

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 807**

51 Int. Cl.:
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07804411 .2**
96 Fecha de presentación: **28.09.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2074143**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.07.2009**

54 Título: **Anticuerpos alterados**

30 Prioridad:
29.09.2006 GB 0619291

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.07.2012

73 Titular/es:
UCB PHARMA S.A.
ALLÉE DE LA RECHERCHE 60
1070 BRUSSELS, BE

72 Inventor/es:
BAKER, Terry Seward;
HUMPHREYS, David Paul y
LAWSON, Alastair David Griffiths

74 Agente/Representante:
Linage González, Rafael

ES 2 384 807 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

Anticuerpos alterados

5 La presente invención se refiere a la modificación por ingeniería genética de anticuerpos y más específicamente proporciona anticuerpos alterados de la clase IgG a los que se unen una o más moléculas efectoras. Se proporcionan además métodos para su producción.

10 Los anticuerpos son generalmente moléculas con forma de Y que comprenden dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas. Enlaces disulfuro unen entre sí los pares de cadenas pesadas y ligeras, cuya parte N-terminal comprende los sitios de unión a antígeno. Enlaces disulfuro también unen entre sí las dos cadenas pesadas, cuya parte C-terminal (la parte Fc) carece de la capacidad de unirse a antígeno. Esta parte Fc está implicada en la mediación de actividades tales como fijación del complemento, paso transplacentario y unión a diversos tipos de células. Las funciones efectoras asociadas con la unión a Fc incluyen, por ejemplo, fagocitosis, 15 citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y endocitosis. Estas funciones pueden ser de importancia en la mediación del efecto terapéutico de un anticuerpo. Conjugados de anticuerpo-fármaco con el potencial para la función efectora son normalmente de la clase IgG1.

20 La alta especificidad y afinidad de los anticuerpos los hace agentes terapéuticos y de diagnóstico ideales, particularmente para modular las interacciones proteína:proteína. Se demuestra que tanto anticuerpos completos como fragmentos de anticuerpo modificados por ingeniería genética son agentes terapéuticos versátiles, tal como se observa por el reciente éxito de productos tales como ReoPro (fragmento Fab de anticuerpo quimérico), Rituxan (IgG1 quimérica), Remicade™ (IgG1 quimérica), Herceptin (IgG1 humanizada) y Humira (IgG1 humana). Específicamente de interés son anticuerpos humanizados y fragmentos de los mismos que tienen como objetivo 25 reducir o eliminar la inmunogenicidad inherente asociada con anticuerpos monoclonales no humanos.

De particular interés terapéutico son conjugados de anticuerpos en los que una molécula efectora tal como un fármaco, una toxina o un marcador se une al anticuerpo. Pueden unirse moléculas efectoras a fragmentos de anticuerpo mediante varios métodos diferentes, incluyendo a través de azúcares de aldehído o más comúnmente a 30 través de cualquier cadena lateral de aminoácido disponible o grupo funcional de aminoácido terminal ubicado en el fragmento de anticuerpo, por ejemplo cualquier grupo amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo libre. El sitio de unión de moléculas efectoras puede ser o bien aleatorio o bien específico de sitio. La unión aleatoria se logra a menudo a través de aminoácidos tales como lisina y esto da como resultado moléculas efectoras que se unen en varios sitios por todo el fragmento de anticuerpo dependiendo de la posición de las lisinas. Aunque esto ha sido satisfactorio en algunos casos el número y la ubicación exacta de las moléculas efectoras unidas no puede controlarse y esto puede 35 conducir a pérdida de actividad, por ejemplo si se unen demasiado pocas, o puede conducir a pérdida de afinidad, por ejemplo si la unión interfiere con el sitio de unión a antígeno (Chapman 2002 *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545). Como tal, el acoplamiento es aleatorio dando como resultado un producto de conjugado de anticuerpo definido por la enfermedad, no homogéneo.

40 En cambio, la unión específica de sitio controlada de moléculas efectoras, tal como la unión mediante residuos de cisteína existentes, ofrece considerables ventajas con respecto a la unión de sitio aleatorio. No obstante, la unión específica de sitio tiene resultados impredecibles porque puede haber pérdida de función efectora de Fc y/o pérdida de la capacidad de unión a antígeno a través de la alteración de la estructura terciaria. Anticuerpos con uno o más 45 residuos de cisteína introducidos por ingeniería genética padecen también estos últimos problemas; por ejemplo, el/los residuo(s) de cisteína introducido(s) por ingeniería genética pueden formar un enlace disulfuro con un tiol libre existente presente dentro del anticuerpo. La presente invención, sin embargo, proporciona anticuerpos con al menos un residuo mutado específico de sitio que permite la producción de un producto bien definido homogéneo que conserva la capacidad de unión a antígeno y, cuando el anticuerpo es un anticuerpo completo, un producto bien 50 definido homogéneo que también conserva la función efectora de la región Fc potencial.

El documento WO 2006034488 da a conocer varios anticuerpos en los que residuos de cadena pesada y ligera específicos se han mutado a un residuo de cisteína. Sin embargo, el documento WO 2006034488 no da a conocer 55 específicamente la mutación de los residuos de la cadena ligera kappa 171, 156, 202 o 203 de una IgG humana a un residuo de cisteína.

Por tanto, la presente invención proporciona la primera descripción de la mutagénesis de uno cualquiera o más de los residuos 171, 156, 202 y 203 (numerados según el sistema de numeración de Kabat expuesto en Kabat *et al.*, 1987, en *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Department of Health and Human Services, NIH, EE.UU.) de la cadena ligera kappa a un residuo de cisteína, que permite la unión específica de sitio de una molécula 60 efectora al residuo mutado. Además, la invención proporciona un anticuerpo alterado en la posición equivalente, numerada según el sistema de numeración de Kabat, en la cadena ligera lambda.

Renard *et al* (2004, *Biochemistry*, vol. 43, páginas 15453-153462) dan a conocer mejoras en la sensibilidad y el 65 intervalo dinámico de inmunosensores fluorescentes sin reactivos mediante diseño basado en el conocimiento.

Shopes *et al* (1993, Molecular Immunology, páginas 603-609) dan a conocer que una IgG humana modificada por ingeniería genética con flexibilidad limitada inicia la citólisis mediante el complemento.

5 Butlin *et al* (2006, Accounts of Chemical Research, vol. 39, páginas 780-787) dan a conocer anticuerpos con afinidad infinita: orígenes y aplicaciones.

Renard *et al* (2006, Journal of Molecular Biology, páginas 167-175, ISSN: 0022-2836) dan a conocer la derivación de restricciones topológicas a partir de datos funcionales para el diseño de inmunosensores fluorescentes sin reactivos.

10 Por consiguiente, se proporciona un anticuerpo alterado de la clase IgG que comprende al menos una cadena ligera kappa humana, que comprende dicha alteración, en el que la alteración comprende sustituir el residuo 171, numerado según el sistema de numeración de Kabat, de la al menos una cadena ligera kappa por un residuo de cisteína.

15 La clase IgG de un anticuerpo de la invención puede ser la subclase humana IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En particular, pueden usarse los isotipos IgG1 e IgG3 cuando la molécula de anticuerpo está destinada a usos terapéuticos y se desean las funciones efectoras del anticuerpo, por ejemplo, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Lo más preferiblemente, cuando el anticuerpo comprende una región Fc, el anticuerpo pertenece a la subclase IgG1. Alternativamente, pueden usarse
20 los isotipos IgG2 e IgG4 cuando la molécula de anticuerpo está destinada a fines terapéuticos en los que no se requieren las funciones efectoras del anticuerpo.

Por tanto, los anticuerpos de la presente invención incluyen anticuerpos que tienen función efectora y, por tanto, pueden mediar ADCC y/o CDC. Por consiguiente, en un aspecto, se proporcionan anticuerpos alterados de la
25 invención que efectúan ADCC y/o CDC. En otro aspecto, el anticuerpo tiene un efecto funcional, por ejemplo, el anticuerpo es un anticuerpo bloqueante, un anticuerpo neutralizante, un anticuerpo agonista o uno antagonista. Lo más preferiblemente, un anticuerpo que media ADCC o CDC tiene también un efecto funcional adicional, por ejemplo, el anticuerpo puede ser un anticuerpo bloqueante o neutralizante que impide o interfiere con la unión del antígeno, por ejemplo un ligando. Alternativamente, o adicionalmente, el anticuerpo puede inhibir o activar una ruta de señalización directa o indirectamente. En otro aspecto de la invención, puede usarse un anticuerpo para inhibir la
30 actividad de su antígeno relacionado. En un aspecto adicional, el anticuerpo es proapoptótico.

Pueden obtenerse anticuerpos generados contra un antígeno deseado administrando el antígeno a un sujeto, preferiblemente un animal no humano, usando protocolos de rutina y bien conocidos. Por tanto, pueden producirse anticuerpos para su uso en la invención mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Tales anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, completamente humanos, derivados por presentación en fago o anticuerpos quiméricos. También se incluyen anticuerpos en los que se han transferido una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de otra especie (anticuerpo con transferencia de sólo una CDR). Se apreciará que anticuerpos humanizados incluyen aquellos anticuerpos en los que se ha humanizado uno o más residuos dentro de una o más CDR. Estos anticuerpos pueden someterse entonces a alteración dentro de la cadena ligera kappa en el residuo 171. El término "anticuerpo" tal como se usa en el presente documento incluye anticuerpos intactos (completos) y fragmentos funcionalmente activos tales como fragmentos de unión a epítipo o derivados de los mismos y pueden ser, pero no se limitan a, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos, bi, tri o tetravalentes, Bis-scFv, scFv-Fc, minicuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, anticuerpos de dominio único, fragmentos Fab modificados, fragmentos Fab, fragmentos Fab' y F(ab')₂ y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores (véase, por ejemplo, Holliger y Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9):1126-1136; Wu y Senter, 2005, Nature Biotech. 23(9):1137-1145).
45

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales mediante cualquier método conocido en la técnica tal como la técnica de hibridoma (Kohler y Milstein, Nature, 1975, 256:495-497), la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de células B humanas (Kozbor *et al.*, Immunology Today, 1983, 4, 72) y la técnica de EBV-hibridoma (Cole *et al.*, "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", págs. 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985).
50

También pueden generarse anticuerpos para su uso en la invención usando métodos de anticuerpos de linfocitos individuales mediante la clonación y expresión de ADNc de regiones variables de inmunoglobulinas generados a partir de linfocitos individuales seleccionados para la producción de anticuerpos específicos mediante, por ejemplo, los métodos descritos por Babcook, J. *et al.*, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93(15), 7843-7848, documentos WO 92/02551, WO 2004/051268, WO 2004/106377, WO 2005/019824 y WO 2005/019823.
55

60 Anticuerpos quiméricos son aquellos anticuerpos codificados por genes de inmunoglobulinas que se han modificado por ingeniería genética de modo que los genes de cadenas pesadas y ligeras están compuestos por segmentos de genes de inmunoglobulinas que pertenecen a diferentes especies.

65 Anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo que tienen una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de una especie no humana y una región de entramado de una molécula de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, el documento US 5.585.089).

Los métodos para crear y fabricar anticuerpos recombinantes se conocen bien en la técnica (véanse por ejemplo, Boss *et al.*, documento US 4.816.397; Cabilly *et al.*, documento US 6.331.415; Simmons *et al.*, 2002, Journal of Immunological Methods, 263, 133-147; Shrader *et al.*, documento WO 92/02551; Orlandi *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 3833; Riechmann *et al.*, 1988, Nature, 322, 323; Queen *et al.*, documento US 5.585.089; Adair, documento WO 91/09967; Mountain y Adair, 1992, Biotechnol. Genet. Eng. Rev, 10, 1-142; Verma *et al.*, 1998, J. Immunol. Methods, 216:165-181; Holliger y Hudson, 2005, Nature Biotech. 23 (9):1126-1136).

Los anticuerpos para su uso en la presente invención también pueden generarse usando diversos métodos de presentación en fago conocidos en la técnica e incluyen los dados a conocer por Brinkman *et al.*, 1995, J. Immunol. Methods, 182:41-50; Ames *et al.*, 1995, J. Immunol. Methods, 184, 177-186; Kettleborough *et al.* 1994, Eur. J. Immunol., 24, 952-958; Persic *et al.*, 1997, Gene, 187, 9-18; y Burton *et al.*, 1994, Advances in Immunol., 57, 191-280; documentos WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; y WO 95/20401; y documentos US 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.

Además, pueden usarse ratones transgénicos, u otros organismos, incluyendo otros mamíferos, para producir anticuerpos (véase por ejemplo el documento US 6.300.129).

Los anticuerpos de la presente invención, en general, podrán unirse selectivamente a un antígeno. El antígeno puede ser cualquier antígeno asociado a células, por ejemplo un antígeno de superficie celular en células tales como células bacterianas, células de levadura, células T, células endoteliales o células tumorales, o puede ser un antígeno soluble. Los antígenos pueden ser también cualquier antígeno médicamente relevante tal como antígenos regulados por incremento durante una enfermedad o infección, por ejemplo receptores y/o sus correspondientes ligandos. Los ejemplos particulares de antígenos de superficie celular incluyen moléculas de adhesión, por ejemplo, integrinas tales como integrinas $\beta 1$ por ejemplo VLA-4, E-selectina, P-selectina o L-selectina, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11a, CD11b, CD18, CD19, CD20, CD23, CD25, CD33, CD38, CD40, CD45, CDW52, CD69, antígeno carcinoembrionario (CEA), globulina de grasa de leche humana (HMFG1 y 2), BCMP7, CD137, CD27L, CDGP1, DPCR1, dudulin2, FLJ20584, FLJ40787, HEK2, KIAA0634, KIAA0659, KIAA1246, KIAA1455, LTBP2, LTK, MAL2, MRP2, 2 de tipo nectina, NKCC1, PTK7, RAIG1, TCAM1, SC6, BCMP101, BCMP11, DTD, antígenos del CMH de clase I y CMH de clase II, y VEGF y, cuando sea apropiado, receptores de los mismos. Los antígenos solubles incluyen interleucinas tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-16 o IL-17, antígenos virales, por ejemplo, antígenos de virus sincitial respiratorio o citomegalovirus, inmunoglobulinas, tales como IgE, interferones tales como interferón α , interferón β o interferón γ , factor de necrosis tumoral- α , factor de necrosis tumoral- β , factores estimulantes de colonias tales como G-CSF o GM-CSF, y factores de crecimiento derivados de las plaquetas tales como PDGF- α y PDGF- β y cuando sea apropiado receptores de los mismos.

La secuencia de ácido nucleico de un anticuerpo puede modificarse por ingeniería genética mediante cualquier método conocido en la técnica para producir los anticuerpos con cadena kappa modificada por ingeniería genética con cisteína de la presente invención, es decir, S 171 C, S 156C, S202C y S203C. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis por superposición de extensión mediante PCR, mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de casete (véase, generalmente, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, 1989; Ausbel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing & Wiley-Interscience, NY, 1993). Están disponibles comercialmente kits de mutagénesis dirigida al sitio, por ejemplo el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange® (Stratagen, La Jolla, CA). La mutagénesis de casete puede realizarse basándose en Wells *et al.*, 1985, Gene, 34:315-323. Alternativamente, pueden prepararse versiones de tipo natural y mutantes de cadenas kappa humanas mediante síntesis génica total mediante apareamiento, ligamiento y amplificación por PCR y clonación de oligonucleótidos solapantes.

El ADN que codifica para el anticuerpo para la modificación por ingeniería genética puede obtenerse usando métodos bien conocidos, por ejemplo a partir de una célula de hibridoma u otra célula productora de anticuerpos.

La presente invención también proporciona un método para la preparación de un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína de la invención. Por consiguiente, se proporciona un método para la preparación de un anticuerpo alterado de la clase IgG que comprende al menos una cadena ligera kappa humana, o un fragmento de unión a epítipo de la misma que comprende dicha alteración, que comprende la mutación en el residuo 171, numerado según el sistema de numeración de Kabat, con un residuo de cisteína. Lo más preferiblemente, el método comprende la mutación de la serina 171 de al menos una cadena ligera kappa de un anticuerpo humano de la clase IgG.

En un aspecto particular, pueden conjugarse anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína de la presente invención con un agente terapéutico, tal como un agente citotóxico, un radionúclido o un resto farmacológico para modificar una respuesta biológica dada, por ejemplo para inhibir la proliferación celular, para tratar una enfermedad, o para inducir apoptosis. No debe interpretarse que el agente terapéutico se limita a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por tanto, un anticuerpo para su uso en la presente invención puede conjugarse con una o más moléculas efectoras. Se apreciará que la molécula efectora puede comprender una única molécula

- efectora o dos o más moléculas de este tipo unidas de modo que forman un único resto que puede unirse a los anticuerpos de la presente invención mediante la cisteína introducida por ingeniería genética en uno o más del residuo 171, numerado según el sistema de numeración de Kabat. Una ventaja adicional ofrecida por los anticuerpos conjugados de la presente invención es que las regiones que dan lugar a anti-idiotipo pueden enmascarse mediante la molécula efectora. En un aspecto preferido, la invención proporciona un anticuerpo alterado que comprende al menos una cadena ligera kappa humana, o un fragmento de unión a epítipo de la misma que comprende dicha alteración, en el que la alteración comprende la sustitución del residuo 171, numerado según el sistema de numeración de Kabat, de la al menos una cadena ligera kappa por un residuo de cisteína, y en el que dicho anticuerpo alterado está conjugado con una o más moléculas efectoras. En un aspecto preferido, un anticuerpo alterado de la invención comprende al menos una alteración de serina 171 a cisteína con una molécula efectora unida a dicho residuo de cisteína 171. Lo más preferiblemente, la invención comprende un anticuerpo que comprende dos cadenas ligeras kappa, cada una con la serina 171 mutada a un residuo de cisteína y en el que cada cisteína 171 tiene una molécula efectora unida. Por tanto, el anticuerpo alterado puede ser un anticuerpo completo, un fragmento Fab, Fab' o F(ab')₂, o un diFab o triFab alterado en el residuo 171 a un residuo de cisteína, y en el que una molécula efectora está conjugada mediante dicho residuo de cisteína (lo más preferiblemente mediante el residuo 171). En un ejemplo, el anticuerpo es un fragmento Fab' con una alteración S171C en el que una molécula efectora está conjugada directa o indirectamente con el residuo de cisteína y una molécula efectora adicional está conjugada con la región constante de cadena pesada C-terminal con respecto a la región de bisagra.
- El término "molécula efectora" tal como se usa en el presente documento incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas, proteínas biológicamente activas, por ejemplo enzimas, otro anticuerpo o fragmentos de anticuerpo, polímeros sintéticos o que se producen de manera natural, ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos, por ejemplo, ADN, ARN y fragmentos de los mismos, radionúclidos, particularmente radioyoduro, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos indicadores tales como compuestos fluorescentes o compuestos que pueden detectarse mediante espectroscopía de ESR o RMN.

Los ejemplos de moléculas efectoras pueden incluir citotoxinas o agentes citotóxicos incluyendo cualquier agente que sea perjudicial para las células (por ejemplo, las destruye). Los ejemplos incluyen auristatinas, combrestatinas, dolastatinas, epotilonas, estaurosporina, maitansinoides, espongistatinas, rizoxina, halicondrinas, roridinas, hemiasterlinas, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiانترacina, mitoxantrona, mitramicina, actinomomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos.

Las moléculas efectoras también incluyen, pero no se limitan a, anti-folatos (por ejemplo aminopterina y metotrexato), antimetabolitos (por ejemplo metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo, dacarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo mecloretamina, tioepa, cloralbucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas [por ejemplo daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina], antibióticos [por ejemplo dactinomicina (anteriormente actinomomicina), bleomicina, mitramicina, antramicina (AMC), caliqueamicinas o duocarmicinas, CC-1065, enediinos, neocarzinostatina], y agentes antimetabólicos (por ejemplo vincristina y vinblastina). Véase Garnett, 2001, *Advanced drug Delivery Reviews* 53:171-216 para detalles adicionales.

Otras moléculas efectoras pueden incluir radionúclidos quelados tales como ¹³¹I, ¹¹¹In y ⁹⁰Y, ⁸⁶Y, ¹⁷⁷Lu, ²¹³Bi, ⁶⁴Cu, ¹⁸F, ⁶⁸Ga, ¹²⁴I, ¹²⁴I, ^{99m}Tc, californio²⁵², iridio¹⁹² y tungsteno¹⁸⁸/renio¹⁸⁸, ²¹¹astatina; o fármacos tales como pero sin limitarse a, alquilfosfolinas, inhibidores de topoisomerasa I, taxoides y suramina. Las moléculas efectoras adicionales incluyen proteínas, péptidos y enzimas. Las enzimas de interés incluyen, pero no se limitan a, enzimas proteolíticas, hidrolasas, liasas, isomerasas, transferasas. Las proteínas, polipéptidos y péptidos de interés incluyen, pero no se limitan a, inmunoglobulinas, toxinas tales como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas*, o toxina diftérica, un maitansinoide (por ejemplo, pero sin limitarse a, DM1), una proteína tal como insulina, factor de necrosis tumoral, interferón α, interferón β, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de las plaquetas o activador de plasminógeno tisular, un agente trombótico o un agente anti-angiogénico, por ejemplo angiostatina o endostatina, angiogenina, gelonina, una dolostatina, agentes de unión al surco menor, mostaza de bis-yodofenol (por ejemplo ZD2767P), o un modificador de la respuesta biológica tal como una linfocina, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de las colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento nervioso (NGF) u otro factor de crecimiento. En una realización preferida, la molécula efectora es un agente de unión al surco menor.

Otras moléculas efectoras pueden incluir sustancias detectables útiles, por ejemplo, en diagnóstico. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, núclidos radiactivos, metales emisores de positrones (para su uso en tomografía por emisión de positrones) e iones de metales paramagnéticos no radiactivos. Véase, generalmente, el documento US 4.741.900 para iones de metales que pueden conjugarse con anticuerpos para su uso como productos de diagnóstico. Las enzimas adecuadas incluyen peroxidasa del rábano, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; los grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina, avidina y biotina; los

materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo y ficoeritrina; los materiales luminiscentes adecuados incluyen luminol; los materiales bioluminiscentes adecuados incluyen luciferasa, luciferina y ecurina; y los núclidos radiactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In y ^{99}Tc .

5 En un ejemplo adicional, la molécula efectora puede aumentar la semivida del anticuerpo *in vivo*, y/o reducir la inmunogenicidad del anticuerpo y/o potenciar el suministro de un anticuerpo a través de una barrera epitelial al sistema inmunitario. Los ejemplos de moléculas efectoras adecuadas de este tipo incluyen polímeros, dextrano, hidroxipropilmetacrilamida (HPMA), albúmina, péptidos o proteínas de unión a albúmina o compuestos de unión a
10 albúmina tales como los descritos en el documento WO 2005/11798 y en el documento WO 2006/034488.

15 Cuando la molécula efectora es un polímero puede ser, en general, un polímero sintético o uno que se produce de manera natural, por ejemplo un polímero de polialquileno, polialquilenilo o polioxialquileno de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido o un polisacárido ramificado o no ramificado, por ejemplo un homo o heteropolisacárido. Véase por ejemplo (Veronese y Pasut, 2005, Drug Discovery Today, 10(21):1451-1458; Pasut *et al.*, 2004, Expert Opinion in Therapeutic Patents, 14 (6):859-894).

20 Los sustituyentes opcionales particulares que pueden estar presentes en los polímeros sintéticos mencionados anteriormente incluyen uno o más grupos hidroxilo, metilo o metoxilo.

Los ejemplos particulares de polímeros sintéticos incluyen polietilenglicol, polipropilenglicol poli(alcohol vinílico) de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituidos o derivados de los mismos, especialmente polietilenglicol opcionalmente sustituido tal como metoxipolietilenglicol o derivados del mismo.

25 Los polímeros que se producen de manera natural particulares incluyen lactosa, amilosa, dextrano, glucógeno o derivados de los mismos.

30 “Derivados” tal como se usa en el presente documento pretende incluir derivados reactivos, por ejemplo grupos reactivos selectivos de tiol tales como maleimidas. El grupo reactivo puede unirse directamente o a través de un segmento de ligador al polímero. Se apreciará que el residuo de un grupo de este tipo formará parte en algunos casos del producto como el grupo de unión entre el fragmento de anticuerpo y el polímero.

35 El tamaño del polímero puede variarse según se desee, pero generalmente estará en un intervalo de peso molecular promedio de desde 500 Da hasta 50000 Da, preferiblemente desde 5000 hasta 40000 Da y más preferiblemente desde 20000 hasta 40000 Da. El tamaño del polímero puede seleccionarse en particular basándose en el uso previsto del producto, por ejemplo la capacidad para localizarse en determinados tejidos tales como tumores o extender la semivida circulante (para una revisión véase Chapman, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews, 54, 531-545). Por tanto, por ejemplo, cuando el producto está destinado a dejar la circulación y penetrar en el tejido, por ejemplo para su uso en el tratamiento de un tumor, puede ser ventajoso usar un polímero de peso molecular pequeño, por ejemplo con un peso molecular de aproximadamente 5000 Da. Para aplicaciones en las que el producto sigue en la circulación, puede ser ventajoso usar un polímero de peso molecular superior, que tiene por ejemplo un peso molecular en el intervalo de desde 20.000 Da hasta 40.000 Da.

45 Los polímeros particularmente preferidos incluyen un polímero de polialquileno, tal como un polietilenglicol o, especialmente, un metoxipolietilenglicol o un derivado del mismo, y especialmente con un peso molecular en el intervalo de desde aproximadamente 15.000 Da hasta aproximadamente 40.000 Da.

50 En un ejemplo, se unen anticuerpos para su uso en la presente invención a restos de polietilenglicol (PEG). En un ejemplo particular, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo y las moléculas de PEG pueden unirse a través de un residuo de cisteína ubicado en la posición 171, 156, 202 ó 203, residuo de cisteína que puede producirse de manera natural en el fragmento de anticuerpo o puede introducirse por ingeniería genética en el fragmento usando métodos de ADN recombinante (véase por ejemplo los documentos US 5.219.996; US 5.667.425; WO 98/25971). Pueden usarse múltiples sitios para unir dos o más moléculas de PEG.

55 Por tanto, pueden unirse covalentemente moléculas de PEG a través de un grupo tiol de al menos un residuo de cisteína ubicado en el residuo 171, numerado según el sistema de numeración de Kabat, en la cadena ligera kappa humana. Lo más preferiblemente, una molécula de PEG se une directa o indirectamente mediante el residuo alterado S171C. En una realización preferida, dos moléculas de PEG se unen mediante cada cisteína 171. Cada molécula de polímero unida al fragmento de anticuerpo modificado puede unirse covalentemente al átomo de azufre
60 de un residuo de cisteína ubicado en el fragmento. El enlace covalente será generalmente un enlace disulfuro o, en particular, un enlace azufre-carbono. Por tanto, pueden usarse derivados selectivos de tiol tales como maleimidas y derivados de cisteína. Puede usarse un polímero activado como material de partida en la preparación de fragmentos de anticuerpo modificados con polímeros tal como se describió anteriormente. El polímero activado puede ser cualquier polímero que contenga un grupo reactivo con tiol tal como, pero sin limitación, un éster o ácido α -halocarboxílico, por ejemplo yodoacetamida, una imida, por ejemplo maleimida, una vinilsulfona o un disulfuro.
65 Pueden obtenerse tales materiales de partida comercialmente (por ejemplo de Nektar, anteriormente Shearwater

Polymers Inc., Huntsville, AL, EE.UU.) o pueden prepararse a partir de materiales de partida disponibles comercialmente usando procedimientos químicos convencionales. Las moléculas de PEG particulares incluyen metoxi-PEG-amina 20K (obtenible de Nektar, anteriormente Shearwater; Rapp Polimere; y SunBio) y M-PEG-SPA (obtenible de Nektar, anteriormente Shearwater).

5 En una realización, el anticuerpo es un fragmento Fab modificado que está pegilado, es decir, tiene PEG (polietilenglicol) unido covalentemente al mismo, por ejemplo según el método dado a conocer en el documento EP 0948544 [véanse también "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, Nueva York, "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris y S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC y "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam y A. Dent, Grove Publishers, Nueva York; Chapman, A. 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews* 2002, 54:531-545]. Por tanto, en una realización preferida, un anticuerpo alterado de la invención es un fragmento Fab que comprende una cadena ligera kappa humana alterada en el residuo 171, 156, 202 ó 203 (lo más preferiblemente en el residuo 171), numerado según el sistema de Kabat, a un residuo de cisteína, estando dicho anticuerpo pegilado con un polímero de PEG lineal de peso molecular de aproximadamente 20.000 Da o con un polímero de PEG de cadena ramificada de peso molecular de aproximadamente 40.000 Da. En otra realización preferida, un anticuerpo alterado de la invención es un fragmento Fab' que comprende una cadena ligera kappa humana alterada en el residuo 171, numerado según el sistema de Kabat, a un residuo de cisteína, estando dicho anticuerpo pegilado con un polímero de PEG lineal de peso molecular de aproximadamente 20.000 Da unido en dicha cisteína o con un polímero de PEG de cadena ramificada de peso molecular de aproximadamente 40.000 Da y que también está pegilado mediante la unión de PEG a una cisteína en la región de bisagra. En otro ejemplo, un fragmento Fab' alterado con una alteración de cisteína en la cadena ligera kappa humana tiene un grupo maleimida unido covalentemente al tiol del residuo de aminoácido alterado (es decir, la cisteína 171) y un grupo maleimida unido a un tiol libre en la región de bisagra. Un residuo de lisina puede unirse covalentemente al grupo maleimida y a cada uno de los grupos amina en el residuo de lisina puede unirse un polímero de metoxipolietilenglicol que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da.

Los anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína 171 de la invención tienen la ventaja de que tales anticuerpos pueden tener una molécula o moléculas efectoras acopladas de manera específica de sitio a uno o dos residuos de cisteína usando un reactivo reactivo con tiol. En un aspecto, tal acoplamiento es sin la pérdida del reconocimiento de antígeno, y en otro aspecto es sin la pérdida de la función efectora de la región Fc. En un tercer aspecto, cuando la molécula efectora es una molécula de PEG, tal acoplamiento puede reducir posiblemente la propensión de la región idiopática a provocar una respuesta inmunitaria tras su administración a un sujeto.

35 Se sabe bien que las proteínas producidas de manera biosintética que contienen residuos de cisteína libres pueden tener de hecho el tiol de la cisteína bloqueado con aductos tales como glutatión. Por tanto, antes de que el tiol pueda usarse como punto de acoplamiento en una reacción de conjugación, los aductos tienen que eliminarse mediante reducción suave. En el caso de IgG, aparte de la cisteína introducida, por ejemplo la cisteína 171, en cada una de las cadenas kappa (o lambda) hay varios residuos de cisteína que forman enlaces disulfuro intra e intercatenarios y mantienen la integridad de la IgG que también pueden ser susceptibles a la reducción. El experto entenderá por tanto que puede ser necesario valorar el agente reductor con el fin de determinar si se ha logrado la reducción específica del/de los residuo(s) de cisteína introducido(s) en la cadena kappa sin desestabilizar los enlaces disulfuro nativos.

45 Los reactivos reactivos con tiol incluyen agentes en los que el grupo reactivo es una maleimida, una yodoacetamida, una vinilsulfona, un disulfuro de piridilo u otro grupo reactivo con tiol (véase Haugland 2003, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and research Chemicals*; Brinkley, 1992, *Bioconjugate Chem.* 3:2; Garman, 1997, *Non-radioactive labelling: A Practical Approach*, Academic Press, Londres; Means, 1990, *Bioconjugate Chem.* 1:2; Hermanson, en *Bioconjugate Techniques*, 1996, Academic Press, San Diego, págs. 40-55 y 643-671; Singh, 2002, *Anal. Biochem.* 304:147; Harlow y Lane, 1999, *Using Antibodies: A Laboratory manual*, Cold Spring Harbour Laboratory press, Cold Spring Harbour, NY; Lundblad, 1991, *Chemical Reagents for Protein Modificación*, 2ª ed, CRC Press, Boca Raton, FL).

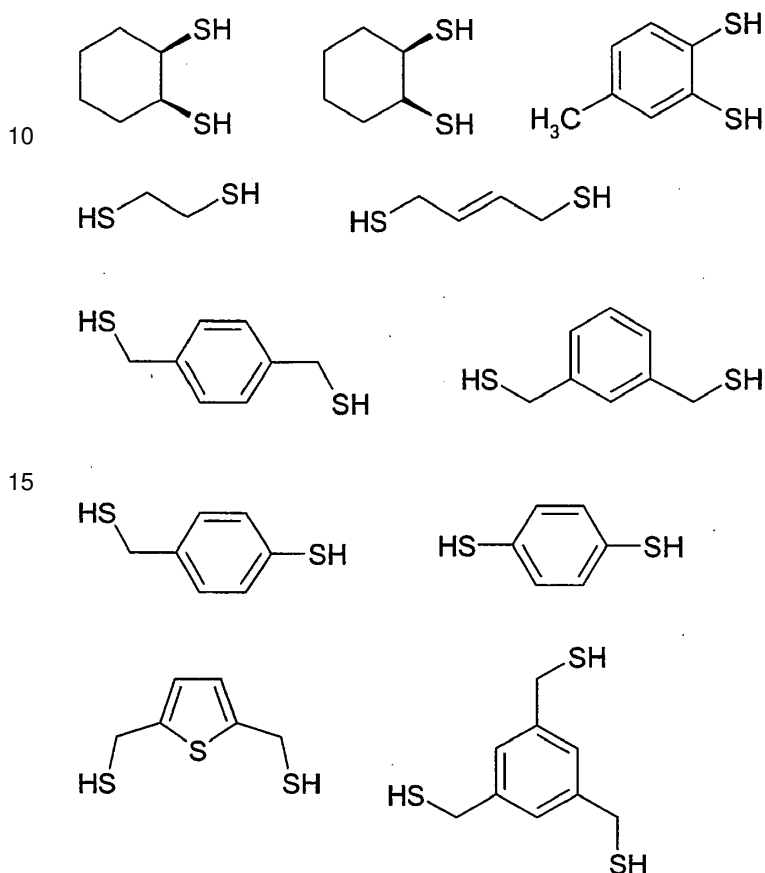
55 En la técnica se conocen ampliamente agentes reductores de monotiol para su uso en la presente invención, los ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, β -mercaptoetilamina, β -mercaptoetanol, cisteína y glutatión reducido. Preferiblemente, el agente reductor de monotiol para su uso en la presente invención es β -mercaptoetilamina.

60 Preferiblemente, la reducción se realiza usando 2-mercaptoetilamina a una concentración de desde 0,01 mM hasta 8 mM. El intervalo de temperatura puede ser de desde 4°C hasta 40°C prefiriéndose de temperatura ambiente a 37°C y siendo lo más preferido 37°C, por ejemplo durante hasta 24 horas.

65 Preferiblemente, el intervalo de concentración es de 0,1 a 5 mM, más preferiblemente de 0,5 mM a 4 mM, o de 1 mM a 3 mM. Lo más preferiblemente, el intervalo de concentración es de desde 1 mM hasta 2 mM y pretende incluir las concentraciones de 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 y 1,9 mM.

El experto entenderá las concentraciones equivalentes de otros agentes reductores. Por tanto, por ejemplo, puede usarse 2-mercaptoetanol a desde 0,01 hasta 3 mM y, más preferiblemente, de 0,5 a 2 mM.

- 5 Otros agentes reductores adecuados incluyen agentes reductores de multitioles que no pueden formar enlaces disulfuro intramoleculares. La expresión "agentes reductores de multitioles que no pueden formar enlaces disulfuro intramoleculares" tal como se usa en el presente documento se refiere a agentes reductores que contienen dos o más grupos tiol que no pueden formar enlaces disulfuro intramoleculares entre los grupos tiol. Se muestran a continuación ejemplos de tales agentes reductores:



- 20 Agentes reductores inadecuados para su uso en la presente invención son agentes reductores de multitioles que pueden formar enlaces disulfuro intramoleculares, por ejemplo, ditiotreitolo que puede formar un enlace disulfuro intramolecular entre sus dos grupos tiol.

- 25 Quedará claro para un experto en la técnica que pueden identificarse agentes reductores adecuados determinando el número de tioles libres producidos tras tratarse la proteína con el agente reductor en la etapa (a) o determinando el número de moléculas efectoras unidad en la etapa (b) por ejemplo mediante cromatografía de exclusión molecular. Se conocen bien en la técnica métodos para determinar el número de tioles libres, véase por ejemplo Lyons *et al.*, 1990, Protein Engineering, 3, 703. Un experto en la técnica también puede determinar empíricamente concentraciones adecuadas de agente reductor. Preferiblemente, la concentración de agente reductor es baja con el fin de lograr la activación selectiva de cisteínas diana.
- 30

- Por consiguiente, se proporciona un método para la unión específica de sitio de una molécula efectora que comprende combinar una muestra que comprende un anticuerpo con un agente reductor de monotioles a una concentración en el intervalo de desde 0,01 hasta 8 mM. Se proporciona además un método para la unión específica de sitio de una molécula efectora a un anticuerpo que comprende combinar una muestra que comprende un anticuerpo alterado para que contenga la cisteína 171, 156, 202 y/o 203 con un agente reductor de monotioles a una concentración en el intervalo de 0,01 a 8 mM. Preferiblemente, la reacción se realiza a una temperatura en el intervalo de 4°C a 40°C, prefiriéndose 37°C. Lo más preferiblemente, el residuo alterado es el residuo 171.
- 35

- 40 Pueden unirse moléculas efectoras a los anticuerpos de la invención directa o indirectamente mediante la cisteína 171 introducida por ingeniería genética. Se apreciará que cuando hay dos o más moléculas efectoras unidas al anticuerpo, éstas pueden ser idénticas o diferentes. Se apreciará también que pueden unirse dos o más moléculas

efectoras al anticuerpo en una única cisteína 171, mediante el uso, por ejemplo, de una estructura de conexión ramificada para unir dos o más moléculas efectoras y proporcionar un único sitio de unión.

5 Por tanto, pueden unirse moléculas efectoras a un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína de la invención mediante un ligador o armazón que tiene un grupo reactivo con tiol unido. Pueden unirse una o dos moléculas de ligador o armazón a cisteína, el residuo 171 introducido por ingeniería genética en las cadenas ligeras kappa. El número de moléculas efectoras unidas, sin embargo, no se limita a una o dos. La molécula de ligador o armazón puede ser tal que pueden unirse dos, tres, cuatro o más moléculas efectoras, según se desee. Los ejemplos de tales ligadores o armazones incluyen los dados a conocer en el documento WO 2007/031734.
10 Alternativamente, cuando la molécula efectora es una proteína o un polipéptido, la unión puede lograrse usando procedimientos de ADN recombinante, por ejemplo tal como se describe en la memoria descriptiva de la patente europea n.º 392745.

15 Se apreciará que pueden unirse moléculas efectoras directa o indirectamente mediante un espaciador a la molécula de ligador o armazón. Por ejemplo, puede unirse una molécula efectora a una molécula de ligador o armazón mediante un espaciador que puede escindirse usando una enzima o un espaciador que es autoeliminable (véase por ejemplo, el documento US 6.214.345).

20 La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo alterado de la invención y un diluyente, excipiente y/o portador farmacéuticamente aceptable. Por tanto, una composición farmacéutica puede comprender un anticuerpo alterado de la invención que está conjugado con una molécula o moléculas efectoras. Por consiguiente, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo alterado de la clase IgG que comprende al menos una cadena ligera kappa humana, o un fragmento de unión a epítipo de la misma que comprende dicha alteración, en el que la alteración comprende la sustitución del residuo
25 171, numerado según el sistema de numeración de Kabat, de la al menos una cadena ligera kappa por un residuo de cisteína y un diluyente, excipiente y/o portador farmacéuticamente aceptable. Lo más preferiblemente, el residuo alterado es S171C.

30 Composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo alterado de la invención encuentran su uso en medicina, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades y trastornos, tales como enfermedades inflamatorias, trastornos proliferativos y trastornos autoinmunitarios, por ejemplo artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, carcinoma, linfoma, leucemia o tumores malignos linfoides, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer de próstata, ELA y esclerosis múltiple. Por tanto, se proporciona el uso de una composición farmacéutica de este tipo
35 en terapia.

La composición se suministrará habitualmente como parte de una composición farmacéutica estéril que normalmente incluirá un portador farmacéuticamente aceptable. Esta composición puede estar en cualquier forma adecuada (dependiendo del método deseado de administrarla a un paciente).

40 Pueden administrarse composiciones farmacéuticas de la invención a un sujeto mediante cualquiera de las vías convencionalmente usadas para la administración de fármacos, por ejemplo pueden administrarse por vía parenteral, por vía oral, por vía tópica (incluyendo bucal, sublingual o transdérmica, o usando administración intracelular mediada por partículas directamente a células de la piel) o mediante inhalación. La administración
45 mediada por partículas se describe por Haynes, JR, 2004, Expert Opinion on Biological Therapy, 4:889-900. La vía más adecuada para la administración en cualquier caso dado dependerá del agente activo particular, la enfermedad o trastorno implicado, el sujeto y la naturaleza y gravedad de la enfermedad y el estado físico del sujeto. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en combinación, por ejemplo, de manera simultánea, secuencial o por separado, con uno o más otros compuestos terapéuticamente activos.

50 La dosificación que va a administrarse de un anticuerpo alterado de la invención variará según el agente activo particular, el cáncer implicado, el sujeto y la naturaleza y gravedad de la enfermedad y el estado físico del sujeto, la edad, el peso y el género del sujeto, la dieta, el momento y la frecuencia de administración, la(s) combinación/combinaciones de fármacos, las sensibilidades de reacción, la tolerancia/respuesta a la terapia y la vía
55 seleccionada de administración; y que un médico determinará en última instancia las dosificaciones apropiadas que han de usarse. Esta dosificación puede repetirse tan a menudo como sea apropiado. Generalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz será de desde 0,01 mg/kg hasta 100 mg/kg, preferiblemente de 0,1 mg/kg a 20 mg/kg. La frecuencia de dosis dependerá de la semivida de la molécula de anticuerpo alterado y la duración de su efecto. Si la molécula de anticuerpo tiene una semivida corta (por ejemplo de 2 a 10 horas) puede ser necesario administrar una
60 o más dosis al día. Alternativamente, si la molécula de anticuerpo tiene una semivida larga (por ejemplo de 2 a 15 días) puede ser necesario sólo administrar una dosificación una vez al día, una vez a la semana o incluso una vez cada 1 ó 2 meses. Si se desarrollan efectos secundarios, la cantidad y/o frecuencia de la dosificación puede alterarse o reducirse, según la práctica clínica normal.

65 Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse convenientemente en formas de dosis unitaria que contienen una cantidad predeterminada de un agente activo de la invención por dosis. En particular, la dosis a la que la

molécula de anticuerpo de la presente invención se administra depende de la naturaleza del estado que va a tratarse, el grado de la inflamación presente y de si la molécula de anticuerpo está usándose profilácticamente o para tratar un estado existente.

5 Para el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad o trastorno en seres humanos y animales, pueden administrarse composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos a los pacientes (por ejemplo, sujetos humanos) a dosificaciones terapéutica o profilácticamente eficaces (por ejemplo, dosificaciones que dan como resultado inhibición del crecimiento tumoral y/o inhibición de la migración de células tumorales, o dosis que mejoran o alivian los síntomas de la enfermedad o trastorno) usando cualquier vía de administración adecuada, tal como
10 inyección y otras vías de administración conocidas en la técnica para productos clínicos a base de anticuerpos.

Las composiciones pueden contener de desde el 0,1% en peso, preferiblemente de desde el 10-60%, o más, en peso, del anticuerpo alterado de la invención, dependiendo del método de administración.

15 Las composiciones pueden administrarse individualmente a un paciente o pueden administrarse en combinación (por ejemplo de manera simultánea, secuencial o por separado) con otros agentes, fármacos u hormonas.

Características preferidas de cada realización de la invención son tal como para cada una de las otras realizaciones cambiando lo que se deba cambiar.

20 La invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos.

La figura 1 muestra la secuencia de las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada [panel (a); SEQ ID NO: 1] y la cadena ligera kappa del anticuerpo CTM01 humano y el anticuerpo modificado por ingeniería genética
25 CTM01(S171C) [paneles (b) y (c); SEQ ID NOS: 2 y 3, respectivamente]. La mutación S171C está subrayada en negrita.

La figura 2 muestra las secuencias de la región constante cKappa humana de TN [(residuos de Kabat 108-214; panel (a); SEQ ID NO: 4], y los mutantes S156C, S202C y S203C con la alteración en negrita y subrayada [paneles
30 (b), (c) y (d); SEQ ID NOS: 5, 6 y 7].

La figura 3 muestra la unión de IgG mutante en S171C CTM01 marcada con colorante a células cancerosas. ◆-células mutantes en S171C DU145; ▲-DU 145 tn; □-DU 145 tn/éster de NHS; x-mutante en S171C LS174T; *-LS174T tn; ●-LS174T tn/éster de NHS.

La figura 4 muestra la unión de IgG CTM01 marcada con AlexaFluor 488 a células T47D. ■-Mutante S171C 3,9 moléculas de colorante por IgG; ▲-tipo natural 3,6 moléculas de colorante por IgG.

40 Ejemplos

1. Mutagénesis de serina 171 a cisteína (S171C)

Se realizó la mutagénesis dirigida al sitio de la serina 171, numerada según el sistema de numeración de Kabat, de la región constante de cadena kappa del anticuerpo humano modificado por ingeniería genética CTM01 tal como
45 sigue: se sometió un vector que codifica para las cadenas ligeras de la región variable y constante de CTM01 en una región de entramado de IgG4 humana a mutagénesis dirigida al sitio usando un kit de mutagénesis dirigida al sitio Quikchange® de Stratagen (n.º de cat. 200519-5, Stratagen, La Jolla, CA) usando el cebador directo, 5'-GCAGGACAGCAAGGACTGCACCTACAGCCTCAG-3' (SEQ ID NO:4), y el cebador inverso, 5'-CTGAGGCTGTAGGTGCAGTCCTTGCTGTCCTGC-3' (SEQ ID NO:5). La secuencia de la cadena kappa de TN se muestra en el panel (b). Se verificó la mutación S171C mediante secuenciación del ADN y se muestra en la figura 1, panel (c). La secuencia de la cadena pesada se muestra en la figura 1 panel (a).

2. Introducción por ingeniería genética de cisteína en S156C S202C y S203C

55 Se produjeron anticuerpos alterados en S156C, S202C y S203C usando un kit de mutagénesis dirigida al sitio Quikchange® de Stratagen (n.º de cat. 200519-5, Stratagen, La Jolla, CA). Las secuencias se muestran en la figura 2, paneles (b) a (d), junto con la secuencia de TN en el panel (a).

3. Expresión de CTM01(S171C) en células Hek 293

60 Se clonó la región variable pesada de CTM01 en pVhGamma4p (como un fragmento de HdIII-XhoI; se eliminó un sitio XhoI interno en la región variable pesada de CTM01 mediante mutagénesis dirigida al sitio) y se clonó la región variable kappa en el vector de expresión, pVhCk(S171C), como un fragmento de HdIII-BsiWI. Se prepararon preparaciones de ADN separadas para cada constructo y se expresó transitoriamente el anticuerpo mediante co-transfección de los dos constructos en células Hek 293 hechas crecer en suspensión en medios libres de suero.
65

4. Purificación de CTM01(S171C)

Se purificó el anticuerpo de IgG presente en sobrenadantes de cultivo tras la expresión transitoria en células Hek 293 mediante cromatografía de afinidad de proteína A. Se preparó una columna de flujo rápido de proteína A sepharose 4 que contenía 20 ml de gel hinchado y se equilibró con 200 ml de tampón glicina / glicinato 50 mM, pH 8,8, eluyendo a 2 ml/min. Se cargó el sobrenadante de cultivo (5 l) en la columna a 1,5 ml/min. tras el ajuste del pH mediante la adición de 125 ml de tampón Tris/HCl 2 M, pH 8,5. Entonces se lavó la columna con 550 ml de tampón glicina / glicinato 50 mM, pH 8,8 a 3,35 ml/min. hasta que las lecturas de A280 nm regresaron al nivel inicial. Se eluyó la IgG con 100 ml de tampón citrato 0,1 M pH 3,0 y se neutralizó la fracción con 8 ml de Tris/HCl 2 M, pH 8,5. Finalmente, se intercambió el tampón del material por tampón acetato 50 mM, EDTA 2 mM pH 5,5, se concentró hasta 45 ml y se esterilizó por filtración. Para almacenamiento a largo plazo, se concentró adicionalmente la IgG y se intercambió el tampón por glicerol al 20% en tampón acetato 50 mM, EDTA 2 mM, pH 6,0.

5. Optimización de la reducción del tiol de CTM01(S171C)

Se mezclaron alícuotas de IgG mutante en S171C o IgG de tipo natural (0,75 mg) en tampón acetato 0,1 M, EDTA 2 mM, pH 6,0 con 2-mercaptoetilamina (2-ME) para dar un intervalo de concentraciones finales de desde 0 hasta 20 mM en un total de 1,5 ml. Se realizaron las reacciones a 37°C durante 24 h y se intercambió el tampón de las muestras por solución salina tamponada por fosfato pH 7,5 que contenía EDTA 2 mM.

Se evaluó el grado de regeneración del tiol activo en la IgG mediante reacción con el colorante fluorescente, AlexaFluor 488-C5-maleimida (Invitrogen Ltd). Se preparó una disolución madre 0,5 mM del colorante en DMF y se añadió una alícuota de 200 μ l a cada muestra de IgG reducida hasta un volumen final de 1 ml y un exceso molar de colorante:IgG 15:1. Se dejó que las reacciones avanzaran a 37°C durante 24 h y se intercambió el tampón de las muestras por solución salina tamponada con fosfato pH 7,5 que contenía EDTA 2 mM. Se estimó el grado de marcaje con colorante de IgG monomérica tras el análisis de HPLC de exclusión molecular en el que se monitorizaron los perfiles de absorbancia a 280 nm y A494 nm. Se calculan los valores de área bajo la curva (AUC) a ambas longitudes de onda permitidas por la incorporación de colorante tal como sigue:

Colorante por IgG = (AUC494 nm/54030) / (AUC280 nm – AUC494 nm x 0,118) / 208380.

Se incorporaron cantidades de colorante insignificantes en la IgG o bien mutante o bien de tipo natural en ausencia de reducción de 2-ME, lo que indica que los tioles en la cys171 de kappa mutante estaban bloqueados covalentemente (tabla 1). A la inversa, a altas concentraciones de 2-ME (20 mM) se incorporaban más de 3 moléculas de colorante por molécula de IgG de tipo natural, lo que indica que se había reducido al menos un enlace disulfuro de la cisteína. En el caso de la IgG mutante, la carga de colorante era superior a 4,8 moléculas de colorante por IgG lo que sugiere que al menos una cys171 de kappa se había reducido también. Sorprendentemente, se encontró que a concentraciones de 2-ME intermedias, a entre 1 y 2 mM, la reducción era suficiente como para dar como resultado el enlace covalente de justo por encima de 2 moléculas de colorante por IgG en la IgG mutante en S171C CTM01, mientras que la reducción no era lo suficientemente fuerte como para dar como resultado la rotura del enlace disulfuro en el control de IgG de tipo natural, en la medida en que, en promedio, no más de una en dos moléculas de IgG incorporaban una única molécula de colorante.

Tabla 1. Marcaje con AlexaFluor 488 de IgG S171C

Concentración de 2-ME (mM)	Moléculas de colorante por IgG	
	IgG mutante en S171C	IgG de tipo natural
0	0,08	0,05
1	2,2	0,5
1,5	2,7	0,5
2	2,8	0,5
3	3,2	0,56
4	3,4	0,7
10	3,6	1,9
20	4,8	3,5

Puesto que la IgG CTM01 S171C difiere del CTM01 de tipo natural sólo en los dos residuos 171 de kappa, se concluyó que el acoplamiento del colorante tras la reducción con 2-ME en el intervalo 1 a 2 mM proporcionó una incorporación cercana a la teórica de 2 colorantes por IgG mediante los tioles de la cys171 de kappa.

6. Pruebas de la potencia de unión y especificidad de IgG CTM01 S171C con AlexaFluor488-C5-maleimida marcada

mediante los residuos de cisteína 171 de kappa

Se generó el anticuerpo CTM01 contra un antígeno globular de grasa de leche humana (Aboud-Pirak *et al*, 1988, Cancer Research, 48:3188.) y reconoce un epítipo repetido en la VNTR de muc-1 (Pietersz *et al*, 1997, Cancer Immunology and Immunotherapy, 44: 323-328). Se comparó la unión de la IgG CTM01 S171C marcada con colorante a la línea celular de cáncer humano positiva para muc-1, DU145, con su unión a una línea celular de cáncer negativa para muc-1, LS174T, mediante citometría de flujo.

Se marcó la IgG mutante en S171C como anteriormente usando reducción previa con 2-ME 1,5 mM, seguido por incubación con un exceso molar de 15 veces de AlexaFluor 488-C5-maleimida para dar una carga de colorante de 2,1 moléculas de colorante por IgG. Como control, se trató la IgG de tipo natural en condiciones idénticas para dar una incorporación de colorante de 0,7 moléculas de colorante por IgG. Como control adicional, se marcó la IgG CTM01 de tipo natural mediante modificación de lisina, usando el colorante AlexaFluor488-éster de NHS, para lograr una carga coincidente de 2 moléculas de colorante por IgG.

Se incubaron los anticuerpos marcados con colorante respectivos 1 h en hielo con suspensiones celulares individuales de o bien células DU145 o bien LS174T a concentraciones finales de $0,8 \times 10^6$ células por ml e IgG que oscilaba desde 0,2 hasta 200 nM. El tampón de ensayo contenía azida de sodio 10 mM, BSA al 0,2%, EDTA 2 mM en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco. Se lavaron las células con 4 ml de PBS enfriado, se centrifugaron a 2,5 g durante 5 min. y se resuspendieron los sedimentos en 300 μ l de PBS.

Se realizó la citometría de flujo usando un instrumento FACScalibur (Becton Dickenson). Se recogieron las intensidades de fluorescencia a partir del canal FL1 y se representaron gráficamente como intensidad media geométrica frente a concentración de IgG (véase la figura 3).

El mutante hCTM01 con el marcador acoplado mediante los tioles de la cys171 de kappa mostró un aumento dependiente de la dosis en la unión por encima de 3 órdenes de magnitud a las células DU145 positivas para muc-1. El hCTM01 de tipo natural marcado en condiciones idénticas, pero con una incorporación de colorante 3 veces inferior, dio como resultado al menos un grado de unión 6 veces inferior. Puesto que en este último caso la incorporación de colorante sólo puede lograrse mediante la rotura del disulfuro inter o intracatenario de la IgG, es probable que tal rotura tenga un efecto perjudicial sobre la unión a antígeno.

El marcaje con colorante de anticuerpos se logra habitualmente mediante enlace covalente aleatorio a cadenas laterales de lisina de la IgG. En el ejemplo actual, el acoplamiento del colorante activo de éster de NHS mediante residuos de lisina de la IgG de tipo natural ha producido una incorporación de colorante coincidente con la de la IgG mutante en S171C marcada con colorante en cys171 de kappa. En esta situación, se espera una potencia de unión igual, sin embargo la unión de la primera es un 8% inferior que la de esta última en el intervalo de dosis superior, probablemente debido al marcaje aleatorio de residuos de lisina que provoca daño o impedimento en el sitio de unión a antígeno. A la inversa, el marcaje mediante la mutación de cisteína 171 de kappa coloca el colorante muy lejos del sitio de unión y por tanto no interfiere con la unión a antígeno.

En cada caso, se confirma la especificidad de unión mediante la falta de unión a la línea celular LS174T negativa para el antígeno.

7. El marcaje con colorante mediante enlaces disulfuro de cisteína reducidos daña la actividad de unión a antígeno

En un experimento adicional, se buscó la confirmación de los efectos perjudiciales del marcaje mediante disulfuros reducidos intra/intercatenarios. Usando condiciones similares a la reducción de IgG anterior y reacciones de acoplamiento de AlexaFluor488-C5-maleimida, se encontró que la reducción del mutante hCTM01 S171C con 2-ME 5 mM y la reducción de hCTM01 de tipo natural con 2-ME 20 mM daban como resultado una incorporación similar de aproximadamente 4 moléculas de colorante por IgG.

Se compararon las potencias de unión de estos anticuerpos marcados con colorante en células de cáncer humano T74D positivas para muc-1 mediante citometría de flujo. La potencia de unión de la IgG mutante en S171C mostró un buen aumento dependiente de la dosis en la unión por encima de dos órdenes de magnitud y sólo alcanza una meseta por encima de una concentración de 100 nM. En cambio, la IgG de tipo natural dio como resultado una unión de 2 a 3 veces inferior alcanzándose una meseta en la unión a sólo IgG 20 nM (véase la figura 4). A pesar de una incorporación de fármaco similar en ambas IgG, la IgG de tipo natural presenta un mayor grado de daño en su capacidad de unión a antígeno. En este caso, al menos dos enlaces disulfuro de cisteínas se han roto, lo que explica la carga de colorante observada, mientras que en el caso de la IgG mutante, la rotura de sólo un disulfuro de cisteínas junto con los residuos de cisteína 171 de kappa puede explicar la carga de colorante observada.

En conclusión, el enlace covalente de aductos de maleimida a IgG mediante la mutación de cisteína 171 de kappa proporciona un método mucho más satisfactorio de formación de conjugados con respecto a la actividad de unión a antígeno que mediante tioles de cisteína reducidos.

8. Conjugación de PEG[40 kD]-maleimida a IgG CTM01 S171C

La conjugación específica de sitio de aductos funcionales a una IgG de una manera que no afecta a la potencia de unión a antígeno es de beneficio potencial. El enlace covalente de aductos de PEG de proteínas y anticuerpos es un modo bien conocido de cambio de la farmacocinética de la proteína. Por tanto, es de interés determinar si una especie de PEG-maleimida de alto peso molecular podría acoplarse específicamente a los tioles de cys171 de kappa de CTM01 S171C IgG.

Se mezclaron alícuotas de IgG mutante en S171C o IgG de tipo natural (1 mg) en tampón acetato 0,1 M, EDTA 2 mM, pH 6,0 con 2-ME hasta una concentración final de 1,5 mM en 1,5 ml. Tras la incubación a 37°C durante 24 h, se intercambió el tampón de las mezclas de reacción por solución salina tamponada con fosfato pH 7,5 que contenía EDTA 2 mM. Se trataron alícuotas de los anticuerpos reducidos con un exceso molar de 15 veces de PEG-maleimida (PM 40000), suministrada por Shearwater Polymers Inc. y se dejó reaccionar a 37°C durante hasta 24 h. Se examinaron las reacciones a lo largo del tiempo y se monitorizó el grado de conjugación mediante HPLC de exclusión molecular usando columnas Zorbax GF450 y Zorbax GF250 en serie y una fase móvil que comprendía etanol al 10% en fosfato de sodio 0,2 M pH 7,0, eluyendo a 1 ml/min.

Se usaron las áreas de picos bajo los perfiles de absorbancia de A280nm para calcular el porcentaje de formación de producto. La tabla 2 muestra los porcentajes del material de partida de IgG ejecutándose como un pico monomérico de IgG con un tiempo de retención de 19,3 min. y los del pico de producto de tiempo de retención de 16,8 min., es decir, de tamaño molecular aumentado. Tras 1 h de tiempo de reacción, la IgG CTM01 S171C mostró una formación de un 26,5% de producto mientras que la IgG de control CTM01 de tipo natural mostró solo un 6,6% de producto. Hacia las 18 h, la reacción de la IgG mutante mostró que la mayoría del material se había convertido en producto mientras que para la reacción de la IgG control el 88,8% permanecía como material de partida.

Los resultados demuestran claramente que la mayoría del producto de reacción de alto PM formado con la IgG CTM01 S171C debe haber surgido a través de enlace covalente específico mediante los tioles de cys171 de la cadena kappa, puesto que la reacción de la IgG control, que difiere sólo en estos residuos, y que se trató de una manera idéntica, dio como resultado 5 veces menos producto.

Tabla 2. Formación de CTM01 S171C-PEG frente a PEG-IgG de tipo natural

Tiempo de reacción, h	IgG mutante en S171C		IgG de tipo natural	
	Rt de pico = 16,8'	Rt de pico = 19,3'	Rt de pico = 16,8'	Rt de pico = 19,3'
1	26,5%	73,5%	6,6%	93,4%
18	52,5%	47,5%	11,2%	88,8%

Lista de secuencias

- 35 <110> UCB PHARMA S.A.
LAWSON, Alastair DG
BAKER, Terry S
HUMPHREYS, David P
- 40 <120> ANTICUERPOS ALTERADOS
- <130> Documento G0028-wo01
- <150> Documento GB 0619291.8
- 45 <151> 29-09-2006
- <160> 7
- 50 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 447
- 55 <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*

ES 2 384 807 T3

<400> 1

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

ES 2 384 807 T3

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

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

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
 210 215 220

Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240

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

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

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285

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

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335

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

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

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380

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

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

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 2

<210> 2

5 <211> 219

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 2

ES 2 384 807 T3

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

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

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

Pro Lys Leu Leu Met Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 3

5 <211> 219

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 3

ES 2 384 807 T3

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

<210> 4

5 <211> 107

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 4

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

ES 2 384 807 T3

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 5

5 <211> 107

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 5

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45
 Cys Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

15 <210> 6

<211> 107

<212> PRT

20

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

25

ES 2 384 807 T3

20

25

30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Cys Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 7

5 <211> 107

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 7

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Cys
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo alterado de la clase IgG que comprende al menos una cadena ligera kappa humana, que comprende dicha alteración, en el que la alteración comprende la sustitución del residuo 171, numerado según el sistema de numeración de Kabat, de la al menos una cadena ligera kappa por un residuo de cisteína.
2. El anticuerpo alterado según la reivindicación 1 ó 2, que es un Fab, un Fab' o un F(ab')₂.
- 10 3. El anticuerpo alterado según la reivindicación 1 ó 2, que está conjugado con una o más moléculas efectoras.
4. El anticuerpo alterado según la reivindicación 3, en el que la molécula efectora comprende uno o más agentes citotóxicos, radionúclidos o restos farmacológicos, o uno o más polímeros.
- 15 5. El anticuerpo alterado según la reivindicación 4, en el que el polímero es una molécula de PEG.
6. La molécula de anticuerpo según la reivindicación 5, en la que el PEG tiene un peso molecular en el intervalo de desde aproximadamente 20.000 hasta 40.000 Da.
- 20 7. La molécula de anticuerpo según la reivindicación 5, en la que el PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da.
8. El anticuerpo alterado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo completamente humano.
- 25 9. Un método para la unión específica de sitio de una molécula efectora a un anticuerpo de la clase IgG que comprende al menos una cadena ligera kappa que comprende combinar una muestra que comprende un anticuerpo con un agente reductor de monotiol o un agente reductor de multitiol que no puede formar enlaces disulfuro intramoleculares a una concentración en el intervalo de desde 1 hasta 8 mM, en el que el anticuerpo es un anticuerpo alterado para que contenga la cisteína 171 de la al menos una cadena ligera kappa, numerada según el sistema de numeración de Kabat.
- 30 10. El método según la reivindicación 9, en el que el agente reductor es 2-mercaptoetilamina a una concentración en el intervalo de desde 1 mM hasta 3 mM.
- 35 11. El método según la reivindicación 9, en el que el agente reductor es 2-mercaptoetilamina a una concentración en el intervalo de desde 1 mM hasta 2 mM.

(a)

QIQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYYINWMRQAPGQGLEWIGWIDPGSGN
TKYNEKFKGRATLTVDSTNTAYMELSSLRSEDYAFYFCAREKTTYYYAMDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPS
CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQ
PREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

(b)

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRSSKSLLSNGDTFLYWFQQKPGKAPKLLMYRMS
NLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCMQHLEYPFTFGQGTKVEVKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYLSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(c)

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRSSKSLLSNGDTFLYWFQQKPGKAPKLLMYRMS
NLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCMQHLEYPFTFGQGTKVEVKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDCTYLSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 1

(a)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(b)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQCGNSQESVT
EQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(c)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLCSPVTKSFNRGEC

(d)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSCPVTKSFNRGEC

Figura 2

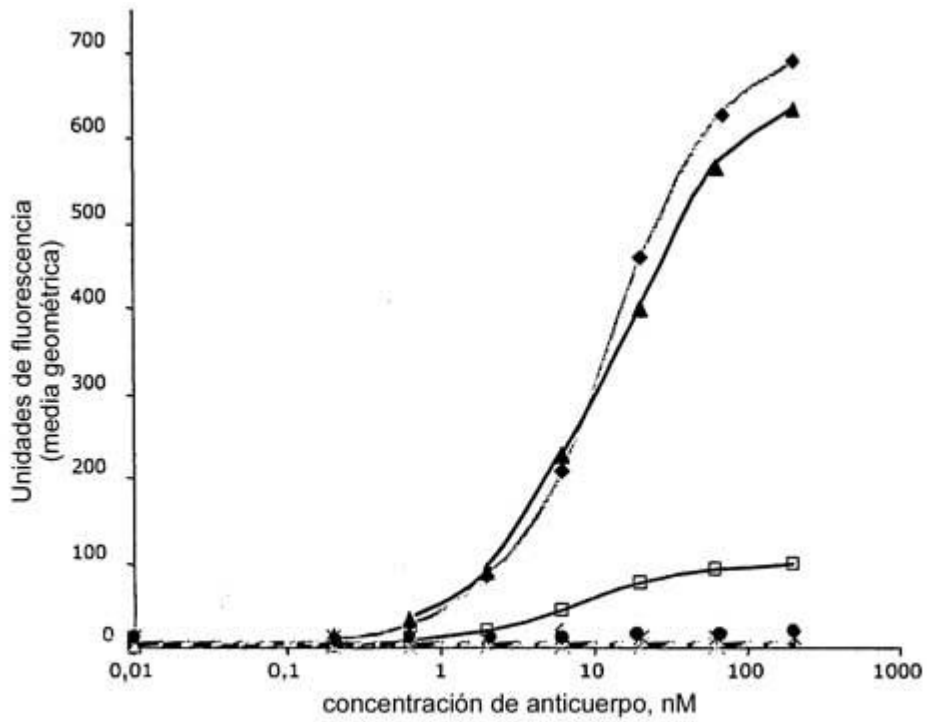


Figura 3

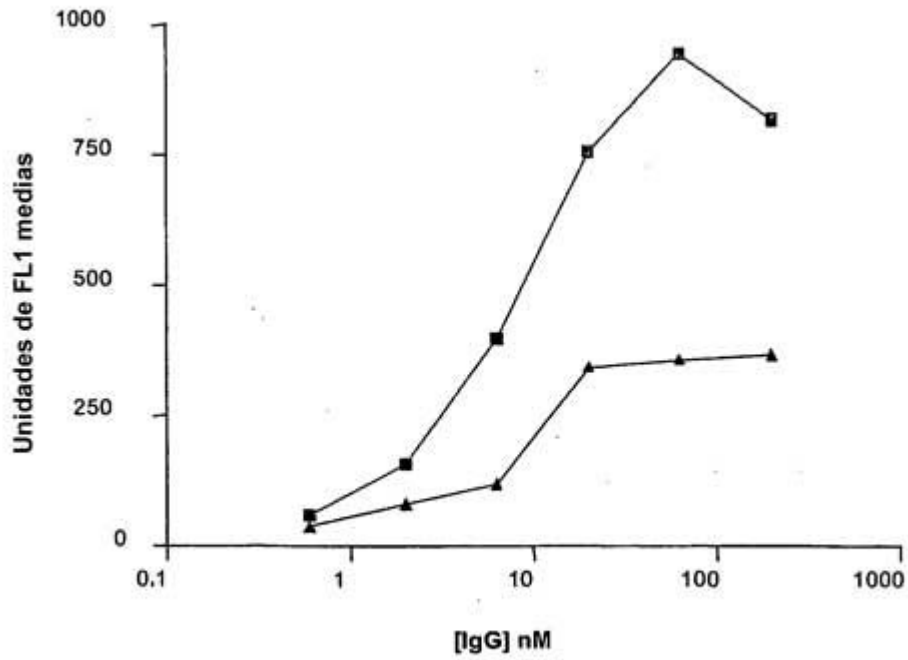


Figura 4