

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 027 182**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2012** **E 19160722 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2025** **EP 3539982**

54 Título: **Regiones constantes de anticuerpos modificadas por ingeniería genética para conjugación específica del sitio y métodos y usos para las mismas**

30 Prioridad:

23.12.2011 US 201161580169 P

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

13.06.2025

73 Titular/es:

**PFIZER INC. (100.00%)
66 Hudson Boulevard East
New York, NY 10001-2192, US**

72 Inventor/es:

**MARQUETTE, KIMBERLY;
BENNETT, ERIC;
TCHISTIAKOVA, LIUDMILA;
TUMEY, L. NATHAN;
BIKKER, JACK;
CALABRO, VALERIE y
GRAZIANI, EDMUND**

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

Observaciones:

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

ES 3 027 182 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

Regiones constantes de anticuerpos modificadas por ingeniería genética para conjugación específica del sitio y métodos y usos para las mismas

Referencia al listado de secuencias

Esta solicitud se presenta electrónicamente a través de EFS-Web e incluye una lista de secuencias enviada electrónicamente en formato .txt. El archivo .txt contiene una lista de secuencias titulada "PC071868A_Sequence_Listing.txt" creada el 15 de diciembre de 2012 y que tiene un tamaño de 303 kb. La lista de secuencias contenida en este archivo .txt es parte de la memoria descriptiva.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos y fragmentos de los mismos, en donde al menos una región constante está modificada por ingeniería genética para introducir un aminoácido para la conjugación específica del sitio. La invención se refiere además a métodos y usos de los anticuerpos y fragmentos modificados por ingeniería genética para, entre otras cosas, la producción de terapias de conjugados de anticuerpos y fármaco.

Antecedentes de la invención

Más de 1,2 millones de estadounidenses desarrollan cáncer cada año. El cáncer es la segunda causa principal de muerte en los Estados Unidos, diagnosticándose uno de cada dos hombres y una de cada tres mujeres con cáncer en algún momento de su vida.

Aunque se han desarrollado muchos agentes quimioterapéuticos, a menudo demuestran una toxicidad inaceptable y/o falta de especificidad por las células cancerosas con respecto a los tejidos no cancerosos. Para evitar los efectos citotóxicos no específicos de los agentes quimioterapéuticos, la terapia con anticuerpos dirigidos ha revolucionado el tratamiento del cáncer, demostrando varios anticuerpos monoclonales (mAbs) potencial clínico. Debido a que los anticuerpos contra antígenos específicos de tumores a menudo carecen de actividades terapéuticas, se han conjugado con agentes citotóxicos para combinar la eficacia de la quimioterapia con el direccionamiento de los anticuerpos. En principio, el suministro selectivo de agentes citotóxicos a tumores específicos mediante la unión de anticuerpos debería reducir la toxicidad sistémica de los agentes quimioterapéuticos tradicionales de moléculas pequeñas.

Los anticuerpos se han conjugado con una diversidad de fármacos citotóxicos, incluyendo moléculas pequeñas que alquilan el ADN (por ejemplo, duocarmicina y calicheamicina), alteran los microtúbulos (por ejemplo, maitansinoides y auristatinas) o se unen al ADN (por ejemplo, antraciclinas). Uno de estos conjugados de anticuerpos y fármaco (Antibody-Drug Conjugate, ADC) que comprende un anticuerpo anti-CD33 humanizado conjugado con calicheamicina - Mylotarg™ (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth) - fue aprobado en 2000 para la leucemia mieloide aguda. Más recientemente, la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos aprobó Adcetris™ (brentuximab vedotina; Seattle Genetics), un ADC que comprende un anticuerpo quimérico para CD30 conjugado con la auristatina monometil auristatina E (MMAE; también conocida como N-metilvalina-valina-dolaisoleuina-dolaproína-norefedrina) para el tratamiento de linfoma de Hodgkin y linfoma anaplásico de células grandes.

Aunque los ADC son prometedores para la terapia contra el cáncer, los fármacos citotóxicos generalmente se conjugan con los anticuerpos a través de cadenas laterales de lisina o reduciendo los enlaces disulfuro entre cadenas presentes en los anticuerpos para proporcionar grupos sulfhidrilo de cisteína activados. Este enfoque de conjugación no específica, sin embargo, tiene numerosos inconvenientes. No solo es capaz de afectar el plegamiento de proteínas al interrumpir los enlaces de cisteína, la conjugación no específica crea una mezcla heterogénea de anticuerpos que tienen una combinación diversa de proporciones de anticuerpo a fármaco (Antibody-To-Drug Ratios, ADR) y también una mezcla compleja de anticuerpos conjugados en una diversidad de posiciones. Entonces, incluso si de alguna manera fuera posible purificar suficientes anticuerpos que tuvieran una proporción anticuerpo:fármaco deseada, la fracción aún comprendería una mezcla compleja de anticuerpos conjugados en diversas posiciones. Cada especie podría tener potencialmente propiedades terapéuticas distintas, y la consistencia de un lote a otro sería difícil de controlar, todo lo cual presenta obstáculos importantes para el éxito del uso de ADC en la terapia contra el cáncer.

Para intentar evitar los inconvenientes de la conjugación no específica, se han propuesto varios enfoques para proporcionar una conjugación específica del sitio del fármaco con el anticuerpo. Sin embargo, los estudios previos que intentaron proporcionar sitios de conjugación reactivos en anticuerpos han demostrado que la biotina u otras pequeñas moléculas no tóxicas conjugadas con cisteínas modificadas por ingeniería genética en otras posiciones de la IgG1 humana no parecían afectar la unión de los anticuerpos a determinados antígenos. Véanse, por ejemplo, el documento WO 2011/005481 (conjugación biotina-maleimida); el documento WO 2010/141902 (conjugación de variantes de cisteína con colorantes maleimida); y el documento WO 2006/034488 (se realizó la conjugación de biotina-maleimida y todos los ejemplos que describen la conjugación con monometil auristatina E (MMAE; N-metilvalina-valina-dolaisoleucina-dolaproína-norefedrina) y monometil auristatina F (MMAF; también denominada "N-metilvalina-valina-dolaisoleucina-dolaproína-fenilalanina") fueron solo proféticos). Sin embargo, es poco probable que la conjugación de

una pequeña molécula no tóxica como la biotina, como se usaba normalmente en esos estudios, imite el impacto que tiene sobre las propiedades biológicas una molécula de anticuerpo que comprende un enlazador y una molécula citotóxica. Debido a que un anticuerpo de plataforma ADC exitoso debe unirse con éxito a un antígeno diana para suministrar una carga tóxica a una célula diana sin una unión significativa a células no diana, es crucial que los anticuerpos mutantes modificados por ingeniería genética de la invención conserven la capacidad de unión específica mientras se conjugan con una carga tóxica. También es crucial que el ADC pueda suministrar una carga tóxica a una célula diana, internalizarse de esta manera y a continuación liberar la carga útil una vez dentro del compartimento apropiado dentro de la célula. Cada una de estas características necesarias para un ADC exitoso no fue demostrada por estudios previos.

A pesar de los éxitos de los tratamientos contra el cáncer actualmente disponibles, rara vez se observan respuestas completas a estos tratamientos o una supervivencia prolongada, y la población de pacientes refractarios a estos tratamientos todavía es grande. Por lo tanto, existe una necesidad insatisfecha de desarrollar nuevas modalidades terapéuticas, particularmente aquellas capaces de aumentar o potenciar la actividad antitumoral de los agentes antineoplásicos mientras reducen los efectos secundarios citotóxicos de los quimioterapéuticos actuales, y la presente invención satisface esta necesidad.

El documento WO2006034488 divulga anticuerpos modificados por ingeniería genética mediante la sustitución de uno o más aminoácidos de un anticuerpo precursor por otros aminoácidos cisteína no reticulados altamente reactivos.

Sumario de la invención

A continuación se describen realizaciones alternativas de la invención que incluyen dominios constantes novedosos de anticuerpos modificados por ingeniería genética, anticuerpos que los incorporan, conjugados novedosos de anticuerpos y fármaco que comprenden fragmentos de anticuerpos modificados por ingeniería genética y métodos y usos relacionados con los mismos.

La invención se define en las reivindicaciones.

La invención se refiere a un polipéptido de dominio constante de cadena ligera kappa humana (Ck) modificado por ingeniería genética, o una porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos para introducir un resto de cisteína útil para la conjugación, ubicándose dicha al menos una sustitución en K183 de acuerdo con el sistema de numeración de índice de EU establecido en Kabat *et al.* (1991, Publicación del NIH 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, VA) y también de acuerdo con la numeración secuencial relativa a la secuencia de SEQ ID NO: 89

El polipéptido Ck modificado por ingeniería genética de la invención puede comprender SEQ ID NO:92.

La invención puede comprender además al menos una sustitución de aminoácidos adicional en una ubicación seleccionada del grupo que consiste en 111 y 210, de acuerdo con la numeración de Kabat.

El polipéptido modificado por ingeniería genética de la invención puede conjugarse con uno o más de un agente citotóxico, un agente citostático, un agente quimioterapéutico, una toxina, un radionucleido, ADN, ARN, ARNip, microARN, un ácido nucleico peptídico, un aminoácido no natural, un péptido, una enzima, una etiqueta fluorescente y biotina, en donde la conjugación es en la cisteína sustituida.

En algunos aspectos de la invención, el agente citotóxico se conjuga al polipéptido a través de un enlazador.

En algunos aspectos de la invención, en donde el enlazador puede seleccionarse del grupo que consiste en mc (maleimidocaproilo), val-cit (valina-citrulina), mc-val-cit (maleimidocaproil-valina-citrulina), mc-val-cit-PABC (maleimidocaproil-valina-citrulina-*p*-aminobencilcarbamato), Mal-PEG2C2 (maleimido-[CH₂CH₂[O]₂CH₂CH₂C(=O)]), Mal-PEG3C2 (maleimido-[CH₂CH₂O]₃CH₂CH₂C(=O)) y Mal-PEG6C2 (maleimido-[CH₂CH₂O]₆CH₂CH₂C(=O)).

En algunos aspectos de la invención, en donde el agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste en una auristatina, un maitansinoide y una calicheamicina.

En algunos aspectos de la invención, el enlazador y el agente citotóxico se seleccionan del grupo que consiste en maleimidocaproil-monometil auristatina D (mcMMAD), maleimidocaproil-0101 (mc0101), maleimidocaproil-3377 (mc3377), maleimidocaproil-8261 (mc8261), valina-citrulina-monometil auristatina D (vcMMAD), valina-citrulina-0101 (vc0101), valina-citrulina-3377 (vc3377), valina-citrulina-8261 (vc8261), mcValCitP ABCMMAD (maleimidocaproil-valina-citrulina-monometil auristatina D), mcValCit0101 (maleimidocaproil-valina-citrulina-0101), mcValCit3377 (maleimidocaproil-valina-citrulina-3377), mcValCit8261 (maleimidocaproil-valina-citrulina-8261), Mal-PEG2C2-MMAD, Mal-PEG3C2-MMAD, Mal-PEG6C2-MMAD, Mal-PEG2C2-0101, Mal-PEG3C2-0101, Mal-PEG6C2-0101, Mal-PEG2C2-3377, Mal-PEG3C2-3377 y Mal-PEG6C2-3377, Mal-PEG2C2-8261, Mal-PEG3C2-8261 y Mal-PEG6C2-8261.

La invención se refiere además a un anticuerpo, o a una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende el polipéptido Ck modificado por ingeniería genética de la invención

5 El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de la invención puede comprender además un segundo polipéptido Ck que comprende una secuencia de tipo silvestre.

10 El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de la invención puede comprender además un segundo polipéptido Ck, en donde la al menos una sustitución de aminoácidos del primer polipéptido Ck modificado por ingeniería genética no está presente en el segundo polipéptido Ck modificado por ingeniería genética, y en donde el segundo polipéptido Ck modificado por ingeniería genética comprende al menos una sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada del grupo que consiste en 111 y 210 de acuerdo con la numeración de Kabat.

15 En algunos aspectos de la invención, el segundo polipéptido Ck modificado por ingeniería genética de la invención comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 90 y 95.

20 En algunos aspectos del anticuerpo, o de la porción de unión a antígeno del mismo de la invención, el polipéptido Ck modificado por ingeniería genética comprende además al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada de las posiciones 111, 149, 188, 207 y 210, de la cadena ligera en donde la numeración es de acuerdo con Kabat, y comprende además un polipéptido de dominio pesado constante (Cy) humano modificado por ingeniería genética, o una porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en K246, D249, S254, D265, S267, D270, N276, Y278, E283, R292, E293, E294, Y300, V302, V303, L314, N315, E318, K320, I332, E333, K334, I336, E345, Q347, S354, R355, M358, K360, Q362, K370, Y373, D376, A378, E380, E382, V284, A287, Q386, E388, N390, K392, T393, D401, F404, T411, D413, K414, R416, Q418, Q419, N421, M428, A431, L432, T437, Q438, K439, L443 y S444, de la cadena pesada de acuerdo con el índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63(1):78-85.

30 En algunos aspectos de la invención, el polipéptido Cy modificado por ingeniería genética de la invención puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 97-100, 102, 104, 107-127 y 129-163.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende el polipéptido Ck modificado por ingeniería genética de la invención, o una porción del mismo, o un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo de la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 La invención proporciona además una composición farmacéutica para su uso en un método de tratamiento del cáncer, enfermedades o trastornos autoinmunitarios, inflamatorios o infecciosos en un sujeto que lo necesite.

40 La invención proporciona además un ácido nucleico que codifica el polipéptido Ck modificado por ingeniería genética, o una porción del mismo de la invención, o el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo.

La invención proporciona además una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico de la invención.

45 La invención proporciona además un método para producir un polipéptido Ck modificado por ingeniería genética, o una porción del mismo, o un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende incubar la célula hospedadora de la invención en condiciones adecuadas para expresar el polipéptido Ck modificado por ingeniería genética, o una porción del mismo, o el anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, y aislar el polipéptido Ck modificado por ingeniería genética, o una porción del mismo, o el anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo.

50 La divulgación n incluye un polipéptido de dominio constante de anticuerpo modificado por ingeniería genética, o una porción del mismo, en donde el dominio constante modificado por ingeniería genética comprende al menos una sustitución de aminoácidos para introducir un resto de cisteína útil para la conjugación, en donde el polipéptido de dominio constante es:

55 (a) un polipéptido de dominio constante de cadena pesada (Cy) de IgG humana modificado por ingeniería genética, o una porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en K246, D249, D265, S267, D270, N276, Y278, E283, R292, E293, E294, Y300, V302, V303, L314, N315, E318, K320, I332, E333, K334, I336, E345, Q347, S354, R355, M358, K360, Q362, K370, Y373, D376, A378, E380, E382, Q386, E388, N390, K392, T393, D401, F404, T411, D413, K414, R416, Q418, Q419, N421, M428, A431, L432, T437, Q438, K439, L443 y S444, de acuerdo con el índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63(1):78-85.;

60 (b) un polipéptido de dominio constante de cadena ligera lambda humana (Cλ) modificado por ingeniería genética, o una porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en K110, A111, L125, K149C, V155, G158, T161, Q185, S188, H189, S191, T197, V205, E206, K207, T208 y A210, de acuerdo con la numeración de Kabat;

(c) un polipéptido de dominio constante de cadena ligera kappa humana (C_K) modificado por ingeniería genética o porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en A111, K183 y N210, de acuerdo con la numeración de Kabat;

5 (d) un polipéptido C_Y modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97-100, 102, 104, 107-127 y 129-163;

10 (e) un polipéptido C_K modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90, 92, 95, 164, 166 y 169; y

15 (f) un polipéptido C_L modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 172-186.

En un aspecto, el polipéptido C_Y modificado por ingeniería genética comprende además al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en una mutación en la posición de aminoácidos 284, 287, A327, N384, L398 y V422, de acuerdo con el índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63(1):78-85.

20 En otro aspecto, el polipéptido C_Y modificado por ingeniería genética comprende uno o más de los siguientes pares de sustituciones de aminoácidos: a) E380 y L443; b) L398 y L443; c) V422 y L443; d) E380 y L398; e) L398 y V422; f) E380 y V422; g) K392 y L443; h) F404 y L443; y i) K392 y F404.

25 La divulgación también proporciona polipéptidos C_Y modificados por ingeniería genéticas que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en (a) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:99 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:107; (b) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:103 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:107; (c) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:105 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:107; (d) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:99 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:103; (e) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:103 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:105; (f) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:99 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:105; (g) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:102 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:107; (h) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:104 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:107; y (i) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:102 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:104.

35 En otro aspecto, el polipéptido C_Y modificado por ingeniería genética se selecciona de una subclase de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

40 En otro aspecto más, el polipéptido de dominio constante de anticuerpo modificado por ingeniería genética, o una porción del mismo, está conjugado a uno o más de un agente citotóxico, un agente citostático, un agente quimioterapéutico, una toxina, un radionucleido, ADN, ARN, ARNip, microARN, un ácido nucleico peptídico, un aminoácido no natural, un péptido, una enzima, una etiqueta fluorescente y biotina, en donde la conjugación es en la cisteína sustituida.

45 En un aspecto adicional, el agente citotóxico se conjuga al polipéptido a través de un enlazador.

Incluso en un aspecto adicional, el enlazador se selecciona del grupo que consiste en mc (maleimidocaproilo), val-cit (valina-citrulina), mc-val-cit (maleimidocaproil-valina-citrulina), mc-val-cit-PABC (maleimidocaproil-valina-citrulina-*p*-aminobencilcarbamato), Mal-PEG2C2 (maleimido-[CH₂CH₂O]₂CH₂CH₂C(=O)), Mal-PEG3C2 (maleimido-[CH₂CH₂O]₃CH₂CH₂C(=O)) y Mal-PEG6C2 (maleimido-[CH₂CH₂O]₆CH₂CH₂C(=O)).

50 En otro aspecto, el agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste en una auristatina, un maitansinoide y una calicheamicina.

55 En un aspecto, el enlazador y el agente citotóxico se seleccionan del grupo que consiste en maleimidocaproil-monometil auristatina D (mcMMAD), maleimidocaproil-0101 (mc0101), maleimidocaproil-3377 (mc3377), maleimidocaproil-8261 (mc8261), valina-citrulina-monometil auristatina D (vcMMAD), valina-citrulina-0101 (vc0101), valina-citrulina-3377 (vc3377), valina-citrulina-8261 (vc8261), mcValCitPABCMMD (maleimidocaproil-valina-citrulina-monometil auristatina D), mcValCit0101 (maleimidocaproil-valina-citrulina-0101), mcValCit3377 (maleimidocaproil-valina-citrulina-3377), mcValCit8261 (maleimidocaproil-valina-citrulina-8261), Mal-PEG2C2-MMAD, Mal-PEG3C2-MMAD, Mal-PEG6C2-MMAD, Mal-PEG2C2-0101, Mal-PEG3C2-0101, Mal-PEG6C2-0101, Mal-PEG2C2-3377, Mal-PEG3C2-3377 y Mal-PEG6C2-3377, Mal-PEG2C2-8261, Mal-PEG3C2-8261 y Mal-PEG6C2-8261.

65 En otro aspecto, la invención incluye un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende un polipéptido C_Y modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en K246, D249, D265, S267, D270, N276, Y278, E283, R292, E293,

E294, Y300, V302, V303, L314, N315, E318, K320, I332, E333, K334, I336, E345, Q347, S354, R355, M358, K360, Q362, K370, Y373, D376, A378, E380, E382, Q386, E388, N390, K392, T393, D401, F404, T411, D413, K414, R416, Q418, Q419, N421, M428, A431, L432, T437, Q438, K439, L443 y S444, de acuerdo con el índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63(1):78-85

La divulgación proporciona un polipéptido de dominio constante de cadena ligera lambda humana (λ) modificado por ingeniería genética, o una porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en K110, A111, L125, K149C, V155, G158, T161, Q185, S188, H189, S191, T197, V205, E206, K207, T208 y A210, de acuerdo con la numeración de Kabat.

La divulgación proporciona un polipéptido de dominio constante de cadena ligera kappa humana (κ) modificado por ingeniería genética o porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en A111, K183 y N210, de acuerdo con la numeración de Kabat.

La divulgación proporciona un polipéptido $C\gamma$ modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en K246, D249, D265, S267, D270, N276, Y278, E283, R292, E293, E294, Y300, V302, V303, L314, N315, E318, K320, I332, E333, K334, I336, E345, Q347, S354, R355, M358, K360, Q362, K370, Y373, D376, A378, E380, E382, Q386, E388, N390, K392, T393, D401, F404, T411, D413, K414, R416, Q418, Q419, N421, M428, A431, L432, T437, Q438, K439, L443 y S444, de acuerdo con el índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63(1):78-85, donde el anticuerpo comprende además un polipéptido λ , o porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en K110, A111, L125, K149C, V155, G158, T161, Q185, S188, H189, S191, T197, V205, E206, K207, T208 y A210, de acuerdo con la numeración de Kabat, y comprende además un polipéptido κ , o porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en A111, K183 y N210, de acuerdo con la numeración de Kabat.

La divulgación proporciona un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende un polipéptido λ modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en K110, A111, L125, K149C, V155, G158, T161, Q185, S188, H189, S191, T197, V205, E206, K207, T208 y A210, de acuerdo con la numeración de Kabat.

En un aspecto, la invención incluye un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende un polipéptido κ modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos para introducir un resto de cisteína útil para la conjugación, ubicándose dicha al menos una sustitución en K183 de acuerdo con el sistema de numeración de índice de EU establecido en Kabat *et al.* (1991, Publicación del NIH 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, VA) y también de acuerdo con la numeración secuencial relativa a la secuencia de SEQ ID NO: 89 y además

que comprende un dominio constante modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, en donde el dominio constante modificado por ingeniería genética comprende al menos una sustitución de aminoácidos para introducir un resto de cisteína útil para la conjugación, y en donde el polipéptido de dominio constante es al menos uno de:

(a) un polipéptido de dominio constante de cadena pesada ($C\gamma$) de IgG humana modificado por ingeniería genética, o una porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en K246, D249, D265, S267, D270, N276, Y278, E283, R292, E293, E294, Y300, V302, V303, L314, N315, E318, K320, I332, E333, K334, I336, E345, Q347, S354, R355, M358, K360, Q362, K370, Y373, D376, A378, E380, E382, Q386, E388, N390, K392, T393, D401, F404, T411, D413, K414, R416, Q418, Q419, N421, M428, A431, L432, T437, Q438, K439, L443 y S444, de acuerdo con el índice EU de Kabat;

(c) un polipéptido de dominio constante de cadena ligera kappa humana ($C\kappa$) modificado por ingeniería genética o porción del mismo, que comprende además al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en A111 y N210, de acuerdo con la numeración de Kabat;

(d) un polipéptido $C\gamma$ modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97-100, 102, 104, 107-127 y 129-163;

(e) un polipéptido κ modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90, 92 y 95, y

En un aspecto, el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, comprende además un polipéptido de dominio constante de cadena pesada ($C\gamma$) modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en K246, D249, D265, S267, D270, N276, Y278, E283, R292, E293, E294, Y300, V302, V303, L314, N315, E318, K320, I332, E333, K334, I336, E345, Q347, S354, R355, M358, K360, Q362, K370, Y373, D376, A378, E380, E382, Q386, E388, N390, K392, T393, D401, F404, T411, D413, K414, R416, Q418, Q419, N421, M428, A431, L432, T437, Q438, K439, L443 y S444, de acuerdo con el índice

EU de Kabat; y que comprende además una cadena ligera que comprende un dominio constante modificado por ingeniería genética seleccionado del grupo que consiste en:

- 5 (b) un polipéptido de dominio constante de cadena ligera kappa humana (C_K) modificado por ingeniería genética o porción del mismo, que comprende además al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en A111 y N210, de acuerdo con la numeración de Kabat.

En otro aspecto, el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, comprende además al menos uno de:

- 10 (a) un polipéptido C_K modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende una sustitución de aminoácidos en A111C de acuerdo con la numeración de Kabat, y un polipéptido C_Y modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende una sustitución de aminoácidos en Q347C de acuerdo con la numeración Eu de Kabat;
- 15 (b) un polipéptido C_K modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende una sustitución de aminoácidos en A111C de acuerdo con la numeración de Kabat, y un polipéptido C_Y modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende una sustitución de aminoácidos en E388C de acuerdo con la numeración Eu de Kabat;
- 20 (c) un polipéptido C_K modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende una sustitución de aminoácidos en A111C de acuerdo con la numeración de Kabat, y un polipéptido C_Y modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende una sustitución de aminoácidos en K392C de acuerdo con la numeración Eu de Kabat;
- 25 (d) un polipéptido C_K modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende una sustitución de aminoácidos en A111C de acuerdo con la numeración de Kabat, y un polipéptido C_Y modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende una sustitución de aminoácidos en L443C de acuerdo con la numeración Eu de Kabat;
- 30 (e) un polipéptido C_K modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende una sustitución de aminoácidos en K183C de acuerdo con la numeración de Kabat, y un polipéptido C_Y modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende una sustitución de aminoácidos en L443C de acuerdo con la numeración Eu de Kabat; o
- 35 (f) un polipéptido C_K modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende una sustitución de aminoácidos en K207C de acuerdo con la numeración de Kabat, y un polipéptido C_Y modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende una sustitución de aminoácidos en L443C de acuerdo con la numeración Eu de Kabat.
- 40 En un aspecto, la invención incluye una proteína de fusión Fc que comprende un polipéptido C_Y modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en K246, D249, D265, S267, D270, N276, Y278, E283, R292, E293, E294, Y300, V302, V303, L314, N315, E318, K320, I332, E333, K334, I336, E345, Q347, S354, R355, M358, K360, Q362, K370, Y373, D376, A378, E380, E382, Q386, E388, N390, K392, T393, D401, F404, T411, D413, K414, R416, Q418, Q419, N421, M428, A431, L432, T437, Q438, K439, L443 y S444, de acuerdo con el índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63(1):78-85.
- 45

En un aspecto, la invención incluye una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo, comprende un polipéptido de dominio constante de cadena ligera kappa humana (C_K) modificado por ingeniería genética o porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos para introducir un resto de cisteína útil para la conjugación, ubicándose dicha al menos una sustitución en K183 de acuerdo con el sistema de numeración de índice de EU establecido en Kabat *et al.* (1991, Publicación del NIH 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, VA) y también de acuerdo con la numeración secuencial relativa a la secuencia de SEQ ID NO: 89, y que comprende además:

- 55 (a) un polipéptido de dominio constante de cadena pesada (C_Y) de IgG humana modificado por ingeniería genética, o una porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en K246, D249, D265, S267, D270, N276, Y278, E283, R292, E293, E294, Y300, V302, V303, L314, N315, E318, K320, I332, E333, K334, I336, E345, Q347, S354, R355, M358, K360, Q362, K370, Y373, D376, A378, E380, E382, Q386, E388, N390, K392, T393, D401, F404, T411, D413, K414, R416, Q418, Q419, N421, M428, A431, L432, T437, Q438, K439, L443 y S444, de acuerdo con el índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85;
- 60
- 65 (c) un polipéptido de dominio constante de cadena ligera kappa humana (C_K) modificado por ingeniería genética o porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en

A111 y N210, de acuerdo con la numeración de Kabat;

(d) un polipéptido Cy modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97-100, 102, 104, 107-127 y 129-163;

(e) un polipéptido Ck modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:90, 92 y 95, y

En un aspecto, la invención incluye una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo, comprende un polipéptido de dominio constante de cadena ligera kappa humana (C_κ) modificado por ingeniería genética o porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos para introducir un resto de cisteína útil para la conjugación, ubicándose dicha al menos una sustitución en K183 de acuerdo con el sistema de numeración de índice de EU establecido en Kabat *et al.* (1991, Publicación del NIH 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, VA) y también de acuerdo con la numeración secuencial relativa a la secuencia de SEQ ID NO: 89, y que opcionalmente comprende además un polipéptido de dominio constante de cadena pesada (C_γ) modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en K246, D249, D265, S267, D270, N276, Y278, E283, R292, E293, E294, Y300, V302, V303, L314, N315, E318, K320, I332, E333, K334, I336, E345, Q347, S354, R355, M358, K360, Q362, K370, Y373, D376, A378, E380, E382, Q386, E388, N390, K392, T393, D401, F404, T411, D413, K414, R416, Q418, Q419, N421, M428, A431, L432, T437, Q438, K439, L443 y S444, de acuerdo con el índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85;

y comprende además una cadena ligera que comprende un dominio constante modificado por ingeniería genética seleccionado del grupo que consiste en:

(b) un polipéptido de dominio constante de cadena ligera kappa humana (C_κ) modificado por ingeniería genética o porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en A111 y N210, de acuerdo con la numeración de Kabat.

La invención incluye un método para tratar el cáncer, enfermedades o trastornos autoinmunitarios, inflamatorios o infecciosos en un sujeto que lo necesite. El método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, o una proteína de fusión Fc, en donde el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, o la proteína de fusión Fc, comprende un polipéptido de dominio constante de cadena ligera kappa humana (C_κ) modificado por ingeniería genética o porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos para introducir un resto de cisteína útil para la conjugación, ubicándose dicha al menos una sustitución en K183 de acuerdo con el sistema de numeración de índice de EU establecido en Kabat *et al.* (1991, Publicación del NIH 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, VA) y también de acuerdo con la numeración secuencial relativa a la secuencia de SEQ ID NO: 89, y en donde opcionalmente el polipéptido de dominio constante modificado por ingeniería genética comprende además:

(a) un polipéptido de dominio constante de cadena pesada (C_γ) de IgG humana modificado por ingeniería genética, o una porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en K246, D249, D265, S267, D270, N276, Y278, E283, R292, E293, E294, Y300, V302, V303, L314, N315, E318, K320, I332, E333, K334, I336, E345, Q347, S354, R355, M358, K360, Q362, K370, Y373, D376, A378, E380, E382, Q386, E388, N390, K392, T393, D401, F404, T411, D413, K414, R416, Q418, Q419, N421, M428, A431, L432, T437, Q438, K439, L443 y S444, de acuerdo con el índice EU de Kabat;

(c) un polipéptido de dominio constante de cadena ligera kappa humana (C_κ) modificado por ingeniería genética o porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en A111, K183 y N210, de acuerdo con la numeración de Kabat;

(d) un polipéptido Cy modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97-100, 102, 104, 107-127 y 129-163;

(e) un polipéptido Ck modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:90, 92 y 95, y

(f) un polipéptido Cλ modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:172-186.

En un aspecto, la invención comprende además un polipéptido Cy que comprende además al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en una mutación en la posición de aminoácido 284, 287, 327, 359, 361, 383, 384, 398 y 422, de acuerdo con el índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63(1):78-85.

En otro aspecto más, el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, comprende además un polipéptido de dominio constante de cadena pesada (C γ) de IgG humana modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en K246, D249, D265, S267, D270, N276, Y278, E283, R292, E293, E294, Y300, V302, V303, L314, N315, E318, K320, I332, E333, K334, I336, E345, Q347, S354, R355, M358, K360, Q362, K370, Y373, D376, A378, E380, E382, Q386, E388, N390, K392, T393, D401, F404, T411, D413, K414, R416, Q418, Q419, N421, M428, A431, L432, T437, Q438, K439, L443 y S444, de acuerdo con el índice EU de Kabat, y comprende además al menos un dominio constante de cadena ligera seleccionado del grupo que consiste en un polipéptido C κ modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en A111C y N210C, de acuerdo con la numeración de Kabat, y un polipéptido C λ modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en K110C, L125C, K149C, V155C, G158C, T161C, Q185C, S188C, H189C, S191C, T197C, V205C, E206C y K207C, T208C y A210C, de acuerdo con la numeración de Kabat.

En otro aspecto más, el polipéptido de dominio constante modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, está conjugado a uno o más de un agente citotóxico, un agente citostático, un agente quimioterapéutico, una toxina, un radionucleido, ADN, ARN, ARNip, microARN, un ácido nucleico peptídico, un aminoácido no natural, un péptido, una enzima, una etiqueta fluorescente y biotina, y en donde la conjugación es en el aminoácido sustituido.

En otro aspecto adicional más, el anticuerpo comprende un polipéptido de dominio constante modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, y comprende además un enlazador y un agente citotóxico, en donde el enlazador y el agente citotóxico se seleccionan del grupo que consiste en maleimidocaproil-monometil auristatina D (mcMMAD), maleimidocaproil-0101 (mc0101), maleimidocaproil-3377 (mc3377), maleimidocaproil-8261 (mc8261), valina-citrulina-monometil auristatina D (vcMMAD), valina-citrulina-0101 (vc0101), valina-citrulina-3377 (vc3377), valina-citrulina-8261 (vc8261), mcValCitPABCMAD (maleimidocaproil-valina-citrulina-monometil auristatina D), mcValCit0101 (maleimidocaproil-valina-citrulina-0101), mcValCit3377 (maleimidocaproil-valina-citrulina-3377), mcValCit8261 (maleimidocaproil-valina-citrulina-8261), Mal-PEG2C2-MMAD, Mal-PEG3C2-MMAD, Mal-PEG6C2-MMAD, Mal-PEG2C2-0101, Mal-PEG3C2-0101, Mal-PEG6C2-0101, Mal-PEG2C2-3377, Mal-PEG3C2-3377 y Mal-PEG6C2-3377, Mal-PEG2C2-8261, Mal-PEG3C2-8261 y Mal-PEG6C2-8261.

La invención incluye un ácido nucleico que codifica un polipéptido de dominio constante de cadena ligera kappa humana (C κ) modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos para introducir un resto de cisteína útil para la conjugación, ubicándose dicha al menos una sustitución en K183 de acuerdo con el sistema de numeración de índice de EU establecido en Kabat *et al.* (1991, Publicación del NIH 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, VA) y también de acuerdo con la numeración secuencial relativa a la secuencia de SEQ ID NO: 89 y opcionalmente que comprende además

(a) un polipéptido de dominio constante de cadena pesada (C γ) de IgG humana modificado por ingeniería genética, o una porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en K246, D249, D265, S267, D270, N276, Y278, E283, R292, E293, E294, Y300, V302, V303, L314, N315, E318, K320, I332, E333, K334, I336, E345, Q347, S354, R355, M358, K360, Q362, K370, Y373, D376, A378, E380, E382, Q386, E388, N390, K392, T393, D401, F404, T411, D413, K414, R416, Q418, Q419, N421, M428, A431, L432, T437, Q438, K439, L443 y S444, de acuerdo con el índice EU de Kabat;

(c) un polipéptido de dominio constante de cadena ligera kappa humana (C κ) modificado por ingeniería genética o porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en A111 y N210, de acuerdo con la numeración de Kabat;

(d) un polipéptido C γ modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97-100, 102, 104, 107-127 y 129-163;

(e) un polipéptido C κ modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90, 92 y 95, y

(f) un polipéptido C λ modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 172-186.

La divulgación proporciona un ácido nucleico que codifica un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética en donde el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética comprende un polipéptido C γ modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en K246, D249, D265, S267, D270, N276, Y278, E283, R292, E293, E294, Y300, V302, V303, L314, N315, E318, K320, I332, E333, K334, I336, E345, Q347, S354, R355, M358, K360, Q362, K370, Y373, D376, A378, E380, E382, Q386, E388, N390, K392, T393, D401, F404, T411, D413, K414, R416, Q418, Q419, N421, M428, A431, L432, T437, Q438, K439, L443 y S444, de acuerdo con el índice EU de Kabat;

En un aspecto, la invención incluye una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico que codifica el polipéptido de dominio constante de cadena ligera kappa humana (C_K) modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos para introducir un resto de cisteína útil para la conjugación, ubicándose dicha al menos una sustitución en K183 de acuerdo con el sistema de numeración de índice de EU establecido en Kabat *et al.* (1991, Publicación del NIH 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, VA) y también de acuerdo con la numeración secuencial relativa a la secuencia de SEQ ID NO: 89.

La invención incluye un ácido nucleico que codifica un polipéptido de dominio constante de cadena ligera kappa humana (C_K) modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos para introducir un resto de cisteína útil para la conjugación, ubicándose dicha al menos una sustitución en K183 de acuerdo con el sistema de numeración de índice de EU establecido en Kabat *et al.* (1991, Publicación del NIH 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, VA) y también de acuerdo con la numeración secuencial relativa a la secuencia de SEQ ID NO: 89.

En un aspecto, la invención incluye una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico que codifica el polipéptido C_K modificado por ingeniería genética de la invención, o porción del mismo.

La invención incluye un ácido nucleico que codifica un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo comprende un polipéptido de dominio constante de cadena ligera kappa humana (C_K) modificado por ingeniería genética o porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos para introducir un resto de cisteína útil para la conjugación, ubicándose dicha al menos una sustitución en K183 de acuerdo con el sistema de numeración de índice de EU establecido en Kabat *et al.* (1991, Publicación del NIH 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, VA) y también de acuerdo con la numeración secuencial relativa a la secuencia de SEQ ID NO: 89 y opcionalmente que comprende además:

(a) un polipéptido de dominio constante de cadena pesada (C_H) de IgG humana modificado por ingeniería genética, o una porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en K246, D249, D265, S267, D270, N276, Y278, E283, R292, E293, E294, Y300, V302, V303, L314, N315, E318, K320, I332, E333, K334, I336, E345, Q347, S354, R355, M358, K360, Q362, K370, Y373, D376, A378, E380, E382, Q386, E388, N390, K392, T393, D401, F404, T411, D413, K414, R416, Q418, Q419, N421, M428, A431, L432, T437, Q438, K439, L443 y S444, de acuerdo con el índice EU de Kabat;

(c) un polipéptido de dominio constante de cadena ligera kappa humana (C_K) modificado por ingeniería genética o porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en A111 y N210, de acuerdo con la numeración de Kabat;

(d) un polipéptido C_H modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97-100, 102, 104, 107-127 y 129-163;

(e) un polipéptido C_K modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90, 92 y 95, y

(f) un polipéptido C_L modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 172-186.

En un aspecto, la invención comprende una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico.

La invención incluye un método para producir un anticuerpo modificado por ingeniería genética, o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende incubar la célula hospedadora en condiciones adecuadas para expresar el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, y aislar el anticuerpo o porción de unión a antígeno.

Breve descripción de los dibujos

El sumario anterior, así como la siguiente descripción detallada de la invención, se comprenderán mejor cuando se lean junto con los dibujos adjuntos. Con el fin de ilustrar la invención se muestran en los dibujos realización o realizaciones que son actualmente preferidas. Debe entenderse, sin embargo, que la invención no está limitada a las disposiciones e instrumentos que se muestran.

En los dibujos:

La Figura 1 muestra los resultados de un ensayo ELISA de unión competitiva que demuestra que la unión a un antígeno diana (es decir, 5T4) no se ve afectada en anticuerpos que comprenden un dominio F_c modificado por ingeniería genética que comprende una sustitución de cisteína. La unión competitiva a la proteína 5T4 recombinante truncada humana (5T4-tm_{myc}_his) que carece de los dominios transmembrana e intracelular de 5T4 (y que comprende

además etiquetas Myc e histidina) fue equivalente entre los anticuerpos que comprenden una única mutación de cisteína en el dominio Fc en comparación con el anticuerpo anti-5T4 precursor que comprende un dominio Fc de IgG1 de tipo silvestre conjugado con biotina (bio anti-5T4 Ab [1,3 nM]). Las sustituciones se indican como sigue: 5T4-T359C; 5T4-K392C; 5T4-L398C; 5T4-F404C; 5T4-V422C; 5T4-S440C.

La Figura 2, que comprende las Figuras 2A-2B, muestra los trazos analíticos de SEC para dos variantes de cisteína modificadas por ingeniería genética conjugadas con vcMMAD. La Figura 2A muestra el trazado de SEC para 5T4-L398C-mcMMAD (maleimidocaproil(monometilauristatina D) (conjugado usando el método SEC-A). La Figura 2B muestra el trazado de SEC para 5T4-V422C-vcMMAD (maleimidocaproil-valina-citrulina-para-aminobenciloxycarbonil (monometilauristatina D)) (conjugado usando el método SEC-B).

La Figura 3, que comprende las Figuras 3A-3B, muestra los cálculos de seguimiento y carga de EM para dos ADC ilustrativos. La Figura 3A muestra el trazado de EM y el cálculo de carga para 5T4-E380C-mcMMAD. La Figura 3B muestra el trazado de EM y el cálculo de carga para 5T4-L398C-vcMMAD.

La Figura 4 es un diagrama que representa los fragmentos generados por el tratamiento de un anticuerpo intacto con FabRICATOR® seguido de la reducción de los enlaces disulfuro por ditiotreitól (DTT). Los restos de cisteína están indicados por pequeños cuadros negros y los enlaces S-S intercatenarios están indicados por líneas.

La Figura 5, que comprende los paneles A y B, representa un trazado de EM de los fragmentos de FabRICATOR® generados por la digestión de un anticuerpo variante de cisteína no conjugado (5T4-L443C) en la Figura 5A en comparación con el mismo anticuerpo conjugado con mcMMAD (5T4-L443-mcMMAD) en la Figura 5B. Los fragmentos generados son el extremo C de la cadena pesada (HC(C)), el extremo N de la cadena pesada (HC(N)), la cadena ligera (LC), el extremo C de la cadena pesada conjugado con un mcMMAD (HC(C)+1) y una pequeña cantidad del extremo N de la cadena pesada conjugado con un mcMMAD (HC(N)+1), que se detectó en 26505,1 en el trazado que se muestra en la Figura 5B.

La Figura 6, que comprende los paneles A-D, muestra trazados resultantes del análisis de HPLC de fase inversa en condiciones reductoras, lo que demuestra que la cadena ligera (LC) permanece en gran parte sin modificar, mientras que la cadena pesada (HC) está modificada. La Figura 6A muestra trazos de HPLC de fase inversa en condiciones reductoras para el anticuerpo anti-5T4 de tipo silvestre no modificado. La Figura 6B muestra trazos de HPLC de fase inversa en condiciones reductoras para 5T4-E380C-mcMMAD. La Figura 6C muestra trazos de HPLC de fase inversa en condiciones reductoras para 5T4-L443C-mcMMAD.

La Figura 7, que comprende los paneles A-D, muestra los trazados obtenidos mediante cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) para la variante 5T4-L443C tanto no conjugada como conjugada con vcMMAD, y para la variante 5T4-E380C conjugada con vcMMAD o mcMMAD. La Figura 7A muestra el trazado de los resultados de HIC para 5T4-L443C no conjugado. La Figura 7B muestra el trazado de los resultados de HIC para 5T4-L443C conjugado con vcMMAD, y muestra que los valores de carga determinados usando EM (2,00) y HIC (2,07) son consistentes. Se indican los máximos que comprenden el anticuerpo cargado con uno (+1), dos (+2) y cuatro (+4) vcMMAD. La Figura 7C muestra el trazado de los resultados de HIC para 5T4-E380C conjugado con vcMMAD, y muestra que los valores de carga determinados usando EM (1,80) y HIC (1,74) son consistentes. Se indican los máximos que comprenden el anticuerpo cargado con ninguno (+0), uno (+1), dos (+2), tres (+3) y cuatro (+4) vcMMAD. La Figura 7D muestra el trazado de los resultados de HIC para 5T4-E380C conjugado con mcMMAD, y muestra que los valores de carga determinados usando EM (1,78) y HIC (1,81) son consistentes. Se indican los máximos que comprenden el anticuerpo cargado con ninguno (+0), uno (+1), dos (+2) y cuatro (+4) vcMMAD.

La Figura 8, que comprende los paneles A-J, muestra los trazados producidos por conjugaciones usando el Método "A" en comparación con el Método "B" para diversos anticuerpos variantes de cisteína. Las Figuras 8A, 8C, 8E, 8G y 8J muestran resultados para conjugaciones usando el "Método A" para los anticuerpos 5T4-E380C-mcMMAD (Figura 8A); 5T4-L398C-mcMMAD (Figura 8C); 5T4-L443C-mcMMAD (Figura 8E); y 5T4-K392C-mcMMAD (Figura 8G). Las Figuras 8B, 8D, 8F, 8H, muestran resultados de conjugaciones usando el "Método B" para los anticuerpos: 5T4-E380C-mcMMAD (Figura 8B); 5T4-L398C-mcMMAD (Figura 8D); 5T4-L443C-mcMMAD (Figura 8F); y 5T4-K392C-mcMMAD (Figura 8H).

La Figura 9, que comprende los paneles A-H, muestra los trazados producidos por conjugaciones usando el Método "A" en comparación con el Método "B" para diversos anticuerpos variantes de cisteína. Las Figuras 9A, 9C, 9E y 9G muestran resultados para conjugaciones usando el "Método A" para los anticuerpos 5T4-E380C+L398C-mcMMAD (Figura 9A); 5T4-E398C+L443C-mcMMAD (Figura 9C); 5T4-E380C+L443C-mcMMAD (Figura 9E); y 5T4-E380C+V422C-mcMMAD (Figura 9G). Las Figuras 9B, 9D, 9F y 9H, muestran resultados de conjugaciones usando el "Método B" para los anticuerpos: 5T4-E380C+L398C-mcMMAD (Figura 9B); 5T4-E398C+L443C-mcMMAD (Figura 9D); 5T4-E380C+L443C-mcMMAD (Figura 9F); y 5T4-E380C+V422C-mcMMAD (Figura 9H).

La Figura 10, que comprende los paneles A-E, representa las estructuras de las siguientes combinaciones de enlazador-carga útil: mcMMAD (Figura 10A); mcMMAE (Figura 10B); mcMMAF (Figura 10C); mcValCitPABC-MMAD, también denominado en el presente documento "vcMMAD" (Figura 10D); Mal-PEG6C2-MMAD (Figura 10E) y Mal-

PEG3C2-MMAD (Figura 10F).

La Figura 11 es un gráfico que muestra la unión de anticuerpos anti-5T4 mutantes de cisteína no conjugados a células MDAMB435 que expresan el antígeno 5T4 (MDAMB435/5T4) expresado como fluorescencia media calculada, en comparación con la unión del anticuerpo anti-5T4 precursor que comprende un dominio Fc de IgG1 de tipo silvestre. Los resultados demuestran que los anticuerpos variantes de cisteína L443C, E380C, L398C, V422C, T359C, S254C, S440C y K392C, tanto a 1 µg (barras grises) como a 10 µg/ml (barras negras), demuestran una unión a las células MDAMB435/5T4 comparable al anticuerpo precursor de tipo silvestre (indicado como "IgG1 ts").

La Figura 12, que comprende los paneles A y B, es un gráfico que muestra la unión de anticuerpos mutantes de cisteína conjugados con mcMMAD en comparación con la unión del anticuerpo precursor que comprende el dominio Fc de IgG1 de tipo silvestre. La Figura 12A es un gráfico que muestra la unión de anticuerpos de variantes de cisteína conjugados con mcMMAD a células que expresan el antígeno 5T4 (células MDAMB435/5T4) en comparación con el anticuerpo anti-5T4 precursor de tipo silvestre. La unión de anticuerpos 5T4-E380C-mcMMAD, 5T4-L398C-mcMMAD, 5T4-L443C-mcMMAD y 5T4-V422C-mcMMAD se comparó con la unión del anticuerpo precursor 5T4 (IgG1 ts). La Figura 12B es un gráfico que muestra la falta de unión de los anticuerpos variantes de cisteína conjugados a mcMMAD en comparación con una falta de unión similar del anticuerpo precursor de tipo silvestre en células Raji que no expresan el antígeno diana 5T4.

La Figura 13 es un gráfico que muestra la internalización de anticuerpos variantes de cisteína conjugados con mcMMAD en comparación con la internalización del anticuerpo de tipo silvestre conjugado con mcMMAD (5T4-IgG1-mcMMAD) y el anticuerpo de tipo silvestre que no se conjugó (IgG1 ts). Los datos muestran que los conjugados de anticuerpos y fármaco mutantes de cisteína 5T4-E380C-mcMMAD, 5T4-L398C-mcMMAD y 5T4-L443C-mcMMAD, se internalizaron por células MDAMB435/5T4 sustancialmente de la misma manera que el conjugado de anticuerpos y fármaco precursor de tipo silvestre 5T4-IgG1-mcMMAD y el anticuerpo precursor de tipo silvestre 5T4 no conjugado (IgG1 ts).

La Figura 14, que comprende los paneles A y B, muestra que los anticuerpos variantes de cisteína modificados por ingeniería genética no exhiben una actividad efectora Fc alterada en comparación con el anticuerpo precursor de tipo silvestre. La Figura 14A muestra un gráfico que muestra que las variantes de cisteína 5T4-E380C, 5T4-L398C, 5T4-V422C y 5T4-L443C demuestran la misma actividad ADCC que el anticuerpo precursor de tipo silvestre (5T4) en células que expresan 5T4 (MDA435/5T4). La Figura 14B muestra un gráfico que muestra que las variantes de cisteína 5T4-E380C, 5T4-L398C, 5T4-V422C y 5T4-L443C demuestran la misma actividad ADCC (ninguna) en comparación con el anticuerpo precursor de tipo silvestre (5T4) en células que no expresan el antígeno 5T4 (MDA435/Neo).

La Figura 15, que comprende los paneles A-UUU, muestra las siguientes secuencias: secuencia de aminoácidos del dominio constante de la cadena pesada de IgG1 humana de tipo silvestre que comprende la región Fc, donde la región Fc comienza en el resto de aminoácido 236 (glicina, G) (Fig. 15A), una secuencia de ácido nucleico ilustrativa que codifica el dominio constante de IgG1 de tipo silvestre humana que comprende la región Fc (Fig. 15 B), la secuencia de aminoácidos del dominio constante de IgG2 humana (Fig. 15 C), la secuencia de aminoácidos del dominio constante de IgG3 de tipo silvestre humana (Fig. 15 D), la secuencia de aminoácidos del dominio constante de IgG4 de tipo silvestre humana (Fig. 15 E) y las secuencias de aminoácidos de polipéptidos Fc modificados por ingeniería genética que comprenden una sustitución de una cisteína en las siguientes posiciones (todo de acuerdo con el índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63(1):78-85.): K246 (Fig. 15 F), D249 (Fig. 15 G), 254 (Fig. 15 H), D265 (Fig. 15 I), S267 (Fig. 15 J), D270 (Fig. 15 K), N276 (Fig. 15 L), Y278 (Fig. 15 M), E283 (Fig. 15 N), 284 (Fig. 15 O), 287 (Fig. 15 P), R292 (Fig. 15 Q), E293 (Fig. 15 R), E294 (Fig. 15 S), Y300 (Fig. 15 T), V302 (Fig. 15 U), V303 (Fig. 15 V), L314 (Fig. 15 W), N315 (Fig. 15 X), E318 (Fig. 15 Y), K320 (Fig. 15 Z), 327 (Fig. 15 AA), I332 (Fig. 15 BB), E333 (Fig. 15 CC), K334 (Fig. 15 DD), I336 (Fig. 15 EE), E345 (Fig. 15 FF), Q347 (Fig. 15 GG), S354 (Fig. 15 HH), R355 (Fig. 15 II), M358 (Fig. 15 JJ), T359 KK), K360 (Fig. 15 LL), N361 (Fig. 15 MM), Q362 (Fig. 15 NN), K370 (Fig. 15 OO), Y373 (Fig. 15 PP), D376 (Fig. 15 QQ), A378 (Fig. 15 RR), E380 (Fig. 15 SS), E382 (Fig. 15 TT), S383 (Fig. 15 UU), 384 (Fig. 15 VV), Q386 (Fig. 15 WW), E388 (Fig. 15 XX), N390 (Fig. 15 YY), K392 (Fig. 15 ZZ), T393 (Fig. 15 AAA), 398 (Fig. 15-BBB), D401 (Fig. 15 CCC), F404 (Fig. 15 DDD), T411 (Fig. 15 EEE), D413 (Fig. 15 FFF), K414 (Fig. 15 GGG), R416 (Fig. 15 HHH), Q418 (Fig. 15 III), Q419 (Fig. 15 JJJ), N421 (Fig. 15 KKK), 422 (Fig. 15 LLL), M428 (Fig. 15 MMM), A431 (Fig. 15 NNN), L432 (Fig. 15 OOO), T437 (Fig. 15 PPP), Q438 (Fig. 15 QQQ), K439 (Fig. 15 RRR), 440 (Fig. 15 SSS), L443 (Fig. 15 TTT) y S444 (Fig. 15 UUU).

La Figura 16, que comprende los paneles A-I, muestra las secuencias de aminoácidos de las siguientes regiones Fc modificadas por ingeniería genética de IgG1 que comprenden dos mutaciones como sigue: E380C-L443C (Fig. 16 A); L398C-L443C (Fig. 16B); V422C-L443C (Fig. 16C); E380C-L398C D); L398C-V422C (Fig. 16E); E380C-V422C (Fig. 16F); L392C-L443C (Fig. 16G); L404C-L443C (Fig. 16H); L392C-L404C (Fig. 16G).

La Figura 17, que comprende los paneles A-F, muestra las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras de longitud completa de diversos anticuerpos. La Figura 17A muestra la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-5T4 de cadena pesada donde el dominio variable (VH) está en mayúscula y las tres (3) CDR están subrayadas y donde la secuencia de la región constante de IgG1 humana se muestra en letras minúsculas. La Figura 17B muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo anti-5T4 donde el dominio variable (VL)

está en mayúscula y las tres (3) CDR están subrayadas y donde la secuencia de la región constante Kappa humana se muestra en letras minúsculas. La Figura 17C muestra la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-Her2 de cadena pesada donde el dominio variable (VH) está en mayúscula y las tres (3) CDR están subrayadas y donde la secuencia de la región constante de IgG1 humana se muestra en letras minúsculas. La Figura 17D muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo anti-Her2 donde el dominio variable (VL) está en mayúscula y las tres (3) CDR están subrayadas y donde la secuencia de la región constante Kappa humana se muestra en letras minúsculas. La Figura 17E muestra la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-VEGFR2 (receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular) de cadena pesada donde el dominio variable (VH) está en mayúscula y las tres (3) CDR están subrayadas y donde la secuencia de la región constante de IgG1 humana se muestra en letras minúsculas. La Figura 17F muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo anti-VEGFR2 donde el dominio variable (VL) está en mayúscula y las tres (3) CDR están subrayadas y donde la secuencia de la región constante Kappa humana se muestra en letras minúsculas.

La Figura 18, que comprende los paneles A-D, muestra las secuencias de aminoácidos de la región constante kappa humana de tipo silvestre (Fig. 18A) y la secuencia de aminoácidos de las regiones Cκ modificadas por ingeniería genética que comprenden las siguientes mutaciones: A111C (Fig. 18B); K183C (Fig. 18C); y N210C (Fig. 18D).

La Figura 19, que comprende los paneles A y B, muestra las alineaciones de la secuencia de aminoácidos de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas que muestran las posiciones equivalentes entre las cuatro subclases de IgG. La Figura 19A muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de los dominios Fc de la IgG1(hIgG1), IgG2 (hIgG2), IgG3 (hIgG3) e IgG4 (hIgG4) de tipo silvestre humanas. La Figura 19B muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos del dominio constante (que comprende las regiones CH1, bisagra, CH2 y CH3) de IgG1 (human_gamma1), IgG2 (human_gamma2), IgG3 (human_gamma3) e IgG4 (human_gamma4) de tipo silvestre humanas.

La Figura 20, que comprende los paneles A y B, La Figura 18, muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica la región constante lambda humana de tipo silvestre (Fig. 20A), la secuencia de aminoácidos de la región constante lambda humana de tipo silvestre (Fig. 20B) y las secuencias de aminoácidos de las regiones Cλ modificadas por ingeniería genética que comprenden las siguientes mutaciones: K110C (Fig. 20C); A111C (Fig. 20D); L125C (Fig. 20E); K149C (Fig. 20F); V155C (Fig. 20G); G158C (Fig. 20H); T161C (Fig. 20I); Q185C (Fig. 20J); S188C (Fig. 20K); H189C (Fig. 20L); S191C (Fig. 20M); T197C (Fig. 20N); V205C (Fig. 20O); E206C (Fig. 20P); K207C (Fig. 20Q); T208C (Fig. 20R); y A210C (Fig. 20S).

La Figura 21, que comprende los paneles A y B, muestra gráficos que demuestran los parámetros PK de diversos anticuerpos de cisteína modificados por ingeniería genética conjugados a través de un enlazador MalPeg6C2 a una carga útil de auristatina patentada (Aur). La Figura 21A es un gráfico que ilustra la concentración en plasma a lo largo del tiempo de los ADC conjugados en un sitio específico donde se conjugó un anticuerpo anti-Her2, en el sitio o sitios específicos indicados, a través de un enlazador MalPeg6C2 a Aur. Los sitios de conjugación modificados por ingeniería genética fueron: Q347C; N421C; kappa K183C; K388C; L443C; L398C+L443C; y K392C+L443C. La Figura 21B es un gráfico que ilustra la concentración en plasma de ADC anti-Her2 total para diversos ADC conjugados específicos del sitio. El anticuerpo anti-Her2 se conjugó, a través de un enlazador MalPeg6C2, a una carga útil de auristatina patentada "Aur" (también denominada en el presente documento "8261"). Los sitios de conjugación modificados por ingeniería genética específicos fueron como sigue: Q347C; N421C; kappa K183C; K388C; L443C; L398C+L443C; y K392C+L443C.

La Figura 22, que comprende los paneles A-C, demuestra la eficacia reductora de tumores de los ADC conjugados específicos del sitio anti-Her2, donde el sitio de conjugación específico del sitio es L443C, y usando diferentes combinaciones de enlazadores y cargas útiles. La Figura 22A representa un gráfico que ilustra el tamaño del tumor en un modelo de ratón N87 de carcinoma gástrico donde el anti-Her2-L443C se conjugó con MMAD a través de un enlazador MalPeg6C2 y se administró a 1 mg/kg, 3 mg/kg y 10 mg/kg en comparación con un control negativo (Vehículo). La Figura 22B representa un gráfico que ilustra el tamaño del tumor en un modelo de ratón N87 de carcinoma gástrico donde se conjugó anti-Her2-L443C con Aur (también denominado "8261", un compuesto citotóxico novedoso basado en auristatina) a través de un enlazador MalPeg6C2 (abreviado en el presente documento "MP6") y administrado a 1 mg/kg, 3 mg/kg y 10 mg/kg en comparación con un control negativo (Vehículo). La Figura 22C representa un gráfico que ilustra el tamaño del tumor en un modelo de ratón N87 de carcinoma gástrico donde el anti-Her2-L443C se conjugó con una carga útil patentada (denominada "0101") a través de un enlazador vc y se administró a 1 mg/kg, 3 mg/kg y 10 mg/kg en comparación con un control negativo (Vehículo).

La figura 23 representa un gráfico que demuestra la eficacia de los ADC anti-Her2 conjugados en un sitio específico en el modelo de carcinoma DYT2 Her2+. Los ADC anti-Her2 se conjugaron en diversas cisteínas modificadas por ingeniería genética (K392C+L443C, Q347C, kappa K183C; K388C; N421C, kappa K207C; L398C+L443C; L443C; y se comparó su eficacia con el vehículo solo y el anticuerpo anti-Her2 conjugado convencionalmente con DM1 (Her2-DM1) y Aur (Her2-Aur).

Descripción detallada de la invención

Salvo que se defina lo contrario en el presente documento, los términos científicos y técnicos usados en relación con

la presente invención tendrán los significados que entienden normalmente los expertos habituales en la materia. Además, salvo que se requiera lo contrario por el contexto, los términos en singular incluirán los plurales y los términos en plural incluirán el singular. Generalmente, las nomenclaturas usadas en relación con, y las técnicas de, cultivo celular y tisular, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química e hibridación de proteínas y de ácidos nucleicos descritas en el presente documento son aquellas bien conocidas y comúnmente usadas en la técnica.

Los métodos y técnicas de la presente invención se llevan a cabo generalmente de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica y según se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan y se analizan en la totalidad de la presente memoria descriptiva salvo que se indique lo contrario. Tales referencias incluyen, por ejemplo, Sambrook y Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (2001), Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (2002), Harlow y Lane *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1998) y Coligan *et al.*, *Short Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY (2003). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se llevan a cabo de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como comúnmente se realizan en la técnica o como se describen en el presente documento. La terminología usada en relación con, y los procedimientos de laboratorio y las técnicas de, química analítica, bioquímica, inmunología, biología molecular, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica descritas en el presente documento son aquellas bien conocidas y comúnmente usadas en la técnica. Se usan técnicas convencionales para síntesis químicas, análisis químico, preparaciones farmacéuticas, formulaciones y administración y tratamiento de pacientes.

A lo largo de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones, la palabra "comprender", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros indicados pero no la exclusión de ningún otro número entero o grupo de números enteros.

Como se usa en el presente documento, cada uno de los siguientes términos y expresiones tiene el significado que se le atribuye en esta sección.

Los artículos "un/uno" y "una" se usan en el presente documento para referirse a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

A pesar de que los intervalos numéricos y los parámetros que establecen el amplio alcance de la invención son aproximaciones, los valores numéricos establecidos en los ejemplos específicos se indican con la mayor precisión posible. Cualquier valor numérico, sin embargo, contiene de forma inherente algunos errores que son necesariamente el resultado de la desviación típica que se encuentra en sus respectivas mediciones de ensayo. Por otra parte, se ha de entender que todos los intervalos divulgados en el presente documento abarcan todos y cada uno de los subintervalos incluidos en los mismos. Por ejemplo, un intervalo indicado como "de 1 a 10" debe considerarse que incluye todos y cada uno de los subintervalos entre (e inclusivos de) el valor mínimo de 1 y el valor máximo de 10; es decir, todos los subintervalos que comienzan con un valor mínimo de 1 o más, por ejemplo, de 1 a 6,1, y que terminan con un valor máximo de 10 o menos, por ejemplo, de 5,5 a 10.

La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) realizaciones que se refieren a ese valor o parámetro en sí. Por ejemplo, la descripción que hace referencia a "aproximadamente X" incluye una descripción de "X". Los valores numéricos incluyen los números que definen el intervalo.

Cuando los aspectos o las realizaciones de la invención se describen en términos de un grupo de Markush u otro grupo de alternativas, la presente invención abarca no solo todo el grupo enumerado en su conjunto, sino cada miembro del grupo individualmente y todos los posibles subgrupos del grupo principal, y también el grupo principal ausente uno o más de los miembros del grupo. La presente invención también prevé la exclusión explícita de uno o más de cualquiera de los miembros del grupo en la invención reivindicada.

Como se usa en el presente documento, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase *Immunology--A Synthesis* (2ª Edición, E. S. Golub y D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)).

Como se usa en el presente documento, los aminoácidos se representan con el nombre completo de los mismos, por el código de tres letras correspondiente a los mismos o por el código de una letra correspondiente a los mismos, como se indica en la siguiente tabla:

| <u>Nombre completo</u> | <u>Código de tres letras</u> | <u>Código de una letra</u> |
|------------------------|------------------------------|----------------------------|
| Ácido aspártico | Asp | D |
| Ácido glutámico | Glu | E |
| Lisina | Lys | K |

| <u>Nombre completo</u> | (continuación) | |
|------------------------|------------------------------|----------------------------|
| | <u>Código de tres letras</u> | <u>Código de una letra</u> |
| Arginina | Arg | R |
| Histidina | His | H |
| Tirosina | Tyr | Y |
| Cisteína | Cys | C |
| Asparagina | Asn | N |
| Glutamina | Gln | Q |
| Serina | Ser | S |
| Treonina | Thr | T |
| Glicina | Gly | G |
| Alanina | Ala | A |
| Valina | Val | V |
| Leucina | Leu | L |
| Isoleucina | Ile | I |
| Metionina | Met | M |
| Prolina | Pro | P |
| Fenilalanina | Phe | F |
| Triptófano | Trp | W |

Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es aquella en donde un resto de aminoácido se sustituye por otro resto de aminoácido que tiene un grupo R de cadena lateral con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). Generalmente, una sustitución conservativa de aminoácidos no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos en que dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí por sustituciones conservativas, el porcentaje de identidad de secuencia o grado de similitud pueden ajustarse hacia arriba para corregir la naturaleza conservativa de la sustitución. Los medios para hacer este ajuste son bien conocidos por los expertos en la materia. Véanse, por ejemplo, Pearson, *Methods Mol. Biol.* **243**:307-31 (1994).

Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen 1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; 2) cadenas laterales de hidroxilo alifático: serina y treonina; 3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; 4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano; 5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; 6) cadenas laterales ácidas: ácido aspártico y ácido glutámico; y 7) cadenas laterales que contienen azufre: cisteína y metionina. Los grupos de sustitución conservativa de aminoácidos preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparagina-glutamina.

Como alternativa, un reemplazo conservativo es cualquier cambio que tenga un valor positivo en la matriz de verosimilitud logarítmica PAM250 divulgada en Gonnet *et al.*, *Science* **256**:1443-45 (1992). Un reemplazo "moderadamente conservativo" es cualquier cambio que tenga un valor no negativo en la matriz de verosimilitud logarítmica PAM250.

Las sustituciones de aminoácidos preferidas son aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos proteicos y (4) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales de dichos análogos. Los análogos que comprenden sustituciones, eliminaciones y/o inserciones pueden incluir varias mutaciones de una secuencia distinta a la secuencia peptídica especificada. Por ejemplo, pueden realizarse sustituciones de aminoácidos simples o múltiples (preferentemente sustituciones de aminoácidos conservativas) en la secuencia especificada (preferentemente en la porción del polipéptido fuera del dominio o dominios que forman contactos intermoleculares, por ejemplo, fuera de las CDR). Una sustitución conservativa de aminoácidos no debería cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia precursora (por ejemplo, un aminoácido de reemplazo no debería tender a romper una hélice que se produce en la secuencia precursora, ni alterar otros tipos de estructura secundaria que caracterizan a la secuencia precursora). Algunos ejemplos de estructuras secundarias y terciarias polipeptídicas reconocidas en la técnica se describen en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, Nueva York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden y J. Tooze, eds., Garland Publishing, Nueva York,

N.Y. (1991)); y Thornton *et al.*, Nature 354:105 (1991).

La similitud de secuencias de polipéptidos generalmente se mide usando software de análisis de secuencias. El software de análisis de proteínas combina secuencias similares usando medidas de similitud asignadas a diversas sustituciones, eliminaciones y otras modificaciones, incluyendo sustituciones conservativas de aminoácidos. Por ejemplo, Genetics Computer Group (GCG comercializado por Genetics Computer Group, Inc.), también denominado el Paquete Wisconsin, es un paquete de software integrado de más de 130 programas para acceder, analizar y manipular secuencias de nucleótidos y proteínas. GCG contiene programas como "Gap" y "Bestfit" que pueden usarse con parámetros predeterminados para determinar la similitud de secuencias, la homología y/o la identidad de secuencia entre polipéptidos estrechamente relacionados, tales como polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos o entre una proteína de tipo silvestre y una muteína de la misma. Véanse, por ejemplo, GCG versión 6.1, versión 7.0, versión 9.1 y versión 10.0.

Las secuencias de polipéptidos también pueden compararse usando FASTA, un programa en GCG, usando parámetros predeterminados o recomendados. FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) proporciona alineaciones y porcentaje de identidad de secuencia de las regiones de mejor superposición entre las secuencias de consulta y búsqueda (Pearson, Methods Enzymol. 183:63-98 (1990); Pearson, Methods Mol. Biol. 132:185-219 (2000)). Otro algoritmo preferido al comparar una secuencia de la invención con una base de datos que contiene un gran número de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST, especialmente blastp o tblastn, usando parámetros por defecto. Véanse, por ejemplo, Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990); Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res. 25:3389-402 (1997).

En el presente documento se usa la anotación convencional para representar las secuencias de polipéptidos: el extremo izquierdo de una secuencia polipeptídica es el extremo amino; el extremo derecho de una secuencia polipeptídica es el extremo carboxilo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "en dirección 5'" se refiere a un resto que es N-terminal con respecto a un segundo resto donde la molécula es una proteína, o 5' con respecto a un segundo resto donde la molécula es un ácido nucleico. También como se usa en el presente documento, la expresión "en dirección 3'" se refiere a un resto que es C-terminal con respecto a un segundo resto donde la molécula es una proteína, o 3' con respecto a un segundo resto donde la molécula es un ácido nucleico.

Un "ácido nucleico" es un polinucleótido tal como ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN). La expresión se usa para incluir ácidos nucleicos monocatenarios, ácidos nucleicos bicatenarios y ARN y ADN elaborados a partir de análogos de nucleótidos o nucleósidos.

El término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede usarse para transportar una segunda molécula de ácido nucleico a una célula. En una realización, el vector permite la replicación de secuencias de ADN insertadas en el vector. El vector puede comprender un promotor para mejorar la expresión de la molécula de ácido nucleico en al menos algunas células hospedadoras. Los vectores pueden replicarse de forma autónoma (extracromosómica) o pueden integrarse en un cromosoma de la célula hospedadora. En una realización, el vector puede comprender un vector de expresión capaz de producir una proteína derivada de al menos parte de una secuencia de ácido nucleico insertada en el vector.

Como es conocido en la técnica, las condiciones para hibridar secuencias de ácidos nucleicos entre sí pueden describirse que varían de rigurosidad baja a alta. Generalmente, las condiciones de hibridación altamente estrictas se refieren al lavado de híbridos en un tampón con bajo contenido de sal a altas temperaturas. La hibridación puede ser para filtrar ADN unido usando soluciones de hibridación convencionales en la técnica tales como NaHPO₄ 0,5 M, dodecil sulfato sódico (SDS) al 7 %, a 65 °C y lavando en NaHPO₄ 0,25 M, SDS al 3,5 % seguido de lavado 0,1 × SSC/SDS al 0,1 % a una temperatura que varía desde la temperatura ambiente hasta los 68 °C dependiendo de la longitud de la sonda (véase, por ejemplo, Ausubel, FM *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology, 4ª Ed., Capítulo 2, John Wiley & Sons, N.Y.). Por ejemplo, un lavado de alta rigurosidad comprende un lavado en 6x SSC/pirofosfato sódico al 0,05 % a 37 °C para una sonda de oligonucleótidos de 14 bases, o a 48 °C para una sonda de oligonucleótidos de 17 bases, o a 55 °C para una sonda de oligonucleótidos de 20 bases, o a 60 °C para una sonda de oligonucleótidos de 25 bases, o a 65 °C para una sonda de nucleótidos de aproximadamente 250 nucleótidos de longitud. Las sondas de ácido nucleico pueden marcarse con radionucleótidos mediante marcaje en el extremo con, por ejemplo, [γ-³²P]ATP, o incorporación de nucleótidos radiomarcados tales como [α-³²P]dCTP mediante marcaje aleatorio de cebadores. Como alternativa, las sondas pueden marcarse mediante la incorporación de nucleótidos biotinilados o marcados con fluoresceína, y la sonda puede detectarse usando estreptavidina o anticuerpos antifluoresceína.

La expresión "proteína de fusión" se refiere a una proteína o polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de dos o más proteínas. La proteína de fusión también puede incluir regiones de enlace de aminoácidos entre porciones de aminoácidos derivadas de proteínas separadas.

La expresión "célula hospedadora" como se usa en el presente documento se refiere a una célula que se cultiva de

acuerdo con la presente invención para producir una proteína o polipéptido de interés. En determinadas realizaciones, la célula hospedadora es una célula de mamífero.

Por el término "hibridoma" como se usa en el presente documento, se entiende que abarca una célula o progenie de una célula resultante de la fusión de una célula inmortalizada y una célula productora de anticuerpos. El hibridoma resultante es una célula inmortalizada que produce anticuerpos. Las células individuales usadas para crear el hibridoma pueden ser de cualquier fuente mamífera, incluyendo, pero no limitado a, rata, cerdo, conejo, oveja, cabra y ser humano. El término también abarca las líneas de células de trioma, que resultan de la fusión de la progenie del mieloma heterohíbrido, que son el producto de una fusión entre células humanas y una línea celular de mieloma murino, posteriormente se fusionan con una célula plasmática. Adicionalmente, el término pretende incluir cualquier línea celular híbrida inmortalizada que produzca anticuerpos tales como, por ejemplo, cuadromas (Véase, por ejemplo, Milstein *et al.*, 1983, Nature 537:3053).

El término "polipéptido" como se usa en el presente documento se refiere a una cadena secuencial de aminoácidos unidos a través de enlaces peptídicos. El término se usa para referirse a una cadena de aminoácidos de cualquier longitud, pero una persona normalmente experta en la técnica entenderá que el término no está limitado a cadenas largas y puede referirse a una cadena mínima que comprende los aminoácidos unidos juntos mediante un enlace peptídico. Como es conocido por los expertos en la materia, los polipéptidos pueden procesarse y/o modificarse. Por ejemplo, un polipéptido puede estar glucosilado. Un polipéptido que se expresará de acuerdo con la presente invención puede ser un polipéptido terapéutico. Un polipéptido terapéutico es un polipéptido que tiene un efecto biológico en una región del cuerpo sobre la que actúa o en una región del cuerpo sobre la que actúa de forma remota a través de intermedios. A continuación se analizan con más detalle ejemplos de polipéptidos terapéuticos.

"Proteína", como se usa el término en el presente documento, se refiere a uno o más polipéptidos que funcionan como una unidad discreta. Si un solo polipéptido es la unidad funcional discreta y no requiere asociación física permanente o temporal con otros polipéptidos para formar la unidad funcional discreta, los términos "polipéptido" y "proteína" pueden usarse indistintamente. Si la unidad funcional discreta está compuesta por múltiples polipéptidos que se asocian físicamente entre sí, el término "proteína" como se usa en el presente documento se refiere a los múltiples polipéptidos que están acoplados físicamente y funcionan juntos como una unidad discreta. Una proteína que se expresará de acuerdo con la presente invención puede ser una proteína terapéutica. Una proteína terapéutica es una proteína que tiene un efecto biológico en una región del cuerpo sobre la que actúa o en una región del cuerpo sobre la que actúa de forma remota a través de intermedios. A continuación se analizan con más detalle ejemplos de terapias proteicas.

El término "fragmento" como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido y se define como cualquier porción discreta de un polipéptido dado que es única o característica de ese polipéptido. El término como se usa en el presente documento también se refiere a cualquier porción discreta de un polipéptido dado que conserva al menos una fracción de la actividad del polipéptido de longitud completa. En determinadas realizaciones, la fracción de actividad retenida es al menos el 10 % de la actividad del polipéptido de longitud completa. En determinadas realizaciones, la fracción de actividad retenida es al menos el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 % o el 90 % de la actividad del polipéptido de longitud completa. En determinadas realizaciones, la fracción de actividad retenida es al menos el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de la actividad del polipéptido de longitud completa. En determinadas realizaciones, la fracción de actividad retenida es el 100 % o más de la actividad del polipéptido de longitud completa. Como alternativa o adicionalmente, el término como se usa en el presente documento también se refiere a cualquier porción de un polipéptido dado que incluye al menos un elemento de secuencia establecido que se encuentra en el polipéptido de longitud completa. En algunas realizaciones, el elemento de secuencia abarca al menos aproximadamente 4-5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más aminoácidos del polipéptido de longitud completa.

"Polipéptido expresado de forma recombinante" y "polipéptido recombinante" como se usan en el presente documento se refieren a un polipéptido expresado a partir de una célula hospedadora que ha sido manipulada para expresar ese polipéptido. En determinadas realizaciones, la célula hospedadora es una célula de mamífero. En determinadas realizaciones, esta manipulación puede comprender una o más modificaciones genéticas. Por ejemplo, las células hospedadoras pueden modificarse genéticamente mediante la introducción de uno o más genes heterólogos que codifican el polipéptido que se va a expresar. El polipéptido heterólogo expresado de forma recombinante puede ser idéntico o similar a los polipéptidos que normalmente se expresan en la célula hospedadora. El polipéptido heterólogo expresado de forma recombinante también puede ser extraño para la célula hospedadora, por ejemplo, heterólogo a polipéptidos normalmente expresados en la célula hospedadora. En determinadas realizaciones, el polipéptido heterólogo expresado de forma recombinante es quimérico. Por ejemplo, las porciones de un polipéptido pueden contener secuencias de aminoácidos que son idénticas o similares a los polipéptidos normalmente expresados en la célula hospedadora, mientras que otras porciones contienen secuencias de aminoácidos que son extrañas a la célula hospedadora. Adicionalmente o como alternativa, un polipéptido puede contener secuencias de aminoácidos de dos o más polipéptidos diferentes que se expresan ambos normalmente en la célula hospedadora. Adicionalmente, un polipéptido puede contener secuencias de aminoácidos de dos o más polipéptidos que son ambos extraños a la célula hospedadora. En algunas realizaciones, la célula hospedadora se modifica genéticamente mediante la activación o la regulación positiva de uno o más genes endógenos.

Un "anticuerpo" intacto comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Véase generalmente, *Fundamental Immunology*, Cap. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (HCVR o V_H) y una región constante de cadena pesada (C_H). La región constante de cadena pesada está compuesta por tres dominios, $CH1$, $CH2$ y $CH3$. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (LCVR o V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio, C_L . En seres humanos, hay dos tipos de cadenas ligeras, kappa (κ) y lambda (λ), de tal manera que las regiones constantes de estos dos tipos de cadenas ligeras se designan C_{κ} y C_{λ} , respectivamente. Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V_H y V_L está normalmente compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas del extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio está de acuerdo con las definiciones de Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987 y 1991)) o Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia *et al.*, *Nature* 342:878-883 (1989).

Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del hospedador, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico. Dentro de las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variables y constantes están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo la cadena pesada también una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. Véase generalmente, *Fundamental Immunology* Cap. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989)).

La expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo"), como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, un antígeno asociado a un tumor, TAA). Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro de la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L and C_H1 ; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_H1 ; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste en un dominio V_H ; y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada, Fv unidos por disulfuro (dsFv) y anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) e intracuerpos. Adicionalmente, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , estén codificados por genes separados, estos pueden unirse, usando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite formarse como una única cadena de proteína en donde las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenarios (scFv)); véanse, por ejemplo, Bird *et al.* *Science* 242:423-426 (1988) y Huston *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 85:5879-5883 (1988)). También se pretende que dichos anticuerpos monocatenarios estén abarcados dentro de la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. Otras formas de anticuerpos monocatenarios, tales como los diacuerpos, también están abarcadas. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes biespecíficos en que los dominios V_H y V_L se expresan en una sola cadena polipeptídica, pero usando un enlazador que es demasiado corto como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, lo que obliga a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y crea dos sitios de unión de antígenos (véanse, por ejemplo, Holliger *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90:6444-6448 (1993); Poljak *et al.*, 1994, *Structure* 2:1121-1123). Los anticuerpos pueden derivar de cualquier mamífero, incluyendo, pero no limitado a, seres humanos, monos, cerdos, caballos, conejos, perros, gatos, ratones, etc., u otros animales tales como aves (por ejemplo, pollos), peces (por ejemplo, tiburones) y camélidos (por ejemplo, llamas).

Las expresiones "región Fc de IgG", "región Fc", "dominio Fc" y "Fc", como se usan indistintamente en el presente documento se refieren a la porción de una molécula de IgG que se correlaciona con un fragmento cristizable obtenido por digestión con papaína de una molécula de IgG. Como se usa en el presente documento, las expresiones se refieren a la región constante de un anticuerpo excluyendo el primer dominio de inmunoglobulina de la región constante y además se refieren a porciones de esa región. Por lo tanto, Fc se refiere a los dos últimos dominios de inmunoglobulina de la región constante de IgA, IgD e IgG y los tres últimos dominios de inmunoglobulina de la región constante de IgE e IgM, y la bisagra flexible N-terminal de estos dominios, o porciones de los mismos. Para IgA e IgM, Fc puede incluir la cadena J. Para IgG, Fc comprende los dominios de inmunoglobulina $C\gamma2$ y $C\gamma3$ (C gamma 2 y C gamma 3) y la bisagra entre $C\gamma1$ (C gamma 1) y $C\gamma2$ (C gamma 2). Aunque los límites de la región Fc pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se define generalmente como que comprende los restos C226 o P230 hasta su extremo carboxilo, en donde la numeración es de acuerdo con el índice EU de Edelman *et al.*, 1969, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 63(1):78-85 como se describe en Kabat *et al.*, 1991. Normalmente, el dominio Fc comprende de aproximadamente el resto de aminoácido 236 a aproximadamente 447 del dominio constante de IgG1 humana. Las secuencias de aminoácidos del dominio Fc de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 de tipo silvestre humanas ilustrativas se muestran en la Figura 19B. El polipéptido Fc puede referirse a esta región de forma aislada, o a esta región en el contexto de un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, o una proteína de fusión Fc. Se prefieren especialmente los polipéptidos Fc modificados por ingeniería genética, que son variantes no naturales de un Fc que

comprenden al menos una sustitución de aminoácidos que introduce un sitio de conjugación específico del sitio.

El dominio constante de la cadena pesada comprende la región Fc y además comprende el dominio CH1 y la bisagra, así como CH2 y CH3 (y, opcionalmente, dominios CH4 de IgA e IgE) de la cadena pesada de IgG. Una secuencia de aminoácidos del dominio constante de IgG1 de tipo silvestre humana ilustrativa se establece en SEQ ID NO:1 y se muestra en la Figura 15A.

Por "polipéptido Fc modificado por ingeniería genética", "región Fc modificada por ingeniería genética" y "Fc modificada por ingeniería genética" ya que los términos se usan indistintamente en el presente documento, se entiende un polipéptido Fc, o una porción del mismo, que comprende al menos una mutación, por ejemplo, una sustitución de aminoácidos, que introduce un sitio para la conjugación. Preferentemente, la mutación introduce una cisteína en lugar del resto de aminoácido de origen natural en esa posición, donde la mutación crea un sitio reactivo (por ejemplo, un grupo sulfhidrilo reactivo) para la conjugación de una fracción al Fc.

Una "variante Fc modificada por ingeniería genética" se refiere a un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética que comprende además al menos una modificación adicional, tales como, pero no limitado a, una mutación de aminoácidos, una modificación postraducciona (por ejemplo, glucosilación alterada), entre otras, además de la mutación que crea un sitio de conjugación.

"Región bisagra" como se usa en el presente documento, generalmente se define como el tramo de Glu216 a Pro230 de IgG1 humana (Burton, 1985, *Molec. Immunol.* 22: 161-206) y se refiere a la porción de una molécula de IgG que comprende la porción C-terminal del dominio CH1 y la porción N-terminal del dominio CH2. Las regiones bisagra ilustrativas para IgG1, IgG2, IgG2 e IgG4 humanas e IgG1 e IgG2A de ratón se proporcionan en la Patente de EE.UU. N.º 6.165.476, en la Tabla que se muestra en la columna 4, línea 54 a la columna 5, línea 15, y también se ilustra, por ejemplo, en Janeway *et al.*, 1999, *Immunology: The Immune System in Health and Disease*, 4ª ed. (Elsevier Science Ltd.); Bloom *et al.*, 1997, *Protein Science* 6:407-415; Humphreys *et al.*, 1997, *J. Immunol. Methods* 209:193-202. Las regiones de bisagra de otros isotipos de IgG pueden alinearse con la secuencia de IgG 1 colocando el primer y el último restos de cisteína que forman enlaces S-S entre cadenas pesadas en las mismas posiciones. Una alineación ilustrativa de los dominios constantes de la IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas que muestra la alineación de la región bisagra de cada subclase se muestra en la Figura 19B. La "región bisagra inferior" de una región Fc se define normalmente como el tramo de restos inmediatamente C-terminal a la región bisagra, es decir, los restos 233 a 239 de la región Fc

La expresión "región bisagra-Fc de IgG" o "fragmento bisagra-Fc" como se usa en el presente documento se refiere a una región bisagra (aproximadamente restos 216-230) y una región Fc (restos 231-447) C-terminal a la misma.

Una "cadena ligera Kappa modificada por ingeniería genética" como se usa la expresión en el presente documento, se refiere a una cadena ligera Kappa, o una porción de la misma, que comprende una región constante de cadena ligera Kappa modificada por ingeniería genética (C_K) que comprende al menos una sustitución de aminoácidos para introducir un grupo reactivo útil para la conjugación en ese sitio.

"Región constante kappa modificada por ingeniería genética", "polipéptido C_K modificado por ingeniería genética", "C_K modificado por ingeniería genética" y "región C_K modificada por ingeniería genética" como se usan indistintamente en el presente documento, significan la región constante de una cadena ligera kappa, o una porción de la misma, que comprende al menos una mutación de aminoácido para introducir un aminoácido que comprende un grupo reactivo útil para la conjugación en comparación con una región constante kappa de tipo silvestre que no está tan modificada. Una secuencia de aminoácidos de la región constante kappa de tipo silvestre humana ilustrativa se muestra en la Figura 18A y se establece en SEQ ID NO:89.

"Región constante lambda modificada por ingeniería genética", "polipéptido C_λ modificado por ingeniería genética", "C_λ modificado por ingeniería genética" y "región C_λ modificada por ingeniería genética" como se usan indistintamente en el presente documento, significan la región constante de una cadena ligera lambda, o una porción de la misma, que comprende al menos una mutación de aminoácido para introducir un aminoácido que comprende un grupo reactivo útil para la conjugación en comparación con una región constante kappa de tipo silvestre que no está tan modificada.

Un "anticuerpo modificado por ingeniería genética", como se usa el término en el presente documento, significa un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende al menos una región constante modificada por ingeniería genética, por ejemplo, una región Fc modificada por ingeniería genética, una región C_K modificada por ingeniería genética y/o una región C_λ modificada por ingeniería genética.

Por la expresión "porción de unión a antígeno del anticuerpo modificado por ingeniería genética", o "porción de anticuerpo modificada por ingeniería genética", como se usa en el presente documento, se entiende un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo, por ejemplo, un Fab, un F(ab')₂ y similares, que comprende al menos una región constante modificada por ingeniería genética.

Aun además, un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo puede ser parte de moléculas de inmunoadhesión

más grandes, formadas por asociación covalente o no covalente del anticuerpo o porción de anticuerpo con una o más proteínas o péptidos diferentes. Los ejemplos de dichas moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de la región central de estreptavidina para crear una molécula scFv tetramérica (Kipriyanov *et al.* Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101 (1995)) y el uso de un resto de cisteína, un péptido marcador y una etiqueta de polihistidina C-terminal para producir moléculas scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov *et al.* Mol. Immunol. 31:1047-1058 (1994)). Otros ejemplos incluyen cuando una o más CDR de un anticuerpo se incorporan a una molécula ya sea de manera covalente o no covalente para convertirla en una inmunoadhesina que se une específicamente a un antígeno de interés, tal como un antígeno tumoral. En dichas realizaciones, la o las CDR pueden incorporarse como parte de una cadena polipeptídica más grande, pueden estar unidas covalentemente a otra cadena polipeptídica o pueden incorporarse de forma no covalente. Las porciones de anticuerpos, tales como los fragmentos Fab y F(ab')₂, pueden prepararse a partir de anticuerpos completos usando técnicas convencionales, tales como digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos completos. Por otra parte, los anticuerpos, las porciones de anticuerpo y las moléculas de inmunoadhesión pueden obtenerse usando técnicas de ADN recombinante convencionales, como se describe en el presente documento.

Cuando en el presente documento se hace referencia a un "anticuerpo" con respecto a la presente invención, debe entenderse que también puede usarse una porción de unión a antígeno del mismo. Una porción de unión a antígeno compete con el anticuerpo intacto por la unión específica. Véase generalmente, Fundamental Immunology, Cap. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed., Raven Press, N.Y. (1989)). Las porciones de unión a antígeno pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante o mediante escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. En algunas realizaciones, las porciones de unión a antígeno incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb y fragmentos de la región determinante de complementariedad (CDR), anticuerpos monocatenarios (scFv), anticuerpos quiméricos, diacuerpos, anticuerpos monocatenarios tales como aquellos derivados de camélidos o de receptores de antígenos nuevos de inmunoglobulina de tiburón (IgNAR) y polipéptidos que contienen al menos una porción de un anticuerpo que es suficiente para conferir unión a antígeno específica al polipéptido. En realizaciones que tienen uno o más sitios de unión, los sitios de unión pueden ser idénticos entre sí o pueden ser diferentes.

Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" como se usan en el presente documento se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una especificidad de unión única y afinidad por un epítipo particular

Las expresiones "anticuerpo humano" o "anticuerpo completamente humano", como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tengan regiones variables en las cuales tanto las regiones marco como las CDR derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Adicionalmente, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también deriva de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la divulgación o porciones de unión a antígeno de los mismos pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los cuales las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias marco humanas.

Las expresiones "anticuerpo monoclonal humano" o "anticuerpo monoclonal completamente humano" se refieren a anticuerpos que muestran una única especificidad de unión que tienen regiones variables en las cuales tanto las regiones CDR como las marco derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos se producen mediante un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera, donde la célula B se fusiona a una célula inmortalizada.

La expresión "anticuerpo humano recombinante", como se usa en el presente documento, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, se expresan, se crean o se aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir del mismo (descrito además a continuación), (b) anticuerpos aislados de una célula hospedadora transformada para expresar el anticuerpo humano, por ejemplo, de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca recombinante combinatoria de anticuerpos humanos y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Estos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las cuales las regiones marco y CDR derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En determinadas realizaciones, sin embargo, dichos anticuerpos humanos recombinantes pueden someterse a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y, por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivan de y están relacionadas con secuencias V_H y V_L de la línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

Como se usa en el presente documento, "isotipo" o "clase" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG) que está codificada por los genes de la región constante de la cadena pesada. Los dominios constantes de los anticuerpos no están implicados en la unión a antígeno, sino que muestran diversas funciones efectoras. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada, un anticuerpo o una inmunoglobulina humana dados pueden asignarse a una de las cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Las estructuras y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. De las diversas clases de inmunoglobulinas humanas, se sabe que solo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgM humanas activan el complemento. Se sabe que la IgG1 y la IgG3 humanas median ADCC en humanos.

Como se usa en el presente documento, "subclase" se refiere a la especificación adicional dentro de un isotipo del gen de la región constante de la cadena pesada, tales como, por ejemplo, las subclases IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 dentro del isotipo IgG.

Las expresiones "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se usan indistintamente en el presente documento con la expresión "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".

La expresión "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una reacción mediada por células en donde células citotóxicas no específicas (por ejemplo, células NK, neutrófilos, macrófagos, etc.) reconocen el anticuerpo unido a una célula diana y posteriormente provocan la lisis de la célula diana. Estas células citotóxicas que median la ADCC generalmente expresan receptores Fc (FcR). Las células primarias que median la ADCC (células NK) expresan FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII, FcγRIII y/o FcγRIV. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula, puede realizarse un ensayo ADCC *in vitro*, tal como el que se describe en las Pat. de EE.UU. N.º 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Como alternativa o adicionalmente, la actividad de ADCC de las moléculas de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes *et al.*, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 95:652-656.

La expresión y el término "receptor Fc" o "FcR" se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo donde la región Fc comprende una región bisagra y los dominios C_H2 y C_H3 de la cadena pesada. Por ejemplo, el FcR puede ser un FcR humano de secuencia nativa. El FcR puede ser uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor γ) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, FcγRIII y FcγRIV, incluyendo las variantes alélicas y las formas de corte y empalme alternativas de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplasmáticos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación de inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición de inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplasmático (véase, Daeron, 1997, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, 1991, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92; Capel *et al.*, 1994, *Immunomethods* 4:25-34; de Haas *et al.*, 1995, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-341; y Nimmerjahn *et al.*, 2005, *Immunity* 23:2-4. Otros FcR, incluyendo aquellos que se identifiquen en el futuro, están abarcados por el término "FcR" en el presente documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, 1976, *Immunol.* 117:587) y Kim *et al.*, 1994, *J. Immunol.* 24:249). El sitio de unión a FcR principal en los fragmentos Fc de inmunoglobulina reside en la región bisagra entre C_H1 y C_H2. Esta región bisagra interactúa con el FcR1-3 en diversos leucocitos y desencadena que estas células ataquen a la diana. (Wines *et al.*, 2000, *J. Immunol.* 164:5313-5318). La región de la bisagra abarca, pero no se limita a, las secuencias descritas en la Patente de EE.UU. N.º 6.165.476.

La expresión "capaz de inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)" se refiere a la capacidad de un agente, tal como un anticuerpo, de demostrar ADCC medida mediante ensayo o ensayos conocidos por aquellos expertos en la materia. Esta actividad se caracteriza normalmente por la unión de la región Fc con diversos FcR. Sin estar limitado por ningún mecanismo en particular, los expertos en la materia reconocerán que la capacidad de un anticuerpo de demostrar ADCC puede ser, por ejemplo, en virtud de su subclase (tal como IgG1 o IgG3), por mutaciones introducidas en la región Fc, o en virtud de modificaciones en los patrones de hidratos de carbono en la región Fc del anticuerpo. Tales modificaciones se describen, por ejemplo, en la Publicación de Patente de EE.UU. N.º 2007/0092521.

La expresión "derivados de anticuerpos humanos" se refiere a cualquier forma modificada del anticuerpo humano, por ejemplo, un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo.

La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos en los cuales las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias marco humanas. Pueden realizarse modificaciones adicionales de la región marco dentro de las secuencias marco humanas.

Por la expresión "se une específicamente", como se usa en el presente documento, se entiende un compuesto, por ejemplo, una proteína, un ácido nucleico, un anticuerpo y similares, que reconoce y se une a una molécula específica, pero no reconoce ni se une sustancialmente a otras moléculas en una muestra. Por ejemplo, un anticuerpo o un

inhibidor de péptidos que reconoce y se une a un ligando afín (por ejemplo, un anticuerpo anti-IgE que se une a su antígeno afín, IgE) en una muestra, pero no reconoce ni se une sustancialmente a otras moléculas en la muestra. Por lo tanto, en condiciones de ensayo designadas, la fracción de unión especificada (por ejemplo, un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo) se une preferentemente a una molécula diana particular, por ejemplo, IgE, y no se une en una cantidad significativa a otros componentes presentes en una muestra de prueba. Puede usarse una diversidad de formatos de ensayo para seleccionar un anticuerpo que se una específicamente a una molécula de interés. Por ejemplo, inmunoensayo ELISA en fase sólida, inmunoprecipitación, BIAcore, FACS y análisis por transferencia Western se encuentran entre los muchos ensayos que pueden usarse para identificar un anticuerpo que reaccione específicamente con IgE. Normalmente, una reacción específica o selectiva será al menos dos veces una señal de fondo o ruido y más normalmente más de 10 veces de fondo, incluso más específicamente, se dice que un anticuerpo se "une específicamente" a un antígeno cuando la constante de disociación de equilibrio (K_D) es $\leq 1 \mu\text{M}$, preferentemente $\leq 100 \text{ nM}$ y lo más preferentemente $\leq 10 \text{ nM}$.

La expresión "afinidad de unión" se usa en el presente documento como una medida de la fuerza de una interacción no covalente entre dos moléculas, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo y un antígeno. La expresión "afinidad de unión" se usa para describir interacciones monovalentes (actividad intrínseca).

La afinidad de unión entre dos moléculas, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo y un antígeno, a través de una interacción monovalente puede cuantificarse mediante la determinación de la constante de disociación (K_D). A su vez, K_D puede determinarse midiendo la cinética de formación y disociación de complejos, por ejemplo, mediante el método SPR (Biacore). Las constantes de velocidad correspondientes a la asociación y la disociación de un complejo monovalente se denominan constantes de velocidad de asociación k_a (o k_{on}) y constante de velocidad de disociación k_d (o k_{off}), respectivamente. La K_D está relacionada con k_a y k_d a través de la ecuación $K_D = k_d / k_a$.

Siguiendo la definición anterior, las afinidades de unión están asociadas a diferentes interacciones moleculares, por ejemplo, la comparación de la afinidad de unión de diferentes anticuerpos para un antígeno dado, puede compararse mediante la comparación de los valores de K_D para los complejos anticuerpo/antígeno individuales.

De manera similar, la especificidad de una interacción puede evaluarse mediante la determinación y la comparación del valor de K_D para la interacción de interés, por ejemplo, una interacción específica entre un anticuerpo y un antígeno, con el valor de K_D de una interacción que no es de interés.

El término " k_{on} ", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la velocidad "on" o la velocidad de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno o receptor-ligando particulares, mientras que el término " k_{off} ", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la velocidad "off" o la velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno/receptor-ligando particulares. El término " K_D ", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de disociación, que se obtiene de la relación de k_{off} a k_{on} (es decir, k_{off}/k_{on}) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de K_D para los anticuerpos u otros compañeros de unión pueden determinarse usando métodos bien establecidos en la técnica. Un método para determinar la K_D se realiza mediante resonancia de plasmón superficial, normalmente usando un sistema biosensor tal como un sistema Biacore®.

La expresión "anticuerpo quimérico" como se usa en el presente documento significa un anticuerpo que comprende regiones de dos o más anticuerpos diferentes. En determinadas realizaciones un "anticuerpo quimérico" comprende secuencias de región variable derivadas de una especie y secuencias de región constante derivadas de otra especie, tal como un anticuerpo en el cual las secuencias de la región variable proceden de un anticuerpo de ratón y las secuencias de la región constante proceden de un anticuerpo humano. En una realización, una o más de las CDR proceden de un anticuerpo de ratón anti-antígeno tumoral humano. En otra realización, todas las CDR proceden de un anticuerpo de ratón anti-antígeno tumoral humano. En otra realización, las CDR de más de un anticuerpo de ratón anti-antígeno tumoral humano se combinan en un anticuerpo humano quimérico. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede comprender una CDR1 de la cadena ligera de un primer anticuerpo de ratón anti-antígeno tumoral humano, una CDR2 de la cadena ligera de un segundo anticuerpo de ratón anti-antígeno tumoral humano y una CDR3 y CDR3 de la cadena ligera de un tercer anticuerpo de ratón anti-antígeno tumoral humano, y las CDR de la cadena pesada pueden proceder de uno o más anticuerpos anti-antígeno tumoral humano distintos. Además, las regiones marco pueden derivar de uno de los mismos anticuerpos de ratón anti-antígeno tumoral humano o de uno o más ratones diferentes.

Por otra parte, como se analizó anteriormente en el presente documento, el anticuerpo quimérico incluye un anticuerpo que comprende una porción derivada de las secuencias de la línea germinal de más de una especie.

"Glucoforma" se refiere a una estructura compleja de oligosacárido que comprende enlaces de diversas unidades de hidratos de carbono. Estas estructuras se describen en, por ejemplo, *Essentials of Glycobiology* Varki *et al.*, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1999), que también proporciona una revisión de la nomenclatura convencional de la glucobiología. Dichas glucoformas incluyen, pero no se limitan a, G2, G1, G0, G-1 y G-2 (véase, por ejemplo, la Publicación de Patente Internacional N.º WO 99/22764).

El "patrón de glucosilación" se define como el patrón de unidades de hidratos de carbono que están unidas

covalentemente a una proteína (por ejemplo, la glucoforma), así como al sitio o sitios a los cuales la glucoforma o glucoformas están unidas covalentemente a la cadena principal peptídica de una proteína, más específicamente a una proteína de inmunoglobulina.

Es probable que los anticuerpos expresados por diferentes líneas celulares o en animales transgénicos tengan diferentes glucoformas y/o patrones de glucosilación en comparación con otros. Sin embargo, todos los anticuerpos codificados por las moléculas de ácido nucleico proporcionadas en el presente documento o que comprenden las secuencias de aminoácidos proporcionadas en el presente documento son parte de la presente invención, independientemente de la glucosilación de los anticuerpos.

"Conjugado de anticuerpos y fármaco" como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo, o una porción de un anticuerpo, unido covalentemente a un fármaco/agente citotóxico o citostático donde el fármaco/agente también se denomina en el presente documento una "carga útil". El anticuerpo y el fármaco pueden estar unidos directamente o pueden estar unidos a través de una fracción denominada un "enlazador".

Por las expresiones "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se entiende una cantidad que cuando se administra a un mamífero, preferentemente un ser humano, media una respuesta terapéutica detectable en comparación con la respuesta detectada en ausencia del compuesto. Una respuesta terapéutica, tales como, pero no limitado a, inhibición y/o disminución del crecimiento tumoral, tamaño del tumor, metástasis y similares, puede evaluarse fácilmente mediante una gran cantidad de métodos reconocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, métodos tales como se divulgan describen en el presente documento.

El experto en la materia comprenderá que la cantidad eficaz del compuesto o la composición administrados en el presente documento varía y puede determinarse fácilmente en función de una serie de factores tales como la enfermedad o la afección que se esté tratando, la etapa de la enfermedad, la edad, la salud y la condición física del mamífero que se está tratando, la gravedad de la enfermedad, el compuesto particular que se está administrando, el nivel de expresión/disponibilidad de la diana del conjugado de anticuerpos y fármaco y similares.

Por el término "competir", como se usa en el presente documento con respecto a un anticuerpo, se entiende que un primer anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, compite por la unión con un segundo anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, donde la unión del primer anticuerpo con su epítipo afin disminuye de forma detectable en presencia del segundo anticuerpo en comparación con la unión del primer anticuerpo en ausencia del segundo anticuerpo. La alternativa, donde la unión del segundo anticuerpo a su epítipo también disminuye de forma detectable en presencia del primer anticuerpo, puede, pero no tiene por qué, ser el caso. Es decir, un primer anticuerpo puede inhibir la unión de un segundo anticuerpo a su epítipo sin que ese segundo anticuerpo inhiba la unión del primer anticuerpo a su epítipo respectivo. Sin embargo, cuando cada anticuerpo inhibe de forma detectable la unión del otro anticuerpo con su epítipo o ligando afin, ya sea al mismo, en mayor o menor medida, se dice que los anticuerpos "compiten de forma cruzada" entre sí por la unión de sus respectivos epítipos. Por ejemplo, los anticuerpos de competencia cruzada pueden unirse al epítipo, o porción del epítipo, a los que se unen los anticuerpos usados en la invención. La presente invención abarca el uso de anticuerpos tanto competitivos como de competencia cruzada. Independientemente del mecanismo por el cual se produce dicha competición o competición cruzada (por ejemplo, impedimento estérico, cambio conformacional o unión a un epítipo común, o porción del mismo, y similares), el experto en la materia apreciará, basándose en las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, que dichos anticuerpos competitivos y/o de competencia cruzada están abarcados y pueden ser útiles para los métodos divulgados en el presente documento.

El término "epítipo" incluye cualquier determinante proteico capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o receptor de linfocitos T. Los determinantes epitópicos habitualmente consisten en agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activa tales como cadenas laterales de aminoácidos o azúcares y por lo general tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítipos conformacionales y no conformacionales se distinguen por que la unión a los primeros, pero no a los últimos, se pierde en presencia de disolventes desnaturalizantes.

"Material didáctico", como se usa esta expresión en el presente documento, incluye una publicación, una grabación, un diagrama o cualquier otro medio de expresión que pueda usarse para comunicar la utilidad del compuesto, la combinación y/o la composición de la invención en el kit para afectar, aliviar o tratar las diversas enfermedades o trastornos citados en el presente documento. Opcionalmente, o como alternativa, el material didáctico puede describir uno o más métodos para aliviar las enfermedades o trastornos en una célula, un tejido o un mamífero, incluyendo como se ha divulgado en cualquier otro sitio del presente documento.

El material didáctico del kit puede, por ejemplo, fijarse a un recipiente que contenga el compuesto y/o la composición de la invención o enviarse junto con un recipiente que contenga el compuesto y/o la composición. Como alternativa, el material didáctico puede enviarse separado del recipiente con la intención de que el destinatario use el material didáctico y el compuesto de forma cooperativa.

Excepto cuando se indique, los términos "paciente" o "sujeto" se usan indistintamente y se refieren a mamíferos tales

como pacientes humanos y primates no humanos, así como sujetos veterinarios tales como conejos, ratas, ratones y otros animales. Preferentemente, paciente se refiere a un ser humano.

En el presente documento se usa la anotación convencional para representar las secuencias de polipéptidos: el extremo izquierdo de una secuencia polipeptídica es el extremo amino; el extremo derecho de una secuencia polipeptídica es el extremo carboxilo.

Por la expresión "se une específicamente", como se usa en el presente documento, se entiende un compuesto, por ejemplo, una proteína, un ácido nucleico, un anticuerpo y similares, que reconoce y se une a una molécula específica, pero no reconoce ni se une sustancialmente a otras moléculas en una muestra. Por ejemplo, un anticuerpo o un receptor peptídico que reconoce y se une a un ligando afín o a un compañero de unión (por ejemplo, un anticuerpo anti-antígeno tumoral humano que se une a un antígeno tumoral) en una muestra, pero no reconoce ni se une sustancialmente a otras moléculas en la muestra. Por lo tanto, en condiciones de ensayo designadas, la fracción de unión especificada (por ejemplo, un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo o un receptor o una porción de unión a ligando del mismo) se une preferentemente a una molécula diana particular y no se une en una cantidad significativa a otros componentes presentes en una muestra de prueba. Puede usarse una diversidad de formatos de ensayo para seleccionar un anticuerpo o péptido que se una específicamente a una molécula de interés. Por ejemplo, inmunoensayo ELISA en fase sólida, inmunoprecipitación, BIAcore™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ), clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), Octet™ (FortéBio, Inc., Menlo Park, CA) y análisis por transferencia Western se encuentran entre los muchos ensayos que pueden usarse para identificar un anticuerpo que reacciona específicamente con un antígeno o un receptor, o porción de unión a ligando del mismo, que se une específicamente con un ligando afín o compañero de unión. Normalmente, una reacción específica o selectiva será al menos dos veces una señal de fondo o ruido y más normalmente más de 10 veces de fondo, incluso más específicamente, se dice que un anticuerpo se "une específicamente" a un antígeno cuando la constante de disociación de equilibrio (K_D) es $\leq 1 \mu\text{M}$, preferentemente $\leq 100 \text{ nM}$ y lo más preferentemente $\leq 10 \text{ nM}$.

Por "ADCC" o "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" como se usa en el presente documento se entiende la reacción mediada por células en donde células citotóxicas no específicas que expresan Fc y R reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente provocan la lisis de la célula diana. La actividad ADCC de una molécula de interés puede evaluarse usando un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como aquel descrito en la patente de EE.UU. N.º 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Como alternativa o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes *et al.*, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 95:652-656.

Por "ADCP" o "fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos" como se usa en el presente documento se entiende la reacción mediada por células en donde células citotóxicas no específicas que expresan Fc y R reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente provocan la fagocitosis de la célula diana.

"CDC" o "citotoxicidad dependiente del complemento" se refieren a la lisis de una célula diana en presencia de complemento. La vía de activación del complemento se inicia mediante la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) complejada con un antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, un ensayo de CDC, tales como, pero no limitado a, un ensayo descrito en Gazzano-Santoro *et al.*, 1996, J. Immunol. Methods 202:163, puede realizarse.

El "dominio CH2" de una región Fc de IgG humana (también denominado dominio "Cy2") generalmente se extiende de aproximadamente el aminoácido 231 a aproximadamente el aminoácido 340. El dominio CH2 es único en el sentido de que no está estrechamente emparejado con otro dominio. Más bien, dos cadenas de hidratos de carbono ramificadas unidas en N se interponen entre los dos dominios CH2 de una molécula de IgG natural intacta. Se ha especulado que el hidrato de carbono puede proporcionar un sustituto para el emparejamiento dominio-dominio y ayudar a estabilizar el dominio CH2. Burton, Molec. Immunol. 22: 161-206 (1985).

El "dominio CH3" comprende el tramo de restos C-terminales a un dominio CH2 en una región Fc (es decir, de aproximadamente el resto de aminoácido 341 a aproximadamente el resto de aminoácido 447 de una IgG).

La expresión "función efectora", como se usa el término en el presente documento, se refiere a las actividades biológicas atribuibles o mediadas por la región Fc de un anticuerpo. Las "funciones efectoras" ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, unión de C1q; citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCP); regulación negativa de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B; BCR), etc. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.º 6.737.056. Dichas funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y pueden evaluarse usando varios ensayos como se divulga en el presente documento, por ejemplo, así como aquellos ensayos conocidos en la técnica, para evaluar dichas funciones efectoras de anticuerpos.

Por "fusión Fc" o "proteína de fusión Fc" como se usa en el presente documento se entiende una proteína en donde

uno o más polipéptidos están unidos operativamente a una región Fc o un derivado de la misma. La fusión Fc se entiende en el presente documento siendo sinónima de los términos "inmuno adhesina", "fusión de Ig", "quimera de Ig" y "globulina receptora" (a veces con guiones) como se usan en la técnica anterior (Chamow *et al.*, 1996, Trends Biotechnol. 14:52-60; Ashkenazi *et al.*, 1997, Curr. Opin. Immunol. 9:195-200). Una fusión Fc combina la región Fc de una inmunoglobulina con un compañero de fusión, que en general puede ser cualquier proteína o molécula pequeña. El papel de la parte no Fc de una fusión Fc, es decir, el compañero de fusión, es mediar la unión de la diana y, por lo tanto, es funcionalmente análogo a las regiones variables de un anticuerpo. Prácticamente cualquier proteína o molécula pequeña puede unirse a un polipéptido Fc para generar una fusión Fc. Los compañeros de fusión de proteínas pueden incluir, pero no se limitan a, la región de unión a diana de un receptor, una molécula de adhesión, un ligando, una enzima, una citocina, una quimiocina o alguna otra proteína o dominio proteico. Los compañeros de fusión de moléculas pequeñas pueden incluir cualquier agente terapéutico que dirija la fusión de Fc a una diana terapéutica. Dichas dianas pueden ser cualquier molécula, preferentemente un receptor extracelular, que está implicada en la enfermedad.

Por "IgG" como se usa en el presente documento se entiende un polipéptido que pertenece a la clase de anticuerpos que están sustancialmente codificados por un gen de inmunoglobulina y reconocido. En seres humanos esta clase comprende IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En ratones esta clase comprende IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3. Por "inmunoglobulina (Ig)" en el presente documento se entiende una proteína que consiste en uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por genes de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas incluyen pero no se limitan a anticuerpos. Las inmunoglobulinas pueden tener varias formas estructurales, incluyendo pero no limitado a anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos y dominios de inmunoglobulina individuales. Por "dominio de inmunoglobulina (Ig)" en el presente documento se entiende una región de una inmunoglobulina que existe como una entidad estructural distinta según lo determine un experto en la materia de la estructura de proteínas. Los dominios Ig tienen normalmente una topología de plegamiento característica. Los dominios Ig conocidos en la clase de anticuerpos IgG son el dominio de cadena pesada variable (V_H), los dominios constantes de la cadena pesada (C_γ1, C_γ2, C_γ3) que comprenden juntos el dominio C_γ que incluye la región bisagra entre C_γ1 y C_γ2, el dominio variable de la cadena ligera (V_L) y el dominio constante de la cadena ligera (C_L), que en seres humanos comprende el dominio constante de cadena ligera kappa (C_κ) o lambda (C_λ). Normalmente, un "polipéptido Fc", como se usa el término en el presente documento, comprende un dominio C_γ2 y un dominio C_γ3 y puede incluir al menos una porción del dominio bisagra, pero habitualmente no incluye todo el dominio C_γ1.

Por "polipéptido progenitor" o "polipéptido precursor" (incluyendo el precursor Fc o sus precursores) como se usa en el presente documento se entiende un polipéptido que se modifica posteriormente para generar una variante o mutante. Dicho polipéptido precursor puede ser un polipéptido de origen natural o una variante o versión modificada por ingeniería genética de un polipéptido de origen natural. El polipéptido precursor puede referirse al polipéptido en sí, a composiciones que comprenden el polipéptido precursor, a la secuencia de aminoácidos del polipéptido o a la secuencia de ácido nucleico que lo codifica. En consecuencia, por "polipéptido Fc precursor" como se usa en el presente documento se entiende un polipéptido Fc no modificado que se modifica para generar una variante, y por "anticuerpo precursor" como se usa en el presente documento se entiende un anticuerpo no modificado que se modifica para generar un anticuerpo variante.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "aminoácido de tipo silvestre", "IgG de tipo silvestre", "anticuerpo de tipo silvestre" o "mAb de tipo silvestre", se refieren a una secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos que se produce de forma natural dentro de una determinada población (por ejemplo, ser humano, ratón, ratas, célula, etc.).

Como se describió anteriormente, pueden alterarse determinadas posiciones de la molécula Fc. Por "posición" como se usa en el presente documento se entiende una ubicación en la secuencia de una proteína. Las posiciones pueden numerarse secuencialmente o de acuerdo con un formato establecido, por ejemplo, el índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85. Por ejemplo, la posición 297 es una posición en el anticuerpo humano IgG1. Las posiciones correspondientes se determinan como se describe anteriormente, generalmente a través de la alineación con otras secuencias precursores.

Por "resto", como se usa en el presente documento, se hace referencia a una posición en una proteína y su identidad de aminoácido asociada. Por ejemplo, Asparagina 297 (también conocida como Asn297, también conocida como N297) es un resto del anticuerpo humano IgG1.

Por "antígeno diana" en el presente documento se entiende la molécula que está unida específicamente a la región variable de un anticuerpo determinado. Un antígeno diana puede ser una proteína, un hidrato de carbono, un lípido u otro compuesto químico.

Por "célula diana" en el presente documento se entiende una célula que expresa un antígeno diana.

Por "región variable" como se usa en el presente documento se entiende la región de una inmunoglobulina que comprende uno o más dominios Ig codificados sustancialmente por cualquiera de los genes V kappa, V lambda, y/o V_H que conforman los locus genéticos de inmunoglobulina kappa, lambda y de cadena pesada respectivamente.

Por "polipéptido variante" como se usa en el presente documento se entiende una secuencia polipeptídica que difiere de la de una secuencia polipeptídica original en virtud de al menos una modificación de aminoácido. El polipéptido variante puede referirse al polipéptido en sí, a una composición que comprende el polipéptido o a la secuencia de aminoácidos que lo codifica. Preferentemente, el polipéptido variante tiene al menos una modificación de aminoácido en comparación con el polipéptido precursor, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez modificaciones de aminoácidos y preferentemente de aproximadamente una a aproximadamente cinco modificaciones de aminoácidos en comparación con el precursor. La secuencia polipeptídica variante descrita en el presente documento poseerá preferentemente al menos aproximadamente el 80 por ciento de homología con una secuencia polipeptídica precursora y más preferentemente al menos aproximadamente el 90 por ciento de homología, más preferentemente al menos aproximadamente el 95 por ciento de homología, incluso más preferentemente, al menos aproximadamente el 97 % de homología, más preferentemente, al menos aproximadamente el 98 % de homología y aún más preferentemente, al menos aproximadamente el 99 % de homología con una secuencia polipeptídica precursora. En consecuencia, por "variante Fc" como se usa en el presente documento se entiende una secuencia Fc que difiere de la de una secuencia Fc precursora en virtud de al menos una modificación de aminoácido. Una variante Fc puede abarcar únicamente una región Fc o puede existir en el contexto de un anticuerpo, Fusión de Fc, u otro polipéptido que está sustancialmente codificado por Fc. La variante Fc puede referirse al propio polipéptido Fc, a composiciones que comprenden el polipéptido variante Fc, a la secuencia de aminoácidos del polipéptido Fc o a la secuencia de ácido nucleico que lo codifica. En una realización preferida, las proteínas variantes de la invención comprenden una variante Fc, como se describe en el presente documento, y como tal, pueden comprender un anticuerpo (y los derivados correspondientes) con la variante Fc, o una proteína de fusión Fc que comprende la variante Fc. Además, en algunos casos, el Fc es una variante en comparación con un Fc de tipo silvestre o con una variante "precursora".

Para todas las posiciones de aminoácidos de la región constante de cadena pesada analizadas en la presente invención, la numeración es de acuerdo con el índice Eu descrito por primera vez en Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63(1):78-85, que describe la secuencia de aminoácidos de la proteína Eu del mieloma, que es la primera IgG1 humana secuenciada. El índice Eu de Edelman *et al.* también se establece en Kabat *et al.*, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda. Por lo tanto, el "EU index of Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85" se refiere al sistema de numeración de restos basado en el anticuerpo humano IgG1 Eu de Edelman *et al.* como se establece en Kabat 1991.

El sistema de numeración usado para la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena ligera es el establecido en Kabat 1991.

Como se usa en el presente documento, "sustancialmente puro" significa que una especie objeto es la especie predominante presente (es decir, en una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición), y preferentemente una fracción sustancialmente purificada es una composición en donde la especie objeto (por ejemplo, una glucoproteína, incluyendo un anticuerpo o receptor) comprende al menos aproximadamente el 50 por ciento (en una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. Generalmente, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente el 80 por ciento de todas las especies macromoleculares presentes en la composición, más preferentemente más de aproximadamente el 85 %, el 90 %, el 95 % y el 99 %. Lo más preferentemente, la especie objeto se purifica hasta alcanzar una homogeneidad esencial (las especies contaminantes no pueden detectarse en la composición mediante métodos de detección convencionales) en donde la composición consiste esencialmente en una única especie macromolecular.

Como se usa en el presente documento, "tratar" significa reducir la frecuencia con la que un paciente experimenta síntomas de una enfermedad (es decir, crecimiento y/o metástasis tumorales u otro efecto mediado por el número y/o la actividad de las células inmunitarias y similares). El término incluye la administración de los compuestos o agentes de la presente invención para prevenir o retrasar la aparición de los síntomas, complicaciones o indicios bioquímicos de una enfermedad, aliviar los síntomas o detener o inhibir un mayor desarrollo de la enfermedad, afección o trastorno. El tratamiento puede ser profiláctico (para prevenir o retrasar la aparición de la enfermedad, o para prevenir la manifestación de síntomas clínicos o subclínicos de la misma) o terapéutico de supresión o alivio de los síntomas después de la manifestación de la enfermedad.

La "combiterapia" abarca la administración de un conjugado de anticuerpos y fármaco y otro agente terapéutico como parte de un régimen de tratamiento específico que incluye opcionalmente una fase de mantenimiento, destinado a proporcionar un efecto beneficioso a partir de la acción conjunta de estos agentes terapéuticos. El efecto beneficioso de la combinación incluye, pero no se limita a, coacción farmacocinética o farmacodinámica resultante de la combinación de agentes terapéuticos. La administración de estos agentes terapéuticos en combinación normalmente se lleva a cabo durante un período de tiempo definido (normalmente minutos, horas, días o semanas dependiendo de la combinación seleccionada). La "combiterapia" generalmente no pretende abarcar la administración de dos o más de estos agentes terapéuticos como parte de regímenes de monoterapia separados que incidental y arbitrariamente dan como resultado las combinaciones de la presente invención.

La "combiterapia" abarca la administración de estos agentes terapéuticos de manera secuencial, es decir, en donde cada agente terapéutico se administra en un momento diferente, así como la administración de estos agentes terapéuticos, o al menos dos de los agentes terapéuticos, de una manera sustancialmente simultánea. La administración secuencial o sustancialmente simultánea de cada agente terapéutico puede efectuarse por cualquier vía apropiada incluyendo, pero no limitado a, vías orales, vías intravenosas, intramusculares, vías subcutáneas y absorción directa a través de los tejidos de las membranas mucosas. Los agentes terapéuticos pueden administrarse por la misma vía o por vías diferentes. Por ejemplo, un primer agente terapéutico (por ejemplo, un agente quimioterapéutico) puede administrarse por vía oral y un segundo agente (por ejemplo, un ADC) puede administrarse por vía intravenosa. Además, un primer agente terapéutico de la combinación seleccionada puede administrarse mediante inyección intravenosa mientras que los otros agentes terapéuticos de la combinación pueden administrarse por vía oral. Como alternativa, por ejemplo, ambos agentes terapéuticos pueden administrarse mediante inyección intravenosa o subcutánea.

En la presente memoria descriptiva el término "secuencial" significa, a menos que se especifique lo contrario, caracterizado por una secuencia u orden regular, por ejemplo, si un régimen de dosificación incluye la administración de un ADC y un agente quimioterapéutico, un régimen de dosificación secuencial podría incluir la administración del ADC antes, simultáneamente, de manera sustancialmente simultánea o después de la administración del agente quimioterapéutico, pero ambos agentes se administrarán en una secuencia u orden regular. El término "separado" significa, a menos que se especifique lo contrario, mantener separados uno del otro. El término "simultáneamente" significa, a menos que se especifique lo contrario, sucediendo o hecho al mismo tiempo, es decir, los compuestos de la invención se administran al mismo tiempo. La expresión "de manera sustancialmente simultánea" significa que los compuestos se administran con minutos de diferencia entre sí (por ejemplo, con 10 minutos de diferencia entre sí) y pretende abarcar tanto la administración conjunta como la administración consecutiva, pero si la administración es consecutiva, está separada en el tiempo solo por un breve periodo (por ejemplo, el tiempo que le tomaría a un médico administrar dos compuestos por separado). Como se usa en el presente documento, administración concurrente y administración sustancialmente simultánea se usan indistintamente. La administración secuencial se refiere a la administración separada temporalmente del ADC y el agente quimioterapéutico.

La "combiterapia" también puede abarcar la administración de los agentes terapéuticos como se describen anteriormente en combinación adicional con otros principios biológicamente activos (tales como, pero no limitado a, un segundo agente antineoplásico diferente, una vacuna de células dendríticas u otra vacuna tumoral) y terapias no farmacológicas (tales como, pero no limitado a, cirugía o tratamiento de radiación). Cuando la combiterapia comprende además radioterapia, el tratamiento de radiación puede realizarse en cualquier momento adecuado siempre que se logre un efecto beneficioso de la acción conjunta de la combinación de los agentes terapéuticos y el tratamiento de radiación. Por ejemplo, en casos apropiados, el efecto beneficioso se consigue aun cuando el tratamiento de radiación se retira temporalmente de la administración de los agentes terapéuticos, quizás durante días o incluso semanas.

Como se usa en el presente documento, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares que son fisiológicamente compatibles. Los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. Las sustancias farmacéuticamente aceptables tales como humectantes o pequeñas cantidades de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que mejoran la vida útil o la eficacia de la proteína o una porción de la misma, también pueden incluirse en la composición.

I. Anticuerpos modificados por ingeniería genética y fragmentos de anticuerpos

La divulgación se basa en el descubrimiento de que ciertos restos presumiblemente presentes en la superficie del dominio CH2 o CH3 de la cadena pesada de anticuerpos, o en el dominio constante de la cadena ligera, o accesibles de otro modo, son adecuados para la sustitución del aminoácido de tipo silvestre presente de forma natural por, por ejemplo, cisteína y, por lo tanto, son útiles para modificar por ingeniería genética un sitio capaz de conjugarse con diversos agentes.

Otros aminoácidos además de la cisteína, incluyendo aminoácidos naturales y/o no naturales, pueden usarse en la sustitución para permitir, entre otras cosas, la conjugación de diversos agentes. Dichos otros aminoácidos incluyen lisina (descrita en Benhar *et al.*, (1994) Bioconjug. Chem. 5:321-326), tirosina (descrita en Byers y Baldwin, (1988) Immunol. 65:329-335), histidina (descrita en Waibel *et al.* (1999) Nature Biotechnol. 17:897-901), selenocisteína, selenometionina y/o aminoácidos no naturales. Por lo tanto, cuando una o más sustituciones de cisteína se describen en el presente documento, un experto en la materia puede emplear opcionalmente uno o más de estos aminoácidos naturales y/o no naturales en lugar de cisteína. Un experto en la materia también puede usar cualquier combinación de aminoácidos en la sustitución, tal como la sustitución con cisteína y lisina para producir un anticuerpo variante con cisteínas sustituidas en algunas posiciones y lisinas, tirosinas, histidinas, selenocisteínas, selenometioninas y/o aminoácidos no naturales en otros casos en cualquier combinación de los mismos.

Las modificaciones de aminoácidos pueden realizarse mediante cualquier método conocido en la técnica y muchos de estos métodos son bien conocidos y rutinarios para el experto en la materia. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, las sustituciones, deleciones e inserciones de aminoácidos pueden realizarse usando cualquier técnica conocida basada en PCR. Las sustituciones de aminoácidos pueden realizarse mediante mutagénesis dirigida al sitio (véase, por ejemplo, Zoller y Smith, 1982, Nucl. Acids Res. 10:6487-6500; Kunkel, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci EE.UU. 82:488).

En algunas realizaciones, el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación puede usarse para preparar un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de tal manera que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región Fc modificada por ingeniería genética que puede usarse para conjugar, en el resto modificado por ingeniería genética (es decir, el aminoácido sustituido en comparación con el Fc no modificado de tipo silvestre), una amplia diversidad de fracciones.

En algunas realizaciones, el polipéptido constante de cadena ligera kappa modificado por ingeniería genética de la divulgación puede usarse para preparar un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de tal manera que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende de esta manera una región C_L que comprende una mutación de aminoácido, o porción de la misma, que puede usarse para conjugar, en el resto de aminoácido modificado por ingeniería genética, una amplia diversidad de fracciones.

Regiones constantes de anticuerpos modificadas por ingeniería genética

A. Región constante de cadena pesada modificada por ingeniería genética

La divulgación proporciona un polipéptido Cy modificado por ingeniería genética, incluyendo, pero no limitado a, un polipéptido Fc, donde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más aminoácidos elegidos de las posiciones: 246, 249, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 327, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 360, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 390, 392, 393, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 443 y 444 de la cadena pesada del anticuerpo en donde el sistema de numeración de la región constante es aquel del índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85; (1991, NIH Publication 91- 3242, National Technical Information Service, Springfield, VA, en lo sucesivo en el presente documento "Kabat") de un anticuerpo progenitor, nativo o de tipo silvestre, se sustituyen por otro aminoácido (incluyendo aminoácidos naturales y no naturales/sintéticos).

Cabe señalar que una sola sustitución en un polipéptido Fc, por ejemplo, de un resto de cisteína, normalmente da como resultado la visualización de dos restos correspondientes en el anticuerpo IgG resultante debido a la naturaleza homodimérica de las moléculas de anticuerpos IgG. Por lo tanto, los anticuerpos IgG modificados por ingeniería genética resultantes de la divulgación pueden mostrar al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 o más grupos reactivos con el fide conjugación con un fármaco o compuesto. En una realización, una o más de las sustituciones es con un resto de cisteína, y los anticuerpos modificados por ingeniería genética resultantes pueden mostrar al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 o más grupos thiol con el fin de conjugación con un fármaco o compuesto.

En otra realización, el anticuerpo modificado por ingeniería genética comprende un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética que comprende diferentes posiciones sustituidas de una segunda región Fc modificada por ingeniería genética. Es decir, debido a la naturaleza dimérica de los anticuerpos IgG y debido a que existe una diversidad de métodos reconocidos en la técnica para preparar anticuerpos heterodiméricos que comprenden, entre otros, dos o más regiones Fc que difieren entre sí, la presente divulgación abarca un anticuerpo que comprende al menos una región Fc modificada por ingeniería genética que comprende una sustitución de aminoácidos que no está presente en la otra región Fc, que puede o no estar modificada por ingeniería genética también. Los métodos para fabricar anticuerpos heterodiméricos que comprenden regiones Fc que comprenden diferentes mutaciones son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, los métodos analizados en la Patente de EE.UU. N.º 7.183.076 de Arathoon *et al.*

En algunos aspectos de la divulgación, un anticuerpo modificado por ingeniería genética comprende un primer polipéptido Fc modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución en las posiciones seleccionadas de 246, 249, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 360, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 390, 392, 393, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 443 y 444 y comprende además una segunda región Fc que no está modificada por ingeniería genética, por ejemplo, comprende la secuencia de aminoácidos de IgG1 de tipo silvestre.

En algunos aspectos de la divulgación, un anticuerpo modificado por ingeniería genética comprende un primer polipéptido Fc modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución en las posiciones seleccionadas de 246, 249, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 360, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 390, 392, 393, 401, 404, 411,

413, 414, 416, 418, 419, 421, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 443 y 444 y comprende además un segundo polipéptido Fc modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución en las posiciones seleccionadas de 246, 249, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 360, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 390, 392, 393, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 443 y 444, en donde la sustitución presente en el primer polipéptido Fc modificado por ingeniería genética no es una sustitución presente en el segundo polipéptido Fc modificado por ingeniería genética.

En algunos aspectos de la divulgación, el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos una sustitución en las posiciones seleccionadas de: 246, 249, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 360, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 390, 392, 393, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 443 y 444 de la cadena pesada de un anticuerpo, en donde el sistema de numeración de la región constante es aquel del índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85; (anteriormente citado).

En algunos aspectos de la divulgación, el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos dos sustituciones en las posiciones seleccionadas de: 246, 249, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 360, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 390, 392, 393, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 443 y 444 de la cadena pesada de un anticuerpo, en donde el sistema de numeración de la región constante es aquel del índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85; (anteriormente citado).

En otros aspectos de la divulgación, el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos dos sustituciones seleccionadas de las posiciones 246, 249, 254, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 284, 287, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 327, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 359, 360, 361, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 383, 384, 386, 388, 390, 392, 393, 398, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 422, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 440, 443 y 444, de la cadena pesada de un anticuerpo, en donde al menos una sustitución se selecciona de las posiciones 246, 249, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 360, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 390, 392, 393, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 443 y 444 de la cadena pesada de un anticuerpo y en donde el sistema de numeración de la región constante es aquel del índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85; (anteriormente citado).

En otros aspectos de la divulgación, el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos tres sustituciones seleccionadas de las posiciones 246, 249, 254, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 284, 287, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 327, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 359, 360, 361, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 383, 384, 386, 388, 390, 392, 393, 398, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 422, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 440, 443 y 444, de la cadena pesada de un anticuerpo, en donde al menos una sustitución se selecciona de las posiciones 246, 249, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 360, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 390, 392, 393, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 443 y 444 de la cadena pesada de un anticuerpo y en donde el sistema de numeración de la región constante es aquel del índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85; (anteriormente citado).

En otros aspectos de la divulgación, el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos cuatro sustituciones seleccionadas de las posiciones 246, 249, 254, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 284, 287, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 327, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 359, 360, 361, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 383, 384, 386, 388, 390, 392, 393, 398, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 422, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 440, 443 y 444, de la cadena pesada de un anticuerpo, en donde al menos una sustitución se selecciona de las posiciones 246, 249, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 360, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 390, 392, 393, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 443 y 444 de la cadena pesada de un anticuerpo y en donde el sistema de numeración de la región constante es aquel del índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85; (anteriormente citado).

En otros aspectos de la divulgación, el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos cinco sustituciones seleccionadas de las posiciones 246, 249, 254, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 284, 287, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 327, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 359, 360, 361, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 383, 384, 386, 388, 390, 392, 393, 398, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 422, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 440, 443 y 444, de la cadena pesada de un anticuerpo, en donde al menos una sustitución se selecciona de las posiciones 246, 249, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 360, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 390, 392, 393, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 443 y 444 de la cadena pesada de un anticuerpo y en donde el sistema de numeración de la región constante es aquel del índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85; (anteriormente citado).

En otros aspectos de la divulgación, el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos seis sustituciones seleccionadas de las posiciones 246, 249, 254, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 284, 287, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 327, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 359, 360, 361, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 383, 384, 386, 388, 390, 392, 393, 398, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 422, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 440, 443 y 444, de la cadena pesada de un anticuerpo, en donde al menos una sustitución se selecciona de las posiciones 246, 249, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 360, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 390, 392, 393, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 443 y 444 de la cadena pesada de un anticuerpo y en donde el sistema de numeración de la región constante es aquel del índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85; (anteriormente citado).

En otros aspectos de la divulgación, el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos siete sustituciones seleccionadas de las posiciones 246, 249, 254, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 284, 287, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 327, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 359, 360, 361, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 383, 384, 386, 388, 390, 392, 393, 398, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 422, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 440, 443 y 444, de la cadena pesada de un anticuerpo, en donde al menos una sustitución se selecciona de las posiciones 246, 249, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 360, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 390, 392, 393, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 443 y 444 de la cadena pesada de un anticuerpo y en donde el sistema de numeración de la región constante es aquel del índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85; (anteriormente citado).

En otros aspectos de la divulgación, el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos ocho sustituciones seleccionadas de las posiciones 246, 249, 254, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 284, 287, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 327, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 359, 360, 361, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 383, 384, 386, 388, 390, 392, 393, 398, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 422, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 440, 443 y 444, de la cadena pesada de un anticuerpo, en donde al menos una sustitución se selecciona de las posiciones 246, 249, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 360, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 390, 392, 393, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 443 y 444 de la cadena pesada de un anticuerpo y en donde el sistema de numeración de la región constante es aquel del índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85; (anteriormente citado).

En otros aspectos de la divulgación, el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos nueve sustituciones seleccionadas de las posiciones 246, 249, 254, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 284, 287, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 327, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 359, 360, 361, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 383, 384, 386, 388, 390, 392, 393, 398, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 422, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 440, 443 y 444, de la cadena pesada de un anticuerpo, en donde al menos una sustitución se selecciona de las posiciones 246, 249, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 360, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 390, 392, 393, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 443 y 444 de la cadena pesada de un anticuerpo y en donde el sistema de numeración de la región constante es aquel del índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85; (anteriormente citado).

En otros aspectos de la divulgación, el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos diez sustituciones seleccionadas de las posiciones 246, 249, 254, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 284, 287, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 327, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 359, 360, 361, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 383, 384, 386, 388, 390, 392, 393, 398, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 422, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 440, 443 y 444, de la cadena pesada de un anticuerpo, en donde al menos una sustitución se selecciona de las posiciones 246, 249, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 360, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 390, 392, 393, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 443 y 444 de la cadena pesada de un anticuerpo y en donde el sistema de numeración de la región constante es aquel del índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85; (anteriormente citado).

En otros aspectos de la divulgación, el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende sustituciones en cada una de las posiciones 254, 359, 361, 380, 383, 384, 392, 398, 404, 422, 442 y 443 de la cadena pesada de un anticuerpo en donde el sistema de numeración de la región constante es aquel del índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85; .

En otros aspectos de la divulgación, el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:97-100, 102, 104, 107-127, 129-163.

En otros aspectos de la divulgación, el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos dos secuencias de aminoácidos seleccionadas de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:97-100, 102,

104, 107-127 y 129-163.

En algunos aspectos de la divulgación, el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos un par de secuencias de aminoácidos seleccionadas de: (a) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:99 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:107; (b) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:103 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:107; (c) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:105 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:107; (d) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:99 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:103; (e) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:103 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:105; (f) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:99 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:105; (g) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:102 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:107; (h) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:104 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:107; y (i) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:102 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:104.

B. Polipéptido de la región constante de la cadena ligera (C_L o C_λ) modificado por ingeniería genética

En otros aspectos de la divulgación, el polipéptido C_L modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de SEQ ID NO:90-95.

En algunos aspectos de la divulgación, el polipéptido C_L modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de SEQ ID NO:164-169.

Un experto en la materia apreciará, una vez armado con las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, que debido a la naturaleza dimérica de muchos anticuerpos (por ejemplo, las IgG comprenden dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas comprendiendo cada cadena pesada una región Fc), un anticuerpo de la divulgación puede comprender al menos una región Fc modificada por ingeniería genética y puede comprender dos regiones Fc modificadas por ingeniería genética, donde cada región Fc modificada por ingeniería genética puede comprender las mismas o diferentes mutaciones. Más preferentemente, ambas regiones Fc modificadas por ingeniería genética comprenden las mismas mutaciones proporcionando de esta manera al menos un sitio de conjugación específico del sitio por cada región Fc.

Un experto en la materia apreciará, una vez armado con las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, que debido a la naturaleza dimérica de muchos anticuerpos (por ejemplo, las IgG comprenden dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas comprendiendo cada cadena pesada una región Fc), un anticuerpo de la divulgación puede comprender al menos un polipéptido constante de cadena ligera modificado por ingeniería genética (por ejemplo, C_L o C_λ) y puede comprender dos polipéptidos constantes de cadena ligera modificados por ingeniería genética, donde cada polipéptido constante de cadena ligera modificado por ingeniería genética puede comprender la misma o diferentes mutaciones. Más preferentemente, ambos polipéptidos constantes de cadena ligera modificados por ingeniería genética comprenden las mismas mutaciones proporcionando de esta manera al menos un sitio de conjugación específico del sitio por cada región constante de cadena ligera.

En otros aspectos de la divulgación, debido a la naturaleza dimérica de muchos anticuerpos (por ejemplo, las IgG comprenden dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas comprendiendo cada cadena pesada un polipéptido Fc), un anticuerpo de la divulgación puede comprender al menos un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética y puede comprender además al menos un polipéptido constante de cadena ligera modificado por ingeniería genética proporcionando de esta manera al menos dos sitios de conjugación específicos del sitio: uno en el polipéptido Fc y otro en el polipéptido C_L.

En otra realización, un anticuerpo de la divulgación puede comprender dos polipéptidos Fc modificados por ingeniería genética, donde cada Fc modificado por ingeniería genética puede comprender las mismas o diferentes mutaciones y el anticuerpo comprende además al menos un polipéptido de región constante de cadena ligera (C_L o C_λ) modificado por ingeniería genética que comprende al menos una mutación. En otros aspectos de la divulgación, el anticuerpo comprende dos polipéptidos Fc modificados por ingeniería genética que comprenden al menos una mutación, y además comprende dos polipéptidos constantes de cadena ligera (C_L o C_λ) modificados por ingeniería genética comprendiendo cada uno al menos una mutación proporcionando de esta manera al menos cuatro sitios de conjugación específicos del sitio: uno por cadena pesada y uno por cadena ligera. Más preferentemente, ambos polipéptidos Fc modificados por ingeniería genética comprenden la misma mutación entre sí y ambos polipéptidos de la región constante de cadena ligera (C_L o C_λ) comprenden la misma mutación entre sí.

En otra realización, un anticuerpo de la divulgación puede comprender dos polipéptidos Fc modificados por ingeniería genética, donde cada Fc modificado por ingeniería genética puede comprender las mismas o diferentes mutaciones y el anticuerpo comprende además al menos un polipéptido de región constante de cadena ligera (C_L o C_λ) modificado por ingeniería genética que comprende al menos una mutación. En otros aspectos de la divulgación, el anticuerpo comprende dos polipéptidos Fc modificados por ingeniería genética que comprenden al menos una mutación, y además comprende dos polipéptidos constantes de cadena ligera modificados por ingeniería genética (dos C_L, dos C_λ o un C_L y un C_λ) comprendiendo cada uno de los cuales al menos una mutación, en donde la mutación puede ser

la misma o diferente entre los dos dominios constantes de cadena ligera), proporcionando de esta manera al menos cuatro sitios de conjugación específicos del sitio: uno por cadena pesada y uno por cadena ligera. Es decir, la divulgación abarca un anticuerpo biespecífico que comprende dos cadenas pesadas diferentes y dos cadenas ligeras diferentes de tal manera que el anticuerpo une, por ejemplo, dos antígenos diferentes o epítomos diferentes del mismo antígeno, y en donde las cadenas pesadas comprenden al menos un dominio constante de cadena ligera y/o un dominio Fc modificado por ingeniería genética. En un aspecto, el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas diferentes comprendiendo cada una de las cuales la misma o diferentes mutaciones de cisteína modificadas por ingeniería genética, y una cadena ligera lambda y una cadena ligera kappa, en donde cada cadena ligera puede comprender al menos una mutación de cisteína modificada por ingeniería genética.

En algunos aspectos de la divulgación, un Fab modificado por ingeniería genética puede comprender al menos una mutación en la región constante de la cadena ligera (C_k o C_λ) para proporcionar al menos un sitio de conjugación específico del sitio proporcionando de esta manera un Fab que comprende al menos un sitio de conjugación específico del sitio.

En otros aspectos de la divulgación, la divulgación abarca un F(ab')₂ modificado por ingeniería genética en donde al menos una región constante de cadena ligera (C_k o C_λ) comprende al menos una mutación proporcionando de esta manera un Fab que comprende al menos un sitio de conjugación específico del sitio. En algunos aspectos de la divulgación, el F(ab')₂ modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos una mutación en cada región constante de cadena ligera (C_k o C_λ) proporcionando de esta manera un F(ab')₂ modificado por ingeniería genética que comprende al menos dos sitios de conjugación específicos del sitio.

En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo comprende un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética que comprende al menos una mutación y dos polipéptidos de cadena ligera C_k modificados por ingeniería genética que comprenden cada uno al menos una mutación.

En otros aspectos de la divulgación, un anticuerpo de la divulgación puede comprender dos polipéptidos Fc modificados por ingeniería genética y dos polipéptidos (C_k o C_λ) modificados por ingeniería genética donde cada Fc y cada C_L comprende al menos una mutación y donde la mutación de la región Fc es la misma en cada polipéptido Fc y la mutación en un polipéptido C_L (C_k o C_λ) es diferente de la mutación en el otro polipéptido C_L (C_k o C_λ).

En otros aspectos de la divulgación, donde el anticuerpo comprende al menos dos polipéptidos Fc modificados por ingeniería genética y dos polipéptidos C_L (C_k o C_λ) modificados por ingeniería genética cada una de las mutaciones en las dos regiones Fc puede ser la misma, cada una de las mutaciones en el C_L puede ser la misma o cada región Fc y/o cada C_L (C_k o C_λ) comprende una mutación diferente, o cualquier permutación de la misma.

En otros aspectos de la divulgación, el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación puede usarse para preparar una proteína de fusión Fc de tal manera que la proteína de fusión Fc comprenda un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética que pueda usarse para conjugar una amplia plétora de fracciones al polipéptido Fc.

Un experto en la materia apreciaría que, debido a la tendencia de los polipéptidos Fc a dimerizarse, la divulgación abarca proteínas de fusión Fc dimericas que comprenden al menos dos polipéptidos Fc modificados por ingeniería genética, donde cada polipéptido Fc modificado por ingeniería genética puede comprender al menos una mutación que proporciona un sitio específico para la conjugación.

En una realización, el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética comprende uno de los siguientes pares de sustituciones en las posiciones: a) 380 y 443; b) 398 y 443; c) 422 y 443; d) 380 y 398; e) 398 y 442; f) 380 y 422; g) 392 y 443; h) 404 y 443; y i) 392 y 404.

En otra realización, el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética comprende al menos uno de los siguientes pares de sustituciones en las posiciones: a) 380 y 443; b) 398 y 443; c) 422 y 443; d) 380 y 398; e) 398 y 442; f) 380 y 422; g) 392 y 443; h) 404 y 443; y i) 392 y 404.

Las sustituciones descritas anteriormente corresponden a las posiciones en SEQ ID NO: 1 (región Fc de IgG1 humana de tipo silvestre) y se pretende que el número haga referencia al sistema de numeración del índice Eu de Edelman *et al.*, 1969, como se describe en Kabat 1991 a lo largo de la divulgación pueden usarse indistintamente con la numeración de posición secuencial de las sustituciones en referencia con SEQ ID NO: 1 para describir las composiciones de la divulgación.

En otros aspectos de la divulgación, el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende una sustitución de al menos un aminoácido de origen natural elegido de: K246, D249, D265, S267, D270, N276, Y278, E283, R292, E293, E294, Y300, V302, V303, L314, N315, E318, K320, I332, E333, K334, I336, E345, Q347, S354, R355, M358, K360, Q362, K370, Y373, D376, A378, E380, E382, Q386, E388, N390, K392, T393, D401, F404, T411, D413, K414, R416, Q418, Q419, N421, M428, A431, L432, T437, Q438, K439, L443 y S444 donde la numeración se basa en la cadena pesada de un anticuerpo usando el sistema de numeración del índice EU de Edelman *et al.*, 1969,

Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85; .

En algunos aspectos de la divulgación, el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación no comprende una sustitución en una posición o posiciones seleccionadas de: 239, 254, 284, 287, 327, 361, 383, 384, 398, 422 y 440 de la cadena pesada de un anticuerpo en donde el sistema de numeración de la región constante es el del índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85; .

En una realización, el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación incluye una IgG1 que tiene un aminoácido de origen natural sustituido (por ejemplo, con una cisteína) en una posición elegida de: 246, 249, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 360, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 390, 392, 393, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 443 y 444 de la cadena pesada de un anticuerpo en donde el sistema de numeración de la región constante es aquel del índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85; . En otros aspectos de la divulgación, el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación deriva de un formato IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En otros aspectos más de la divulgación, el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación deriva de formatos no IgG tales como IgA1, IgA2 IgM, IgD o IgE. En otros aspectos de la divulgación, el polipéptido Fc de la divulgación comprende la modificación por ingeniería genética de restos de superficie de la región CH2 y/o CH3 de una molécula de IgG1 o equivalentes de la misma mediante la sustitución de un resto natural por cisteína y/u otros aminoácidos.

La divulgación abarca una región constante de cadena ligera de anticuerpo modificada por ingeniería genética (C_L) en donde la cadena ligera es una cadena ligera kappa o una cadena ligera lambda, o una porción de las mismas, donde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más aminoácidos elegidos de las posiciones 111, 149, 183, 188, 207 y 210 de la cadena ligera del anticuerpo, en donde el sistema de numeración de la región constante de la cadena ligera es aquel del sistema de numeración de Kabat establecido en Kabat *et al.* (1991, NIH Publication 91- 3242, National Technical Information Service, Springfield, VA, en lo sucesivo en el presente documento "Kabat"), de un anticuerpo parental, nativo o de tipo silvestre, se sustituyen por otro aminoácido (incluyendo aminoácidos naturales y no naturales/sintéticos).

En algunos aspectos de la divulgación, la región constante de cadena ligera es una región constante lambda (C_λ). En otra realización, la región constante de la cadena ligera es una región constante kappa (C_κ).

Cabe señalar que una sola sustitución en una región constante de cadena ligera, por ejemplo, de un resto de cisteína, normalmente da como resultado la visualización de dos restos correspondientes en el anticuerpo IgG resultante debido a la naturaleza homodimérica de las moléculas de anticuerpos IgG. Por lo tanto, los anticuerpos IgG modificados por ingeniería genética resultantes de la divulgación pueden mostrar al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 o más grupos reactivos con el fin de conjugación con un fármaco o compuesto. En una realización, una o más de las sustituciones es con un resto de cisteína, y los anticuerpos modificados por ingeniería genética resultantes pueden mostrar al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 o más grupos tiol con el fin de conjugación con un fármaco o compuesto.

En una realización, la divulgación proporciona un anticuerpo modificado por ingeniería genética que comprende un polipéptido modificado por ingeniería genética que comprende un dominio constante de cadena ligera kappa (C_κ) que comprende la misma posición sustituida de un segundo dominio constante de cadena ligera kappa modificado por ingeniería genética. Es decir, debido a la naturaleza bivalente dimérica de los anticuerpos IgG, el anticuerpo puede comprender dos polipéptidos C_κ que son iguales o diferentes entre sí, y la presente divulgación abarca un anticuerpo que comprende al menos un polipéptido C_κ modificado por ingeniería genética que comprende una sustitución de aminoácidos que está presente en el otro polipéptido C_κ .

En otra realización, el anticuerpo modificado por ingeniería genética comprende un polipéptido modificado por ingeniería genética que comprende un dominio constante de cadena ligera kappa (C_κ) que comprende diferentes posiciones sustituidas de un segundo dominio constante de cadena ligera kappa modificado por ingeniería genética. Es decir, debido a la naturaleza dimérica de los anticuerpos IgG y debido a que existe una diversidad de métodos reconocidos en la técnica para preparar anticuerpos heterodiméricos que comprenden, entre otros, dos o más polipéptidos C_κ que difieren entre sí, la presente divulgación abarca un anticuerpo que comprende al menos un polipéptido C_κ modificado por ingeniería genética que comprende una sustitución de aminoácidos que no está presente en el otro polipéptido C_κ , que puede o no estar modificada por ingeniería genética también. Los métodos para fabricar anticuerpos heterodiméricos que comprenden regiones C_L que comprenden diferentes mutaciones son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, los métodos analizados en la Patente de EE.UU. N.º 7.183.076 de Arathoon *et al.*

En algunos aspectos de la divulgación, un anticuerpo modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende un primer polipéptido C_κ modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución en las posiciones seleccionadas de 111, 149, 183, 188, 207 y 210, y comprende además un segundo polipéptido C_κ que no está modificado por ingeniería genética, por ejemplo, comprende la secuencia de aminoácidos de C_κ de tipo silvestre donde

una secuencia de aminoácidos del polipéptido Ck de tipo silvestre humano ilustrativa se muestra en la Figura 18A y se proporciona en SEQ ID NO:89.

5 En otros aspectos de la divulgación, un Fab modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende un polipéptido Ck modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución en las posiciones seleccionadas de 111, 183 y 210.

10 En algunos aspectos de la divulgación, un anticuerpo modificado por ingeniería genética comprende un primer polipéptido Ck modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución en las posiciones seleccionadas de 111, 183 y 210, y comprende además un segundo polipéptido Ck modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución en las posiciones seleccionadas de 111, 183 y 210, en donde la sustitución presente en el primer polipéptido Ck modificado por ingeniería genética no es una sustitución presente en el segundo polipéptido Ck modificado por ingeniería genética.

15 En algunos aspectos de la divulgación, un F(ab')₂ modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende un primer polipéptido Ck modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución en las posiciones seleccionadas de 111, 149, 183, 188, 207 y 210, y comprende además un segundo polipéptido Ck modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución en las posiciones seleccionadas de 111, 183 y 210, en donde la sustitución presente en el primer polipéptido Ck modificado por ingeniería genética no es una sustitución presente en el segundo polipéptido Ck modificado por ingeniería genética.

25 En otros aspectos de la divulgación, un F(ab')₂ modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende un primer polipéptido Ck modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución en las posiciones seleccionadas de 111, 149, 183, 188, 207 y 210, y comprende además un segundo polipéptido Ck modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución en las posiciones seleccionadas de 111, 183 y 210, en donde al menos una sustitución presente en el primer polipéptido Ck modificado por ingeniería genética es la misma sustitución presente en el segundo polipéptido Ck modificado por ingeniería genética.

30 En algunos aspectos de la divulgación, el polipéptido Ck modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos una sustitución en las posiciones seleccionadas de: 111, 183 y 210 de la cadena ligera de un anticuerpo, en donde el sistema de numeración de la región constante es aquel del índice de Kabat como se establece en Kabat *et al.* (anteriormente citado).

35 En algunos aspectos de la divulgación, el polipéptido Ck modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos dos sustituciones en las posiciones seleccionadas de: 111, 183 y 210 de la cadena ligera de un anticuerpo, en donde el sistema de numeración de la región constante es aquel del índice de Kabat como se establece en Kabat *et al.* (anteriormente citado).

40 En otros aspectos de la divulgación, el polipéptido Ck modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende las tres sustituciones seleccionadas de las posiciones 111, 183 y 210, de la región constante de cadena ligera de un anticuerpo, y en donde el sistema de numeración de la región constante es aquel del índice de numeración de Kabat como se establece en Kabat *et al.* (anteriormente citado).

45 Las sustituciones descritas anteriormente corresponden a las posiciones en SEQ ID NO:89 (región constante de cadena ligera kappa humana de tipo silvestre), y se pretende que el número con referencia a Kabat a lo largo de la divulgación pueda usarse indistintamente con la numeración de posición secuencial de las sustituciones en referencia a SEQ ID NO:89 para describir las composiciones de la divulgación.

50 En otros aspectos de la divulgación, el polipéptido Ck modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende una sustitución de al menos un aminoácido de origen natural elegido de: A111, K183 y N210 donde la numeración se basa en la cadena ligera de un anticuerpo usando el sistema de numeración del índice de numeración de Kabat como se establece en Kabat.

55 En otros aspectos de la divulgación, el dominio constante de cadena ligera modificado por ingeniería genética es un dominio constante de cadena ligera lambda (Cλ).

60 En un aspecto de la divulgación, el anticuerpo modificado por ingeniería genética comprende un polipéptido modificado por ingeniería genética que comprende un dominio constante de cadena ligera lambda (Cλ) que comprende las mismas o diferentes posiciones sustituidas de un segundo dominio constante de cadena ligera lambda modificado por ingeniería genética. Es decir, debido a la naturaleza dimérica de los anticuerpos IgG y debido a que existe una diversidad de métodos reconocidos en la técnica para preparar anticuerpos heterodiméricos que comprenden, entre otros, dos o más polipéptidos Cλ que son los mismos o que difieren entre sí, la presente divulgación abarca un anticuerpo que comprende al menos un polipéptido Cλ modificado por ingeniería genética que comprende una sustitución de aminoácidos que no está presente en el otro polipéptido Cλ, que puede o no estar modificada por ingeniería genética también. Los métodos para fabricar anticuerpos heterodiméricos que comprenden regiones C_L que comprenden diferentes mutaciones son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, los métodos

analizados en la Patente de EE.UU. N.º 7.183.076, de Arathoon *et al.*

En otro aspecto, el anticuerpo modificado por ingeniería genética comprende al menos un polipéptido modificado por ingeniería genética que comprende un dominio constante de cadena ligera lambda (Cλ), en donde el anticuerpo comprende dos dominios Cλ cada uno de los cuales comprende la misma mutación o mutaciones.

En algunos aspectos de la divulgación, un anticuerpo modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende un primer polipéptido Cλ modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución en posiciones seleccionadas de K110C, L125C, K149C, V155C, G158C, T161C, Q185C, S188C, H189C, S191C, T197C, V205C, E206C, K207C, T208 y A210 y comprende además un segundo polipéptido Cλ que no está modificado por ingeniería genética, por ejemplo, comprende la secuencia de aminoácidos de Cλ de tipo silvestre donde una secuencia de aminoácidos del polipéptido Cλ de tipo silvestre humano ilustrativa se muestra en la Figura 20A y se proporciona en SEQ ID NO:170.

En otros aspectos de la divulgación, un Fab modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende un polipéptido Cλ modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución en posiciones seleccionadas de K110, L125, K149, V155, G158, T161, Q185, S188, H189, S191, T197, V205, E206, K207C, T208 y A210.

En algunos aspectos de la divulgación, un anticuerpo modificado por ingeniería genética comprende un primer polipéptido Cλ modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución en las posiciones seleccionadas de 110, 125, 149, 155, 158, 161, 185, 188, 189, 191, 197, 205, 206, K207C, T208 y A210 y comprende además un segundo polipéptido Cλ modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución en las posiciones seleccionadas de 110, 125, 149, 155, 158, 161, 185, 188, 189, 191, 197, 205, 206, K207C, T208 y A210, en donde la sustitución presente en el primer polipéptido Cλ modificado por ingeniería genética no es una sustitución presente en el segundo polipéptido Cλ modificado por ingeniería genética.

En algunos aspectos de la divulgación, un F(ab')₂ modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende un primer polipéptido Cλ modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución en las posiciones seleccionadas de 110, 125, 149, 155, 158, 161, 185, 188, 189, 191, 197, 205, 206, 207, 208 y 210 y comprende además un segundo polipéptido Cκ modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución en las posiciones seleccionadas de 110, 125, 149, 155, 158, 161, 185, 188, 189, 191, 197, 205, 206, 207, 208 y 210 en donde la sustitución presente en el primer polipéptido Cλ modificado por ingeniería genética no es una sustitución presente en el segundo polipéptido Cλ modificado por ingeniería genética.

En otros aspectos de la divulgación, un F(ab')₂ modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende un primer polipéptido Cλ modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución en las posiciones seleccionadas de 110, 125, 149, 155, 158, 161, 185, 188, 189, 191, 197, 205, 206, 207, 208 y 210 y comprende además un segundo polipéptido Cλ modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución en las posiciones seleccionadas de 110, 125, 149, 155, 158, 161, 185, 188, 189, 191, 197, 205, 206, 207, 208 y 210, en donde al menos una sustitución presente en el primer polipéptido Cλ modificado por ingeniería genética es la misma sustitución presente en el segundo polipéptido Cλ modificado por ingeniería genética.

En algunos aspectos de la divulgación, el polipéptido Cλ modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos una sustitución en las posiciones seleccionadas de: 110, 125, 149, 155, 158, 161, 185, 188, 189, 191, 197, 205, 206, 207, 208 y 210, de la cadena ligera de un anticuerpo, en donde el sistema de numeración de la región constante es aquel del índice de Kabat como se establece en Kabat *et al.* (anteriormente citado).

En algunos aspectos de la divulgación, el polipéptido Cλ modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos dos sustituciones en las posiciones seleccionadas de: 110, 125, 149, 155, 158, 161, 185, 188, 189, 191, 197, 205, 206, 20C, 208 y A210, de la cadena ligera de un anticuerpo, en donde el sistema de numeración de la región constante es aquel del índice de Kabat como se establece en Kabat *et al.* (anteriormente citado).

En otros aspectos de la divulgación, el polipéptido Cλ modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos dos sustituciones seleccionadas de las posiciones 110, 125, 149, 155, 158, 161, 185, 188, 189, 191, 197, 205, 206, 207, 208 y 210, de la región constante de cadena ligera de un anticuerpo, y en donde el sistema de numeración de la región constante es aquel del índice de numeración de Kabat como se establece en Kabat *et al.* (anteriormente citado).

En otros aspectos de la divulgación, el polipéptido Cλ modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos tres sustituciones seleccionadas de las posiciones 110, 125, 149, 155, 158, 161, 185, 188, 189, 191, 197, 205, 206, 207, 208 y 210, de la región constante de cadena ligera de un anticuerpo, y en donde el sistema de numeración de la región constante es aquel del índice de numeración de Kabat como se establece en Kabat *et al.* (anteriormente citado).

En otros aspectos de la divulgación, el polipéptido Cλ modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende

al menos cuatro sustituciones seleccionadas de las posiciones 110, 125, 149, 155, 158, 161, 185, 188, 189, 191, 197, 205, 206, 207C, 208 y 210, de la región constante de la cadena ligera de un anticuerpo, en donde al menos una sustitución se selecciona de las posiciones 110, 125, 149, 155, 158, 161, 185, 188, 189, 191, 197, 205, 206, 207, 208 y 210 del dominio constante de cadena ligera de un anticuerpo y en donde el sistema de numeración de la región constante es el del índice de numeración de Kabat como se establece en Kabat *et al.* (anteriormente citado).

En otros aspectos de la divulgación, el polipéptido C λ modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos cinco sustituciones seleccionadas de las posiciones 110, 125, 149, 155, 158, 161, 185, 188, 189, 191, 197, 205, 206, 207, 208 y 210, de la región constante de cadena ligera de un anticuerpo, y en donde el sistema de numeración de la región constante es aquel del índice de numeración de Kabat como se establece en Kabat *et al.* (anteriormente citado).

En otros aspectos de la divulgación, el polipéptido C λ modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos seis sustituciones seleccionadas de las posiciones 110, 125, 149, 155, 158, 161, 185, 188, 189, 191, 197, 205, 206, 207, 208 y 210, de la cadena ligera de un anticuerpo, y en donde el sistema de numeración de la región constante es aquel del índice de numeración de Kabat como se establece en Kabat *et al.* (anteriormente citado).

En otros aspectos de la divulgación, el polipéptido C λ modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos siete sustituciones seleccionadas de las posiciones 110, 125, 149, 155, 158, 161, 185, 188, 189, 191, 197, 205, 206, 207, 208 y 210, de la cadena ligera de un anticuerpo, y en donde el sistema de numeración de la región constante es aquel del índice de numeración de Kabat como se establece en Kabat *et al.* (anteriormente citado).

En otros aspectos de la divulgación, el polipéptido C λ modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos ocho sustituciones seleccionadas de las posiciones 110, 125, 149, 155, 158, 161, 185, 188, 189, 191, 197, 205, 206, 207, 208 y 210, de la cadena ligera de un anticuerpo, y en donde el sistema de numeración de la región constante es aquel del índice de numeración de Kabat como se establece en Kabat *et al.* (anteriormente citado).

En otros aspectos de la divulgación, el polipéptido C λ modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos nueve sustituciones seleccionadas de las posiciones 110, 125, 149, 155, 158, 161, 185, 188, 189, 191, 197, 205, 206, 207C, 208 y 210, de la cadena ligera de un anticuerpo, y en donde el sistema de numeración de la región constante es aquel del índice de numeración de Kabat como se establece en Kabat *et al.* (anteriormente citado).

En otros aspectos de la divulgación, el polipéptido C λ modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos diez sustituciones seleccionadas de las posiciones 110, 125, 149, 155, 158, 161, 185, 188, 189, 191, 197, 205, 206, 207, 208 y 210, de la cadena ligera de un anticuerpo, y en donde el sistema de numeración de la región constante es aquel del índice de numeración de Kabat como se establece en Kabat *et al.* (anteriormente citado).

En otros aspectos de la divulgación, el polipéptido C λ modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende sustituciones en cada una de las posiciones 110, 125, 149, 155, 158, 161, 185, 188, 189, 191, 197, 205, 206, 207, 208 y 210, de la cadena ligera de un anticuerpo, en donde el sistema de numeración de la región constante es aquel del índice de numeración de Kabat como se establece en Kabat.

Las sustituciones descritas anteriormente corresponden a las posiciones en SEQ ID NO:170 (región constante de cadena ligera lambda humana de tipo silvestre), y se pretende que el número con referencia a Kabat a lo largo de la divulgación pueda usarse indistintamente con la numeración de posición secuencial de las sustituciones en referencia a SEQ ID NO:170 para describir las composiciones de la divulgación.

En otros aspectos de la divulgación, el polipéptido C λ modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende una sustitución de al menos un aminoácido de origen natural elegido de: 110, 125, 149, 155, 158, 161, 185, 188, 189, 191, 197, 205, 206, 207, 208 y 210 donde la numeración se basa en la cadena ligera de un anticuerpo usando el sistema de numeración del índice de numeración de Kabat como se establece en Kabat.

C. Anticuerpo modificado por ingeniería genética, o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende un dominio constante (pesado y/o ligero) modificado por ingeniería genética

Un experto en la materia apreciará, una vez armado con las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, que debido a la naturaleza dimérica de muchos anticuerpos (por ejemplo, las IgG comprenden dos cadenas ligeras comprendiendo cada una una región constante (C_L) y dos cadenas pesadas comprendiendo cada cadena pesada una región Fc), un anticuerpo de la divulgación puede comprender al menos una región constante modificada por ingeniería genética (por ejemplo, una región constante de cadena pesada, una región C γ , una región C κ y/o una región C λ de IgG) y puede comprender dos regiones C_L modificadas por ingeniería genética, donde cada región C_L modificada por ingeniería genética puede comprender las mismas o diferentes mutaciones. Más preferentemente, ambas regiones C_L (C κ o C λ) modificadas por ingeniería genética comprenden las mismas mutaciones proporcionando al menos una conjugación específica de sitio por cada región C_L (C κ o C λ).

En otra realización, el anticuerpo modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos un

polipéptido Fc modificado por ingeniería genética y puede comprender dos polipéptidos Fc modificados por ingeniería genética, donde cada polipéptido Fc modificado por ingeniería genética puede comprender las mismas o diferentes mutaciones. Más preferentemente, ambos polipéptidos Fc modificados por ingeniería genética comprenden las mismas mutaciones proporcionando de esta manera al menos un sitio de conjugación específico del sitio por cada polipéptido Fc. El anticuerpo puede comprender además al menos un polipéptido Ck modificado por ingeniería genética y puede comprender dos polipéptidos Ck modificados por ingeniería genética, en donde cada polipéptido Ck modificado por ingeniería genética puede comprender las mismas o diferentes mutaciones. Más preferentemente, ambos polipéptidos Fc modificados por ingeniería genética comprenden las mismas mutaciones y ambos polipéptidos Ck modificados por ingeniería genética comprenden las mismas mutaciones, proporcionando de esta manera al menos un sitio de conjugación específico del sitio por cada polipéptido Fc y al menos un sitio de conjugación específico del sitio por polipéptido Ck proporcionando de esta manera un anticuerpo que comprende al menos cuatro sitios de conjugación potenciales.

En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética y puede comprender dos polipéptidos Fc modificados por ingeniería genética, donde cada polipéptido Fc modificado por ingeniería genética puede comprender las mismas o diferentes mutaciones. Más preferentemente, ambos polipéptidos Fc modificados por ingeniería genética comprenden las mismas mutaciones proporcionando de esta manera al menos un sitio de conjugación específico del sitio por cada polipéptido Fc. El anticuerpo puede comprender además al menos un polipéptido Cλ modificado por ingeniería genética y puede comprender dos polipéptidos Cλ modificados por ingeniería genética, en donde cada polipéptido Cλ modificado por ingeniería genética puede comprender las mismas o diferentes mutaciones. Más preferentemente, ambos polipéptidos Fc modificados por ingeniería genética comprenden las mismas mutaciones y ambos polipéptidos Cλ modificados por ingeniería genética comprenden las mismas mutaciones, proporcionando de esta manera al menos un sitio de conjugación específico del sitio por cada polipéptido Fc y al menos un sitio de conjugación específico del sitio por polipéptido Cλ proporcionando de esta manera un anticuerpo que comprende al menos cuatro sitios de conjugación potenciales.

En una realización, el anticuerpo modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética y puede comprender dos polipéptidos Fc modificados por ingeniería genética, donde cada polipéptido Fc modificado por ingeniería genética puede comprender las mismas o diferentes mutaciones. Más preferentemente, ambos polipéptidos Fc modificados por ingeniería genética comprenden las mismas mutaciones proporcionando de esta manera al menos un sitio de conjugación específico del sitio por cada polipéptido Fc. El anticuerpo puede comprender además al menos un polipéptido Cλ modificado por ingeniería genética y puede comprender dos polipéptidos Cλ modificados por ingeniería genética, en donde cada polipéptido Cλ modificado por ingeniería genética puede comprender las mismas o diferentes mutaciones. Más preferentemente, ambos polipéptidos Fc modificados por ingeniería genética comprenden las mismas mutaciones y ambos polipéptidos Cλ modificados por ingeniería genética comprenden las mismas mutaciones, proporcionando de esta manera al menos un sitio de conjugación específico del sitio por cada polipéptido Fc y al menos un sitio de conjugación específico del sitio por polipéptido Cλ proporcionando de esta manera un anticuerpo que comprende al menos cuatro sitios de conjugación potenciales.

En otros aspectos de la divulgación, el anticuerpo modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución seleccionada de las posiciones 246, 249, 254, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 284, 287, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 360, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 390, 392, 393, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 443 y 444, de la cadena pesada usando el sistema de numeración del índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85; y comprende al menos un polipéptido Ck modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución seleccionada de las posiciones 111, 149, 183, 188, 207 y 210, de la cadena ligera de un anticuerpo, y en donde el sistema de numeración del polipéptido constante de cadena ligera es aquel del índice de numeración de Kabat como se establece en Kabat *et al.* (anteriormente citado). Es decir, donde el anticuerpo modificado por ingeniería genética comprende al menos un dominio constante de cadena pesada (Cy) modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada de una sustitución en la posición 246, 249, 254, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 284, 287, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 360, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 390, 392, 393, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 443 y 444, de acuerdo con la numeración Eu de Kabat, y/o donde el anticuerpo comprende al menos un dominio Cλ modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en K110C, L125C, K149C, V155C, G158C, T161C, Q185C, S188C, H189C, S191C, T197C, V205C, E206C, K207C, T208 y A210, el anticuerpo puede comprender además al menos un Ck modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución seleccionada del grupo que consiste en A111, K183 y N210 y/o al menos una sustitución conocida en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, una sustitución de aminoácidos en un Ck como se divulga en la Publicación de Patente Internacional N.º WO 2011/156382, publicada el 15 de diciembre de 2011, tales como, K149 (SEQ ID NO:91), K188 (SEQ ID NO:93) y K207 (SEQ ID NO:94).

En una realización, el anticuerpo modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución seleccionada de las

posiciones 246, 249, 254, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 284, 287, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 360, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 390, 392, 393, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 443 y 444, de la cadena pesada usando el sistema de numeración del índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85; y comprende al menos un polipéptido C λ modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución seleccionada de las posiciones 110, 111, 125, 149, 155, 158, 161, 185, 188, 189, 191, 197, 205, 206 y 207, de la cadena ligera de un anticuerpo, y en donde el sistema de numeración del polipéptido constante de cadena ligera es aquel del índice de numeración de Kabat como se establece en Kabat *et al.* (anteriormente citado).

En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución seleccionada de las posiciones 246, 249, 254, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 284, 287, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 360, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 390, 392, 393, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 443 y 444, de la cadena pesada usando el sistema de numeración del índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85; y comprende al menos un: (a) polipéptido C κ modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución seleccionada de las posiciones 111, 183 y 210, de la cadena ligera de un anticuerpo, y/o (b) al menos un polipéptido C λ modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución seleccionada de las posiciones 110, 111, 125, 149, 155, 158, 161, 185, 188, 189, 191, 197, 205, 206 y 207, de la cadena ligera de un anticuerpo, y en donde el sistema de numeración del polipéptido constante de cadena ligera es aquel del índice de numeración de Kabat como se establece en Kabat *et al.* (anteriormente citado).

En otros aspectos de la divulgación, el anticuerpo modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución seleccionada de las posiciones 246, 249, 254, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 284, 287, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 360, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 390, 392, 393, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 443 y 444, de la cadena pesada usando el sistema de numeración del índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85; y comprende al menos un: (a) polipéptido C κ modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución seleccionada de las posiciones 111, 149, 183, 188, 207 y 210, de la cadena ligera de un anticuerpo, y/o (b) al menos un polipéptido C λ modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución seleccionada de las posiciones 110, 111, 125, 149, 155, 158, 161, 185, 188, 189, 191, 197, 205, 206 y 207, de la cadena ligera de un anticuerpo, y en donde el sistema de numeración del polipéptido constante de cadena ligera es aquel del índice de numeración de Kabat como se establece en Kabat *et al.* (anteriormente citado).

En otros aspectos de la divulgación, el anticuerpo modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos un polipéptido C κ modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución seleccionada de las posiciones 111, 149, 183, 188, 207 y 210, de la cadena ligera de un anticuerpo, y comprende al menos un: (a) polipéptido Fc modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución seleccionada de las posiciones 246, 249, 254, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 284, 287, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 360, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 390, 392, 393, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 443 y 444, de la cadena pesada usando el sistema de numeración del índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85; y/o (b) al menos un polipéptido C λ modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución seleccionada de las posiciones 110, 111, 125, 149, 155, 158, 161, 185, 188, 189, 191, 197, 205, 206 y 207, de la cadena ligera de un anticuerpo, y en donde el sistema de numeración del polipéptido constante de cadena ligera es aquel del índice de numeración de Kabat como se establece en Kabat *et al.* (anteriormente citado).

En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos un polipéptido C κ modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución seleccionada de las posiciones 111, 149, 183, 188, 207 y 210, de la cadena ligera de un anticuerpo en donde la numeración es según Kabat, y un polipéptido Fc que comprende al menos una sustitución seleccionada de las posiciones 246, 249, 254, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 284, 287, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 360, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 390, 392, 393, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 443 y 444, de la cadena pesada usando el sistema de numeración del índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85; ,

En un aspecto, el anticuerpo modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende dos polipéptidos C κ modificados por ingeniería genética comprendiendo cada uno una sustitución en A111 según la numeración de Kabat, y dos polipéptidos Fc modificados por ingeniería genética comprendiendo cada uno una sustitución en Q347 usando el sistema de numeración del índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85; ,

En un aspecto, el anticuerpo modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende dos polipéptidos C κ modificados por ingeniería genética comprendiendo cada uno una sustitución en A111 según la numeración de Kabat, y dos polipéptidos Fc modificados por ingeniería genética comprendiendo cada uno una sustitución en E388 usando el sistema de numeración del índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85; ,

En otro aspecto, el anticuerpo modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende dos polipéptidos Ck modificados por ingeniería genética comprendiendo cada uno una sustitución en A111 según la numeración de Kabat, y dos polipéptidos Fc modificados por ingeniería genética comprendiendo cada uno una sustitución en K392 usando el sistema de numeración del índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85; ,

En otro aspecto más, el anticuerpo modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende dos polipéptidos Ck modificados por ingeniería genética comprendiendo cada uno una sustitución en A111 según la numeración de Kabat, y dos polipéptidos Fc modificados por ingeniería genética comprendiendo cada uno una sustitución en L443 usando el sistema de numeración del índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85; ,

En un aspecto adicional, el anticuerpo modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende dos polipéptidos Ck modificados por ingeniería genética comprendiendo cada uno una sustitución en K183 según la numeración de Kabat, y dos polipéptidos Fc modificados por ingeniería genética comprendiendo cada uno una sustitución en L443 usando el sistema de numeración del índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85; ,

En otro aspecto, el anticuerpo modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende dos polipéptidos Ck modificados por ingeniería genética comprendiendo cada uno una sustitución en K207 según la numeración de Kabat, y dos polipéptidos Fc modificados por ingeniería genética comprendiendo cada uno una sustitución en L443 usando el sistema de numeración del índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85; ,

Además, la presente divulgación no se limita a estas ni a ninguna otra combinación particular de sustituciones entre los dominios constantes, sino que incluye cualquier combinación o permutación de las nuevas sustituciones de aminoácidos y combinaciones de las mismas divulgadas en el presente documento.

En otros aspectos de la divulgación, el anticuerpo modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos un polipéptido Cλ modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución seleccionada de las posiciones 110, 111, 125, 149, 155, 158, 161, 185, 188, 189, 191, 197, 205, 206 y 207, en donde el sistema de numeración del polipéptido constante de cadena ligera es el del índice de numeración de Kabat como se establece en Kabat *et al.* y comprende al menos un: (a) polipéptido Fc modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución seleccionada de las posiciones 246, 249, 254, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 284, 287, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 360, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 390, 392, 393, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 443 y 444, de la cadena pesada usando el sistema de numeración del índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85; y/o (b) un polipéptido Ck modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución seleccionada de las posiciones 111, 149, 183, 188, 207 y 210, de la cadena ligera de un anticuerpo en donde el sistema de numeración del polipéptido constante de cadena ligera es aquel del índice de numeración de Kabat (anteriormente citado).

En otros aspectos de la divulgación, el anticuerpo modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética que comprende al menos dos sustituciones seleccionadas de las posiciones 246, 249, 254, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 284, 287, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 360, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 390, 392, 393, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 443 y 444, de la cadena pesada usando el sistema de numeración del índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85; y comprende al menos un polipéptido Ck modificado por ingeniería genética que comprende al menos dos sustituciones seleccionadas de las posiciones 111, 149, 183, 188, 207 y 210, de la cadena ligera de un anticuerpo, y en donde el sistema de numeración del polipéptido constante de cadena ligera es aquel del índice de numeración de Kabat como se establece en Kabat *et al.* (anteriormente citado) y/o comprende al menos un polipéptido Cλ modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución seleccionada de las posiciones 110, 111, 125, 149, 155, 158, 161, 185, 188, 189, 191, 197, 205, 206 y 207, de la cadena ligera de un anticuerpo, y en donde el sistema de numeración del polipéptido constante de cadena ligera es aquel del índice de numeración de Kabat como se establece en Kabat *et al.* (anteriormente citado).

En otros aspectos de la divulgación, el anticuerpo modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética que comprende al menos tres sustituciones seleccionadas de las posiciones 246, 249, 254, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 284, 287, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 360, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 390, 392, 393, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 443 y 444, de la cadena pesada usando el sistema de numeración del índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85; y comprende al menos un polipéptido Ck modificado por ingeniería genética que comprende al menos tres sustituciones seleccionadas de las posiciones 111, 149, 183, 188, 207 y 210, de la cadena ligera de un anticuerpo, y en donde el sistema de numeración del polipéptido constante de cadena ligera es aquel del índice de numeración de Kabat como se establece en Kabat *et al.* (anteriormente citado) y/o comprende al menos un polipéptido Cλ modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución seleccionada de las posiciones 110, 111, 125, 149, 155, 158, 161, 185, 188, 189, 191, 197, 205, 206 y 207, de la cadena ligera de un anticuerpo, y en donde el sistema de numeración

del polipéptido constante de cadena ligera es aquel del índice de numeración de Kabat como se establece en Kabat *et al.* (anteriormente citado).

En otros aspectos de la divulgación, el anticuerpo modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende al menos un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética que comprende al menos cinco sustituciones seleccionadas de las posiciones 246, 249, 254, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 284, 287, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 360, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 390, 392, 393, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 443 y 444, de la cadena pesada usando el sistema de numeración del índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85; y comprende al menos un polipéptido C_k modificado por ingeniería genética que comprende al menos cinco sustituciones seleccionadas de las posiciones 111, 149, 183, 188, 207 y 210, de la cadena ligera de un anticuerpo, y en donde el sistema de numeración del polipéptido constante de cadena ligera es aquel del índice de numeración de Kabat como se establece en Kabat *et al.* (anteriormente citado) y/o comprende al menos un polipéptido C_λ modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución seleccionada de las posiciones 110, 111, 125, 149, 155, 158, 161, 185, 188, 189, 191, 197, 205, 206 y 207, de la cadena ligera de un anticuerpo, y en donde el sistema de numeración del polipéptido constante de cadena ligera es aquel del índice de numeración de Kabat como se establece en Kabat *et al.* (anteriormente citado).

En otros aspectos de la divulgación, donde el anticuerpo comprende al menos dos polipéptidos Fc modificados por ingeniería genética y dos polipéptidos constantes de cadena ligera modificados por ingeniería genética (C_k-C_k, C_λ-C_λ o C_k-C_λ) en donde cada una de las mutaciones en los dos polipéptidos Fc puede ser la misma, cada una de las mutaciones en C_k o C_λ puede ser la misma o cada polipéptido Fc y/o cada C_k o C_λ comprende una mutación diferente, o ninguna mutación, y cualquier combinación de los anteriores.

Una persona experta habitual en la materia puede seleccionar fácilmente un aminoácido adecuado para su uso en la sustitución. Puede ser deseable seleccionar un resto que sea similar al resto que no es de origen natural (por ejemplo, una sustitución conservativa) para minimizar los cambios en la estructura de la proteína. Por ejemplo, para sustituciones de cisteína, puede ser deseable, pero no necesario, sustituir la cisteína por una alanina o serina de origen natural.

En el caso de sustituciones en IgG2, IgG3 e IgG4, un experto en la materia puede usar la alineación de secuencias del tipo de Ig de interés con IgG1 para determinar los restos relativos de la isoforma deseada que corresponden a las posiciones descritas anteriormente de las posiciones 246, 249, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 360, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 390, 392, 393, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 443 y 444 de la cadena pesada de un anticuerpo en donde el sistema de numeración de la región constante es aquel del índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85; . Las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de cadena pesada de tipo silvestre humana (HC Fc) de IgG2, IgG3 e IgG4 se divulgan en el presente documento como SEQ ID NO: 2, 3 y 4, y se muestran en las Figuras 15C, 15D y 15E, respectivamente.

Una alineación ilustrativa, que muestra las posiciones correspondientes para cada aminoácido de los dominios Fc de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas, se proporciona en la Figura 19A. La región Fc de la IgG1 humana comienza en el resto de aminoácido 236 glicina (²³⁶G) usando el índice Eu como se describe en Kabat. Por lo tanto, las secuencias que se muestran en la Figura 15 muestran la región CH1 y la región bisagra completa de la IgG1 humana, donde la región Fc humana comienza más preferentemente en ²³⁶G.

En otros aspectos de la divulgación, la divulgación abarca la expresión de un polipéptido Fc aislado que comprende restos modificados por ingeniería genética. Estos polipéptidos Fc aislados pueden ser útiles como andamios para fines de visualización o como dominios de dimerización solos o cuando se combinan con otro agente. En un aspecto, la divulgación comprende una proteína de fusión que comprende un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética y un dominio de unión que comprende un sitio de unión de un receptor, citocina, ligando y similares, de tal manera que el dominio de unión proporciona especificidad de unión para el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de tal manera que cualquier fracción conjugada con el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética se dirige a la molécula de unión afín que se une específicamente con el dominio de unión. Una proteína de fusión Fc ilustrativa abarcada por la divulgación comprende un receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR2) o una porción de unión a TNFα del mismo, fusionado con un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación, similar, pero no idéntico a, etanercept (ENBREL™), que comprende TNFR2 fusionado con un polipéptido Fc IgG1 de tipo silvestre. Por lo tanto, un experto habitual en la materia apreciará, una vez armado con las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, que la divulgación no se limita a los anticuerpos modificados por ingeniería genética, sino más bien, la divulgación abarca un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética fusionado con cualquier dominio de unión que proporcione especificidad para un diana de interés.

En otros aspectos de la divulgación, la divulgación proporciona proteínas de fusión que comprenden un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética que comprende al menos una o más sustituciones en posiciones seleccionadas de: 246, 249, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 360, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 390, 392, 393, 401, 404, 411, 413, 414, 416,

418, 419, 421, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 443 y 444, en donde el sistema de numeración de la región constante es aquel del índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85; , fusionado a otra proteína.

Afinidad de anticuerpos

Normalmente, la K_D para el anticuerpo con respecto a la diana será 2 veces, preferentemente 5 veces, más preferentemente 10 veces menos que la K_D con respecto a otra molécula no diana tales como, pero no limitado a, material no relacionado o material acompañante en el ambiente. Más preferentemente, la K_D será 50 veces menor, tal como 100 veces menos o 200 veces menos; aún más preferentemente 500 veces menos, tal como 1.000 veces menos o 10.000 veces menos que la K_D con respecto a la molécula no diana.

El valor de esta constante de disociación puede determinarse directamente mediante métodos bien conocidos, y puede calcularse incluso para mezclas complejas mediante métodos tales como aquellos, por ejemplo, establecidos en Caceci *et al.*, 1984, Byte 9: 340-362. Por ejemplo, la K_D puede establecerse usando un ensayo de unión de filtro de nitrocelulosa de doble filtro tal como el divulgado por Wong y Lohman, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90: 5428-5432. En la técnica se conocen otros ensayos convencionales para evaluar la capacidad de unión de ligandos tales como anticuerpos hacia dianas, incluyendo, por ejemplo, ELISA, transferencias Western, RIA y análisis de citometría de flujo. La cinética de unión y la afinidad de unión del anticuerpo también pueden evaluarse mediante ensayos convencionales conocidos en la técnica, tales como la resonancia plasmónica superficial (Surface Plasmon Resonance, SPR), por ejemplo, usando un sistema Biacore™.

Puede llevarse a cabo un ensayo de unión competitiva en el cual se compara la unión del anticuerpo a la diana con la unión de la diana por otro ligando de esa diana, tal como otro anticuerpo. La concentración a la que se produce una inhibición de la unión del 50 por ciento se conoce como K_i . En condiciones ideales, la K_i es equivalente a K_D . El valor de K_i nunca será menor que K_D , por lo que la medición de K_i puede sustituirse convenientemente para proporcionar un límite superior para K_D .

Un anticuerpo de la invención puede tener una K_D para su diana de 1×10^{-7} M o menos, 1×10^{-8} M o menos, o 1×10^{-9} M o menos, o 1×10^{-10} M o menos, 1×10^{-11} M o menos o 1×10^{-12} M o menos.

Un anticuerpo que se une específicamente a su diana puede unirse a su diana con una alta afinidad, es decir, exhibiendo una K_D baja como se analizó anteriormente, y puede unirse a otras moléculas no diana con una afinidad menor. Por ejemplo, el anticuerpo puede unirse a moléculas no diana con una K_D de 1×10^{-6} M o más, más preferentemente 1×10^{-5} M o más, más preferentemente 1×10^{-4} M o más, más preferentemente 1×10^{-3} M o más, aún más preferentemente 1×10^{-2} M o más. Un anticuerpo de la invención es preferentemente capaz de unirse a su diana con una afinidad que es al menos dos veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 500 veces, 1.000 veces o 10.000 veces o mayor que su afinidad para unirse a otra molécula no diana.

En una realización, un anticuerpo que comprende un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación puede tener una constante de tasa de afinidad o K_a (k_{on}/k_{off}) de al menos 10^2 M⁻¹, al menos 5×10^2 M⁻¹, al menos 10^3 M⁻¹, al menos 5×10^3 M⁻¹, al menos 10^4 M⁻¹, al menos 5×10^4 M⁻¹, al menos 10^5 M⁻¹, al menos 5×10^5 M⁻¹, al menos 10^6 M⁻¹, al menos 5×10^6 M⁻¹, al menos 10^7 M⁻¹, al menos 5×10^7 M⁻¹, al menos 10^8 M⁻¹, al menos 5×10^8 M⁻¹, al menos 10^9 M⁻¹, al menos 5×10^9 M⁻¹, al menos 10^{10} M⁻¹, al menos 5×10^{10} M⁻¹, al menos 10^{11} M⁻¹, al menos 5×10^{11} M⁻¹, al menos 10^{12} M⁻¹, al menos 5×10^{12} M⁻¹, al menos 10^{13} M⁻¹, al menos 5×10^{13} M⁻¹, al menos 10^{14} M⁻¹, al menos 5×10^{14} M⁻¹, al menos 10^{15} M⁻¹ o al menos 5×10^{15} M⁻¹.

En otra realización, un anticuerpo que comprende polipéptidos Fc modificados por ingeniería genética de la divulgación puede tener una constante de velocidad de disociación o K_d (k_{off}/k_{on}) de menos de 5×10^{-2} M, menos de 10^{-2} M, menos de 5×10^{-3} M, menos de 10^{-3} M, menos de 5×10^{-4} M, menos de 10^{-4} M, menos de 5×10^{-5} M, menos de 10^{-5} M, menos de 5×10^{-6} M, menos de 10^{-6} M, menos de 5×10^{-7} M, menos de 10^{-7} M, menos de 5×10^{-8} M, menos de 10^{-8} M, menos de 5×10^{-9} M, menos de 10^{-9} M, menos de 5×10^{-10} M, menos de 10^{-10} M, menos de 5×10^{-11} M, menos de 10^{-11} M, menos de 5×10^{-12} M, menos de 10^{-12} M, menos de 5×10^{-13} M, menos de 10^{-13} M, menos de 5×10^{-14} M, menos de 10^{-14} M, menos de 5×10^{-15} M o menos de 10^{-15} M.

Un anticuerpo que comprende un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética usado de acuerdo con un método descrito en el presente documento puede tener una constante de disociación (K_d) de menos de 3000 pM, menos de 2500 pM, menos de 2000 pM, menos de 1500 pM, menos de 1000 pM, menos de 750 pM, menos de 500 pM, menos de 250 pM, menos de 200 pM, menos de 150 pM, menos de 100 pM, menos de 75 pM según lo evaluado usando un método descrito en el presente documento o conocido por un experto en la materia (por ejemplo, un ensayo Biacore™, ELISA) (Biacore International AB, Uppsala, Suecia).

Los anticuerpos que comprenden polipéptidos Fc modificados por ingeniería genética de la divulgación conservan la capacidad de unión a antígeno de sus homólogos nativos. En una realización, los anticuerpos que comprenden un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación exhiben esencialmente la misma afinidad en comparación con un anticuerpo antes de la modificación por ingeniería genética. En otra realización, los anticuerpos que comprenden un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación exhiben una afinidad reducida

en comparación con un anticuerpo antes de la modificación por ingeniería genética. En otra realización, los anticuerpos que comprenden un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación exhiben una afinidad mejorada en comparación con un anticuerpo antes de la modificación por ingeniería genética.

- 5 En una realización, un anticuerpo que comprende un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación puede tener una constante de disociación (K_d) aproximadamente igual a K_d del anticuerpo antes de la modificación por ingeniería genética.

- 10 En una realización, un anticuerpo que comprende un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación puede tener una constante de disociación (K_d) aproximadamente 1 vez, más preferentemente aproximadamente 2 veces, incluso más preferentemente, aproximadamente 3 veces, más preferentemente, aproximadamente 4 veces, aún más preferentemente, aproximadamente 5 veces, incluso más preferentemente, aproximadamente 10 veces, más preferentemente, aproximadamente 20 veces, incluso más preferentemente, aproximadamente 50 veces, más preferentemente, aproximadamente 100 veces, incluso más preferentemente, aproximadamente 150 veces, más preferentemente, aproximadamente 200 veces, aún más preferentemente, aproximadamente 250 veces, incluso más preferentemente, aproximadamente 300 veces, más preferentemente, aproximadamente 400 veces, incluso más preferentemente, aproximadamente 500 veces, más preferentemente, aproximadamente 600 veces, incluso más preferentemente, aproximadamente 700 veces, más preferentemente, aproximadamente 800 veces, aún más preferentemente 900 veces y aún más preferentemente, aproximadamente 1000 veces mayor por su antígeno afín en comparación con la K_d del anticuerpo antes de la modificación por ingeniería genética.

- 25 En otra realización más, un anticuerpo que comprende un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación puede tener una K_d aproximadamente 1 vez, más preferentemente aproximadamente 2 veces, incluso más preferentemente, aproximadamente 3 veces, más preferentemente, aproximadamente 4 veces, aún más preferentemente, aproximadamente 5 veces, incluso más preferentemente, aproximadamente 10 veces, más preferentemente, aproximadamente 20 veces, incluso más preferentemente, aproximadamente 50 veces, más preferentemente, aproximadamente 100 veces, incluso más preferentemente, aproximadamente 150 veces, más preferentemente, aproximadamente 200 veces, aún más preferentemente, aproximadamente 250 veces, incluso más preferentemente, aproximadamente 300 veces, más preferentemente, aproximadamente 400 veces, incluso más preferentemente, aproximadamente 500 veces, más preferentemente, aproximadamente 600 veces, incluso más preferentemente, aproximadamente 700 veces, más preferentemente, aproximadamente 800 veces, aún más preferentemente 900 veces y aún más preferentemente, aproximadamente 1000 veces menor por su antígeno afín en comparación con la K_d del anticuerpo antes de la modificación por ingeniería genética.

35 Especificidad de los anticuerpos

- En algunas realizaciones, el anticuerpo modificado por ingeniería genética, Fab y $F(ab')_2$ de la divulgación comprende un anticuerpo, Fab y $F(ab')_2$ que comprende un dominio de unión a epítipo (por ejemplo, pero no limitado a, una región variable de anticuerpo que tenga las 6 CDR, o una región equivalente que es al menos el 90 por ciento idéntica a una región variable de anticuerpo) elegido de: abagovomab, abatacept (ORENCIA®), abciximab (REOPRO®, c7E3 Fab), adalimumab (HUMIRA®), adecatumumab, alemtuzumab (CAMPATH®, MabCampath o Campath-1H), altumomab, afelimomab, anatumomab mafenatox, anetumumab, anrukizumab, apolizumab, arcitumomab, aselizumab, atilizumab, atorolimumab, bapineuzumab, basiliximab (SIMULECT®), bavituximab, bectumomab (LYMPHOSCAN®), belimumab (LYMPHO-STAT-B®), bertilimumab, besilesomab, betacept (ENBREL®), bevacizumab (AVASTIN®), biciromab brallobarbitol, bivatuzumab mertansina, brentuximab vedotina (ADCETRIS®), canakinumab (ACZ885), cantuzumab mertansina, capromab (PROSTASCINT®), catumaxomab (REMOV AB®), cedelizumab (CIMZIA®), certolizumab pegol, cetuximab (ERBITUX®), clenoliximab, dacetuzumab, dacliximab, daclizumab (ZENAP AX®), denosumab (AMG 162), detumomab, dorlimomab aritox, dorlixizumab, duntumomab, durimulomab, durmulumab, ecomeximab, eculizumab (SOLIRIS®), edobacomab, edrecolomab (Mab17-1A, PANOREX®), efalizumab (RAPTIVA®), efungumab (MYCOGRAB®), elsilimumab, enlimomab pegol, epitumomab cituxetan, efalizumab, epitumomab, epratuzumab, erlizumab, ertumaxomab (REXOMUN®), etaracizumab (etaratuzumab, VITAXIN®, ABEGRAIN™), exbivirumab, fanolesomab (NEUTROSPEC®), faralimumab, felvizumab, fontolizumab (HUZAF®), galiximab, gantenerumab, gavilimumab (ABX-CBL(R)), gemtuzumab ozogamicina (MYLOTARG®), golimumab (CNTO 148), gomiliximab, ibalizumab (TNX-355), ibritumomab tiuxetán (ZEVALIN®), igovomab, imciromab, infliximab (REMICAD E®), inolimomab, inotuzumab ozogamicina, ipilimumab (YERVOY®, MDX-010), iratumumab, keliximab, labetuzumab, lemalesomab, lebrilizumab, lerdelimomab, lexatumumab (HGS-ETR2, ETR2-ST01), lexitumumab, libivirumab, lintuzumab, lucatumumab, lumiliximab, mapatumumab (HGS-ETRI, TRM-I), maslimomab, matuzumab (EMD72000), mepolizumab (BOSATRIA®), metelimomab, milatuzumab, minretumomab, mitumomab, morolimumab, motavizumab (NUMAX™), muromonab (OKT3), nacolomab tafenatox, naptumomab estafenatox, natalizumab (TYSABRI®, ANTEGREN®), nebacumab, nerelimomab, nimotuzumab (THERACIM hR3®, THERA-CIM-hR3®, THERALOC®), nofetumomab merpentan (VERLUMA®), ocrelizumab, odulimumab, ofatumumab, omalizumab (XOLAIR®), oregovomab (OVAREX®), otelixizumab, pagibaximab, palivizumab (SYNAGIS®), panitumumab (ABX-EGF, VECTIBIX®), pascolizumab, pemtumomab (THERAGYN®), pertuzumab (2C4, OMNITARG®), pexelizumab, pintumomab, ponezumab, priliximab, pritumomab, ranibizumab (LUCENTIS®), raxibacumab, regavirumab, reslizumab, rituximab (RITUXAN®, MabTHERA®), rovelizumab, ruplizumab, satumomab, sevirumab, sibrotuzumab, siplizumab

(MEDI-507), sontuzumab, stamulumab (Myo-029), sulesomab (LEUKOSCAN®), tacatuzumab tetraxetan, tadocizumab, talizumab, taplitumomab paptox, tefibazumab (AUREXIS®), telimomab aritox, teneliximab, teplizumab, ticilimumab, toclizumab (ACTEMRA®), toralizumab, tositumomab, trastuzumab (HERCEPTIN®), tremelimumab (CP-675.206), tucotuzumab celmoleucina, tuvirumab, urtoxazumab, ustekinumab (CNTO 1275), vapaliximab, veltuzumab, vepalimomab, visilizumab (NUVION®), volociximab (M200), votumumab (HUMASPECT®), zalutumumab, zanolimumab (HuMAX-CD4), ziralimumab o zolimomab aritox.

En otras realizaciones, un anticuerpo modificado por ingeniería genética, Fab y F(ab')₂ de la divulgación comprenden un dominio variable de cadena pesada y ligera que tiene seis CDR y/o compiten por la unión con un anticuerpo seleccionado de la lista anterior. En otras realizaciones, un anticuerpo, Fab y F(ab')₂ que comprenden un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética y/o un polipéptido C_κ o C_λ modificado por ingeniería genética de la divulgación se unen al mismo epítipo que los anticuerpos en la lista anterior. En otras realizaciones, un anticuerpo, Fab y F(ab')₂ que comprenden un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética y/o un polipéptido C_κ o C_λ modificado por ingeniería genética de la divulgación comprenden un dominio variable de cadena pesada y ligera que tiene seis CDR en total y se unen al mismo antígeno que los anticuerpos en la lista anterior.

En otras realizaciones, un anticuerpo, Fab y F(ab')₂ que comprenden un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética y/o un polipéptido C_κ o C_λ modificados por ingeniería genética de la divulgación comprenden un dominio variable de cadena pesada y ligera que tiene seis (6) CDR en total y se unen específicamente a un antígeno seleccionado de: PDGFRα, PDGFRβ, PDGF, VEGF, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, FGF, FGF2, HGF, KDR, flt-1, FLK-1, Ang-2, Ang-1, PLGF, CEA, CXCL13, Baff, IL-21, CCL21, TNF-α, CXCL12, SDF-1, bFGF, MAC-1, IL23p19, FPR, IGFBP4, CXCR3, TLR4, CXCR2, EphA2, EphA4, EphrinB2, EGFR(ErbB1), HER2(ErbB2 o p185neu), HER3(ErbB3), HER4 ErbB4 o tyro2), SCI, LRP5, LRP6, RAGE, s100A8, s100A9, Nav1.7, GLPI, RSV, proteína F del RSV, proteína HA de la gripe, proteína NA de la gripe, HMGB1, CD16, CD19, CD20, CD21, CD28, CD32, CD32b, CD64, CD79, CD22, ICAM-1, FGFR1, FGFR2, HDGF, EphB4, GTR, β-amiloide, hMPV, PIV-1, PIV-2, OX40L, IGFBP3, cMet, PD-1, PLGF, Noprolisina, CTD, IL-18, IL-6, CXCL-13, IL1R1, IL-15, IL-4R, IgE, PAI-1, NGF, EphA2, uPAR, DLL-4, αvβ5, αvβ6, α5β1, α3β1, receptor de interferón tipo I y tipo II, CD 19, ICOS, IL-17, Factor II, Hsp90, IGF, IGF-1, IGF-II, CD 19, GM-CSFR, PIV-3, CMV, IL-13, IL-9 y EBV.

En otras realizaciones, un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, por ejemplo, fragmento Fab y F(ab')₂, que comprende un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética y/o un polipéptido C_κ o C_λ modificado por ingeniería genética de la divulgación se une específicamente a un miembro (receptor o ligando) de la superfamilia TNF. Diversas moléculas incluyen, pero no se limitan al Factor de necrosis tumoral α ("TNF-α"), Factor de necrosis tumoral β ("TNF-β"), Linfotóxina-α ("LT-α"), ligando CD30, ligando CD27, ligando CD40, ligando 4-1 BB, ligando Apo-1 (también conocido como ligando Fas o ligando CD95), ligando Apo-2 (también conocido como TRAIL), ligando Apo-3 (también conocido como TWEAK), osteoprotegerina (OPG), APRIL, ligando RANK (también conocido como TRANCE), TALL-1 (también conocido como BlyS, BAFF o THANK), DR4, DR5 (también conocido como Apo-2, TRAIL-R2, TR6, Tango-63, hAPO8, TRICK2 o KILLER), DR6, DcR1, DcR2, DcR3 (también conocido como TR6 o M68), CAR1, HVEM (también conocido como ATAR o TR2), GTR, ZTNFR-5, NTR-1, TNFRI, CD30, LTB₄, receptor 4-1BB y TR9.

En otra realización, el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, por ejemplo, fragmento Fab y F(ab')₂, que comprende un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética y/o un polipéptido C_κ o C_λ modificado por ingeniería genética de la divulgación es capaz de unirse a una o más dianas elegidas de 5T4, ABL, ABCB5, ABCF1, ACVRI, ACVRIB, ACVR2, ACVR2B, ACVRLI, ADORA2A, AggreCAN, AGR2, AICDA, AIFI, AIGI, AKAP1, AKAP2, AMH, AMHR2, angiogenina (ANG), ANGPT1, ANGPT2, ANGPTL3, ANGPTL4, Anexina A2, ANPEP, APC, APOC1, AR, aromatasa, ATX, AXI, AZGP1 (cinc-a-glucoproteína), B7.1, B7.2, B7-H1, BAD, BAFF, BAGI, BAI1, BCR, BCL2, BCL6, BDNF, BLNK, BLR1 (MDR15), BlyS, BMP1, BMP2, BMP3B (GDF10), BMP4, BMP6, BMP7, BMP8, BMP9, BMP11, BMP12, BMPR1A, BMPR1B, BMPR2, BPAGI (plectina), BRCA1, C19orf10 (IL27w), C3, C4A, C5, C5R1, CANTI, CASP1, CASP4, CAVI, CCBP2 (D6 / JAB61), CCL1 (1-309), CCL1 1 (eotaxina), CCL13 (MCP-4), CCL15 (MIP-1d), CCL16 (HCC-4), CCL17 (TARC), CCL18 (PARC), CCL19 (MIP-3b), CCL2 (MCP-1), MCAF, CCL20 (MIP-3a), CCL21 (MEP-2), SLC, exodus-2, CCL22(MDC / STC-1), CCL23 (MIP-1), CCL24 (MIP-2 / eotaxina-2), CCL25 (TECK), CCL26(eotaxina-3), CCL27 (CTACK / ILC), CCL28, CCL3 (MIP-1a), CCL4 (MIP-1b), CCL5(RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL8 (mcp-2), CCNA1, CCNA2, CCND1, CCNE1, CCNE2, CCRI (CKR1 / HM145), CCR2 (mcp-1RB / RA), CCR3 (CKR3 / CMKBR3), CCR4, CCR5(CMKBR5 / ChemR13), CCR6 (CMKBR6 / CKR-L3 / STRL22 / DRY6), CCR7 (CKR7 / EBI1), CCR8 (CMKBR8 / TER1 / CKR-LI), CCR9 (GPR-9-6), CCRL1 (VSHKI), CCRL2 (L-CCR), CD164, CD19, CDIC, CD20, CD200, CD-22, CD24, CD28, CD3, CD33, CD35, CD37, CD38, CD3E, CD3G, CD3Z, CD4, CD40, CD40L, CD44, CD45RB, CD46, CD52, CD69, CD72, CD74, CD79A, CD79B, CD8, CD80, CD81, CD83, CD86, CD105, CD137, CDH1 (E-cadherina), CDCP1, CDH10, CDH12, CDH13, CDH18, CDH19, CDH20, CDH5, CDH7, CDH8, CDH9, CDK2, CDK3, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7, CDK9, CDKNIA (p21Wap1/Cip1), CDKNIB (p27Kip1), CDKNIC, CDKN2A (p16INK4a), CDKN2B, CDKN2C, CDKN3, CEBPB, CER1, CHGA, CHGB, Quitinasa, CHST10, CKLFSF2, CKLFSF3, CKLFSF4, CKLFSF5, CKLFSF6, CKLFSF7, CKLFSF8, CLDN3, CLDN7 (claudina-7), CLN3, CLU (clusterina), CMKLRI, CMKORI (RDCI), CNRI, COL1A1, COL1A1A3, COL6A1, CR2, Cripto, CRP, CSF1 (M-CSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (G-CSF), CTLA4, CTL8, CTNBI (b-catenina), CTSB (cathepsina B), CX3CL1 (SCYDI), CX3CR1 (V28), CXCL1(GRO1), CXCLIO (IP-10), CXCLII (I-TAC / IP-9), CXCL12 (SDF1), CXCL13, CXCL14, CXCL16, CXCL2 (GRO2), CXCL3 (GRO3), CXCL5 (ENA-78 / LIX), CXCL6 (GCP-2), CXCL9 (MIG), CXCR3 (GPR9/CKR-L2), CXCR4, CXCR6 (TYMSTR / STRL33 / Bonzo), CYB5, CYC1, Cyr61, CYSLTRI, c-Met, DAB2IP, DES, DKFZp451J0118, DNCLI, DPP4, E2F1, ECGF15EDGI, EFNA1, EFNA3,

EFNB2, EGF, EGFR, ELAC2, ENG, endoglina, ENOI, ENO2, ENO3, EPHA1, EPHA2, EPHA3, EPHA4, EPHA5, EPHA6, EPHA7, EPHA8, EPHA9, EPHA10, EPHB1, EPHB2, EPHB3, EPHB4, EPHB5, EPHB6, EPHRIN-A1, EPHRIN-A2, EPHRIN-A3, EPHRIN-A4, EPHRIN-A5, EPHRIN-A6, EPHRIN-B1, EPHRIN-B2, EPHRTN-B3, EPHB4,EPG, ERBB2 (Her-2), EREG, ERK8, Receptor de estrógeno, ESR1, ESR2, F3 (TF), FADD, farnesiltransferasa, FasL, FASnF, FCER1A,FCER2, FCGR3A, FGF, FGFI (aFGF), FGFIO, FGFI 1, FGF12, FGF12B, FGF13, FGF14, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF2 (bFGF), FGF20, FGF21, FGF22, FGF23, FGF3 (int-2),FGF4 (HST), FGF5, FGF6 (HST-2), FGF7 (KGF), FGF8, FGF9, FGFR3, FIGF (VEGFD), FIL(ε), FBLI(ζ), FLJ12584, FLJ25530, FLRTI (fibronectina), FLTI, FLT-3, FOS, FOSLI(FRA-I), FY (DARC), GABRP (GABAa), GAGEBI, GAGECI, GALNAC4S-6ST, GATA3, GD2, GD3, GDF5, GDF8, GFII, GGTI, GM-CSF, GNASI, GNRHI, GPR2 (CCRIO), GPR31, GPR44, GPR81 (FKSG80), GRCCIO (CIO), gremlina, GRP, GSN (Gelsolina), GSTPI, HAVCR2, HDAC, HDAC4, HDAC5,HDAC7A, HDAC9, Hedgehog, HGF, HIFIA, HIP1, histamina y receptores de histamina, HLA-A, HLA-DRA, HM74, HMOXI, HSP90, HUMCYT2A, ICEBERG, ICOSL, ID2, IFN-a, IFNA1, IFNA2, IFNA4,IFNA5, EFNA6, BFNA7, IFNBI, IFNy, IFNWI, IGBPI, IGFI, IGFI, IGF2, IGFBP2,IGFBP3, IGFBP6, DL-I, ILIO, ILIORA, ILIORB, IL- 1, ILIRI (CD121a), ILIR2(CD121b), IL- IRA, IL-2, IL2RA (CD25), IL2RB(CD122), IL2RG(CD132), IL-4, IL-4R(CD123), IL-5, IL5RA(CD125), IL3RB(CD131), IL-6, IL6RA (CD126), IR6RB(CD130), IL-7, IL7RA(CD127), IL-8, CXCR1 (IL8RA), CXCR2 (IL8RB/CD128), IL-9, IL9R (CD129), IL-10, IL10RA(CD210), IL10RB(CDW210B), IL-11, ILI IRA, IL-12, IL-12A, IL-12B, IL- 12RB1, IL-12RB2, IL-13, IL13RA1, IL13RA2, IL14, IL15, IL15RA, IL16, IL17, IL17A, IL17B, IL17C, IL17R, IL18, IL18BP, IL18R1, IL18RAP, IL19, ILIA, ILIB, ILIFIO, IL1F5, IL1F6, IL1F7, IL1F8, DL1F9, ILIHYI, ILIRI, IL1R2, ILIRAP, ILIRAPLI, IL1RAPL2, ILIRLI, IL1RL2, ILIRN, IL2, IL20, IL20RA, IL21R, IL22, IL22R, IL22RA2, IL23,DL24, IL25, IL26, IL27, IL28A, IL28B, IL29, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL3, IL30, IL3RA, IL4,IL4R, IL6ST (glucoproteína 130), ILK, INHA, INHBA, INSL3, INSL4, IRAKI, IRAK2, ITGA1, ITGA2, ITGA3, ITGA6 (α 6 integrina), ITGAV, ITGB3, ITGB4 (β 4 integrina), JAG1, JAK1, JAK3, JTB, JUN,K6HF, KAI1, KDR, KIM-1, KITLG, KLF5 (GC Box BP), KLF6, KLK10, KLK12, KLK13, KLK14, KLK15, KLK3, KLK4, KLK5, KLK6, KLK9, KRTI, KRT19 (Queratina 19), KRT2A, KRTHB6 (queratina tipo II específica del cabello), LAMA5, LEP (leptina), Lingo- p75, Lingo-Troy, LPS, LRP5, LRP6, LTA (TNF- b), LTB, LTB4R (GPR16), LTB4R2, LTBR, MACMARCKS, MAG u Omgp, MAP2K7 (c-Jun), MCP-I, MDK, MIBI, midcina, MIF, MISRII, MJP-2,MK, MKI67 (Ki-67), MMP2, MMP9, MS4A1, MSMB,MT3 (metalotionectina-Ui), mTOR, MTSSI, MUCI (mucina), MYC, MYD88, NCK2, neurocan, neuregulina-1, neuropilina-1, NFKBI, NFKB2, NGFB (NGF), NGFR, NgR-Lingo, NgR-Nogo66 (Nogo), NgR- p75, NgR-Troy, NMEI (NM23A), NOTCH, NOTCHI, N0X5, NPPB, NROBI, NR0B2, NRIDI, NR1D2, NR1H2, NR1H3, NR1H4, NR1I2, NR1I3, NR2C1, NR2C2, NR2E1, NR2E3, NR2F1, NR2F2, NR2F6, NR3C1, NR3C2, NR4A1, NR4A2, NR4A3, NR5A1, NR5A2, NR6A1, NRPI, NRP2, NT5E, NTN4, OCT-1, ODZ1, OPN1, OPN2, OPRDI, P2RX7, PAP, PARTI, PATE, PAWR, PCA3, PCDGF, PCNA, PDGFA, PDGFB, PDGFRA, PDGFRB, PECAMI, peg- asparaginasa, PF4 (CXCL4), Plexina B2 (PLXNB2), PGF, PGR, fosfacán, PIAS2, PI3 Quinasa, PIK3CG, PLAU (uPA), PLG5PLXDCI, PKC, PKC-β, PPBP (CXCL7), PPID, PRI, PRKCQ, PRKDI, PRL, PROC, PROK2, pro-NGF, prosaposina, PSAP, PSCA, PTAFR, PTEN, PTGS2 (COX-2), PTN, RAC2 (P21Rac2), RANK, ligando de RANK, RARB, RGS1, RGS13, RGS3,RNFI10 (ZNF144), Ron, R0B02, RXR, selectina, S100A2, S100A8, S100A9, SCGB 1D2 (lipofilina B), SCGB2A1 (mammaglobina 2),SCGB2A2 (mammaglobina 1), SCYE1 (citocina activadora de monocitos endoteliales), SDF2, SERPENA1, SERPINA3, SERPINB5 (maspina), SERPINEI (PAI-I), SERPINFI, SHIP-I, SHIP-2, SHBI, SHB2, SHBG, SfcAZ,SLC2A2, SLC33A1, SLC43A1, SLIT2, SPPI, SPRRIB (Sprl), ST6GAL1, STABI, STAT6, STEAP, STEAP2, SULF-1, Sulf-2, TB4R2, TBX21, TCPIO, TDGFI, TEK, TGFA, TGFB1, TGFBIII, TGFB2,TGFB3, TGFB1, TGFBRI, TGFBRI, TGFBRI, THIL, THBSI (tromboespondina-1), THBS2/THBS4, THPO, TIE (Tie-1), TIMP3, factor tisular, TIKI2, TLR10, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6JLR7, TLR8, TLR9, TM4SF1, TNF, TNF-a, TNFAIP2 (B94), TNFAIP3, TNFRSFIIA, TNFRSFIA, TNFRSFIB, TNFRSF21, TNFRSF5, TNFRSF6 (Fas), TNFRSF7, TNFRSF8, TNFRSF9, TNFSFIO (TRAIL), TNFSFI 1 (TRANCE), TNFSF12 (AP03L), TNFSF13 (April), TNFSF13B,TNFSF14 (HVEM-L), TNFSF15 (VEGI), TNFSF 18, TNFSF4 (ligando de OX40), TNFSF5 (ligando de CD40), TNFSF6 (FasL), TNFSF7 (ligando de CD27), TNFSF8 (ligando de CD30), TNFSF9 (ligando de 4-1BB), TOLLIP, receptores tipo Toll, TLR2, TLR4, TLR9, TOP2A (topoisomerasa lia), TP53, TPMI, TPM2,TRADD, TRAFI, TRAF2, TRAF3, TRAF4, TRAF5, TRAF6, TRKA, TREM1, TREM2, TRPC6, TROY, TSLP, TWEAK, Tirosinasa, uPAR, VEGF, VEGFB, VEGFC, versicán, VHL C5, VLA-4, Wnt-1, XCLI (linfotactina), XCL2 (SCM-Ib), XCRI (GPR5 / CCXCR1), YYY y ZFPM2.

50 Proteína de fusión Fc modificada por ingeniería genética

En otra realización, el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación puede fusionarse/unirse covalentemente con una porción de cualquiera de las proteínas de la lista anterior o el polipéptido Fc puede fusionarse/unirse covalentemente con cualquier receptor o ligando que se una específicamente a una proteína de la lista anterior. En un aspecto, la divulgación abarca una proteína de fusión de polipéptido Fc que comprende un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética fusionado con una proteína enumerada anteriormente, o una porción de la proteína que se une a su ligando o receptor afín. Por ejemplo, abatacept y betanercept son proteínas de fusión Fc que comprenden una porción de CTLA4 y TNFR2, respectivamente. Por lo tanto, la presente divulgación abarca una proteína de fusión que comprende una proteína de fusión CTLA4-Fc (abatacept; ORENCIA™) donde el Fc es un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación y CTLR4 es un dominio extracelular de CTLA4 que es capaz de unirse a sus antígenos afines, por ejemplo, CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2). Del mismo modo, la divulgación abarca una proteína de fusión que comprende una proteína de fusión TNFR2-Fc que se une a TNFα (etanercept; ENBREL™) en donde el Fc es un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación; una proteína de fusión Fc que comprende el dominio extracelular (ECD) de LFA3 (alefacept; AMEVIVE™) que se une a CD2 en donde el Fc es un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación; y una proteína de fusión Fc que comprende un péptido de unión al receptor de trombopoyetina que se une al receptor de trombopoyetina (romiplostim)

en donde el Fc es un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación. La divulgación no se limita de ninguna manera a estas realizaciones particulares, sino más bien, abarca una amplia diversidad de proteínas de fusión Fc que comprenden cualquier proteína de interés fusionada con un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación.

5

En una realización, la divulgación abarca una proteína de fusión que comprende un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética fusionado con cualquiera de las siguientes proteínas, o una porción de unión de las mismas: PDGFR α , PDGFR β , PDGF, VEGF, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F, VEGFR-I, VEGFR-2, VEGFR-3, FGF, FGF2, HGF, KDR, flt-1, FLK-1, Ang-2, Ang-1, PLGF, CEA, CXCL13, Baff, IL-21, CCL21, TNF- α , CXCL12, SDF-I, bFGF, MAC-I, IL23p19, FPR, IGFBP4, CXCR3, TLR4, CXCR2, EphA2, EphA4, EphrinB2, EGFR(ErbB1), HER2(ErbB2 o p185neu), HER3(ErbB3), HER4 ErbB4 o tyro2), SCI, LRP5, LRP6, RAGE, Nav1.7, GLPI, RSV, proteína F del RSV, proteína HA de la gripe, proteína NA de la gripe, HMGB1, CD16, CD19, CD20, CD21, CD28, CD32, CD32b, CD64, CD79, CD22, ICAM-1, FGFR1, FGFR2, HDGF, EphB4, GTR, β -amiloides, hMPV, PIV-1, PIV-2, OX40L, IGFBP3, cMet, PD-1, PLGF, Nephrolisina, CTD, IL-18, IL-6, CXCL-13, IL-1R1, IL-15, IL-4R, IgE, PAI-I, NGF, EphA2, uPAR, DLL-4, $\alpha\beta$ 5, $\alpha\beta$ 6, α 5 β 1, α 3 β 1, receptor de interferón tipo I y tipo II, CD 19, ICOS, IL- 17, Factor II, Hsp90, IGF, IGF-I, IGF-II, CD 19, GM-CSFR, PIV-3, CMV, IL-13, IL-9 y EBV, TNF- α , TNF- β , LT- α , CD30L, CD27L, CD40L, 4-1 BBL, ligando Apo-1 (también conocido como ligando Fas o ligando CD95), ligando Apo-2 (también conocido como TRAIL), ligando Apo-3 (también conocido como TWEAK), osteoprotegerina (OPG), APRIL, RANKL (también conocido como TRANCE), TALL-I (también conocido como BlyS, BAFF o THANK), DR4, DR5 (también conocido como Apo-2, TRAIL-R2, TR6, Tango-63, hAPO8, TRICK2 o KILLER), DR6, DcR1, DcR2, DcR3 (también conocido como TR6 o M68), CAR1, HVEM (también conocido como ATAR o TR2), GTR, ZTNFR-5, NTR-1, TNFL1, CD30, LTBR, receptor 4-1BB y TR9.

En otra realización, la fusión Fc que comprende un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación es capaz de unirse a una o más proteínas elegidas de 5T4, ABL, ABCB5, ABCF1, ACVRI, ACVRIB, ACVR2, ACVR2B, ACVRLI, ADORA2A, Aggrecan, AGR2, AICDA, AIFI, AIGI, AKAP1, AKAP2, AMH, AMHR2, angiogenina (ANG), ANGPT1, ANGPT2, ANGPTL3, ANGPTL4, Anexina A2, ANPEP, APC, APOC1, AR, aromatasa, ATX, AXI, AZGP1 (cinc-a-glucoproteína), B7.1, B7.2, B7-H1, BAD, BAFF, BAGI, BAI1, BCR, BCL2, BCL6, BDNF, BLNK, BLR1 (MDR15), BlyS, BMP1, BMP2, BMP3B (GDF10), BMP4, BMP6, BMP8, BMPRIA, BMPRII, BMPRII, BMPRII, BPAGI (plectina), BRCA1, C19orf10 (IL27w), C3, C4A, C5, C5R1, CANT1, CASP11, CASP4, CAVI, CCBP2 (D6 / JAB61), CCLI (1-309), CCLI1 (eotaxina), CCL13 (MCP-4), CCL15 (MIP-Id), CCL16 (HCC-4), CCL17 (TARC), CCL18 (PARC), CCL19 (MIP-3b), CCL2 (MCP - 1), MCAF, CCL20 (MIP-3a), CCL21 (MEP-2), SLC, exodus-2, CCL22 (MDC / STC-1), CCL23 (MPIF- 1), CCL24 (MPIF- 2 / eotaxina-2), CCL25 (TECK), CCL26 (eotaxina-3), CCL27 (CTACK / ILC), CCL28, CCL3 (MIP-1a), CCL4 (MIP-1b), CCL5(RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL8 (mcp-2), CCNA1, CCNA2, CCND1, CCNE1, CCNE2, CCR1 (CKR1 / HM145), CCR2 (mcp- IRB / RA), CCR3 (CKR3 / CMKBR3), CCR4, CCR5(CMKBR5 / ChemR13), CCR6 (CMKBR6 / CKR-L3 / STRL22 / DRY6), CCR7 (CKR7 / EB11), CCR8 (CMKBR8 / TER1 / CKR-L1), CCR9 (GPR-9-6), CCR11 (VSHK1), CCR12 (L-CCR), CD164, CD19, CDIC, CD20, CD200, CD-22, CD24, CD28, CD3, CD33, CD35, CD37, CD38, CD3E, CD3G, CD3Z, CD4, CD40, CD40L, CD44, CD45RB, CD46, CD52, CD69, CD72, CD74, CD79A, CD79B, CD8, CD80, CD81, CD83, CD86, CD105, CD137, CDH1 (E-cadherina), CDCP1CDH10, CDH12, CDH13, CDH18, CDH19, CDH20, CDH5, CDH7, CDH8, CDH9, CDK2, CDK3, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7, CDK9, CDKN1A (p21Wap1/Cipl), CDKN1B (p27Kipl), CDKN1C, CDKN2A (p16INK4a), CDKN2B, CDKN2C, CDKN3, CEBPB, CER1, CHGA, CHGB, Quitinasa, CHST10, CKLFSF2, CKLFSF3, CKLFSF4, CKLFSF5, CKLFSF6, CKLFSF7, CKLFSF8, CLDN3, CLDN7 (claudina- 7), CLN3, CLU (clusterina), CMKLRI, CMKORI (RDCl), CNRI, COL1 8A1, COL1A1, COL4A3, COL6A1, CR2, Cripto, CRP, CSF1 (M-CSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (G-CSF), CTLA4, CTL8, CTNNB1 (b-catenina), CTSE (cathepsin B), CX3CL1 (SCYDI), CX3CR1 (V28), CXCL1(GROI), CXCLIO (IP-IO), CXCLII (I-TAC / IP-9), CXCL12 (SDFI), CXCL13, CXCL 14, CXCL 16, CXCL2 (GR02), CXCL3 (GR03), CXCL5 (ENA-78 / LIX), CXCL6 (GCP-2), CXCL9 (MIG), CXCR3 (GPR9/CKR-L2), CXCR4, CXCR6 (TYMSTR / STRL33/ Bonzo), CYB5, CYC1, Cyr61, CYSLTR1, c-Met, DAB2IP, DES, DKFZp451J0118, DNCL1, DPP4, E2F1, ECGF15EDGI, EFNA1, EFNA3, EFNB2, EGF, EGFR, ELAC2, ENG, endoglin, ENO1, ENO2, ENO3, EPHA1, EPHA2, EPHA3, EPHA4, EPHA5, EPHA6, EPHA7, EPHA8, EPHA9, EPHA10, EPHB1, EPHB2, EPHB3, EPHB4, EPHB5, EPHB6, EPHRIN-A1, EPHRIN-A2, EPHRIN-A3, EPHRIN-A4, EPHRIN-A5, EPHRIN-A6, EPHRIN-B1, EPHRIN-B2, EPHRTN-B3, EPHB4, EPG, ERBB2 (Her-2), EREG, ERK8, Receptor de estrógeno, ESRI, ESR2, F3 (TF), FADD, farnesiltransferasa, FasL, FASnF, FCER1A, FCER2, FCGR3A, FGF, FGF1 (aFGF), FGF10, FGF11, FGF12, FGF12B, FGF13, FGF14, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF2 (bFGF), FGF20, FGF21, FGF22, FGF23, FGF3 (int-2), FGF4 (HST), FGF5, FGF6 (HST-2), FGF7 (KGF), FGF8, FGF9, FGFR3, FIGF (VEGFD), FILI(ϵ), FBIL1 (ζ), FLJ12584, FLJ25530, FLRT1 (fibronectina), FLTI, FLT-3, FOS, FOSLI(FRA-I), FY (DARC), GABRP (GABAa), GAGEB1, GAGEC1, GALNAC4S-6ST, GATA3, GD2, GD3, GDF5, GFII, GGTI, GM-CSF, GNAS1, GNRHI, GPR2 (CCR10), GPR31, GPR44, GPR81 (FKSG80), GRCC10 (C10), GRP, GSN (Gelsolina), GSTPI, HAVCR2, HDAC, HDAC4, HDAC5, HDAC7A, HDAC9, Hedgehog, HGF, HIF1A, HIP1, histamina y receptores de histamina, HLA-A, HLA-DRA, HM74, HMOXI, HSP90, HUMCYT2A, ICEBERG, ICOSL, ID2, IFN-a, IFNA1, IFNA2, IFNA4, IFNA5, EFNA6, BFNA7, IFNB1, IFN γ , IFNWI, IGBPI, IGFI, IGFI, IGF2, IGFBP2, IGFBP3, IGFBP6, DL-I, ILIO, ILIORA, ILIORB, IL-1, ILIRI (CD121a), ILIR2(CD121b), IL- IRA, IL-2, IL2RA (CD25), IL2RB(CD122), IL2RG(CD132), IL-4, IL-4R(CD123), IL-5, IL5RA(CD125), IL3RB(CD131), IL-6, IL6RA (CD126), IR6RB(CD130), IL-7, IL7RA(CD127), IL-8, CXCR1 (IL8RA), CXCR2 (IL8RB/CD128), IL-9, IL9R (CD129), IL- 10, IL10RA(CD210), IL10RB(CDW210B), IL-11, ILI IRA, IL-12, IL-12A, IL-12B, IL- 12RB1, IL-12RB2, IL-13, IL13RA1, IL13RA2, IL14, IL15, IL15RA, IL16, IL17, IL17A, IL17C, IL17R, IL18, IL18BP, IL18R1, IL18RAP, IL19, ILIA, ILIB, ILIFIO, IL1F5, IL1F6, IL1F7, IL1F8, DL1F9, ILIHY1, ILIRI, ILIR2, ILIRAP, ILIRAPLI, IL1RAPL2, ILIRLI, IL1RL2, ILIRN, IL2, IL20, IL20RA, IL21R, IL22, IL22R, IL22RA2, IL23, DL24, IL25,

IL26, IL27, IL28A, IL28B, IL29, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL3, IL30, IL3RA, IL4, IL4R, IL6ST (glucoproteína 130), ILK, INHA, INHBA, INSL3, INSL4, IRAKI, IRAK2, ITGAI, ITGA2, ITGA3, ITGA6 (<x6 integrina), ITGAV, ITGB3, ITGB4 (β 4 integrina), JAG1, JAK1, JAK3, JTB, JUN, K6HF, KAI1, KDR, KIM-1, KITLG, KLF5 (GC Box BP), KLF6, KLK10, KLK12, KLK13, KLK14, KLK15, KLK3, KLK4, KLK5, KLK6, KLK9, KRT1, KRT19 (Queratina 19), KRT2A, KRTHB6 (queratina tipo II específica del cabello), LAMA5, LEP (leptina), Lingo- p75, Lingo-Troy, LPS, LRP5, LRP6, LTA (TNF- b), LTB, LTB4R (GPR16), LTB4R2, LTBR, MACMARCKS, MAG u Omgp, MAP2K7 (c-Jun), MCP-I, MDK, MIB1, midcina, MIF, MISRII, MJP-2, MK, MKI67 (Ki-67), MMP2, MMP9, MS4A1, MSMB, MT3 (metalotionectina-Ui), mTOR, MTSSI, MUC1 (mucina), MYC, MYD88, NCK2, neurocan, neuregulina-1, neuropilina-1, NFKBI, NFKB2, NGFB (NGF), NGFR, NgR-Lingo, NgR-Nogo66 (Nogo), NgR- p75, NgR-Troy, NME1 (NM23A), NOTCH, NOTCHI, N0X5, NPPB, NROBI, NR0B2, NR1D1, NR1D2, NR1H2, NR1H3, NR1H4, NR1I2, NR1I3, NR2C1, NR2C2, NR2E1, NR2E3, NR2F1, NR2F2, NR2F6, NR3C1, NR3C2, NR4A1, NR4A2, NR4A3, NR5A1, NR5A2, NR6A1, NRPI, NRP2, NT5E, NTN4, OCT-1, ODZ1, OPN1, OPN2, OPRDI, P2RX7, PAP, PARTI, PATE, PAWR, PCA3, PCDGF, PCNA, PDGFA, PDGFB, PDGFRA, PDGFRB, PECAMI, peg- asparaginasa, PF4 (CXCL4), Plexina B2 (PLXNB2), PGF, PGR, fosfacán, PIAS2, PI3 Quinasa, PLG3CG, PLAUI (uPA), PLG5PLXDCI, PKC, PKC- β , PPBP (CXCL7), PPID, PRI, PRKCQ, PRKDI, PRL, PROC, PROK2, pro-NGF, prosaposina, PSAP, PSCA, PTAFR, PTEN, PTGS2 (COX-2), PTN, RAC2 (P21Rac2), RANK, ligando de RANK, RARB, RGS1, RGS13, RGS3, RNF110 (ZNF144), Ron, R0B02, RXR, selectina, S100A2, S100A8, S100A9, SCGB 1D2 (lipofilina B), SCGB2A1 (mammaglobina 2), SCGB2A2 (mammaglobina 1), SCYE1 (citocina activadora de monocitos endoteliales), SDF2, SERPENA1, SERPINA3, SERPINB5 (maspina), SERPINE1 (PAI-I), SERPINI1, SHIP-I, SHIP-2, SHBI, SHB2, SHBG, SfcAZ, SLC2A2, SLC33A1, SLC43A1, SLIT2, SPPI, SPRIB (Sprl), ST6GAL1, STABI, STAT6, STEAP, STEAP2, SULF-1, Sulf-2, TB4R2, TBX21, TCPIO, TDGFI, TEK, TGFA, TGFB1, TGFBIII, TGFB2, TGFB3, TGFB1, TGFBRI, TGFBRI2, TGFBRI3, THIL, THBS1 (tromboespondina-1), THBS2/THBS4, THPO, TIE (Tie-1), TIMP3, factor tisular, TIKI2, TLR10, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6JLR7, TLR8, TLR9, TM4SF1, TNF, TNF-a, TNFAIP2 (B94), TNFAIP3, TNFRSFIIA, TNFRSFIA, TNFRSFIB, TNFRSF21, TNFRSF5, TNFRSF6 (Fas), TNFRSF7, TNFRSF8, TNFRSF9, TNFSFIO (TRAIL), TNFSFI 1 (TRANCE), TNFSF12 (AP03L), TNFSF13 (April), TNFSF13B, TNFSF14 (HVEM-L), TNFSF15 (VEGI), TNFSF 18, TNFSF4 (ligando de OX40), TNFSF5 (ligando de CD40), TNFSF6 (FasL), TNFSF7 (ligando de CD27), TNFSF8 (ligando de CD30), TNFSF9 (ligando de 4-1BB), TOLLIP, receptores tipo Toll, TLR2, TLR4, TLR9, T0P2A (topoisomerasa lia), TP53, TPMI, TPM2, TRADD, TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF4, TRAF5, TRAF6, TRKA, TREM1, TREM2, TRPC6, TROY, TSLP, TWEAK, Tirosinasa, uPAR, VEGF, VEGFB, VEGFC, versicán, VHL C5, VLA-4, Wnt-1, XCL1 (linfotactina), XCL2 (SCM-Ib), XCRI (GPR5 / CCXCRI), YYI y ZFPM2.

Modificación adicional de la región Fc

La divulgación también proporciona un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética que puede modificarse aún más. Se sabe que las variantes de la región Fc, por ejemplo, sustituciones, inserciones y/o adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos, mejoran o disminuyen la función efectora. Véanse, por ejemplo, Presta et al, 2002, Biochem. Soc. Trans. 30:487-490; Strohl, 2009, Curr. Opin. Biotechnol. 20(6):685-691; Patentes de EE.UU. 5.624.821; 5.648.260; 5.885.573; 6.737.056; 7.317.091; Publicaciones PCT N.º WO 99/58572, WO 00/42072, WO 04/029207, WO 2006/105338, WO 2008/022152, WO 2008/150494, WO 2010/033736; Publicaciones de Solicitudes de Patente de EE.UU. N.º 2004/0132101, 2006/0024298, 2006/0121032, 2006/0235208, 2007/0148170; Armour et al., 1999, Eur. J. Immunol. 29(8):2613-2624 (ADCC y CDC reducidos); Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. 276(9):6591-6604 (ADCC y CDC reducidos); Idusogie et al., 2000, J. Immunol. 164(8):4178-4184 (ADCC y CDC aumentados); Steurer et al., 1995, J. Immunol. 155(3):1165-1174 (ADCC y CDC reducidos); Idusogie et al., 2001, J. Immunol. 166(4):2571-2575 (ADCC y CDC aumentados); Lazar et al., 2006, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 103(11): 4005-4010 (ADCC aumentado); Ryan et al., 2007, Mol. Cancer. Ther., 6: 3009-3018 (ADCC aumentado); Richards et al., 2008, Mol. Cancer Ther. 7(8):2517-2527.

En una realización, el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética exhibe un nivel similar de función efectora inductora en comparación con el polipéptido Fc de tipo silvestre nativo. En otra realización, el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética exhibe una mayor inducción de la función efectora en comparación con el Fc nativo. En otra realización, el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética exhibe una menor inducción de la función efectora en comparación con el Fc nativo. En otra realización, el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética exhibe una mayor inducción de ADCC en comparación con el Fc nativo. En otra realización, el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética exhibe una menor inducción de ADCC en comparación con el Fc nativo. En otra realización, el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética exhibe una mayor inducción de CDC en comparación con el Fc nativo. En otra realización, el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética exhibe una menor inducción de CDC en comparación con el Fc nativo. Más abajo se detallan realizaciones específicas de polipéptidos Fc modificados por ingeniería genética modificados adicionalmente para afectar la función efectora.

La presente divulgación abarca proteínas Fc modificadas por ingeniería genética que además comprenden propiedades de unión alteradas por un ligando Fc (por ejemplo, un receptor Fc, Clq y similares) con respecto a una molécula de referencia (por ejemplo, una proteína que tiene la misma secuencia de aminoácidos excepto que tiene un polipéptido Fc de tipo silvestre nativo). Los ejemplos de propiedades de unión incluyen pero no se limitan a, especificidad de unión, constante de disociación de equilibrio (K_D), tasas de disociación y asociación (K_{off} y K_{on} , respectivamente), afinidad de unión y/o aidez. Se entiende generalmente que una molécula de unión (por ejemplo, una proteína variante Fc tal como un anticuerpo) con una K_D baja puede ser preferible a una molécula de unión con

una K_D alta. Sin embargo, en algunos casos, el valor de k_{on} o k_{off} puede ser más relevante que el valor de K_D . Un experto en la materia puede determinar qué parámetro cinético es más importante para una aplicación de anticuerpo determinada.

- 5 Las afinidades y las propiedades de unión de un polipéptido Fc por su ligando pueden determinarse mediante una diversidad de métodos de ensayo *in vitro* (ensayos bioquímicos o inmunológicos) conocidos en la técnica para determinar interacciones Fc-FcγR, es decir, unión específica de un polipéptido Fc a un FcγR incluyendo pero no limitado a, métodos de equilibrio (por ejemplo, ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) o radioinmunoensayo (RIA)) o cinética (por ejemplo, análisis BIACORE®, OCTET®, FortéBio, Menlo Park, CA) y otros métodos tales como
- 10 ensayos de unión indirecta, ensayos de inhibición competitiva, transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), electroforesis en gel y cromatografía (por ejemplo, filtración en gel). Estos y otros métodos pueden usar un marcador en uno o más de los componentes que se están examinando y/o emplear una diversidad de métodos de detección incluyendo pero no limitado a marcadores cromogénicos, fluorescentes, luminiscentes o isotópicos. Una descripción detallada de las afinidades de unión y puede encontrarse en Paul, W.E., ed., *Fundamental Immunology*, 4ª ed. (Lippincott-Raven, Filadelfia, 1999), que se centra en las interacciones anticuerpo-inmunógeno.

En una realización, el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética comprende una mutación adicional y exhibe una unión mejorada a uno o más ligandos Fc en relación con una molécula Fc modificada por ingeniería genética comparable sin la mutación adicional en comparación con el Fc no modificado de tipo silvestre. En otra realización, la

20 proteína variante Fc modificada por ingeniería genética tiene una afinidad por un ligando Fc que es al menos 2 veces, o al menos 3 veces, o al menos 5 veces, o al menos 7 veces, o al menos 10 veces, o al menos 20 veces, o al menos 30 veces, o al menos 40 veces, o al menos 50 veces, o al menos 60 veces, o al menos 70 veces, o al menos 80 veces, o al menos 90 veces, o al menos 100 veces, o al menos 200 veces mayor que un Fc modificado por ingeniería genética comparable sin la mutación adicional. En una realización específica, la proteína variante Fc modificada por ingeniería

25 genética tiene una unión mejorada a un receptor Fc. En otra realización específica, la proteína variante Fc tiene una unión mejorada al receptor Fc FcγRIIIA. En una realización específica adicional, la proteína variante Fc tiene una unión mejorada al receptor Fc FcγRIIB. En otra realización más específica, la proteína variante Fc tiene una unión mejorada al receptor Fc FcRn. En otra realización específica más, la proteína variante Fc tiene una unión mejorada a Clq en relación con una molécula Fc comparable que carece de las mutaciones (por ejemplo, Fc precursor de tipo silvestre).

Puede ensayarse la capacidad de cualquier proteína variante Fc modificada por ingeniería genética en particular para mediar la lisis de la célula diana por ADCC. Para evaluar la actividad de ADCC se añade una proteína variante Fc modificada por ingeniería genética de interés a las células diana en combinación con células inmunoefectoras, que pueden activarse por los complejos antígeno-anticuerpo dando como resultado la citólisis de la célula diana. La citólisis

35 generalmente se detecta mediante la liberación de un marcador (por ejemplo, sustratos radiactivos, tintes fluorescentes o proteínas intracelulares naturales) de las células lisadas. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) y linfocitos citotóxicos naturales (NK). Los ejemplos específicos de ensayos ADCC *in vitro* se describen en Wisecarver *et al.*, 1985, *J. Immunol. Methods* 79(2):277-282; Bruggemann *et al.*, 1987, *J. Exp. Med.* 166:1351-1361; Wilkinson *et al.*, 2001, *J. Immunol. Methods* 258:183-191; Patel *et al.*, 1995, *J. Immunol. Methods* 184:29-38. La actividad ADCC de la proteína variante Fc modificada por ingeniería genética de interés también puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes *et al.*, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 95:652-656.

En una realización, una proteína variante Fc modificada por ingeniería genética tiene una actividad ADCC mejorada en relación con una molécula comparable (por ejemplo, un Fc natural de tipo silvestre sin ninguna mutación y/o un Fc modificado por ingeniería genética sin ninguna modificación adicional). En una realización específica, una proteína variante Fc tiene una actividad ADCC que es al menos 2 veces, o al menos 3 veces, o al menos 5 veces, o al menos 10 veces, o al menos 50 veces, o al menos 100 veces mayor que la de una molécula comparable. En otra realización específica, una proteína variante Fc tiene unión mejorada al receptor Fc FcγRIIIA y tiene actividad ADCC mejorada en

50 relación con una molécula comparable. En otras realizaciones, la proteína variante Fc tiene tanto una actividad ADCC mejorada como una semivida en suero mejorada en relación con una molécula comparable.

En una realización, una proteína variante Fc modificada por ingeniería genética tiene una actividad ADCC reducida en relación con una molécula comparable (por ejemplo, un Fc natural de tipo silvestre sin ninguna mutación y/o un Fc modificado por ingeniería genética sin ninguna modificación adicional). En una realización específica, una proteína variante Fc modificada por ingeniería genética tiene una actividad ADCC que es al menos 2 veces, o al menos 3 veces, o al menos 5 veces, o al menos 10 veces, o al menos 50 veces, o al menos 100 veces menor que la de una molécula comparable. En otra realización específica, una proteína variante Fc modificada por ingeniería genética tiene unión reducida al receptor Fc FcγRIIIA y tiene actividad ADCC reducida en relación con una molécula comparable. En otras

60 realizaciones, la proteína variante Fc modificada por ingeniería genética tiene tanto una actividad ADCC reducida como una semivida en suero mejorada en relación con una molécula comparable.

En una realización, una proteína variante Fc modificada por ingeniería genética tiene una actividad CDC mejorada en relación con una molécula comparable (por ejemplo, un Fc natural de tipo silvestre sin ninguna mutación y/o un Fc modificado por ingeniería genética sin ninguna modificación adicional). En una realización específica, una proteína variante Fc tiene una actividad CDC que es al menos 2 veces, o al menos 3 veces, o al menos 5 veces, o al menos

10 veces, o al menos 50 veces, o al menos 100 veces mayor que la de una molécula comparable. En otras realizaciones, la proteína variante Fc modificada por ingeniería genética tiene tanto una actividad CDC mejorada como una semivida en suero mejorada en relación con una molécula comparable. En una realización, la proteína variante Fc modificada por ingeniería genética tiene una unión reducida a uno o más ligandos Fc en relación con una molécula comparable. En otra realización, la proteína variante Fc modificada por ingeniería genética tiene una afinidad por un ligando Fc que es al menos 2 veces, o al menos 3 veces, o al menos 5 veces, o al menos 7 veces, o al menos 10 veces, o al menos 20 veces, o al menos 30 veces, o al menos 40 veces, o al menos 50 veces, o al menos 60 veces, o al menos 70 veces, o al menos 80 veces, o al menos 90 veces, o al menos 100 veces, o al menos 200 veces menor que la de una molécula comparable. En una realización específica, la proteína variante Fc modificada por ingeniería genética tiene una unión reducida a un receptor Fc. En otra realización específica, la proteína variante Fc modificada por ingeniería genética tiene una unión reducida al receptor Fc FcγRIIIA. En una realización específica adicional, una variante Fc modificada por ingeniería genética descrita en el presente documento tiene una afinidad por el receptor Fc FcγRIIIA que es al menos aproximadamente 5 veces menor que la de una molécula comparable, en donde dicha variante Fc modificada por ingeniería genética tiene una afinidad por el receptor Fc FcγRIIB que es aproximadamente 2 veces la de una molécula comparable. En otra realización más específica, la proteína variante Fc modificada por ingeniería genética tiene una unión reducida al receptor Fc FcRn. En otra realización específica más, la proteína variante Fc modificada por ingeniería genética tiene una unión reducida a Clq en relación con una molécula comparable.

Además de la modificación de la secuencia de aminoácidos, también se sabe que la glucosilación de un polipéptido Fc puede modificarse para aumentar o disminuir la función efectora (véanse, por ejemplo, Umaña *et al.*, 1999, Nat. Biotechnol. 17:176-180; Davies *et al.*, 2001, Biotechnol. Bioeng. 74:288-294; Shields *et al.*, 2002, J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Shinkawa *et al.*, 2003, J. Biol. Chem. 278:3466-3473; Pat. de EE.UU. N.º 6.602.684; Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 2003/0157108; Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 2003/0003097; Publicación de Patente Internacional N.º WO 00/61739A1; WO 01/292246A1; WO 02/311140A1; y WO 02/30954A1; tecnología Pottilegent™ (Biowa, Inc. Princeton, N.J.); tecnología de modificación por ingeniería genética de glucosilación GlycoMab™ (GLYCART biotechnology AG, Zúrich, Suiza).

En consecuencia, en una realización, los polipéptidos Fc modificados por ingeniería genética de anticuerpos y proteínas de fusión de la divulgación pueden comprender una glucosilación alterada de restos de aminoácidos. En otra realización, la glucosilación alterada de los restos de aminoácidos da como resultado una función efectora disminuida. En otra realización, la glucosilación alterada de los restos de aminoácidos da como resultado una función efectora aumentada. En una realización específica, el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética tiene fucosilación reducida. En otra realización, el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética está afucosilado (véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 2005/0226867).

En otras realizaciones, donde el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética comprende un resto de aminoácido lisina (K) C-terminal (por ejemplo, la cadena pesada de IgG1 humana comprende una lisina terminal), un experto en la materia comprendería que el resto de lisina puede recortarse dando como resultado una proteína de fusión que carece del resto de lisina C-terminal. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el anticuerpo o la proteína de fusión Fc que comprende un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética comprende un polipéptido donde la lisina terminal que de otro modo estaría presente no está presente.

En otras realizaciones, el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende una sustitución del aminoácido de origen natural en la posición 297 en donde dicha sustitución reduce y/o anula de manera detectable la glucosilación en la posición 297. En realizaciones específicas, el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación comprende una sustitución de cisteína por asparagina en la posición 297 de la cadena pesada del anticuerpo. En otras realizaciones más, la divulgación proporciona anticuerpos que carecen de glucosilación en la posición 297 de la cadena pesada del anticuerpo. En cada una de estas, el sistema de numeración de la región constante es aquel del índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63(1):78-85.

La adición de ácido siálico a los oligosacáridos sobre las moléculas de IgG potencia su actividad antiinflamatoria y altera su citotoxicidad (Keneko *et al.*, 2006, Science 313:670-673, Scallan *et al.*, 2007, Mol. Immunol. 44(7):1524-1534). Por lo tanto, la eficacia de las opciones terapéuticas n anticuerpos puede optimizarse mediante la selección de una glucoforma adecuada a la aplicación prevista. Las dos cadenas de oligosacáridos interpuestas entre los dos dominios CH2 de los anticuerpos están implicadas en la unión del polipéptido Fc a sus receptores. Los estudios mencionados anteriormente demuestran que las moléculas de IgG con mayor sialilación tienen propiedades antiinflamatorias, mientras que las moléculas de IgG con menor sialilación tienen mayores propiedades inmunoestimulantes. Por lo tanto, un anticuerpo terapéutico que comprende un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación puede modificarse con un perfil de sialilación apropiado para una aplicación particular. En los documentos WO2007/005786 y WO2007/117505 se presentan métodos para modular el estado de sialilación de los anticuerpos.

También se sabe en la técnica que la región Fc puede modificarse para aumentar la semivida de las proteínas. El aumento de la semivida permite reducir la cantidad de medicamento dado a un paciente, así como reducir la frecuencia de administración. En consecuencia, los anticuerpos de la divulgación con semividas aumentadas pueden generarse modificando (por ejemplo, sustituyendo, eliminando o añadiendo) restos de aminoácidos identificados como implicados

en la interacción entre el Fc y el receptor FcRn (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT N.º WO 97/34631 y WO 02/060919, Hinton *et al.*, 2004, J. Biol. Chem. 279(8):6213-6216, Vaccaro *et al.*, 2005, Nat. Biotechnol. 23(10):1283-1288.

5 Además, la semivida de los anticuerpos y las proteínas de fusión de la divulgación puede aumentarse mediante conjugación con un biopolímero (por ejemplo, polietilenglicol (PEG), albúmina, almidón hidroxietilado (HES), almidón hidroxialquilado, XTEN (Amunix, Inc.), mediante técnicas ampliamente utilizadas en la técnica. En algunas realizaciones los polipéptidos Fc modificados por ingeniería genética de los anticuerpos de la divulgación comprenden un aumento en la semivida de aproximadamente el 5 por ciento, aproximadamente el 10 por ciento, aproximadamente el 15 por ciento, aproximadamente el 20 por ciento, aproximadamente el 25 por ciento, aproximadamente el 30 por ciento, aproximadamente el 35 por ciento, aproximadamente el 40 por ciento, aproximadamente el 45 por ciento, aproximadamente el 50 por ciento, aproximadamente el 55 por ciento, aproximadamente el 60 por ciento, aproximadamente el 65 por ciento, aproximadamente el 70 por ciento, aproximadamente el 75 por ciento, aproximadamente el 80 por ciento, aproximadamente el 85 por ciento, aproximadamente el 90 por ciento, aproximadamente el 95 por ciento, aproximadamente el 100 por ciento, aproximadamente el 125 por ciento, aproximadamente el 150 por ciento o más en comparación con un polipéptido Fc no modificado de tipo silvestre de referencia. En algunas realizaciones, los polipéptidos Fc modificados por ingeniería genética de los anticuerpos de la divulgación comprenden un aumento en la semivida de aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10 veces, aproximadamente 20 veces, aproximadamente 50 veces o más en comparación con un polipéptido Fc de referencia no modificado.

En una realización alternativa, los polipéptidos Fc modificados por ingeniería genética de anticuerpos y proteínas de fusión Fc de la divulgación comprenden una disminución en la semivida. En algunas realizaciones los polipéptidos Fc modificados por ingeniería genética de los anticuerpos de la divulgación comprenden una disminución en la semivida de aproximadamente el 5 por ciento, aproximadamente el 10 por ciento, aproximadamente el 15 por ciento, aproximadamente el 20 por ciento, aproximadamente el 25 por ciento, aproximadamente el 30 por ciento, aproximadamente el 35 por ciento, aproximadamente el 40 por ciento, aproximadamente el 45 por ciento, aproximadamente el 50 por ciento, aproximadamente el 55 por ciento, aproximadamente el 60 por ciento, aproximadamente el 65 por ciento, aproximadamente el 70 por ciento, aproximadamente el 75 por ciento, aproximadamente el 80 por ciento, aproximadamente el 85 por ciento, aproximadamente el 90 por ciento, aproximadamente el 95 por ciento, aproximadamente el 100 por ciento, aproximadamente el 125 por ciento, aproximadamente el 150 por ciento o más en comparación con un polipéptido Fc no modificado de referencia. En algunas realizaciones, los polipéptidos Fc modificados por ingeniería genética de los anticuerpos de la divulgación comprenden una disminución en la semivida de aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10 veces, aproximadamente 20 veces, aproximadamente 50 veces o más en comparación con un polipéptido Fc de referencia no modificado.

En una realización, la presente divulgación proporciona variantes de Fc, en donde el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética comprende además un resto de aminoácido que no es de origen natural además de o distinto de, las sustituciones divulgadas anteriormente en una o más posiciones elegidas de 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 251, 252, 254, 255, 256, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 279, 280, 284, 292, 296, 297, 298, 299, 305, 313, 316, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 339, 341, 343, 370, 373, 378, 392, 416, 419, 421, 440 y 443 como se numera por el índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85; . Opcionalmente, el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética puede comprender un resto de aminoácido adicional no de origen natural en posiciones adicionales y/o alternativas conocidas por un experto en la materia (véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. 5.624.821, 6.277.375, 6.737.056, 7.217.797, Publicación de Patente de EE.UU. N.º US2007/0135620; Publicaciones de Patente PCT N.º WO 01/58957; WO 02/06919; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752; WO 04/074455; WO 04/099249; WO 04/063351; WO 05/070963; WO 05/040217, WO 05/092925 y WO 06/020114).

En una realización específica, la presente divulgación proporciona un anticuerpo variante Fc modificado por ingeniería genética, en donde el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética comprende al menos una modificación, por ejemplo, sustituciones de aminoácidos, inserciones de aminoácidos, eliminaciones de aminoácidos, adiciones de aminoácidos) en una o más posiciones elegidas de 234, 235, 237 y 331. En una realización, los aminoácidos de origen no natural se eligen de 234F, 235F, 235Y e 331S. En una realización, los aminoácidos de origen no natural se eligen de 234A, 235A y 237A. En otra realización específica, la presente divulgación proporciona una variante Fc modificada por ingeniería genética, en donde el polipéptido Fc comprende al menos un aminoácido de origen no natural en una o más posiciones elegidas de 239, 330 y 332. En una realización, los aminoácidos de origen no natural se seleccionan del grupo elegido de 239D, 330L y 332E.

En una realización específica, la presente divulgación proporciona un anticuerpo variante Fc modificado por ingeniería genética, en donde el polipéptido Fc comprende al menos un aminoácido de origen no natural en una o más posiciones elegidas de 252, 254 y 256. En una realización, los aminoácidos de origen no natural se seleccionan del grupo elegido de 252Y, 254T y 256E (denominados la "modificación YTE"), como se describe en Dall'Acqua *et al.*, 2006, J. Biol. Chem. 281:23514-23524 y en la Patente de EE.UU. N.º 7.083.784.

En otras realizaciones, la variante Fc modificada por ingeniería genética comprende un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada de una sustitución en la posición 246, 249, 254, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 284, 287, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 360, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 390, 392, 393, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 443 y 444 usando el índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85; (anteriormente citado) y que comprende además al menos un aminoácido de origen no natural en una o más posiciones elegidas de 428 y 434. En una realización, las sustituciones de aminoácidos adicionales comprenden 428L y 434S como se describe en la Publicación de Patente Internacional N.º WO 2009/086320.

En otras realizaciones, los anticuerpos variantes modificados por ingeniería genética de la divulgación pueden comprender además al menos uno o más aminoácidos de cisteína que no se producen de forma natural en la región 131-139 del dominio CH1 de un anticuerpo. En algunas realizaciones, los anticuerpos modificados por ingeniería genética de la divulgación comprenden al menos una sustitución en posiciones seleccionadas de: 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138 y 139 del dominio CH1 de un anticuerpo, en donde el sistema de numeración de la región constante es aquel del índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85; .

Métodos de producción de anticuerpos

El polipéptido de dominio constante (Fc, Ck y Cλ) modificado por ingeniería genética de la divulgación y un anticuerpo, Fab y F(ab')₂ que comprende el polipéptido modificado por ingeniería genética puede producirse mediante cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, Fab y F(ab')₂, en particular, mediante síntesis química o preferentemente, mediante técnicas de expresión recombinante.

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales usando una gran diversidad de técnicas conocidas en la materia incluyendo el uso de hibridoma, tecnologías recombinantes y de presentación en fagos o una combinación de las mismas. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos monoclonales usando técnicas de hibridoma incluyendo aquellas conocidas en la técnica y enseñadas, por ejemplo, en Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling, *et al.*, en: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981). La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento no se limita a anticuerpos producidos a través de la tecnología de hibridoma. La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que procede de un solo clon, incluyendo cualquier clon eucariota, procariota o fágico, y no el método mediante el cual se produce.

Los métodos para producir y explorar anticuerpos específicos usando tecnología de hibridoma son habituales y bien conocidos en la técnica. Resumiendo, los ratones pueden inmunizarse con un antígeno diana (ya sea la proteína de longitud completa o un dominio de la misma, por ejemplo, el dominio extracelular o el dominio de unión del ligando) y una vez que se detecta una respuesta inmunitaria, por ejemplo, se detectan anticuerpos específicos para el antígeno diana en el suero del ratón, se recoge el bazo del ratón y se aíslan los esplenocitos. A continuación se fusionan los esplenocitos mediante técnicas bien conocidas a cualquier célula de mieloma adecuada, por ejemplo, células de la línea celular SP20 disponibles de la ATCC. Los hibridomas se seleccionan y se clonan mediante dilución limitada. A continuación se someten a ensayo los clones de hibridoma mediante métodos conocidos en la técnica para células que secretan anticuerpos capaces de unirse a un polipéptido de la divulgación. El fluido de ascitis, que generalmente contiene altos niveles de anticuerpos, puede generarse inmunizando ratones con clones de hibridoma positivos.

En consecuencia, los anticuerpos monoclonales pueden generarse cultivando una célula de hibridoma que secreta un anticuerpo de la divulgación en donde, preferentemente, el hibridoma se genera fusionando esplenocitos aislados de un ratón inmunizado con un antígeno diana con células de mieloma y a continuación analizando los hibridomas resultantes de la fusión en busca de clones de hibridoma que secretan un anticuerpo capaz de unirse a un antígeno diana específico.

Los fragmentos de anticuerpos que reconocen epítomos de antígenos diana específicos pueden generarse mediante cualquier técnica conocida por aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, los fragmentos Fab y F(ab')₂ de la divulgación pueden producirse mediante escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). Los fragmentos F(ab')₂ contienen la región variable, la región constante de la cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada. Además, los anticuerpos de la presente divulgación también pueden generarse usando diversos métodos de presentación en fagos conocidos en la técnica.

En los métodos de presentación en fagos, se presentan dominios de anticuerpo funcionales sobre la superficie de partículas de fago que portan las secuencias de polinucleótido que los codifican. En particular, las secuencias de ADN que codifican los dominios VH y VL se amplifican a partir de bibliotecas de ADNc animales (por ejemplo, bibliotecas de ADNc humanas o murinas de tejidos linfoides). El ADN que codifica los dominios VH y VL se recombina junto con un enlazador scFv mediante PCR y se clona en un vector fagémido (por ejemplo, pCANTAB6 o pComb3 HSS). El vector se electropora en *E. coli* y la *E. coli* se infecta con el fago auxiliar. Los fagos usados en estos métodos son normalmente fagos filamentosos que incluyen fd y M 13, y los dominios VH y VL suelen estar fusionados de forma

recombinante al gen III o al gen VIII del fago. Los fagos que expresan un dominio de unión a antígeno que se une a un epítipo de interés pueden seleccionarse o identificarse con antígeno, por ejemplo, usando antígeno marcado o antígeno unido o capturado sobre una superficie sólida o una perla. Los ejemplos de métodos de presentación en fagos que pueden usarse para producir los anticuerpos de la presente divulgación incluyen aquellos divulgados en Brinkmann *et al.*, 1995, J. Immunol. Methods 182:41-50; Ames *et al.*, 1995, J. Immunol. Methods 184:177; Kettleborough *et al.*, 1994, Eur. J. Immunol. 24:952-958; Persic *et al.*, 1997, Gene 187:9; Burton *et al.*, 1994, Advances in Immunology 57:191-280; Publicación Internacional N.º WO 92/01047, WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/1 1236, WO 95/15982, WO 95/20401 y WO97/13844; y las Patentes de EE.UU. N.º 5.698.426, 5.223.409, 5.403.484, 5.580.717, 5.427.908, 5.750.753, 5.821.047, 5.571.698, 5.427.908, 5.516.637, 5.780.225, 5.658.727, 5.733.743 y 5.969.108.

Como se describe en las referencias anteriores, después de la selección en fagos, las regiones codificantes de anticuerpo del fago pueden aislarse y usarse para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos, o cualquier otro fragmento de unión a antígeno deseado, y pueden expresarse en cualquier hospedador deseado, incluyendo células de mamífero, células de insecto, células vegetales, levaduras y bacterias, por ejemplo, como se describe a continuación. Las técnicas para producir de manera recombinante fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ también pueden emplearse usando métodos conocidos en la técnica tales como aquellos divulgados en la Publicación Internacional N.º WO 92/22324; Mullinax *et al.*, 1992, BioTechniques 12:864; Sawai *et al.*, 1995, AJRI 34:26; y Better *et al.*, 1988, Science 240:1041.

Para generar anticuerpos completos, pueden usarse cebadores de PCR que incluyen secuencias de nucleótidos VH o VL, un sitio de restricción y una secuencia flanqueante para proteger el sitio de restricción para amplificar las secuencias VH o VL en clones scFv. Utilizando técnicas de clonación conocidas por aquellos expertos en la materia, los dominios VH amplificados por PCR pueden clonarse en vectores que expresan una región constante VH, por ejemplo, la región constante γ 1 humana y los dominios VL amplificados por PCR pueden clonarse en vectores que expresan una región constante VL, por ejemplo, regiones constantes kappa o lambda humanas. Preferentemente, los vectores para expresar los dominios VH o VL comprenden un promotor EF-1 α , una señal de secreción, un sitio de clonación para el dominio variable, dominios constantes y un marcador de selección tal como neomicina. Los dominios VH y VL también pueden clonarse en un vector que exprese las regiones constantes necesarias. Los vectores de conversión de cadena pesada y los vectores de conversión de cadena ligera se cotransfectan a continuación en líneas celulares para generar líneas celulares estables o transitorias que expresan anticuerpos de longitud completa, por ejemplo, IgG, usando técnicas conocidas por aquellos expertos en la materia.

Para algunos usos, incluyendo el uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos y ensayos de detección *in vitro*, puede ser preferible usar anticuerpos humanos o quiméricos. Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de sujetos humanos. Los anticuerpos humanos pueden prepararse mediante una diversidad de métodos conocidos en la técnica incluyendo métodos de presentación en fagos descritos anteriormente usando bibliotecas de anticuerpos procedentes de secuencias de inmunoglobulinas humanas. Véanse también las Patentes de EE.UU. N.º 4.444.887 y 4.716.111; y las Publicaciones Internacionales N.º WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741.

También pueden producirse anticuerpos humanos usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, los complejos de genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera humana pueden introducirse aleatoriamente o mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. Como alternativa, la región variable humana, la región constante y la región de diversidad pueden introducirse en células madre embrionarias de ratón además de los genes humanos de cadena pesada y ligera. Los genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera de ratón pueden volverse no funcionales por separado o simultáneamente con la introducción de locus de inmunoglobulina humana mediante recombinación homóloga. En particular, la eliminación homocigótica de la región JH impide la producción de anticuerpos endógenos. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y se microinyectan en blastocistos para producir ratones quiméricos. A continuación, los ratones quiméricos se cruzan para producir una descendencia homocigota que expresa anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan de manera normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, todo o parte de un polipéptido de la divulgación. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno pueden obtenerse de los ratones inmunizados transgénicos usando tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana hospedados por los ratones transgénicos se reordenan durante la diferenciación de los linfocitos B y experimentan posteriormente cambio de clase y mutación somática. Por lo tanto, usando una técnica tal, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una visión general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar, 1995, Rev. Immunol. 13:65-93. Para un análisis detallado sobre esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y los protocolos para producir dichos anticuerpos, véase, por ejemplo, Publicación Internacional N.º WO 98/24893, WO 96/34096 y WO 96/33735; y las Patentes de EE.UU. N.º 5.413.923, 5.625.126, 5.633.425, 5.569.825, 5.661.016, 5.545.806, 5.814.318 y 5.939.598. Además, pueden contratarse empresas tales como Medarex (Princeton, NJ) para que proporcionen anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando una tecnología similar a la descrita anteriormente.

Un anticuerpo quimérico es una molécula en donde diferentes porciones del anticuerpo derivan de diferentes

moléculas de inmunoglobulina tales como anticuerpos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo no humano y una región constante de inmunoglobulina humana. Se conocen en la técnica métodos para producir anticuerpos quiméricos. Véanse, por ejemplo, Morrison, 1985, *Science* 229:1202; Oi et al, 1986, *BioTechniques* 4:214; Gillies *et al.*, 1989, *J. Immunol. Methods* 125:191-202; y las patentes de EE.UU. N.º 6.311.415, 5.807.715, 4.816.567 y 4.816.397. Los anticuerpos quiméricos que comprenden una o más CDR de una especie no humana y regiones marco de una molécula de inmunoglobulina humana pueden producirse usando una diversidad de técnicas conocidas en la técnica incluyendo, por ejemplo, injerto de CDR (documento EP 0 239 400; Publicación Internacional N.º WO 91/09967; y patentes de EE.UU. N.º 5.225.539, 5.530.101 y 5.585.089), recubrimiento o revestimiento (documento EP 0 592 106; documento EP 0 519 596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498; Studnicka *et al.*, 1994, *Protein Engineering* 7:805; y Roguska *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 91:969) y mezcla de cadenas (Patente de EE.UU. N.º 5.565.332).

Los restos estructurales de las regiones marco se sustituyen normalmente por el resto correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, preferentemente mejorar, la unión a antígeno. Estas sustituciones del marco se identifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante modelado de las interacciones de los restos de CDR y estructurales para identificar los restos marco importantes para la unión a antígeno y comparación de secuencias para identificar restos marco inusuales en posiciones determinadas. (Véanse, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.º 5.585.089; y Riechmann *et al.*, 1988, *Nature* 332:323).

Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo o su variante o fragmento del mismo que es capaz de unirse a un antígeno predeterminado y que comprende una región marco que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana y una CDR que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina no humana. Un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente la totalidad de al menos uno y normalmente dos, dominios variables en los cuales todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana (es decir, anticuerpo donante) y todas o sustancialmente todas las regiones marco son aquellas de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. Preferentemente, un anticuerpo humanizado también comprende al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Habitualmente, el anticuerpo contendrá tanto la cadena ligera, así como al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3 y CH4 (para los isotipos IgA e IgM) de la cadena pesada. El anticuerpo humanizado puede seleccionarse de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE y cualquier isotipo, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Generalmente, el dominio constante es un dominio constante de fijación del complemento donde se desea que el anticuerpo humanizado muestre actividad citotóxica y la clase es normalmente IgG1 humana. Cuando dicha actividad citotóxica no sea deseable, el dominio constante puede ser de la clase IgG2 humana. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo, y la selección de dominios constantes particulares para optimizar las funciones efectoras deseadas está dentro de la habilidad habitual en la técnica. Las regiones marco y CDR de un anticuerpo humanizado no necesitan corresponder exactamente a las secuencias precursoras, por ejemplo, la CDR o el marco consenso donante pueden mutagenizarse mediante sustitución, inserción o eliminación de al menos un resto de tal manera que el resto de la CDR o el marco en el sitio no corresponde con el consenso o bien el anticuerpo importado. Dichas mutaciones, sin embargo, no serán extensas. Habitualmente, al menos el 75 por ciento de los restos de anticuerpos humanizados corresponderán a los de la región marco (FR) precursora y las secuencias CDR, más a menudo el 90 por ciento, o incluso más del 95 por ciento.

Los anticuerpos humanizados pueden producirse usando una diversidad de técnicas conocidas en la técnica, incluyendo pero no limitado a, injerto de CDR (Patente europea N.º EP 0 239 400; Publicación Internacional N.º WO 91/09967; y Patentes de EE.UU. N.º 5.225.539, 5.530.101 y 5.585.089), recubrimiento o revestimiento (Patentes europeas N.º EP 0 592 106 y EP 0 519 596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498; Studnicka *et al.*, 1994, *Protein Engineering* 7(6):805-814; y Roguska *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 91:969-973), mezcla de cadenas (patente de EE.UU. N.º 5.565.332) y técnicas divulgadas en, por ejemplo, Patentes de EE.UU. N.º 6.407.213; 5.766.886; 5.585.089, Publicación Internacional N.º WO 93/17105, Tan *et al.*, 2002, *J. Immunol.* 169: 1119-25, Caldas *et al.*, 2000, *Protein Eng.* 13:353-360, Morea *et al.*, 2000, *Methods* 20:267-279, Baca *et al.*, 1997, *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684, Roguska *et al.*, 1996, *Protein Eng.* 9:895-904, Couto *et al.*, 1995, *Cancer Res.* 55(23 Sup):5973s-5977s, Couto *et al.*, 1995, *Cancer Res.* 55:1717-1722, Sandhu, 1994, *Gene* 150:409-410, Pedersen *et al.*, 1994, *J. Mol. Biol.* 235:959-973, Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321:522-525, Riechmann *et al.*, 1988, *Nature* 332:323 y Presta, 1992, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596. Con frecuencia, los restos estructurales de las regiones marco serán sustituidos por el resto correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, preferentemente mejorar, la unión a antígeno. Estas sustituciones del marco se identifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante modelado de las interacciones de los restos de CDR y estructurales para identificar los restos marco importantes para la unión a antígeno y comparación de secuencias para identificar restos marco inusuales en posiciones determinadas. (Véanse, por ejemplo, Queen *et al.*, la Patente de EE.UU. N.º 5.585.089; y Riechmann *et al.*, 1988, *Nature* 332:323).

Además, los anticuerpos de la divulgación pueden, a su vez, utilizarse para generar anticuerpos antiidiotipo usando técnicas bien conocidas por aquellos expertos en la materia. (Véanse, por ejemplo, Greenspan y Bona, 1989, *FASEB J.* 7:437-444; y Nissinoff, 1991, *J. Immunol.* 147:2429-2438). La divulgación proporciona métodos que emplean el uso de polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo de la divulgación o un

fragmento del mismo.

Adicionalmente, diversas publicaciones describen métodos para obtener moléculas fisiológicamente activas cuyas semividas se modifican ya sea introduciendo un polipéptido de unión a FcRn en las moléculas (documento WO 97/43316; Pat. de EE.UU. N.º 5.869.046; Pat. de EE.UU. N.º 5.747.035; WO 96/32478; documento WO 91/14438) o fusionando las moléculas con anticuerpos cuyas afinidades de unión a FcRn se conservan pero las afinidades por otros receptores Fc se han reducido en gran medida (documento WO 99/43713) o fusionando con dominios de unión a FcRn de anticuerpos (documento WO 00/09560; Pat. de EE.UU. N.º 4.703.039). También pueden encontrarse técnicas y métodos específicos para aumentar la semivida de moléculas fisiológicamente activas en la patente de EE.UU. N.º 7.083.784. Específicamente, se contempla que los anticuerpos de la divulgación comprendan un polipéptido Fc que comprenda mutaciones de restos de aminoácidos (según la numeración del índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85;): M252Y/S254T/T256E o H433K/N434F/Y436H.

Polinucleótidos que codifican un anticuerpo

Los polinucleótidos pueden obtenerse y la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos determinarse, mediante cualquier método conocido en la técnica. Dado que se conocen las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos, las secuencias de nucleótidos que codifican estos anticuerpos pueden determinarse usando métodos bien conocidos en la técnica, es decir, los codones de nucleótidos que se sabe que codifican aminoácidos particulares se ensamblan de una manera tal para generar un ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento del mismo de la divulgación. Un polinucleótido de este tipo que codifica el anticuerpo puede ensamblarse a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente (por ejemplo, como se describe en Kutmeier *et al.*, 1994, BioTechniques 17:242), que, brevemente, implica la síntesis de oligonucleótidos superpuestos que contienen porciones de la secuencia que codifica el anticuerpo, hibridar y ligar dichos oligonucleótidos y a continuación la amplificación de los oligonucleótidos ligados mediante PCR.

Como alternativa, puede generarse un polinucleótido que codifica un anticuerpo a partir de ácido nucleico de una fuente adecuada. Si no se encuentra disponible un clon que contenga un ácido nucleico que codifique un anticuerpo particular, pero se conoce la secuencia del anticuerpo, un ácido nucleico que codifica la inmunoglobulina puede sintetizarse químicamente u obtenerse de una fuente adecuada (por ejemplo, una biblioteca de ADNc de anticuerpos o una biblioteca de ADNc generada a partir de, o ácido nucleico, preferentemente ARN poli A+, aislado de, cualquier tejido o célula que exprese el anticuerpo mediante amplificación por PCR usando cebadores sintéticos hibridables a los extremos 3' y 5' de la secuencia o mediante clonación usando una sonda de oligonucleótidos específica para la secuencia del gen particular a identificar, por ejemplo, un clon de ADNc de una biblioteca de ADNc que codifica el anticuerpo. Los ácidos nucleicos amplificados generados por PCR pueden a continuación clonarse en vectores de clonación replicables usando cualquier método bien conocido en la técnica.

Una vez determinada la secuencia de nucleótidos del anticuerpo, la secuencia de nucleótidos del anticuerpo puede manipularse usando métodos bien conocidos en la técnica para la manipulación de secuencias de nucleótidos, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida al sitio, PCR, etc. (véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al.*, 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY y Ausubel *et al.*, eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, NY), para generar anticuerpos que tengan una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo, para crear sustituciones, eliminaciones y/o inserciones de aminoácidos.

En una realización, una o más de las CDR se insertan dentro de regiones marco usando técnicas rutinarias de ADN recombinante. Las regiones marco pueden ser regiones marco de origen natural o de consenso, y preferentemente regiones marco humanas (véase, por ejemplo, Chothia *et al.*, 1998, J. Mol. Biol. 278: 457-479 para una lista de regiones del marco humano). Preferentemente, el polinucleótido generado por la combinación de las regiones marco y las CDR codifica un anticuerpo que se une específicamente a 5T4, Her2 o VEGF. Preferentemente, como se ha analizado anteriormente, pueden realizarse una o más sustituciones de aminoácidos dentro de las regiones marco y, preferentemente, las sustituciones de aminoácidos mejoran la unión del anticuerpo a su antígeno. Adicionalmente, estos métodos pueden usarse para realizar sustituciones o eliminaciones de aminoácidos de uno o más restos de cisteína de la región variable que participan en un enlace disulfuro intracatenarios para generar anticuerpos que carecen de uno o más enlaces disulfuro intracatenarios. La presente divulgación abarca otras alteraciones del polinucleótido y se encuentran dentro del conocimiento de la técnica.

Expresión recombinante de polipéptidos de dominio constante (Fc, Ck y Cl) modificados por ingeniería genética y anticuerpos que comprenden los polipéptidos

La expresión recombinante de un anticuerpo modificado por ingeniería genética, incluyendo Fab y F(ab')₂, que comprende un polipéptido de dominio constante modificado por ingeniería genética de la divulgación, o un derivado, análogo o fragmento del mismo, requiere la construcción de un vector de expresión que contenga un polinucleótido que codifique el polipéptido. Una vez que un polinucleótido que codifica un anticuerpo modificado por ingeniería genética o una cadena pesada o ligera modificada por ingeniería genética de un anticuerpo, o porción del mismo, de la divulgación que se haya obtenido, el vector para la producción del anticuerpo o del polipéptido modificado por

ingeniería genética que lo comprende puede producirse mediante tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en la técnica. Por lo tanto, se describen en el presente documento métodos para preparar una proteína mediante la expresión de un polinucleótido que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo. Pueden usarse métodos bien conocidos por los expertos en la materia para construir vectores de expresión que
 5 contengan secuencias codificantes de anticuerpos y señales de control transcripcional y traduccional apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*.

La divulgación, por lo tanto, proporciona vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos que
 10 codifica un anticuerpo de la divulgación, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, un dominio variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo o una porción del mismo, o una CDR de cadena pesada o ligera, operativamente unida a un promotor. Dichos vectores pueden incluir la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante del anticuerpo (véase, por ejemplo, la Publicación Internacional N.º WO 86/05807 y WO 89/01036; y la Patente de EE.UU. N.º 5.122.464) y el dominio variable del anticuerpo puede clonarse en dicho vector para la expresión de todo el dominio
 15 pesado, toda la cadena ligera o tanto las cadenas pesada como ligera, en donde la cadena pesada comprende una región Fc modificada por ingeniería genética y/o la cadena ligera comprende una región Ck modificada por ingeniería genética de la divulgación.

El vector de expresión se transfiere a una célula hospedadora mediante técnicas convencionales (transfección y transducción) y a continuación las células hospedadoras se cultivan mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo de la divulgación. Por lo tanto, la divulgación incluye células hospedadoras que contienen un polinucleótido que codifica un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética, un polipéptido Ck o Cλ modificado por ingeniería genética, o un anticuerpo, Fab y F(ab')₂ que comprenden el mismo, o fragmentos del mismo, o una
 20 cadena pesada o ligera del mismo, o una porción del mismo, o un anticuerpo de cadena sencilla de la divulgación, o una proteína de fusión que comprende un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación unido operativamente a un promotor heterólogo. En determinadas realizaciones para la expresión de anticuerpos bcatenarios, los vectores que codifican tanto las cadenas pesadas como las ligeras pueden coexpresarse en la célula hospedadora para la expresión de la molécula de inmunoglobulina completa, como se detalla a continuación.

Pueden utilizarse diversos sistemas de vectores de expresión del hospedador para expresar los anticuerpos y polipéptidos modificados por ingeniería genética de la divulgación (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.º 5.807.715). Estos sistemas de expresión del hospedador representan vehículos mediante los cuales pueden producirse y purificarse posteriormente las secuencias codificantes de interés, pero también representan células que
 30 pueden, cuando se transforman o se transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, expresar un anticuerpo de la divulgación *in situ*. Estos incluyen pero no se limitan a microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*) transformadas con ADN de bacteriófago recombinante, vectores de expresión de ADN plasmídico o ADN de cósmido que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinante que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus
 35 recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; o sistemas de células de mamíferos (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, NS0 y 3T3) que albergan construcciones de expresión recombinante que
 40 contienen promotores derivados del genoma de células de mamíferos (por ejemplo, el promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío del adenovirus; el promotor 7.5K del virus vaccinia). Preferentemente, las células bacterianas tales como *Escherichia coli* y, más preferentemente, las células eucariotas, especialmente para la expresión de anticuerpos recombinantes completos, se usan para la expresión de polipéptidos modificados por ingeniería genética y/o un anticuerpo recombinante que comprende los mismos.

Por ejemplo, las células de mamíferos tales como las células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector que comprende el principal elemento promotor del gen temprano intermedio del citomegalovirus humano es un sistema de expresión eficaz para anticuerpos (Foecking *et al.*, 1986, Gene 45: 101; y Cockett *et al.*, 1990, BioTechnology 8:2).

En los sistemas bacterianos, pueden seleccionarse ventajosamente varios vectores de expresión dependiendo del uso previsto para el anticuerpo que se expresa. Por ejemplo, cuando debe producirse una gran cantidad de dicha proteína, para la generación de composiciones farmacéuticas de un anticuerpo, pueden ser deseables vectores que
 55 dirijan la expresión de altos niveles de productos de proteínas de fusión que se purifiquen fácilmente. Dichos vectores incluyen, pero no se limitan a, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther *et al.*, 1983, EMBO 12:1791), en el cual la secuencia codificante del anticuerpo puede ligarse individualmente en el vector en marco con la región codificante lac Z de tal manera que se produce una proteína de fusión; vectores pFN (Inouye e Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke y Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24:5503-5509); y similares. Los vectores PGEX también pueden usarse para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión 5-transferasa (GST). Generalmente, dichas proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células
 60 lisadas mediante adsorción y unión a perlas de glutatión-agarosa de la matriz, seguido de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX se han modificado por ingeniería genética para que incluyan trombina o sitios de

escisión por la proteasa del factor Xa de tal manera que el producto del gen diana clonado pueda liberarse de la fracción GST.

En un sistema de insectos, el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) se usa como un vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante del anticuerpo puede clonarse individualmente en regiones no esenciales del virus y colocarse bajo el control de un promotor AcNPV.

En células hospedadoras de mamífero, pueden utilizarse varios sistemas de expresión basados en virus. En casos donde se usa un adenovirus como un vector de expresión, la secuencia codificante del anticuerpo de interés puede ligarse a un complejo de control de transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico puede a continuación insertarse en el genoma del adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma vírico (por ejemplo, la región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar el anticuerpo en hospedadores infectados (por ejemplo, véase Logan y Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 81:6355-6359). También pueden requerirse señales de iniciación específicas para la traducción eficaz de las secuencias codificantes de anticuerpo insertadas. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y las secuencias adyacentes. Adicionalmente, el codón de iniciación debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para garantizar la traducción de todo el inserto. Estas señales de control de traducción exógenas y codones de iniciación pueden tener diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficiencia de la expresión puede mejorarse mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados, terminadores de la transcripción, etc. (véanse, por ejemplo, Bittner *et al.*, 1987, Methods in Enzymol. 153:516-544).

Además, puede elegirse una cepa de célula hospedadora que module la expresión de las secuencias insertadas o modifique y procese el producto genético de la manera específica deseada. Dichas modificaciones (por ejemplo, glucosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células hospedadoras tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y la modificación postraduccionales de proteínas y productos génicos. Pueden escogerse líneas celulares o sistemas hospedadores adecuados de tal manera que se asegure una correcta modificación y procesamiento de la proteína extraña expresada. Con este fin, pueden usarse células hospedadoras eucariotas que posean la maquinaria celular para el procesamiento adecuado de la transcripción primaria, la glucosilación y la fosforilación del producto génico. Dichas células hospedadoras de mamíferos incluyen pero no se limitan a células CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20, NS1 y T47D, NS0 (una línea celular de mieloma murino que no produce de forma endógena ninguna cadena de inmunoglobulina), CRL7030 y HsS78Bst.

En una realización los anticuerpos y las proteínas de fusión que comprenden un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética de la divulgación y/o un polipéptido Ck o Cλ modificado por ingeniería genética de la divulgación se producen de acuerdo con los métodos divulgados en la patente de EE.UU. N.º 7.521.541 y la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 2009/0175865.

Para la producción a largo plazo de alto rendimiento de proteínas recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, podrían modificarse por ingeniería genética líneas celulares que expresen el anticuerpo de forma estable. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes víricos de replicación, las células hospedadoras pueden transformarse con ADN controlado por elementos de control de expresión apropiados (por ejemplo, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Tras la introducción del ADN extraño, las células modificadas por ingeniería genética pueden dejarse crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido y a continuación se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de forma estable el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos que, a su vez, pueden clonarse y expandirse en las líneas celulares. Este método puede usarse ventajosamente para diseñar líneas celulares que expresen el anticuerpo. Dichas líneas celulares modificadas por ingeniería genética pueden ser particularmente útiles en la selección y la evaluación de composiciones que interactúan directa o indirectamente con el anticuerpo.

Pueden usarse diversos sistemas de selección, incluyendo pero no limitado a, la timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler *et al.*, 1977, Cell 11:223), glutamina sintetasa, hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska y Szybalski, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202) y adenina fosforribosiltransferasa (Lowy *et al.*, 1980, Cell 22:8-17) los genes pueden emplearse en células tk, gs⁻, hgprt o aprt, respectivamente. También, la resistencia a los antimetabolitos puede usarse como base de selección para los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler *et al.*, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 77:357; O'Hare *et al.*, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 78:1527); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan y Berg, 1981, PNAS 78:2072); neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418 (Wu y Wu, 1991, Biotherapy 3:87; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573; Mulligan, 1993, Science 260:926; y Morgan y Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191; mayo de 1993, TIB TECH 11:155); e hygro, que confiere resistencia a higromicina (Santerre *et al.*, 1984, Gene 30: 147), pueden usarse con fines de selección. Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología del ADN recombinante pueden aplicarse de forma rutinaria para seleccionar el clon recombinante deseado, y dichos

métodos se describen, por ejemplo, en Ausubel *et al.* (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, NY (1993); Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990); y en los Capítulos 12 y 13, Dracopoli *et al.* (eds), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley and Sons, NY (1994); Colberre-Garapin *et al.*, 1981, *J Mol. Biol.* 150: 1.

5 La célula hospedadora puede cotransfectarse con dos vectores de expresión de la divulgación, codificando el primer vector un polipéptido derivado de cadena pesada y codificando el segundo vector un polipéptido derivado de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten la expresión igual de polipéptidos de cadena pesada y ligera. Como alternativa, puede usarse un único vector que codifique y sea capaz de expresar, tanto polipéptidos de cadena pesada como ligera. En tales situaciones, la cadena ligera debe colocarse antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, 1986, *Nature* 322:52; y Kohler, 1980, *PNAS* 77:2197). Las secuencias codificantes para las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

15 Una vez que un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética, o anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, o proteína de fusión Fc que comprende el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética, o un polipéptido Ck o Cl modificado por ingeniería genética se ha producido mediante expresión recombinante, puede purificarse mediante cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad por el antígeno específico después de la Proteína A, y cromatografía en columna de tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial o mediante cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas. Además, las proteínas de la presente divulgación o fragmentos de las mismas pueden fusionarse a secuencias polipeptídicas heterólogas descritas en el presente documento o conocidas de otro modo en la técnica para facilitar la purificación.

25 Conjugados de anticuerpos y proteínas de fusión

La presente divulgación abarca el uso de regiones constantes de anticuerpos modificadas por ingeniería genética, por ejemplo, Fc y/o Cy, Ck, o Cl y anticuerpos que lo comprenden (es decir, "anticuerpo modificado por ingeniería genética"), que se fusionan de forma recombinante o se conjugan químicamente (incluyendo conjugaciones covalentes y no covalentes) a un agente heterólogo. La divulgación también abarca Fab y F(ab')₂ modificados por ingeniería genética que comprenden una región de dominio constante modificada por ingeniería genética, por ejemplo, Fc y/o Cy, Ck o Cl. Los inmunoconjugados de anticuerpos se describen en, entre muchos otros, Francisco *et al.*, 2003, *Blood* 102:1458-1465; Doronina *et al.*, 2008, *Bioconjugate Chem.* 19:1960-1963 y Dosio *et al.*, 2011, *Toxins* 3:848-883. Las sustancias adecuadas para la unión a los anticuerpos modificados por ingeniería genética de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, un aminoácido, un péptido, una proteína, un polisacárido, un nucleósido, un nucleótido, un oligonucleótido, un ácido nucleico, un hapteno, un fármaco, una hormona, un lípido, un conjunto de lípidos, un polímero sintético, una micropartícula polimérica, una célula biológica, un virus, un fluoróforo, un cromóforo, un tinte, una toxina, un hapteno, una enzima, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un radioisótopo, matrices sólidas, matrices semisólidas y combinaciones de los mismos.

40 Los métodos para conjugar o unir covalentemente otra sustancia a un anticuerpo son bien conocidos en la técnica. La fusión o la conjugación no necesariamente tiene que ser directa, sino que puede producirse a través de secuencias enlazadoras. Los anticuerpos modificados por ingeniería genética fusionados o conjugados a agentes heterólogos pueden usarse *in vivo* para detectar, tratar, gestionar o monitorizar el avance de un trastorno usando métodos conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Publicación Internacional WO 93/21232; documento EP 0 439 095; Naramura *et al.*, 1994, *Immunol. Lett.* 39:91-99; la Patente de EE.UU. N.º 5.474.981; Gillies *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 89:1428-1432; y Fell *et al.*, 1991, *J. Immunol.* 146:2446-2452. En algunas realizaciones, el trastorno que se desea detectar y tratar, gestionar o monitorizar es una enfermedad autoinmunitaria, inflamatoria, infecciosa o trastorno relacionado con el cáncer. Se conocen en la técnica métodos para fusionar o conjugar polipéptidos con porciones de anticuerpos. Véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N.º 5.336.603, 5.622.929, 5.359.046, 5.349.053, 5.447.851 y 5.112.946; documento EP 0 307 434; documento EP 0 367 166; Publicación Internacional N.º WO 96/04388 y WO 91/06570; Ashkenazi *et al.*, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 88:10535-10539; Zheng *et al.*, 1995, *J. Immunol.* 154:5590-5600; y Vil *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 89:11337-11341 ().

55 Pueden generarse proteínas de fusión adicionales mediante técnicas de reorganización genética, reorganización de motivos, reorganización de exones y/o reorganización de codones (denominados colectivamente "reorganización de ADN"). La reorganización del ADN puede emplearse para alterar las actividades de los anticuerpos modificados por ingeniería genética de la divulgación (por ejemplo, anticuerpos con mayores afinidades y tasas de disociación más bajas). Véanse, generalmente, las Patentes de EE.UU. N.º 5.605.793; 5.811.238; 5.830.721; 5.834.252; y 5.837.458 y Patten *et al.*, 1997, *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:724-33; Harayama, 1998, *Trends Biotechnol.* 16:76; Hansson, *et al.*, 1999, *J. Mol. Biol.* 287:265; y Lorenzo y Blasco, 1998, *BioTechniques* 24:308. Los anticuerpos o fragmentos de los mismos, o los anticuerpos codificados o fragmentos de los mismos, pueden alterarse al ser sometidos a mutagénesis aleatoria mediante PCR propensa a errores, inserción aleatoria de nucleótidos u otros métodos antes de la recombinación. Una o más porciones de un polinucleótido que codifica un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo pueden recombinarse con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc. de uno o más agentes heterólogos.

En determinadas realizaciones, las regiones Fc, las regiones Ck y las regiones Cλ modificadas por ingeniería genética, o los anticuerpos de la divulgación que las comprenden, están conjugados a un soporte sólido. Los anticuerpos pueden conjugarse con un soporte sólido como parte del proceso de selección y/o purificación y/o fabricación. Como alternativa los anticuerpos de la divulgación pueden conjugarse con un soporte sólido como parte de un método o composición de diagnóstico. Un soporte sólido adecuado para su uso en la presente divulgación normalmente es sustancialmente insoluble en fases líquidas. Hay disponible un gran número de soportes que son conocidos por cualquier persona experta en la materia. Por lo tanto, los soportes sólidos incluyen matrices sólidas y semisólidas, tales como aerogeles e hidrogeles, resinas, perlas, biochips (incluyendo biochips recubiertos con película fina), chip microfluídico, un chip de silicio, placas multipocillo (también denominadas placas de microtitulación o microplacas), membranas, metales conductores y no conductores, vidrio (incluyendo portaobjetos de microscopio) y soportes magnéticos

En algunas realizaciones, el soporte sólido puede incluir un grupo funcional reactivo, incluyendo, pero no limitado a, hidroxilo, carboxilo, amino, tiol, aldehído, halógeno, nitro, ciano, amido, urea, carbonato, carbamato, isocianato, sulfona, sulfonamida, sulfóxido, etc., para unir los anticuerpos modificados por ingeniería genética de la divulgación.

En una realización, los anticuerpos modificados por ingeniería genética de la presente divulgación o fragmentos o variantes de los mismos se conjugan o se fusionan a una secuencia marcadora, tal como un péptido, para facilitar la purificación. En determinadas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del marcador es un péptido de hexahistidina, tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA), entre otras, muchos de los cuales están disponibles en el mercado. Como se describe en Gentz et al, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 86:821, por ejemplo, la hexahistidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras etiquetas peptídicas útiles para la purificación incluyen, pero no se limitan a, la etiqueta "HA" de hemaglutinina, que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson et al., 1984, Cell 37:767) y la etiqueta "flag".

En otras realizaciones, los anticuerpos modificados por ingeniería genética de la presente divulgación se conjugan o se fusionan con un agente de diagnóstico o detectable. Dichos anticuerpos modificados por ingeniería genética pueden ser útiles para monitorizar o pronosticar el desarrollo o la progresión de un trastorno (tales como, pero no limitado a, cáncer) como parte de un procedimiento de prueba clínica, tal como determinar la eficacia de una terapia particular.

Dicho diagnóstico y detección pueden lograrse mediante la fusión o conjugación específica del sitio del anticuerpo modificado por ingeniería genética con sustancias detectables incluyendo, pero no limitado a diversas enzimas, tales como por ejemplo pero no limitado a peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β-galactosidasa o acetilcolinesterasa; grupos prostéticos, tales como pero no limitado a estreptavidina/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes, tales como pero no limitado a, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo o ficoeritrina; materiales luminiscentes, tales como pero no limitado a, materiales bioluminiscentes, tales como pero no limitado a, luciferasa, luciferina y aequorina; materiales radioactivos, tales como pero no limitado a, bismuto (²¹³Bi), carbono (¹⁴C), cromo (⁵¹Cr), cobalto (⁵⁷Co), flúor (¹⁸F), gadolinio (¹⁵³Gd, ¹⁵⁹Gd), galio (⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), germanio (⁶⁸Ge), holmio (¹⁶⁶Ho), indio (¹¹⁵In, ¹¹³In, ¹¹²In, ¹¹¹In), yodo (¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ¹²¹I), lantano (¹⁴⁰La), lutecio (¹⁷⁷Lu), manganeso (⁵⁴Mn), molibdeno (⁹⁹Mo), paladio (¹⁰³Pd), fósforo (³²P), praseodimio (¹⁴²Pr), prometeo (¹⁴⁹Pm), renio (¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re), rodio (¹⁰⁵Rh), rutenio (⁹⁷Ru), samario (¹⁵³Sm), escandio (⁴⁷Sc), selenio (⁷⁵Se), estroncio (⁸⁵Sr), azufre (³⁵S), tecnecio (⁹⁹Tc), talio (²⁰¹Tl), estaño (¹¹³Sn, ¹¹⁷Sn), tritio (³H), xenón (¹³³Xe), iterbio (¹⁶⁹Yb, ¹⁷³Yb), itrio (⁹⁰Y), cinc (⁶⁵Zn); metales emisores de positrones usando diversas tomografías por emisión de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos.

En otras realizaciones, los anticuerpos modificados por ingeniería genética de la presente divulgación se conjugan con un agente terapéutico tal como una citotoxina, por ejemplo, un agente citostático o citocida, un agente terapéutico o un ion metálico radiactivo, por ejemplo, emisores α. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea adverso para las células. Los ejemplos incluyen paclitaxel, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiانترacindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, puomicina, epirrubicina y ciclofosfamida y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil dacarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BCNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamino platino (II) (DDP, cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina [anteriormente conocida como daunomicina] y doxorubicina), antibióticos [por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)] y agentes antimitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). Las toxinas químicas también pueden tomarse del grupo elegido de duocarmicina (Patentes de EE.UU. N.º 5.703.080; 4.923.990), metotrexato, doxorubicina, melfalán, clorambucilo, ARA-C, vindesina, mitomicina C, cis-platino, etopósido, bleomicina y 5-fluorouracilo. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos también incluyen adriamicina, Doxorubicina, 5-Fluorouracilo, Arabinósido de citosina (Ara-C), Ciclofosfamida, Tiotepa, Taxotere (docetaxel), Busulfán, Citoxina, Taxol, Metotrexato, Cisplatino, Melfalán, Vinblastina, Bleomicina, Etopósido, Ifosfamida, Mitomicina C, Mitoxantrona, Vincristina, Vinorelbina, Carboplatino, Tenipósido, Daunomicina, Carminomicina, Aminopterina, Dactinomicina, Mitomicinas, Esperamicinas (Patente de EE.UU. N.º 4.675.187),

Melfalán y otras mostazas nitrogenadas relacionadas.

En una realización, el agente citotóxico se elige de una enediina, una lexitropsina, una duocarmicina, un taxano, una puromicina, una dolastatina, un maitansinoide y un alcaloide de vinca. En otras realizaciones, el agente citotóxico es
 5 paclitaxel, docetaxel, CC-1065, SN-38, topotecán, morfolino-doxorrubicina, rizoxina, cianomorfolino-doxorrubicina, dolastatina-10, equinomicina, combretastatina, calicheamicina, maitansina, fármaco maitansinoide 1 (DM-1), una auristatina u otros derivados de dolastatina, tales como auristatina E o auristatina F, AEB, AEVB, AEFP, MMAD (monometilauristatina D), MMAE (monometilauristatina E), MMAF (monometilauristatina F), eleuterobina o netropsina. La síntesis y la estructura de la auristatina E, también conocida en la técnica como dolastatina-10, y sus derivados se
 10 describen en la Publ. de Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 2003/0083263 y 2005/0009751; Solicitud de Patente Internacional N.º: PCT/US02/13435, Pat. de EE.UU. N.º 6.323.315; 6.239.104; 6.034.065; 5.780.588; 5.665.860; 5.663.149; 5.635.483; 5.599.902; 5.554.725; 5.530.097; 5.521.284; 5.504.191; 5.410.024; 5.138.036; 5.076.973; 4.986.988; 4.978.744; 4.879.278; 4.816.444; y 4.486.414.

15 En algunas realizaciones, el agente citotóxico es una citotoxina novedosa divulgada en la Solicitud de Patente Internacional N.º PCT/IB2012/056224 presentada el 7 de noviembre de 2012, , Dichos agentes citotóxicos novedosos incluyen, pero no se limitan a, 0101 (N.º 54), 3377 (N.º 115) y 8261 (N.º 69) como se describe en la solicitud que divulga además su síntesis.

20 En determinadas realizaciones, el agente citotóxico es maitansina o maitansinoides y derivados de los mismos, en donde los anticuerpos (de longitud completa o fragmentos) de la divulgación que comprenden una región constante modificada por ingeniería genética (Cy, Cλ, Cκ, incluyendo un Fc), están conjugados específicamente en el sitio en la sustitución de aminoácidos modificada por ingeniería genética a una o más moléculas de maitansinoide. Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina. La maitansina se aisló
 25 por primera vez del arbusto del este de África *Maytenus serrata* (Pat. de EE.UU. N.º 3.896.111) y posteriormente se aislaron maitansinoides adicionales de otros microbios determinados, por ejemplo, maitansinol y ésteres de maitansinol C-3 (Pat. de EE.UU. N.º 4.151.042). El maitansinol sintético y derivados y análogos del mismo se divulgan, por ejemplo, en las Pat. de EE.UU. N.º 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866;
 30 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; y 4.371.533.

Los inmunoconjugados que comprenden maitansinoides conjugados de forma no específica con un anticuerpo y su uso terapéutico se divulgan, por ejemplo, en las Pat. de EE.UU. N.º 5.208.020, 5.416.064 y la patente europea EP 0 425 235; Liu *et al.*, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 93:8618-8623 (inmunoconjugados que comprenden DM1
 35 conjugado de forma no específica con mAb C242 dirigido al cáncer colorrectal humano); Chari *et al.*, 1992, Cancer Research 52: 127-131 (maitansinoide conjugado no específicamente con mAb A7 de células anti-cáncer de colon murino o mAb murino TA.1 anti-HER-2). Por lo tanto, la presente divulgación contempla anticuerpos modificados por ingeniería genética específicamente en el sitio conjugados con agentes maitansinoides para el tratamiento terapéutico de determinados tipos de cáncer.

40 En una realización específica, el fármaco es un maitansinoide. En una realización más específica, el fármaco es maitansina. Además, en una realización específica, el agente citotóxico o citostático es DM-1 (ImmunoGen, Inc.; véase también Chari *et al.*, 1992, Cancer Res 52:127-131).

45 En otras realizaciones, el agente citotóxico de un conjugado de anticuerpo modificado por ingeniería genética de la divulgación es un agente antitubulina. Los agentes antitubulina son una clase bien establecida de compuestos para la terapia contra el cáncer. Los ejemplos de agentes antitubulina incluyen, pero no se limitan a, taxanos (por ejemplo, Taxol® (paclitaxel), docetaxel), T67 (Tularik), vincas y auristatinas (por ejemplo, auristatina E, AEB, AEVB, AEFP, MMAD, MMAE, MMAF, entre otros). Los agentes antitubulina incluidos en esta clase también son: alcaloides de la
 50 vinca, incluyendo vincristina y vinblastina, vindesina y vinorelbina; taxanos tales como paclitaxel y docetaxel y derivados de baccatina, epítolona A y B, nocodazol, 5-Fluorouracilo y colcimid, estramustina, criptofisinas, cemadotina, maitansinoides, combretastatinas, dolastatinas, discodermolida y eleuterobina. En realizaciones más específicas, el agente citotóxico se elige de un alcaloide de la vinca, una podofilotoxina, un taxano, un derivado de baccatina, una criptofisina, un maitansinoide, una combretastatina y una dolastatina.

55 En realizaciones más específicas, el agente citotóxico es vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina, VP-16, camptotecina, paclitaxel, docetaxel, epítolona A, epítolona B, nocodazol, colchicina, colcímido, estramustina, cemadotina, discodermolida, maitansina, DM-1, una auristatina u otros derivados de dolastatina, tales como auristatina E o auristatina F, AEB, AEVB, AEFP, MMAD (monometilauristatina D), MMAE (monometilauristatina E), MMAF (monometilauristatina F), eleuterobina o netropsina.
 60

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la divulgación que comprenden una región Fc modificada por ingeniería genética pueden conjugarse o fusionarse con otras moléculas pequeñas o toxinas proteicas, tales como, pero no limitado a abrina, brucina, cicutoxina, toxina de la difteria, batracotoxina, toxina del botulismo, toxina shiga, endotoxina,
 65 exotoxina de *Pseudomonas*, endotoxina de *Pseudomonas*, toxina tetánica, toxina pertúsica, toxina de *Anthrax*, toxina colérica, falcarinol, fumonisina B1, fumonisina B2, aflatoxina, maurotoxina, agitoxina, caribdotoxina, margatoxina,

eslotoxina, escilatoxina, hefutoxina, calciseptina, taicatoxina, calciclutina, geldanamicina, gelonina, lotaustralina, ocratoxina A, patulina, ricina, estricnina, tricoteceno, zearlenona y tetradoxina. Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de la difteria, fragmentos activos que no se unen de la toxina de la difteria, cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena de ricina A, cadena de abrina A, cadena de modicina A, α -sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos.

Los ejemplos adicionales de toxinas, espaciadores, enlazadores, tensores y similares, y sus estructuras pueden encontrarse en las Publicaciones de Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 2006/0074008, 2005/0238649, 2005/0123536, 2005/0180972, 2005/0113308, 2004/0157782, Patente de EE.UU. N.º 6.884.869, Patente de EE.UU. N.º 5.635.483.

Como se analizó anteriormente en el presente documento, los compuestos usados para la conjugación con los conjugados de anticuerpos de la presente divulgación pueden incluir agentes quimioterapéuticos convencionales, tales como doxorrubicina, paclitaxel, carboplatino, melfalán, alcaloides de la vinca, metotrexato, mitomicina C, etopósido y otros. Además, agentes potentes tales como análogos de CC-1065, calicheamicina, maitansina, análogos de dolastatina 10, rizoxina y palitoxina pueden unirse a los anticuerpos en el sitio de conjugación modificado por ingeniería genética provisto en la región Fc para proporcionar inmunoconjugados potentes.

En determinadas realizaciones, el agente citotóxico o citostático es una dolastatina. En realizaciones más específicas, la dolastatina es de la clase auristatina. En una realización específica de la divulgación, el agente citotóxico o citostático es MMAD. En otra realización específica de la divulgación, el agente citotóxico o citostático es MMAE. En otra realización específica más de la divulgación, el agente citotóxico o citostático es MMAF.

En otras realizaciones, los anticuerpos de la presente divulgación o un dominio constante modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, se conjugan o se fusionan a un agente terapéutico o a una fracción de fármaco que modifica una respuesta biológica determinada.

Los agentes terapéuticos o fracciones de fármacos no deben interpretarse limitados a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la fracción de fármaco puede ser una proteína o un polipéptido que posea una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, toxina del cólera o toxina de la difteria; una proteína tal como el factor de necrosis tumoral, interferón α , interferón β , factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador del plasminógeno tisular, un agente apoptótico, por ejemplo, TNF- α , TNF- β , AIM I (véase, la Publicación Internacional N.º WO 97/33899), AIM II (véase, la Publicación Internacional N.º WO 97/34911), Ligando Fas (Takahashi *et al.*, 1994, J. Immunol. 6:1567) y VEGF (véase, la Publicación Internacional N.º WO 99/23105), un agente trombótico o un agente antiangiogénico, por ejemplo, angiostatina o endostatina; o, un modificador de la respuesta biológica tal como, por ejemplo, una linfocina (por ejemplo, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-4 ("IL-4"), interleucina-6 ("IL-6"), interleucina-7 ("IL-7"), interleucina-9 ("IL-9"), interleucina-10 ("IL-10"), interleucina-15 ("IL-15"), interleucina-12 ("IL-12"), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos ("GM-CSF") y factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF")), o un factor de crecimiento (por ejemplo, hormona del crecimiento ("GH")), y un receptor, o porción de unión a ligando del mismo, de cualquiera de las moléculas anteriores.

En otras realizaciones, los anticuerpos modificados por ingeniería genética de la presente divulgación están conjugados específicamente con un polipéptido que comprende restos de poliarginina o polilisina. En algunas realizaciones, dicho polipéptido comprende 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más restos de aminoácidos. En algunas realizaciones, el polipéptido de poliarginina puede comprender al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más restos de arginina. En otras realizaciones, el polipéptido de polilisina puede comprender al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más restos de lisina. En otras realizaciones, el polipéptido puede comprender cualquier combinación de restos de arginina y lisina.

En otras realizaciones, los anticuerpos modificados por ingeniería genética de la presente divulgación se conjugan con un agente terapéutico tal como materiales radiactivos o quelantes macrocíclicos útiles para conjugar iones radiometálicos (véase anteriormente los ejemplos de materiales radiactivos). En determinadas realizaciones, el quelante macrocíclico es el ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA), que puede unirse al anticuerpo a través de una molécula enlazadora. Tales moléculas enlazadoras, analizadas adicionalmente a continuación en el presente documento, son comúnmente conocidas en la técnica y se describen en Denardo *et al.*, 1998, Clin Cancer Res. 4:2483-90; Peterson *et al.*, 1999, Bioconjug. Chem. 10:553; y Zimmerman *et al.*, 1999, Nucl. Med. Biol. 26:943-50.

En otras realizaciones, los anticuerpos modificados por ingeniería genética de la presente divulgación se conjugan con un ácido nucleico. El ácido nucleico puede seleccionarse de ADN, ARN, ARN de interferencia pequeño (ARNip), microARN, horquilla o miméticos de ácidos nucleicos tales como ácido nucleico peptídico. En algunas realizaciones el ácido nucleico conjugado tiene al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 100, al menos 200, al menos 500, al menos 1000, al menos 5000 o más pares de bases. En algunas realizaciones, el ácido nucleico conjugado es monocatenario. En realizaciones alternativas, el ácido nucleico

conjugado es bicatenario.

Las técnicas para el suministro de ácidos nucleicos a las células pueden encontrarse en Song *et al.*, 2005, Nat. Biotechnol. 23(6):709-717 y también la Patente de EE.UU. N.º 6.333.396, w.

Métodos de conjugación

Las técnicas para conjugar fracciones terapéuticas con anticuerpos son bien conocidas. Las fracciones pueden conjugarse con anticuerpos mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitado a enlace aldehído/Schiff, enlace sulfhidrilo, enlace ácido-lábil, enlace cis-aconitilo, enlace hidrazona, enlace degradable enzimáticamente (véase generalmente Garnett, 2002, Adv. Drug Deliv. Rev. 53:171-216). Las técnicas adicionales para conjugar fracciones terapéuticas con anticuerpos son bien conocidas, véase, por ejemplo, Arnon *et al.*, en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, en Controlled Drug Delivery (2nd ed.), Robinson *et al.* (Eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera *et al.* (Eds.), pp. 475-506 (1985); Baldwin *et al.* (eds.) en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, pp. 303-316 (Academic Press 1985) y Thorpe *et al.*, 1982, Immunol. Rev. 62:119-158.

Los métodos para fusionar o conjugar anticuerpos con fracciones polipeptídicas se conocen en la técnica. Véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N.º 5.336.603, 5.622.929, 5.359.046, 5.349.053, 5.447.851 y 5.112.946; el documento EP 0 307.434; el documento EP 0 367.166; Publicación Internacional N.º WO 96/04388 y WO 91/06570; Ashkenazi *et al.*, 1991, Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU. 88:10535-10539; Zheng *et al.*, 1995, J. Immunol. 154:5590-5600; y Vil *et al.*, 1992, Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU. 89: 11337-11341. La fusión de un anticuerpo con una fracción no necesariamente tiene que ser directa, sino que puede producirse a través de secuencias enlazadoras. Dichas moléculas enlazadoras son comúnmente conocidas en la técnica y se describen en Denardo *et al.*, 1998, Clin Cancer Res. 4:2483-90; Peterson *et al.*, 1999, Bioconjug. Chem. 10:553; Zimmerman *et al.*, 1999, Nucl. Med. Biol 26:943-50; Garnett, 2002, Adv. Drug Deliv. Rev. 53: 171-216; Francisco *et al.*, 2003, Blood 102:1458-1465; Doronina *et al.*, 2008, Bioconjugate Chem. 19:1960-1963; y Dosio *et al.*, 2011, Toxins 3:848-883.

Pueden adoptarse dos enfoques ilustrativos para minimizar la actividad del fármaco fuera de las células a las que se dirigen los conjugados de anticuerpos de la divulgación: en primer lugar, puede usarse un anticuerpo que se une a un receptor de membrana celular pero no a un receptor soluble, de tal manera que el fármaco, incluyendo el fármaco producido por la acción de la enzima convertidora de profármacos, se concentra en la superficie celular de las células, tal como un linfocito activado; en segundo lugar, los fármacos se conjugan de una manera que reduciría su actividad a menos que se hidrolicen o se separen del anticuerpo. Dichos métodos emplearían la unión del fármaco a los anticuerpos con enlaces que sean sensibles al entorno de la superficie celular del linfocito activado (por ejemplo, la actividad de una proteasa que está presente en la superficie celular del linfocito activado) o al entorno dentro del linfocito activado que encuentra el conjugado cuando es absorbido por el linfocito activado (por ejemplo, en el endosoma o, por ejemplo, en virtud de la sensibilidad al pH o la sensibilidad a la proteasa, en el ambiente lisosómico). Los ejemplos de enlazadores que pueden usarse en la presente divulgación se describen en las Publicaciones de Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 2005/0123536, 2005/0180972, 2005/0113308, 2004/0157782 y la Patente de EE.UU. N.º 6.884.869.

En una realización, el enlazador es un grupo hidrazona o hidrazida lábil a los ácidos que se hidroliza en el lisosoma (véase, por ejemplo, la Pat. de EE.UU. N.º 5.622.929). En realizaciones alternativas, los fármacos pueden conjugarse con anticuerpos a través de otros enlaces lábiles al ácido, tales como amidas cis-aconíticas, ortoésteres, acetales y cetales (Dubowchik y Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123; Neville *et al.*, 1989, Biol. Chem. 264: 14653-14661). Estos enlaces son relativamente estables en condiciones de pH neutro, tales como los que están en la sangre, pero son inestables a un pH inferior a 5, el pH aproximado del lisosoma.

En otras realizaciones, los fármacos se unen a los anticuerpos de la divulgación en un sitio reactivo modificado por ingeniería genética usando espaciadores peptídicos que son escindidos por proteasas intracelulares. Las enzimas diana incluyen cathepsinas B y D y plasmina, todas ellas conocidas por hidrolizar derivados de fármacos de dipéptido dando como resultado la liberación del fármaco activo dentro de las células diana (Dubowchik y Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123). La ventaja de usar la liberación intracelular de fármacos proteolíticos es que el fármaco se atenúa altamente cuando se conjuga y las estabildades séricas de los conjugados pueden ser extraordinariamente altas.

En una realización, el enlazador dipeptídico sensible a la cathepsina B es valina-citrulina (denominado en el presente documento "val-cit" o "ValCit"), como se describe en, por ejemplo, Gerber *et al.*, 2009, Blood 113(18):4352-4361).

En una realización, el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética y/o el polipéptido Ck modificado por ingeniería genética de un anticuerpo modificado por ingeniería genética está conjugado específicamente en el sitio a un enlazador escindible, por ejemplo, val-cit, que está conjugado con una auristatina, tales como, pero no limitado a, val-cit-MMAD, val-cit-MMAE y val-cit-MMAF, entre muchas otras.

En una realización, el polipéptido Fc modificado por ingeniería genética y/o el polipéptido Ck modificado por ingeniería genética de la divulgación o un anticuerpo modificado por ingeniería genética que comprende el polipéptido, está conjugado específicamente en el sitio a un enlazador no escindible, por ejemplo, maleimidocaproilo (mc o mal-c), que está conjugado con una auristatina, tales como, pero no limitado a, mc-MMAD, mc-MMAE y mc-MMAF, entre muchas otras. Como se usa en este caso, "maleimido" puede representarse con "mal".

En otras realizaciones, pueden usarse enlazadores no escindibles para conjugar específicamente en el sitio un agente citotóxico o citostático con un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética y/o un polipéptido Ck modificado por ingeniería genética o un anticuerpo modificado por ingeniería genética que comprende un polipéptido modificado por ingeniería genética de la divulgación. Los enlazadores no escindibles incluyen, pero no se limitan a, enlazadores maleimidocaproilo (mc) tales como aquellos descritos en Lee *et al.*, 2009, J. Natl. Cancer Inst. 2009 101:1193-1205 (conjugación de MMAF con un anticuerpo anti-EphA2 usando un enlazador maleimidocaproilo).

En otras realizaciones más, el enlazador es un enlazador malonato (Johnson *et al.*, 1995, Anticancer Res. 15:1387-1393), un enlazador maleimidobenzóilo (Lau *et al.*, 1995, Bioorg. Med. Chem. 3(10):1299-1304) o un análogo de 3'-N-amida (Lau *et al.*, 1995, Bioorg. Med. Chem. 3(10):1305-1312).

La química de enlace que emplea un grupo maleimida y un espaciador (tal como polietilenglicol (PEG) o similar) es adecuada para sustituciones de cisteína, lisina, selenocisteína y selenometionina. Para sustituciones de histidina, puede usarse un espaciador acoplado a un metal (tales como cobre, cinc, hierro, níquel, etc.) para la conjugación. Para la tirosina, uno puede conjugar con un grupo funcional presente en un azúcar u otro compuesto de hidroxilo. Los detalles de estas y otras técnicas de conjugación adecuadas son conocidos por aquellos expertos en la materia y pueden encontrarse en, por ejemplo, Bioconjugate Techniques, 2ª ed., por Greg T. Hermanson, Academic Press (2008).

En algunas realizaciones, un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética y/o un polipéptido Ck modificado por ingeniería genética o un anticuerpo modificado por ingeniería genética de la divulgación se conjuga específicamente en el sitio con un agente citotóxico o citostático a través de un enlazador escindible o no escindible que comprende además un espaciador tales como, pero no limitado a, $-\text{[CH}_2\text{CH}_2\text{O]}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C(=O)-}$ (PEG2-C2), $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C(=O)-}$ (PEG3-C2) y $-\text{[CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_6\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C(=O)-}$ (PEG6-C2), entre otros. En otras realizaciones, el enlazador no escindible es maleimidocaproilo unido a un espaciador tales como, pero no limitado a, PEG2-C2, PEG3-C2 y PEG6-C2 para formar una fracción enlazador-espaciador mc-PEG2-C2, mc-PEG3-C2 y mc-PEG6-C2, entre otros. En otras realizaciones, el enlazador es un enlazador escindible tal como, pero no limitado a, valina-citrulina que es susceptible a la escisión por cathepsina B, que está conjugado con una fracción espaciadora tal como, pero no limitado a, PEG2-C2, PEG3-C2 y PEG6-C2 para formar una fracción enlazador-espaciador que incluye val-cit-PEG2-C2, val-cit-PEG3-C2 y val-cit-PEG6-C2, entre otros.

En algunas realizaciones, la fracción enlazador-espaciador escindible está conjugada con una auristatina, incluyendo, pero no limitado a, MMAD, MMAE, MMAF, 0101, 3377 y 8261. En algunas realizaciones, el enlazador-espaciador-auristatina abarca mc-val-cit-PABC-MMAD (vc-MMAD), mc-val-cit-PABC-MMAE (vc-MMAE) y mc-val-cit-PABC-MMAF (vc-MMAF). Como se usa en este caso, "para-aminobenciloxicarbonilo" está representado por "PABC". En algunas realizaciones, el enlazador-espaciador-auristatina abarca mc-val-cit-PABC-PEG2-C2-MMAD (vc-PEG-C2-MMAD), mc-val-cit-PABC-PEG3-C2-MMAD (vc-PEG3-C2-MMAD), mc-val-cit-PABC-PEG6-C2-MMAD (vc-PEG6-C2-MMAD), mc-val-cit-PABC-PEG2-C2-MMAE (vc-PEG2-C2-MMAE), mc-val-cit-PABC-PEG3-C2-MMAE (vc-PEG3-C2-MMAE), mc-val-cit-PABC-PEG6-C2-MMAE (vc-PEG6-C2-MMAE), mc-val-cit-PABC-PEG2-C2-MMAF (vc-PEG2-C2-MMAF), mc-val-cit-PABC-PEG3-C2-MMAF (vc-PEG3-C2-MMAF) y mc-val-cit-PABC-PEG6-C2-MMAF (vc-PEG6-C2-MMAF), entre otros.

En otras realizaciones, la fracción enlazador-espaciador no escindible está conjugada además con una auristatina, incluyendo, pero no limitado a, MMAD, MMAE, MMAF, 0101, 3377 y 8261. En algunas realizaciones, el enlazador-espaciador-auristatina abarca mc-PEG2-C2-MMAD, mc-PEG3-C2-MMAD, mc-PEG6-C2-MMAD, mc-PEG2-C2-MMAE, mc-PEG3-C2-MMAE, mc-PEG6-C2-MMAE, mc-PEG2-C2-MMAF, mc-PEG3-C2-MMAF y mc-PEG6-C2-MMAF, entre otros.

En algunas realizaciones, un agente citotóxico se conjuga con un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética a través de un enlazador. En otras realizaciones, el enlazador puede ser mc (maleimidocaproilo), val-cit (valina-citrulina), mc-val-cit (maleimidocaproil-valina-citrulina), mc-val-cit-PABC (maleimidocaproil-valina-citrulina-*p*-aminobencilcarbamoato), Mal-PEG3C2 (maleimido- $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C(=O)}$) y Mal-PEG6C2 (maleimido- $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_6\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C(=O)}$).

En otra realización, un agente citotóxico se conjuga con un polipéptido de dominio constante de anticuerpo modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, a través de un enlazador tal como, pero no limitado a, los enlazadores descritos en el presente documento o conocidos en la técnica, y el agente citotóxico es una auristatina, un maitansinoide y una calicheamicina, entre otros.

En algunas realizaciones, un polipéptido de dominio constante de anticuerpo modificado por ingeniería genética, o

porción del mismo, que comprende una cisteína introducida, se conjuga a través de una combinación de enlazador y agente citotóxico incluyendo, pero no limitado a, maleimidocaproil-monometil auristatina D (mcMMAD), maleimidocaproil-monometil auristatina E (mcMMAE), maleimidocaproil-monometil auristatina F (mcMMAF), maleimidocaproil-0101 (mc0101), maleimidocaproil-3377 (mc3377), maleimidocaproil-8261 (mc8261), valina-citrulina-monometil auristatina D (vcMMAD), valina-citrulina-monometil auristatina E (vcMMAE), valina-citrulina-monometil auristatina F (vcMMAF), valina-citrulina-0101 (vc0101), valina-citrulina-3377 (vc3377), valina-citrulina-8261 (vc8261), mcValCitPABCMMAD (maleimidocaproil-valina-citrulina-monometil auristatina D), mcValCitMMAE (maleimidocaproil-valina-citrulina-monometil auristatina E), mcValCitMMAF (maleimidocaproil-valina-citrulina-monometil auristatina F), mcValCit0101 (maleimidocaproil-valina-citrulina-0101), mcValCit3377 (maleimidocaproil-valina-citrulina-3377), mcValCit8261 (maleimidocaproil-valina-citrulina-8261), Mal-PEG2C2-MMAD, Mal-PEG3C2-MMAD y Mal-PEG6C2-MMAD, Mal-PEG2C2-MMAE, Mal-PEG3C2-MMAE y Mal-PEG6C2-MMAE, Mal-PEG2C2-MMAF, Mal-PEG3C2-MMAF y Mal-PEG6C2-MMAF, PEG2C2-0101, Mal-PEG3C2-0101 y Mal-PEG6C2-0101, PEG2C2-3377, Mal-PEG3C2-3377 y Mal-PEG6C2-3377, PEG2C2-8261, Mal-PEG3C2-8261 y Mal-PEG6C2-8261.

En algunas realizaciones, un agente citotóxico se conjuga con un polipéptido Ck modificado por ingeniería genética a través de un enlazador. En otras realizaciones, el enlazador puede ser mc (maleimidocaproilo), val-cit (valina-citrulina), mc-val-cit (maleimidocaproil-valina-citrulina), mc-val-cit-PABC (maleimidocaproil-valina-citrulina-*p*-aminobencilcarbamato), Mal-PEG3C2 (maleimido-[CH₂CH₂O]₂CH₂CH₂C(=O)) y Mal-PEG6C2 (maleimido-[CH₂CH₂O]₆CH₂CH₂C(=O)).

En algunas realizaciones, un agente citotóxico se conjuga con un dominio constante de anticuerpo modificado por ingeniería genética (por ejemplo, polipéptido Cy, Ck y Cλ), o porción del mismo, a través de un enlazador, a un agente citotóxico, en donde el enlazador y el agente citotóxico se seleccionan del grupo que consiste en maleimidocaproil-monometil auristatina D (mcMMAD), maleimidocaproil-monometil auristatina E (mcMMAE), maleimidocaproil-monometil auristatina F (mcMMAF), maleimidocaproil-0101 (mc0101), maleimidocaproil-3377 (mc3377), maleimidocaproil-8261 (mc8261), valina-citrulina-monometil auristatina D (vcMMAD), valina-citrulina-monometil auristatina E (vcMMAE), valina-citrulina-monometil auristatina F (vcMMAF), valina-citrulina-0101 (vc0101), valina-citrulina-3377 (vc3377), valina-citrulina-8261 (vc8261), mcValCitPABCMMAD (maleimidocaproil-valina-citrulina-monometil auristatina D), mcValCitMMAE (maleimidocaproil-valina-citrulina-monometil auristatina E), mcValCitMMAF (maleimidocaproil-valina-citrulina-monometil auristatina F), mcValCit0101 (maleimidocaproil-valina-citrulina-0101), mcValCit3377 (maleimidocaproil-valina-citrulina-3377), mcValCit8261 (maleimidocaproil-valina-citrulina-8261), Mal-PEG2C2-MMAD, Mal-PEG3C2-MMAD y Mal-PEG6C2-MMAD, Mal-PEG2C2-MMAE, Mal-PEG3C2-MMAE y Mal-PEG6C2-MMAE, Mal-PEG2C2-MMAF, Mal-PEG3C2-MMAF y Mal-PEG6C2-MMAF, Mal-PEG2C2-0101, Mal-PEG3C2-0101 y Mal-PEG6C2-0101, Mal-PEG2C2-3377, Mal-PEG3C2-3377 y Mal-PEG6C2-3377, Mal-PEG2C2-8261, Mal-PEG3C2-8261 y Mal-PEG6C2-8261.

En otra realización, un agente citotóxico se conjuga con un polipéptido Ck modificado por ingeniería genética a través de un enlazador tal como, pero no limitado a, los enlazadores descritos en el presente documento o conocidos en la técnica, y el agente citotóxico es una auristatina, un maitansinoide y una calicheamicina, entre otros.

En algunas realizaciones, un polipéptido Ck o Cλ modificado por ingeniería genética que comprende una cisteína introducida, se conjuga a través de una combinación de enlazador y agente citotóxico incluyendo, pero no limitado a, maleimidocaproil-monometil auristatina D (mcMMAD), maleimidocaproil-monometil auristatina E (mcMMAE), maleimidocaproil-monometil auristatina F (mcMMAF), maleimidocaproil-0101 (mc0101), maleimidocaproil-3377 (mc3377), maleimidocaproil-8261 (mc8261) valina-citrulina-monometil auristatina D (vcMMAD), valina-citrulina-monometil auristatina E (vcMMAE), valina-citrulina-monometil auristatina F (vcMMAF), valina-citrulina-0101 (vc0101), valina-citrulina-3377 (vc3377), valina-citrulina-8261 (vc8261) mcValCitPABCMMAD (maleimidocaproil-valina-citrulina-monometil auristatina D), mcValCitMMAE (maleimidocaproil-valina-citrulina-monometil auristatina E), mcValCitMMAF (maleimidocaproil-valina-citrulina-monometil auristatina F), mcValCit0101 (maleimidocaproil-valina-citrulina-0101), mcValCit3377 (maleimidocaproil-valina-citrulina-3377), mcValCit8261 (maleimidocaproil-valina-citrulina-8261), Mal-PEG2C2-MMAD, Mal-PEG3C2-MMAD y Mal-PEG6C2-MMAD, Mal-PEG2C2-MMAE, Mal-PEG3C2-MMAE y Mal-PEG6C2-MMAE, Mal-PEG2C2-MMAF, Mal-PEG3C2-MMAF y Mal-PEG6C2-MMAF, Mal-PEG2C2-0101, Mal-PEG3C2-0101 y Mal-PEG6C2-0101, Mal-PEG2C2-3377, Mal-PEG3C2-3377 y Mal-PEG6C2-3377, Mal-PEG2C2-8261, Mal-PEG3C2-8261 y Mal-PEG6C2-8261, entre muchas otras combinaciones de enlazador/agente citotóxico conocidas en la técnica o divulgadas en el presente documento.

Como se ha analizado anteriormente, los conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética generalmente se elaboran conjugando un compuesto o un fármaco con un anticuerpo modificado por ingeniería genética, o un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética y/o un polipéptido Ck modificado por ingeniería genética, a través de un enlazador. Cualquier enlazador conocido en la técnica puede usarse en los conjugados de la presente divulgación, por ejemplo, agentes bifuncionales (tales como dialdehídos o imidoésteres) o enlaces de hidrazona ramificados (véase, por ejemplo, la Pat. de EE.UU. N.º 5.824.805).

En determinadas realizaciones no limitantes de la divulgación, la región de enlazador entre la porción conjugada y la porción de anticuerpo modificado por ingeniería genética/polipéptido Fc/Ck modificado por ingeniería genética es escindible en determinadas condiciones, en donde la escisión o hidrólisis del enlazador libera la fracción del fármaco

de la fracción Fc/Ck modificada por ingeniería genética/anticuerpo. En algunas realizaciones, el enlazador es sensible a la escisión o hidrólisis en condiciones intracelulares.

En una realización, la región enlazadora entre la parte conjugada y la parte del anticuerpo modificado por ingeniería genética es escindible si el pH cambia en un valor determinado o excede un valor determinado. En otra realización de la divulgación, el enlazador es escindible en el medio del lisosoma, por ejemplo, en condiciones ácidas (es decir, un pH de alrededor de 5-5,5 o menos). En otras realizaciones, el enlazador es un enlazador peptídico que se escinde por una enzima peptidasa o proteasa, incluyendo pero no limitado a una enzima proteasa lisosómica, una proteasa asociada a la membrana, una proteasa intracelular o una proteasa endosómica. Normalmente, el enlazador tiene al menos dos aminoácidos de longitud, más normalmente tiene al menos tres aminoácidos de longitud. Por ejemplo, puede usarse un enlazador peptídico que puede escindirse por la cathepsina B (por ejemplo, un enlazador Val-Cit, un enlazador Gly-Phe-Leu-Gly, entre otros), una proteasa dependiente de tiol que se expresa en gran medida en el tejido canceroso. Otros enlaces similares se describen, por ejemplo, en la Pat. de EE.UU. N.º 6.214.345.

En otras realizaciones no mutuamente excluyentes de la divulgación, el enlazador mediante el cual se conjugan el anticuerpo modificado por ingeniería genética y el compuesto de un conjugado de anticuerpo de la divulgación promueve la internalización celular. En determinadas realizaciones, la fracción enlazador-fármaco promueve la internalización celular. En determinadas realizaciones, el enlazador se elige de tal manera que la estructura de todo el conjugado de anticuerpos promueva la internalización celular. En una realización, el enlazador es un enlazador tioéter (véase, por ejemplo, la Pat. de EE.UU. N.º 5.622.929). En otra realización, el enlazador es un enlazador de hidrazona (véanse, por ejemplo, las Pat. de EE.UU. N.º 5.122.368 y 5.824.805).

En otras realizaciones más, el enlazador es un enlazador disulfuro. En la técnica se conoce una diversidad de enlazadores disulfuro, incluyendo pero no limitado a los que pueden formarse usando SATA (N-succinimidil-S-acetiltioacetato), SPDP (N-succinimidil-3-(2-piridilditiopropionato), SPDB (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)butirato) y SMPT (N-succinimidil-oxycarbonil- α -metil- α -(2-piridilditiotolueno). SPDB y SMPT (véanse, por ejemplo, Thorpe *et al.*, 1987, Cancer Res., 47:5924-5931; Wawrzynczak *et al.*, 1987, En Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer, ed. C. W. Vogel, Oxford U. Press, pp. 28-55; véase también la Pat. de EE.UU. N.º 4.880.935).

En la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º US 2004/0018194 A1 se describen diversos enlazadores que pueden usarse con las composiciones y los métodos de la presente divulgación.

La eliminación de fármacos que contienen amina que están sustituidos en la posición α de la glicina (Kingsbury, *et al.*, J. Med. Chem., 1984, 27, 1447) también son ejemplos de estrategias espaciadoras autoinmolativas que pueden aplicarse a los conjugados anticuerpo-enlazador-fármaco de la divulgación.

En otras realizaciones más de la presente divulgación, la unidad enlazadora de un conjugado de anticuerpo une el agente citotóxico o citostático (fármaco; -D) y el anticuerpo (-Ab). En determinadas realizaciones, la unidad enlazadora tiene la fórmula general:

$-T_a-W_w-Y_y$ en donde:

i. -T- es una unidad tensora;

ii. a es 0 o 1;

iii. cada -W- es independientemente una unidad de aminoácido;

iv. w es independientemente un número entero que va de 2 a 12;

v. -Y- es una unidad espaciadora; y

vi. y es 0, 1 o 2.

La unidad tensora ($-T-$), cuando está presente, enlaza la unidad de anticuerpo a una unidad de aminoácido ($-W-$). Los grupos funcionales útiles que pueden estar presentes en un anticuerpo, ya sea de forma natural o mediante manipulación química incluyen, pero no se limitan a, sulfhidrilo, amino, hidroxilo, el grupo hidroxilo anomérico de un carbohidrato y carboxilo. Los anticuerpos modificados por ingeniería genética de la divulgación en donde se ha introducido una cisteína presentan al menos un grupo sulfhidrilo para la conjugación. Otros métodos para introducir grupos sulfhidrilo implican la reducción de los enlaces disulfuro intramoleculares de un anticuerpo. Como alternativa, los grupos sulfhidrilo pueden generarse mediante la reacción de un grupo amino de una fracción de lisina modificada por ingeniería genética de un anticuerpo (que se ha introducido) con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) u otros reactivos generadores de sulfhidrilo.

La unidad de aminoácido ($-W-$) enlaza la unidad tensora ($-T-$) a la unidad espaciadora ($-Y-$) si la unidad espaciadora está presente, y une la unidad tensora al agente citotóxico o citostático (fármaco; D) si la unidad espaciadora está ausente.

En algunas realizaciones, $-W-$ es una unidad dipeptídica, tripeptídica, tetrapeptídica, pentapeptídica, hexapeptídica, heptapeptídica, octapeptídica, nonapeptídica, decapeptídica, undecapeptídica o dodecapeptídica. La unidad de aminoácido de la unidad enlazadora puede ser escindida enzimáticamente por una enzima que incluye,

pero no limitado a, una proteasa asociada a tumores, catepsina B, catepsina D, plasmina y similares, para liberar el fármaco (-D) que está protonado *in vivo* tras liberarse para proporcionar un fármaco citotóxico (D).

En una realización, la unidad de aminoácidos es un dipéptido fenilalanina-lisina (enlazador phe-lys o FK). En otra realización, la unidad de aminoácidos es un dipéptido valina-citrulina (val-cit).

La unidad espaciadora (—Y—), cuando está presente, enlaza una unidad de aminoácido a la unidad del fármaco. Las unidades espaciadoras son de dos tipos generales: autoinmolativas y no autoinmolativas. Una unidad espaciadora no autoinmolativa es aquella en donde parte o la totalidad de la unidad espaciadora permanece unida a la unidad de fármaco después de la escisión enzimática de una unidad de aminoácido del conjugado anticuerpo-enlazador-fármaco o del compuesto fármaco-enlazador. Los ejemplos de una unidad espaciadora no autoinmolativa incluyen, pero no se limitan a una unidad espaciadora (glicina-glicina) y una unidad espaciadora de glicina. Cuando un conjugado anticuerpo-enlazador-fármaco de la divulgación que contiene una unidad espaciadora de glicina-glicina o una unidad espaciadora de glicina sufre una escisión enzimática a través de una proteasa asociada a células tumorales, una proteasa asociada a células cancerosas o una proteasa asociada a linfocitos, una fracción de glicina-glicina-fármaco o una fracción de glicina-fármaco se escinde de Ab—T—W_W—. Para liberar el fármaco, debe tener lugar una reacción de hidrólisis independiente dentro de la célula diana para romper el enlace de la unidad glicina-fármaco.

Otros ejemplos de espaciadores autoinmolativos incluyen, pero no se limitan a, para-aminobenciloxycarbonilo (PABC) y compuestos aromáticos que son electrónicamente equivalentes al grupo PABC, tales como derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol (véase Hay *et al.*, 1999, Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237 para ejemplos) y orto- o para-aminobencilacetals. Pueden usarse espaciadores que experimentan una fácil ciclización tras la hidrólisis del enlace amida, tales como amidas de ácido 4-aminobutírico sustituidas y no sustituidas (Rodrigues *et al.*, Chemistry, Biology, 1995, 2, 223), sistemas de anillos sustituidos apropiadamente (Storm, *et al.*, J. Amer. Chem. Soc. 1972, 94, 5815) y amidas de ácido 2-aminofenilpropiónico (Amsberry, *et al.*, J. Org. Chem., 1990, 55, 5867).

Métodos de conjugación de una molécula heteróloga a un dominio constante modificado por ingeniería genética

Las moléculas heterólogas, tales como aquellas descritas en el presente documento pueden conjugarse eficientemente con anticuerpos modificados por ingeniería genética que comprenden una región Fc modificada por ingeniería genética y/o una región Ck modificada por ingeniería genética y/o una región Cλ modificada por ingeniería genética de la divulgación a través de los grupos reactivos que proporcionan los restos de aminoácidos modificados por ingeniería genética. En un aspecto, la divulgación proporciona métodos para conjugar eficientemente moléculas heterólogas con anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína. En una realización, la conjugación de una molécula heteróloga puede producirse en un grupo reactivo proporcionado por al menos un resto modificado por ingeniería genética seleccionado de las posiciones 246, 249, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 360, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 390, 392, 393, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 443 y 444 de la región Fc o el anticuerpo que comprende el polipéptido Fc, en donde el sistema de numeración de la región constante es aquel del índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 63(1):78-85; . En un aspecto adicional, el grupo reactivo es un tiol y la conjugación de una molécula heteróloga puede producirse en un grupo tiol proporcionado por al menos un resto de cisteína modificado por ingeniería genética seleccionado de las posiciones 246, 249, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 360, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 390, 392, 393, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 443 y 444 del polipéptido Fc o un anticuerpo que comprende el polipéptido Fc, en donde el sistema de numeración de la región constante es aquel del índice EU de Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63(1):78-85.

En una realización, la conjugación de una molécula heteróloga puede producirse en un grupo reactivo proporcionado por al menos un resto modificado por ingeniería genética seleccionado de las posiciones 111, 149, 183, 188, 207 y 210, del polipéptido Ck modificado por ingeniería genética o un anticuerpo modificado por ingeniería genética que comprende el polipéptido Ck modificado por ingeniería genética, en donde el sistema de numeración de la región constante es aquel del índice de numeración de Kabat como se establece en Kabat. En un aspecto adicional, el grupo reactivo es un tiol, y la conjugación de una molécula heteróloga puede producirse en un grupo tiol proporcionado por al menos un resto de cisteína modificado por ingeniería genética seleccionado de las posiciones 111, 149, 183, 188, 207 y 210, del polipéptido Ck modificado por ingeniería genética o un anticuerpo modificado por ingeniería genética que comprende el polipéptido Ck modificado por ingeniería genética, en donde el sistema de numeración de la región constante es aquel del índice de numeración de Kabat como se establece en Kabat.

La modificación por ingeniería genética de restos de cisteína de origen no natural para convertirlos en anticuerpos puede alterar el apareamiento disulfuro de las cadenas pesadas y ligeras, de tal manera que un resto de cisteína natural que formaba parte de un enlace disulfuro se libera y presenta un grupo tiol capaz de conjugación. En otra realización, el método comprende la conjugación eficiente de una molécula heteróloga con un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína en un grupo tiol proporcionado por al menos un resto de cisteína modificado por ingeniería genética seleccionado de las posiciones 246, 249, 265, 267, 270, 276, 278, 283, 292, 293, 294, 300, 302, 303, 314, 315, 318, 320, 332, 333, 334, 336, 345, 347, 354, 355, 358, 360, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 386,

388, 390, 392, 393, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 443 y 444 de la región Fc de un anticuerpo.

La modificación por ingeniería genética de restos de cisteína de origen no natural para convertirlos en anticuerpos puede alterar el apareamiento disulfuro de las cadenas pesadas y ligeras, de tal manera que un resto de cisteína natural que formaba parte de un enlace disulfuro se libera y presenta un grupo tiol capaz de conjugación. En otra realización, el método comprende la conjugación eficiente de una molécula heteróloga con un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína en un grupo tiol proporcionado por al menos un resto de cisteína modificado por ingeniería genética seleccionado de las posiciones 111, 149, 183, 188, 207 y 210, de la región Ck de un anticuerpo.

La presencia de grupos tiol libres en los anticuerpos puede determinarse mediante diversas técnicas aceptadas en la materia, tales como aquellas que se describen a continuación. La eficiencia de la conjugación de una molécula heteróloga a un anticuerpo puede determinarse evaluando la presencia de tioles libres restantes después de la reacción de conjugación. En una realización, la divulgación proporciona un método para conjugar eficientemente una molécula heteróloga con un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína. En una realización, la eficiencia de conjugación es de al menos el 5 por ciento, al menos el 20 por ciento, al menos el 50 por ciento, al menos el 80 por ciento, al menos el 90 por ciento, al menos el 95 por ciento, al menos el 98 por ciento, al menos el 99 por ciento o más medido por el nivel de grupos tiol libres que quedan después de la reacción de conjugación.

En otra realización, la divulgación proporciona un método para conjugar una molécula heteróloga con un anticuerpo modificado por ingeniería genética, incluyendo un Fab o F(ab')₂, o una región Fc modificada por ingeniería genética y/o una región Ck o Cλ del anticuerpo en donde el anticuerpo o Fc, la región Ck y/o Cλ comprende al menos una sustitución de aminoácidos, de tal manera que se formen 2 o más grupos reactivos. En otra realización, el método comprende un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética, un polipéptido Ck modificado por ingeniería genética, un polipéptido Cλ modificado por ingeniería genética o un anticuerpo modificado por ingeniería genética que comprende al menos una sustitución de aminoácidos, de tal manera que al menos 2, al menos 4, al menos 6, al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 14, al menos 16, al menos 18, al menos 20 o más grupos reactivos recién introducidos se forman. En una realización adicional, al menos una de las sustituciones es con una cisteína y los grupos reactivos son grupos tiol.

Las regiones constantes modificadas por ingeniería genética (Fc, Ck y Cλ), y los anticuerpos que los comprenden de la divulgación capaces de conjugación pueden contener restos de cisteína que comprenden grupos sulfhidrilo que están bloqueados o protegidos con caperuza. Dichas caperuzas incluyen proteínas, péptidos, iones y otros materiales que interactúan con el grupo sulfhidrilo y previenen o inhiben la formación de conjugados. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la divulgación pueden requerir que se les quite la tapa antes de una reacción de conjugación. En realizaciones específicas, las regiones constantes modificadas por ingeniería genética (Fc, Ck y Cλ), y los anticuerpos modificados por ingeniería genética de la divulgación que comprenden los polipéptidos no están protegidos con caperuza y muestran un grupo sulfhidrilo capaz de conjugación. En otras realizaciones específicas, los anticuerpos de la divulgación se someten a una reacción de eliminación de caperuza que da como resultado una interrupción o reordenamiento mínimo de los enlaces disulfuro que se producen de forma natural. En algunas realizaciones, el nivel de ruptura natural del enlace disulfuro puede variar desde aproximadamente el 30 % hasta un nivel indetectable en comparación con el nivel de ruptura en el polipéptido no tratado. En otras realizaciones, los anticuerpos de la divulgación se someten a una reacción de eliminación de caperuza como se presenta en las Publicaciones de Patente Internacional N.º WO 2008/141044, WO 2009/092011 y WO 2010/1411902.

En algunas realizaciones, los anticuerpos modificados por ingeniería genética de la divulgación pueden someterse a reacciones de conjugación en donde el anticuerpo que se va a conjugar está presente en una concentración de al menos 1 mg/ml, al menos 2 mg/ml, al menos 3 mg/ml, al menos 4 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 8 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 13 mg/ml, al menos 14 mg/ml, al menos 15 mg/ml, al menos 16 mg/ml o superior.

Métodos de uso de conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética

A. Uso de conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética para el diagnóstico

Los conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética pueden usarse para diagnóstico por formación de imágenes. Por ejemplo, el conjugado de anticuerpo modificado por ingeniería genética puede ser un anticuerpo monoclonal radiomarcado. Véanse, por ejemplo, Srivastava (ed.), *Radiolabeled Monoclonal Antibodies For Imaging And Therapy*, Plenum Press (1988); Chase, "Medical Applications of Radioisotopes", en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª edición, Gennaro *et al.* (eds.), Mack Publishing Co., pp. 624-652 (1990); y Brown, "Clinical Use of Monoclonal Antibodies", en *Biotechnology and Pharmacy*, Pezzuto *et al.* (eds.), Chapman y Hall, pp. 227-249 (1993). Esta técnica, también conocida como inmunocentellografía, usa una cámara y para detectar la ubicación de radioisótopos emisores de rayos y conjugados con anticuerpos monoclonales. El diagnóstico por formación de imágenes puede usarse para diagnosticar cáncer, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad infecciosa y/o enfermedad cardiovascular. (Véanse, por ejemplo, Brown, anteriormente citado).

En una realización, los conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética pueden usarse para

diagnosticar enfermedad cardiovascular. Por ejemplo, los conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética que comprenden fragmentos de anticuerpos anti-miosina pueden usarse para obtener imágenes de necrosis miocárdica asociada a infarto agudo de miocardio. Los conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética que comprenden fragmentos de anticuerpos que se unen a plaquetas o fibrina pueden usarse para obtener imágenes de trombosis venosa profunda. Por otra parte, los conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética que comprenden fragmentos de anticuerpos que se unen a las plaquetas activadas pueden usarse para obtener imágenes de la placa aterosclerótica.

Los conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética también pueden usarse en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Por ejemplo, pueden usarse conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética que comprenden fragmentos de anticuerpos que se unen a antígenos bacterianos específicos para localizar abscesos. Además, los conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética que comprenden fragmentos de anticuerpos que se unen a granulocitos y leucocitos inflamatorios pueden usarse para localizar sitios de infección bacteriana.

Numerosos estudios han evaluado el uso de anticuerpos monoclonales para la detección gammagráfica del cáncer. Véanse, por ejemplo, Brown, citado anteriormente. Las investigaciones han abarcado los principales tipos de tumores sólidos tales como melanoma, carcinoma colorrectal, carcinoma de ovario, carcinoma de mama, sarcoma y carcinoma de pulmón. Por lo tanto, la presente invención también contempla la detección de cáncer usando conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética que comprenden fragmentos de anticuerpos que se unen a marcadores tumorales para detectar el cáncer. Los ejemplos de dichos marcadores tumorales incluyen antígeno carcinoembrionario, α -fetoproteína, productos oncogénicos, antígenos de superficie celular asociados a tumores y antígenos intracelulares asociados a necrosis, así como antígenos asociados a tumores y antígenos específicos de tumores que se analizan más adelante.

Además del diagnóstico, la formación de imágenes de anticuerpos monoclonales puede usarse para monitorizar las respuestas terapéuticas, detectar recurrencias de una enfermedad y orientar decisiones clínicas posteriores.

Para fines de diagnóstico y seguimiento, los radioisótopos pueden unirse a fragmentos de anticuerpos ya sea directa o indirectamente mediante el uso de un grupo funcional intermedio. Estos grupos funcionales intermedios incluyen, por ejemplo, DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético) y EDTA (ácido etilendiaminetetraacético). La dosis de radiación administrada al paciente normalmente se mantiene al nivel más bajo posible. Esto puede lograrse mediante la elección del isótopo para la mejor combinación de semivida mínima, retención mínima en el cuerpo y cantidad mínima de isótopo que permitirá la detección y medición precisa. Los ejemplos de radioisótopos que pueden unirse a anticuerpos y son apropiados para el diagnóstico por formación de imágenes incluyen ^{99m}Tc y ^{111}In .

Los estudios indican que los fragmentos de anticuerpos, particularmente Fab y Fab', proporcionan relaciones tumor/fondo adecuadas. (Véanse, por ejemplo, Brown, anteriormente citado).

Los conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética también pueden marcarse con iones paramagnéticos para fines de diagnóstico *in vivo*. Los elementos que son particularmente útiles para la resonancia magnética incluyen iones Gd, Mn, Dy y Fe.

Los conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética también pueden detectar la presencia de antígenos particulares *in vitro*. En tales inmunoensayos, los conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética pueden usarse en fase líquida o unirse a un portador en fase sólida. Por ejemplo, un anticuerpo intacto, o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede unirse a un polímero, tal como aminodextrano, para unir el componente de anticuerpo a un soporte insoluble tal como una perla recubierta de polímero, placa o tubo.

Como alternativa, los conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética pueden usarse para detectar la presencia de antígenos particulares en secciones de tejido preparadas a partir de una muestra histológica. Dicha detección *in situ* puede lograrse, por ejemplo, mediante la aplicación de un inmunoconjugado marcado de forma detectable a las secciones de tejido. La detección *in situ* puede usarse para determinar la presencia de un antígeno particular y para determinar la distribución del antígeno en el tejido examinado. Las técnicas generales de detección *in situ* son bien conocidas por aquellos expertos. (Véanse, por ejemplo, Ponder, "Cell Marking Techniques and Their Application", en *Mammalian Development: A Practical Approach*, Monk (ed.), IRL Press, pp. 115-138 (1987); Coligan *et al.*, anteriormente citado).

Los marcadores detectables tales como enzimas, compuestos fluorescentes, agentes de transferencia de electrones y similares pueden unirse a un portador mediante métodos convencionales bien conocidos en la técnica. Estos portadores marcados y los conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética preparados a partir de los mismos pueden usarse para inmunoensayos *in vitro* y para detección *in situ*, de la misma manera puede prepararse un conjugado de anticuerpos mediante la unión directa de los marcadores al anticuerpo. La carga de conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética con una pluralidad de marcadores puede aumentar la sensibilidad de los inmunoensayos o procedimientos histológicos, donde se logra solo un bajo grado de unión del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo, al antígeno diana.

B. Uso de conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética para terapia

Los conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética pueden usarse para tratar enfermedades infecciosas víricas y bacterianas, enfermedad cardiovascular, enfermedad autoinmunitaria y cáncer. La diana de dicha terapia es suministrar dosis citotóxicas o citostáticas de un principio activo (por ejemplo, radioactividad, una toxina o un fármaco) para dirigirse a las células, mientras minimiza la exposición a tejidos no diana.

Un radioisótopo puede unirse a un anticuerpo intacto o a un fragmento del mismo que se une al antígeno, directa o indirectamente, a través de un agente quelante. Por ejemplo, ⁶⁷Cu puede conjugarse con un componente de anticuerpo usando el agente quelante, ácido p-bromo-acetamidobencil-tetraetilaminotetraacético (TETA). (Véase, por ejemplo, Chase, anteriormente citado).

Por otra parte, pueden prepararse conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética en los cuales el agente terapéutico es una toxina o un fármaco. Las toxinas útiles para la preparación de dichos conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética incluyen ricina, abrina, proteína antivírica de la hierba carmín, gelonina, toxina diftérica y endotoxina de *Pseudomonas*. Los fármacos quimioterapéuticos útiles para la preparación de inmunconjugados incluyen auristatina, dolastatina, MMAE, MMAF, AFP, AEB, doxorubicina, daunorrubicina, metotrexato, melfalán, clorambucilo, alcaloides de la vinca, 5-fluorouridina, mitomicina-C, taxol, L-asparaginasa, mercaptopurina, tioguanina, hidroxiurea, citarabina, ciclofosfamida, ifosfamida, nitrosoureas, cisplatino, carboplatino, mitomicina, dacarbazina, procarbazina, topotecán, mostazas nitrogenadas, citoxano, etopósido, BCNU, irinotecán, camptotecinas, bleomicina, idarrubicina, dactinomicina, plicamicina, mitoxantrona, asparaginasa, vinblastina, vincristina, vinorelbina, paclitaxel, docetaxel y sales, disolventes y derivados de los mismos. Otros agentes adecuados incluyen quelantes, tales como DTPA, a los que pueden añadirse marcadores detectables tales como moléculas fluorescentes o agentes citotóxicos tales como metales pesados o radionucleidos; y toxinas tales como la exotoxina de *Pseudomonas* y similares.

En algunas realizaciones, el agente diagnóstico, preventivo o terapéutico es auristatina E (también conocida en la técnica como dolastatina-10) o un derivado de los mismos así como sales o solvatos farmacéuticos de los mismos. Normalmente, el derivado de auristatina E es, por ejemplo, un éster formado entre auristatina E y un cetoácido. Por ejemplo, la auristatina E se puede hacer reaccionar con ácido paraacetilbenzoico o ácido benzoilvalérico para producir AEB y AEVB, respectivamente. Otros derivados típicos de la auristatina incluyen AFP, MMAF y MMAE. La síntesis y estructura de la auristatina E y sus derivados, así como los enlazadores, se describen en la solicitud de patente de EE.UU. N.º de serie 09/845.786 (Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 20030083263), Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 2005-0238629; Publicación de Patente Internacional N.º WO 2004/010957; Publicación de Patente Internacional N.º WO 2002/088172; Publicación de Patente Internacional N.º WO 04/073656; y Pat. de EE.UU. N.º 6.884.869; 6.323.315; 6.239.104; 6.214.345; 6.034.065; 5.780.588; 5.665.860; 5.663.149; 5.635.483; 5.599.902; 5.554.725; 5.530.097; 5.521.284; 5.504.191; 5.410.024; 5.138.036; 5.076.973; 4.986.988; 4.978.744; 4.879.278; 4.816.444; y 4.486.414

En algunas realizaciones, el agente antineoplásico incluye, pero no se limita a, un fármaco listado a continuación: metotrexato, taxol, mercaptopurina, tioguanina, hidroxiurea, citarabina, ciclofosfamida, ifosfamida, nitrosoureas, cisplatino, carboplatino, mitomicina, dacarbazina, procarbazina, etopósidos, camptotecinas, bleomicina, doxorubicina, idarrubicina, daunorrubicina, dactinomicina, plicamicina, mitoxantrona, asparaginasa, vinblastina, vincristina, vinorelbina, paclitaxel y docetaxel, doxorubicina, epirubicina, 5-fluorouracilo, taxanos tales como docetaxel y paclitaxel, leucovorina, levamisol, irinotecán, estramustina, etopósido, nitrosoureas tales como carmustina y lomustina, L-asparaginasa, topotecán, mostazas nitrogenadas, citoxano, etopósido, BCNU, alcaloides de la vinca, compuestos de platino, mitomicina, gemcitabina, hexametilmelamina, temsirolimus (CCI-779); lapatinib (GW 572016); RAD-001 (everolimus); XRP-9881; ixabepilona (BMS-247550); pertuzumab (OMNITARG, 2C4); topotecán, inhibidores de la tirosina quinasa, tirfostinas, mesilato de imatinib (GLEEVEC), herbimicina A, genisteína, erblastina y lavendustina A.

En otras realizaciones, los quimioterapéuticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes: mostazas nitrogenadas (por ejemplo, ciclofosfamida, ifosfamida, trofosfamida, clorambucilo); nitrosoureas (por ejemplo, carmustina (BCNU), lomustina (CCNU)); alquilsulfonatos (por ejemplo, busulfán, treosulfán); triazenos (por ejemplo, dacarbazina); compuestos que contienen Platino (por ejemplo, cisplatino, carboplatino, aroplatino, oxaliplatino); Alcaloides vegetales: Alcaloides de la vinca (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina); Taxoides (por ejemplo, paclitaxel, docetaxel); Inhibidores de la ADN topoisomerasa: epipodofilinas (por ejemplo, etopósido, tenipósido, topotecán, 9-aminocamptotecina, camptotecina, crisnatol); mitomicinas (por ejemplo, mitomicina C, antimetabolitos); antifolatos: inhibidores de DHFR (por ejemplo, metotrexato, trimetrexato) Inhibidores de la IMP deshidrogenasa (por ejemplo, ácido micofenólico, tiazofurina, ribavirina, EICAR); Inhibidores de la ribonucleótido reductasa (por ejemplo, hidroxiurea, deferroxamina); análogos de pirimidina: análogos de uracilo (por ejemplo, 5-fluorouracilo, floxuridina, doxifluridina, ratitrexed); análogos de citosina (por ejemplo, citarabina (ara C), arabinósido de citosina, fludarabina); análogos de purina (por ejemplo, mercaptopurina, tioguanina); Antimetabolitos de ADN (por ejemplo, 3-HP, 2'-desoxi-5-fluorouridina, 5-HP, α-TGDR, glicinato de afidicolina, ara-C, 5-aza-2'-desoxicitidina, β-TGDR, ciclocitidina, guanazol, glucodialdehído de inosina, macebecina II, pirazoloimidazol); Terapias hormonales: Antagonistas del receptor: Antiestrógeno (por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, megestrol); inhibidores de la aromatasa

(por ejemplo, exemestano, anastrozol, letrozol); Antagonistas de GnRH (por ejemplo, abarelix, histrelina); moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERM) (por ejemplo, lasofoxifeno); Agonistas de LH-RH (por ejemplo, goserelina, triptorelina, buserelina, acetato de leuprolida); Antiandrógenos (por ejemplo, flutamida, bicalutamida, nilutamida, megestrol, ciproterona); Retinoides/Deltoides ácido cis-retinoico; derivado de la vitamina A (por ejemplo, ácido retinoico totalmente trans (ATRA-IV)); análogos de la vitamina D3 (por ejemplo, EB 1089, CB 1093, KH 1060); Terapias fotodinámicas (por ejemplo, vertoporfina (BPD-MA), ftalocianina, fotosensibilizador Pc4, desmetoxi-hipocrelina A (2BA-2-DMHA); Citocinas, por ejemplo, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-18, IFN α , IFN β , IFN- γ , TNF α , TNF β , G-CSF, GM-CSF, TGF- β , SLC, EMAP2, MIP-3 α , MIP-3 β , HLA-B7, otros miembros de la familia TNF (por ejemplo, TRAIL, TRANCE, TWEAK, CD40L, LT- α , LT- β , OX40L, CD40L, FasL, CD27L, CD30L, 4-1BBL, APRIL, LIGHT, TL1, TNFSF16, TNFSF17 y AITR-L o una porción funcional de los mismos); Inhibidores de la angiogénesis: angiostatina (fragmento del plasminógeno), antitrombina antiangiogénica III, angiozima, ABT-627, Bay 12-9566, benefina, bevacizumab, BMS-275291, inhibidor derivado del cartílago (CDI), CAI, fragmento del complemento CD59, CEP-7055, Col 3, combretastatina A-4, endostatina (fragmento XVIII del colágeno), fragmento de fibronectina, Gro- β , halofuginona, heparinasas, fragmento del hexasacárido de heparina, HMV833, gonadotropina coriónica humana (hCG), IM-862, interferón $\alpha/\beta/\gamma$, proteína inducible por interferón (IP-10), interleucina-12, Kringle 5 (fragmento de plasminógeno), marimastat, inhibidores de metaloproteinasas (TIMP), 2-metoxiestradiol, MMI 270 (CGS 27023A), MoAb IMC-1C11, neovastat (Aeterna), NM-3, panzem, PI-88, inhibidor de la ribonucleasa placentaria, inhibidor del activador del plasminógeno, factor plaquetario-4 (PF4), prinomastat, fragmento de prolactina de 16 kD, proteína relacionada con la proliferina (PRP), PTK 787/ZK 222594, retinoides, solimastat, escualamina, SS 3304, SU 5416, SU6668, SU11248, SU12662, SU14813, BAY 43-9006, AG-013736, tetrahidrocortisol-S, tetratiomolibdato, talidomida, trombospondina-1 (TSP-1), TNP-470, factor de crecimiento transformante β (TGF- β), vasculostatina, vasoestatina (fragmento de calreticulina), ZD6126, ZD 6474, inhibidores de la farnesil transferasa (FTI), bisfosfonatos; Agentes antimetabólicos (por ejemplo, alocolchicina, halicondrina B, colchicina, derivado de colchicina, dolstatina 10, maitansina, rizoxina, tiocolchicina, tritil cisteína); Otros agentes: inhibidores de la isoprenilación; neurotoxinas dopaminérgicas (por ejemplo, ion 1-metil-4-fenilpiridinio); inhibidores del ciclo celular (por ejemplo, estaurosporina); actinomicinas (por ejemplo, actinomicina D, dactinomicina); bleomicinas (por ejemplo, bleomicina A2, bleomicina B2, peplomicina); antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina, doxorubicina (adriamicina), idarrubicina, epirubicina, pirarubicina, zorubicina, mitoxantrona); inhibidores de mTOR (por ejemplo, temsirolimus, everolimus); Inhibidores de MDR (por ejemplo, verapamilo); inhibidores de la Ca²⁺ ATPasa (por ejemplo, taspargina); agonistas del receptor tipo Toll (por ejemplo, CpG-7909, también conocido como PF03512676 o PROMUNE; Coley Pharm); moléculas coestimuladoras (por ejemplo, CD4, CD25, PD-1, B7-H3, 4-1BB, OX40, ICOS, CD30, HLA-DR, MHCII y LFA y anticuerpos agonistas para los mismos); entre muchos otros agentes conocidos en la técnica.

Los agentes anticancerosos adicionales que pueden usarse en los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a: acivicina; aclarubicina; clorhidrato de acodazol; acronina; adozelesina; aldesleuquina; altretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; trihidrato de amifostina; aminoglutetimida; amacrina; anastrozol; antramicina; trióxido de arsénico; asparaginasa; asperlina; azacitidina; azetepa; azotomicina; Bacilo de Calmette-Guerin; batimastat; benzodepa; bevacizumab; bicalutamida; clorhidrato de bisantreno; dimesilato de bisnafida; bizelesina; sulfato de bleomicina; bortezomib; brequinar sódico; bropirimina; busulfán; cactinomicina; calusterona; capecitabina; caracemida; carbetimer; carboplatino; carmustina; clorhidrato de carubicina; carzelesina; cedefingol; clorambucilo; cirolemicina; cisplatino; clorambucilo; cladribina; clodronato; mesilato de crisnatol; ciclofosfamida; citarabina; dacarbazina; dactinomicina; darbepoyetina; clorhidrato de daunorubicina; decitabina; dexormaplatino; dextrazoxano; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diazicuona; dietilestilbestrol; docetaxel; doxorubicina; clorhidrato de doxorubicina; droloxifeno; citrato de droloxifeno; propionato de dromostanolona; duazomicina; farmorubicina; edatrexato; clorhidrato de eflornitina; elsamitrucina; enloplatino; enpromato; epipropidina; clorhidrato de epirubicina; erbulozol; erlotinib; eritropoyetina; clorhidrato de esorubicina; estramustina; estramustina fosfato sódico; etanidazol; etopósido; etopósido fosfato; etoprina; everolimus; exemestano; clorhidrato de fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgastrim (G-CSF); floxuridina; fludarabina fosfato; fludrocortisona; fluorouracilo; fluoximesterona; fluorocitabina; fosquidona; fostriecina sódica; fulvestrant; gefitinib; gemcitabina; clorhidrato de gemcitabina; gemtuzumab; goserelina; hidroxiurea; ibritumomab tiuxetan; clorhidrato de idarubicina; ifosfamida; ilmofosina; imatinib; interleucina II (incluyendo interleucina II recombinante, o rIL2), interferón α -2a; interferón α -2b; interferón α -n1; interferón α -n3; interferón β -1a; interferón γ -1b; iproplatino; clorhidrato de irinotecán; ixabepilona; ketoconazol; acetato de lanreótido; lapatinib; letrozol; leucovorina; acetato de leuprólido; levamisol; clorhidrato de liarozol; lometrexol sódico; lomustina; clorhidrato de losoxantrona; masoprocol; maitansina; clorhidrato de mecloretamina; medroxiprogesterona; acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalan; menogaril; mercaptopurina; mesna; metotrexato; metotrexato sódico; metoprina; meturedpa; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitospora; mitotano; clorhidrato de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamina; octreotida; ormaplatino; oxaliplatino; oxisuran; paclitaxel; pamidronato; pegaspargasa; PEG-L-asparaginasa; PEG-filgastrim; peliomicina; pentamustina; pentostatina; peplomicina sulfato; perfosfamida; pertuzumab; pipobromano; piposulfan; clorhidrato de piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfímero sódico; porfímero; porfiromicina; prednimustina; pemetrexed; clorhidrato de procarbazona; puomicina; clorhidrato de puomicina; pirazofurina; raltitrexed; riboprina; rituximab; rogletimida; safingol; clorhidrato de safingol; semustina; simtrazeno; somavert (PEGVISOMANT); esparfosato sódico; esparsomicina; clorhidrato de espirogermanio; espiromustina; espiroplatino; estreptonigrina; estreptoazocina; sulofenur; sunitinib; estreptoazocina; talisomicina; tecogalan sódico; tegafur; clorhidrato de teloxantrona; temoporfina; temozolomida; temsirolimus; tenipósido; teroxirona; testolactona; talidomida; tiampirina; tioguanina; tiotepa; tiazofurina; tirapazamina; topotecán; citrato de toremifeno; trastuzumab; tretinoína; acetato de trestolona; fosfato de triciribina; trimetrexato;

glucoronato de trimetrexato; triptorelina; topotecán; clorhidrato de tubulozol; mostaza de uracilo; uredepa; vapreotida; verteporfina; sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vinepidina; sulfato de vinglicinato; sulfato de vinleurosina; tartrato de vinorelbina; sulfato de vinrosidina; sulfato de vinzolidina; vorozol; zeniplatino; zinostatina; zolendronato; clorhidrato de zorubicina.

5 Otros fármacos contra el cáncer que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a: 20-epi-1,25 dihidroxivitamina D3; 5-etiniluracilo; abiraterona; aclarubicina; acilfulveno; adecipenol; adozelesina; aldesleuquina; antagonistas de ALL-TK; altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; ácido aminolevulínico; amrubicina; amsacrina; anagrelida; anastrozol; andrografólido; inhibidores de la angiogénesis; antagonista D; antagonista G; antarelix; proteína-1 morfogenética

10 antidorsalizante; antiandrógeno, carcinoma prostático; antiestrógeno; antineoplastón; oligonucleótidos de sentido contrario; glicinato de afidicolina; moduladores del gen de la apoptosis; reguladores de la apoptosis; ácido apurínico; ara-CDP-DL-PTBA; arginina desaminasa; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3; azasetron; azatoxina; azatirosina; derivados de la bacatina III; balanol; batimastat; antagonistas de BCR-ABL; benzoclorinas; benzoilestaurosoprina; derivados de β lactama; β -aletina; betaclamina B; ácido betulínico;

15 inhibidor de bFGF; bicalutamina; bisantreno; bisaziridinilespermina; bisnafida; bistrateno A; bizelesina; breflato; bropirimina; budotitano; butionina sulfoximina; calcipotriol; calfofina C; derivados de camptotecina; IL-2 de la viruela del canario; capecitabina; carboxamida-amino-triazol; carboxiamidotriazol; CaRest M3; CARN 700; inhibidor del derivado de cartilago; carzelesina; inhibidores de la caseína quinasa (ICOS); castanospermina; cecropina B; cetorelix; cloros; cloroquinoxalina sulfonamida; cicaprost; cis porfirina; cladribina; análogos de clomifeno; clotrimazol; colismicina

20 A; colismicina B; combretastatina A4; análogo de combretastatina; conagenina; crambescidina 816; crisnatol; criptoficina 8; derivados de criptoficina A; curacina A; ciclopentantraquinonas; cicloplatama; cipemicina; citarabina ocfosfato; factor citolítico; citostatina; dacliximab; decitabina; deshdrodidemina B; deslorelinea; dexametasona; dexifosfamida; dexrazoxano; dexverapamil; diazicuona; didemnin B; didox; dietilnorespermina; dihidro-5 azacitidina; dihidrotaxol, 9; dioxamicina; difenil espiromustina; docetaxel; docosanol; dolasetron; doxifluridina; droloxifeno;

25 dronabinol; duocarmicina SA; ebselen; ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflornitina; elemene; emitefur; epirubicina; epristerida; análogo de estramustina; agonistas de estrógenos; antagonistas de estrógenos; etanidazol; etopósido fosfato; exemestano; fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgrastima; finasterida; flavopiridol; flezelastina; fluasterona; fludarabina; clorhidrato de fluorodaunorunicina; forfenimex; formestano; fostriecina; fotemustina; gadolinio texafirin; nitrato de galio; galocitabina; ganirelix; inhibidores de la gelatinasa; gemcitabina; inhibidores del glutatión;

30 hepsulfam; heregulina; hexametileno bisacetamida; hipericina; ácido ibrandónico; idarubicina; idoxifeno; idramantona; ilmofosina; ilomastat; imidazoacridonas; imiquimod; péptidos inmunoestimulantes; inhibidor del receptor del factor de crecimiento-1 de tipo insulina; agonistas del interferón; interferones; interleucinas; iobenguano; yododoxorrubicina; ipomeanol, 4; iroplact; irsogladina; isobengazol; isohomohalicondrina B; itasetron; jasplaquinolida; kahalalida F; lamelarina-N triacetato; lanreótido; leinamicina; lenograstim; sulfato de lentinan; leptostatina; letrozol; factor inhibidor

35 de la leucemia; interferón α de leucocitos; leuprólido+estrógeno+progesterona; leuporelina; levamisol; liarazol; análogo de poliamina lineal; péptido disacárido lipofílico; compuestos lipófilos de platino; lisocinamida 7; lobaplatino; lombricina; lomretrexol; lonidamina; losoxantrona; lovastatina; loxoribina; lurtotecan; lutecio texafirina; lisofilina; péptidos líticos; maitansina; manostatina A; marimastat; masoprocol; maspina; inhibidores de la matrilisina; inhibidores de la metaloproteína de matriz; menogaril; merbarona; meterelin; metioninasa; metoclopramida; inhibidor de MIF;

40 mifepristona; miltefosina; mirimostim; ARN bicatenario emparejado de manera incorrecta; mitogua zona; mitolactol; análogos de mitomicina; mitonafida; mitotoxina del factor de crecimiento del fibroblasto-saporina; mitoxantrona; mofaroteno; molgramostim; anticuerpo monoclonal, gonadotropina coriónica humana; monofosforil lípido A+sk de la pared celular de myobacterium; mopidamol; inhibidor del gen de la resistencia a múltiples fármacos; tratamiento basado en el supresor 1 de múltiples tumores; agente anticanceroso de mostaza; micaperóxido B; extracto de la pared

45 celular micobacteriana; miriaporona; N-acetilidinalina; benzamidas N-sustituidas; nafarelinea; nagrestip; naloxona+pentazocina; napavin; nafterpina; nartograstim; nedaplatino; nemorubicina; ácido neridróico; endopeptidasa neutra; nilutamida; nisamicina; moduladores de óxido nítrico; antioxidante nítróico; nitulina; O6-bencilguanina; octreotida; okicenona; oligonucleótidos; onapristona; ondansetrón; ondansetrón; oracina; inductor oral de citocina; ormaplatino; osaterona; oxaliplatino; oxaunomicina; paclitaxel; análogos de paclitaxel; derivados de paclitaxel; paluamina; palmitoilrizosina; ácido pamidróico; panaxitriol; panomifeno; parabactino; pazelliptina; pegaspargasa; peldesina; pentosan polisulfato sódico; pentostatina; pentrozol; perflubron; perfosfamida; alcohol

50 perillíco; fenazinomicina; acetato de fenilo; inhibidores de la fosfatasa; picibanilo; pilocarpina clorhidrato; pirarubicina; piritrexim; placetina A; placetina B; inhibidor del activador del plasminógeno; complejo de platino; compuestos de platino; complejo de platino-triamina; porfímero sódico; porfíromicina; prednisona; propibis-acridona; prostaglandina J2; inhibidores del proteosoma; inmunomodulador basado en proteína A; inhibidor C de la proteína quinasa; inhibidores C de la proteína quinasa, microalgal; inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa; inhibidores de la purina nucleósido fosforilasa; purpurinas; pirazoloacridina; conjugado de hemoglobina piridoxilada polioxi etilenada; antagonistas de raf; raltitrexed; ramosetron; inhibidores de la farnesil proteína transferasa de ras; inhibidores de ras; inhibidor de ras-GAP; retelliptina desmetilada; etidronato de renio Re186; rizoxina; ribozimas; retinamida RII; rogletimida; rohitukina;

60 romurtida; roquinimex; rubiginona B1; ruboxil; safingol; saintopina; SarCNU; sarcotitol A; sargramostim; miméticos de Sdi 1; semustina; inhibidor 1 derivado de senescencia; oligonucleótidos directos; inhibidores de la transducción de la señal; moduladores de la transducción de la señal; proteína de unión a antígeno monocatenario; sizofurano; sobuzoxano; borocaptato sódico; fenilacetato sódico; solverol; proteína de unión a somatomedina; sonermina; ácido esparfósico; espicamicina D; espiromustina; esplenopentina; espongistatina 1; escualamina; inhibidor de citoblastos;

65 inhibidor de las divisiones de los citoblastos; estipiamida; inhibidores de la estromelina; sulfinosina; antagonista del péptido intestinal vasoactivo superactivo; suradista; suramina; swainsonina; glucosaminoglicanos sintéticos;

talimustina; tamoxifén metyoduro; tauromustina; tazaroteno; tecogalán sódico; tegafur; telurapirilio; inhibidores de la telomerasa; temoporfina; temozolomida; tenipósido; tetraclorodecaóxido; tetrazomina; taliblastina; tiocoralina; trombopoyetina; mimético de trombopoyetina; timalfasina; agonista del receptor de timopoyetina; timotrinán; hormona estimuladora de tiroides; etil etiopurpurina de estaño; tirapazamina; titanoceno bicloruro; topsentina; toremifeno; factor citoblástico totipotente; inhibidores de la traducción; tretinoína; triacetiluridina; triciribina; trimetrexato; triptorelina; tropisetron; turosterida; inhibidores de tirosina cinasa; tirfostinas; inhibidores de UBC; ubenimex; factor inhibidor del crecimiento del seno urogenital; antagonistas del receptor de la uroquinasa; vapreotida; variolina B; sistema de vectores, terapia génica de eritrocitos; velaresol; veramina; verdinas; verteporfina; vinorelbina; vinxaltina; vitaxina; vorozol; zanoterona; zeniplatino; zilascorb; y zinostatina estimalamer.

En algunas realizaciones, el agente diagnóstico, preventivo o terapéutico no es un radioisótopo.

En algunas realizaciones, un conjugado de anticuerpos modificado por ingeniería genética puede usarse para tratar uno de los siguientes tipos particulares de cáncer: Se contempla que los conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética de la presente divulgación pueden usarse para tratar diversas enfermedades o trastornos, por ejemplo, aquellos caracterizados por la sobreexpresión de un antígeno tumoral. Las afecciones o los trastornos hiperproliferativos ilustrativos incluyen tumores benignos o malignos, leucemia y neoplasias malignas linfoides. Otros incluyen neoplasias malignas neuronales, gliales, astrocitales, hipotalámicas, glandulares, macrofágicas, epiteliales, endoteliales y estromales. Otros tipos de cáncer o trastornos hiperproliferativos incluyen: cánceres de la cabeza, cuello, ojo, boca, garganta, esófago, pecho, piel, hueso, pulmón, colon, recto, colorrectal, estómago, bazo, riñón, músculo esquelético, tejido subcutáneo, melanoma metastásico, endometrial, próstata, mama, ovarios, testículos, tiroides, sangre, ganglios linfáticos, riñón, hígado, páncreas, cerebro o sistema nervioso central. Los ejemplos de cánceres que pueden prevenirse, gestionarse, tratarse o mejorarse de acuerdo con los métodos de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, cáncer de la cabeza, cuello, ojo, boca, garganta, esófago, pecho, hueso, pulmón, colon, recto, estómago, próstata, mama, ovarios, riñón, hígado, páncreas y cerebro. Los cánceres adicionales incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: leucemias tales como pero no limitado a, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemias mielocíticas agudas tales como de mieloblastos, promielocítica, mielomonocítica, monocítica, leucemias eritroleucemia y síndrome mielodisplásico, leucemias crónicas tales como pero no limitado a, leucemia mielocítica (granulocítica) crónica, leucemia linfocítica crónica, tricoleucemia; policitemia vera; linfomas tales como pero no limitado a enfermedad de Hodgkin, enfermedad no Hodgkiniana; mielomas múltiples tales como pero no limitado a mieloma múltiple latente, mieloma no secretor, mieloma osteosclerótico, leucemia de células plasmáticas, plasmocitoma solitario y plasmocitoma extramedular; macroglobulinemia de Waldenström; gammapatía monoclonal de significado indeterminado; gammapatía monoclonal benigna; enfermedad de la cadena pesada; cáncer de hueso y sarcomas del tejido conectivo tales como pero no limitado a sarcoma óseo, enfermedad ósea por mieloma, mieloma múltiple, osteosarcoma óseo inducido por colesteatoma, enfermedad de Paget del hueso, osteosarcoma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, tumor maligno de células gigantes, fibrosarcoma de hueso, cordoma, sarcoma perióstico, sarcomas de tejidos blandos, angiosarcoma (hemangiosarcoma), fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiomasarcoma, liposarcoma, linfangiosarcoma, neurilemoma, rhabdomyosarcoma y sarcoma sinovial; tumores cerebrales tales como pero no limitado a, glioma, astrocitoma, glioma del tronco encefálico, ependimoma, oligodendroglioma, tumor no glial, neurinoma acústico, craneofaringioma, meduloblastoma, meningioma, pineocitoma, pineoblastoma y linfoma cerebral primario; cáncer de mama incluyendo pero no limitado a adenocarcinoma, carcinoma lobulillar (de células pequeñas), intraductal carcinoma, cáncer de mama medular, cáncer de mama mucinoso, cáncer de mama tubular, cáncer de mama papilar, Enfermedad de Paget (incluyendo la enfermedad de Paget juvenil) y cáncer de mama inflamatorio; cáncer suprarrenal tal como pero no limitado a feocromocitoma y carcinoma adrenocortical; cáncer de tiroides tal como pero no limitado a cáncer de tiroides papilar o folicular, cáncer medular de tiroides y cáncer anaplásico de tiroides; cáncer de páncreas tal como pero no limitado a, insulinoma, gastrinoma, glucagonoma, vipoma, tumor secretor de somatostatina y tumor carcinoide o de células de los islotes; cánceres de la hipófisis tales como pero no limitado a enfermedad de Cushing, tumor secretor de prolactina, acromegalia y diabetes insípida; cánceres oculares tales como pero no limitado a melanoma ocular tal como melanoma del iris, melanoma corioideo, melanoma del cuerpo ciliar y retinoblastoma; cánceres vaginales tales como carcinoma epidermoide, adenocarcinoma y melanoma; cáncer vulvar tal como carcinoma epidermoide, melanoma, adenocarcinoma, carcinoma de células basales, sarcoma y enfermedad de Paget; cánceres de cuello uterino tales como pero no limitado a, carcinoma de células escamosas y adenocarcinoma; cánceres uterinos tales como pero no limitado a carcinoma endometrial y sarcoma uterino; cánceres de ovario tales como pero no limitado a, carcinoma epitelial de ovario, tumor limítrofe, tumor de células germinales y tumor del estroma; cánceres esofágicos tales como pero no limitado a, cáncer escamoso, adenocarcinoma, carcinoma adenoide quístico, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma adenoescamoso, sarcoma, melanoma, plasmocitoma, carcinoma verrugoso y carcinoma de células de avena (células pequeñas); cánceres de estómago tales como pero no limitado a, adenocarcinoma, linfoma neoplásico maligno fungiforme (polipoide), ulcerante, de propagación superficial, de propagación difusa, liposarcoma, fibrosarcoma y carcinosarcoma; cánceres de colon; cánceres de recto; cánceres de hígado tales como pero no limitado a carcinoma hepatocelular y hepatoblastoma, cánceres de vesícula biliar tales como adenocarcinoma; colangiocarcinomas tales como pero no limitado a papilar, nodular y difuso; cánceres de pulmón tales como cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma de células escamosas (carcinoma epidermoide), adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y cáncer de pulmón microcítico; cánceres testiculares tales como pero no limitado a tumor germinales, seminoma, no seminoma anaplásico, clásico (típico), espermatocítico, carcinoma embrionario, carcinoma de teratoma, coriocarcinoma (tumor del saco vitelino), cánceres de próstata tales como pero no limitado a, adenocarcinoma, leiomiomasarcoma y

rabdomiosarcoma; cánceres penales; cánceres orales tales como pero no limitado a carcinoma epidermoide; cánceres basales; cánceres de las glándulas salivales tales como pero no limitado a adenocarcinoma, carcinoma mucoepidermoide y carcinoma adenoide quístico; cánceres de faringe tales como pero no limitado a cáncer epidermoide y verrugoso; cánceres de piel tales como pero no limitado a, carcinoma de células basales, carcinoma epidermoide y melanoma, melanoma de diseminación superficial, melanoma nodular, melanoma lentigo maligno, melanoma lentiginoso acral; cánceres de riñón tales como pero no limitado a cáncer de células renales, adenocarcinoma, hipernefoma, fibrosarcoma, cáncer de células de transición (pelvis renal y/u uréter); tumor de Wilms; cánceres de vejiga tales como pero no limitado a carcinoma de células transicionales, cáncer epidermoide, adenocarcinoma, carcinosarcoma. Además, los cánceres incluyen mixosarcoma, sarcoma osteogénico, endoteliosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, mesotelioma, sinovioma, hemangioblastoma, carcinoma epitelial, cistadenocarcinoma, carcinoma broncogénico, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar y adenocarcinomas papilares (para una revisión de dichos trastornos, véanse Fishman et al., 1985, Medicine, 2ª Ed., J. B. Lippincott Co., Philadelphia y Murphy et al., 1997, Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., inc., Estados Unidos de América). También se contempla que los cánceres provocados por aberraciones en la apoptosis también puedan tratarse mediante los métodos y composiciones de la divulgación. Dichos cánceres pueden incluir, pero sin limitación, linfomas foliculares, carcinomas con mutaciones p53, tumores de mama dependientes de hormonas, próstata y ovario y lesiones precancerosas tales como poliposis adenomatosa familiar y síndromes mielodisplásicos.

Los conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética de la divulgación, y los polipéptidos Fc modificados por ingeniería genética y los polipéptidos C_K modificados por ingeniería genética y las composiciones que los comprenden son útiles para muchos fines, por ejemplo, como opciones terapéuticas contra una amplia gama de enfermedades y trastornos crónicos y agudos incluyendo, pero no limitado a, trastornos autoinmunitarios y/o inflamatorios, que incluyen síndrome de Sjögren, artritis reumatoide, lupus, psoriasis, aterosclerosis, retinopatías diabéticas y otras, fibroplasia retrolental, degeneración macular asociada a la edad, glaucoma neovascular, hemangiomas, hiperplasias tiroideas (incluyendo enfermedad de Graves), trasplante de córnea y otros tejidos, e inflamación crónica, sepsis, artritis reumatoide, peritonitis, enfermedad de Crohn, lesión por reperfusión, septicemia, choque endotóxico, fibrosis quística, endocarditis, psoriasis, artritis (por ejemplo, artritis psoriásica), choque anafiláctico, isquemia orgánica, lesión por reperfusión, lesión de la médula espinal y rechazo del injerto. Otros ejemplos de trastornos autoinmunitarios y/o inflamatorios incluyen, pero no se limitan a, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Addison autoinmunitaria, enfermedades autoinmunes de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, ooforitis y orquitis autoinmunitaria, síndrome de Sjögren, psoriasis, aterosclerosis, retinopatías diabéticas y otras, fibroplasia retrolental, degeneración macular asociada a la edad, glaucoma neovascular, hemangiomas, hiperplasias tiroideas (incluyendo enfermedad de Graves), trasplante de córnea y otros tejidos, e inflamación crónica, sepsis, artritis reumatoide, peritonitis, lesión por reperfusión, septicemia, choque endotóxico, fibrosis quística, endocarditis, psoriasis, artritis (por ejemplo, artritis psoriásica), choque anafiláctico, isquemia orgánica, lesión por reperfusión, lesión de la médula espinal y rechazo de aloinjerto, trombocitopenia autoinmunitaria, enfermedad de Behcet, penfigoide ampuloso, miocardiopatía, dermatitis celíaca, síndrome de disfunción inmunitaria de fatiga crónica (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de CREST, enfermedad de las crioaglutininas, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), neuropatía por IgA, artritis juvenil, liquen plano, lupus eritematoso, enfermedad de Meniere, enfermedad mixta del tejido conectivo, esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo 1 o inmunomediada, miastenia grave, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artropatía psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, Artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis tales como dermatitis herpetiforme vasculitis, vitíligo y granulomatosis de Wegener. Los ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen, pero no se limitan a, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía indiferenciada, artropatía indiferenciada, artritis, osteólisis inflamatoria e inflamación crónica resultante de infecciones víricas o bacterianas crónicas. Las composiciones y los métodos de la divulgación pueden usarse con una o más terapias convencionales que se usan para prevenir, controlar o tratar las enfermedades mencionadas anteriormente.

La divulgación también proporciona métodos para usar los conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética de la divulgación, y los polipéptidos Fc modificados por ingeniería genética y los polipéptidos C_K modificados por ingeniería genética de la divulgación, para inactivar diversos agentes infecciosos tales como virus, hongos, microbios eucariotas y bacterias. En algunas realizaciones, las composiciones de la divulgación pueden usarse para inactivar el RSV, HMPV, PIV o virus de la gripe. En otras realizaciones, las composiciones de la divulgación pueden usarse para inactivar patógenos fúngicos, tales como, pero no limitado a los miembros de los géneros *Naegleria*, *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Histoplasma*, *Candida* o *Tinea*. En otras realizaciones, las composiciones de la divulgación pueden usarse para inactivar microbios eucariotas, tales como, pero no limitado a los miembros de los géneros *Giardia*, *Toxoplasma*, *Plasmodium*, *Trypanosoma* y *Entamoeba*. En otras realizaciones, las composiciones de la divulgación pueden usarse para inactivar patógenos bacterianos, tales como pero no limitado a miembros de los géneros

Staphylococcus, Streptococcus, Pseudomonas, Clostridium, Borrelia, Vibrio y Neisseria.

Las composiciones de la divulgación son útiles para muchos fines, por ejemplo, como opciones terapéuticas contra una amplia gama de enfermedades y trastornos crónicos y agudos incluyendo, pero no limitado a, enfermedades infecciosas, incluyendo enfermedades víricas, bacterianas y fúngicas. Los ejemplos de patógenos víricos incluyen pero no se limitan a: adenovirus (por ejemplo, mastadenovirus y aviadenovirus), herpesviridae (por ejemplo, virus del herpes simple 1, virus del herpes simple 2, virus del herpes simple 5 y virus del herpes simple 6), leviviridae (por ejemplo, levivirus, enterobacterias fase MS2, allovirus), poxviridae (por ejemplo, chordopoxvirinae, parapoxvirus, virus de la viruela aviar, virus de la viruela caprina, virus de la viruela del conejo, suipoxvirus, virus de la viruela de moluscos y entomopoxvirinae), papovaviridae (por ejemplo, virus del polio y virus del papiloma), paramixoviridae (por ejemplo, paramixovirus, virus de la paragrape 1, morbillivirus (por ejemplo, virus del sarampión), rubulavirus (por ejemplo, virus de las paperas), pneumonovirinae (por ejemplo, pneumovirus, virus respiratorio sincicial humano) y metapneumovirus (por ejemplo, neumovirus aviar y metapneumovirus humano)), picornaviridae (por ejemplo, enterovirus, rinovirus, hepatovirus (por ejemplo, virus de la hepatitis A humana), cardiovirus y aptovirus), reoviridae (por ejemplo, ortoreovirus, orbivirus, rotavirus, citovirus, fiovirus, fitoreovirus y orizavirus), retroviridae (por ejemplo, retrovirus tipo B de mamíferos, retrovirus tipo C de mamíferos, retrovirus tipo C aviares, grupo de retrovirus tipo D, retrovirus BLV-HTLV, lentivirus (por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia humana 1 y virus de la inmunodeficiencia humana T, espumavirus), flavivirus (por ejemplo, virus de la hepatitis C), hepadnaviridae (por ejemplo, virus de la hepatitis B), togaviridae (por ejemplo, alfavirus (por ejemplo, virus sindbis) y rubivirus (por ejemplo, virus de la rubéola)), rhabdoviridae (por ejemplo, vesiculovirus, lisavirus, ephemerovirus, citorhabdovirus y necleorhabdovirus), arenaviridae (por ejemplo, arenavirus, virus de la coriomeningitis linfocítica, virus lpp y virus Lassa) y coronaviridae (por ejemplo, coronavirus y torovirus). Los ejemplos de patógenos bacterianos incluyen pero no se limitan a: pero no limitado a, la familia Aquaspirillum, familia Azospirillum, familia Azotobacteraceae, familia Bacteroidaceae, especies de Bartonella, familia Bdellovibrio, especies de Campylobacter, especies de Chlamydia (por ejemplo, Chlamydia pneumoniae), Clostridium, familia Enterobacteriaceae (por ejemplo, especies de Citrobacter, Edwardsiella, Enterobacter aerogenes, especies de Erwinia, Escherichia coli, especies de Hafnia, especies de Klebsiella, especies de Morganella, Proteus vulgaris, Providencia, especies de Salmonella, Serratia marcescens y Shigella flexneri), familia Gardinella, Haemophilus influenzae, familia Halobacteriaceae, familia Helicobacter, familia Legionellaceae, especies de Listeria, familia Methylococcaceae, micobacterias (por ejemplo, Mycobacterium tuberculosis), familia Neisseriaceae, familia Oceanospirillum, familia Pasteurellaceae, especies de Pneumococcus, especies de Pseudomonas, familia Rhizobiaceae, familia Spirillum, familia Spirosomaceae, Staphylococcus (por ejemplo, Staphylococcus aureus resistente a la meticilina y Staphylococcus pyrogenes), Streptococcus (por ejemplo, Streptococcus enteritidis, Streptococcus fasciae y Streptococcus pneumoniae), familia Helicobacter y familia Vampirovibrio. Los ejemplos de patógenos fúngicos incluyen, pero no se limitan a: especies de Absidia (por ejemplo, Absidia corymbifera y Absidia ramosa), especies de Aspergillus, (por ejemplo, Aspergillus flavus, Aspergillus fumigatus, Aspergillus nidulans, Aspergillus niger y Aspergillus terreus), Basidiobolus ranarum, Blastomyces dermatitidis, especies de Candida (por ejemplo, Candida albicans, Candida glabrata, Candida kerr, Candida krusei, Candida parapsilosis, Candida pseudotropicalis, Candida quillermontii, Candida rugosa, Candida stellatoidea y Candida tropicalis), Coccidioides immitis, especies de Conidiobolus, Cryptococcus neoforms, especies de Cunninghamella, dermatofitos, Histoplasma capsulatum, Microsporum gypseum, Mucor pusillus, Paracoccidioides brasiliensis, Pseudallescheria boydii, Rhinosporidium seeberi, Pneumocystis carinii, especies de Rhizopus (por ejemplo, Rhizopus arrhizus, Rhizopus oryzae y Rhizopus microsporus), especies de Saccharomyces, Sporothrix schenckii, zigomicetos y clases tales como Zigomicetos, Ascomicetos, los Basidiomicetos, Deuteromicetos y Oomicetos.

La divulgación también proporciona métodos de uso de conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética para agotar una población de células. En una realización, los métodos de la divulgación son útiles en el agotamiento de los siguientes tipos de células: eosinófilo, basófilo, neutrófilo, célula T, célula B, mastocito, monocitos, célula endotelial y célula tumoral. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la divulgación agotan una población celular respectiva en al menos el 5 por ciento, el 10 por ciento, el 15 por ciento, el 20 por ciento, el 25 por ciento, el 30 por ciento, el 35 por ciento, el 40 por ciento, el 45 por ciento, el 50 por ciento, el 55 por ciento, el 60 por ciento, el 65 por ciento, el 70 por ciento, el 75 por ciento, el 80 por ciento, el 85 por ciento, el 90 por ciento, el 95 por ciento o más, en comparación con un anticuerpo de control no modificado por ingeniería genética o un conjugado del mismo.

Los anticuerpos modificados por ingeniería genética de la divulgación y sus conjugados también pueden ser útiles en el diagnóstico y la detección de enfermedades o síntomas de las mismas. En otra realización, las composiciones de la divulgación pueden ser útiles en la monitorización de la progresión de la enfermedad. En otra realización, las composiciones de la divulgación pueden ser útiles en la monitorización de los regímenes de tratamiento. En otra realización, las composiciones de la divulgación son útiles para el diagnóstico en una aplicación ex vivo, tal como un kit de diagnóstico.

Las composiciones de la divulgación pueden ser útiles en la visualización de antígenos diana. En algunas realizaciones, los antígenos diana son receptores de la superficie celular que se internalizan. En otras realizaciones, el antígeno diana es un antígeno intracelular. En otras realizaciones la diana es un antígeno intranuclear.

En una realización, los anticuerpos modificados por ingeniería genética o los conjugados de anticuerpo y fármaco de

- la divulgación una vez unidos, se internalizan en las células en donde la internalización es de al menos aproximadamente el 10 por ciento, al menos aproximadamente el 20 por ciento, al menos aproximadamente el 30 por ciento, al menos aproximadamente el 40 por ciento, al menos aproximadamente el 50 por ciento, al menos aproximadamente el 60 por ciento, al menos aproximadamente el 70 por ciento, al menos aproximadamente el 80 por ciento o al menos aproximadamente el 90 por ciento, al menos aproximadamente el 100 por ciento, al menos aproximadamente el 110 por ciento, al menos aproximadamente el 130 por ciento, al menos aproximadamente el 140 por ciento, al menos aproximadamente el 150 por ciento, al menos aproximadamente el 160 por ciento o al menos aproximadamente el 170 por ciento más que los anticuerpos de control como se describe en el presente documento.
- 10 El uso de conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética de la divulgación y los polipéptidos Fc modificados por ingeniería genética, los polipéptidos C_K modificados por ingeniería genética y los polipéptidos C_λ modificados por ingeniería genética para el tratamiento de otros cánceres o trastornos autoinmunitarios también se contemplan y están dentro del alcance de la presente divulgación.
- 15 Composiciones farmacéuticas
- En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición, por ejemplo, pero no limitado a, una composición farmacéutica, que contiene un anticuerpo modificado por ingeniería genética o un conjugado de anticuerpo modificado por ingeniería genética, un polipéptido Fc modificado por ingeniería genética o conjugado del mismo, una proteína de fusión Fc modificada por ingeniería genética que comprende una región Fc modificada por ingeniería genética o un conjugado de la misma, un polipéptido C_K modificado por ingeniería genética o un conjugado del mismo y polipéptido C_λ modificado por ingeniería genética o un conjugado del mismo, formulado junto con un portador farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 25 En otro aspecto, la composición es una composición farmacéutica que comprende uno o una combinación de anticuerpos modificados por ingeniería genética, o conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética de la presente divulgación, formulado junto con un portador farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 30 Dichas composiciones pueden incluir uno o una combinación de, por ejemplo, pero no limitado a dos o más anticuerpos modificados por ingeniería genética diferentes de la divulgación. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la divulgación puede comprender una combinación de anticuerpos modificados por ingeniería genética que se unen a diferentes epítomos en el antígeno diana o que tienen actividades complementarias.
- 35 Las composiciones farmacéuticas de la divulgación también pueden administrarse en combiterapia, tales como, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la combiterapia puede incluir un anticuerpo modificado por ingeniería genética o conjugado del mismo de la presente divulgación combinado con al menos otra terapia, en donde la terapia puede ser cirugía, inmunoterapia, quimioterapia, tratamiento de radiación o terapia con fármacos.
- 40 Los compuestos farmacéuticos de la divulgación pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de dichas sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Las sales de adición de ácido incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos alifáticos mono y dicarboxílicos, ácidos alcanóicos fenil-sustituídos, ácidos hidroxil alcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de adición de bases incluyen aquellas derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.
- 45 Una composición farmacéutica de la divulgación también puede incluir un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfito sódico, sulfito sódico y similares; (2) antioxidantes oleosolubles, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, α-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosforoso y similares.
- 50 Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la divulgación incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como el oleato de etilo. Puede mantenerse la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.
- 55 Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede garantizarse tanto mediante procedimientos de esterilización como mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenol sódico y similares. También puede ser deseable incluir
- 60
- 65

agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede producirse mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción tales como el monoestearato de aluminio y la gelatina.

5 Las composiciones farmacéuticas normalmente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, una microemulsión, un liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una concentración alta de fármaco. El portador puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será adecuado incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede llevarse a cabo incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

15 Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por microfiltración.

20 Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los restantes ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los ejemplos de métodos de preparación son secado al vacío y secado por congelación (liofilización) que proporcionan un polvo del principio activo así como cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución de los mismos previamente esterilizada por filtración.

25 Una composición farmacéutica de la divulgación puede prepararse, envasarse o venderse en una formulación adecuada para administración oftálmica. Tales formulaciones pueden, por ejemplo, estar en forma de gotas para los ojos incluyendo, por ejemplo, una solución o suspensión al 0,1-1,0 % (p/p) del principio activo en un vehículo líquido acuoso o aceitoso. Dichas gotas pueden contener además agentes tampón, sales o uno o más de los ingredientes adicionales descritos en el presente documento. Otras formulaciones administrables oftálmicamente que son útiles incluyen aquellas que comprenden el principio activo en forma microcristalina o en una preparación liposómica.

30 Como se usa en el presente documento, "ingredientes adicionales" incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: excipientes; agentes tensioactivos; agentes dispersantes; diluyentes inertes; agentes granulantes y disgregantes; agentes aglutinantes; agentes lubricantes; edulcorantes; aromatizantes; colorantes; conservantes; composiciones fisiológicamente degradables tales como gelatina; vehículos y disolventes acuosos; vehículos y disolventes oleosos; agentes de suspensión; agentes de dispersión o humectantes; agentes emulsionantes; emolientes; tampones; sales; agentes espesantes; cargas; agentes emulsionantes; antioxidantes; antibióticos; agentes antifúngicos; agentes estabilizantes; y materiales poliméricos o hidrófobos farmacéuticamente aceptables.

40 Otros "ingredientes adicionales" que pueden incluirse en las composiciones farmacéuticas de la divulgación se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Genaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1985).

45 En una realización, el anticuerpo modificado por ingeniería genética o el conjugado de anticuerpo modificado por ingeniería genética se administra en una formulación intravenosa como una solución acuosa estéril que contiene 5 mg/ml, o más preferentemente, aproximadamente 10 mg/ml, o aún más preferentemente, aproximadamente 15 mg/ml, o aún más preferentemente, aproximadamente 20 mg/ml de anticuerpo, con acetato sódico, polisorbato 80 y cloruro sódico a un pH que varía de aproximadamente 5 a 6. Preferentemente, la formulación intravenosa es una solución acuosa estéril que contiene 5 o 10 mg/ml de anticuerpo, con acetato sódico 20 mM, polisorbato 80 0,2 mg/ml y cloruro sódico 140 mM a pH 5,5. Además, una solución que comprende un anticuerpo modificado por ingeniería genética o un conjugado de anticuerpo modificado por ingeniería genética puede comprender, entre muchos otros compuestos, histidina, manitol, sacarosa, trehalosa, glicina, poli(etilen)glicol, EDTA, metionina y cualquier combinación de los mismos y muchos otros compuestos conocidos en la técnica relevante.

55 En una realización, parte de la dosis se administra mediante bolo intravenoso y el resto mediante infusión de la formulación del anticuerpo modificado por ingeniería genética o del conjugado del anticuerpo modificado por ingeniería genética. Por ejemplo, puede administrarse una inyección intravenosa de 0,01 mg/kg del anticuerpo modificado por ingeniería genética o del conjugado del anticuerpo modificado por ingeniería genética como una embolada y el resto de una dosis predeterminada del anticuerpo modificado por ingeniería genética o del conjugado del anticuerpo modificado por ingeniería genética puede administrarse mediante inyección intravenosa. Puede administrarse una dosis predeterminada del anticuerpo modificado por ingeniería genética, por ejemplo, durante un período de una hora y media a dos horas a cinco horas.

65 Con respecto a un agente terapéutico, cuando el agente es, por ejemplo, una molécula pequeña, puede estar presente en una composición farmacéutica en forma de éster o sal fisiológicamente aceptable, tal como en combinación con un catión o anión fisiológicamente aceptable, como es bien sabido en la técnica.

Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden prepararse mediante cualquier método conocido o desarrollado en el futuro en la técnica de la farmacología. Generalmente, dichos métodos preparatorios incluyen la etapa de asociar el principio activo con un transportador o con uno o más principios auxiliares, y después, si fuese necesario o si se desea, conformar el producto, o envasarlo, en una unidad mono o

multidosis deseada.

En una realización, las composiciones de la divulgación son formulaciones libres de pirógenos que están sustancialmente libres de endotoxinas y/o sustancias pirogénicas relacionadas. Las endotoxinas incluyen toxinas que están confinadas dentro de un microorganismo y se liberan cuando los microorganismos se descomponen o mueren. Las sustancias pirogénicas también incluyen las que inducen fiebre, termoeestables (glucoproteínas) de la membrana externa de las bacterias y otros microorganismos. Ambas sustancias pueden provocar fiebre, hipotensión y choque si se administran a seres humanos. Debido a los potenciales efectos nocivos, es ventajoso eliminar incluso pequeñas cantidades de endotoxinas de soluciones de medicamentos farmacéuticos administrados por vía intravenosa. La Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos ("FDA") ha establecido un límite superior de 5 unidades de endotoxina (UE) por dosis por kilogramo de peso corporal en un solo período de una hora para aplicaciones de medicamentos intravenosos (The United States Pharmacopeial Convention, Pharmacopeial Forum 26 (1):223 (2000)). Cuando se administran proteínas terapéuticas en cantidades de varios cientos o miles de miligramos por kilogramo de peso corporal resulta ventajoso eliminar incluso trazas de endotoxina. En una realización, los niveles de endotoxinas y pirógenos en la composición son menos de 10 UE/mg, o menos de 5 UE/mg, o menos de 1 UE/mg, o menos de 0,1 UE/mg, o menos de 0,01 UE/mg, o menos de 0,001 UE/mg. En otra realización, los niveles de endotoxinas y pirógenos en la composición son menos de aproximadamente 10 UE/mg, o menos de aproximadamente 5 UE/mg, o menos de aproximadamente 1 UE/mg, o menos de aproximadamente 0,1 UE/mg, o menos de aproximadamente 0,01 UE/mg, o menos de aproximadamente 0,001 UE/mg.

En una realización, la divulgación comprende administrar una composición en donde dicha administración es oral, parenteral, intramuscular, intranasal, vaginal, rectal, lingual, sublingual, bucal, intrabucal, intravenosa, cutánea, subcutánea o transdérmica.

En otra realización la divulgación comprende además administrar una composición en combinación con otras terapias, tales como cirugía, quimioterapia, terapia hormonal, terapia biológica, inmunoterapia o radioterapia.

Dosificación/Administración

Para preparar composiciones farmacéuticas o estériles que incluyan un anticuerpo modificado por ingeniería genética o un conjugado de anticuerpo modificado por ingeniería genética de la divulgación, el conjugado anticuerpo/anticuerpo se mezcla con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones de agentes terapéuticos y de diagnóstico pueden prepararse mezclándolos con portadores excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables, en forma de, por ejemplo, polvos liofilizados, suspensiones espesas, soluciones acuosas, lociones o suspensiones (véanse, por ejemplo, Hardman, *et al.* (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, Nueva York, N.Y.; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams y Wilkins, Nueva York, N. Y.; Avis, *et al.* (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner y Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y.).

La selección de un régimen de administración para un tratamiento terapéutico depende de varios factores, incluyendo la tasa de recambio sérico o tisular de la entidad, el nivel de los síntomas, la inmunogenicidad de la entidad y la accesibilidad de las células diana en la matriz biológica. En determinadas realizaciones, un régimen de administración maximiza la cantidad de tratamiento terapéutico administrado al paciente en consonancia con un nivel aceptable de efectos secundarios. En consecuencia, la cantidad de producto biológico administrado depende en parte de la entidad particular y de la gravedad de la afección a tratar. Las directrices para seleccionar dosis apropiadas de anticuerpos, citocinas y moléculas pequeñas disponibles están disponibles (véanse, por ejemplo, Wawrzynczak, 1996, Antibody Therapy, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, RU; Kresina (ed.), 1991, Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis, Marcel Dekker, Nueva York, N.Y.; Bach (ed.), 1993, Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases, Marcel Dekker, Nueva York, N. Y.; Baert, *et al.*, 2003, New Engl. J. Med. 348:601-608; Milgrom, *et al.*, 1999, New Engl. J. Med. 341:1966-1973; Slamon, *et al.*, 2001, New Engl. J. Med. 344:783-792; Beniaminovitz, *et al.*, 2000, New Engl. J. Med. 342:613-619; Ghosh, *et al.*, 2003, New Engl. J. Med. 348:24-32; Lipsky, *et al.*, 2000, New Engl. J. Med. 343:1594-1602).

La determinación de la dosis apropiada la realiza el médico, por ejemplo, usando parámetros o factores conocidos o sospechados en la técnica que afectan al tratamiento o que se prevé que afectarán al tratamiento. Generalmente, la dosis comienza con una cantidad algo menor que la dosis óptima y se aumenta en pequeños incrementos en lo sucesivo hasta que se logra el efecto deseado u óptimo en relación con cualquier efecto secundario negativo. Las medidas de diagnóstico importantes incluyen las de los síntomas de, por ejemplo, la inflamación o el nivel de citocinas inflamatorias producidas.

Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden variarse para obtener una cantidad del principio activo que es eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin ser tóxicos para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una diversidad de factores farmacocinéticos, incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente divulgación empleada o el éster, la sal o la amida del mismo, la vía de administración, el momento de la administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se está empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados junto con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, la afección, la salud general y los antecedentes médicos anteriores del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

Las composiciones que comprenden anticuerpos modificados por ingeniería genética o conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética de la divulgación pueden proporcionarse mediante infusión continua o mediante dosis a intervalos de, por ejemplo, un día, una semana o 1-7 veces por semana. Las dosis pueden proporcionarse por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía tópica, por vía oral, por vía nasal, por vía rectal, intramuscular, por vía intracerebral o por inhalación. Un protocolo de dosis específico es aquel que implica la dosis máxima o la frecuencia de dosis que evita efectos secundarios indeseables significativos. Una dosis semanal total puede ser de al menos 0,05 micro g/kg de peso corporal, al menos 0,2 micro g/kg, al menos 0,5 micro g/kg, al menos 1 micro g/kg, al menos 10 micro g/kg, al menos 100 micro g/kg, al menos 0,2 mg/kg, al menos 1,0 mg/kg, al menos 2,0 mg/kg, al menos 10 mg/kg, al menos 25 mg/kg o al menos 50 mg/kg (véanse, por ejemplo, Yang, *et al.*, 2003, New Engl. J. Med. 349:427-434; Herold, *et al.*, 2002, New Engl. J. Med. 346:1692-1698; Liu, *et al.*, 1999, J. Neurol. Neurosurg. Psych. 67:451-456; Portielji, *et al.*, 2003, Cancer. Immunol. Immunother. 52: 133-144). La dosis puede ser de al menos 15 micro g, al menos 20 micro g, al menos 25 micro g, al menos 30 micro g, al menos 35 micro g, al menos 40 micro g, al menos 45 micro g, al menos 50 micro g, al menos 55 micro g, al menos 60 micro g, al menos 65 micro g, al menos 70 micro g, al menos 75 micro g, al menos 80 micro g, al menos 85 micro g, al menos 90 micro g, al menos 95 micro g o al menos 100 micro g. Las dosis administradas a un sujeto pueden ser al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12, o más.

Para los anticuerpos modificados por ingeniería genética o conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética de la divulgación, la dosis administrada a un paciente puede ser de 0,0001 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente. La dosis puede estar entre 0,0001 mg/kg y 20 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 10 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 5 mg/kg, 0,0001 y 2 mg/kg, 0,0001 y 1 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,75 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,5 mg/kg, 0,0001 mg/kg a 0,25 mg/kg, 0,0001 a 0,15 mg/kg, 0,0001 a 0,10 mg/kg, 0,001 a 0,5 mg/kg, 0,01 a 0,25 mg/kg o 0,01 a 0,10 mg/kg del peso corporal del paciente.

La dosis de los anticuerpos modificados por ingeniería genética o conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética de la divulgación puede calcularse usando el peso del paciente en kilogramos (kg) multiplicado por la dosis a administrar en mg/kg. La dosis de los anticuerpos de la divulgación puede ser de 150 micro g/kg o menos, 125 micro g/kg o menos, 100 micro g/kg o menos, 95 micro g/kg o menos, 90 micro g/kg o menos, 85 micro g/kg o menos, 80 micro g/kg o menos, 75 micro g/kg o menos, 70 micro g/kg o menos, 65 micro g/kg o menos, 60 micro g/kg o menos, 55 micro g/kg o menos, 50 micro g/kg o menos, 45 micro g/kg o menos, 40 micro g/kg o menos, 35 micro g/kg o menos, 30 micro g/kg o menos, 25 micro g/kg o menos, 20 micro g/kg o menos, 15 micro g/kg o menos, 10 micro g/kg o menos, 5 micro g/kg o menos, 2,5 micro g/kg o menos, 2 micro g/kg o menos, 1,5 micro g/kg o menos, 1 micro g/kg o menos, 0,5 micro g/kg o menos o 0,5 micro g/kg o menos del peso corporal de un paciente.

La dosis unitaria de los anticuerpos modificados por ingeniería genética o conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética de la divulgación puede ser de 0,1 mg a 20 mg, de 0,1 mg a 15 mg, de 0,1 mg a 12 mg, de 0,1 mg a 10 mg, de 0,1 mg a 8 mg, de 0,1 mg a 7 mg, de 0,1 mg a 5 mg, de 0,1 a 2,5 mg, de 0,25 mg a 20 mg, de 0,25 a 15 mg, de 0,25 a 12 mg, de 0,25 a 10 mg, de 0,25 a 8 mg, de 0,25 mg a 7 mg, de 0,25 mg a 5 mg, de 0,5 mg a 2,5 mg, de 1 mg a 20 mg, de 1 mg a 15 mg, de 1 mg a 12 mg, de 1 mg a 10 mg, de 1 mg a 8 mg, de 1 mg a 7 mg, de 1 mg a 5 mg o de 1 mg a 2,5 mg.

La dosis de los anticuerpos modificados por ingeniería genética o conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética de la divulgación puede lograr un título en suero de al menos 0,1 micro g/ml, al menos 0,5 micro g/ml, al menos 1 micro g/ml, al menos 2 micro g/ml, al menos 5 micro g/ml, al menos 6 micro g/ml, al menos 10 micro g/ml, al menos 15 micro g/ml, al menos 20 micro g/ml, al menos 25 micro g/ml, al menos 50 micro g/ml, al menos 100 micro g/ml, al menos 125 micro g/ml, al menos 150 micro g/ml, al menos 175 micro g/ml, al menos 200 micro g/ml, al menos 225 micro g/ml, al menos 250 micro g/ml, al menos 275 micro g/ml, al menos 300 micro g/ml, al menos 325 micro g/ml, al menos 350 micro g/ml, al menos 375 micro g/ml o al menos 400 micro g/ml en un sujeto. Como alternativa, la dosis de los anticuerpos de la divulgación puede alcanzar un título en suero de al menos 0,1 micro g/ml, al menos 0,5 micro g/ml, al menos 1 micro g/ml, al menos 2 micro g/ml, al menos 5 micro g/ml, al menos 6 micro g/ml, al menos 10 micro g/ml, al menos 15 micro g/ml, al menos 20 micro g/ml, al menos 25 micro g/ml, al menos 50 micro g/ml, al menos 100 micro g/ml, al menos 125 micro g/ml, al menos 150 micro g/ml, al menos 175 micro g/ml, al menos 200 micro g/ml, al menos 225 micro g/ml, al menos 250 micro g/ml, al menos 275 micro g/ml, al menos 300 micro g/ml, al menos 325 micro g/ml, al menos 350 micro g/ml, al menos 375 micro g/ml o al menos 400 micro g/ml en el sujeto.

Las dosis de anticuerpos modificados por ingeniería genética o conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética de la divulgación pueden repetirse y las administraciones pueden estar separadas por al menos 1 día, 2 días, 3 días, 5 días, 10 días, 15 días, 30 días, 45 días, 2 meses, 75 días, 3 meses o al menos 6 meses.

- 5 Una cantidad eficaz para un paciente en particular puede variar dependiendo de factores como la afección que se esté tratando, la salud general del paciente, el método, la vía y la dosis de administración y la gravedad de los efectos secundarios (véanse, por ejemplo, Maynard, *et al.*, 1996, A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Raton, Fla.; Dent, 2001, Good Laboratory and Good Clinical Practice, Urch Publ, Londres, RU).
- 10 La vía de administración puede ser mediante, por ejemplo, aplicación tópica o cutánea, inyección o infusión por vía intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial, intracerebroespinal, intralesional, o mediante sistemas de liberación sostenida o un implante (véase, por ejemplo, Sidman *et al.*, 1983, Biopolymers 22:547-556; Langer, *et al.*, 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277; Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105; Epstein, *et al.*, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 82:3688-3692; Hwang, *et al.*, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 77:4030-4034; Pat. de EE.UU. N.º 6.350.466 y 6.316.024). En caso necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Además, también puede emplearse administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador y formulación con un agente de formación de aerosol. Véanse, por ejemplo, Pat. de EE.UU. N.º 6.019.968, 5.985.320, 5.985.309, 5.934.272, 5.874.064, 5.855.913, 5.290.540 y 4.880.078; y las Publicaciones PCT N.º WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 y WO 99/66903. En una realización, un anticuerpo modificado por ingeniería genética o un conjugado de anticuerpo modificado por ingeniería genética, combiterapia o una composición de la divulgación se administra usando la tecnología de suministro de fármacos pulmonares Alkermes AIR™ (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.).
- 25 Una composición de la presente divulgación también puede administrarse a través de una o más vías de administración usando uno o más de una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Como apreciará el experto en la materia, la vía y/o el modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Las vías de administración seleccionadas para los anticuerpos de la divulgación incluyen intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías parenterales de administración, por ejemplo, mediante inyección o perfusión. La administración parenteral puede representar modos de administración distintos a la administración enteral y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal. Como alternativa, una composición de la divulgación puede administrarse por una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, por vía intranasal, por vía oral, por vía vaginal, por vía rectal, vía sublingual o por vía tópica.
- 40 Si los anticuerpos modificados por ingeniería genética o los conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética de la divulgación se administran en un sistema de liberación controlada o de liberación sostenida, puede usarse una bomba para lograr la liberación controlada o sostenida (véase Langer, anteriormente mencionado; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20; Buchwald *et al.*, 1980, Surgery 88:501; Saudek *et al.*, 1989, N. Engl. J. Med. 321:514).
- 45 Los materiales poliméricos pueden usarse para lograr la liberación controlada o sostenida de las terapias de la divulgación (véase, por ejemplo, Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen y Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, 1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; véase también Levy *et al.*, 1985, Science 11 225:190; During *et al.*, 1979, Ann. Neurol. 25:351; Howard *et al.*, 1989, J. Neurosurg. 7 1: 105; Pat. de EE.UU. N.º 5.679.377; Pat. de EE.UU. N.º 5.916.597; Pat. de EE.UU. N.º 5.912.015; Pat. de EE.UU. N.º 5.989.463; Pat. de EE.UU. N.º 5.128.326; Publicación PCT N.º WO 99/15154; y la Publicación PCT N.º WO 99/20253.
- 50 Los ejemplos de polímeros usados en formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero no se limitan a, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), poli(metil metacrilato), ácido poli(acrílico), poli(acetato de etileno-co-vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinilpirrolidona), alcohol polivinílico, poli(acrilamida, polietilenglicol), polilactidas (PLA), polioeactida-co-glucólidos (PLGA) y polioeésteres. En una realización, el polímero usado en una formulación de liberación sostenida es inerte, libre de impurezas lixiviables, estable durante el almacenamiento, estéril y biodegradable. Un sistema de liberación controlada o sostenida puede colocarse en proximidad de la diana profiláctica o terapéutica, requiriendo de este modo solamente una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, anteriormente citado, vol. 2, págs. 115-138 (1984)).
- 60 Los sistemas de liberación controlada se analizan en la revisión de Langer, 1990, Science 249:1527-1533. Cualquier técnica conocida por un experto en la materia puede usarse para producir formulaciones de liberación sostenida que comprendan uno o más anticuerpos de la divulgación o conjugados de los mismos. Véanse, por ejemplo, Pat. de EE.UU. N.º 4.526.938, Publicación de Patente Internacional N.º WO 91/05548, WO 96/20698, Ning *et al.*, 1996,
- 65 "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel", Radiotherapy and Oncology 59:179-189, Song *et al.*, 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating

Emulsions", PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology 50:372-397, Cleek et al, 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application", Pro. MI. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854 y Lam et al., 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery", Proc. MI. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-160.

Si el anticuerpo modificado por ingeniería genética o el conjugado de anticuerpo modificado por ingeniería genética de la divulgación se administra por vía tópica, puede formularse en forma de una pomada, crema, parche transdérmico, loción, gel, champú, pulverización, aerosol, solución, emulsión u otra forma bien conocida por un experto en la materia. Véanse, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19ª ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995). Para las formas farmacéuticas tópicas no pulverizables, las formas viscosas a semisólidas o sólidas que comprenden un portador o uno o más excipientes compatibles con la aplicación tópica y que tienen una viscosidad dinámica, en algunos casos, se emplean normalmente más que el agua. Las formulaciones adecuadas incluyen, sin limitación, soluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, pomadas, polvos, linimentos, salvas y similares, que están, si se desea, esterilizados o mezclados con coadyuvantes (por ejemplo, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, tampones o sales) para influenciar diversas propiedades, tales como, por ejemplo, presión osmótica. Otras formas farmacéuticas tópicas adecuadas incluyen preparaciones en aerosol pulverizables en donde el principio activo, en algunos casos, en combinación con un portador sólido o líquido inerte, se envasa en una mezcla con un componente volátil a presión (por ejemplo, un propulsor gaseoso, tal como freón) o en una botella flexible. Los agentes hidratantes o humectantes también pueden añadirse si se desea a las composiciones farmacéuticas y las formas farmacéuticas. Los ejemplos de dichos ingredientes adicionales se conocen bien en la técnica.

Si las composiciones que comprenden anticuerpos modificados por ingeniería genética o conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética se administran por vía intranasal, pueden formularse en una forma de aerosol, pulverización, nebulización o en forma de gotas. En particular, los agentes profilácticos o terapéuticos para su uso según la presente divulgación pueden suministrarse convenientemente en forma de una presentación de pulverización en aerosol a partir de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado (por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado). En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula que suministra una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos (compuestos por, por ejemplo, gelatina) para su uso en un inhalador o insuflador pueden formularse para que contengan una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Los métodos para la coadministración o el tratamiento con un segundo agente terapéutico, por ejemplo, una citocina, esteroide, un agente quimioterapéutico, antibiótico o radiación, son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Hardman, et al. (eds.) (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10ª ed., McGraw-Hill, Nueva York, N.Y.; Poole y Peterson (eds.) (2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach, Lippincott, Williams y Wilkins, Phila., Pa.; Chabner y Longo (eds.) (2001) Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams y Wilkins, Phila., Pa.). Una cantidad efectiva de terapia puede disminuir los síntomas en al menos el 10 por ciento; en al menos el 20 por ciento; al menos aproximadamente el 30 por ciento; al menos el 40 por ciento o al menos el 50 por ciento.

Las terapias adicionales (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos), que pueden administrarse en combinación con los anticuerpos modificados por ingeniería genética o conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética de la divulgación, pueden administrarse con menos de 5 minutos de diferencia, con menos de 30 minutos de diferencia, con una diferencia de 1 hora, con una diferencia de aproximadamente 1 hora, con una diferencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 horas, con una diferencia de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas, con una diferencia de aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas, con una diferencia de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas, con una diferencia de aproximadamente 5 horas a aproximadamente 6 horas, con una diferencia de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 horas, con una diferencia de aproximadamente 7 horas a aproximadamente 8 horas, con una diferencia de aproximadamente 8 horas a aproximadamente 9 horas, con una diferencia de aproximadamente 9 horas a aproximadamente 10 horas, con una diferencia de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 11 horas, con una diferencia de aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas, con una diferencia de aproximadamente 12 horas a 18 horas, con una diferencia de 18 horas a 24 horas, con una diferencia de 24 horas a 36 horas, con una diferencia de 36 horas a 48 horas, con una diferencia de 48 horas a 52 horas, con una diferencia de 52 horas a 60 horas, con una diferencia de 60 horas a 72 horas, con una diferencia de 72 horas a 84 horas, con una diferencia de 84 horas a 96 horas o de 96 horas a 120 horas de los anticuerpos de la divulgación. Las dos o más terapias pueden administrarse dentro de una misma visita del paciente.

Los anticuerpos modificados por ingeniería genética o los conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética de la divulgación y las otras terapias pueden administrarse cíclicamente. La terapia cíclica implica la administración de una primera terapia (por ejemplo, un primer agente profiláctico o terapéutico) durante un período de tiempo, seguido de la administración de una segunda terapia (por ejemplo, un segundo agente profiláctico o terapéutico) durante un período de tiempo, opcionalmente, seguido de la administración de una tercera terapia (por ejemplo, agente profiláctico o terapéutico) durante un período de tiempo y así sucesivamente, y repitiendo esta

administración secuencial, es decir, el ciclo, con el fin de reducir el desarrollo de resistencia a una de las terapias, para evitar o reducir los efectos secundarios de una de las terapias, y/o para mejorar la eficacia de las terapias.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos modificados por ingeniería genética o los conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética de la divulgación pueden formularse para garantizar una distribución adecuada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BHE) excluye muchos compuestos altamente hidrófilos. Para garantizar que los compuestos terapéuticos de la divulgación crucen la BHE (si se desea), pueden formularse, por ejemplo, en liposomas. Para los métodos de fabricación de liposomas, véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N.º 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender una o más fracciones que se transportan selectivamente a células u órganos específicos, potenciando de esta manera la administración dirigida de fármacos (véase, por ejemplo, V.V. Ranade, 1989, J. Clin. Pharmacol. 29:685). Las fracciones de direccionamiento ilustrativas incluyen folato o biotina (véanse, por ejemplo, Patente de EE.UU. 5.416.016; manósidos (Umezawa *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 153: 1038); anticuerpos (P. G. Bloeman *et al.*, 1995, FEBS Lett. 357: 140; M. Owais *et al.*, 1995, Antimicrob. Agents Chemother. 39: 180); receptor de proteína A tensioactiva (Briscoe *et al.* (1995) Am. J. Physiol. 1233: 134); p120 (Schreier *et al.* (1994) J. Biol. Chem. 269:9090); véanse también K. Keinanen; M.L. Laukkanen, 1994, FEBS Lett. 346:123; Killian; Fidler, 1994; Immunomethods 4:273.

La divulgación proporciona protocolos para la administración de una composición farmacéutica que comprende anticuerpos modificados por ingeniería genética o conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética de la divulgación solos o en combinación con otras terapias a un sujeto que lo necesita. Las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) de las combiterapias de la presente divulgación pueden administrarse de forma concomitante o secuencial a un sujeto. La terapia (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) de las combiterapias de la presente divulgación también pueden administrarse de forma cíclica. La terapia cíclica implica la administración de una primera terapia (por ejemplo, un primer agente profiláctico o terapéutico) durante un período de tiempo, seguido de la administración de una segunda terapia (por ejemplo, un segundo agente profiláctico o terapéutico) durante un período de tiempo y repitiendo esta administración secuencial, es decir, el ciclo, con el fin de reducir el desarrollo de resistencia a una de las terapias (por ejemplo, agentes), para evitar o reducir los efectos secundarios de una de las terapias (por ejemplo, agentes) y/o para mejorar, la eficacia de las terapias.

Las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) de las combiterapias de la divulgación pueden administrarse a un sujeto al mismo tiempo. La expresión "al mismo tiempo" no se limita a la administración de terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) exactamente al mismo tiempo, sino que más bien se entiende que una composición farmacéutica que comprende anticuerpos modificados por ingeniería genética o conjugados de anticuerpos modificados por ingeniería genética de la divulgación se administran a un sujeto en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo de tal manera que los anticuerpos de la divulgación o los conjugados de los mismos pueden actuar junto con la otra u otras terapias para proporcionar un mayor beneficio que si se administraran de otra manera. Por ejemplo, cada terapia puede administrarse a un sujeto al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden en diferentes puntos del tiempo; sin embargo, si no se administran al mismo tiempo, deben administrarse con una frecuencia suficientemente cercana en el tiempo para proporcionar el efecto terapéutico o profiláctico deseado. Cada terapia puede administrarse a un sujeto por separado, en cualquier forma adecuada y por cualquier vía adecuada. En diversas realizaciones, las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) se administran a un sujeto durante menos de 15 minutos, menos de 30 minutos, menos de 1 hora de separación, con una diferencia de aproximadamente 1 hora, con una diferencia de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas, con una diferencia de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas, con una diferencia de aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas, con una diferencia de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas, con una diferencia de aproximadamente 5 horas a aproximadamente 6 horas, con una diferencia de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 horas, con una diferencia de aproximadamente 7 horas a aproximadamente 8 horas, con una diferencia de aproximadamente 8 horas a aproximadamente 9 horas, con una diferencia de aproximadamente 9 horas a aproximadamente 10 horas, con una diferencia de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 11 horas, con una diferencia de aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas, con una diferencia de 24 horas, con una diferencia de 48 horas, con una diferencia de 72 horas o con una diferencia de 1 semana. En otras realizaciones, se administran dos o más terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) a un paciente en la misma visita.

Los agentes profilácticos o terapéuticos de las combiterapias pueden administrarse a un sujeto en la misma composición farmacéutica. Como alternativa, los agentes profilácticos o terapéuticos de las combiterapias pueden administrarse simultáneamente a un sujeto en composiciones farmacéuticas separadas. Los agentes profilácticos o terapéuticos pueden administrarse a un sujeto mediante la misma vía de administración o mediante diferentes vías de administración.

Equivalentes

Se considera que la memoria descriptiva escrita anterior es suficiente para permitir que un experto en la materia ponga en práctica la divulgación. La descripción anterior y los Ejemplos detallan determinadas realizaciones ilustrativas de la divulgación. Se apreciará, sin embargo, que no importa cuán detallado pueda aparecer en el texto lo anterior, la divulgación puede ponerse en práctica de muchas maneras y la divulgación debe interpretarse de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

Realizaciones ilustrativas

La invención se describe además en detalle por referencia a los siguientes ejemplos experimentales. Estos ejemplos se proporcionan solo con fines ilustrativos y no pretenden ser limitantes, salvo que se indique lo contrario.

Ejemplos

EJEMPLO 1:Modificación por ingeniería genética de cisteínas reactivas en la región IqG1-Fc del anticuerpo humano para conjugación específica del sitio

Las estrategias de conjugación convencionales para conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC) se basan en la conjugación aleatoria de la carga útil al anticuerpo a través de lisinas o cisteínas. Los métodos ejemplificados en el presente documento producen una población homogénea de ADC compuesta por especies con una relación fármaco:anticuerpo (DAR) molar definida. Los datos divulgados en el presente documento demuestran que la conjugación específica del sitio de cargas tóxicas con anticuerpos que usan restos de aminoácidos reactivos en estas nuevas posiciones produce preparaciones de ADC homogéneas con estequiometría uniforme, lo que da como resultado un perfil farmacocinético, de biodistribución y de seguridad mejorado. Los datos divulgados en el presente documento demuestran un enfoque mediante el cual se modificaron por ingeniería genética restos de cisteína reactivos en las regiones constantes de anticuerpos (por ejemplo, regiones constantes de cadena pesada y ligera) para facilitar la generación de ADC homogéneos con una relación fármaco:anticuerpo de 2 o 4 y el uso exitoso de estos anticuerpos novedosos como una plataforma útil para la conjugación específica del sitio para varias fracciones de orientación terapéutica.

En esencia, la estructura cristalina de la IgG1 humana (disponible públicamente en Sondermann *et al.*, 2000, Nature 406:267-273; PDB código 3DO3, 10.2210/pdb3do3/pdb) se usó para predecir, usando modelos estructurales, las posiciones donde deben introducirse las cisteínas reactivas para una conjugación óptima con un agente reactivo con sulfhidrilo. Las doce posiciones expuestas en la Tabla 1, a continuación, se identificaron en los dominios CH2 y CH3 de la IgG1 humana basándose en los siguientes criterios: de aproximadamente el 30 al 50 % de accesibilidad al disolvente, retención de la estructura/estabilidad de la proteína y falta de interferencia de la introducción de cisteínas reactivas en cada posición con las propiedades funcionales del anticuerpo tales como, pero no limitado a, unión al antígeno, unión de FcγR, unión a FcRn y/o unión a la proteína A. La secuencia de aminoácidos de la IgG1 de tipo silvestre sin mutaciones y con numeración en orden secuencial (empezando en alanina 1 y terminando en lisina 330) es la siguiente y se designa SEQ ID NO:1:

```
ASTKGPSVFEP LAPSSKSTSG CTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSCV 50
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP 100
KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS 150
HEDPEVKFNW YVDCVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNCK 200
EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC 250
LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSGGSFFLY SKLTVDKSRW 300
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 330
```

La Tabla 2 expone la ubicación de las mutaciones en relación con la IgG1 humana endógena de tipo silvestre en donde el resto de aminoácido se mutó a cisteína para la conjugación específica del sitio reactivo de tiol. La Tabla 2 indica las posiciones donde los restos de IgG1 humana fueron reemplazados por cisteínas reactivas. Las posiciones se identifican usando el sistema de numeración de índice de la UE establecido en Kabat *et al.* (1991, Publicación del NIH 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, VA) y también de acuerdo con la numeración secuencial relativa a la secuencia de SEQ ID NO:1.

Tabla 2

| ID de posición de la cisteína modificada por ingeniería genética (Kabat EU) | Posición de Cys modificada por ingeniería genética (N.º secuencial) | ID de secuencia del mutante Cys que comprende Fc de longitud completa | Aminoácidos que flanquean la cisteína modificada por ingeniería genética que está subrayada | SEQ ID NO de los aminoácidos que flanquean la cisteína modificada por ingeniería genética |
|---|---|---|---|---|
| S254C | S137 | SEQ ID NO. 8 | PPKPKDTLMICRTPEVTCVVV | 96 |
| T359C | T242 | SEQ ID NO. 37 | YTLPPSREEMCKNQVSLTCLV | 97 |
| N361C | N244 | SEQ ID NO. 39 | LPPSREEMTKCQVSLTCLVKG | 98 |
| E380C | E263 | SEQ ID NO. 45 | KGFYPSDIAVCWESNGQPENN | 99 |
| S383C | S266 | SEQ ID NO. 47 | YPSDIAVEWEKNGQPENNYKT | 100 |
| N384C | N267 | SEQ ID NO. 48 | PSDIAVEWESKNGQPENNYKTT | 101 |
| K392C | K275 | SEQ ID NO. 52 | ESNGQPENNYCTTPPVLDSDG | 102 |
| L398C | L281 | SEQ ID NO. 54 | ENNYKTTPPVCDSDGSFFLYS | 103 |
| F404C | F287 | SEQ ID NO. 56 | TPPVLDSDGSCFLYSKLTVDK | 104 |
| V422C | V305 | SEQ ID NO. 64 | VDKSRWQQGNCFSVMHEAL | 105 |
| S440C | S323 | SEQ ID NO. 71 | VMHEALHNHYTQKCLSLSPGK | 106 |
| L443C | L326 | SEQ ID NO. 72 | VMHEALHNHYTQKSLSCSPGK | 107 |

MATERIALES Y MÉTODOS

5 Generación de anticuerpo IgG1 humano único modificado por ingeniería genética con cisteína

Se introdujeron restos de cisteína reactivos individuales en un anticuerpo humanizado que comprende dominios variables de cadena pesada y ligera humanizados que se unen específicamente a 5T4 humano y a una región Fc de IgG1 humana (el anticuerpo al que en el presente documento se denomina anti-5T4 o simplemente "5T4"). Los restos de cisteína reactivos se introdujeron en el Fc de IgG1 en las doce posiciones enumeradas en la Tabla 2 usando un método de mutagénesis por PCR superpuesta. La secuencia de aminoácidos de la IgG1 humana de tipo silvestre, sin mutaciones, se establece en SEQ ID NO:1.

La mutagénesis por PCR se realizó como sigue. Los oligonucleótidos mutagénicos sentido y antisentido que albergan las mutaciones de cisteína individuales así como los cebadores flanqueantes de la región constante de IgG1 humana directos e inversos se sintetizaron en Integrated DNA Technologies, Inc (ParkCoralville, Iowa). La reacción de PCR 1 contenía cien nanogramos (ng) de ADN plasmídico que codificaba el anticuerpo anti-5T4, 100 pmoles de oligonucleótido cebador flanqueante directo, 100 pmoles de oligonucleótido mutagénico antisentido, 1 µl de polimerasa Vent® (New England Biolabs Inc., Ipswich, Massachusetts), 25 µl de tampón de PCR 2x HN (EPICENTRE® Biotechnologies, Madison, WI) y H₂O para llevar el volumen de la reacción a 50 µl. De manera similar, la reacción de PCR 2 se realizó mezclando 100 ng de ADN plasmídico codificante del anticuerpo A1 anti-5T4, 100 pmoles de oligonucleótido mutagénico sentido, 100 pmoles de oligonucleótido cebador flanqueante inverso, 1 µl de polimerasa Vent®, 25 µl de tampón de PCR 2x HN y adición de H₂O para llevar el volumen de la reacción a 50 µl. Los parámetros de PCR para las reacciones 1 y 2 fueron 95 °C durante 1 minuto, 63 °C durante 1 minuto, 72 °C durante 1 minuto para 25 ciclos y a continuación 10 minutos a 72 °C. La reacción de PCR final se realizó mezclando 1 µl de cada una de las reacciones de PCR 1 y 2, 100 pmoles de cada uno de los oligonucleótidos cebadores flanqueantes directos e inversos, 1 µl de polimerasa Vent®, 25 µl de tampón de PCR 2x HN y H₂O para llevar el volumen de la reacción a 50 µl. Los parámetros finales de la reacción de PCR fueron los mismos que los usados para las reacciones 1 y 2. Las variantes de IgG1 humanas que albergan los restos de cisteína modificados por ingeniería genética individualmente se unieron a la región variable de la cadena pesada A1 usando la ADN ligasa T4 (New England Biolabs Inc., Ipswich, Massachusetts) y se confirmó la secuencia del ácido nucleico.

Evaluación de la expresión transitoria de variantes de anticuerpos anti-5T4 modificados por ingeniería genética con cisteína única

Para confirmar que el anticuerpo anti-5T4 humanizado que comprende la cisteína única modificada por ingeniería genética podría expresarse de manera eficiente, las células COS-1 se cotransfectaron transitoriamente con ADN plasmídico que codifica las variantes de cisteína y el anticuerpo anti-5T4 precursor, es decir, la región Fc de IgG1 de

tipo silvestre que no contenía ninguna mutación, usando métodos convencionales. Después de un período de 48 horas, se recogió el medio de cultivo celular y el medio acondicionado resultante que contenía las variantes del anticuerpo 5T4-cisteína se cuantificó mediante ELISA sándwich de IgG humana total. Resumiendo, se recubrió una placa ELISA de fondo plano (Costar n.º de catálogo 3590) durante la noche a temperatura ambiente con 100 µl de cada pocillo de 1 µ/ml de IgG antihumana de cabra en PBS (Thermo/Pierce n.º de catálogo 31125). Las placas se bloquearon con 100 µl/pocillo de una solución de caseína al 0,02 % en PBS durante un mínimo de 3 horas o hasta 24 horas a temperatura ambiente. Los patrones y las muestras se diluyeron en serie en tampón de ensayo (BSA al 0,5 % + Tween-20 al 0,02 % en PBS) y se añadieron 100 µl a la placa ELISA recubierta/bloqueada y se incubaron durante 3 a 24 horas a temperatura ambiente. El contenido de la placa se descartó y la placa se lavó 4 veces con Tween-20 al 0,03 % en PBS, 200 µl por pocillo. Cabra anti-IgG humana (Thermo/Pierce n.º de catálogo 31413) se diluyó 1:5000 en tampón de ensayo, se añadieron 100 µl al pocillo y se dejó incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente. La placa se lavó como se describió previamente y se desarrolló en 100 µl por pocillo BioFX TMB (3,3',5,5' tetrametilbencidina; N.º de Cat. TMBW-0100-01, BioFX Labs., Inc., Owings Mills, MD). La reacción se detuvo en 100 µl por pocillo con H₂SO₄ 0,18 N y la placa se leyó a 450 nM en el lector de placas Molecular Devices vMax. La concentración de anticuerpos en las desconocidas se calculó a partir del intervalo lineal de la curva de la serie de dilución del patrón. Como se muestra en la Tabla 3, todas las variantes de anticuerpos anti-5T4 modificadas por ingeniería genética con cisteína única se expresaron a un nivel comparable al anticuerpo anti-5T4 precursor que comprende la región constante IgG1 humana de tipo silvestre que carece de mutaciones. Por lo tanto, estos datos demuestran que el nivel de expresión transitoria de variantes de anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína única no se vio afectado por la introducción de cisteínas reactivas en estas posiciones.

TABLA 3

| Variante anti-5T4 (posición de la mutación indicada mediante la numeración EU de Kabat) | IgG humana en el medio de cultivo celular [µg/ml] |
|---|---|
| Anticuerpo anti-5T4 precursor | 39,8 |
| 5T4-S254C | 38,6 |
| 5T4-T359C | 39,9 |
| 5T4-E380C | 50,1 |
| 5T4-K392C | 47,0 |
| 5T4-F404C | 47,3 |
| 5T4-V422C | 35,6 |
| 5T4-S440C | 44,4 |
| 5T4-L443C | 43,3 |

Producción de células transfectadas de forma estable que expresan variantes de cisteína única anti-5T4

Para determinar que las variantes de anticuerpos modificados por ingeniería genética individualmente podrían expresarse de manera estable en las células y producirse a gran escala, las células CHO se cotransfectaron con ADN de cadena pesada y ligera que codifica ocho (S254C, T359C, E380C, K392C, L398C, V422C, S440C and L443C) variantes de cisteína únicas de anticuerpos anti-5T4 y grupos de alta producción estables mediante procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica. El ADN se cotransfectó en las células CHO ya que las construcciones de expresión de cadena pesada y ligera estaban en plásmidos de expresión separados. El grupo de CHO para el anticuerpo anti-5T4 precursor también se generó cotransfectando construcciones de expresión de cadena pesada y ligera en células CHO. Para todos los mutantes de cisteína Fc-modificados por ingeniería genética, comparten una secuencia de ADN de cadena ligera común con el anticuerpo anti-5T4 precursor, pero tienen secuencias de cadena pesada diferentes debido a la incorporación de cisteína en la región constante de la cadena pesada. El título y la productividad celular de estas variantes de anticuerpos de cisteína de ingeniería única expresadas en grupos de CHO estables fueron aceptables y comparables al anticuerpo anti-5T4 precursor que comprende la región Fc de IgG1 humana de tipo silvestre (Tabla 4).

Una estrategia de purificación convencional de dos etapas, es decir, captura de afinidad de proteína A seguida de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), se usó para aislar estas variantes de cisteína del material de partida del grupo CHO concentrado. La capacidad de aislar los anticuerpos usando este proceso de dos etapas demostró que el sitio de unión de la proteína A de la región Fc no se alteró por la presencia de la cisteína modificada por ingeniería genética y que la región Fc de IgG1 mutada se unía a la proteína A de manera similar a la Fc de IgG1 de tipo silvestre. Se detectaron especies agregadas mínimas de alto peso molecular después de la elución de la resina de proteína A para 6 de las 8 variantes de cisteína simple y esta especie se informa como porcentaje de máximo de interés (%POI) en la Tabla 4. Inesperadamente, 2 de los 8 mutantes (S254C y S440C) eran propensos a la agregación (Tabla 4). Estos datos demuestran que la producción de anticuerpos que comprenden variantes de cisteína única modificadas

por ingeniería genética en estas posiciones usando grupos de células de mamíferos estables no se vio afectada en comparación con la IgG1 de tipo silvestre.

TABLA 4

| Variante de cisteína única anti-5T4 | %POI después de ProA | %POI después de Superdex 200 | Rendimiento [mg/litro] |
|-------------------------------------|----------------------|------------------------------|------------------------|
| S254C | 84 % | 88,9 % | 21,5 |
| T359C | 97 % | >99 % | 31,1 |
| E380C | 97 % | >99 % | 39,6 |
| K392C | 95 % | >99 % | 25,3 |
| L398C | 98 % | >99 % | 41,3 |
| V422C | 96,4 % | >99 % | 18,4 |
| S440C | 95 % | 96,5 % | 24,4 |
| L443C | 98 % | >99 % | 42,8 |
| Anticuerpo anti-5T4 precursor | 98 % | >99 % | 58,8 |

5

Evaluación de las propiedades de unión a antígeno 5T4 de variantes de anticuerpos anti-5T4 de cisteína única

Se evaluaron las propiedades de unión de 5T4 para las variantes de anticuerpos anti-5T4 que comprenden variantes de cisteína única usando un ensayo ELISA de competición con un anticuerpo anti-5T4 de tipo silvestre biotinilado que comprende la región constante IgG1 humana de tipo silvestre como anticuerpo indicador para determinar si las variantes de cisteína 5T4 podrían competir eficazmente con este anticuerpo 5T4 de tipo silvestre para unirse al antígeno 5T4. Para este ensayo ELISA de competición, el anticuerpo indicador anti-5T4 precursor (que comprende Fc IgG1 de tipo silvestre sin mutaciones) se biotiniló usando EZ-link Sulfo-NHS-Biotina Sulfosuccinimidobiotina (Thermo/Pierce, número de catálogo 21217) con una relación de acoplamiento molar de 20:1 de acuerdo con los protocolos del fabricante. La proteína para este ensayo se generó transfectando transitoriamente ADN que codifica las variantes de cisteína única anti-5T4 y el anticuerpo anti-5T4 de tipo silvestre en células COS-1. Es decir, tanto las variantes como los anticuerpos de tipo silvestre de control comprendían regiones Fc de IgG1 humana. El medio acondicionado resultante que contiene las variantes de cisteína única anti-5T4 y el anticuerpo gG1 de tipo silvestre anti-5T4 se analizó usando un ELISA sándwich de IgG humana total como se describió anteriormente. Para este procedimiento de ensayo ELISA de competición, se recubrió una placa de 96 pocillos (Costar n.º de catálogo 3590) con proteína recombinante truncada humana 5T4 (5T4-tm₁-myc₂-his) que carece de los dominios transmembrana e intracelular de 5T4 (véase Boghaert *et al.*, 2008, Int. J. Oncol. 32:221-234) y que comprende además etiquetas Myc e histidina. La construcción 5T4-tm₁-myc₂-his se diluyó a 1 µg/ml en PBS-CMF pH 7,2, se añadieron 100 µl a cada pocillo de la placa y esta se incubó durante la noche a 4 °C. Se descartó el contenido de la placa y, a continuación, se bloqueó con PBS-CMF pH 7,2 + caseína al 0,02 % durante 3 horas a temperatura ambiente. El anticuerpo anti-5T4 biotinilado a 20 ng/ml en PBS + BSA al 0,5 % + tween-20 al 0,02 % se mezcló con concentraciones variables de las variantes de cisteína simple anti-5T4 o el anticuerpo anti-5T4 de tipo silvestre como el control positivo, las muestras se añadieron a la placa bloqueada recubierta con 5T4 y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Más específicamente, cada uno de los anticuerpos usados en este ensayo comprende los dominios V_L y V_H idénticos al anticuerpo humanizado anti-5T4, pero el anticuerpo indicador biotinilado comprende una región Fc de IgG de tipo silvestre sin una cisteína modificada por ingeniería genética, mientras que los anticuerpos competidores comprenden la región Fc de IgG1 de tipo silvestre o regiones Fc de IgG1 mutadas que comprenden una mutación de cisteína única.

Los pocillos se lavaron cuatro veces con PBS-CMF pH 7,2 + tween-20 al 0,03 %. Estreptavidina-HRP (n.º de catálogo 7100-05, Southern Biotech, (Birmingham, Alabama) se añadió diluido 1:10.000 y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron cuatro veces con PBS-CMF pH 7,2, + tween-20 al 0,03 % y se añadió TMB (BioRx). La reacción se desarrolló durante 5 a 10 minutos y a continuación se extinguió con H₂SO₄ 0,18 N. Se determinó la absorbancia a 450 nm y los resultados se muestran en la Figura 1. Estos datos demuestran que la incorporación reactiva de cisteína en la región Fc del anticuerpo anti-5T4 IgG1 en las posiciones indicadas en el gráfico no altera las propiedades de unión del anticuerpo 5T4. Es decir, cada variante de cisteína única 5T4 compitió por igual con el anticuerpo anti-5T4 indicador biotinilado por la unión a 5T4.

Detección de sulfhidrido libre para las variantes de cisteína única anti-5T4

Como se ha analizado anteriormente, los anticuerpos contienen enlaces disulfuro inter e intracatenarios que unen las cuatro cadenas peptídicas y todos estos enlaces disulfuro canónicos deben formarse para un plegamiento adecuado del anticuerpo. La presencia de grupos sulfhidrido (-SH) libres puede dar lugar a una molécula parcialmente desplegada o plegada incorrectamente, lo que conduce a una población heterogénea de anticuerpos y a una disminución de la

estabilidad de las proteínas. El reactivo fluorescente ThioGlo®1 (EMD Millipore), un colorante que se une mediante la química de la maleimida, se usó para detectar grupos sulfhidrilo libres para las variantes de cisteína única anti-5T4.

Todos los anticuerpos se evaluaron con y sin reducción de DTT con ditioneitol (v, por ejemplo, Antioxidants & Redox Signaling, Volumen 4, Número 5 (2002) Mary Ann Liebert, Inc.). Resumiendo, la reducción parcial con ditioneitol (DTT; 2 mM) expone la cisteína desapareada de los aductos de cisteína o glutatión presumiblemente formados durante el proceso de cultivo de células CHO, mientras que los enlaces disulfuro formados por las cisteínas restantes se dejaron intactos. Después de la reducción parcial de DTT, los anticuerpos se trataron con clorhidrato de guanidina (6,7 M) para exponer los grupos -SH enterrados y aumentar la accesibilidad del disolvente antes de la adición del reactivo fluorescente ThioGlo®1 (20 μ M). Se usó N-acetil-L-cisteína como patrón para cuantificar la cantidad de sulfhidrilo libre presente para cada anticuerpo. La seroalbúmina bovina (BSA; OmniPur BSA Fraction V, N.º de catálogo 2910, EMD Chemicals) también se incluyó como control positivo ya que contiene una sola cisteína desapareada. Como se muestra en la Tabla 5, los resultados divulgados en el presente documento indican que se detectó sulfhidrilo libre para las variantes de cisteína única anti-5T4 y no para el anticuerpo anti-5T4 precursor. En ausencia de DTT, no se observaron niveles aumentados de -SH libre para las seis variantes de cisteína evaluadas en comparación con la proteína anti-5T4 de tipo silvestre. De manera impredecible, la variante 5T4-S254C exhibió agregación y fue inestable a continuación de la reducción con DTT.

TABLA 5

| Anticuerpo | μ M -SH/ μ M proteína | |
|---------------|-------------------------------|------------|
| | Sin DTT | DTT (2 mM) |
| 5T4 precursor | 0,24 | 0,30 |
| 5T4-S254C | 0,19 | 0,03 < LOQ |
| 5T4-E380C | 0,16 | 0,82 |
| 5T4-L398C | 0,26 | 0,90 |
| 5T4-V422C | 0,20 | 1,02 |

Evaluación de la unión de variantes de cisteína única modificadas por ingeniería genética anti-5T4 al FcRn humano

Se cree en la técnica que FcRn interactúa con IgG independientemente del subtipo de una manera dependiente del pH y protege al anticuerpo de la degradación al evitar que ingrese al compartimento lisosómico donde se degrada. Por lo tanto, una consideración para seleccionar posiciones para la introducción de cisteínas reactivas en la región IgG1-Fc de tipo silvestre fue evitar alterar las propiedades de unión de FcRn y la semivida del anticuerpo que comprende la cisteína modificada por ingeniería genética.

Se realizó un análisis BIAcore® para determinar la afinidad en estado estable (KD) de las variantes de cisteína única modificadas por ingeniería genética anti-5T4 para la unión a FcRn humano. La tecnología BIAcore® usa cambios en el índice de refracción en la capa superficial de un sensor tras la unión de las variantes de cisteína modificadas por ingeniería genética individuales anti-5T4 a la proteína FcRn humana inmovilizada en la capa. La unión se detecta mediante resonancia plasmónica de superficie (SPR) de la luz láser que se refracta desde la superficie. El FcRn humano se biotiniló específicamente a través de una etiqueta Avi modificada por ingeniería genética usando el reactivo BirA (n.º de catálogo: BIRA500, Avidity, LLC, Aurora, Colorado) e inmovilizado sobre un chip sensor de estreptavidina (SA) para permitir la orientación uniforme de la proteína FcRn en el sensor. Después, diversas concentraciones de las variantes de cisteína única anti-5T4 en 20 mM MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico pH 6,0, con NaCl 150 mM, EDTA 3 mM (ácido etilendiaminotetraacético), Tensioactivo P20 al 0,5 % (MES-EP) se inyectaron sobre la superficie del chip. La superficie se regeneró usando HBS-EP + tensioactivo P20 al 0,05 % (GE Healthcare, Piscataway, NJ, Piscataway, NJ), pH 7,4, entre ciclos de inyección. Se determinaron las afinidades de unión en estado estable para las variantes de cisteína única modificadas por ingeniería genética anti-5T4 y se compararon con el anti-5T4 de tipo silvestre precursor (que no comprende mutaciones de cisteína en la región Fc de IgG1). Los resultados se presentan en la Tabla 6, y estos datos demuestran que la incorporación de restos de cisteína modificados por ingeniería genética en la región IgG-Fc en las nuevas posiciones de la invención no alteró la afinidad a FcRn.

TABLA 6.

| Anticuerpo | KD en estado estacionario [nM] |
|-------------------------------|--------------------------------|
| Anticuerpo anti-5T4 precursor | 412,1 |
| 5T4-E380C | 390,1 |

(continuación)

| Anticuerpo | KD en estado estacionario [nM] |
|------------|--------------------------------|
| 5T4-K392C | 383,5 |
| 5T4-L398C | 513,4 |
| 5T4-V422C | 443,3 |
| 5T4-S440C | 608,4 |

Evaluación de la unión de ADC variantes anti-5T4 de cisteína única a FcRn humano

- 5 Se realizó un análisis BIAcore® para determinar la afinidad en estado estacionario (KD) para la unión de los ADC anti-5T4 a FcRn humano, donde los ADC se conjugaron específicamente en el sitio a través de las cisteínas modificadas por ingeniería genética uniendo de esta manera una toxina al anticuerpo. Resumiendo, los ADC se prepararon conjugando mcMMAD, como se divulga más totalmente a continuación, a la cisteína modificada por ingeniería genética para las variantes 5T4-E380C, 5T4-L398C, 5T4-V422C e 5T4-L443C. Usando el mismo método Biacore SPR descrito anteriormente, diversas concentraciones de los ADC 5T4-mcMMAD conjugados específicamente en el sitio, las variantes de cisteína única no conjugadas con mcMMAD (descritas anteriormente y cuyos resultados se muestran en la Tabla 6) y el anticuerpo anti-5T4 de tipo silvestre "desnudo" precursor (es decir, no conjugado con mcMMAD) en MES-EP + tensioactivo P20 al 0,5 % pH 6,0 se inyectaron, por separado, sobre la superficie de FcRn humano y se determinaron las afinidades en estado estacionario y los resultados se muestran en la Tabla 7.

TABLA 7

| ADC o anticuerpo desnudo | KD en estado estacionario [nM] |
|-------------------------------|--------------------------------|
| Anticuerpo anti-5T4 precursor | 493,3 |
| 5T4-E380C-mcMMAD | 408,7 |
| 5T4-L398C-mcMMAD | 703,9 |
| 5T4-V422C-mcMMAD | 401,8 |
| 5T4-L443C-mcMMAD (1) | 697,0 |
| 5T4-L443C-mcMMAD (2) | 518,5 |

- Los resultados que se muestran en la Tabla 7 demuestran que los ADC 5T4-mcMMAD conjugados específicamente en el sitio usando las nuevas posiciones de cisteína de la invención tienen afinidades similares al FcRn humano en comparación entre sí y que estas afinidades por el FcRn son comparables a las de las variantes de cisteína únicas no conjugadas desnudas (compárese con la Tabla 6 anterior), así como para el anticuerpo 5T4 precursor no conjugado. Por lo tanto, estos datos demuestran que la conjugación de una fracción de toxina con las cisteínas reactivas modificadas por ingeniería genética introducidas en la región Fc de IgG1 no afectó la unión de Fc a FcRn.

EJEMPLO 2:Generación de anticuerpos anti-5T4 modificados por ingeniería genética con doble cisteína

- Se introdujeron nueve combinaciones de dos restos de cisteína reactivos en el anticuerpo anti-5T4 que comprende IgG1 humana. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de longitud completa de tipo silvestre de este anticuerpo se establece en la Figura 17A (SEQ ID NO:83) y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera kappa de longitud completa de este anticuerpo se establece en la Figura 17B (SEQ ID NO:84). Las mutaciones para sustituir el aminoácido de tipo silvestre relevante por la nueva cisteína modificada por ingeniería genética en la región constante de la cadena pesada se introdujeron usando el mismo método de mutagénesis por PCR superpuesta que se describió anteriormente en el Ejemplo 1. La introducción de dos cisteínas reactivas en cada región Fc de IgG1 proporcionó cuatro nuevos sitios de conjugación de cisteína que producirían ADC con una proporción de fármaco: anticuerpo (DAR) de 4 para cada anticuerpo (es decir, 2 cisteínas novedosas reactivas x 2 regiones Fc de cadena pesada por molécula de anticuerpo). Las posiciones relativas de las cisteínas reactivas modificadas por ingeniería genética para cada mutante doble se muestran a continuación en la Tabla 8, que muestra los diez (10) aminoácidos antes y después de la mutación, excepto cuando la mutación está a menos de 10 restos de aminoácidos del extremo C de la región Fc. La secuencia de aminoácidos de longitud completa para cada región Fc se proporciona en la SEQ ID NO indicada en la tabla.

TABLA 8

| Posiciones de doble cisteína de IgG1 | ID de secuencia | Secuencia de aminoácidos |
|--------------------------------------|-----------------|---|
| E380C+L443C | SEQ ID NO:74 | -KGFYPSDIAVCWESNGQPENN- + -VMHEALHNHYTQKSLSCSPGK |
| L398C+L443C | SEQ ID NO:75 | -ENNYKTTPPVCDSDGSFFLYS- + -VMHEALHNHYTQKSLSCSPGK |
| V422C+L443C | SEQ ID NO:76 | -VDKSRWQQGNCFCSCVMHEAL- + -VMHEALHNHYTQKSLSCSPGK |
| E380C+L398C | SEQ ID NO:77 | -KGFYPSDIAVCWESNGQPENN- + -ENNYKTTPPVCDSDGSFFLYS- |
| L398C+V422C | SEQ ID NO:78 | -ENNYKTTPPVCDSDGSFFLYS- + -VDKSRWQQGNCFCSCVMHEAL- |
| E380C+V422C | SEQ ID NO:79 | -KGFYPSDIAVCWESNGQPENN- + -VDKSRWQQGNCFCSCVMHEAL- |
| K392C+L443C | SEQ ID NO:80 | -ESNGQPENNYCTTPFVLDSGD- + -VMHEALHNHYTQKSLSCSPGK |
| F404C+L443C | SEQ ID NO:81 | -TPPVLDSDGSCFLYSKLTVDK- + -VMHEALHNHYTQKSLSCSPGK |
| K392C+F404C | SEQ ID NO:82 | -ESNGQPENNYCTTPFVLDSGD- + TPPVLDSDGSCFLYSKLTVDK |

Expresión transitoria de anticuerpos anti-5T4 modificados con doble cisteína

- 5 Para confirmar que los anticuerpos anti-5T4 que comprenden las cisteínas dobles modificadas por ingeniería genética podrían expresarse, las células COS-1 se contranfectaron transitoriamente con ADN de cadena pesada y ligera que codifica las variantes de doble cisteína 5T4 y el anticuerpo 5T4 precursor. Después de un período de 48 horas, se analizó cada medio de cultivo celular para determinar el nivel de anticuerpo IgG1 humano expresado para cada construcción usando el ELISA sándwich de IgG humana total descrito anteriormente. Como se muestra en la Tabla 9,
- 10 cada variante de anticuerpo anti-5T4 modificada por ingeniería genética con doble cisteína se expresó a un nivel comparable en comparación con el anticuerpo anti-5T4 precursor que no comprende ninguna cisteína adicional.

TABLA 9

| Anticuerpo 5T4 | Cantidad de IgG1 humana en el medio de cultivo celular [µg/ml] |
|--------------------|--|
| 5T4 Tipo silvestre | 41,2 |
| 5T4-E380C+L443C | 32,6 |
| 5T4-E380C+L398C | 45,4 |
| 5T4-L398C+ L443C | 52,0 |
| 5T4-E380C+V422C | 39,6 |
| 5T4-V422C+L443C | 42,2 |
| 5T4-L398C+V422C | 44,0 |

- 15 Producción de variantes de cisteína doble 5T4 a partir del sistema de expresión transitoria HEK-293

Para producir material suficiente para los estudios de conjugación, Las células HEK-293 se cotransfectaron transitoriamente con ADN de cadena pesada y ligera que codifica las seis variantes de anticuerpos modificados por ingeniería genética con doble cisteína 5T4 usando métodos convencionales. Después, los anticuerpos de la variante de doble cisteína se purificaron usando una estrategia de purificación convencional de dos etapas, captura de afinidad de proteína A seguida de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Estos resultados mostrados en la Tabla 10 demuestran que se detectaron niveles aceptables de especies agregadas de alto peso molecular (HMW) a continuación de la elución de la resina de proteína A para las seis variantes de cisteína doble 5T4 y que estas especies de HMW indeseables podrían eliminarse mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Adicionalmente, los datos

divulgados en el presente documento demuestran que el sitio de unión de la proteína A en la región constante de IgG1 humana no se alteró por la presencia de los restos de cisteína doble modificados por ingeniería genética.

TABLA 10

| Variante de cisteína doble 5T4 | %POI después de ProA | %POI después de Superdex 200 | Rendimiento [mg/litro] |
|--------------------------------|----------------------|------------------------------|------------------------|
| 5T4-E380C+L443C | 91,0 % | >99 % | 22,4 |
| 5T4-E380C+L398C | 97,3 % | >99 % | 24,0 |
| 5T4-L398C+ L443C | 90,9 % | >99 % | 29,0 |
| 5T4-E380C+V422C | 89,5 % | >99 % | 16,0 |
| 5T4-V422C+L443C | 94,3 % | >99 % | 8,2 |
| 5T4-L398C+V422C | 92,7 % | >99 % | 10,5 |

5

EJEMPLO 3:Generación de variantes de anticuerpos anti-Her2 modificados por ingeniería genética con cisteína simple y doble

- 10 Para demostrar que estas posiciones seleccionadas para la ingeniería de cisteínas reactivas pueden aplicarse a otros anticuerpos independientemente de la especificidad de unión a antígeno, se diseñaron cuatro (4) restos de cisteína simples y nueve (9) dobles en la región Fc de IgG1 de un anticuerpo anti-Her2 humano. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de longitud completa del anticuerpo anti-Her2 se muestra en la Figura 17C (SEQ ID NO:85) que muestra la región Fc de IgG1 de tipo silvestre sin mutaciones (letras minúsculas). La secuencia de aminoácidos de la
- 15 cadena ligera de longitud completa del anticuerpo anti-Her2 se muestra en la Figura 17D (SEQ ID NO:86) que muestra la región C_K de tipo silvestre sin mutaciones (letras minúsculas). Las posiciones de las mutaciones de cisteína introducidas se exponen en la Tabla 11. El ácido nucleico que codifica la región constante de IgG1 humana del anticuerpo anti-Her2 se eliminó del vector mediante digestión con enzimas de restricción y se reemplazó por un ácido nucleico que codifica las regiones Fc de IgG1 constante de cadena pesada humana que comprenden los restos de
- 20 cisteína modificados por ingeniería genética de manera simple y doble usando la ADN ligasa T4 (New England Biolabs Inc., Ipswich, Massachusetts). Se confirmó la secuencia del ácido nucleico resultante para cada construcción.

TABLA 11

| Variante de cisteína modificada por ingeniería genética anti-Her2 | Secuencia de la porción Fc de IgG1 del anticuerpo SEQ ID NO: |
|---|--|
| Her2-E380C | SEQ ID NO:45 |
| Her2-L398C | SEQ ID NO:54 |
| Her2-V422C | SEQ ID NO:64 |
| Her2-L443C | SEQ ID NO:72 |
| Her2-E380C+L443C | SEQ ID NO:74 |
| Her2-L398C+L443C | SEQ ID NO:75 |
| Her2-V422C+L443C | SEQ ID NO:76 |
| Her2-E380C+L398C | SEQ ID NO:77 |
| Her2-L398C+V422C | SEQ ID NO:78 |
| Her2-E380C+V422C | SEQ ID NO:79 |
| Her2-K392C+L443C | SEQ ID NO:80 |
| Her2-F404C+L443C | SEQ ID NO:81 |
| Her2-K392C+F404C | SEQ ID NO:82 |

25 Producción de variantes de cisteína modificadas por ingeniería genética anti-Her2

Se produjeron con éxito anticuerpos para su uso en estudios de conjugación mediante la cotransfección transitoria de células COS-1 con ADN de cadena pesada y ligera que codifica las variantes de anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína simple y doble anti-Her2, lo que demuestra que los anticuerpos se pueden expresar

transitoriamente en las células. Además, los anticuerpos se purificaron usando una estrategia de purificación convencional de dos etapas, captura de afinidad de proteína A seguida de cromatografía de exclusión por tamaño (Size Exclusion Chromatography, SEC). Los datos divulgados en el presente documento (Tabla 12) demuestran que se detectaron niveles bajos de especies agregadas de alto peso molecular (High Molecular Weight, HMW) a continuación de la elución de la resina de proteína A para las 6 variantes de cisteína doble anti-Her2 y que estas especies de HMW pudieron eliminarse mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Estos datos demuestran que la unión de Fc a la proteína A para estas variantes no se vio afectada por la introducción de las cisteínas reactivas en las posiciones novedosas.

TABLA 12

| Variante de cisteína anti-Her2 | %POI después de ProA | %POI después de Superdex 200 | Rendimiento [mg/litro] |
|--------------------------------|----------------------|------------------------------|------------------------|
| E380C | 98,8 % | 100 % | 7 |
| L443C | 95,0 % | 98,9 % | 12 |
| E380C+L443C | 94,2 % | 99,3 % | 11 |

EJEMPLO 4:Producción de una variante de anticuerpo anti-VEGFR2 modificado por ingeniería genética con cisteína única

Para demostrar además que las nuevas posiciones para la ingeniería de cisteínas reactivas podrían aplicarse a anticuerpos dirigidos al endotelio vascular, se diseñó un único resto de cisteína para crear un anticuerpo anti-VEGFR2 humano. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de longitud completa del anticuerpo anti-VEGFR2 se muestra en la Figura 17E (SEQ ID NO:87) que muestra la región Fc de IgG1 de tipo silvestre sin mutaciones (letras minúsculas). La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de longitud completa del anticuerpo anti-VEGFR2 se muestra en la Figura 17F (SEQ ID NO:88) que muestra la región C_K de tipo silvestre sin mutaciones (letras minúsculas). La secuencia de ácido nucleico que codifica la región constante Fc de IgG1 humana de tipo silvestre de un anticuerpo anti-VEGFR2 humano se eliminó mediante digestión con enzimas de restricción y se reemplazó por una secuencia de ácido nucleico que codifica la región constante de cadena pesada que comprende un solo resto de cisteína en la posición L443C (SEQ ID NO: 72) usando ADN ligasa T4 (New England Biolabs Inc., Ipswich, Massachusetts) y se confirmó la secuencia del ácido nucleico resultante.

El anticuerpo se produce transfectando COS-1 con el ácido nucleico que codifica el anticuerpo y la proteína se purifica usando un proceso de dos etapas (proteína A seguida de cromatografías SEC). Esto demuestra que el anticuerpo anti-VEGFR2 humano que comprende la cisteína reactiva única puede expresarse y que la unión de la proteína A de la región Fc no se ve afectada.

En resumen, como se divulgó previamente en el presente documento, se identificaron doce posiciones de restos para la introducción de cisteínas reactivas en las regiones Fc de IgG1 humana. De estas doce posiciones novedosas, se produjeron nueve variantes de anticuerpos de cisteína única para conjugación y caracterización. De estas nueve, solo dos mutaciones individuales demostraron inesperadamente una agregación proteica aparente S254C y S440C (según la numeración de la UE), y las otras siete variantes de cisteína individuales mostraron una agregación nominal similar al anticuerpo precursor que comprende la región constante IgG1 de tipo silvestre. Además, de las siete variantes que no demostraron agregación aparente, dos (T359C y F404C [según numeración EU]) exhibieron una eficiencia de conjugación marginal con diferentes combinaciones de enlazador y carga útil. Las cisteínas modificadas por ingeniería genética en 5 posiciones, E380C, L398C, K392C, V422C y L443C (numeración usando el índice Eu de Kabat), demostraron eficiencias de conjugación aceptables en una serie de condiciones. Adicionalmente, esta diferencia en la eficiencia de conjugación no se detectó si solo se evaluó la capacidad de conjugar con biotina. Es decir, la diferencia en la eficiencia de conjugación solo se detectó cuando se aplicó un patrón más riguroso, es decir, cuando se conjugaron cargas tóxicas más grandes con el anticuerpo. Bajo esta exigencia más rigurosa, se demostró que las cisteínas novedosas de la presente invención proporcionan novedosas plataformas de conjugación eficientes para la producción de ADC potencialmente efectivos terapéuticamente.

EJEMPLO 5:Posiciones adicionales en la región Fc de IgG1 humana para la introducción de cisteína reactiva para la conjugación específica del sitio

Además de las doce posiciones novedosas en la IgG1 humana divulgadas previamente en el presente documento para la producción exitosa de regiones Fc modificadas por ingeniería genética que comprenden cisteínas reactivas, se identificaron posiciones adicionales para la incorporación de cisteínas reactivas de la siguiente manera. Resumiendo, el complejo cristalino del dominio Fc de la IgG1 humana (código PDB 3DO3, 10.2210/pdb3do3/pdb) se obtuvo del banco de datos de proteínas RCSB y se preparó para visualización y modelado en Discovery Studio (Accelrys Inc., San Diego, CA). Las cadenas laterales individuales se mutaron a cisteína y se minimizaron usando la

función Mutate Residue en Discovery Studios de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se calculó la accesibilidad del disolvente de la cadena lateral del resto mutado, como era el pKa del resto, usando el método de Spassov y Yan (2008, Protein Sci. 17(11):1955-1970).

- 5 Más específicamente y sin desear quedar ligados a teoría particular alguna, viendo los datos divulgados en el presente documento por primera vez para las doce posiciones Fc novedosas divulgadas anteriormente, se sugirió que un pKa bajo o una alta accesibilidad de la cadena lateral pueden conducir a una carga ineficiente del fármaco, agregación de proteínas u otros problemas. Se identificaron sitios adicionales consistentes con estos intervalos de pKa y accesibilidad de solventes de cadena lateral basándose en cálculos realizados con Discovery Studio.

- 10 Los datos divulgados en el presente documento sugieren que los restos de cisteína con un intervalo de pKa previsto óptimo entre 9,5 y 11,5 y/o una accesibilidad al disolvente de la cadena lateral prevista entre 15 y 60, pueden imitar las propiedades de los mutantes de cisteína conjugada divulgados previamente en el presente documento, incluyendo, pero no limitado a E380C, K392C, L398C, V422C e L443C. Dado que estas propiedades (pKa y accesibilidad prevista al disolvente de la cadena lateral) están correlacionadas, es difícil establecer qué criterios están asociados con los resultados biológicos deseados, incluyendo, pero no limitado a, baja propensión a agregarse y fácil conjugación con enlazadores y cargas útiles. Las posiciones adicionales seleccionadas por el presente método de diseño por ordenador novedoso para introducir cisteínas reactivas basado en los sorprendentes datos obtenidos para los doce nuevos mutantes divulgados en el presente documento se enumeran en la Tabla 13 con su posición de numeración EU correspondiente.

TABLA 13

| Posición secuencial | Posición (Numeración EU) | SEQ ID NO de IgG1 modificada por ingeniería genética completa | Secuencia de aminoácidos (con aminoácidos que flanquean la cisteína modificada por ingeniería genética) | SEQ ID NO de porción que muestra Cys modificadas por ingeniería genética |
|---------------------|--------------------------|---|---|--|
| 129 | K246 <u>C</u> | 6 | GGPSVFLFPPC <u>PK</u> DTLMISRT | 108 |
| 132 | D249 <u>C</u> | 7 | SVFLFPPKPK <u>CT</u> LMISRTPEV | 109 |
| 148 | D265 <u>C</u> | 9 | RTPEVTCVVV <u>C</u> VSHEDPEVKF | 110 |
| 150 | S267 <u>C</u> | 10 | PEVTCVVVDV <u>CH</u> EDPEVKFNW | 111 |
| 153 | D270 <u>C</u> | 11 | TCVVVDVSHE <u>C</u> PEVKFNWYVD | 112 |
| 159 | N276 <u>C</u> | 12 | VSHEDPEVKF <u>C</u> WYVDGVEVHN | 113 |
| 161 | Y278 <u>C</u> | 13 | HEDPEVKFNW <u>C</u> VDGVEVHNAK | 114 |
| 166 | E283 <u>C</u> | 14 | VKFNWYVDGV <u>C</u> VHNAKTKPRE | 115 |
| 167 | V284 <u>C</u> | 15 | KFNWYVDGVE <u>CH</u> NAKTKPREE | 116 |
| 170 | A287 <u>C</u> | 16 | WYVDGVEVHN <u>CK</u> TKPREEQYN | 117 |
| 175 | R292 <u>C</u> | 17 | VEVHNAKTKP <u>CEE</u> QYNSTYRV | 118 |
| 176 | E293 <u>C</u> | 18 | EVHNAKTKPR <u>CE</u> QYNSTYRVV | 119 |
| 177 | E294 <u>C</u> | 19 | VHNAKTKPRE <u>C</u> QYNSTYRVVS | 120 |
| 183 | Y300 <u>C</u> | 20 | KPREEQYNSTC <u>RV</u> SVLTVLH | 121 |
| 185 | V302 <u>C</u> | 21 | REEQYNSTYRC <u>VS</u> VLTVLHQD | 122 |
| 186 | V303 <u>C</u> | 22 | EEQYNSTYRV <u>C</u> SVLTVLHQDW | 123 |
| 197 | L314 <u>C</u> | 23 | SVLTVLHQDW <u>C</u> NGKEYCKVVS | 124 |
| 198 | N315 <u>C</u> | 24 | VLTVLHQDWL <u>CG</u> KEYCKVSN | 125 |
| 201 | E318 <u>C</u> | 25 | VLHQDWLNGK <u>CY</u> CKVSNKAL | 126 |
| 203 | K320 <u>C</u> | 26 | HQDWLNGKEY <u>C</u> CKVSNKALPA | 127 |
| 210 | A327 <u>C</u> | 27 | KEYCKVSNK <u>CL</u> PAPIEKTIS | 128 |
| 215 | I332 <u>C</u> | 28 | KVSNKALPAP <u>CE</u> KTISKAKGQ | 129 |

ES 3 027 182 T3

(continuación)

| Posición secuencial | Posición (Numeración EU) | SEQ ID NO de IgG1 modificada por ingeniería genética completa | Secuencia de aminoácidos (con aminoácidos que flanquean la cisteína modificada por ingeniería genética) | SEQ ID NO de porción que muestra Cys modificadas por ingeniería genética |
|---------------------|--------------------------|---|---|--|
| 216 | E333C | 29 | VS NKALPAPICTISKAKGQP | 130 |
| 217 | K334C | 30 | SNKALPAPIECTISKAKGQPR | 131 |
| 219 | I336C | 31 | KALPAPIEKTCSKAKGQPREP | 132 |
| 228 | E345C | 32 | TISKAKGQPRCPQVYTLPPSR | 133 |
| 230 | Q347C | 33 | SKAKGQPREPCVYTLPPSREE | 134 |
| 237 | S354C | 34 | REPQVYTLPPCREEMTKNQVS | 135 |
| 238 | R355C | 35 | EPQVYTLPPSCEEMTKNQVSL | 136 |
| 241 | M358C | 36 | VYTLPPSREECTKNQVSLTCL | 137 |
| 243 | K360C | 38 | TLPPSREEMTCNQVSLTCLVK | 138 |
| 245 | Q362C | 40 | PPSREEMTKNCVSLTCLVKGF | 139 |
| 253 | K370C | 41 | KNQVSLTCLVCGFYPSDIAVE | 140 |
| 256 | Y373C | 42 | VSLTCLVKGFCPSDIAVEWES | 141 |
| 259 | D376C | 43 | TCLVKGFYPSCIAVEWESNGQ | 142 |
| 261 | A378C | 44 | LVKGFYPSDICEVEWESNGQPE | 143 |
| 265 | E382C | 46 | FYPSDIAVEWC SNGQPENNYK | 144 |
| 269 | Q386C | 49 | DIAVEWESNGCPENNYKTPP | 145 |
| 271 | E388C | 50 | AVEWESNGQPCNNYKTPPV L | 146 |
| 273 | N390C | 51 | EWESNGQPENCYKTPPV L D S | 147 |
| 276 | T393C | 53 | SNGQPENNYKCTPPV L D S D G S | 148 |
| 284 | D401C | 55 | YKTPPV L D SCGSFFLYSKLT | 149 |
| 294 | T411C | 57 | DGSFFLYSKLCVDKSRWQQGN | 150 |
| 296 | D413C | 58 | SFFLYSKLTVCKSRWQQGNVF | 151 |
| 297 | K414C | 59 | FFLYSKLTVDCSRWQQGNVFS | 152 |
| 299 | R416C | 60 | LYSKLTVDKSCWQQGNVFSCS | 153 |
| 301 | Q418C | 61 | SKLTVDKSRWCQGNVFSCSVM | 154 |
| 302 | Q419C | 62 | KLTVDKSRWCQGNVFSCSVMH | 155 |
| 304 | N421C | 63 | TVDKSRWQQGCVFSCSVMHEA | 156 |
| 311 | M428C | 65 | QQGNVFSCSVCHEALHNHYTQ | 157 |
| 314 | A431C | 66 | NVFSCSVMHECLHNHYTQKSL | 158 |
| 315 | L432C | 67 | VFSCSVMHEACHNHYTQKSLS | 159 |
| 320 | T437C | 68 | VMHEALHNHYCQKSLSLSPGK | 160 |
| 321 | Q438C | 69 | VMHEALHNHYTCQKSLSLSPGK | 161 |
| 322 | K439C | 70 | VMHEALHNHYTCQKSLSLSPGK | 162 |
| 327 | S444C | 73 | VMHEALHNHYTQKSLSLCPGK | 163 |

EJEMPLO 6:Generación de variantes adicionales de anticuerpos anti-Her2 modificados por ingeniería genética con cisteína única

- 5 Determinadas posiciones de cisteínas reactivas que se muestran en la Tabla 13 se seleccionaron con accesibilidad al solvente de la cadena lateral e intervalos de pKa óptimos y se muestran en la Tabla 14. Las regiones Fc de IgG1 humana que comprenden cisteínas individuales modificadas por ingeniería genética en estas once (11) posiciones novedosas se incorporaron a un anticuerpo anti-Her2 (véase anteriormente) para una evaluación adicional.

10

TABLA 14

| Variante | SEQ ID NO de Fc de longitud completa | Secuencia de aminoácidos | SEQ ID NO de la porción que muestra la posición del aminoácido modificado por ingeniería genética |
|----------|--------------------------------------|--------------------------|---|
| K246C | SEQ ID NO:6 | GGPSVFLFPFCPKDTLMISRT | 108 |
| Q347C | SEQ ID NO:33 | SKAKGQPREPCVYTLPPSREE | 134 |
| M358C | SEQ ID NO:36 | VYTLPPSREECTKNQVSLTCL | 137 |
| Y373C | SEQ ID NO:42 | VSLTCLVKGFPCPSDIAVEWES | 141 |
| E388C | SEQ ID NO:50 | AVEWESNGQPCNNYKTPPVVL | 146 |
| N390C | SEQ ID NO:51 | EWESNGQPENCYKTPPVLDLS | 147 |
| D413C | SEQ ID NO:58 | SFFLYSKLTVCKSRWQQGNVF | 151 |
| Q418C | SEQ ID NO:61 | SKLTVCKSRWQQGNVFSCSVM | 154 |
| N421C | SEQ ID NO:63 | TVCKSRWQQGVFSCSVMHEA | 156 |
| A431C | SEQ ID NO:66 | NVFSCSVMHECLHNHYTQKSL | 158 |
| Q438C | SEQ ID NO:69 | VMHEALHNHYTCKSLSLSPGK | 161 |

EJEMPLO 7Conjugación y caracterización de ADC usando anticuerpos variantes de cisteína única

15

Conjugación de anticuerpos variantes de cisteína única con enlazadores y cargas útiles:

- Los ADC novedosos divulgados anteriormente que demuestran una conjugación exitosa de los anticuerpos que comprenden regiones Fc novedosas de IgG1 que comprenden cisteínas reactivas modificadas por ingeniería genética se prepararon como se describe a continuación.

20

- Condición A: (La condición B se describe a continuación en el Ejemplo 8) Las reacciones de conjugación se realizaron en la parte superior de un dispositivo de ultrafiltración centrífuga tales como los filtros Amicon Ultra 50k Ultracel (pieza n.º UFC805096, GE). Se preparó una solución madre de 132 mM de L-cisteína en PBS que contenía EDTA 50 mM. Esta solución (50 µl) se añadió a una mezcla del respectivo anticuerpo mutante (5 mg) en 950 µl de PBS que contenía EDTA 50 mM. La concentración final de cisteína en la mezcla de reacción fue 6,6 mM. Después de dejar reposar la reacción a temperatura ambiente (aproximadamente 23 grados C) durante 1,5 horas se centrifugó el tubo de reacción para concentrar el material a aproximadamente 100 µl. La mezcla se diluyó a 1 ml con PBS que contenía EDTA 50 mM. Este proceso se repitió 4 veces para eliminar todo el reductor de cisteína.

25

- El material resultante se diluyó a 1 ml en PBS que contenía EDTA 50 mM y se trató con 16 µl de una solución de mCMAD 5 mM en dimetil acetamida (DMA) (aproximadamente 5 equivalentes). Después de reposar a temperatura ambiente (aproximadamente 23 grados C) durante 1,5 horas, el tubo de reacción se centrifugó para concentrar el material a aproximadamente 100 µl. La mezcla se diluyó a 1 ml con PBS. Este proceso se repitió 2 veces para eliminar el exceso de reactivo maleimida (por ejemplo, mCMAD).

30

- Los conjugados de anticuerpo generalmente se purificaron y se caracterizaron usando cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) como se describe a continuación. La carga del fármaco en el sitio de conjugación previsto se determinó usando una diversidad de métodos incluyendo espectrometría de masas (EM), HPLC de fase inversa y cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), como se describe más totalmente a continuación. La combinación de estos tres métodos analíticos proporciona una diversidad de formas de verificar y cuantificar la carga de la molécula pequeña en la proteína, proporcionando de esta manera una determinación precisa del DAR para cada conjugado.

35

Caracterización de los ADC de anticuerpos mutantes de cisteína mediante cromatografía de exclusión por tamaño

(SEC):

SEC preparativa: Los conjugados de anticuerpo y fármaco (Ab-enlazador-carga útil, por ejemplo, Ab-mcMMAD y Ab-vcMMAD) se purificaron generalmente mediante cromatografía SEC usando una columna Waters Superdex200 10/300GL en un sistema Akta Explorer FPLC para eliminar el agregado de proteínas y eliminar los rastros del enlazador de carga útil que quedaron en la mezcla de reacción. De vez en cuando, los ADC estaban libres de agregados y moléculas pequeñas antes de la purificación SEC y, por lo tanto, no se sometieron a SEC preparativa. El eluyente usado fue PBS a un flujo de 1 ml/min. En estas condiciones, el material agregado (que se eluye a los 10 minutos aproximadamente a temperatura ambiente) se separó fácilmente del material no agregado (que se eluye a los 15 minutos aproximadamente a temperatura ambiente). Las combinaciones de carga útil hidrófoba y enlazador frecuentemente resultaron en un "desplazamiento hacia la derecha" de los máximos de SEC. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, este desplazamiento de máximos de SEC puede deberse a interacciones hidrófobas de la carga útil del enlazador con la fase estacionaria. En algunos casos, este desplazamiento a la derecha permitió que la proteína conjugada se resolviera parcialmente a partir de la proteína no conjugada.

Cromatografía analítica de exclusión por tamaño (SEC): La SEC analítica se llevó a cabo en un HPLC Agilent 1100 usando PBS como eluyente. El eluyente se monitorizó a 220 y 280 nM. Los métodos utilizados son los siguientes:

Método SEC-A: La columna era una columna TSKGel G3000SW (7,8x300 mm, número de catálogo R874803P). La fase móvil usada fue PBS con un caudal de 0,9 ml/min durante 30 minutos.

Método SEC-B: La columna era una columna BiosepSEC3000 (7,8x300 mm) con PBS como fase móvil usando un caudal de 1,0 ml/min durante 25 minutos.

A continuación se analizan los resultados de los métodos anteriores.

En la Tabla 15 a continuación se presentan los resultados para diversos conjugados de anticuerpo y fármaco purificados y caracterizados usando los métodos anteriores. A continuación se analizan el análisis de carga y las caracterizaciones de EM.

Los conjugados se analizaron mediante SEC analítica para establecer la integridad del conjugado de proteína purificada y garantizar que se produjera una agregación mínima durante la conjugación. Los dos métodos descritos anteriormente dan tiempos de retención aproximadamente equivalentes y se usaron en diferentes circunstancias simplemente por motivos prácticos tales como la disponibilidad y la confiabilidad de la columna. Generalmente se observó que el material agregado indujo un desplazamiento hacia la izquierda del tiempo de retención de aproximadamente un minuto. En la Figura 2 se ilustran ejemplos de dos trazos de SEC analíticas. La Figura 2A muestra el trazo de SEC para 5T4-L398C-mcMMAD (usando el método SEC-A); La Figura 2B muestra el trazo de SEC para 5T4-V422C-vcMMAD (usando el método SEC-B). Estos trazados muestran que el material no está agregado y no contiene ningún contaminante de moléculas pequeñas medible. Se observó generalmente que las cargas útiles más hidrófobas tales como vcMMAD dieron como resultado ADC con máximos de SEC modestamente más amplios y menos uniformes. En algunos casos la conjugación de una carga útil hidrófoba (tal como vcMMAD) dio como resultado un desplazamiento significativo hacia la derecha en el tiempo de retención. (Por ejemplo, véase 5T4-L443C-vcMMAD en la Tabla 15). Sin embargo, el máximo principal siempre pudo distinguirse fácilmente del máximo agregado que normalmente se eluía aproximadamente a los 7,5 minutos. Los datos analíticos SEC para una diversidad de ADC 5T4 (todos preparados mediante el Método A) se indican en la Tabla 15.

TABLA 15

| Anticuerpo | Carga útil del enlazador | Rendimiento aislado (mg) | tr de SEC (min) | Método SEC |
|------------|--------------------------|--------------------------|-----------------|------------|
| 5T4-A1 | Ninguno | ND | 9,12 | SEC-B |
| 5T4-E380C | mcMMAD | 2,5 mg | 9,13 | SEC-A |
| 5T4-L398C | mcMMAD | 2,5 mg | 8,92 | SEC-A |
| 5T4-V422C | mcMMAD | 4,0 mg | 9,23 | SEC-A |
| 5T4-L443C | mcMMAD | 4,0 mg | 9,73 | SEC-A |
| 5T4-K392C | mcMMAD | 2,7 mg | 8,89 | SEC-A |
| 5T4-E380C | vcMMAD | 2,6 mg | 9,36 | SEC-A |
| 5T4-L398C | vcMMAD | 3,3 mg | 8,46 | SEC-B |
| 5T4-V422C | vcMMAD | 2,9 mg | 8,86 | SEC-B |
| 5T4-L443C | vcMMAD | 2,6 mg | 10,68 | SEC-A |

Caracterización y análisis por espectroscopia de masas de los conjugados de anticuerposAnálisis de EM y preparación de muestras:

Las muestras se prepararon para el análisis CLEM combinando aproximadamente 20 µl de muestra (aproximadamente 1 mg/ml de ADC en PBS) con 20 µl de ditioneitol (DTT) 20 mM. Después de dejar reposar la mezcla a temperatura ambiente durante 5 minutos, las muestras se inyectaron en un sistema HPLC Agilent 1100 equipado con una columna Agilent Poroshell 300SB-C8 (2,1x75 mm). La temperatura del sistema se ajustó a 60 °C. Se usó un gradiente de 5 minutos del 20 % al 45 % de acetonitrilo en agua (con modificador de ácido fórmico al 0,1 %). El eluyente se monitorizó mediante UV (220 nm) y mediante un espectrómetro de masas Waters MicromassZQ (ionización ESI; voltaje de cono: 20 V; Temperatura de la fuente: 120 °C; Temperatura de desolvatación: 350 °C). El espectro bruto que contiene las especies con carga múltiple se desconvolucionó usando MaxEnt1 dentro del paquete de software MassLynx 4.1 de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Determinación EM de la carga por anticuerpo:

Los espectros de toda la ventana de elución (normalmente 5 minutos) se combinan en un único espectro sumado (es decir, un espectro de masas que representa la EM de toda la muestra). Los resultados de EM para las muestras de ADC se compararon directamente con el EM correspondiente del anticuerpo de control idéntico no cargado. Esto permite la identificación de máximos de cadena pesada (HC) cargados/no cargados y máximos de cadena ligera (LC) cargados/no cargados. La relación de los distintos máximos puede usarse para establecer la carga según la siguiente ecuación (Ecuación 1). Los cálculos se basan en el supuesto de que las cadenas cargadas y no cargadas se ionizan por igual, lo que se ha determinado que es un supuesto generalmente válido. Además, para comprobar estos cálculos de carga, también se evaluó la carga de un subconjunto de ADC usando métodos alternativos (cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa [rpHPLC] y métodos basados en cromatografía de interacción hidrofóbica [HIC]), como se describe con más detalle en las secciones a continuación.

Se realizó el siguiente cálculo para establecer la carga total (también denominada "Relación fármaco-anticuerpo" o "DAR") del conjugado:

Ecuación 1:

$$\text{Carga} = 2 * [\text{LC1}/(\text{LC1} + \text{LC0})] + 2 * [\text{HC1}/(\text{HC0} + \text{HC1} + \text{HC2})] + 4 * [\text{HC2}/(\text{HC0} + \text{HC1} + \text{HC2})]$$

Donde las variables indicadas son la abundancia relativa de: LC0 = cadena ligera no cargada, LC1 = cadena ligera de carga única, HC0 = cadena pesada no cargada, HC1 = cadena pesada de carga simple y HC2 = cadena pesada de carga doble. Un experto en la materia apreciaría que la invención abarca la expansión de este cálculo para abarcar especies con mayor carga tales como LC2, LC3, HC3, HC4, HC5 y similares.

La Ecuación 2, a continuación, se usa para estimar la cantidad de carga sobre restos de cisteína no modificados por ingeniería genética. Para mutantes Fc modificados por ingeniería genética, se consideró la carga en la cadena ligera (LC), por definición, ser una carga no específica. Por otra parte, se asumió que cargar solo el LC era el resultado de una reducción inadvertida del puente disulfuro HC-LC (es decir, el anticuerpo estaba "sobre-reducido"). Dado que se usó un gran exceso de electrófilo maleimida para las reacciones de conjugación (generalmente 5 equivalentes aproximadamente para mutantes simples y 10 equivalentes para mutantes dobles), se asumió que cualquier carga no específica en la cadena ligera estaba acompañada por una cantidad correspondiente de carga no específica en la cadena pesada (es decir, la otra "mitad" del disulfuro HC-LC roto). Con estas suposiciones en mente, se usó la siguiente ecuación (Ecuación 2) para estimar la cantidad de carga no específica en la proteína:

Ecuación 2:

$$\text{Carga no específica} = 4 * [\text{LC1}/(\text{LC1} + \text{LC0})]$$

Donde las variables indicadas son la abundancia relativa de: LC0 = cadena ligera no cargada, LC1 = cadena ligera de carga única.

Los cálculos de carga que usan este análisis EM para dos ADC ilustrativos (5T4-E380C-mcMMAD y 5T4-L398C-vcMMAD) se muestran en las Figuras 3A y 3B, respectivamente.

La Tabla 16 expone los resultados de la espectrometría de masas y los cálculos de carga para los ADC ensayados.

TABLA 16

| Anticuerpo | Carga útil del enlazador | PM de HC no cargada (glucoforma de menor PM) | PM I teórico de HC | PM observado de HC (cargado) | Carga no específica estimada por Ab (DAR no específica) | Carga total por Ab (DAR) |
|------------|--------------------------|--|--------------------|------------------------------|---|--------------------------|
| 5T4-E380C | mcMMAD | 50678 | 51642 | 51644 | 0,15 | 1,78 |
| 5T4-L398C | mcMMAD | 50828 | 51792 | 51793 | 0,18 | 1,82 |
| 5T4-V422C | mcMMAD | 50707 | 51671 | 51673 | 0,08 | 1,37 |
| 5T4-L443C | mcMMAD | 50693 | 51657 | 51659 | 0,23 | 2,10 |
| 5T4-K392C | mcMMAD | 50827 | 51791 | 51792 | 0,24 | 1,74 |
| 5T4-E380C | vcMMAD | 50668 | 52037 | 52038 | 0,0 | 1,80 |
| 5T4-L398C | vcMMAD | 50686 | 52055 | 52056 | 0,0 | 1,76 |
| 5T4-V422C | vcMMAD | 50700 | 52069 | 52070 | 0,08 | 1,76 |
| 5T4-L443C | vcMMAD | 50686 | 52055 | 52053 | 0,0 | 2,00 |

Proteólisis con FabRICATOR® para establecer el lugar de carga:

- 5 Los mutantes de cisteína divulgados en las Tablas 14-16 están ubicados en los dominios CH2 y CH3 dentro del dominio Fc de la cadena pesada IgG1. Se presume que cualquier carga no específica de la carga electrofílica sobre el anticuerpo ocurre en la "intercadena", también denominada restos de cisteína "internos" (es decir, aquellos que normalmente son parte de los puentes disulfuro HC-HC o HC-LC). Para distinguir la carga de electrófilos en las cisteínas modificadas por ingeniería genética en el dominio Fc frente a la carga en los restos de cisteína internos (que de lo contrario normalmente forman los enlaces S-S entre HC-HC o HC-LC), los conjugados se trataron con una proteasa conocida por escindir los dominios Fab y el dominio Fc del anticuerpo. Una de estas proteasas es la cisteína proteasa IdeS, comercializada como "FabRICATOR®" por Genovis, y descrito en von Pawel-Rammingen *et al.*, 2002, EMBO J. 21:1607. La Figura 4 representa un diagrama que ilustra la escisión por esta proteasa de una molécula de anticuerpo intacta mostrando las posiciones (cuadrados oscuros) de los enlaces de cistina internos.
- 10
- 15 Resumiendo, siguiendo las condiciones sugeridas por el fabricante, el ADC fue tratado con proteasa FabRICATOR® y la muestra se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Las muestras se prepararon para el análisis CLEM combinando aproximadamente 20 µl de muestra (aproximadamente 1 mg/ml en PBS) con 20 µl de ditioneitol (DTT) 20 mM y dejando reposar la mezcla a temperatura ambiente durante 5 minutos. Este tratamiento de IgG1 humana dio como
- 20 resultado tres fragmentos de anticuerpos, todos con un tamaño que varía de aproximadamente 23 a 26 kD como se ilustra en el diagrama representado en la Figura 4 que ilustra los fragmentos resultantes del tratamiento con FabRICATOR: el fragmento LC que comprende una cisteína interna que normalmente forma un enlace disulfuro entre cadenas LC-HC; el fragmento HC N-terminal que comprende tres cisteínas internas (donde una forma normalmente un enlace disulfuro LC-HC y las otras dos cisteínas se encuentran en la región bisagra del anticuerpo y que normalmente forman enlaces disulfuro HC-HC entre las dos cadenas pesadas del anticuerpo); y el fragmento HC C-terminal que no contiene cisteínas reactivas distintas de las introducidas por mutación en las construcciones novedosas divulgadas en el presente documento. Las muestras se analizaron por EM como se describe anteriormente. Los cálculos de carga se realizaron de la misma manera que se describió previamente (anteriormente) para cuantificar la carga de la LC, la HC N-terminal y la HC C-terminal. La carga en la HC C-terminal se considera carga "específica" mientras que la carga en la LC y la HC N-terminal se considera carga "inespecífica". La Figura 5A muestra los resultados del trazado de EM para la variante 5T4-L443C que no se carga después del tratamiento con proteasa FabRICATOR®. El inserto representa un diagrama que ilustra los fragmentos de escisión proteolítica generados por el tratamiento con FabRICATOR®. La Figura 5B es un gráfico que muestra los resultados de los trazados de EM para el tratamiento con FabRICATOR® del ADC 5T4-L443C-mcMMAD. El inserto muestra un diagrama que ilustra los
- 30 fragmentos resultantes de la escisión proteolítica e ilustra que el enlazador y la carga útil están asociados con el fragmento HC C-terminal, lo que indica que la carga se encuentra en la cisteína reactiva introducida por la mutación. Los resultados del análisis de un subconjunto de los ADC se exponen en la Tabla 17.
- 35

TABLA 17

| Anticuerpo | Carga útil del enlazador | Carga de HC(C-term) por Ab (carga específica) | Carga de HC(N-term) por Ab (carga no específica) | Carga de LC por Ab (carga no específica) | Carga total por Ab |
|------------|--------------------------|---|--|--|--------------------|
| 5T4-E380C | mcMMAD | 1,9 | 0,0 | 0,1 | 2,0 |

(continuación)

| Anticuerpo | Carga útil del enlazador | Carga de HC(C-term) por Ab (carga específica) | Carga de HC(N-term) por Ab (carga no específica) | Carga de LC por Ab (carga no específica) | Carga total por Ab |
|------------|--------------------------|---|--|--|--------------------|
| 5T4-L398C | mcMMAD | 1,9 | 0,0 | 0,0 | 1,9 |
| 5T4-V422C | mcMMAD | 1,4 | 0,0 | 0,0 | 1,4 |
| 5T4-L443C | mcMMAD | 2,0 | 0,1 | 0,1 | 2,2 |
| 5T4-E380C | vcMMAD | 1,8 | 0,1 | 0,0 | 1,8 |
| 5T4-L398C | vcMMAD | 1,7 | 0,0 | 0,0 | 1,7 |
| 5T4-V422C | vcMMAD | 1,6 | 0,0 | 0,0 | 1,6 |
| 5T4-L443C | vcMMAD | 1,8 | 0,1 | 0,0 | 1,9 |

Los resultados de la escisión por FabRICATOR® de los ADC novedosos de la divulgación demuestran que hay muy poca, si la hay, carga no específica detectable de los anticuerpos. Además, los datos demuestran que la carga del anticuerpo se realiza en la cisteína reactiva introducida en la región Fc de IgG1 y que la estequiometría esperada de 2:1 (DAR = 2) se logra para la mayoría, si no todos, los ADC novedosos. Estos datos demuestran que los nuevos mutantes de cisteína pueden conjugarse con éxito y de manera específica para producir ADC potencialmente terapéuticos con una estequiometría controlada y específica para una administración exitosa del fármaco.

10 Análisis HPLC de fase inversa de ADC:

Las muestras se prepararon para el análisis de HPLC de fase inversa combinando aproximadamente 20 µl de muestra (aproximadamente 1 mg/ml en PBS) con 20 µl de ditioneitol (DTT) 20 mM. Después de dejar reposar la mezcla a temperatura ambiente durante 5 minutos, las muestras se inyectaron en un sistema HPLC Agilent 1100 equipado con una columna Agilent Poroshell 300SB-C8 (2,1x75 mm). La temperatura del sistema se ajustó a 60 °C y el eluyente se controló mediante UV (220 nm y 280 nm). Se utilizó un gradiente de 20 minutos del 20 % al 45 % de acetonitrilo en agua (con modificador TFA al 0,1 %):

T=0 min : acetonitrilo al 25 %; T=2 min : acetonitrilo al 25 %; T=19 min : acetonitrilo al 45 %; y T=20 min : acetonitrilo al 25 %.

Usando estas condiciones, la HC y la LC del anticuerpo podrían estar separadas en el valor inicial. Como se ilustra en la Figura 6, los resultados de este análisis indican que la LC permanece en gran medida sin modificaciones mientras que la HC sí está modificada. Más específicamente, la Figura 6 muestra trazos de HPLC de fase inversa en condiciones reductoras para (A) el anticuerpo anti-5T4 de tipo silvestre no modificado; (B) 5T4-E380C-mcMMAD; y (C) 5T4-L443C-mcMMAD. Los resultados obtenidos con HPLC de fase inversa son consistentes con los obtenidos usando el análisis EM como se divulgó anteriormente en el presente documento. Usando las ecuaciones descritas anteriormente para determinar la carga, se calcularon la carga específica y la carga no específica para cada muestra usando el AUC para cada máximo indicado en la Figura 6. Los valores de carga obtenidos de esta manera son consistentes con los cálculos de carga anteriores.

Cromatografía de interacción hidrófoba (HIC)

Los compuestos se prepararon para el análisis HIC diluyendo una muestra de 30 µl (aproximadamente a 1 mg/ml de ADC) con 30 µl de K₂HPO₄ 2 M (pH 8,5). Las muestras se analizaron usando un HPLC Agilent 1200 con una columna TSK-GEL Butyl NPR (4,5x35 mm, 2,5 µm). Se inyectaron aproximadamente 60 µl de muestra y se ejecutó un método de gradiente de la siguiente manera:

Fase móvil A: K₂HPO₄ 1 M (pH 8,5); Fase móvil B: agua; T=0 min. 90 % de A; T=40 min., 0 % de A; y T=50 min, 0 % de A.

Los máximos generalmente se eluyeron de la columna desde las especies con menor carga a las especies con mayor carga, aunque esto no se pudo verificar para cada ejemplo. La Figura 7 muestra los trazos de HIC producidos para varias variantes que ilustran la distribución de especies de anticuerpos con cargas variables. La Figura 7 muestra los trazos de (A) anticuerpo de control anti-5T4-L443C no cargado; (B) 5T4-L443C-vcMMAD; (C) 5T4-E380C-vcMMAD; y (D) 5T4-E380C-mcMMAD. Como puede observarse, el anticuerpo cargado puede separarse fácilmente del anticuerpo no cargado usando el método descrito. Por otra parte, las especies con carga diferencial normalmente pueden resolverse (aunque no siempre). El AUC de los distintos máximos que se muestran en la Figura 7 se usó para calcular los valores de carga basados en HIC y para complementar y verificar aún más los valores de carga determinados por otros métodos descritos anteriormente. Las cargas calculadas de esta manera se presentan en la Tabla 18 que compara las estimaciones de carga producidas usando la metodología HIC y la metodología EM. Como puede

observarse, existe una correlación muy estrecha entre los valores de carga calculados usando los dos métodos diferentes.

TABLA 18

| Anticuerpo | Carga útil del enlazador | Carga como se determina por el método EM | Carga como se determina por el método HIC |
|------------|--------------------------|--|---|
| 5T4-E380C | mcMMAD | 1,78 | 1,81 |
| 5T4-L398C | mcMMAD | 1,82 | 1,84 |
| 5T4-V422C | mcMMAD | 1,37 | 1,42 |
| 5T4-L443C | mcMMAD | 2,10 | 1,89 |
| 5T4-E380C | vcMMAD | 1,80 | 1,74 |
| 5T4-L443C | vcMMAD | 2,00 | 2,07 |

La metodología anterior proporciona varios métodos independientes para establecer la carga de enlaces de carga electrófila en los restos de Cys modificados por ingeniería genética. Estos métodos son complementarios, consistentes e independientes entre sí. La combinación de estos métodos permite determinar las estimaciones de carga incluso frente a factores complicados tales como cargas útiles que pueden contener funcionalidad que dé lugar a una ionización EM inusual o una alta absorción de UV. Estos datos demuestran que los ADC que comprenden una cisteína reactiva en una nueva posición en la región Fc de IgG1 proporcionan una plataforma útil para la producción de ADC potencialmente terapéuticamente efectivos que demuestran una DAR precisa que puede controlarse y medirse cuidadosamente.

EJEMPLO 8

Método de reducción/reoxidación para la conjugación de cargas útiles de maleimida a mutantes cys simples y dobles usando un método de conjugación alternativo ("Método B").

Si bien la metodología de conjugación descrita anteriormente dio resultados aceptables para la conjugación de mutantes de una sola cys, la cromatografía HIC mostró que había heterogeneidad significativa en el caso de mutantes doble-cys conjugados usando el método (Método A) descrito en el Ejemplo 7. Esto era de esperar ya que teóricamente puede obtenerse una diversidad de mutantes dobles parcialmente cargados donde hay cuatro cisteínas reactivas y cada HC comprende dos, proporcionando de esta manera una mezcla heterogénea de anticuerpos cargados 1, 2, 3 o 4 veces. Además, cada uno de los ADC cargados puede tener una carga no específica parcial sobre restos de cisteína internos, como se muestra en el Ejemplo 7. El resultado neto es un aumento exponencial de la heterogeneidad de los mutantes dobles en comparación con los mutantes simples.

Para mejorar la homogeneidad de la carga, se usó un procedimiento alternativo ("Método B") que implica la reducción completa del anticuerpo modificado por ingeniería genética con TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina) seguida de la reoxidación de los disulfuros internos con DHA (ácido deshidroascórbico), lo que permitió una conjugación con maleimidados que dio como resultado un ADC más homogéneo (medido por EM y por HIC). Las Figuras 8 y 9 muestran los trazados producidos por conjugaciones usando el método "A" (Figuras 8A, 8C, 8E, 8G, 9A, 9C, 9E y 9G) y conjugaciones usando el "Método B" (Figuras 8B, 8D, 8F, 8H, 9B, 9D, 9F y 9H). Las descripciones de los 8 conjugados son como sigue: 8A y 8B, 5T4-E380C-mcMMAD; 8C y 8D, 5T4-L398C-mcMMAD; 8E y 8F, 5T4-L443C-mcMMAD; 8G y 8H, 5T4-K388C-mcMMAD; 9A y 9B, 5T4-E380C+L398C-mcMMAD; 9C y 9D, 5T4-E398C+L443C-mcMMAD; 9E y 9F, 5T4-E380C+L443C-mcMMAD; y 9G y 9H, 5T4-E380C+V422C-mcMMAD.

En la Tabla 19 se presenta un resumen de los resultados de diversas conjugaciones usando el "Método A" y el "Método B". Los datos divulgados en la Tabla 19 y en las Figuras 8 y 9 demuestran que los conjugados generados usando el "Método B" mostraron una carga específica mejorada y una homogeneidad mejorada en comparación con los mismos conjugados preparados con el "Método A".

Conjugación del "Método B"

La conjugación del "Método B" se realizó de la siguiente manera. Se añadió una solución de TCEP 20 mM (50 a 100 equivalentes molares) al anticuerpo (5 mg) de tal manera que la concentración final del anticuerpo fuera 5 mg/ml en PBS que contenía EDTA 50 mM. Después de dejar reposar la reacción a 37 °C durante 1,5 horas, el anticuerpo se intercambió en tampón PBS que contenía EDTA 50 mM usando un dispositivo de concentración por centrifugación de corte de 50 kD MW (lavado 3x3 ml, concentración 10x por ciclo). El anticuerpo resultante se resuspendió en 1 ml de PBS que contenía EDTA 50 mM y se trató con una solución recién preparada de DHA 50 mM en PBS/EtOH 1:1 (concentración final de DHA = 1 mM - 4 mM) y se dejó reposar a 4 °C durante la noche.

La mezcla de anticuerpo/DHA se intercambió en tampón PBS que contenía EDTA 50 mM usando un dispositivo de

concentración por centrifugación de corte de 50 kD MW (lavado 3x3 ml, concentración 10x por ciclo). El anticuerpo resultante se resuspendió en 1 ml de PBS que contenía EDTA 50 mM y se trató con 33 µl de carga útil de maleimida 10 mM (mcMMAD) en DMA. Después de reposar durante 1,5 horas, el material se intercambió con el tampón (como se indicó anteriormente) en 1 ml de PBS (lavados 3x3 ml, concentración 10x por ciclo). Se realizó purificación por SEC (según fue necesario) para eliminar cualquier material agregado. Las estructuras de la carga útil-enlazador mcMMAD, vcMMAD y mcMMAF usadas para producir los resultados de las Tablas 15 a 19 se muestra en la Figura 10, que también incluye Mal-PEG6C2-MMAD y Mal-PEG3C2-MMAD.

Los resultados de carga de una diversidad de conjugaciones de mutantes de doble cisteína, que comprende cisteínas modificadas por ingeniería genética en los dominios constantes Fc y/o Kappa (Tabla 24; Ejemplo 10), usando tanto el Método A como el Método B, se proporcionan en la Tabla 19 a continuación.

TABLA 19

| Anticuerpo | Carga útil del enlazador | Carga (usando el Método B)* | Carga (usando el Método A)* |
|------------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 5T4-E380C | mcMMAD | 2,0 (0) | 1,8 (0,2) |
| 5T4-L398C | mcMMAD | 1,8 (0) | 1,8 (0,2) |
| 5T4-L443C | mcMMAD | 2,0 (0) | 2,1 (0,2) |
| 5T4-V422C | mcMMAD | 1,6 (0) | 1,4 (0,1) |
| 5T4-K392C | mcMMAD | 2,0 (0) | 1,7 (0,24) |
| 5T4-E380C-L398C | mcMMAD | 4,0 (0,2) | 3,2 (0) |
| 5T4-L398C-L443C | mcMMAD | 3,8 (0) | 3,2 (0) |
| 5T4-E380C-L443C | mcMMAD | 4,0 (0,2) | 3,6 (0) |
| 5T4-E380C-V422C | mcMMAD | 4,0 (0,2) | 3,3 (0) |
| Her2-E380C-L443C | mcMMAD | 4,3 (0,6) | ND |
| Her2-L443C | mcMMAD | 2,0 (0,08) | ND |
| Her2-E380C | mcMMAD | 1,9 (0,12) | ND |
| 5T4-L398C-L443C | mcMMAD | 3,8 (0) | ND |
| 5T4-L398C-V422C | mcMMAD | 3,7 (0) | ND |
| 5T4-K392C-L443C | mcMMAD | 3,5 (0) | ND |
| Her2-Q347C | MalPeg6C2-MMAD | 2 | ND |
| Her2-Q347C | mcMMAD | 2 | ND |
| Her2-Y373C | MalPeg6C2-MMAD | 1,6 | ND |
| Her2-Y373C | mcMMAD | 1,9 | ND |
| Her2-E380C | MalPeg3C2-MMAD | 2 | ND |
| Her2-E380C+L443C | MalPeg3C2-MMAD | 3,8 | ND |
| Her2-K392C | MalPeg6C2-MMAD | 2 | ND |
| Her2-K392C | mcMMAD | 2 | ND |
| Her2-K392C+L443C | mcMMAD | 4 | ND |
| Her2-L398C+L443C | mcMMAD | 4 | ND |
| Her2-N421C | MalPeg6C2-MMAD | 1,98 | ND |
| Her2-N421C | mcMMAD | 2,1 | ND |
| Her2-L443C | MalPeg3C2-MMAD | 2 | ND |
| Her2-L443C | MalPeg6C2-MMAD | 2 | ND |

(continuación)

| Anticuerpo | Carga útil del enlazador | Carga (usando el Método B)* | Carga (usando el Método A)* |
|---|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Her2-kappa-A111C | mcMMAD | 1,8 | ND |
| Her2-kappa-A111C+Q347C | mcMMAD | 3,5 | ND |
| Her2-kappa-A111C+K392C | mcMMAD | 3,6 | ND |
| Her2-kappa-A111C+L443C | mcMMAD | 3,5 | ND |
| Her2-kappa-K149C | mcMMAD | 1,7 | ND |
| Her2-kappa-K183C | mcMMAD | 1,9 | ND |
| Her2-kappa-K183C+L443C | mcMMAD | 3,8 | ND |
| Her2-kappa-K207C | mcMMAD | 1,8 | ND |
| Her2-kappa-K207C+L443C | mcMMAD | 3,5 | ND |
| * La carga informada se midió usando el método EM descrito en el ejemplo 3. El número entre paréntesis es la carga no específica estimada, según se determina por la carga observada en la cadena ligera. | | | |

La combinación de los datos de carga/especificidad de la Tabla 19 y los datos HIC de las Figuras 8 y 9 demuestran la heterogeneidad de la carga del fármaco cuando se conjugaron mutantes de doble cisteína usando el Método A descrito anteriormente en comparación con la carga mucho más homogénea lograda usando el Método de conjugación B.

Estos datos demuestran que la heterogeneidad potencial en la carga de los mutantes novedosos de cisteína de la divulgación puede reducirse fácilmente usando métodos de conjugación reconocidos en la técnica. Por lo tanto, los datos divulgados en el presente documento demuestran que los mutantes novedosos doble-cys de la divulgación pueden conjugarse fácilmente usando una diversidad de enlazadores para producir ADC casi homogéneos que comprenden una cantidad predecible y deseable de fracciones de carga útil por anticuerpo (es decir, DAR), así como homogeneidad en cuanto a los sitios de conjugación en los anticuerpos.

EJEMPLO 9

Caracterización de mutantes de cisteína modificados por ingeniería genética 5T4

Los Materiales y métodos en este ejemplo son los siguientes.

Líneas celulares:

Las células transfectadas MDAMB435/5T4 que expresaban el antígeno 5T4 humano y las células de control MDAMB435/neo que no fueron transfectadas se prepararon como se describió anteriormente (Boghaert *et al.*, 2008, Int. J. Oncol. 32:221-234). La línea celular Raji (CCL-86) se obtuvo de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA). Se determinó que las líneas celulares estaban libres de micoplasma según lo determinado por un ensayo de detección de micoplasma mediante reacción en cadena de la polimerasa (ATCC, Manassas, VA).

La línea celular MDAMB453/5T4, se mantuvo en medio MEM con sales de Earl suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10 %, 1 % MEM de aminoácidos no esenciales y 1 % MEM de vitaminas, piruvato sódico 1 mM, penicilina G sódica 100 U/ml, sulfato de estreptomycin 100 µg/ml y L-glutamina 2 mM más 1,5 mg/ml del antibiótico de selección G418.

La línea celular Raji se mantuvo en medio RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10 %, HEPES 10 mM (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico), piruvato sódico 1 mM, glucosa al 0,2 %, penicilina G sódica 100 U/ml, sulfato de estreptomycin 100 µg/ml y L-Glutamina 2 mM. Antes de usar Raji, las células viables se aislaron mediante centrifugación en gradiente de densidad (30 min a 1000xg) usando Lymphoprep (Nycomed, Oslo, Noruega).

Ratones:

Se obtuvieron ratones hembra nu/nu (desnudos) (18-23 g) de Charles River Laboratories, Wilmington, MA. Todos los procedimientos que usan ratones fueron aprobados por el Comité de Cuidado y Uso de Animales de Wyeth de acuerdo con las directrices establecidas.

Estudios de unión:

Las células que expresan 5T4 y las células Raji de control negativo, se sembraron a una densidad de 500.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos tratadas no de cultivo de tejidos y se mantuvieron en hielo. Las diluciones del anticuerpo primario se realizaron en BSA al 3 % en dPBS (solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, fosfato 100 mM, pH 7,4) y se añadió a la placa a una concentración final de 10 µg/ml. A continuación las placas se incubaron en hielo durante 1 hora seguido de 2 lavados con 1X DPBS. El anticuerpo secundario, cabra conjugado con PE anti-IgG humana (Jackson ImmunoResearch Labs n.º 109-115-098) se añadió a los pocillos a una dilución de 1:100. Después de 30 minutos de incubación a 4 °C, las placas se lavaron dos veces con 1X DPBS y a continuación se midió la intensidad de fluorescencia media usando un citómetro de flujo FACSort (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Sunnyvale, CA).

Estudios de modulación:

La modulación del anticuerpo anti-5T4 unido a la superficie, definida por la pérdida de la visualización de la superficie del anticuerpo unido, se evaluó mediante citometría de flujo. Las células MDAMB435/5T4 se sembraron a razón de 10.000 células en placas negras de 96 pocillos. El anticuerpo primario se añadió a una concentración final de 1 µg/ml. A continuación las placas se incubaron en hielo durante 1 hora, se lavaron dos veces con DPBS 1X y a continuación se incubaron a 4 °C en medio frío durante otra hora (esto se denomina en el presente documento "placa de unión"). Para estudios de internalización, las placas de internalización se incubaron a 37 °C durante 1, 4 o 20 horas. Las placas se lavaron una vez con DPBS 1X. El anticuerpo secundario, cabra Affinity Pure conjugado con peroxidasa anti-IgG humana (Jackson ImmunoResearch Labs n.º 109-035-008) se añadió a los pocillos a una dilución de 1:4000. Después de una hora de incubación a 4 °C con el anticuerpo secundario, las placas se lavaron tres veces y el sustrato, LumiGLO® (N.º de Cat. 54-61-01, Kirkegaard & Perry Labs., Gaithersburg, MD) se añadió. La diferencia en la fluorescencia relativa promedio entre la placa de unión y la placa de internalización se expresó como porcentaje de unión para estimar la internalización del anticuerpo.

Conjugación de anticuerpos anti-5T4 (mutantes y tipo silvestre precursor) con toxinas

La conjugación de mCMAD y vcMMAD con el anticuerpo anti-5T4 precursor de tipo silvestre (IgG1 de tipo silvestre humano sin mutaciones) y con nuevas variantes que comprenden una mutación que introduce una única cisteína reactiva en la región Fc de IgG1 se describió previamente en otro lugar en el presente documento (Ejemplo 7).

Estudios de inhibición del crecimiento:

El efecto de los ADC en las líneas celulares se evaluó usando un ensayo indicador de viabilidad celular, CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTS) (Promega, Madison, WI), para determinar el número de células supervivientes tras la exposición a diversos tratamientos con ADC. Las células se sembraron en placas de microtitulación de 96 pocillos a una densidad de 5.000 a 10.000 células por pocillo y se expusieron a diversas concentraciones de anticuerpos o ADC. Tras la determinación del número de células viables que sobreviven 96 horas de exposición al fármaco (o 240 horas para las células primarias 37622a), la CI_{50} de cada tratamiento se calculó basándose en los parámetros de regresión logística derivados de las curvas de respuesta a la dosis. Las CI_{50} se calcularon mediante regresión logística no lineal y se informan como la concentración (nM) de cada grupo de tratamiento que provoca una pérdida del 50 % de la viabilidad celular.

Ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC):

Se recogió sangre de un voluntario sano en un tubo de preparación de células BD Vacutainer CPT con heparina sódica. Los mononucleocitos de sangre periférica humana (PBMC) se recogieron y se resuspendieron en un tampón de ensayo (RPMI 1640 suplementado con HEPES 10 mM) a $2,5 \times 10^7$ células/ml. Las células diana MDAMB435/5T4 o las células de control MDAMB435/neo se sembraron a una densidad de 1×10^4 células/pocillo en una placa de ensayo de 96 pocillos. Se añadieron anticuerpos o ADC, a continuación se dispensaron células efectoras PBMC humanas (5×10^5) en los pocillos para lograr una relación célula efectora: célula diana (E:T) de 50:1. La placa de ensayo se incubó a 37 °C durante 4 horas para la actividad ADCC. La placa se recogió añadiendo un volumen igual de reactivo CytoTox-One (Promega). Se añadió solución de parada (Promega; 50 µl) a cada pocillo y se cuantificó la liberación de lactato deshidrogenasa midiendo la intensidad de fluorescencia. Como un control positivo, se añadieron 2 µl de tampón de lisis por pocillo para generar una liberación máxima de LDH (citotoxicidad al 100 %) en los pocillos de control. El porcentaje de citotoxicidad específica se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Citotoxicidad específica} = \frac{\text{experimental} - \text{efector espontáneo} - \text{diana espontánea}}{\text{diana máxima} - \text{diana espontánea}} \times 100$$

Donde "experimental" corresponde a la señal medida en una de las condiciones experimentales, "efector espontáneo" corresponde a la señal medida en presencia de PBMC solas, "diana espontánea" corresponde a la señal medida en presencia de células diana solas y "diana máxima" corresponde a la señal medida en presencia de células diana lisadas con detergente solas.

Los resultados experimentales fueron los siguientes.

La unión a 5T4 en las células por variantes anti-5T4 no conjugadas es equivalente a la unión por anticuerpo precursor anti-5T4 de tipo silvestre no conjugado:

- 5 Unión de los anticuerpos mutantes de cisteína única anti-5T4 IgG1 (L443C, E380C, L398C, V422C, T359C, S254C, S440C y K392C), todos anticuerpos "desnudos" no conjugados, la expresión de 5T4 en la membrana de la línea celular 5T4 + MDAMB435/5T4 se demostró como se muestra en la Figura 11. La unión de cada uno de los anticuerpos 5T4 mutantes cys no conjugados fue similar a la del anticuerpo 5T4 IgG1 no conjugado de tipo silvestre (etiquetado como "IgG1ts") en ambas concentraciones probadas (1 µg/ml y 10 µg/ml). Estos datos demuestran que la introducción de una cisteína modificada por ingeniería genética en estas posiciones novedosas de IgG1 humana no afectó significativamente la unión de los anticuerpos a las células tumorales que expresan el antígeno.

La unión a las células que expresan el antígeno 5T4 no se vio afectada por la conjugación de ADC novedosos de variantes de cisteína mutantes conjugados con cargas útiles tóxicas

- 15 Los datos divulgados previamente en el presente documento demuestran que la introducción de cisteínas modificadas por ingeniería genética en posiciones novedosas de IgG1 humana no afectó a la unión del anticuerpo a las células en comparación con la unión del anticuerpo de tipo silvestre que comprende la región Fc de IgG1 de tipo silvestre humana sin mutaciones. Los estudios previos han demostrado que la biotina u otras moléculas pequeñas conjugadas con cisteínas modificadas por ingeniería genética en otras posiciones de la IgG1 humana no parecían afectar a la unión de los anticuerpos a sus antígenos. Véanse, por ejemplo, el documento WO 2011/005481 (conjugación biotina-maleimida); el documento WO 2010/141902 (conjugación de variantes de cisteína con colorantes maleimida); y el documento WO 2006/034488 (se realizó la conjugación de biotina-maleimida y todos los ejemplos que describen la conjugación con MMAE y MMAF fueron solo proféticos). Sin embargo, la conjugación de una pequeña molécula no tóxica tal como biotina, como se usaba normalmente en esos estudios, es poco probable que imite el impacto en las propiedades biológicas de una molécula de anticuerpo mediada por la conjugación de una fracción mucho más grande tal como un enlazador y una molécula de toxina. Debido a que un anticuerpo de plataforma ADC exitoso debe unirse eficazmente a un antígeno diana para suministrar una carga tóxica a la célula diana, sin unión significativa a células no diana, es crucial que los anticuerpos mutantes modificados por ingeniería genética de la divulgación conserven la capacidad de unión específica mientras se conjugan con una carga tóxica. En consecuencia, se evaluó la capacidad de los anticuerpos novedosos mutantes modificados por ingeniería genética de la presente divulgación para unirse a células diana que expresan el antígeno 5T4, y no para unirse a células 5T4 negativas. Como se demuestra más adelante, los anticuerpos novedosos mutantes de cisteína cuando se conjugan con una toxina conservan las características de unión específicas del anticuerpo precursor no conjugado y no muestran una unión no específica.

- 35 Los conjugados de anticuerpos y fármacos se prepararon usando cuatro (4) de los mutantes de cisteína 5T4: E380C, L398C, L443C e V422C. En cada caso, el ADC se preparó conjugando los anticuerpos mutados con mcMMAD y vcMMAD como se divulgó anteriormente en el presente documento (véase el Ejemplo 7).

- 40 Se comparó la unión de los ADC 5T4 específicamente conjugados con mcMMAD a través de cisteínas modificadas por ingeniería genética con el anticuerpo precursor IgG1 de tipo silvestre 5T4 nativo no conjugado en la línea celular MDAMB435/5T4 5T4-positiva y en la línea celular Raji 5T4-negativa. Los resultados se muestran en la Figura 11. La Figura 12A muestra un gráfico que demuestra que para 5T4-L398C-mcMMAD, 5T4-443C-mcMMAD y 5T4-V422C-mcMMAD, la unión del ADC a las líneas celulares positivas para 5T4, en promedio para las tres (3) concentraciones de ADC probadas (1, 3 y 10 µg/kg), era similar a la del anticuerpo 5T4 nativo no conjugado. Estos datos demuestran que la conjugación de un enlazador y una carga útil a cada uno de estos nuevos anticuerpos mutantes de cisteína 5T4 no afectó significativamente a su capacidad para unirse al antígeno 5T4 en las células. Los datos que se muestran en la Figura 12B demuestran que cada uno de los ADC mostró una unión insignificante a la línea celular Raji 5T4-negativa, lo que demuestra que la conjugación de un enlazador y una carga útil a los anticuerpos mutados con cisteína no afecta las propiedades de unión de 5T4 en relación con el anticuerpo IgG1 de tipo silvestre precursor.

La internalización de los ADC mutantes cys es comparable al anticuerpo IgG1 de tipo silvestre precursor:

- 55 Otra propiedad crítica para la actividad de un ADC es internalizarse rápidamente mientras está conjugado con una toxina para suministrar la carga tóxica al compartimento lisosómico intracelular. De nuevo, los estudios anteriores han demostrado la capacidad de los supuestos ADC novedosos de internalizarse mientras están conjugados con la pequeña molécula de vitamina biotina. Los ADC mutantes novedosos de cisteína de la presente divulgación se sometieron a pruebas más rigurosas y apropiadas para determinar si se internalizarían mientras se conjugaban con una verdadera combinación representativa de enlazador y carga útil citotóxica (por ejemplo, mcMMAD) con una eficiencia comparable en comparación con la internalización del anticuerpo precursor que comprende IgG1 de tipo silvestre conjugado convencionalmente con la misma combinación de enlazador-carga útil. Los resultados divulgados en el presente documento demuestran que los ADC mutantes Cys novedosos se internalizaron con una eficiencia comparable a la del ADC de control precursor.

- 65 Cuando el anticuerpo precursor 5T4-IgG1 no conjugado o el ADC mutante Cys (E380C, L398C, L443C y el anticuerpo precursor IgG1, cada uno conjugado con mcMMAD) se incubó con células MDAMB435/5T4 a 37 °C durante 4 horas

a una concentración de 2,25 µg/ml, el ADC se moduló (es decir, se internalizó de tal manera que ya no se detectó en la membrana celular) de manera dependiente del tiempo como lo demuestran los resultados que se muestran en la Figura 13. A las 4 horas, aproximadamente el 65 % del anticuerpo anti-5T4 precursor no conjugado o ADC se internalizó (el intervalo fue de un máximo de 70 % para L398C a un mínimo de 54 % para L443C). Estos resultados demuestran que la unión del anticuerpo 5T4 al antígeno 5T4 se internaliza de manera relativamente rápida, que la conjugación de los 4 Ab anti-5T4 mutados a un enlazador y una carga de toxina no afecta significativamente su internalización en relación con el Ab 5T4 no conjugado, y que los ADC anti-5T4 mutados se internalizan en un grado equivalente al ADC 5T4-mcMMAD no mutado (nativo) (designado "A1-IgG1mcMMAD"). Por lo tanto, estos datos demuestran que la conjugación con una carga citotóxica y un enlazador, no solo biotina, no afecta a la capacidad de los ADC mutantes cys de internalizarse en comparación con el anticuerpo mutante anti-5T4 cys no conjugado o el anticuerpo precursor que comprende una región Fc de IgG1 de tipo silvestre conjugada con la carga útil MMAD mediante métodos convencionales.

La citotoxicidad de los ADC mutantes cys fue comparable a la del ADC de tipo silvestre precursor:

También se probó la plataforma ADC para determinar si puede mediar un efecto citotóxico en las células diana sin afectar significativamente a las células no diana. Es decir, el ADC, mientras transportaba una carga citotóxica, aún debe unirse específicamente a las células diana pero no unirse significativamente a las células no diana, a continuación debe internalizarse y suministrarse la carga útil a un compartimento donde a continuación mediará un efecto citotóxico en las células diana mientras que preserva las células no diana que pueden estar cerca. Los ADC novedosos de la presente divulgación se sometieron a esta prueba y, como se muestra a continuación, fueron capaces de unirse a las células diana mientras transportaban un verdadero enlazador y carga útil (no solo la vitamina biotina no tóxica), internalizarse y mediar un efecto citotóxico en las células diana, sin afectar a las células no diana. Este efecto fue comparable al del anticuerpo precursor que comprendía una región Fc de IgG1 de tipo silvestre.

Los resultados establecidos en la Tabla 20 demuestran que los ADC mcMMAD y vcMMAD mutados con Cys 5T4 fueron capaces de inhibir el crecimiento de las líneas celulares que expresan 5T4 MDAMB435/5T4 (un alto expresor de 5T4) y MDAMB-468 (una línea celular resistente a HER2 con expresión moderada de 5T4). Se observó que los mismos ADC eran en gran medida inactivos en las células Raji 5T4 negativas. El aumento de la carga de fármaco en los mutantes dobles Cys se refleja en un aumento detectable en la potencia de la inhibición del crecimiento de las líneas celulares MDAMB435 y MDAMB-468. Los anticuerpos mutantes Cys conjugados con vcMMAD fueron aproximadamente 10 veces más potentes que los ADC mcMMAD para inhibir el crecimiento en las células 5T4+. Los ADC vcMMAD están enlazados con un enlazador vc sensible a la cathepsina más lábil y, por lo tanto, son más activos en la inhibición del crecimiento celular que los ADC mcMMAD enlazados de manera más estable. Al ser más lábiles, los ADC enlazados a vc también tienden a ser más tóxicos en los animales. Ambos tipos de enlazadores se han probado en la clínica como ADC. Estos datos demuestran que los mutantes cys novedosos de la divulgación proporcionan una plataforma eficaz para la producción de ADC homogéneos eficaces que pueden administrar una carga citotóxica con una estequiometría precisa de DAR y, por lo tanto, proporcionar un efecto terapéutico. La citotoxicidad observada para estos ADC depende de la expresión del antígeno y de la carga de anticuerpos (DAR).

TABLA 20

| Anticuerpo mutante | Carga útil | Carga (método de preparación) | CI-50 (ng de ADC/ml) MDAMB435 /5T4 (5T4+) (expresión de 5T4 3+) | CI50 MDA-MB-468 (ng/ml) (expresión de 5T4 2+) | CI-50 (ng de Ab/ml) Raji (5T4) (expresión de 5T4 -) |
|--------------------|------------|-------------------------------|---|---|---|
| 5T4-E380C | mcMMAD | 2,0 (B) | 170 | 8100 | 29000 |
| 5T4-K392C | mcMMAD | 2,0 (B) | 160 | 32000 | >75000 |
| 5T4-L398C | mcMMAD | 1,8 (B) | 160 | 13000 | >83000 |
| 5T4-L443C | mcMMAD | 2,0 (B) | 120 | 20000 | >75000 |
| 5T4-V422C | mcMMAD | 1,6 (B) | 270 | 36000 | 84000 |
| 5T4-K392C+L443C | mcMMAD | 3,5 (B) | 98 | 30000 | >43000 |
| 5T4-L398C+L443C | mcMMAD | 3,8 (B) | 81 | 5500 | >39000 |
| 5T4-L398C+V422C | mcMMAD | 3,7 (B) | 100 | 17000 | >41000 |
| 5T4-E380C+L398C | mcMMAD | 4,0 (B) | 79 | 5100 | 19000 |
| 5T4-E380C+L443C | mcMMAD | 4,0 (B) | 79 | 3300 | 36000 |

(continuación)

| Anticuerpo mutante | Carga útil | Carga (método de preparación) | CI-50 (ng de ADC/ml) MDAMB435 /5T4 (5T4 ⁺) (expresión de 5T4 3+) | CI50 MDA-MB-468 (ng/ml) (expresión de 5T4 2+) | CI-50 (ng de Ab/ml) Raji (5T4) (expresión de 5T4 -) |
|--------------------|------------|-------------------------------|--|---|---|
| 5T4-E380C+V422C | mcMMAD | 4,0 (B) | 100 | 5000 | 21000 |
| 5T4-L398C+L443C | mcMMAD | 3,8 (B) | 79 | 7100 | >29000 |
| 5T4-E380C | vcMMAD | 1,8 (A) | 15 | ND | 25000 |
| 5T4-L398C | vcMMAD | 1,8 (A) | 14 | ND | >45000 |
| 5T4-L443C | vcMMAD | 2,0 (A) | 40 | 1400 | 16000 |
| 5T4-V422C | vcMMAD | 1,8 (A) | 15 | ND | ND |

La Tabla 21 ilustra la citotoxicidad de los mutantes anti-Her2 conjugados con la carga útil mcMMAD. Los datos divulgados demuestran además la citotoxicidad de los mutantes Fc anti-Her2 y los mutantes dobles de cadena Fc y kappa conjugados con MMAD a través de enlazadores mc, MalPeg6C2 y MalPeg3C2. De nuevo, el aumento de la carga de los mutantes dobles se refleja en un aumento de la potencia contra las líneas celulares que expresan Her2, BT474 y N87 (ambos considerados como altos expresadores de Her2). Los ADC fueron entre 100 y 1000 veces menos activos contra una línea celular que no expresaba Her2 (MDA-MB468). Estos datos indican que los sitios de mutación divulgados pueden transferirse eficazmente entre diferentes plataformas de anticuerpos (anticuerpos que se unen a 5T4 y Her2) y usando diversos enlaces y cargas útiles. Por lo tanto, estos datos demuestran que los mutantes novedosos cys de la divulgación son de amplia utilidad y son generalmente aplicables en todas las plataformas de anticuerpos y enlazadores y cargas útiles y no se limitan a esos anticuerpos, enlazadores y cargas útiles ejemplificados en el presente documento.

TABLA 21

| Anticuerpo mutante | Carga útil | Carga | BT474 (nM) | N87 (nM) | MDA-MB-468 (nM) |
|------------------------|----------------|-------|------------|----------|-----------------|
| Her2 Q347C | MalPeg6C2-MMAD | 2,0 | 0,65 | 1,9 | 850 |
| Her2 Q347C | mcMMAD | 2,0 | 1,1 | 38 | >750 |
| Her2 Y373C | MalPeg6C2-MMAD | 1,6 | 0,35 | 4,42 | >1000,00 |
| Her2 Y373C | mcMMAD | 1,9 | 1,1 | >710 | >930 |
| Her2 S375C | mcMMAD | 1,8 | 1,1 | 570570 | >770 |
| Her2 E380C | MalPeg3C2-MMAD | 2,0 | 0,87 | ND | 320 |
| Her2 E380C+L443C | MalPeg3C2-MMAD | 3,8 | 0,81 | 3,3 | 620 |
| Her2 E392C | MalPeg6C2-MMAD | 2,0 | 0,87 | 4,9 | 720 |
| Her2 E392C | mcMMAD | 2,0 | 0,61 | >520>520 | >810 |
| Her2 K392C+L443C | mcMMAD | 4,0 | 0,77 | 9,3 | >1000,00 |
| Her2 L398C+L443C | mcMMAD | 4,0 | 0,76 | 11 | 460 |
| Her2 N421C | MalPeg6C2-MMAD | 2,0 | 1,0 | 3,7 | 770 |
| Her2 N421C | mcMMAD | 2,1 | 0,78 | 30 | 430 |
| Her2 L443C | MalPeg3C2-MMAD | 2,0 | 0,82 | 2,8 | 520 |
| Her2 L443C | MalPeg6C2-MMAD | 2,0 | 0,39 | 2,3 | >890 |
| Her2 kappa-A111C | mcMMAD | 1,8 | 0,51 | 4433 | >1000 |
| Her2 Q347C+kappa-A111C | mcMMAD | 3,5 | 0,50 | 8,9 | >1000 |
| Her2 E392C+kappa-A111C | mcMMAD | 3,6 | 0,58 | 7,4 | >1000 |
| Her2 L443C+kappa A111C | mcMMAD | 3,5 | 0,66 | 6,4 | >1000 |

(continuación)

| Anticuerpo mutante | Carga útil | Carga | BT474 (nM) | N87 (nM) | MDA-MB-468 (nM) |
|------------------------|------------|-------|------------|----------|-----------------|
| Her2 kappa K183C | mcMMAD | 1,9 | 0,48 | 19 | 560 |
| Her2 L443C+kappa K183C | mcMMAD | 3,8 | 0,65 | 9,2 | 740 |
| Her2 L443C+kappa-K207C | mcMMAD | 3,5 | 0,66 | 7,1 | >1000 |
| Her2 E380C | mcMMAD | 1,9 | 0,91 | ND | 120 |
| Her2 E380C+L443C | mcMMAD | 4,3 | 1,8 | 8,7 | 310 |
| Her2 L443C | mcMMAD | 2,0 | 0,69 | ND | 410 |

La función efectora (ADCC) no se ve afectada por las mutaciones cys novedosas en la región Fc de IgG1 humana:

- 5 La región Fc de IgG1 puede mediar funciones efectoras deseables, tales como ADCC, que pueden proporcionar efectos terapéuticos adicionales al anticuerpo. En consecuencia, la función efectora, por ejemplo, la capacidad de mediar ADCC, de los anticuerpos mutantes cys de la presente divulgación se evaluó como sigue.

- 10 Los datos divulgados en el presente documento demuestran que los anticuerpos 5T4 mutantes Cys (E380C, L398C, V422C, L443C) y el anticuerpo nativo 5T4 que comprende una IgG1 de tipo silvestre mediaron cada uno la actividad ADCC dependiente de la dosis contra células diana MDAMB435/5T4 positivas para 5T4 (T) usando células efectoras humanas (E) de un voluntario sano (Figura 14A). Contra células neo MDAMB435 (5T4 +/-), no se observó actividad con ninguno de los Ab demostrando el requisito de direccionamiento del antígeno 5T4 para mediar la actividad de ADCC (Figura 14B). Estos datos demuestran que la introducción de cisteínas reactivas en las posiciones novedosas
- 15 divulgadas en el presente documento no afecta a la función efectora, por ejemplo, la capacidad de mediar ADCC, de la región Fc de IgG1 humana. Se sabe que las funciones efectoras proporcionan beneficios terapéuticos lo que enfatiza aún más la utilidad terapéutica potencial de los mutantes de la presente divulgación.

La farmacocinética de los ADC mutantes cys es comparable a la del anticuerpo IgG1 de tipo silvestre precursor:

- 20 Se realizó un estudio para determinar los parámetros farmacocinéticos del anticuerpo anti-5T4 humano que comprende una región Fc de IgG1 de tipo silvestre y un sitio de anticuerpo anti-5T4 mutante cys humano específicamente conjugado con una carga útil (ADC) en ratones nu/nu hembra (sin tumores) a los que se les administró una dosis única IV de 3 mg/kg de anticuerpo 5T4 solo, ADC 5T4-mcMMAD (conjugación cys convencional) o varios
- 25 ADC mcMMAD 5T4 cys mutantes. Se recogieron muestras de sangre de animales individuales en diversos momentos hasta 336 horas después de la dosificación y se analizaron para determinar las concentraciones de anticuerpos 5T4 y conjugados usando un ensayo basado en ELISA.

- 30 En este estudio, la eliminación sistémica del anticuerpo no conjugado 5T4 (Tabla 22) y del ADC conjugado específicamente en el sitio (Tabla 23) fue más lenta en comparación con la eliminación del ADC conjugado con cisteína convencional. Los valores de exposición (AUC) para el anticuerpo 5T4 fueron aproximadamente el 85 %, el 74 %, el 61 % y el 43 % más altos en ratones que recibieron 5T4-L398C-mcMMAD, 5T4-V422C-mcMMAD, 5T4-L443C-mcMMAD y 5T4-E376-CmcMMAD, respectivamente, en comparación con aquellos dosificados con el ADC 5T4-mcMMAD (conjugación cys convencional) como se muestra en la Tabla 22.

35

TABLA 22

| Compuesto | C _{máx} (µg/ml) | T _{1/2} (días) | AUC _{0-∞} (µg·h/ml) | CL (ml/h/kg) | V _{ss} (ml/kg) |
|------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------------|--------------|-------------------------|
| 5T4-mcMMAD | 49,3 ±2,8 | 4,2 ±1,6 | 3870 ±755 | 0,80 ±0,15 | 106 ±17 |
| 5T4-L398C-mcMMAD | 58,2 ±9,8 | 6,4 ±1,7 | 7160 ±1640 | 0,44 ±0,11 | 92 ±13 |
| 5T4-V422C-mcMMAD | 70,2 ±9,7 | 4,3 ±0,8 | 6740 ±1390 | 0,46 ±0,08 | 71 ±9 |
| 5T4-L443C-mcMMAD | 61,3 ±3,8 | 4,6 ±1,1 | 6220 ±1960 | 0,52 ±0,14 | 73 ±7 |
| 5T4-E380C-mcMMAD | 58,4 ±8,5 | 5,2 ±0,9 | 5550 ±938 | 0,55 ±0,09 | 90 ±8 |
| 5T4-IgG1 | 63,1 ±4,4 | 5,1 ±2,6 | 6410 ±3030 | 0,55 ±0,23 | 85 ±5 |

- 40 Al evaluar las concentraciones de conjugado (ADC), los valores de exposición fueron aproximadamente el 58 %, el 61 % y el 55 % más altos en ratones que recibieron 5T4-L398C-mcMMAD, 5T4-V422C-mcMMAD y 5T4-L443C-mcMMAD, respectivamente, en comparación con aquellos dosificados con el ADC 5T4-mcMMAD (conjugación de cisteína convencional) como se muestra en la Tabla 23. La exposición al ADC de 5T4-E380C-mcMMAD fue menor (-9 %) que la del ADC convencional (5T4-mcMMAD).

TABLA 23

| Compuesto | C _{máx} (µg/ml) | T _{1/2} (días) | AUC _{0-∞} (µg·h/ml) | CL (ml/h/kg) | V _{ss} (ml/kg) |
|------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------------|--------------|-------------------------|
| 5T4-L398C-mcMMAD | 56,1 ±3,2 | 5,2 ±1,2 | 5320 ±1090 | 0,58 ±0,13 | 94 ±6 |
| 5T4-V422C-mcMMAD | 78,5 ±8,3 | 4,2 ±0,6 | 5440 ±824 | 0,56 ±0,08 | 72 ±5 |
| 5T4-L443C-mcMMAD | 55,8 ±4,2 | 3,8 ±1,0 | 5220 ±1430 | 0,61 ±0,15 | 73 ±7 |
| 5T4-E380C-mcMMAD | 71,7 ±9,0 | 4,3 ±0,6 | 3030 ±326 | 1,00 ±0,10 | 97 ±9 |
| 5T4-mcMMAD | 48,0 ±4,8 | 4,1 ±0,8 | 3370 ±386 | 0,90 ±0,10 | 105 ±10 |

La mayor exposición a determinados ADC con cisteína mutante (por ejemplo, 5T4-L443C-mcMMAD) en comparación con el ADC convencional indica que la mejora de los parámetros PK depende del sitio de conjugación de la carga útil determinado por la posición de la cisteína modificada por ingeniería genética. Por lo tanto, la administración de ADC producidos usando la nueva metodología de conjugación específica del sitio a través de posiciones de cisteína modificadas por ingeniería genética particulares de esta divulgación, puede dar como resultado un suministro más eficiente de la carga citotóxica al sitio del tumor diana en comparación con los ADC convencionales.

EJEMPLO 10

Región constante Kappa modificada por ingeniería genética que comprende cisteínas reactivas para la conjugación específica del sitio

Se seleccionaron sitios para diseñar cisteínas reactivas en la región constante de la cadena ligera Kappa para expandir la diversidad de posiciones para la conjugación específica del sitio y permitir la conjugación de 4 cargas tóxicas por anticuerpo combinando regiones Kappa modificadas por ingeniería genética con mutantes de cisteína de región Fc única seleccionados. Las posiciones preferidas para las cisteínas modificadas por ingeniería genética en la región constante Kappa han predicho valores de pKa de 9,5 a 11,5 y una accesibilidad al disolvente de la cadena lateral predicha de 15-60 Å², propiedades que se prevé que imiten a los mutantes de cisteína conjugada más exitosos divulgados previamente en el presente documento, incluyendo, pero no limitado a Q347C, E380C, K392C y L443C.

Se realizaron predicciones de propiedades en varias estructuras cristalinas del dominio Kappa y las posiciones que dieron predicciones de propiedades óptimas en múltiples estructuras (2R8S y 1N8Z; Ye *et al.*, 2008, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 105:82-87 y Cho *et al.*, 2003, Nature 421:756-760, respectivamente) se prefirieron. Se examinó cada posición en cada estructura cristalina mutando primero la posición a cisteína y prediciendo el rotámetro con SCWRL4 (Krivov *et al.*, 2009, Proteins 77(4):778-795), a continuación prediciendo el pKa de la cadena lateral de cisteína usando métodos tales como aquellos descritos en, entre otros, Spassov y Yan, 2008, Protein Sci. 17:1955-1970) y la accesibilidad del disolvente de la cadena lateral usando Discovery Studio 3.0 (Accelrys, Inc., San Diego, CA). La Tabla 24 expone la ubicación de las mutaciones en relación con la región constante kappa humana endógena de tipo silvestre en donde el resto de aminoácido se mutó a cisteína para la conjugación específica del sitio reactivo de tiol. La Tabla 24 indica las posiciones donde los restos kappa humanos fueron reemplazados por cisteínas reactivas. Las posiciones se definieron mediante el sistema de numeración de Kabat como se establece en Kabat *et al.* (1991, Publicación del NIH 91 - 3242, National Technical Information Service, Springfield, VA), de manera que todas las posiciones están numeradas de acuerdo con el sistema Kabat.

TABLA 24

| Posición (Numeración Kabat) | SEQ ID NO de la región Ck completa | Aminoácidos que flanquean la cisteína modificada | SEQ ID NO de la porción que muestra el aminoácido modificado por ingeniería genética |
|-----------------------------|------------------------------------|--|--|
| Ck humana de tipo silvestre | 89 | No aplicable | No aplicable |
| A111C | 90 | TVCAPSVFIFPPSDEQLKSGT | 164 |
| K183C | 92 | YLSSTLTLSADYEKHKVYA | 166 |
| N210C | 95 | CEVTHQGLSSPVTKSFCRGEC | 169 |

EJEMPLO 11

Generación de anticuerpos anti-Her2 de la región constante Kappa humana modificados con cisteína única

Las regiones constantes Kappa humanas que comprenden cisteínas individuales modificadas por ingeniería genética en estas posiciones novedosas que se muestran en la Tabla 24 se incorporaron a un anticuerpo anti-Her2 (las

secuencias de aminoácidos de los dominios VH y VL de un anticuerpo Her2 ilustrativo se muestran en las Figuras 17C y 17D, respectivamente) para una evaluación adicional. El ácido nucleico que codifica la región constante Kappa de tipo silvestre humana del anticuerpo anti-Her2 se eliminó del vector de expresión mediante digestión con enzimas de restricción y se reemplazó por un ácido nucleico que codifica las regiones constantes Kappa de la cadena ligera humana que comprenden los restos de cisteína modificados por ingeniería genética individualmente usando la ADN ligasa T4 (New England Biolabs Inc., Ipswich, Massachusetts). Se confirmó la secuencia del ácido nucleico resultante para cada construcción. Estos datos demuestran que se produjeron ácidos nucleicos que codifican las cadenas ligeras Kappa modificadas por ingeniería genética que comprenden mutaciones para introducir cisteínas reactivas en la región constante.

EJEMPLO 12

Producción de variantes humanas Kappa modificadas por ingeniería genética con cisteína única de anticuerpos anti-Her2 a partir del sistema de expresión transitoria HEK-293

Para producir material suficiente para estudios de conjugación y determinar si las variantes podrían producirse en cantidades mayores, las células HEK-293 en bolsas de ondas de 10 l se cotransfectaron transitoriamente con ADN de cadena pesada y ligera que codifica las seis variantes de anticuerpos anti-Her2 de cisteína única modificados por ingeniería genética por ingeniería Kappa descritas anteriormente usando métodos convencionales. Después, los anticuerpos de la variante Kappa de cisteína única se purificaron usando una estrategia de purificación convencional de dos etapas, captura de afinidad de proteína A seguida de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Estos resultados mostrados en la Tabla 25 demuestran que se detectaron niveles aceptables de especies agregadas de alto peso molecular (HMW) a continuación de la elución de la resina de proteína A para las seis variantes de cisteína Kappa individuales y que estas especies de HMW podrían eliminarse mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Se demostró que las preparaciones de proteína de anticuerpo anti-Her2 Kappa modificada por ingeniería genética con cisteína única purificada final no forman especies agregadas de alto peso molecular después del almacenamiento a 4 °C durante 1 semana o cuando se someten a tres (3) ciclos de congelación/descongelación (Tabla 25).

TABLA 25

| Variante de cisteína kappa | % de HMW después de ProA | % de HMW proteína final | % de HMW a 4 °C 1 semana | % de HMW 3x congelación/descongelación | Rendimiento final [mg/litro] |
|----------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--|------------------------------|
| A111C | 9 | <1 | <1 | <1 | 19,0 |
| K183C | 7 | <1 | <1 | <1 | 18,9 |
| N210C | 13 | <1 | <1 | <1 | 18,2 |

Resumen de variantes de anticuerpos Kappa modificados por ingeniería genética con cisteína única anti-Her2 en el sistema de expresión transitoria HEK-293. Estos datos demuestran que las cadenas ligeras Kappa modificadas por ingeniería genética que comprenden una mutación en A111, K183 y N210, para introducir una cisteína reactiva, podría producirse fácilmente sin ningún efecto significativo en el rendimiento de anticuerpos y la propensión a agregarse.

EJEMPLO 13

Estabilidad *in vitro* de los ADC modificados por ingeniería genética

La estabilidad del enlace maleimida-cisteína se ha convertido en un área de creciente interés en los últimos años. Los informes recientes han demostrado que las maleimidas pueden transferirse tanto *in vitro* como *in vivo* a nucleófilos exógenos (véase, por ejemplo, Shen *et al.*, 2012, Nature Biotech. 30(2):184-185). Con el fin de evaluar la estabilidad de los ADC y priorizar las muestras para la evaluación *in vivo*, se desarrolló un ensayo novedoso que implica el tratamiento del ADC ligado a maleimida con exceso de glutatión acuoso (GSH) o plasma. Se analizan alícuotas de la mezcla de reacción en diversos puntos de tiempo para determinar la carga de ADC. Este método, descrito a continuación, se usó para evaluar la estabilidad de una serie de anticuerpos mutantes de cisteína de la divulgación que estaban enlazados a mCMAD y otros enlazadores de carga útil. Los resultados indican que el enlace fármaco-anticuerpo se escinde lentamente de manera dependiente de GSH (Tabla 26). De manera importante, la tasa de escisión depende en gran medida del sitio de modificación, permitiendo de esta manera una clasificación de los mutantes de cisteína basándose en su estabilidad. Los resultados del ensayo de estabilidad de GSH que se muestran en la Tabla 26 demuestran que los mutantes particulares (por ejemplo, E388C y L443C) son significativamente más estables que otros mutantes (por ejemplo, E380C y V422C).

Protocolo del ensayo:

La muestra de ADC (30 µg) en PBS se mezcló con solución de glutatión (GSH) para producir una concentración final de GSH de 0,5 mM y una concentración de proteína de 3 mg/ml. También se preparó una muestra de control (sin GSH) a partir de 30 µg de ADC diluido a 3 mg/ml en PBS. La muestra de ADC tratada con GSH y la muestra de ADC

de control se incubaron a 37 °C y se muestrearon a los 0, 3 y 6 días. Las alícuotas se redujeron con exceso de TCEP, se acidificaron añadiendo una solución de ácido fórmico al 0,1 % con acetonitrilo al 10 % y se analizaron para la carga mediante CL/EM como se describe a continuación.

- 5 Análisis de muestra: El análisis se realizó usando un HPLC capilar Agilent 1100 acoplado a un espectrómetro de masas Waters Xevo G2 Q-TOF. Los analitos se cargaron en una columna Zorbax Poroshell 300SB C8 (0,5 mm X 75 mm, mantenida a 80 °C) con ácido fórmico al 0,1 % y se eluyeron usando un gradiente de tampón B al 20-40 % (acetonitrilo al 80 %, 1-propanol al 18 %, agua al 2 % con ácido fórmico al 0,1 %) a un caudal de 20 µl/min durante 5,5 minutos. La detección espectrométrica de masas se realizó en modo de sensibilidad positivo con voltaje capilar establecido en 3,3 kV. Los análisis de datos se realizaron con la función MaxEnt 1 en MassLynx y se usaron intensidades para el cálculo de la carga según la fórmula descrita previamente (es decir, la Ecuación 1 establecida previamente en otro lugar en el presente documento). Los resultados de los análisis se muestran en la Tabla 26 a continuación.

15

TABLA 26

| Anticuerpo | Carga útil | Carga original Día 0 | Carga el Día 3 (+GSH) | Carga el día 6 (+GSH) | % de carga restante el Día 3 (+GSH) | % de carga restante el día 6 (+GSH) |
|-----------------------|----------------|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---|---|
| 5T4-E380C | mcMMAD | 2,0 | 1,0 | 0,6 | 48 % | 31 % |
| 5T4-E380C+L398C | mcMMAD | 3,9 | 3,7 | 2,9 | 94 % | 74 % |
| 5T4-E380C+L443C | mcMMAD | 4,0 | 3,0 | 2,8 | 77 % | 70 % |
| 5T4-E380C+V422C | mcMMAD | 3,0 | 2,4 | 2,2 | 81 % | 73 % |
| 5T4-K388C | mcMMAD | 1,9 | 2,0 | 2,0 | 101 % | 101 % |
| 5T4-K392C+L443C | MalPeg6C2_MMAD | 3,8 | 3,6 | 3,6 | 95 % | 95 % |
| 5T4-K392C+L443C | MalPeg3C2_MMAD | 3,9 | 3,9 | 3,9 | 100 % | 100 % |
| 5T4-K392C+L443C | mcMMAD | 3,9 | 3,8 | 3,7 | 97 % | 95 % |
| 5T4-L398C | mcMMAD | 2,0 | 1,9 | 1,6 | 96 % | 84 % |
| 5T4-L398C+L443C | MalPeg3C2_MMAD | 3,9 | 3,9 | 4,0 | 100 % | 103 % |
| 5T4-L398C+L443C | MalPeg6C2_MMAD | 3,8 | 3,8 | 3,9 | 100 % | 103 % |
| 5T4-L398C+L443C | mcMMAD | 3,9 | 3,7 | 3,5 | 95 % | 90 % |
| 5T4-L398C+L443C | mcMMAD | 3,9 | 3,1 | 3,3 | 80 % | 84 % |
| 5T4-L398C+V422C | MalPeg6C2_MMAD | 3,6 | 3,8 | 3,8 | 106 % | 106 % |
| 5T4-L398C+V422C | MalPeg3C2_MMAD | 3,9 | 3,9 | 4,0 | 100 % | 103 % |
| 5T4-L398C+V422C | mcMMAD | 3,8 | 3,6 | 3,3 | 95 % | 87 % |
| 5T4-L443C | mcMMAD | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 101 % | 99 % |
| 5T4-V422C | mcMMAD | 1,7 | 1,1 | 0,9 | 65 % | 53 % |
| Her2-E380C | mcMMAD | 1,8 | 0,7 | 0,4 | 39 % | 22 % |
| Her2-E380C+L443C | mcMMAD | 2,6 | 2,7 | 2,3 | 104 % | 88 % |
| Her2-E388C | MalPeg6C2_MMAD | 1,9 | 1,9 | 1,9 | 100 % | 100 % |
| Her2-E388C | mcMMAD | 2,0 | 1,9 | 1,9 | 95 % | 95 % |
| Her2-E388C+kappaA111C | mcMMAD | 3,7 | 3,5 | 3,5 | 95 % | 95 % |
| Her2-K392C+L443C | mcMMAD | 3,9 | 3,9 | 3,7 | 100 % | 95 % |
| Her2-kappaA111C | mcMMAD | 2,0 | 1,9 | 1,9 | 95 % | 95 % |
| Her2-kappaA111C | mcMMAD | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 100 % | 100 % |
| Her2-kappaK183C | mcMMAD | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 100 % | 100 % |

(continuación)

| Anticuerpo | Carga útil | Carga original Día 0 | Carga el Día 3 (+GSH) | Carga el día 6 (+GSH) | % de carga restante el Día 3 (+GSH) | % de carga restante el día 6 (+GSH) |
|-----------------------|----------------|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---|---|
| Her2-kappaK183C | mcMMAD | 2,0 | 1,9 | 1,7 | 95 % | 85 % |
| Her2-L398C+L443C | mcMMAD | 3,9 | 3,6 | 3,2 | 92 % | 82 % |
| Her2-L443C | MalPeg6C2_MMAD | 2,0 | 1,9 | 1,8 | 95 % | 90 % |
| Her2-L443C | mcMMAD | 1,9 | 1,9 | 1,7 | 100 % | 89 % |
| Her2-L443C+kappaA111C | mcMMAD | 4,0 | 3,7 | 3,6 | 93 % | 90 % |
| Her2-L443C+kappaK183C | mcMMAD | 3,9 | 3,8 | 3,6 | 97 % | 92 % |
| Her2-L443C+kappaK207C | mcMMAD | 3,5 | 3,5 | 3,5 | 100 % | 100 % |
| Her2-N421C | MalPeg6C2_MMAD | 1,9 | 2,0 | 2,0 | 105 % | 105 % |
| Her2-Q347C | MalPeg6C2_MMAD | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 100 % | 100 % |
| Her2-Q347C | mcMMAD | 2,0 | 1,8 | 2,0 | 90 % | 100 % |
| Her2-Q347C+kappaA111C | mcMMAD | 3,6 | 3,4 | 3,4 | 94 % | 94 % |
| Her2-Q421C | mcMMAD | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 100 % | 100 % |
| Her2-S375C | mcMMAD | 2,0 | 2,0 | 1,8 | 100 % | 90 % |
| Her2-Y373C | MalPeg6C2_MMAD | 1,7 | 1,4 | 1,0 | 82 % | 59 % |
| Her2-Y373C | mcMMAD | 1,6 | 1,5 | 1,4 | 94 % | 88 % |

EJEMPLO 14**5 Región constante Lambda modificada por ingeniería genética que comprende cisteínas reactivas para la conjugación específica del sitio**

Las cisteínas reactivas modificadas por ingeniería genética seleccionadas en la región constante de la cadena ligera Lambda divulgada en el presente documento expanden la diversidad de posiciones para la conjugación específica del sitio y permiten la conjugación de 4 cargas tóxicas por anticuerpo al combinar regiones Lambda modificadas por ingeniería genética con mutantes de cisteína de región Fc única seleccionados. Las posiciones preferidas para las cisteínas modificadas por ingeniería genética en la región constante Lambda de la divulgación han predicho valores de pKa de 9,5-11,5 y una accesibilidad al solvente de la cadena lateral predicha de 15-60 Å². Sin desear quedar ligados a teoría alguna, estas propiedades se comparten con los mutantes de cisteína conjugada preferidos divulgados previamente en el presente documento, incluyendo, pero no limitado a, las cisteínas del dominio constante de la cadena pesada modificadas por ingeniería genética en las siguientes posiciones: Q347C, E380C, K392C e L443C.

Se realizaron predicciones de las propiedades deseadas en varias estructuras cristalinas del dominio Lambda (dos estructuras no publicadas, más las entradas PDB 3H42 y 3G6A, descrito en Chan *et al.*, 2009, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 106:9820-9825 y Teplyakov *et al.*, 2009, J. Mol. Bio. 389:115-123, respectivamente) y se prefirieron las posiciones que proporcionaban predicciones de propiedades óptimas en múltiples estructuras. Se examinó cada posición en cada estructura cristalina mutando primero la posición a cisteína y prediciendo el rotámetro con SCWRL4 (Krivov *et al.*, 2009, Proteins 77(4):778-795), a continuación prediciendo el pKa de la cadena lateral de cisteína (usando métodos tales como aquellos descritos en, entre otros, Spassov y Yan, 2008, Protein Sci. 17:1955-1970) y la accesibilidad del disolvente de la cadena lateral usando Discovery Studio 3.0 (Accelrys, Inc., San Diego, CA). La Tabla 27 expone la ubicación de las mutaciones en relación con la región constante Lambda humana endógena de tipo silvestre en donde el resto de aminoácido se mutó a cisteína para la conjugación específica del sitio reactivo de tior. La Tabla 27 indica las posiciones donde los restos Lambda humanos fueron reemplazados por cisteínas reactivas. Las posiciones se definieron mediante el sistema de numeración Lambda como se establece en Kabat *et al.* (1991, Publicación del NIH 91 - 3242, National Technical Information Service, Springfield, VA), de tal manera que todas las posiciones están numeradas de acuerdo con el sistema Kabat.

TABLA 27

| Posición (Numeración Kabat) | SEQ ID NO de la región C λ completa | Aminoácidos que flanquean la cisteína modificada | SEQ ID NO de la porción que muestra el aminoácido modificado por ingeniería genética |
|---|---|---|---|
| C λ humana de tipo silvestre | 170 | No aplicable | No aplicable |
| Aminoácido C λ humano de tipo silvestre | 171 | No aplicable | No aplicable |
| K110C | 172 | GQPCAAPSVTLFPP | 189 |
| A111C | 173 | GQPKCAPSVTLFPPS | 190 |
| L125C | 174 | VTLFPPSSEECQANKATLVCL | 191 |
| K149C | 175 | FYPGAVTVAWCADSSPVKAGV | 192 |
| V155C | 176 | TVAWKADSSPCKAGVETTTPS | 193 |
| G158C | 177 | WKADSSPVKACVETTTPSKQS | 194 |
| T161C | 178 | DSSPVKAGVECTTPSKQSNNK | 195 |
| Q185C | 179 | ASSYLSLTPECWKSHRSYSCQ | 196 |
| S188C | 180 | YLSLTPEQWKCHRSYSCQVTH | 197 |
| H189C | 181 | LSLTPEQWKSCRSYSCQVTHE | 198 |
| S191C | 182 | LTPEQWKSHRCYSCQVTHEGS | 199 |
| T197C | 183 | EQWKSHRSYSCQVCHEGSTVE | 200 |
| V205C | 184 | SCQVTHEGSTCEKTVAPTECS | 201 |
| E206C | 185 | CQVTHEGSTVCKTVAPTECS | 202 |
| K207C | 186 | QVTHEGSTVECTVAPTECS | 203 |
| T208C | 187 | VTHEGSTVEKCVAPTECS | 204 |
| A210C | 188 | HEGSTVEKTVCPTECS | 205 |

EJEMPLO 15

5 Caracterización *in vivo* de anticuerpos modificados por ingeniería genética para conjugación específica del sitio

Se evaluaron los parámetros PK *in vivo* de diversos ADC conjugados específicos del sitio de la divulgación en un modelo de ratón. Resumiendo, la PK de varios ADC conjugados anti-Her2 específicos del sitio cargados con mcMMAD usando una carga útil de enlace MalPeg6C2_Aur, donde "Aur" es una carga útil de auristatina patentada también denominada "8261" y divulgada en la Solicitud de Patente Internacional N.º PCT/IB2012/056224, presentada el 7 de noviembre de 2012, que se incorpora por referencia como si se estableciera en su totalidad en el presente documento, se determinaron y los resultados se muestran en la Figura 21. No se observaron diferencias farmacocinéticas detectables significativas para los ADC específicos del sitio, independientemente del sitio (Fc C347, Fc C421, kappa 183, Fc C388, Fc C443, Fc C398+C443 y Fc C392+C443) usados para la conjugación (Figura 21A). Los datos divulgados en la Figura 21B demuestran que los conjugados específicos del sitio mostraron proporciones de AUC de ADC/anticuerpo de al menos aproximadamente el 70 %, con la mayoría cerca del 100%, a diferencia de los que normalmente se observan para los conjugados convencionales. Las proporciones del AUC del ADC al AUC del anticuerpo fueron normalmente más bajas y en el intervalo del 40 -60 %. Los datos divulgados en el presente documento demuestran que dos ADC específicos del sitio MalPeg6C2_Aur de doble modificación por ingeniería genética (es decir, DAR = 4) (L398C+L443C y K392C+L443C) exhibieron una PK comparable a la de los ADC de modificación por ingeniería genética simple (DAR = 2). Ambos tipos de ADC de sitio específico tuvieron una mejora significativa en las proporciones ADC/anticuerpo. Adicionalmente, los datos farmacocinéticos anti-Her2-mcMMAD se correlacionaron con los parámetros farmacocinéticos determinados para ADC comparables en un anticuerpo anti-5T4, lo que sugiere que las posiciones de cisteína modificadas por ingeniería genética pueden usarse en múltiples plataformas de anticuerpos para generar conjugados estables.

Modelo de carcinoma gástrico N87

La eficacia de las variantes de ADC anti-Her2-L443C, conjugado con cargas útiles de enlace propietarias seleccionadas, se determinó en el modelo de carcinoma gástrico N87 *in vivo*. Los resultados muestran eficacia *in vivo* comparable para los ADC anti-Her2-L443C-Mal-Peg6-C2-MMAD (Figura 22A), anti-Her2-L443C-MalPeg6C2-Aur (Figura 22B) y anti-Her2-L443C-vc0101 (un compuesto citotóxico novedoso divulgado en la Solicitud de Patente Internacional N.º PCT/IB2012/056224) (Figura 22C) con respecto a los datos históricos para los conjugados no específicos de sitio convencionales a pesar de aproximadamente un 50 % menor de carga por anticuerpo. Es decir, el promedio para los ADC anti-Her2-L443C es DAR = 2 en comparación con un DAR = 4 para los conjugados anti-Her2 no específicos convencionales (T-DM1; fármaco maitansinoide 1).

10 Modelo de tumor de xenoinjerto DYT2

Se evaluó la eficacia de los ADC conjugados específicos del sitio anti-Her2 en otro modelo tumoral. Se compararon ocho ADC mutantes de cisteína específicos del sitio modificados por ingeniería genética por MalPeg6C2-Aur con un conjugado convencional a 1 mg/kg en el modelo de xenoinjerto DYT2 y los resultados se muestran en la Figura 23. Los datos de este estudio indicaron que los mutantes individuales L443C, K388C y N421C y el mutante doble L398C+L443C tuvieron una potencia equivalente en relación con el conjugado convencional. Sin embargo, el mutante doble K392C+L443C y los mutantes individuales Q347C y kappa-K183C no fueron tan eficaces como el conjugado convencional (Figura 23). De manera general, la potencia *in vivo* de los ADC conjugados específicamente en el sitio que usan varias combinaciones de enlazador-carga útil es comparable a la observada para los conjugados convencionales.

Estudios de toxicología *in vivo*

Se realizaron estudios de toxicología en ratas usando conjugados anti-Her2-L443C-vc0101, anti-Her2-MalPeg6C2-MMAD y anti-Her2-MalPeg6C2-Aur en el modelo de carcinoma gástrico N87. Un conjugado específico del sitio de la divulgación, L443C-vc0101, demostró un mejor perfil de toxicidad en la dosis de carga útil más alta probada que el Her2-vc0101 conjugado convencionalmente. Se observó una mejora similar, pero ligeramente menos pronunciada en la seguridad en relación con el conjugado convencional para el ADC de sitio específico Her2-L443C-MalPeg6C2-Aur.

30 Determinación de valores del índice terapéutico (TI) para ADC conjugados específicos del sitio

Los valores del índice terapéutico (TI) del mcMMAD conjugado convencional frente al específico del sitio, vc0101 y conjugados mcAur anti-Her2 de la divulgación se determinaron y los resultados se muestran en la Figura 23. Los valores de TI se determinaron usando la relación de cNOAEL (del inglés "statistically derived No Observed Adverse Effect Levels" basados en la variable de respuesta continua) de estudios de toxicología en ratas hasta la eficacia definida como concentración estática del tumor (TSC). El ADC L443C-vc0101 específico del sitio anti-Her2 mostró un aumento de más del doble en el valor de TI en relación con un ADC conjugado convencionalmente. Esto se debió a una disminución de tres veces en la eficacia (TSC) que fue compensada con un aumento de 6 veces en la seguridad (cNOAEL mejorado). Los datos divulgados en el presente documento sugieren que los conjugados novedosos de anticuerpos específicos del sitio de la divulgación pueden usarse con determinadas combinaciones de enlazador-carga útil, tales como vc0101, y podrían exhibir una mejor ventana terapéutica que los anticuerpos conjugados convencionalmente.

Los datos divulgados en el presente documento demuestran que las posiciones novedosas identificadas para modificar por ingeniería genética cisteínas reactivas para permitir la conjugación específica del sitio produjeron ADC estables y eficaces con PK y TI mejorados con respecto a los conjugados convencionales en múltiples anticuerpos, carga útil y plataformas de enlazador.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de dominio constante de cadena ligera kappa (κ) humana modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos para introducir un resto de cisteína útil para la conjugación, ubicándose dicha al menos una sustitución en K183 de acuerdo con el sistema de numeración de índice de EU establecido en Kabat *et al.* (1991, Publicación del NIH 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, VA) y también de acuerdo con la numeración secuencial relativa a la secuencia de SEQ ID NO: 89.
2. El polipéptido κ modificado por ingeniería genética de la reivindicación 1, en donde el polipéptido κ modificado por ingeniería genética comprende SEQ ID NO:92.
3. El polipéptido κ modificado por ingeniería genética, o porción del mismo, de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos adicional en una ubicación seleccionada del grupo que consiste en 111 y 210, de acuerdo con la numeración de Kabat.
4. El polipéptido κ modificado por ingeniería genética, o una porción del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polipéptido modificado por ingeniería genética está conjugado con uno o más de un agente citotóxico, un agente citostático, un agente quimioterapéutico, una toxina, un radionucleido, ADN, ARN, ARNip, microARN, un ácido nucleico peptídico, un aminoácido no natural, un péptido, una enzima, una etiqueta fluorescente y biotina, en donde la conjugación es en la cisteína sustituida.
5. El polipéptido κ modificado por ingeniería genética, o una porción del mismo, de la reivindicación 4, en donde el agente citotóxico se conjuga al polipéptido a través de un enlazador.
6. El polipéptido κ modificado por ingeniería genética, o una porción del mismo, de la reivindicación 5, en donde el enlazador puede seleccionarse del grupo que consiste en mc (maleimidocaproilo), val-cit (valina-citrulina), mc-val-cit (maleimidocaproil-valina-citrulina), mc-val-cit-PABC (maleimidocaproil-valina-citrulina-*p*-aminobencilcarbamato), Mal-PEG2C2 (maleimido-[CH₂CH₂O]₂CH₂CH₂C(=O)), Mal-PEG3C2 (maleimido-[CH₂CH₂O]₃CH₂CH₂C(=O)) y Mal-PEG6C2 (maleimido-[CH₂CH₂O]₆CH₂CH₂C(=O)).
7. El polipéptido κ modificado por ingeniería genética, o una porción del mismo, de la reivindicación 6, en donde el agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste en una auristatina, un maitansinoide y una calicheamicina.
8. El polipéptido κ modificado por ingeniería genética, o una porción del mismo, de la reivindicación 7, en donde el enlazador y el agente citotóxico se seleccionan del grupo que consiste en maleimidocaproil-monometil auristatina D (mcMMAD), maleimidocaproil-0101 (mc0101), maleimidocaproil-3377 (mc3377), maleimidocaproil-8261 (mc8261), valina-citrulina-monometil auristatina D (vcMMAD), valina-citrulina-0101 (vc0101), valina-citrulina-3377 (vc3377), valina-citrulina-8261 (vc8261), 1 mcValCitPABCMMD (maleimidocaproil-valina-citrulina-monometil auristatina D), mcValCit0101 (maleimidocaproil-valina-citrulina-0101), mcValCit3377 (maleimidocaproil-valina-citrulina-3377), mcValCit8261 (maleimidocaproil-valina-citrulina-8261), Mal-PEG2C2-MMAD, Mal-PEG3C2-MMAD, Mal-PEG6C2-MMAD, Mal-PEG2C2-0101, Mal-PEG3C2-0101, Mal-PEG6C2-0101, Mal-PEG2C2-3377, Mal-PEG3C2-3377 y Mal-PEG6C2-3377, Mal-PEG2C2-8261, Mal-PEG3C2-8261 y Mal-PEG6C2-8261.
9. Un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende el polipéptido κ modificado por ingeniería genética de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
10. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende además un segundo polipéptido κ que comprende una secuencia de tipo silvestre.
11. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende además un segundo polipéptido κ , en donde la al menos una sustitución de aminoácidos del primer polipéptido κ modificado por ingeniería genética no está presente en el segundo polipéptido κ modificado por ingeniería genética, y en donde el segundo polipéptido κ modificado por ingeniería genética comprende al menos una sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada del grupo que consiste en 111 y 210 de acuerdo con la numeración de Kabat.
12. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el segundo polipéptido κ modificado por ingeniería genética comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 90 y 95.
13. El anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 9-12, en donde el polipéptido κ modificado por ingeniería genética comprende además al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada de las posiciones 111, 149, 188, 207 y 210, de la cadena ligera en donde la numeración es de acuerdo con Kabat, y que comprende además un polipéptido de dominio pesado constante (γ) humano modificado por ingeniería genética, o una porción del mismo, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada

del grupo que consiste en K246, D249, S254, D265, S267, D270, N276, Y278, E283, V284, A287, R292, E293, E294, Y300, V302, V303, L314, N315, E318, K320, I332, E333, K334, I336, E345, Q347, S354, R355, M358, K360, Q362, K370, Y373, D376, A378, E380, E382, Q386, E388, N390, K392, T393, D401, F404, T411, D413, K414, R416, Q418, Q419, N421, M428, A431, L432, T437, Q438, K439, L443 y S444, de la cadena pesada de acuerdo con el índice EU de Kabat.

- 5
14. El anticuerpo de la reivindicación 13, en donde el polipéptido Cy modificado por ingeniería genética comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 97-100, 102, 104, 107-127 y 129-163.
- 10 15. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido Ck modificado por ingeniería genética, o una porción del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, o un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9-14, y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 15 16. La composición de acuerdo con la reivindicación 15 para su uso en un método de tratamiento de cáncer, enfermedades o trastornos autoinmunitarios, inflamatorios o infecciosos en un sujeto que lo necesite.
- 20 17. Un ácido nucleico que codifica el polipéptido Ck modificado por ingeniería genética, o una porción del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, o el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9-14.
- 20 18. Una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 17.
- 25 19. Un método para producir un polipéptido Ck modificado por ingeniería genética, o una porción del mismo, o un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende incubar la célula hospedadora de la reivindicación 18 en condiciones adecuadas para expresar el polipéptido Ck modificado por ingeniería genética, o una porción del mismo, o el anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, y aislar el polipéptido Ck modificado por ingeniería genética, o una porción del mismo, o el anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo.

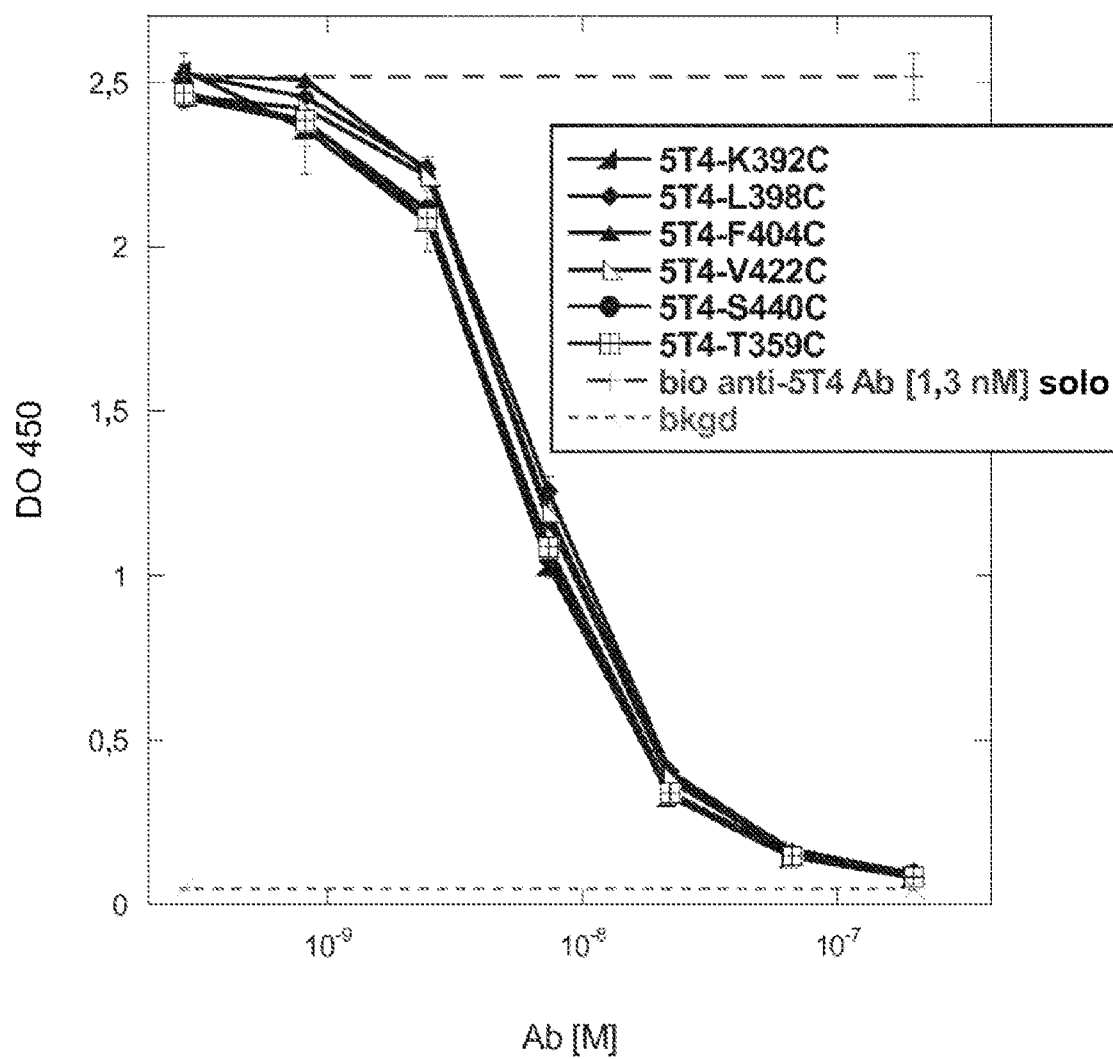
Figura 1

Figura 2

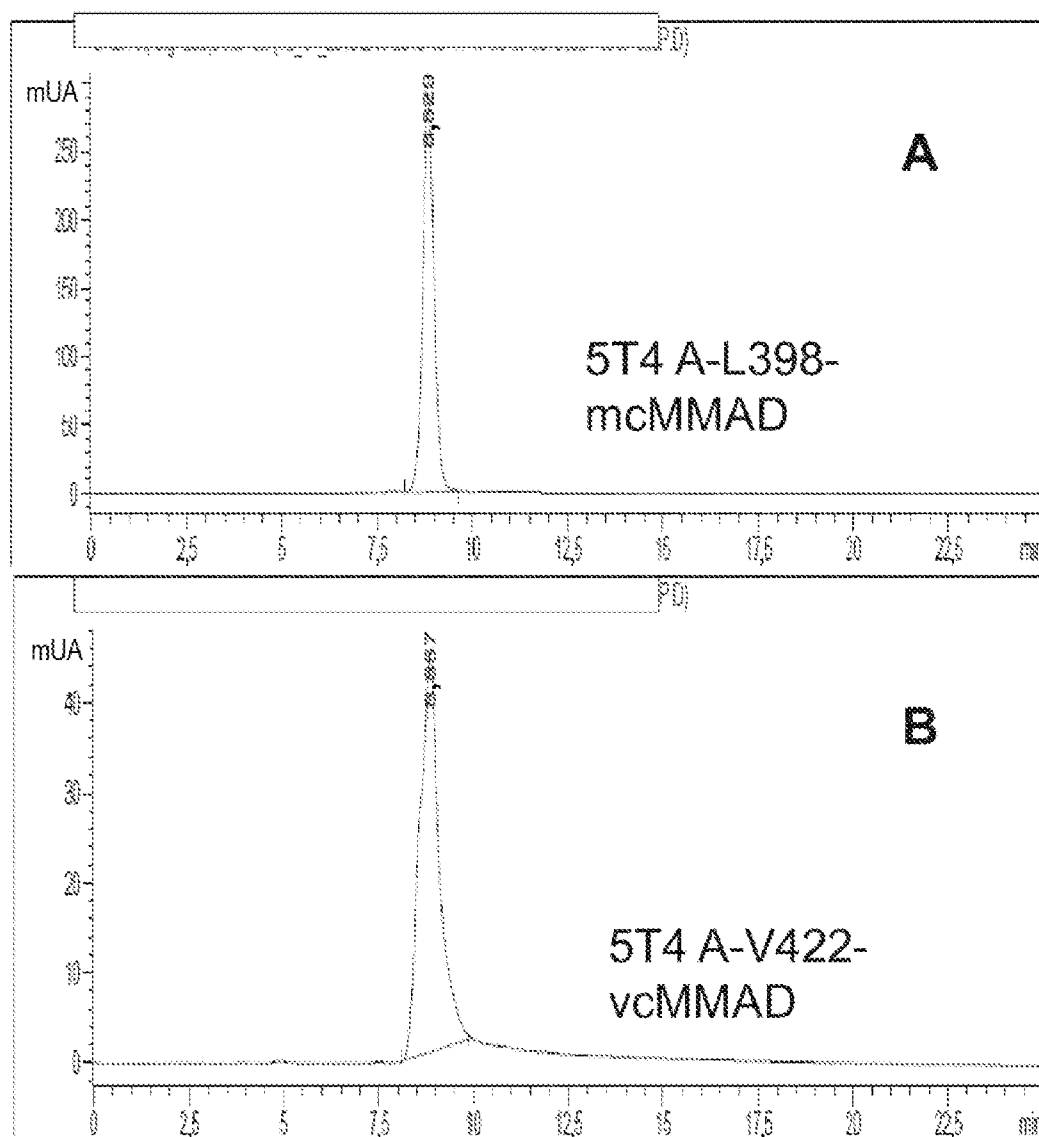
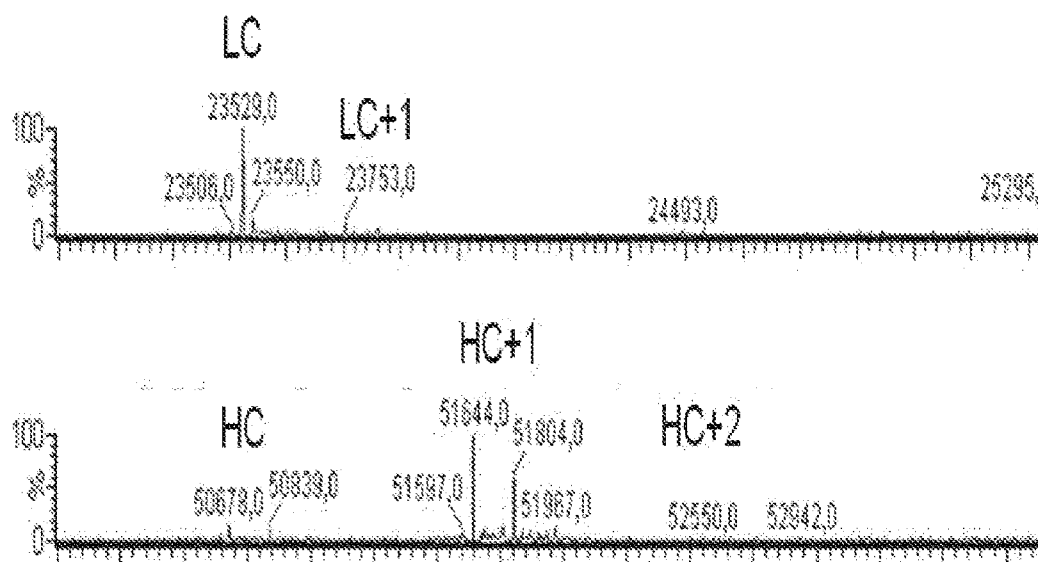


Figura 3A



Abundancia relativa de especies:

LC: 96,3

LC+1: 3,7

5T4 A-E380-mcMMAD

HC: 14,6

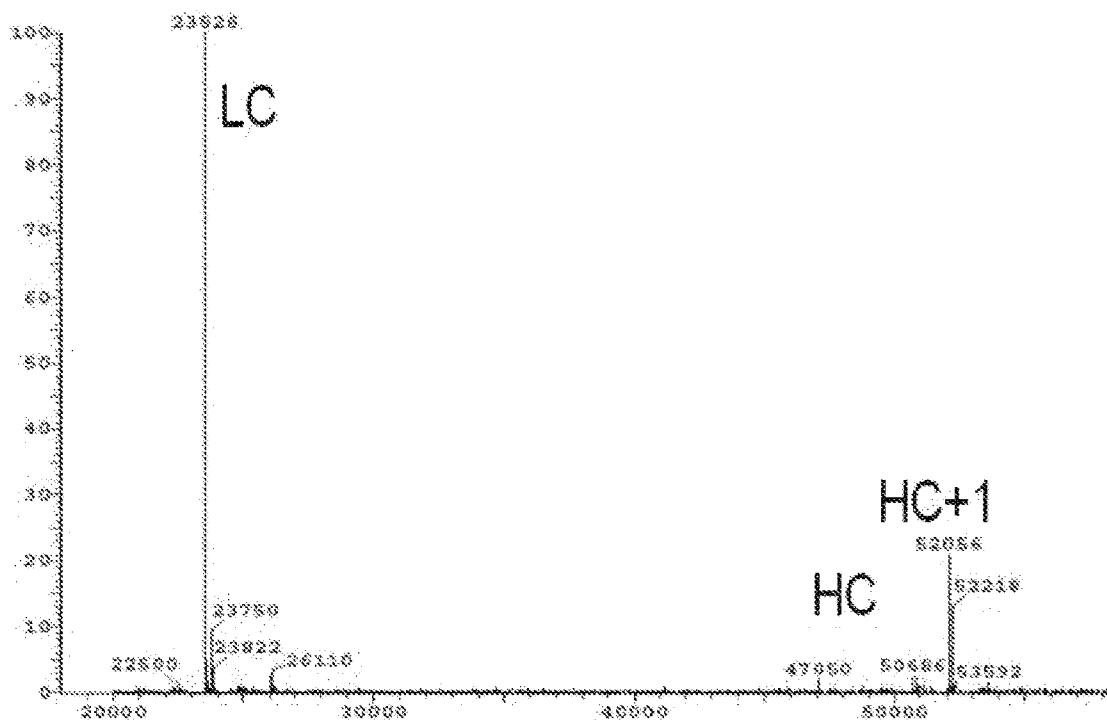
HC+1: 85,4

HC+2: trazo

Carga total calculada: 1,78

Carga no específica estimada: 0,15

Figura 3B



Abundancia relativa de especies:

LC: 100

LC+1: 0

HC: 12

5T4 A-L398C-vcMMAD

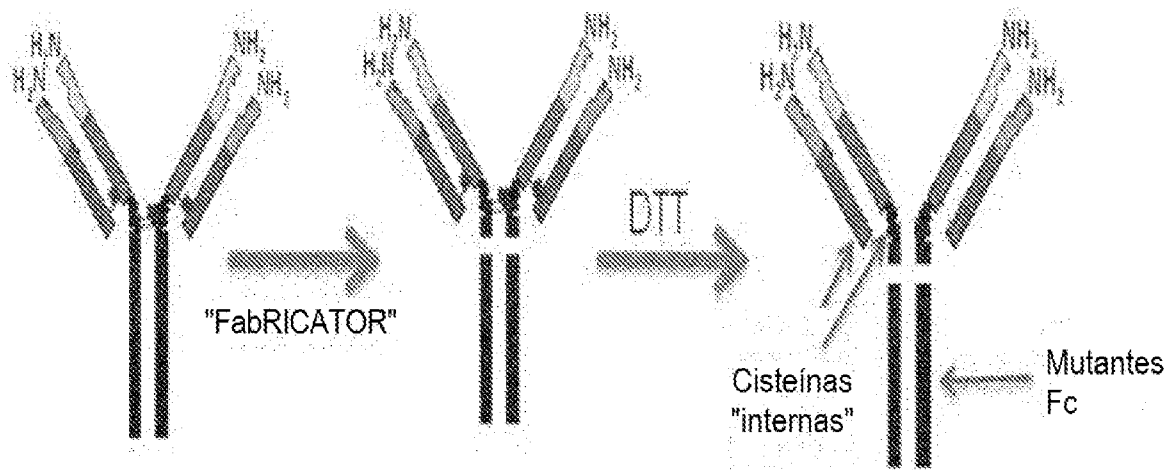
HC+1: 88

HC+2: 0

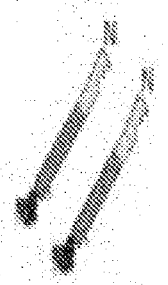
Carga total calculada: 1,76

Carga no específica estimada: 0,0

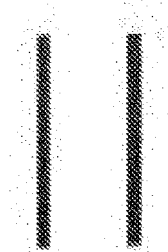
Figura 4



LC(23524) – un resto de cys "interno"



HC(N-term)(25378) – tres restos de cys "internos"



HC(C-term) -- ningún resto de cys "interno"
(25231/25396)

Figura 5

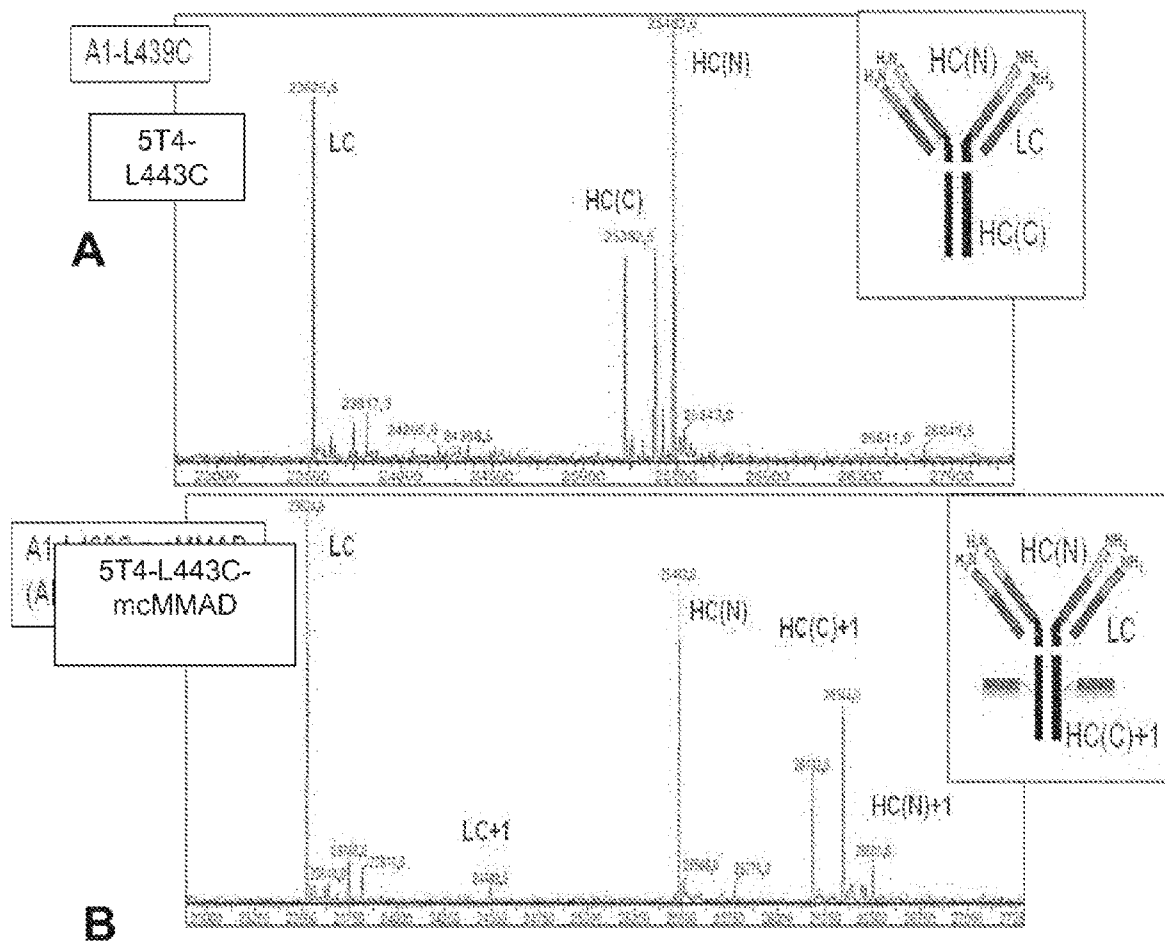


Figura 6

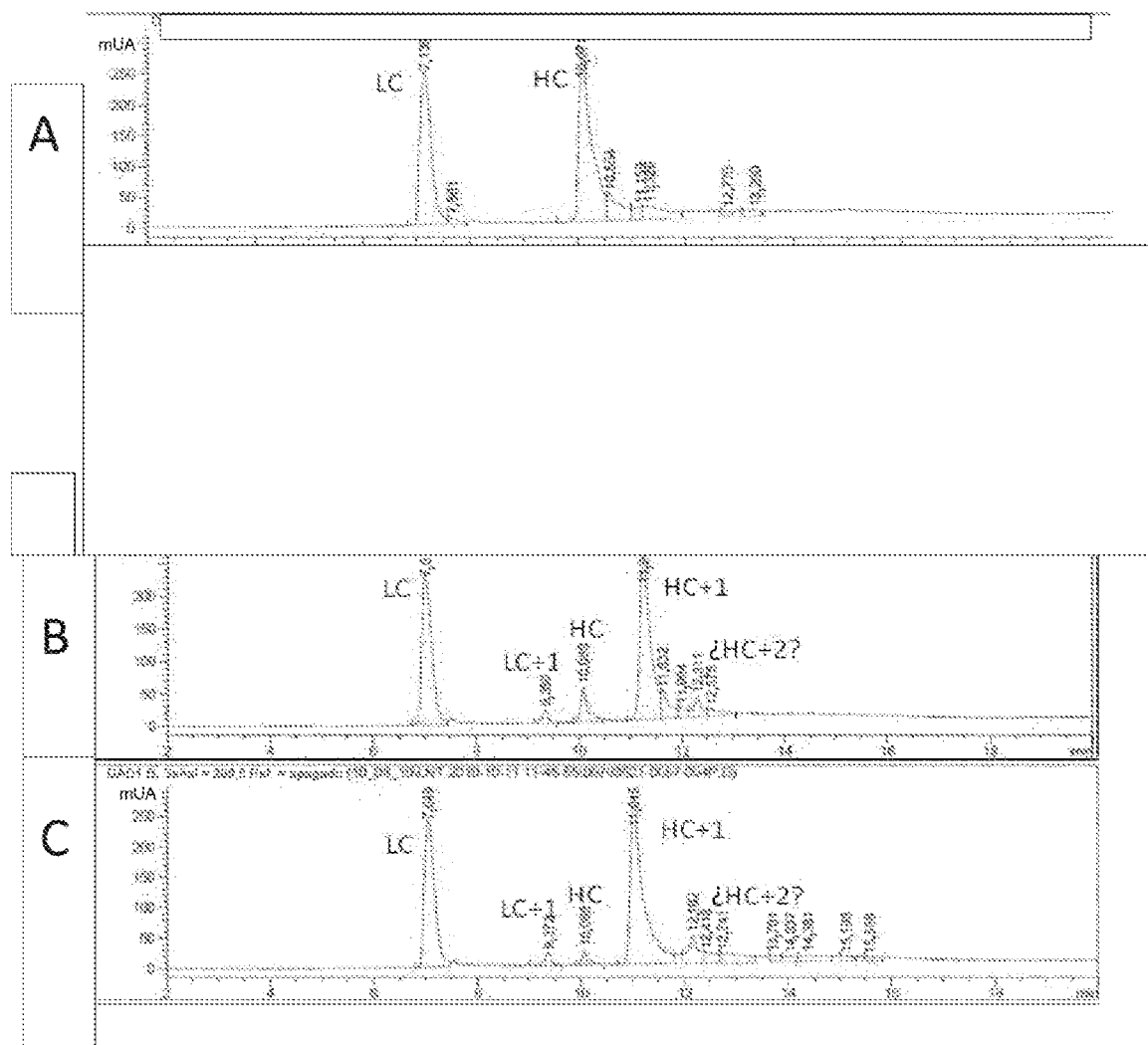


Figura 7

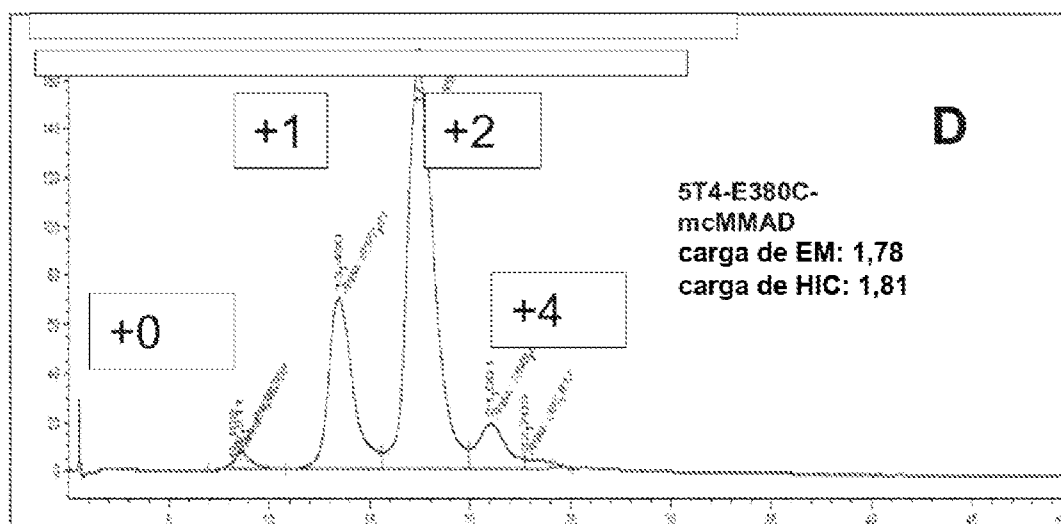
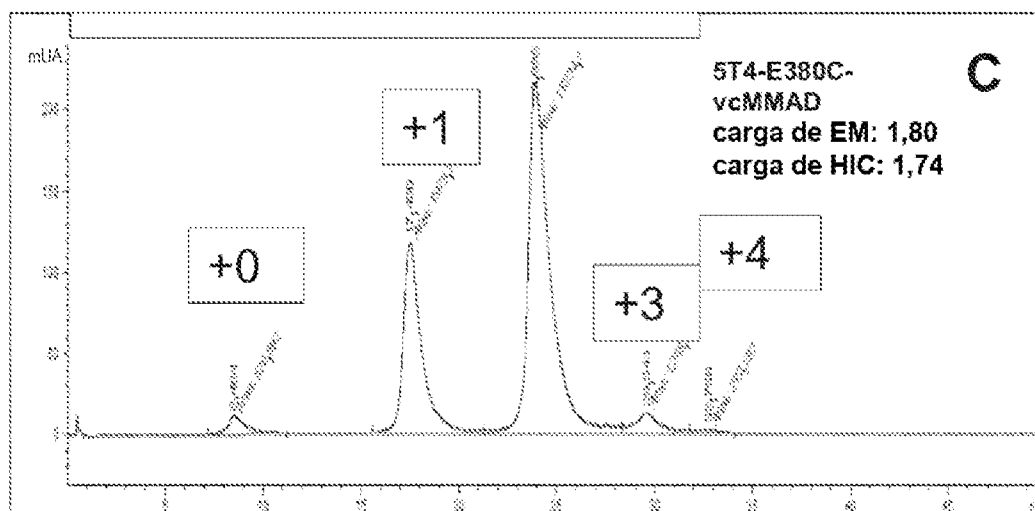


Figura 8

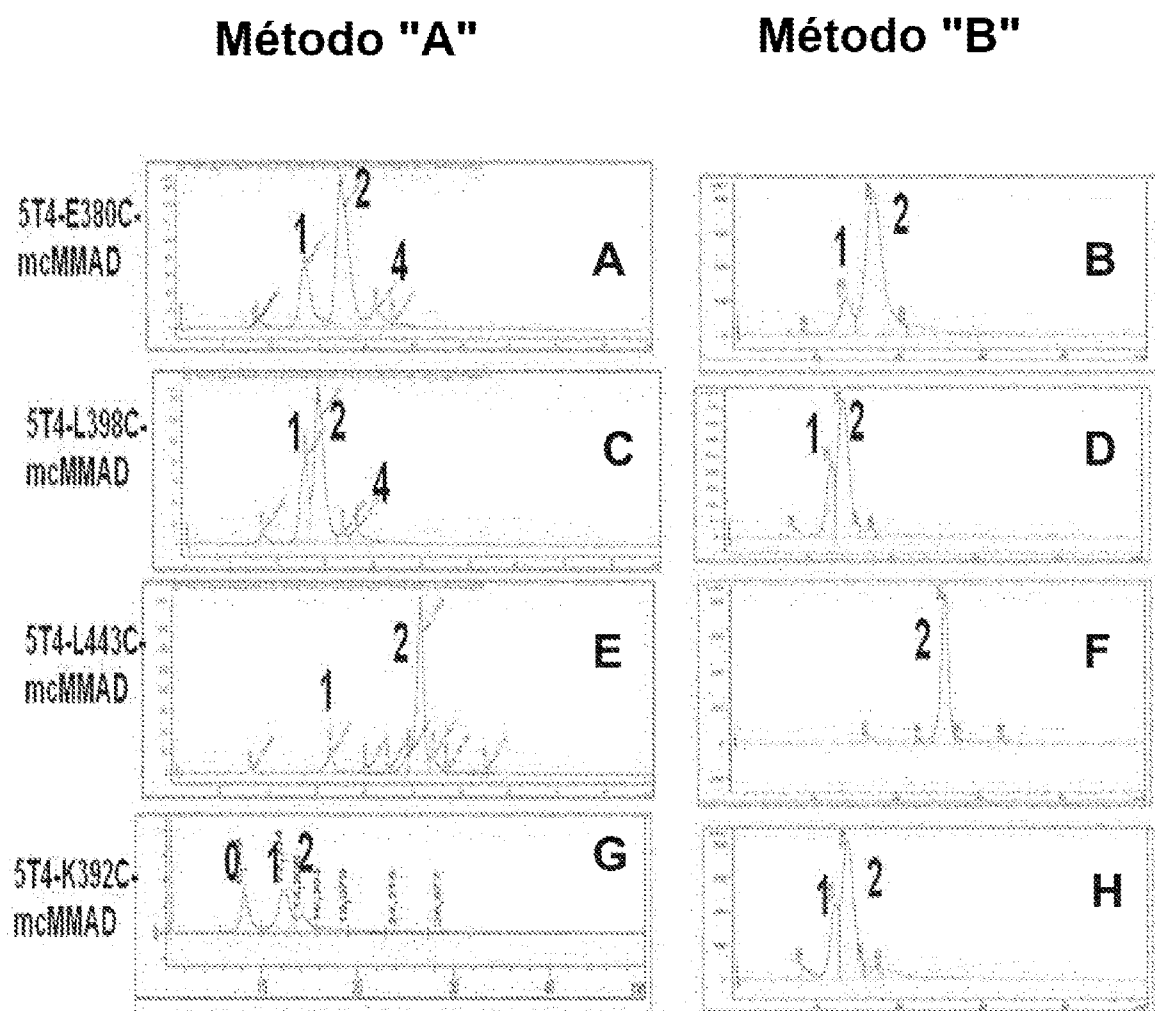


Figura 9

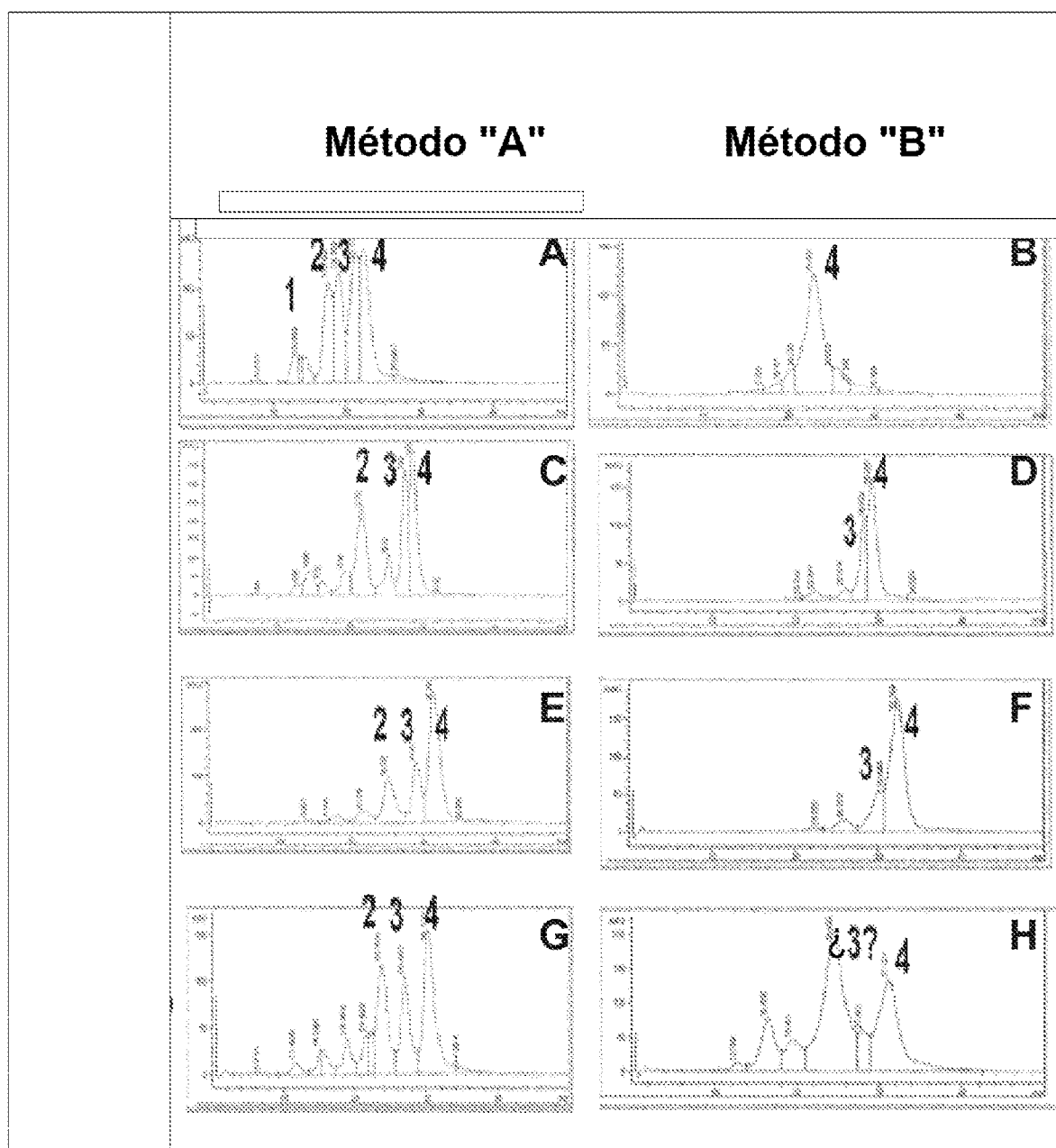


Figura 10

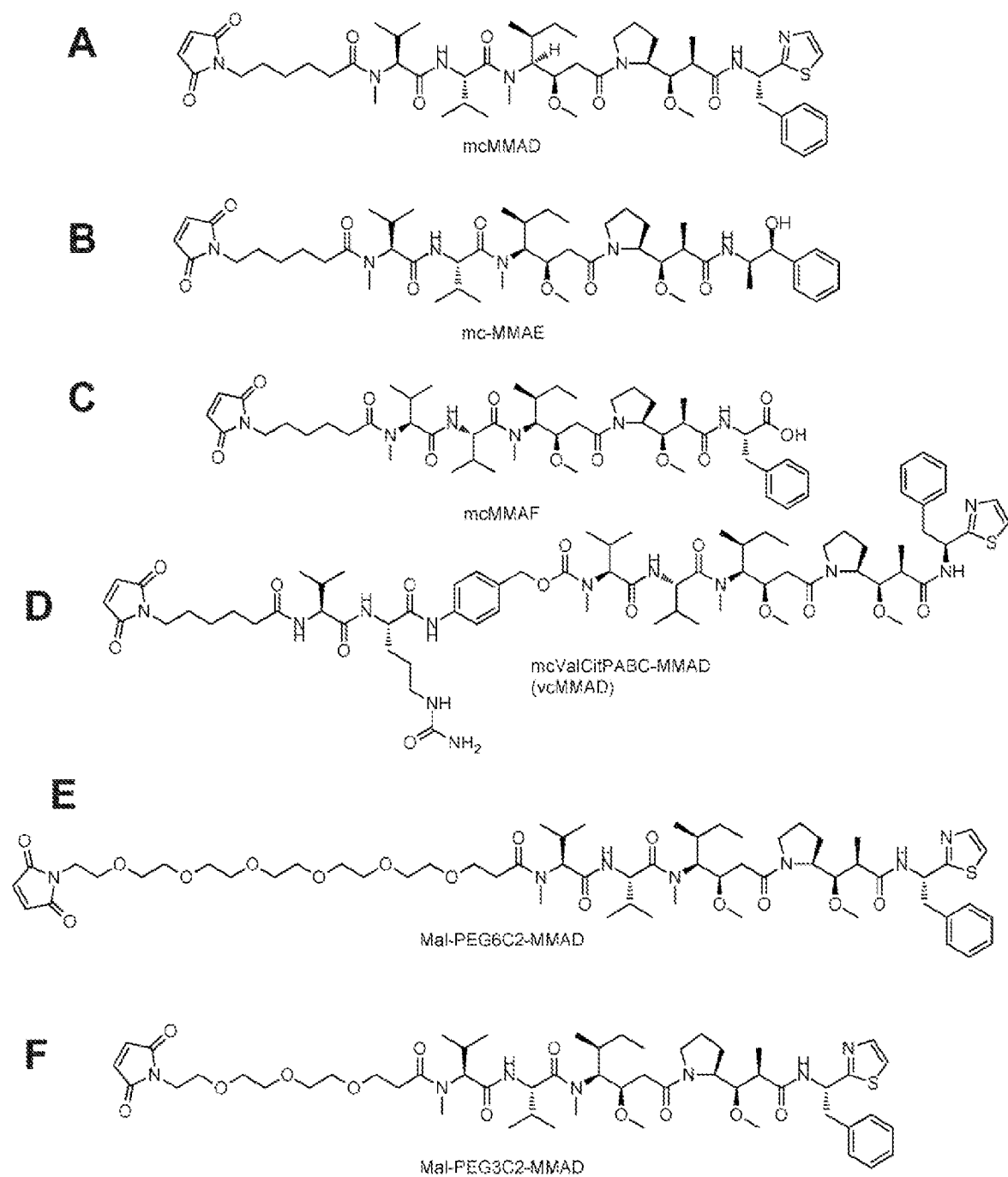


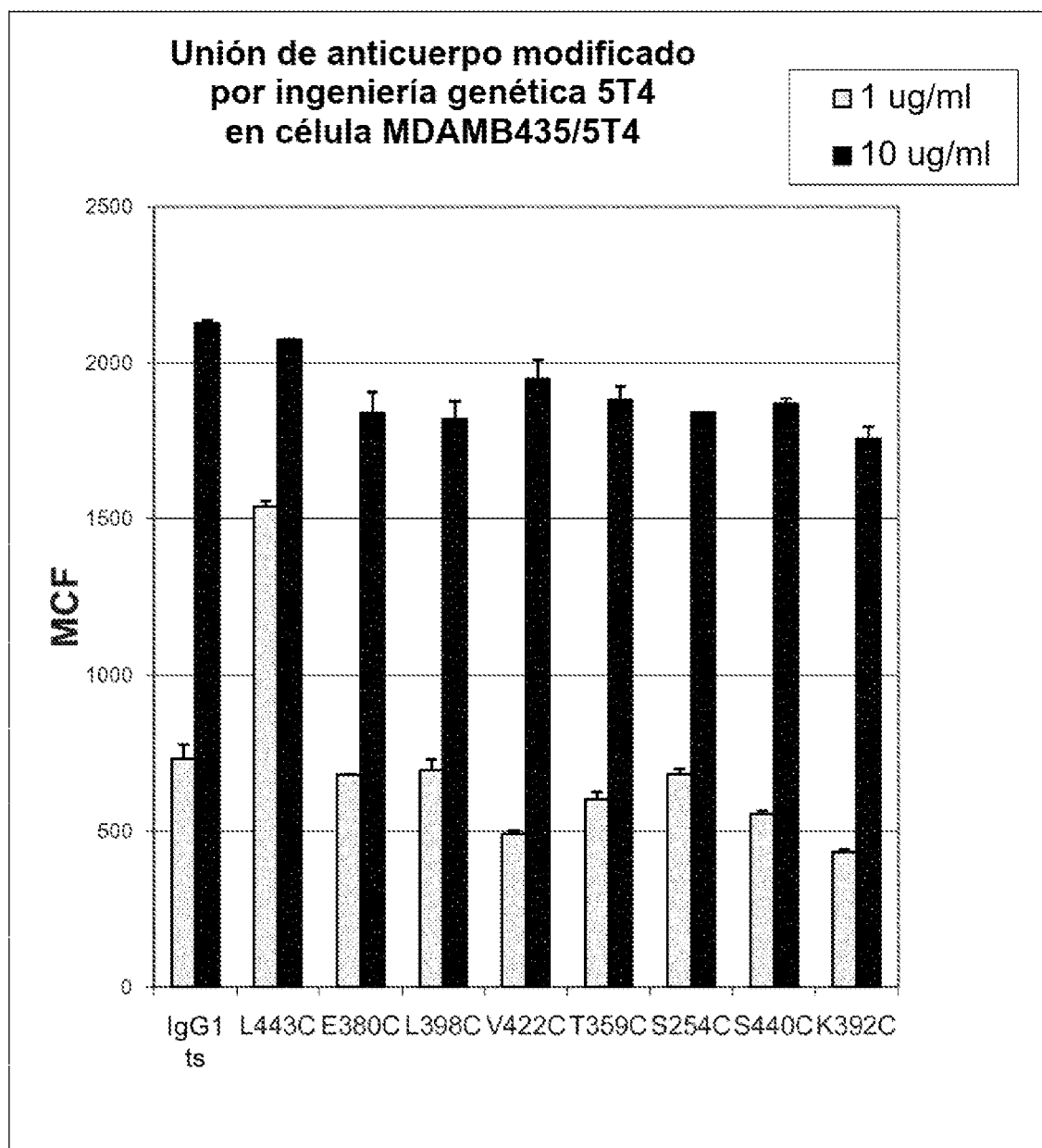
Figura 11

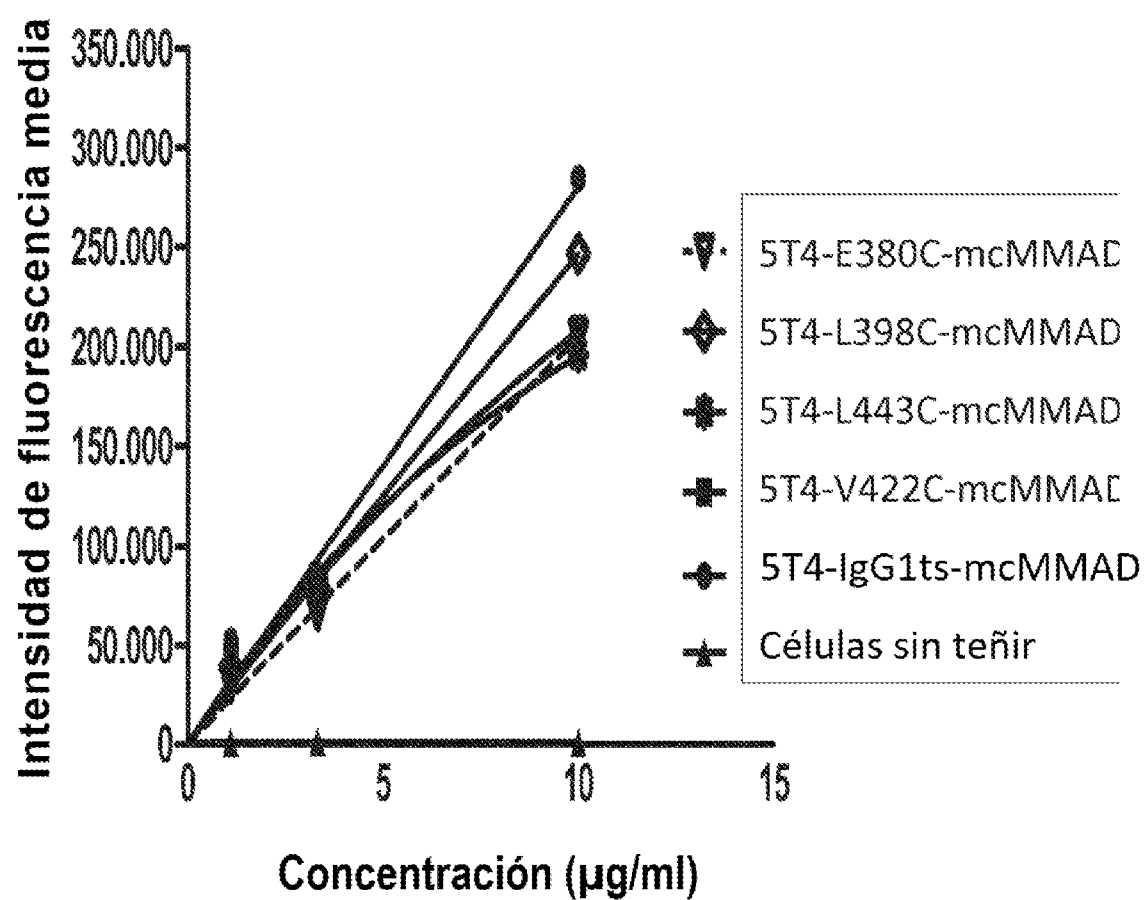
Figura 12A**Unión a células
MDAMB435/5T4**

Figura 12B

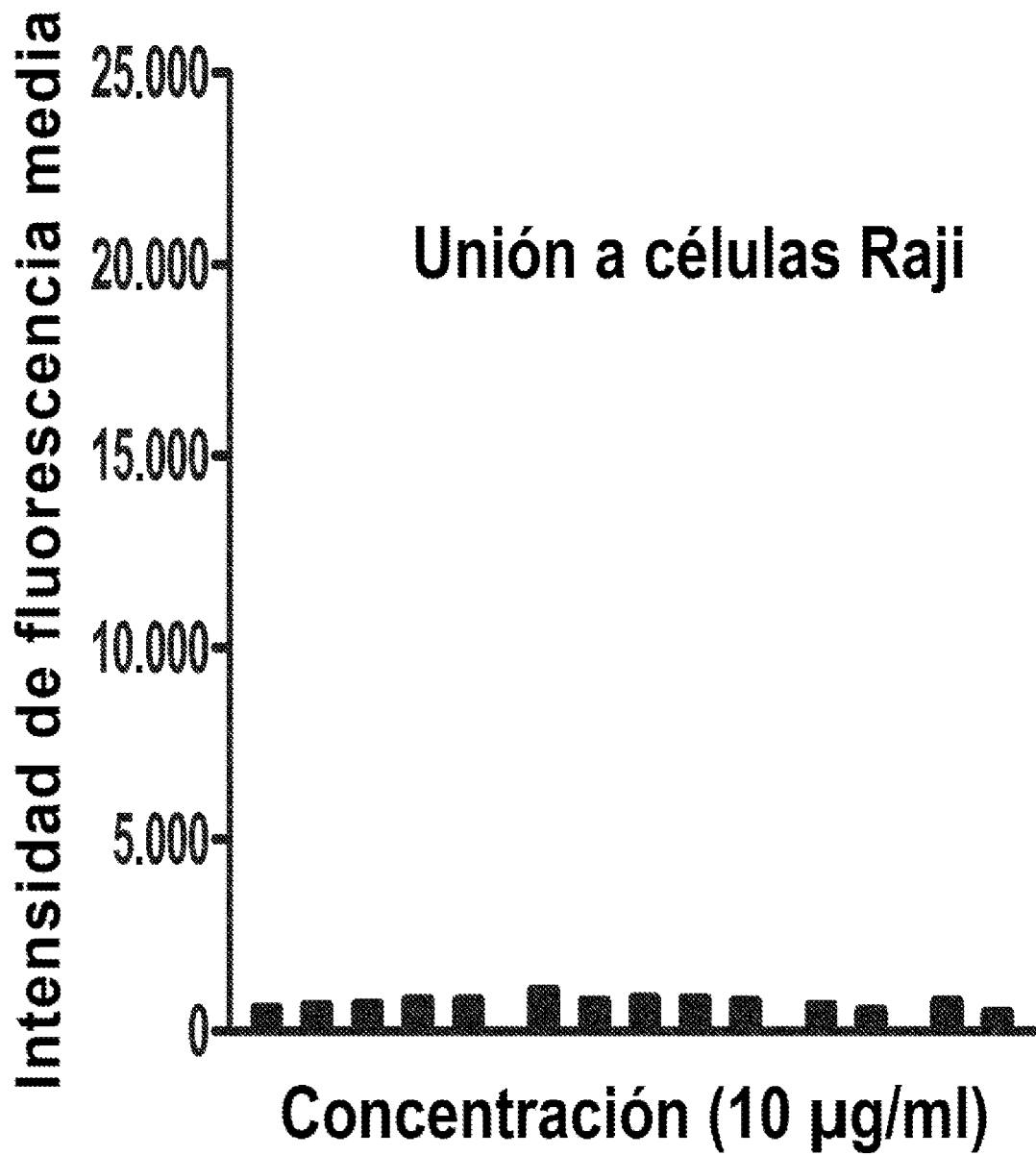


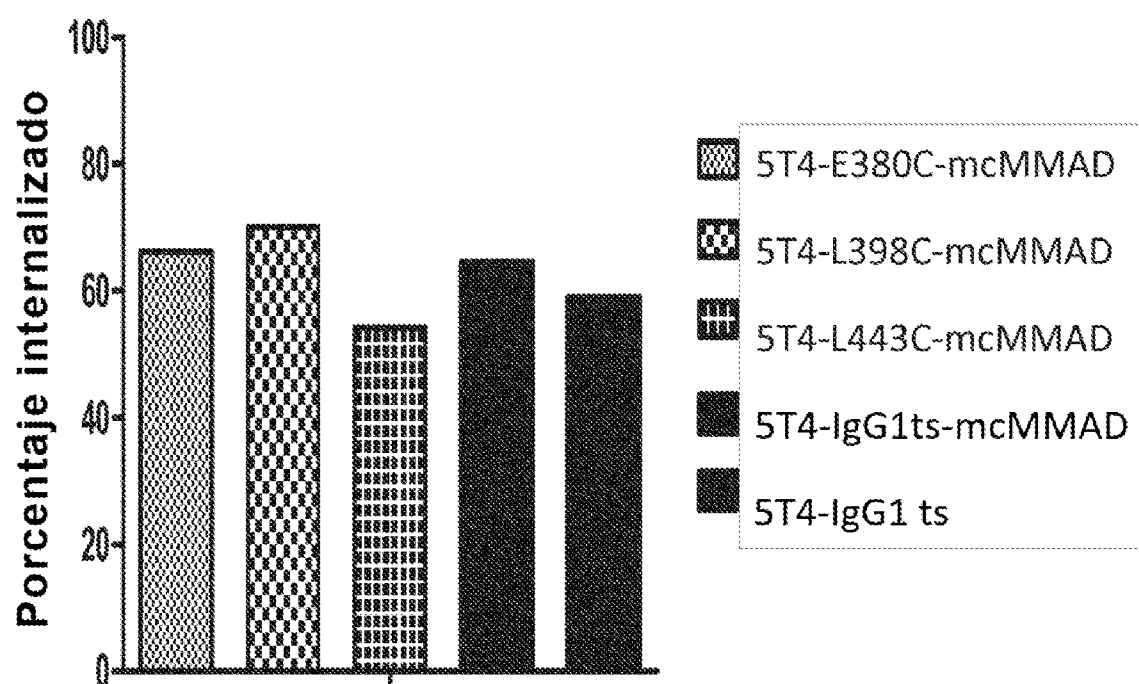
Figura 13**Internalización de compuestos a 4 h
en células MDAMB435/5T4**

Figura 14A

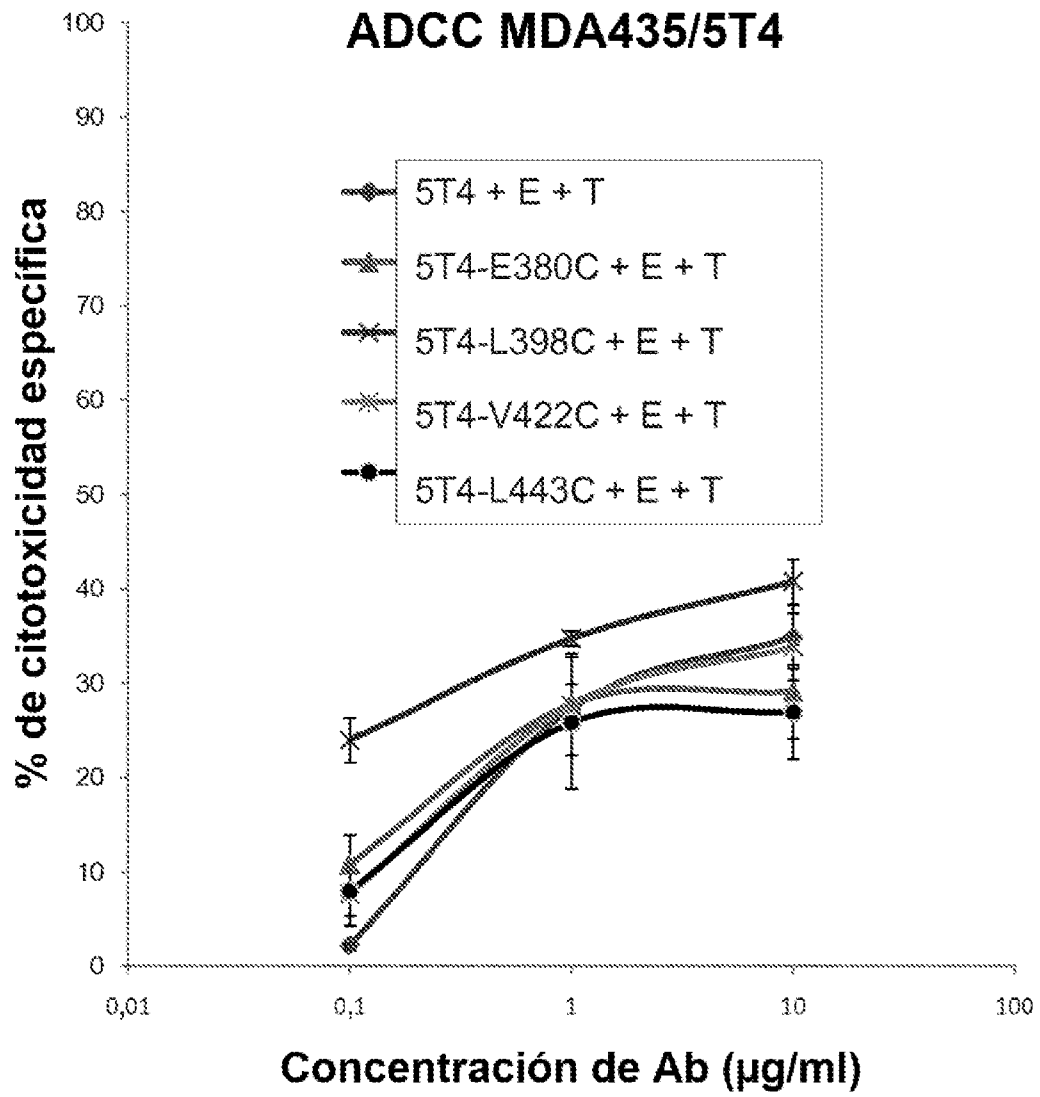


Figura 14B

ADCC MDA /Neo

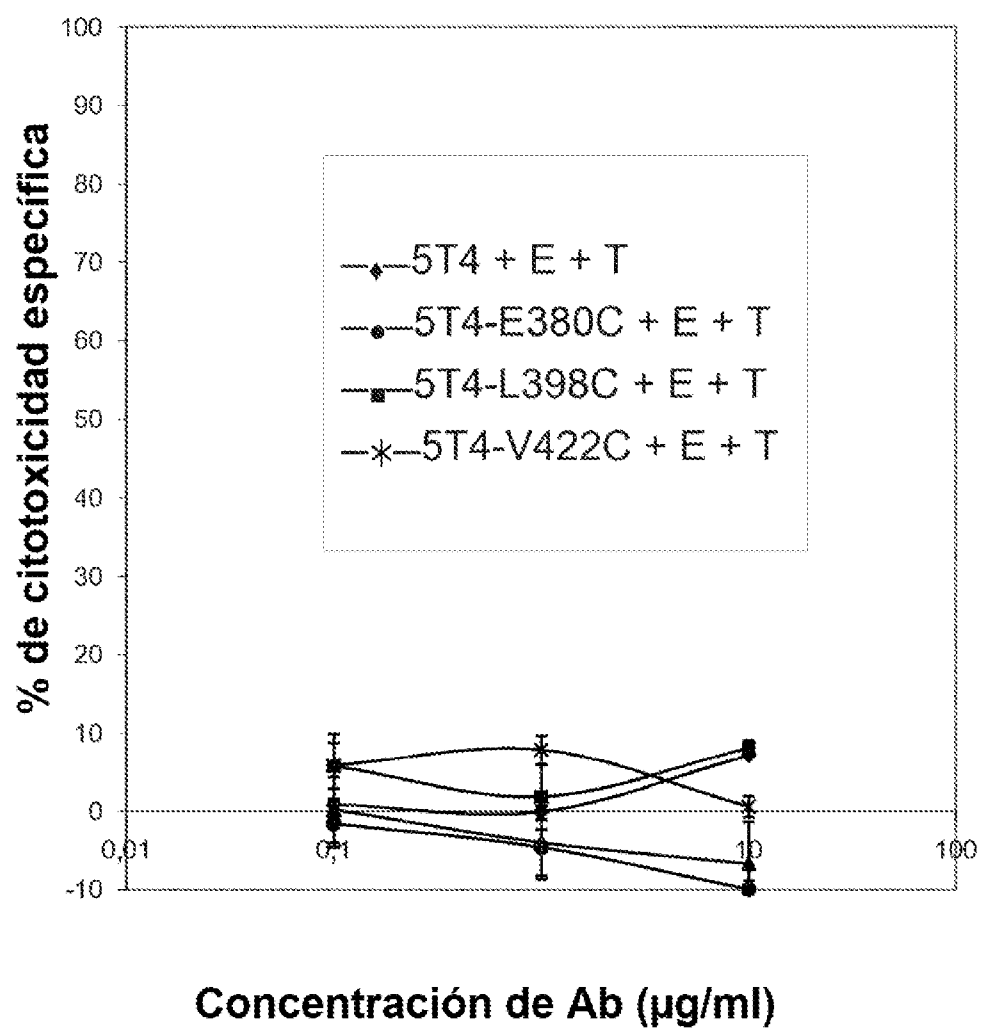


FIGURA 15A

FIG. 15A. Secuencia de aminoácidos del dominio constante de la cadena pesada de IgG1 de tipo silvestre humana que comprende la región Fc (SEQ ID NO:1)

```

ASTKGPSVFPP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV 50
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTRVDDKKEP 100
KSCDKHTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS 150
HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKFREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK 200
EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC 250
LVEGFPYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSGGSFFLY SKLTVDKSRW 300
QQGNVFSCSV MREALHNHYT QKSLSLSPGK 330

```

FIG. 15B. Secuencia de ácido nucleico que codifica la región constante de IgG1 de tipo silvestre humana (SEQ ID NO:2)

```

gggtcgacca agggcccacg ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg
ggcacagcgg ccttgggctg cctgggtcaag gactacttcc cogaacoggt gaagggtgctg
tggaaactcag gggccctgac cagcggcggtg cacaccttcc oggctgtcct acagtctcca
ggactctact cctcagcag cgtgggtgacc gtgcccctcca gcagcttggg cccccagacc
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc
aaatcttggtg acaaaaactca cacatgcccc ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga
ccgtcagttct tctcttcccc cccaaaacccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct
gaggtcacat ggttggtggt ggacgtgagc caggaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg
taogtggacg ggttggtggt gcataatgac aagacaaaagc cgggggagga gcagtacaac
agcacgtacc gttgtggtcag cgtcctcacc gtctcgcacc aggaactggct gaatggcaag
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aacctctctc
aaagccaaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacaccc tggcccccac ccgggaggag
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc
gcogtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gctcccggtg
ctggactccg acggctcctt ctctctctat agcaagctca ccgtggacaa ggcaggtgg
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg
cagaagagcc tctccctgtc cccgggtaaa 990

```

FIGURA 15B**FIG. 15C. Secuencia de aminoácidos de la región constante de IgG2 de tipo silvestre humana (SEQ ID NO:3)**

```

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS 60
GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDRTVER KCCVECPCPC APPVAGPSVF
120
LEFPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDF EVQFNWYVDG VEVHNAKTKF PEEQFNSTFR
180
VVSVLTIVVHQ DWLNGKEYKC KVSNEGLPAP IEKTISKTEG QPREPQVYTL PPSREEMTKN
240
QVSLTCLVKG FYPDISVEW ESNGQPENNY KTPPMLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
300
VPSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK 326

```

FIG. 15D. Secuencia de aminoácidos de la región constante de IgG3 de tipo silvestre humana (SEQ ID NO:4)

```

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS 60
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YTCNVNHPKS NTKVDKVEL KTFPLGDTTHT CPRCPPEKSC
120
DTFPPCPCPC EPKSCDTPPP CPRCPPEKSC DTPPPCPCPC APELLGGRSV FLFPKPKDT
180
LMISRTPEVT CVVDVSHED PEVQFKWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTF RVSVLTIVLH
240
QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK
300
GFYPSDIAVE WESSGQPENN YNTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NIFSCSVMHE
360
ALHNRTQKS LSLSPGK 377

```

FIG. 15E. Secuencia de aminoácidos de la región constante de IgG4 de tipo silvestre humana (SEQ ID NO:5)

```

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS 60
GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPSCP APEFLGGPSV
120
FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVDVVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY
180
RVSVLTIVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK
240
NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSD DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG
300
NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK 327

```

FIGURA 15C**FIG. 15F. IgG1-K246C (SEQ ID NO 6)**

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPFCCPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15G. IgG1-D249C (SEQ ID NO:7)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPFCPKCTLTMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15H. IgG1-S254C humana (SEQ ID NO:8)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPFCPKDTLMICRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15I. IgG1-D265C (SEQ ID NO:9)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPFCPKDTLMISRTPEVTCVVVCVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15J. . IgG1-S267C (SEQ ID NO:10)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPFCPKDTLMISRTPEVTCVVVDVCHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIGURA 15D**FIG. 15K IgG1-D270C (SEQ ID NO:11)**

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15L. IgG1-N276C (SEQ ID NO:12)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15M IgG1-Y278C (SEQ ID NO:13)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15N IgG1-E283C (SEQ ID NO:14)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15O IgG1-V284C (SEQ ID NO:15)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIGURA 15E**FIG. 15P. IgG1-A287C (SEQ ID NO:16)**

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNCKTTPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15Q IgG1-R292C (SEQ ID NO:17)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTTPCEEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15R IgG1-E293C (SEQ ID NO:18)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTTPCEEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15S IgG1-E294C (SEQ ID NO:19)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTTPCEEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15T. IgG1-Y300C (SEQ ID NO:20)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTTPREEQYNSTCKRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIGURA 15F

FIG. 15U IgG1-V302C (SEQ ID NO:21)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVTVFPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYPCV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15V IgG1-V303C (SEQ ID NO:22)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVTVFPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVC
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15W IgG1-L314C (SEQ ID NO:23)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVTVFPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15X IgG1-N315C (SEQ ID NO:24)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVTVFPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15Y IgG1-E318C (SEQ ID NO:25)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVTVFPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIGURA 15G

FIG. 15Z IgG1-K320C (SEQ ID NO:26)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTQSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTQVLHQLDNLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15AA IgG1-A327C (SEQ ID NO:27)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTQSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTQVLHQLDNLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15BB IgG1-I332C (SEQ ID NO:28)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTQSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTQVLHQLDNLNGKEYCKVSNKALPAPICKETISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15CC IgG1-E333C (SEQ ID NO:29)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTQSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTQVLHQLDNLNGKEYCKVSNKALPAPICKETISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15DD IgG1-K334C (SEQ ID NO:30)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTQSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTQVLHQLDNLNGKEYCKVSNKALPAPICKETISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIGURA 15H

FIG. 15EE IgG1-I336C (SEQ ID NO:31)

ASTKGPSVFELAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTIWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTIVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTCSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15FF IgG1-E345C (SEQ ID NO:32)

ASTKGPSVFELAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTIWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTIVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRECPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15GG IgG1-Q347C (SEQ ID NO:33)

ASTKGPSVFELAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTIWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTIVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPCVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15HH IgG1-S354C (SEQ ID NO:34)

ASTKGPSVFELAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTIWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTIVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSL
TCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15II IgG1-R355C (SEQ ID NO:35)

ASTKGPSVFELAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTIWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTIVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSCREEMTKNQVSL
TCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIGURA 15I**FIG. 15JJ IgG1-M358C (SEQ ID NO:36)**

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPEPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREECTKNQVSL
 TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
 MEEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15KK IgG1-T359C (SEQ ID NO:37)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPEPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMCKNQVSL
 TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
 MEEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15LL IgG1-K360C (SEQ ID NO:38)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPEPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTCNQVSL
 TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
 MEEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15MM IgG1-N361C (SEQ ID NO:39)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPEPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTCQVSL
 TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
 MEEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15NN IgG1-Q362C (SEQ ID NO:40)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPEPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTCQVSL
 TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
 MEEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIGURA 15J**FIG. 15OO. IgG1-K370C (SEQ ID NO:41)**

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVTVFPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGCFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15PP. IgG1-Y373C (SEQ ID NO:42)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVTVFPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGCFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15QQ. IgG1-D376C (SEQ ID NO:43)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVTVFPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGCFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15RR. IgG1-A378C (SEQ ID NO:44)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVTVFPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGCFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15SS. IgG1-E380C (SEQ ID NO:45)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVTVFPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGCFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIGURA 15K**FIG. 15TT. IgG1-E382C (SEQ ID NO:46)**

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTIVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGFYPSPDIAVEWCSNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15UU. IgG1-S383C (SEQ ID NO:47)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTIVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGFYPSPDIAVEWECNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15VV. IgG1-N384C (SEQ ID NO:48)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTIVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15 WW. IgG1-Q386C (SEQ ID NO:49)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTIVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGFYPSPDIAVEWESNGCQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15XX. IgG1-E388C (SEQ ID NO:50)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTIVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGFYPSPDIAVEWESNGQPCNNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIGURA 15L**FIG. 15YY IgG1-N390C (SEQ ID NO:51)**

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENCYKTTFPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15ZZ IgG1-K392C (SEQ ID NO:52)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYCTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15AAA. IgG1-T393C (SEQ ID NO:53)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKCTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15BBB IgG1-L398C (SEQ ID NO:54)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPVCDSOGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15CCC. IgG1-D401C (SEQ ID NO:55)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPVLDSCGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIGURA 15M

FIG. 15DDD IgG1-F404C (SEQ ID NO:56)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSCLFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15EEE IgG1-T411C (SEQ ID NO:57)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLCVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15FFF. IgG1-D413C (SEQ ID NO:58)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVCKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15GGG IgG1-K414C (SEQ ID NO:59)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDCSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIGURA 15N**FIG 15HHH IgG1-R416C (SEQ ID NO:60)**

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSCWQQGNVFSCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15III. IgG1-Q418C (SEQ ID NO:61)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWCQGNVFSCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15JJJ IgG1-Q419 (SEQ ID NO:62)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWCQGNVFSCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15KKK. IgG1-N421C (SEQ ID NO:63)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15LLL IgG1-V422C (SEQ ID NO:64)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNCVFSCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIGURA 150

FIG. 15MMM. IgG1-M428C (SEQ ID NO:65)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTFLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
CHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15NNN. IgG1-A431C (SEQ ID NO:66)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTFLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
MHECLHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15OOO. IgG1-L432C (SEQ ID NO:67)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTFLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
MHEACHNNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15PPP. IgG1-T437C (SEQ ID NO:68)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTFLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
MHEALHNHYCQKSLSLSPGK

FIG. 15QQQ. IgG1-Q438C (SEQ ID NO:69)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTFLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
MHEALHNHYTCKSLSLSPGK

FIGURA 15P

FIG. 15RRR. IgG1-K439C (SEQ ID NO:70)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPFVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQCSLSLSPGK

FIG. 15SSS. IgG1-S440C (SEQ ID NO:71)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPFVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKCLSLSPGK

FIG. 15TTT. IgG1-L443C (SEQ ID NO:72)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPFVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 15UUU. IgG1-S444C (SEQ ID NO:73)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPFVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLCPGK

FIGURA 16A

Secuencias de mutación de cisteína doble modificadas por ingeniería genética en la región constante de IgG1 humana

FIG. 16A. IgG1-E380C+L443C (SEQ ID NO:74)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDAKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVCWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSCSPGK

FIG. 16B. IgG1-L398C+L443C (SEQ ID NO:75)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDAKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVCSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSCSPGK

FIG. 16C. IgG1- V422C+L443C (SEQ ID NO:76)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDAKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNCFSCEVMHEALHNHYTQKSLSCSPGK

FIG. 16D. IgG1- E380C+L398C (SEQ ID NO:77)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDAKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVCWESNGQPENNYKTTTPVCSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIGURA 16B**FIG. 16E. IgG1- L398C+V422C (SEQ ID NO:78)**

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
 LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
 PREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVCDSDGSEFFLYSKLTVDKSR
 WQQGNCFSCSVMHREALHNYTQKSLSLSPGK

FIG. 16F. IgG1-E380C+V422C (SEQ ID NO:79)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
 LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
 PREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVCEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSR
 WQQGNCFSCSVMHREALHNYTQKSLSLSPGK

FIG. 16G. IgG1-K392C+L443C (SEQ ID NO:80)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
 LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
 PREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYCTTPPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSR
 WQQGNVFSCSVMHREALHNYTQKSLSCSPGK

FIG. 16H. IgG1-F404C+L443C (SEQ ID NO:81)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
 LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
 PREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSCFLYSLTVDKSR
 WQQGNVFSCSVMHREALHNYTQKSLSCSPGK

FIG. 16I. IgG1-K392C+F404C (SEQ ID NO:82)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
 LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
 PREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYCTTPPVLDSDGSCFLYSLTVDKSR
 WQQGNVFSCSVMHREALHNYTQKSLSLSPGK

FIGURA 17A

FIG. 17A. Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo anti-5T4 que comprende el dominio constante de IgG1 humana de tipo silvestre. (SEQ ID NO:83).

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNFGMNWVRQAPGKGLEWVAWINTNTGEPRYAE
EFKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAPDWDGAYFFDYWGQGTLVTVSSSastkg
 psvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlgqsglyslss
 vvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtoppcpapellggpsvflfppk
 pkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreegynstyrvsvltv
 lhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakggpprepqvytlppsreemtknqvsitclvk
 gfyfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmheal
 hnhytqkslsislspgk

FIG. 17B. Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de anti-5T4 que comprende la cadena ligera Kappa de tipo silvestre humana de tipo silvestre (SEQ ID NO:84).

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVSNDAVWYQQKPKAPKLLIYFATNRYTGVPSRF
SGSGYGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQDYSSFWTIFGQGTKVEIKRtvaapsvflfppsdeq
 lksgtasvvcilnnfyppreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslsstltlskady
 ekhkvyacevthqglsspvtksfurgeo

FIG. 17C. Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo anti-Her2 que comprende el dominio constante de IgG1 humana de tipo silvestre (SEQ ID NO:85).

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYAD
SVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGEYAMDYWGQGTLVTVSSSastk
 gpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlgqsglysls
 svvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtoppcpapellggpsvflfpp
 kpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreegynstyrvsvlt
 vlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakggpprepqvytlppsreemtknqvsitclv
 kgfyfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhea
 lnhytqkslsislspgk

FIGURA 17B

FIG. 17D. Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de anti-Her2 que comprende el dominio constante de la cadena ligera Kappa de tipo silvestre humana de tipo silvestre (SEQ ID NO:86).

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF
SGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKrtvaapsvfi fppsdeq
lksqtasvvcollnnfympreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslsstltlskady
ekhkvyacevthqglsspvtksfnrgec

FIG. 17E. Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo anti-VEGFR2 que comprende el dominio constante de IgG1 humana de tipo silvestre (SEQ ID NO:87).

EVQLVQSGGGLVVKPGGSLRLSCAASGFTTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYAD
SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVTDADFDIWGQGTMTVTVSSastkqpsv
fplapsskstsggtaalgcldvdyfpepvtvswnsqaltsgvhtfpav.lqssg.lyslssvt.
vpssslgtqtiyicrvnhkpsntkvdkkvepkscdktht.cppcpapellgqpsvflfppkpkd
tlmisrtpevtcvvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlihq
dwlngkeykokvsnkalpapiektiskakgqprepcvytlppsreemtkngvsltolvkgy
psdiavewasngqpennykttppvl dsdgsfflyskltvdksrwgggnvfscsvmhealnh
ytqklsislspgk

FIG. 17F. Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de anti-VEGFR2 que comprende el dominio constante de la cadena ligera Kappa de tipo silvestre humana de tipo silvestre (SEQ ID NO:88).

DIQMTQSPSSVSASIGDRVTITCRASQGI DNWLGWYQQKPGKAPKLLIYDASNLDTGVPSTRF
SGSGSGTYFTLTISSLQAEDFAVYFCQQAFAFPPTFGGGTKVDIKrtvaapsvfi fppsdeq
lksqtasvvcollnnfympreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslsstltlskady
ekhkvyacevthqglsspvtksfnrgec

FIGURA 18

FIG. 18A. Región constante Kappa humana de tipo silvestre (huKappa) (SEQ ID NO:89)

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIG. 18B. A111C-huKappa (SEQ ID NO:90)

TVCAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIG. 18C K183C-huKappa (SEQ ID NO:92)

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYSLSSSTLTLSCADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIG. 18D N210C-huKappa (SEQ ID NO:95)

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIGURA 19A

Alineación de secuencias del dominio Fc de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 humanas de tipo silvestre

| | |
|-------|---|
| | 238 |
| hIgG1 | QAPFVFLPTFEDPAIAPETETKVTYVQNHPEVETIAFYDQETTHDAE |
| hIgG2 | QAPFVFLPTFEDPAIAPETETKVTYVQNHPEVETIAFYDQETTHDAE |
| hIgG3 | QAPFVFLPTFEDPAIAPETETKVTYVQNHPEVETIAFYDQETTHDAE |
| hIgG4 | QAPFVFLPTFEDPAIAPETETKVTYVQNHPEVETIAFYDQETTHDAE |
| | 290 |
| hIgG1 | EPHEDQFMTFTPTTTLTLAGTFLHGEHNCYVHALLAFTETTTGALDQD |
| hIgG2 | KPEHEDQFMTFTPTTTLTLAGTFLHGEHNCYVHALLAFTETTTGALDQD |
| hIgG3 | KPEHEDQFMTFTPTTTLTLAGTFLHGEHNCYVHALLAFTETTTGALDQD |
| hIgG4 | KPEHEDQFMTFTPTTTLTLAGTFLHGEHNCYVHALLAFTETTTGALDQD |
| | 344 |
| hIgG1 | RELQVTLPTFEDPAIAPETETKVTYVQNHPEVETIAFYDQETTHDAE |
| hIgG2 | RELQVTLPTFEDPAIAPETETKVTYVQNHPEVETIAFYDQETTHDAE |
| hIgG3 | RELQVTLPTFEDPAIAPETETKVTYVQNHPEVETIAFYDQETTHDAE |
| hIgG4 | RELQVTLPTFEDPAIAPETETKVTYVQNHPEVETIAFYDQETTHDAE |
| | 396 |
| hIgG1 | VTIDSGDFTLTFLPTFEDPAIAPETETKVTYVQNHPEVETIAFYDQETTHDAE |
| hIgG2 | VTIDSGDFTLTFLPTFEDPAIAPETETKVTYVQNHPEVETIAFYDQETTHDAE |
| hIgG3 | VTIDSGDFTLTFLPTFEDPAIAPETETKVTYVQNHPEVETIAFYDQETTHDAE |
| hIgG4 | VTIDSGDFTLTFLPTFEDPAIAPETETKVTYVQNHPEVETIAFYDQETTHDAE |

FIGURA 19B

Alineación de secuencias del dominio constante de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas de tipo silvestre

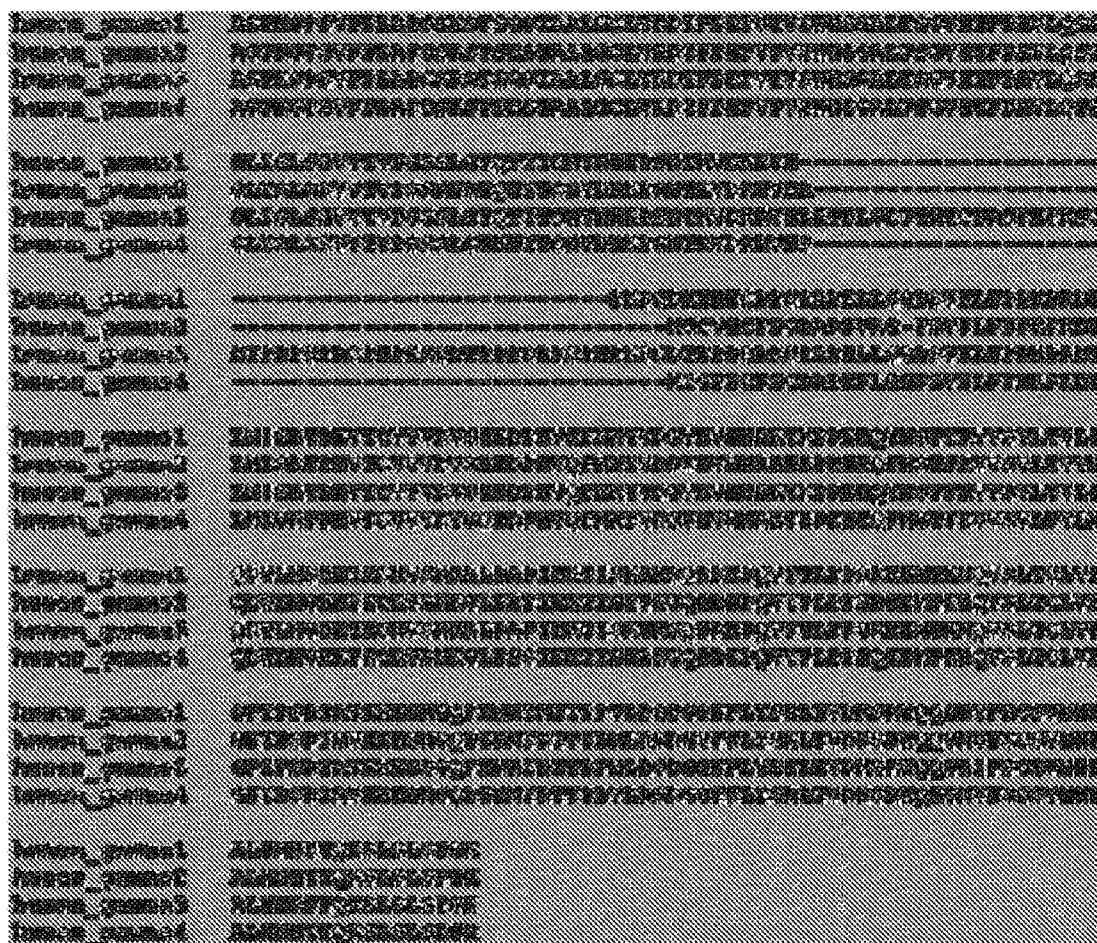


FIGURA 20A**FIG. 20A. Ácido nucleico de la región constante Lambda humana de tipo silvestre (huLambda) (SEQ ID NO:170)**

GGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCTCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGC
 CAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCGGGAGCCGTGACAGTGGCCT
 GGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGC
 AACACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGGAAGTCCCACAG
 AAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCTACAG
 AATGTTCA

FIG. 20B. Aminoácidos de la región constante Lambda humana de tipo silvestre (huLambda) (SEQ ID NO:171)

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQS
 NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

FIG. 20C. K110C-huLambda (SEQ ID NO: 172)

GQPKCAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQS
 NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

FIG. 20D. A111C-huLambda (SEQ ID NO: 173)

GQPKCAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQS
 NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

FIG. 20E. L125C-huLambda (SEQ ID NO: 174)

GQPKAAPSVTLFPPSSEELCQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQS
 NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

FIG. 20F. K149C-huLambda (SEQ ID NO: 175)

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWCADSSPVKAGVETTTPSKQS
 NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

FIG. 20G. V155C-huLambda (SEQ ID NO: 176)

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPCKAGVETTTPSKQS
 NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

FIG. 20H. G158C-huLambda (SEQ ID NO: 177)

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKACVETTTPSKQS
 NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

FIGURA 20B

FIG. 20I. T161C-huLambda (SEQ ID NO: 178)

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVECTTPSKQS
NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

FIG. 20J. Q185C-huLambda (SEQ ID NO: 179)

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQS
NNKYAASSYLSLTPECWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

FIG. 20K. S188C-huLambda (SEQ ID NO: 180)

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQS
NNKYAASSYLSLTPEQWKCHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

FIG. 20L. H189C-huLambda (SEQ ID NO: 181)

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQS
NNKYAASSYLSLTPEQWKSCHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

FIG. 20M. S191C-huLambda (SEQ ID NO: 182)

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQS
NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRCYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

FIG. 20N. T197C-huLambda (SEQ ID NO: 183)

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQS
NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVCHEGSTVEKTVAPTECS

FIG. 20O. V205C-huLambda (SEQ ID NO: 184)

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQS
NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTCEKTVAPTECS

FIG. 20P. E206C-huLambda (SEQ ID NO: 185)

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQS
NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVCKTVAPTECS

FIG. 20Q. K207C-huLambda (SEQ ID NO: 186)

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQS
NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVECTVAPTECS

FIG. 20R. T208C-huLambda (SEQ ID NO: 187)

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQS
NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVERCVAPTECS

FIG. 20S. A210C-huLambda (SEQ ID NO: 188)

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQS
NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVCPTECS

Figura 21A

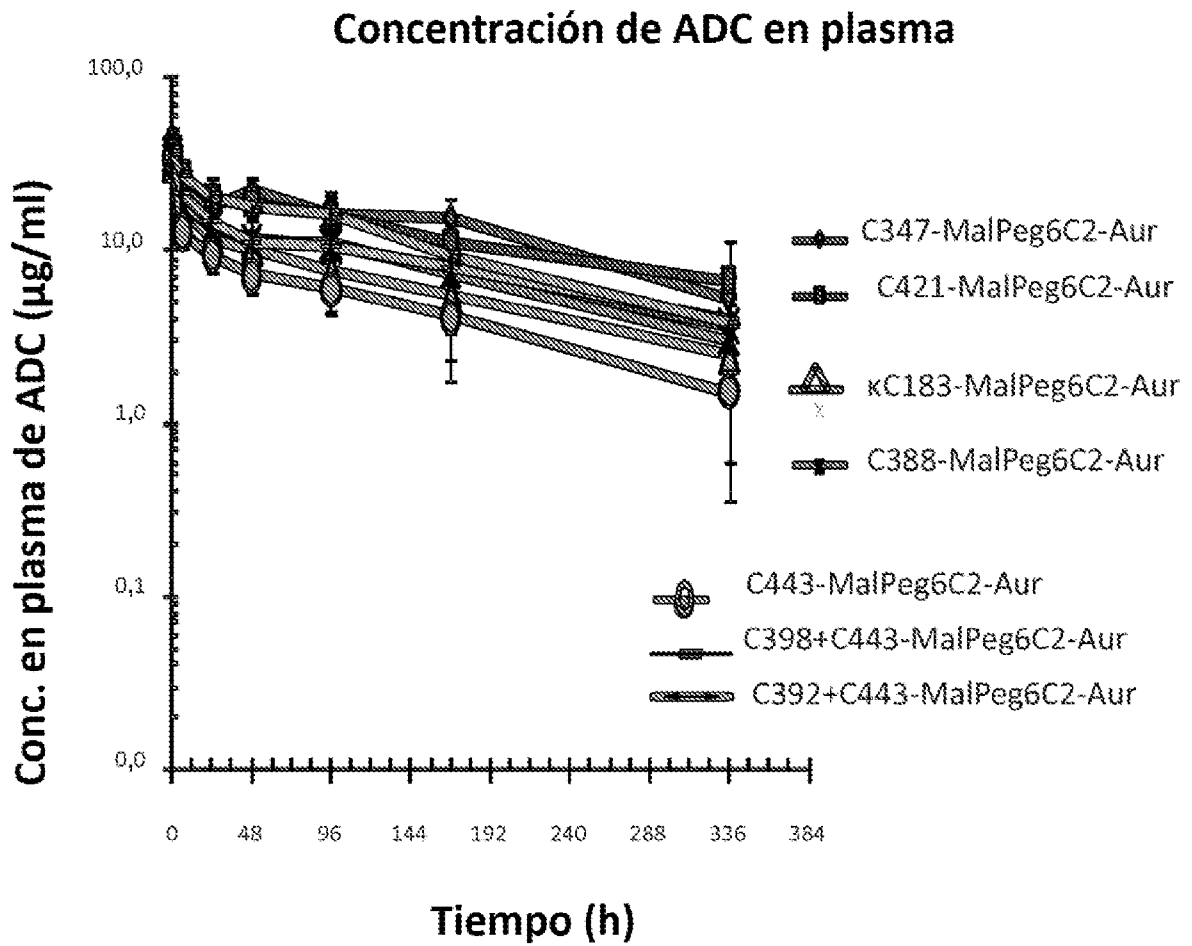


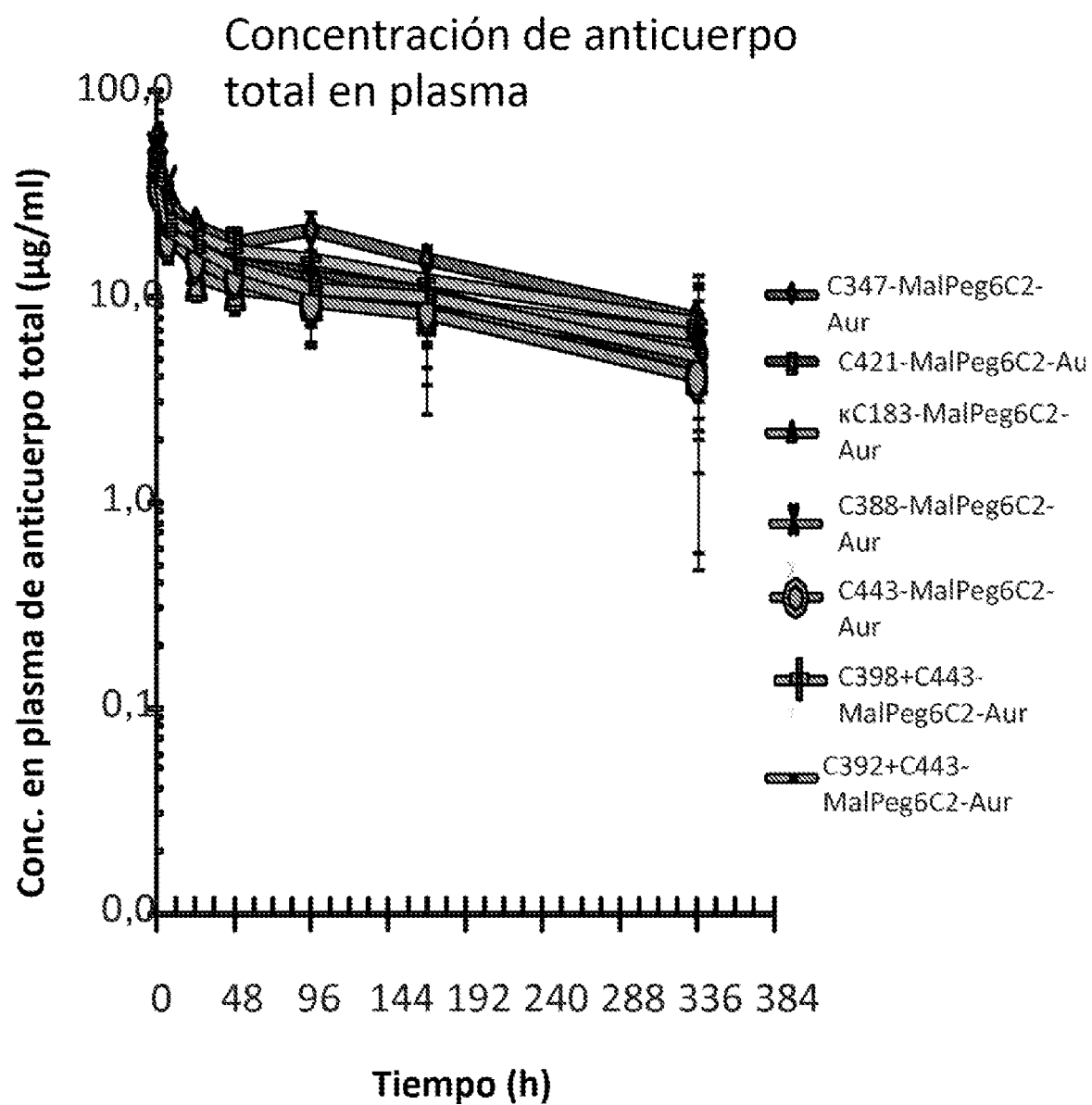
Figura 21B

Figura 22A

C443 MalPeg6C2-MMAD

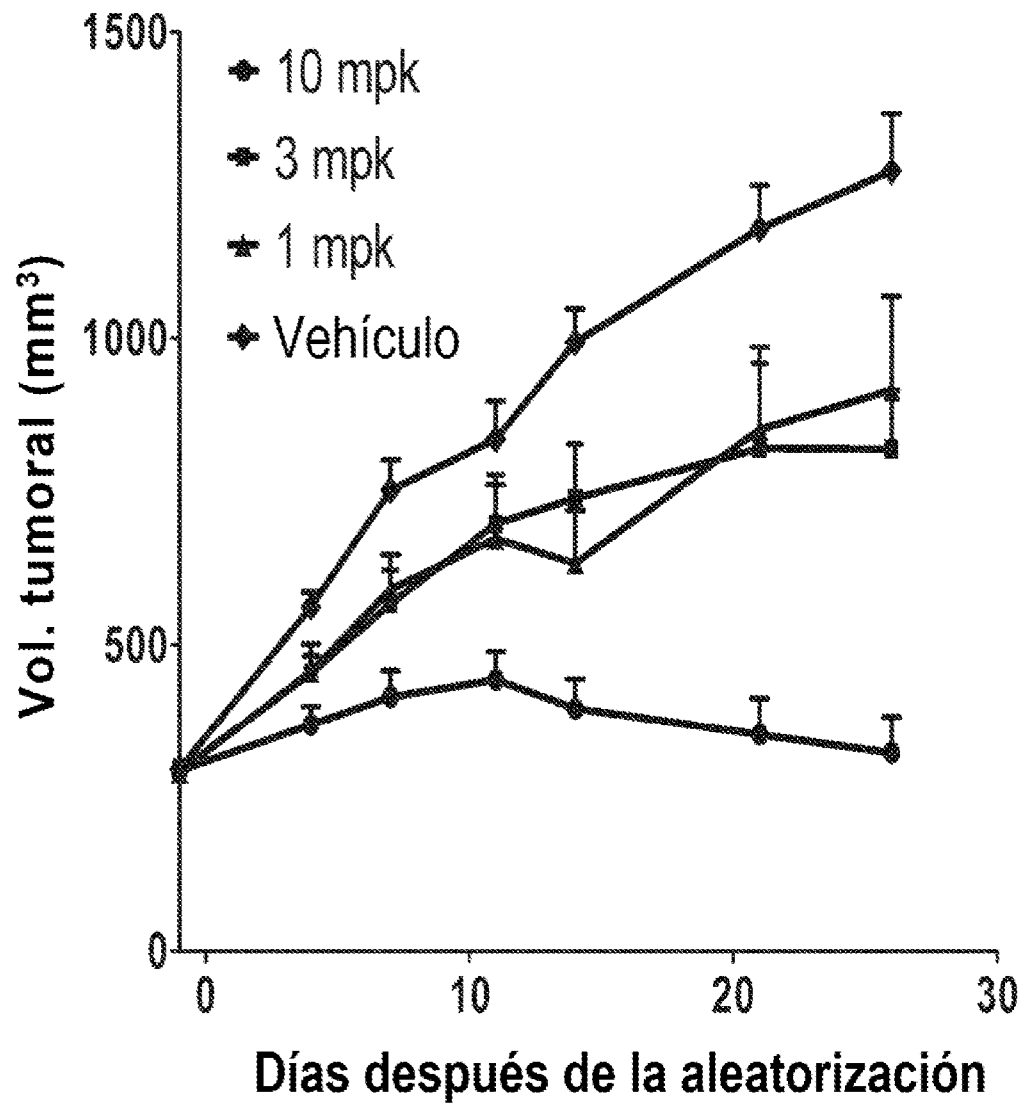


Figura 22B

C443 MalPeg6C2-8261

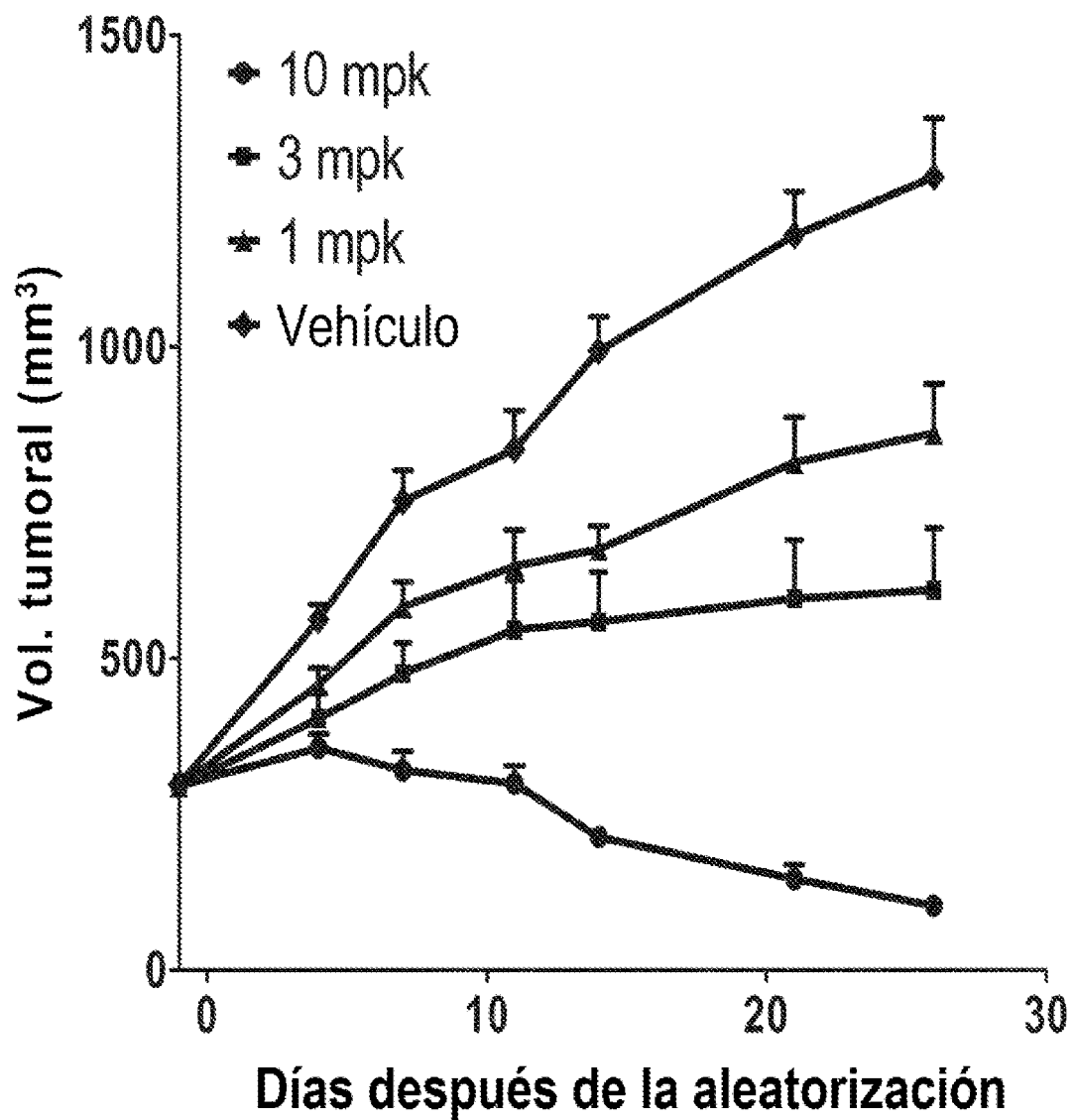


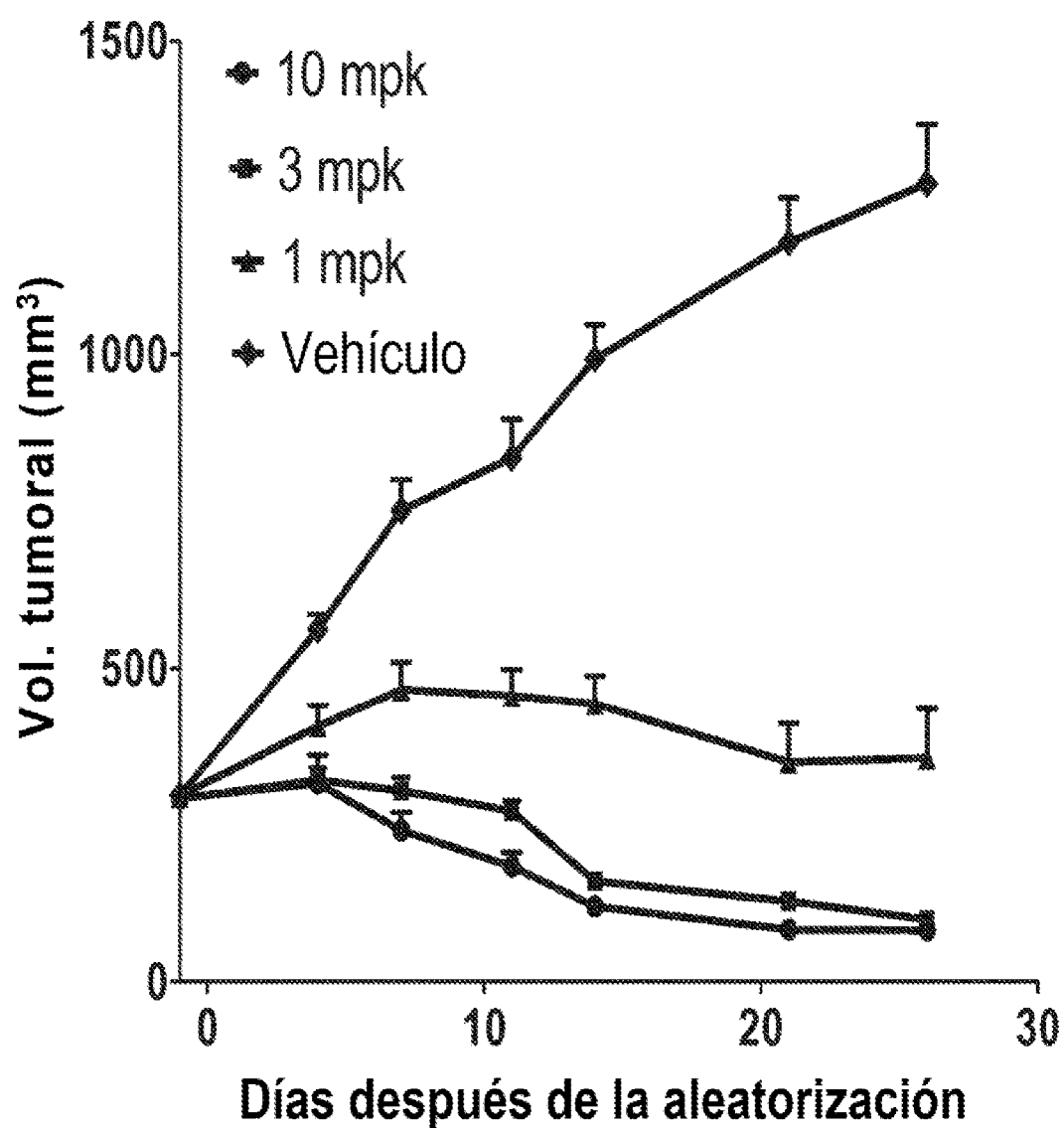
Figura 22C**C443 vc0101**

Figura 23

