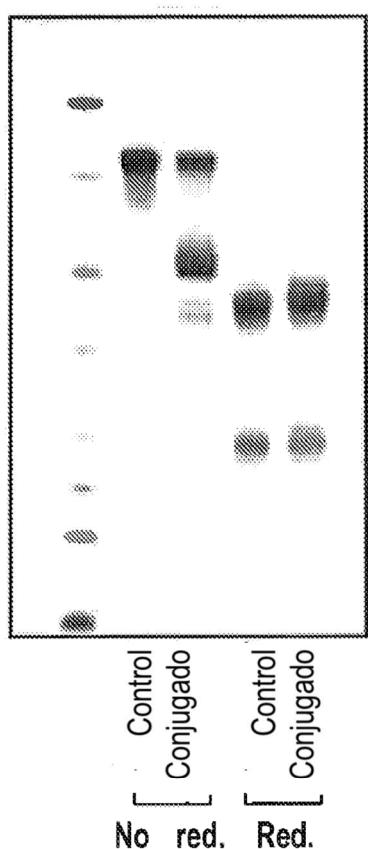
Fig. 56

	mol de galactosa por mol de AB	mol de glucopéptido por mol de AB
NNAS	1.4 + 0	0
NNAS desialilado/galactosilado	7.4 + 0.3	0
Conjugado de NNAS	9.4 + 0	3.1

Fig. 57**MALDI-TOF:****HPLC Dionex:****Fig. 58**

A

4-12% NuPAGE:



B

Análisis de ácido siálico:

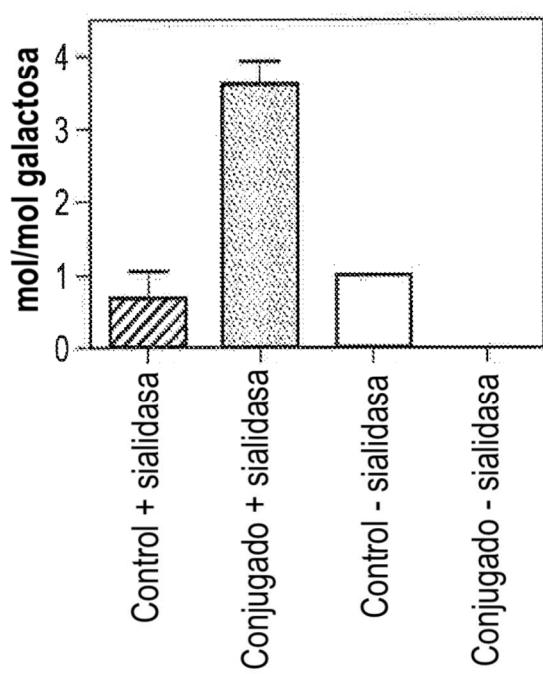


Fig. 59

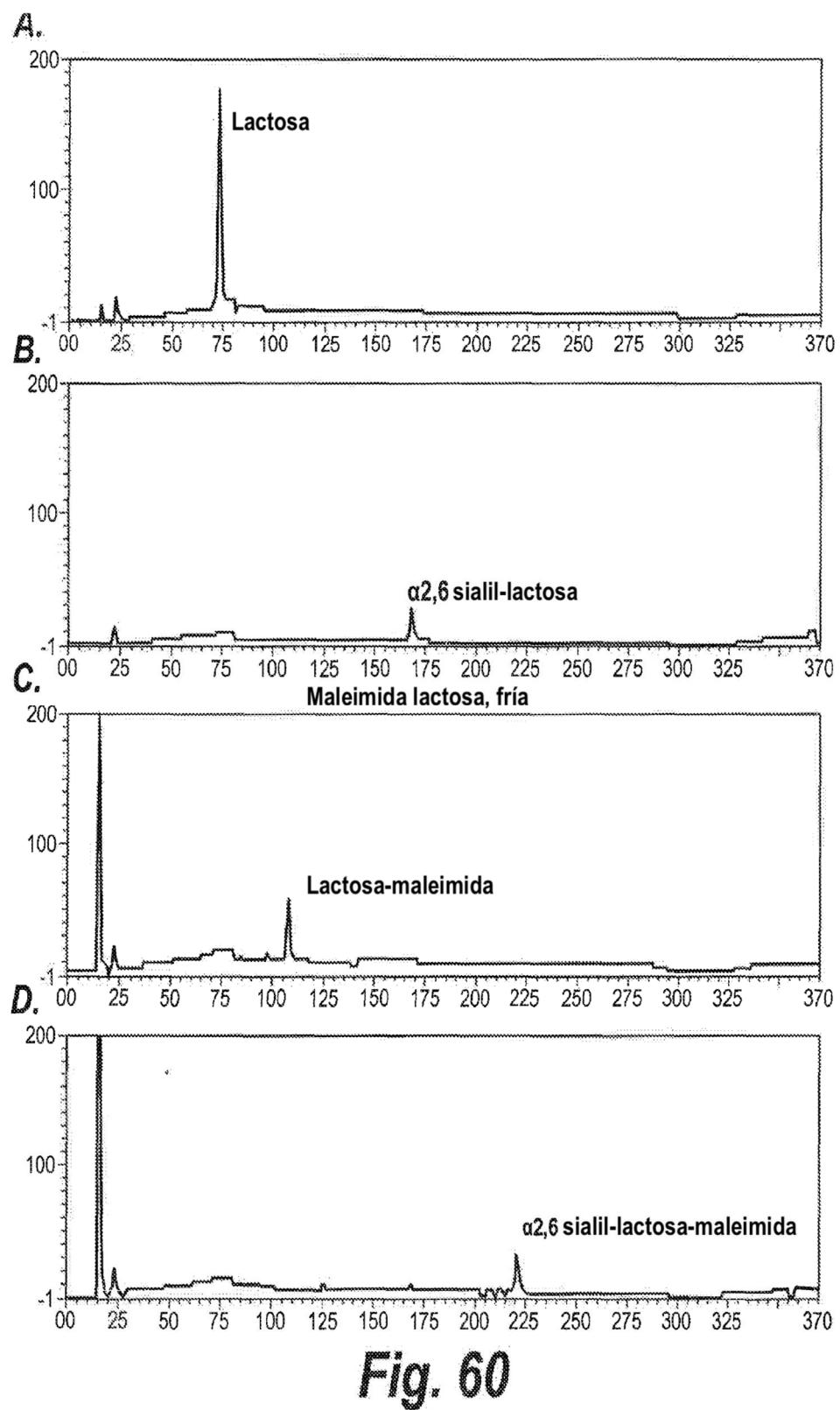


Fig. 60

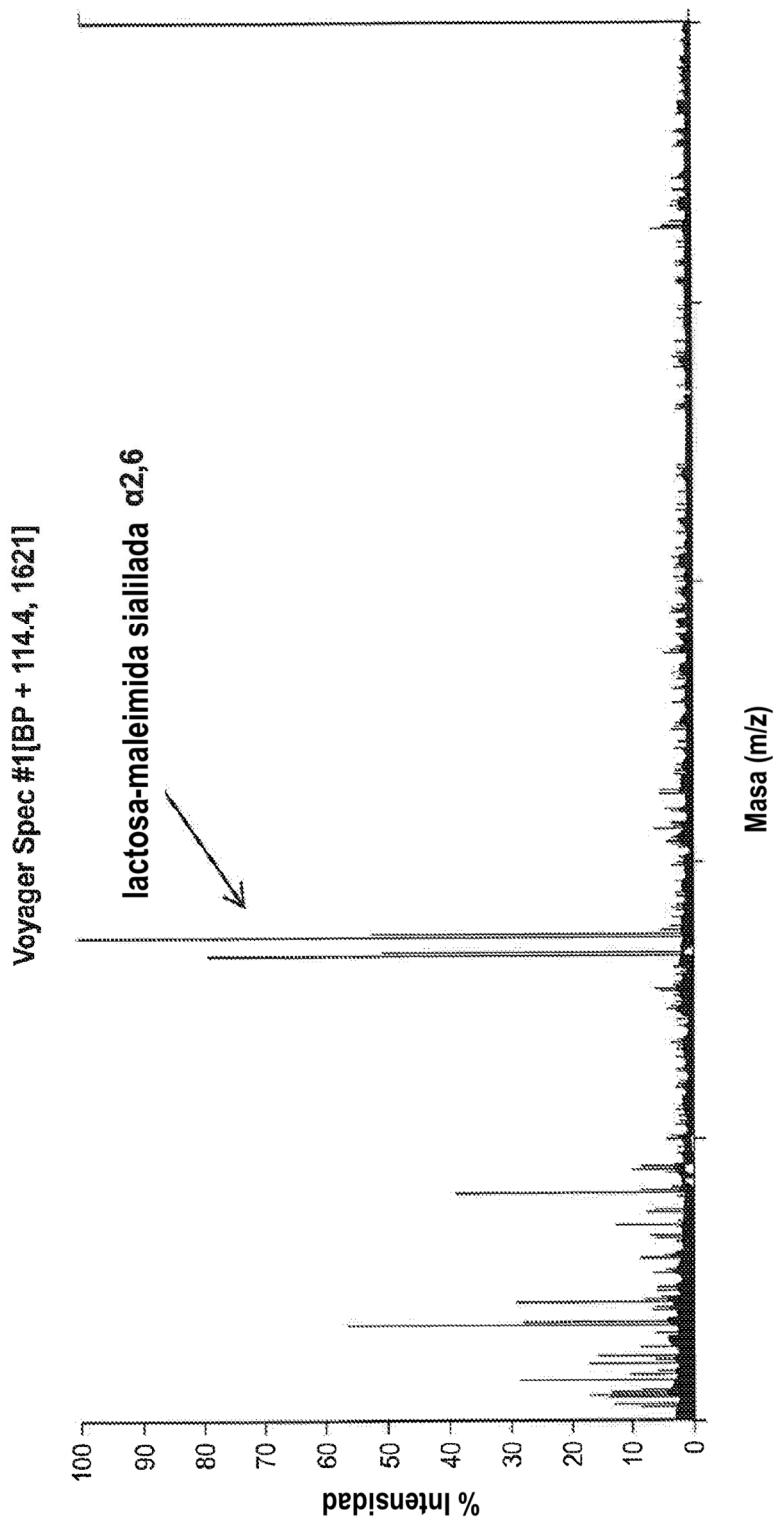
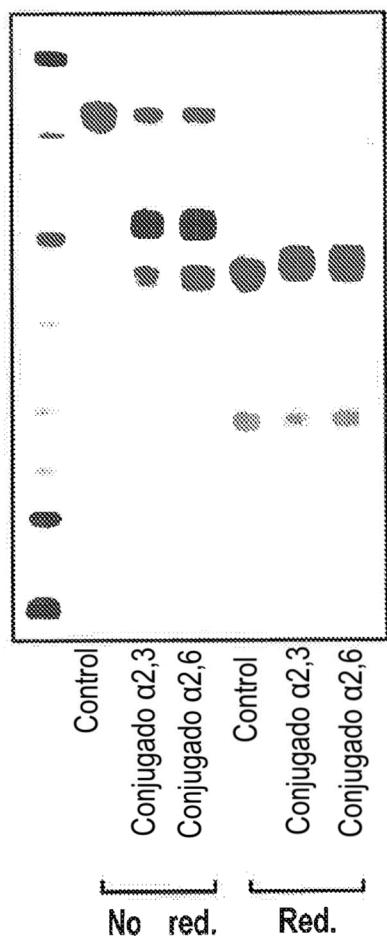
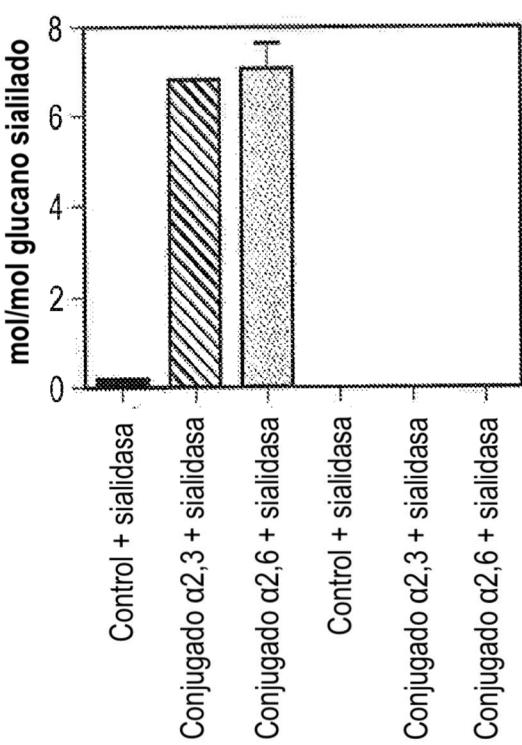


Fig. 61

A.**4-12% NuPAGE:****B.****Análisis de ácido siálico:****Fig. 62**

4 - 12% NuPAGE: Transferencia de lectina ECL:

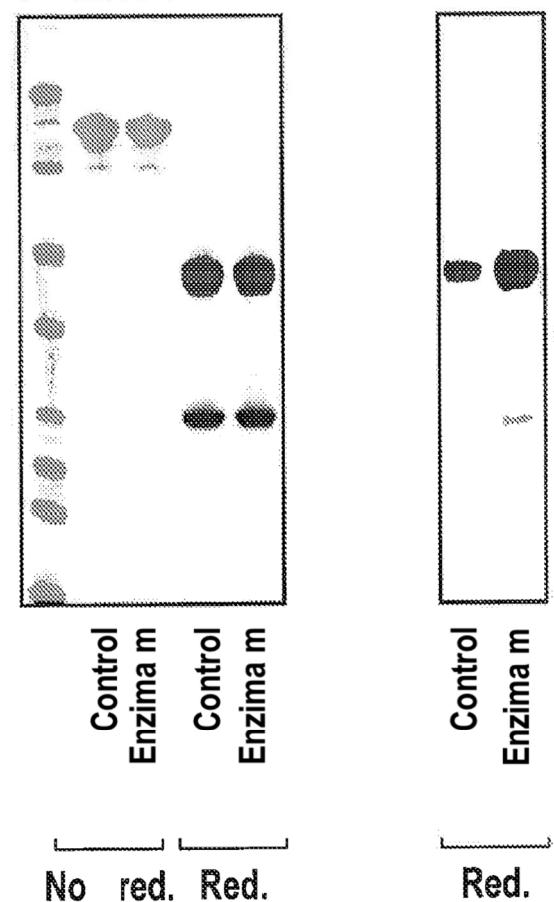


Fig. 63

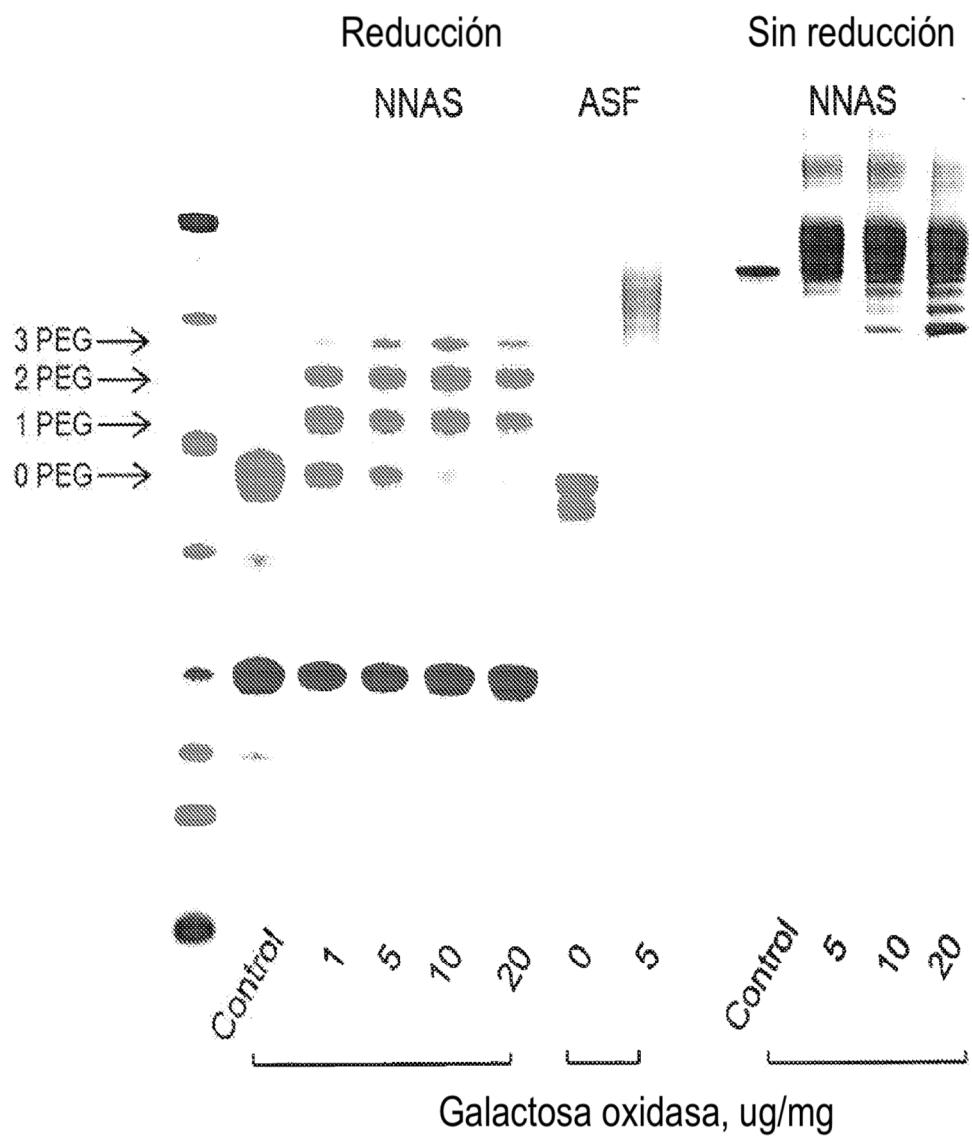


Fig. 64

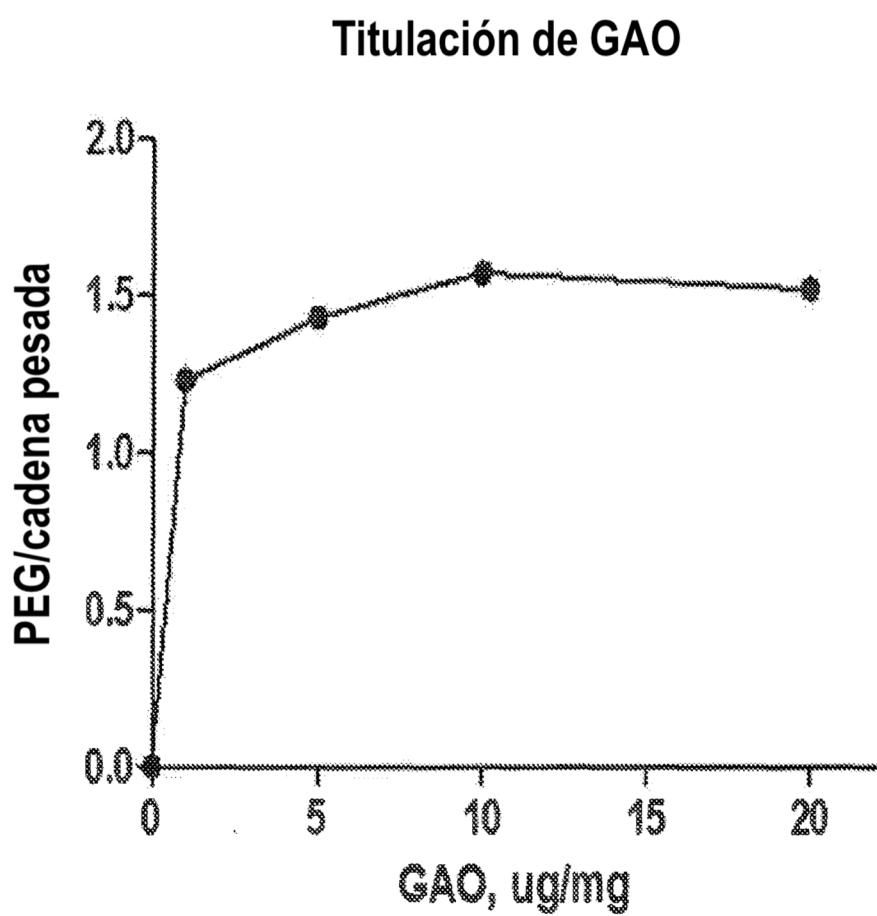


Fig. 65

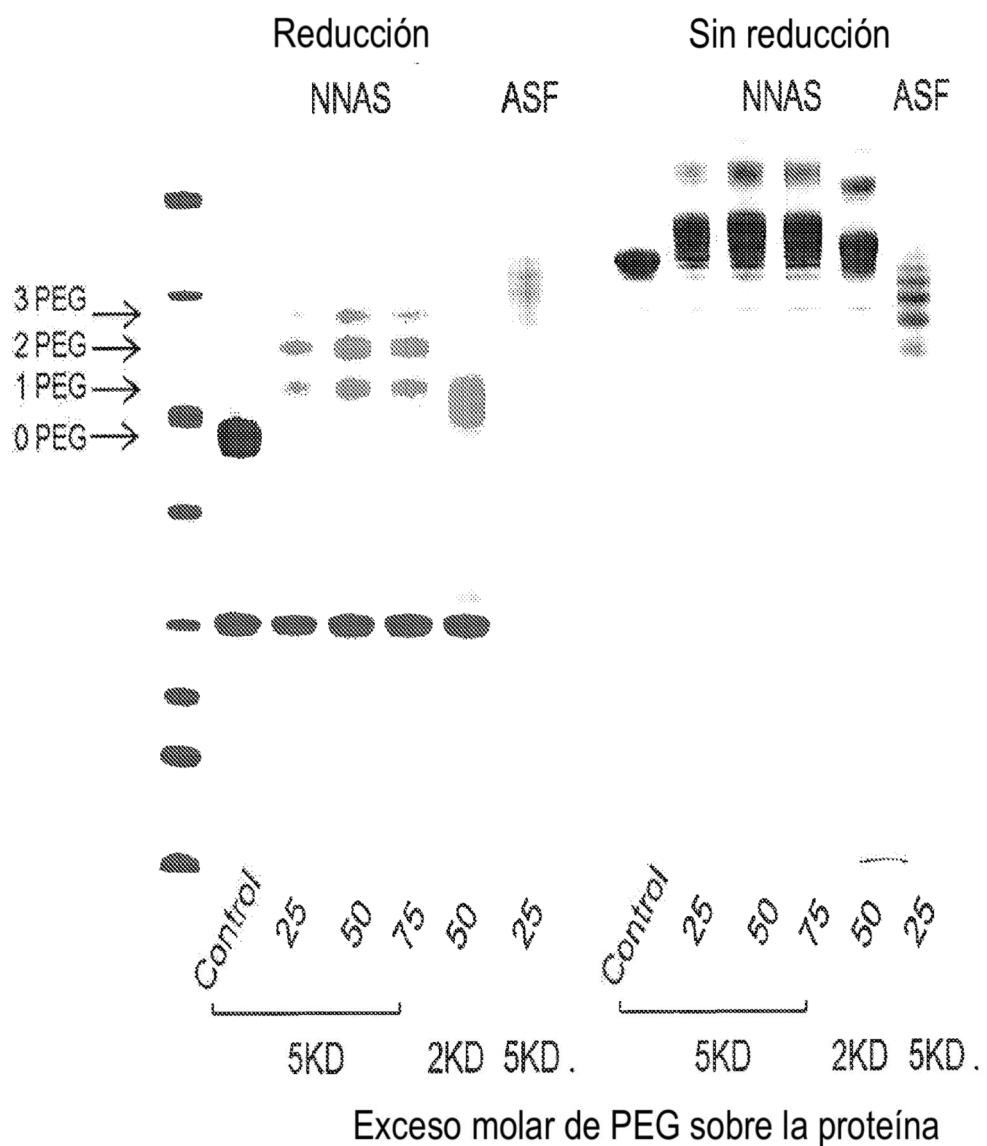


Fig. 66

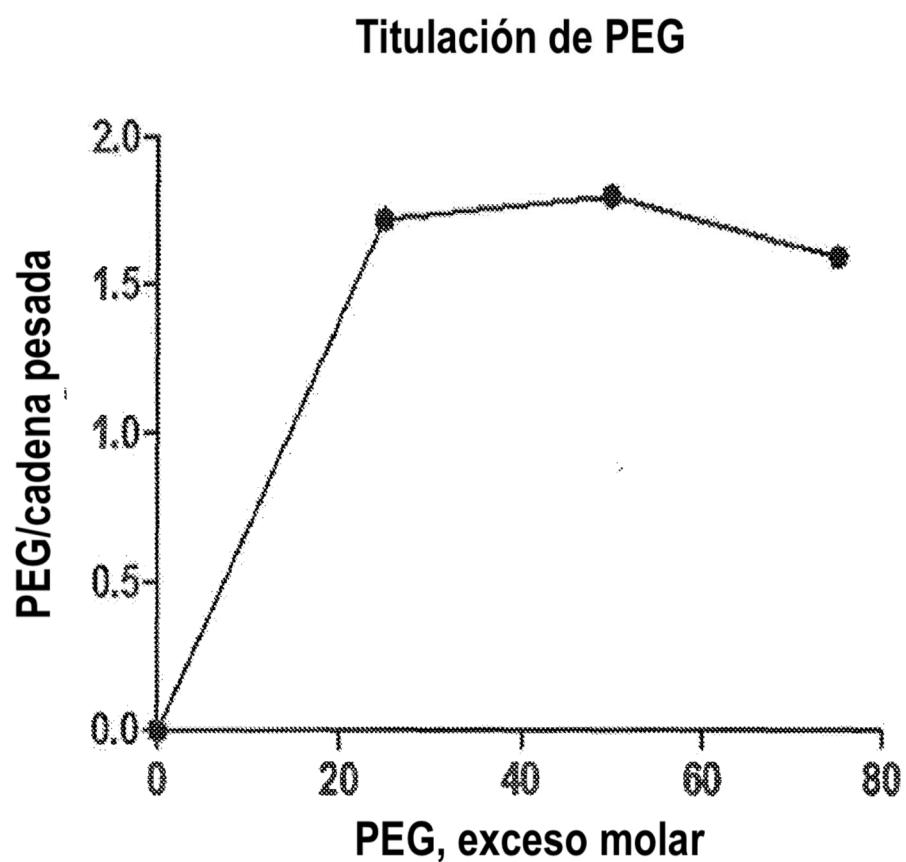
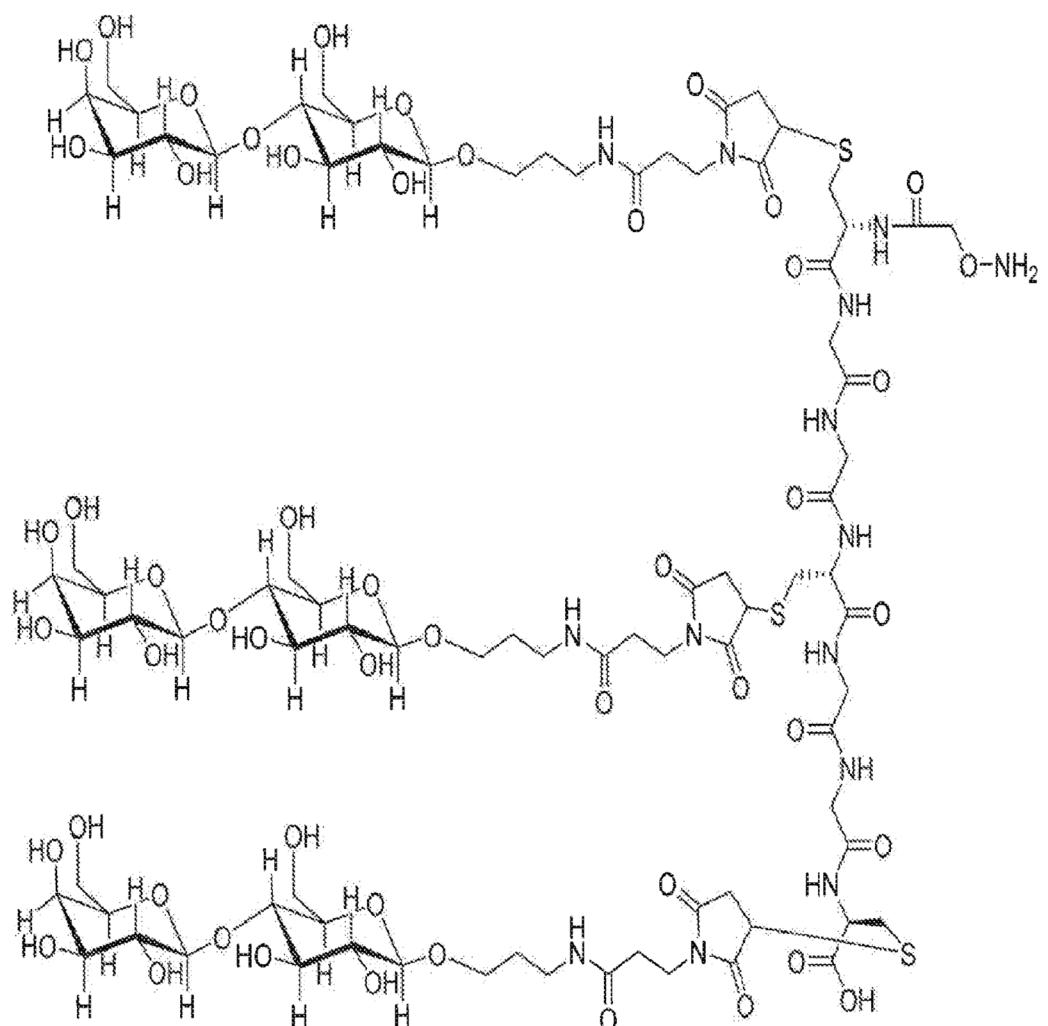


Fig. 67



Glucopéptido aminoxy: lactosa₃-Cys₃-Gly₄

Fig. 68

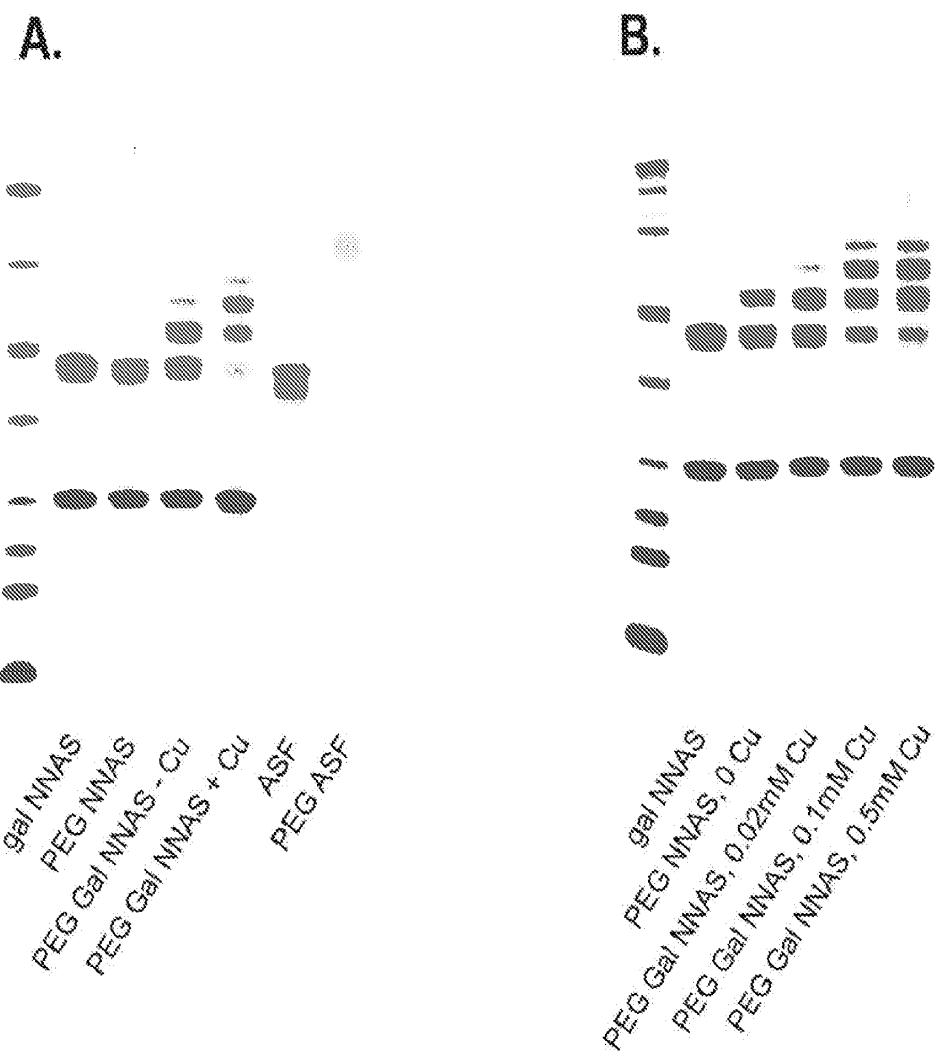


Fig. 69

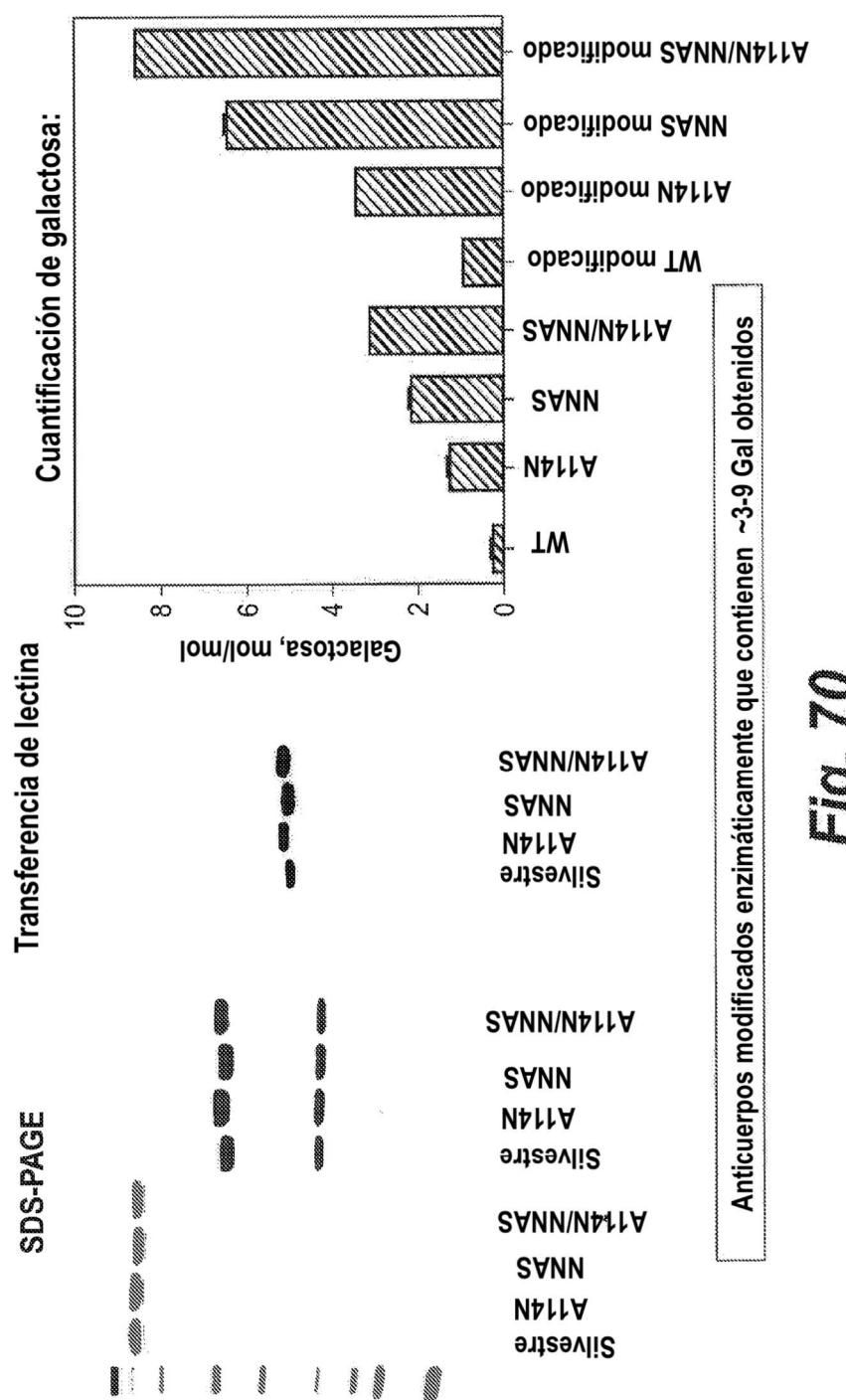


Fig. 70

	Mol por mol, Media \pm SD
Silvestre	0.1 ± 0
A114N	0.5 ± 0
NNAS	2.3 ± 0
A114N/NNAS	2.7 ± 0

Fig. 71

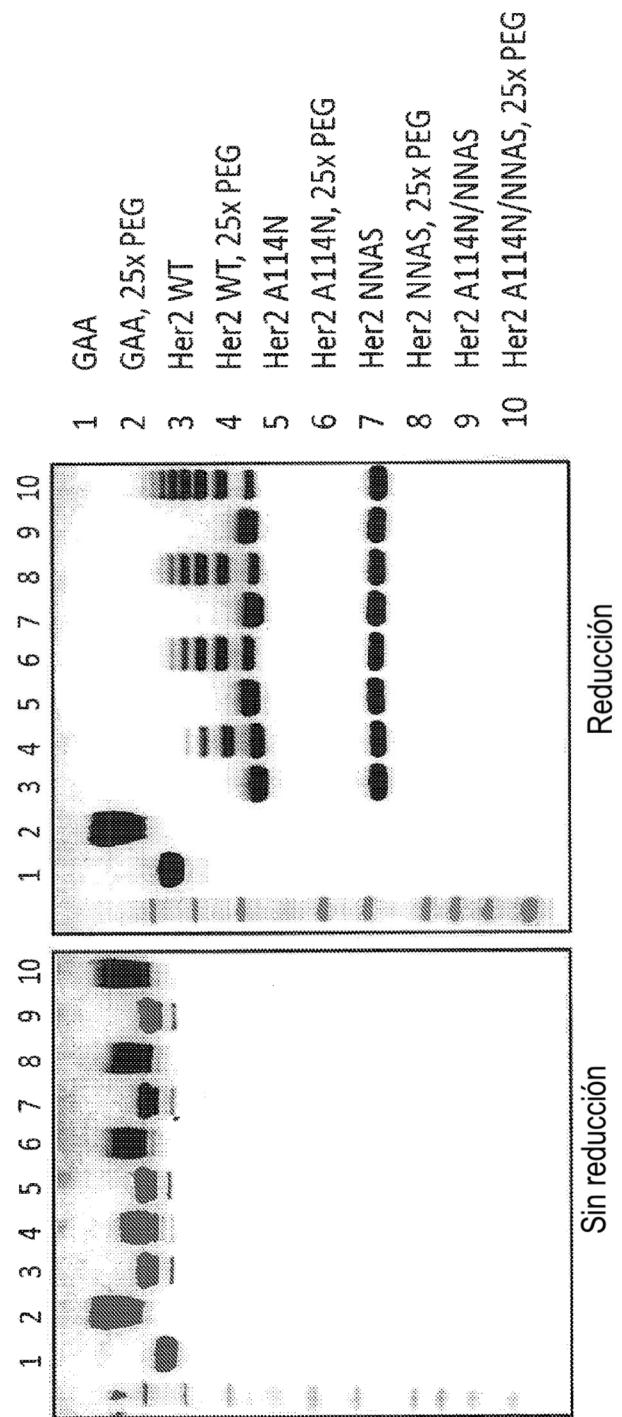


Fig. 72

	Mol por mol, Media + SD
Silvestre	1.4
A114N	2.7
NNAS	3.4
A114N/NNAS	4.6

Fig. 73

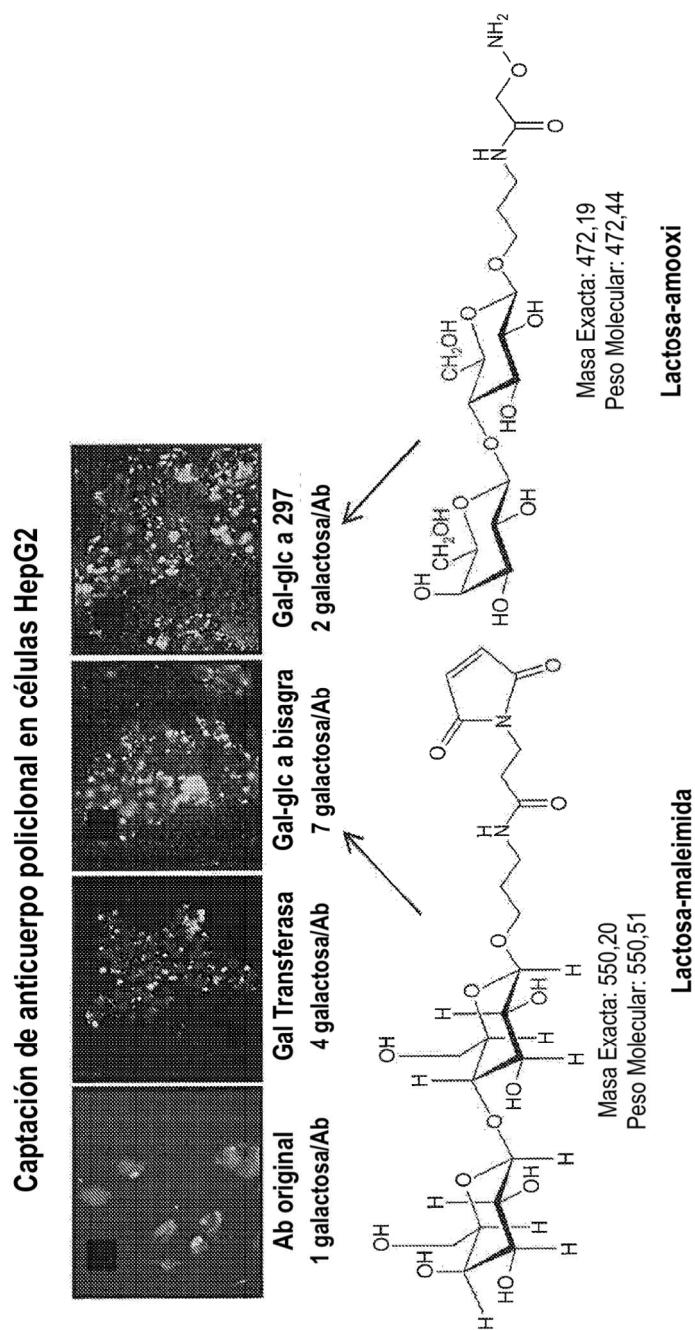


Fig. 74

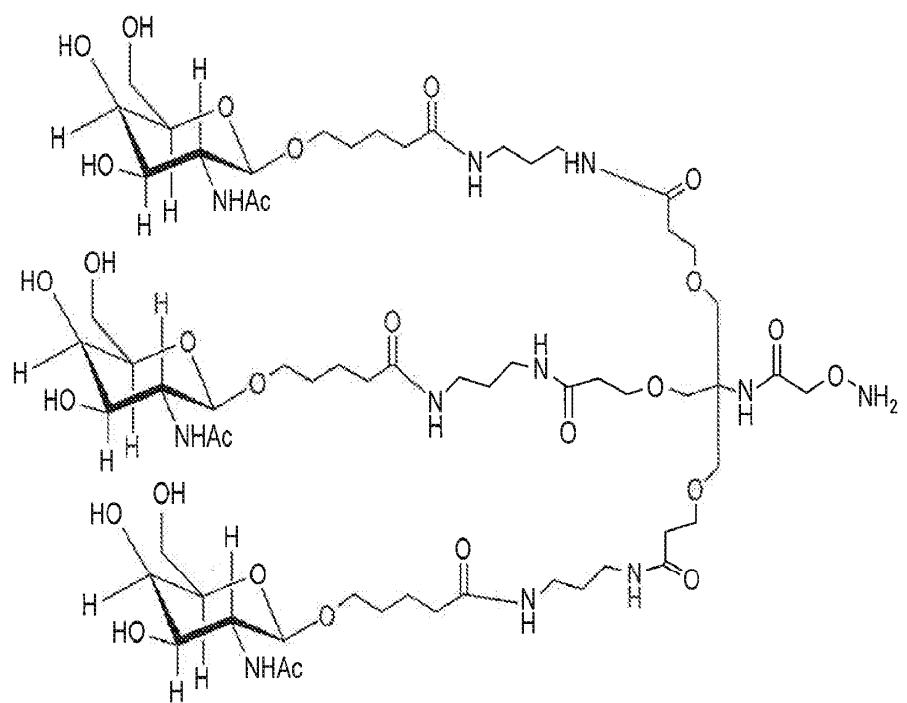


Fig. 75

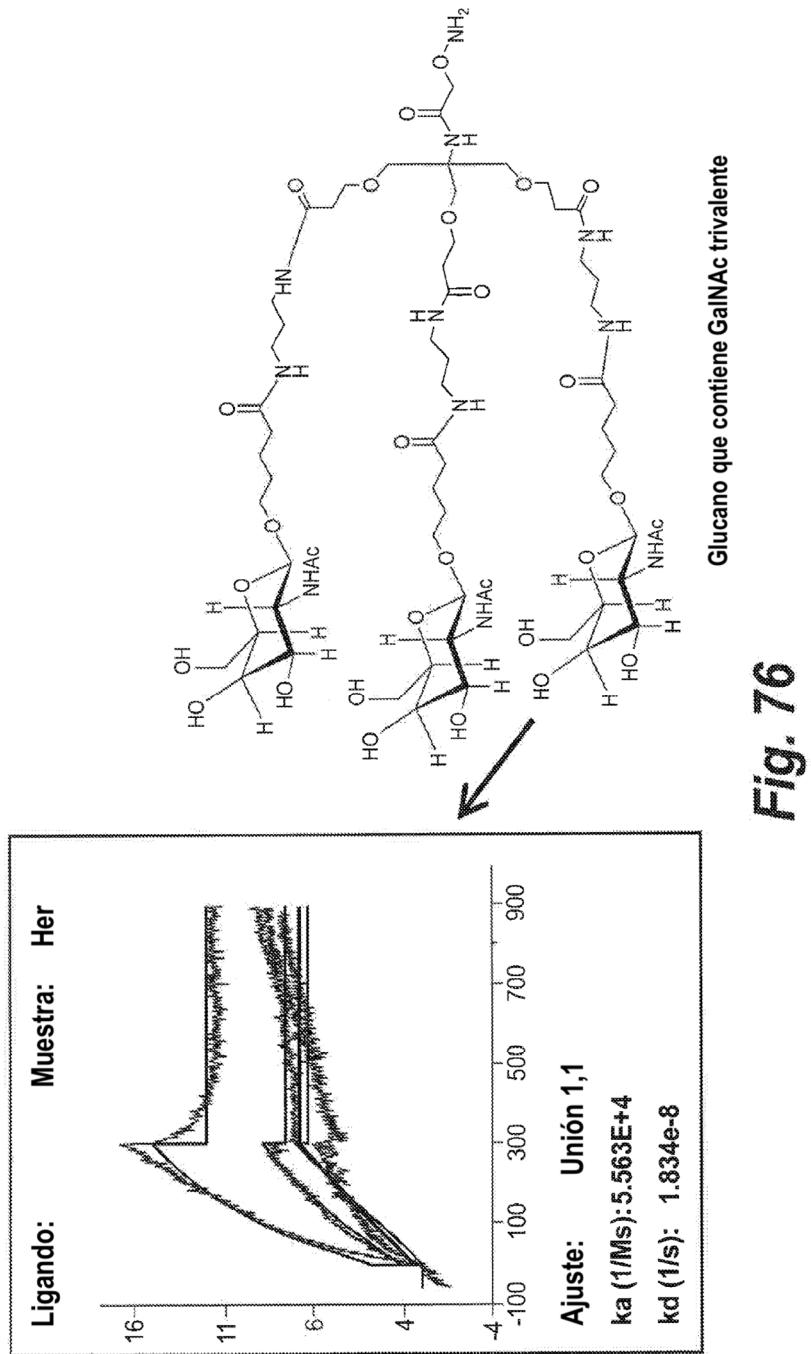
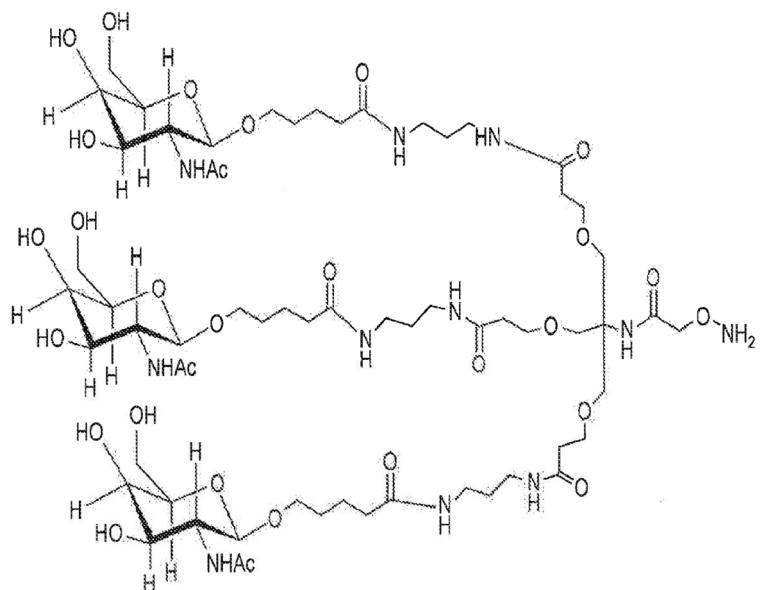
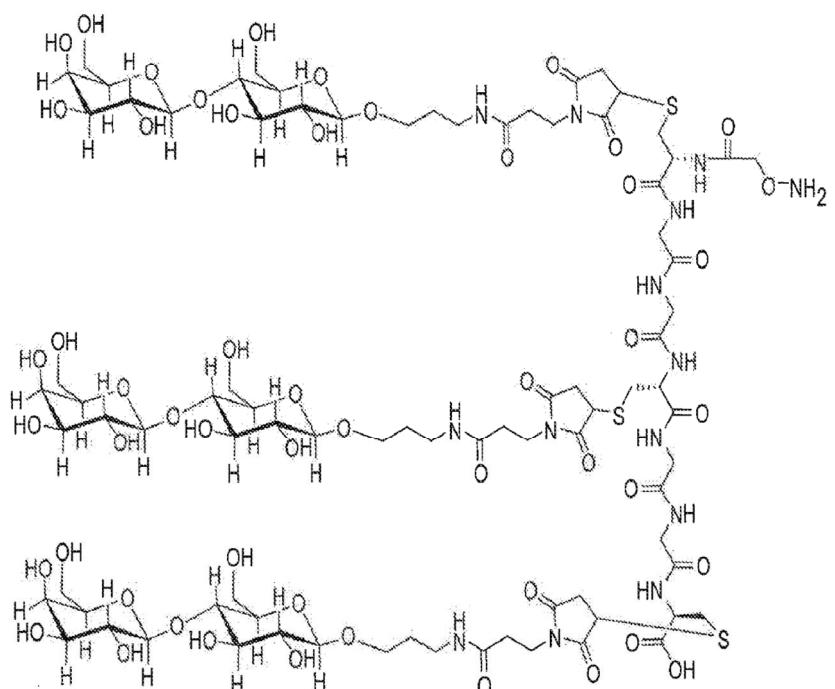


Fig. 76



Glucano que contiene GalNAC trivalente



Glucopéptido que contiene galactosa trivalente

Fig. 77

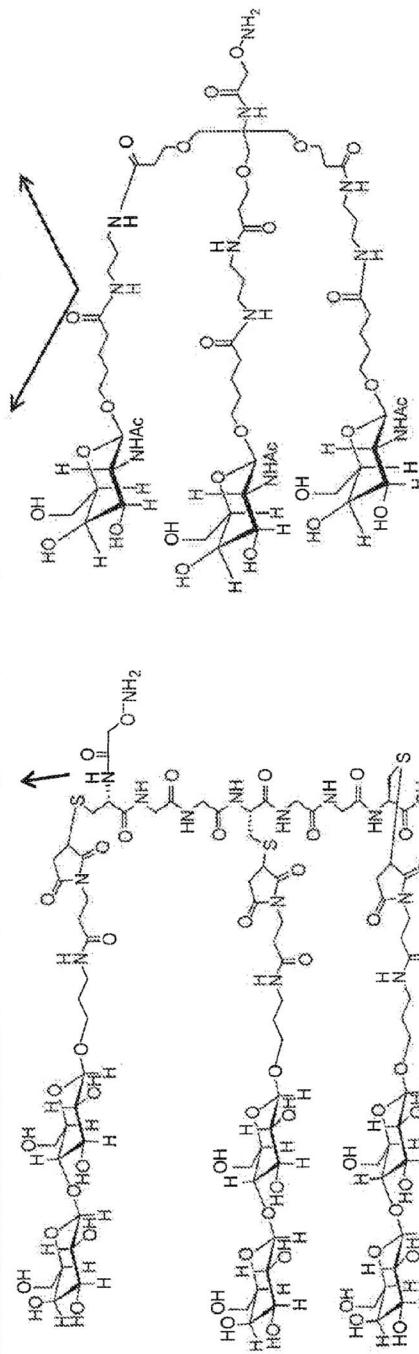
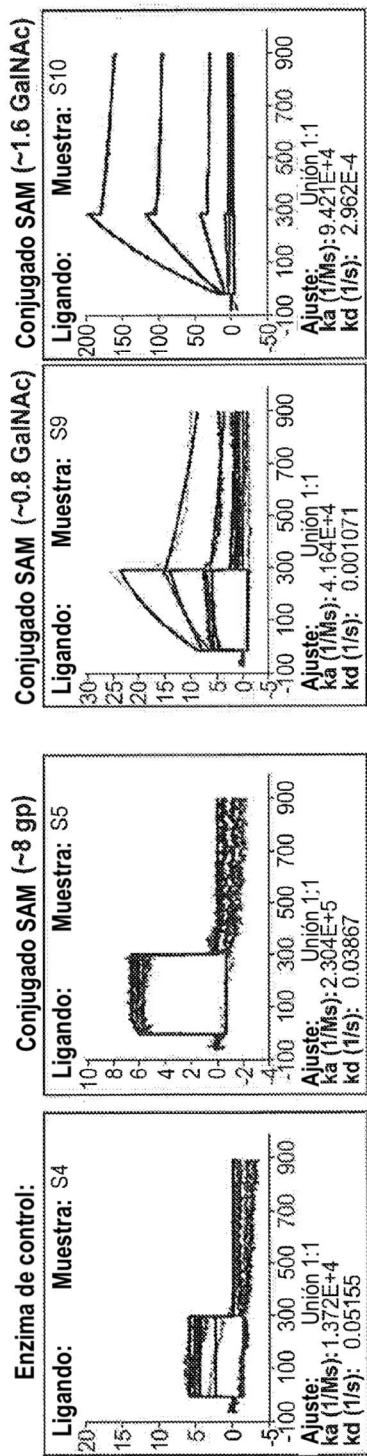
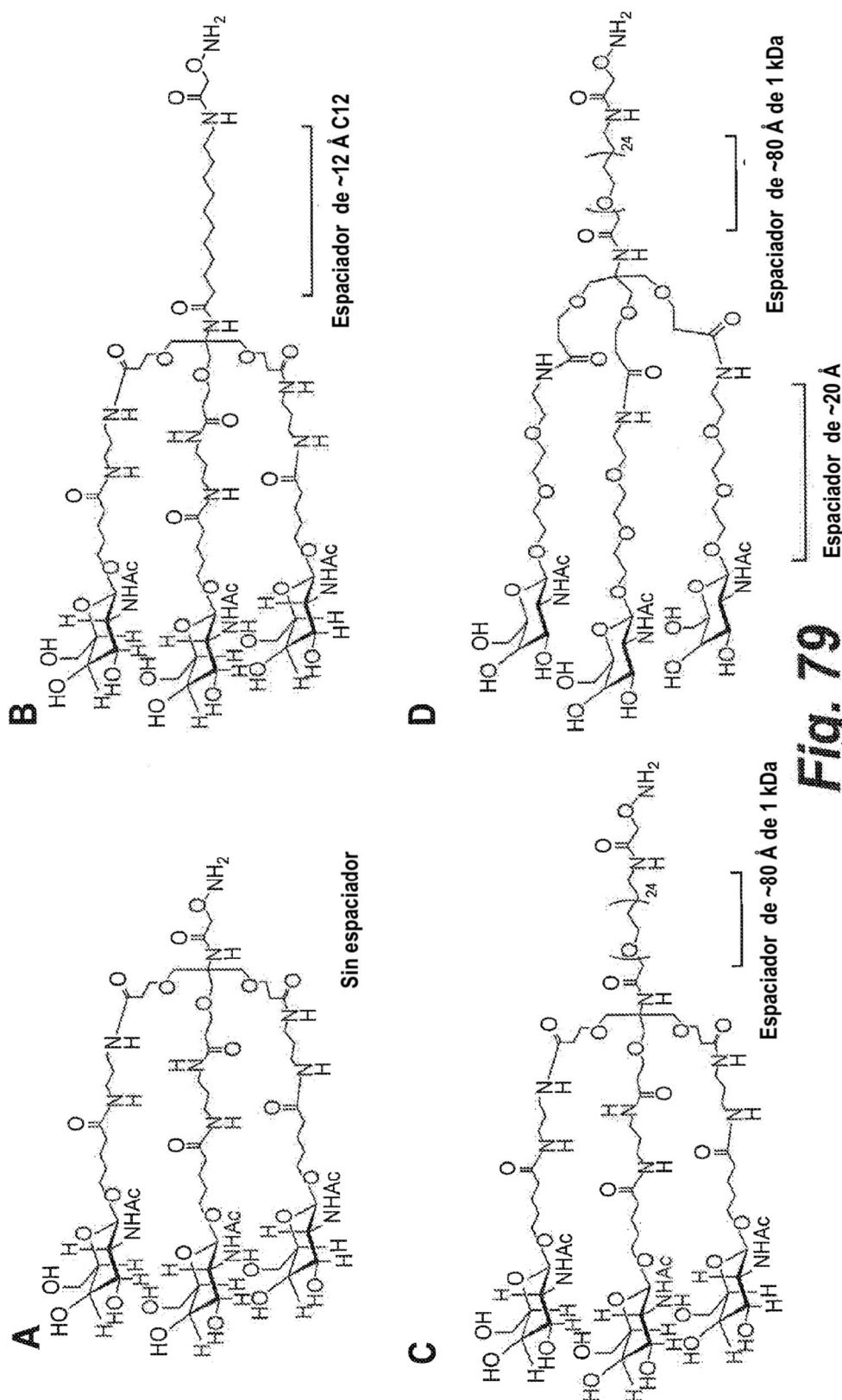
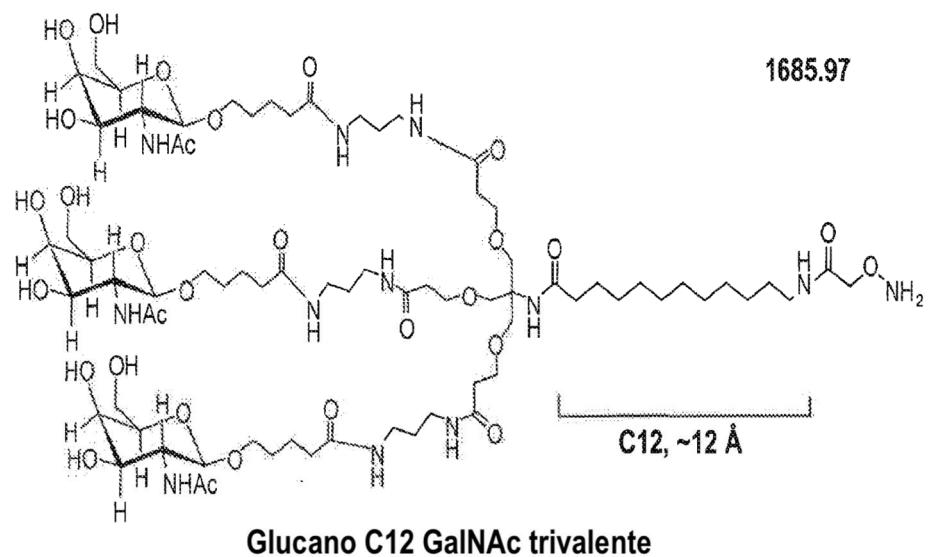


Fig. 78
Glucano que contiene GalNAC trivalente





Análisis por MALDI de proteína intacta

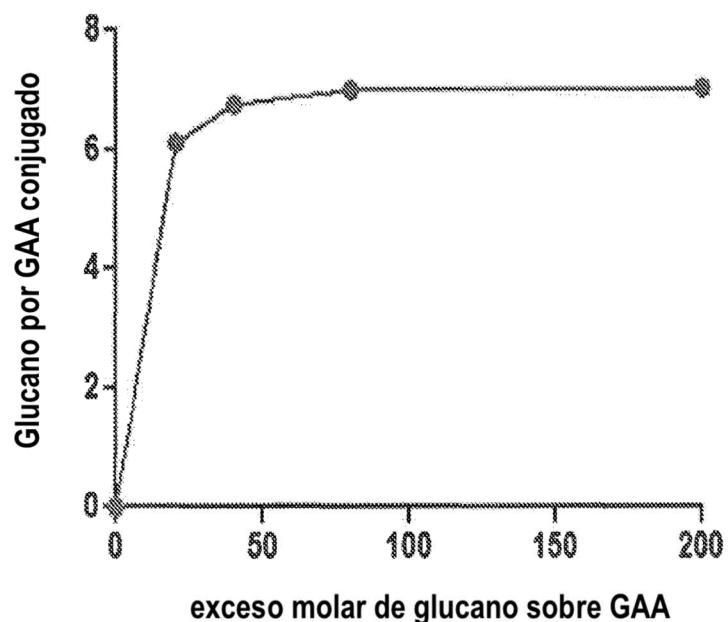


Fig. 80

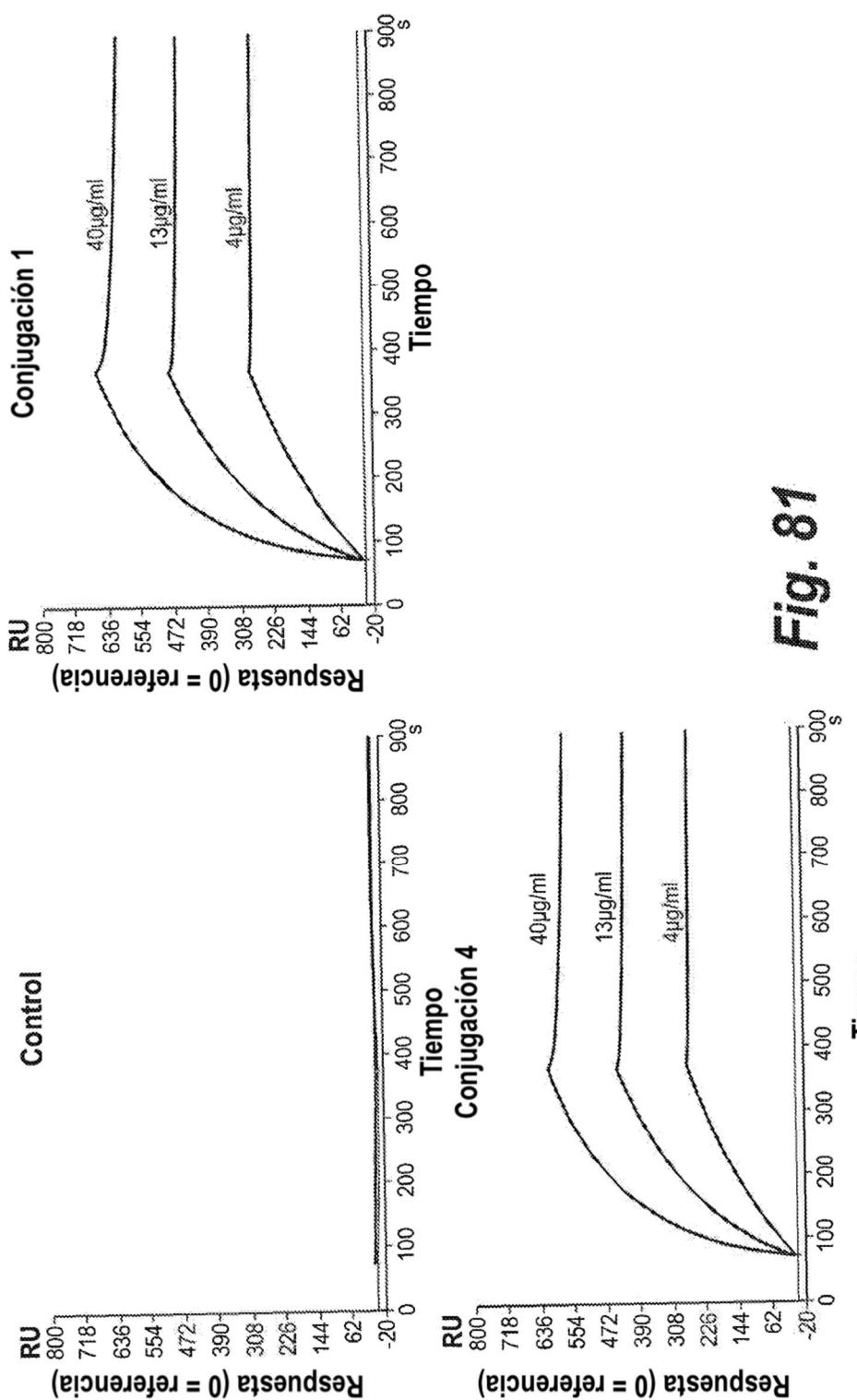


Fig. 81