



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: 2 613 963

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01) C07K 16/00 (2006.01) A61K 51/10 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: 21.01.2009 PCT/US2009/031294

(87) Fecha y número de publicación internacional: 23.07.2009 WO09092011

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: 16.01.2009 E 09702787 (4)

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: 02.11.2016 EP 2244729

(54) Título: Anticuerpos manipulados con cisteína para conjugación específica de sitio

(30) Prioridad:

18.01.2008 US 22073 P

Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: 29.05.2017

(73) Titular/es:

MEDIMMUNE, LLC (100.0%) One MedImmune Way Gaithersburg, MD 20878, US

(72) Inventor/es:

DIMASI, NAZZARENO; GAO, CHANGSHOU y WU, HERREN

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos manipulados con cisteína para conjugación específica de sitio

5 1. Campo de la invención

10

La invención se refiere a anticuerpos que comprenden dominios CH1 manipulados con cisteína que producen grupos tiol libres para reacciones de conjugación. También se proporcionan métodos de diseño, modificación, producción y uso de tales anticuerpos.

2. Antecedentes de la invención

2.1 Cáncer y terapias para el cáncer

- Más de 1,2 millones de norteamericanos desarrollan cáncer cada año. El cáncer es la segunda causa principal de muerte en los Estados Unidos y si continúan las tendencias actuales, se espera que el cáncer sea la causa más frecuente de muerte en el año 2010. El cáncer de pulmón y de próstata son las principales causas de muerte por cáncer para los hombres en los Estados Unidos. El cáncer de pulmón y de mama son las principales causas de muerte por cáncer para las mujeres en los Estados Unidos. Uno de cada dos hombres en los Estados Unidos será diagnosticado con cáncer en algún momento durante su vida. Una de cada tres mujeres en los Estados Unidos será diagnosticada con cáncer en algún momento durante su vida. Las actuales opciones de tratamiento, tales como cirugía, quimioterapia y tratamiento con radiación, son frecuentemente o bien ineficaces o bien presentan efectos secundarios graves.
- Una barrera para el desarrollo de agentes antimetástasis ha sido los sistemas de ensayo que se usan para diseñar y evaluar estos fármacos. La mayoría de las terapias para el cáncer convencionales se dirigen a células que crecen rápidamente. Sin embargo, las células cancerosas no crecen necesariamente más rápidamente, sino que en su lugar sobreviven y crecen en condiciones que son no permisivas para las células normales (Lawrence y Steeg, 1996, World J. Urol. 14:124-130). Estas diferencias fundamentales entre los comportamientos de células normales y malignas proporcionan oportunidades para el direccionamiento terapéutico. El paradigma de que los tumores micrometastásicos ya se han diseminado a través del cuerpo enfatiza la necesidad de evaluar posibles fármacos quimioterapéuticos en el contexto de un microentorno extraño y tridimensional. Muchos ensayos de fármacos para el cáncer estándar miden el crecimiento de células tumorales o la supervivencia bajo condiciones de cultivo celular típicas (es decir, crecimiento de monocapas). Sin embargo, el comportamiento de la célula en ensayos bidimensionales frecuentemente no predice de forma fiable el comportamiento de células tumorales *in vivo*.
- Actualmente, la terapia del cáncer puede implicar cirugía, quimioterapia, terapia hormonal y/o tratamiento con radiación para erradicar células neoplásicas en un paciente (véase, por ejemplo, Stockdale, 1998, "Principles of Cancer Patient Management", en Scientific American: Medicine, vol. 3, Rubenstein and Federman, eds., Capítulo 12, Sección IV). Todos estos enfoques poseen inconvenientes significativos para el paciente. La cirugía, por ejemplo, puede estar contraindicada debido a la salud del paciente o puede ser inaceptable para el paciente. Adicionalmente, la cirugía puede no eliminar completamente el tejido neoplásico. La radioterapia solo es eficaz cuando el tejido neoplásico presenta una sensibilidad más alta a la radiación que el tejido normal, y la radioterapia también puede provocar frecuentemente efectos secundarios graves. La terapia hormonal se administra raramente como un agente único y, aunque puede ser eficaz, se usa frecuentemente para prevenir o retardar la reaparición del cáncer después de que otros tratamientos hayan eliminado la mayoría de las células cancerosas.
- Con respecto a la quimioterapia, hay una variedad de agentes quimioterapéuticos disponibles para el tratamiento del cáncer. Una mayoría significativa de los quimioterapéuticos para el cáncer actúan inhibiendo la síntesis de ADN (véase, por ejemplo, Gilman et al., Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Octava Ed. (Pergamon Press, New York, 1990)). Como tales, los agentes de quimioterapia son inherentemente no específicos. Además, casi todos los agentes quimioterapéuticos son tóxicos, y la quimioterapia produce efectos secundarios significativos, y frecuentemente peligrosos, que incluyen náuseas graves, depresión de la médula ósea, inmunosupresión, etc. (véase, por ejemplo, Stockdale, 1998, "Principles Of Cancer Patient Management" en Scientific American Medicine, vol. 3, Rubenstein and Federman, eds., Cap. 12, Secc. 10). Además, incluso con la administración de combinaciones de agentes quimioterapéuticos, muchas células tumorales son resistentes o desarrollan resistencia a los agentes quimioterapéuticos.
- La terapia del cáncer puede ahora también implicar terapia biológica o inmunoterapia. Las terapias 60 biológicas/inmunoterapias están limitadas en número y, aunque son más específicas que los agentes quimioterapéuticos, muchas se dirigen todavía a tanto células sanas como a cancerosas. Además, tales terapias pueden producir efectos secundarios tales como urticarias o edemas, síntomas tipo gripe, que incluyen fiebre, escalofríos y fatiga, problemas del tubo digestivo o reacciones alérgicas.

2.2 Anticuerpos para el tratamiento de cáncer

Los anticuerpos son proteínas inmunológicas que se unen a un antígeno específico. En la mayoría de los mamíferos, que incluyen seres humanos y ratones, los anticuerpos se construyen a partir de cadenas de polipéptidos pesadas y ligeras emparejadas. Cada cadena está constituida de dos regiones distintas, denominadas las regiones variables (Fv) y constantes (Fc). Las regiones Fv de cadena ligera y pesada contienen los determinantes de unión al antígeno de la molécula y son responsables de la unión del antígeno diana. Las regiones Fc definen la clase (o isotipo) de anticuerpo (por ejemplo, IgG) y son responsables de la unión de varias proteínas naturales para provocar importantes eventos bioquímicos.

10

15

20

5

La región Fc de un anticuerpo interacciona con varios ligandos que incluyen receptores de Fc y otros ligandos, que confieren una matriz de importantes capacidades funcionales denominadas funciones efectoras. Una familia importante de receptores de Fc para la clase de IgG son los receptores de Fc gamma (FcyR). Estos receptores median en la comunicación entre los anticuerpos y el brazo celular del sistema inmunitario (Raghavan et al., 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220; Ravetch et al., 2001, Annu Rev Immunol 19:275-290). En seres humanos, esta familia de proteínas incluye FcyRI (CID64), que incluye las isoformas FcyRIB y FcvRIC; FcyRII (CD32), que incluye las isoformas FcyRIIA, FcyRIB y FcyRIIC; y FcyRIII (CD 16), que incluye las isoformas FcyRIIIA y FcyRIIB (Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82:57-65). Estos receptores normalmente tienen un dominio extracelular que media en la unión a Fc, una región que atraviesa la membrana, y un dominio intracelular que puede mediar en algún evento de señalización dentro de la célula. Estos diferentes subtipos de FcyR se expresan en diferentes tipos de células (revisado en Ravetch et al., 1991, Annu Rev Immunol 9:457-492). Por ejemplo, en seres humanos, FcyRIIIB se encuentra solo en neutrófilos, mientras que FcyRIIIA se encuentra en macrófagos, monocitos, linfocitos citolíticos espontáneos (NK) y una subpoblación de linfocitos T.

25

La formación del complejo Fc/FcγR recluta células efectoras a sitios de antígeno unido, produciendo normalmente eventos de señalización dentro de las células e importantes respuestas inmunitarias posteriores tales como la liberación de mediadores de inflamación, activación de linfocitos B, endocitosis, fagocitosis y ataque citotóxico. La capacidad para mediar en las funciones efectoras citotóxicas y fagocíticas es un posible mecanismo por el que los anticuerpos destruyen células elegidas como diana. La reacción mediada por células en la que células citotóxicas no específicas que expresan FcγR reconocen anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente producen la lisis de la célula diana se denomina citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC) (Raghavan et al., 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220; Ghetie et al., 2000, Annu Rev Immunol 18:739-766; Ravetch et al., 2001, Annu Rev Immunol 19:275-290). En particular, las células primarias para mediar en ADCC, linfocitos NK, expresan solo FcγRIIIA, mientras que los monocitos expresan FcγRII y FcγRIII (Ravetch et al., 1991, arriba).

35

30

Otro ligando de Fc importante es la proteína del complemento C1q. La unión de Fc a C1q media en un proceso llamado citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) (revisado en Ward et al., 1995, Ther Immunol 2:77-94). C1q es capaz de unirse a seis anticuerpos, aunque la unión a dos IgG es suficiente para activar la cascada del complemento. C1q forma un complejo con las serina proteasas C1r y C1s para formar el complejo de C1 de la vía del complemento.

40

45

Varias características clave de anticuerpos que incluyen, pero no se limitan a, especificidad por diana, capacidad para mediar en mecanismos de efectores inmunitarios y larga semivida en suero, hacen que los anticuerpos y moléculas de inmunoglobulina relacionadas sean terapéuticos poderosos. Numerosos anticuerpos monoclonales están actualmente en desarrollo o están siendo usados terapéuticamente para el tratamiento de una variedad de afecciones que incluyen cáncer. Ejemplos de éstos incluyen Vitaxin® (MedImmune), un anticuerpo humanizado dirigido contra la integrina ανβ3 (por ejemplo, publicación PCT WO 2003/075957), Herceptin® (Genentech), un anticuerpo humanizado anti-Her2/neu autorizado para tratar cáncer de mama (por ejemplo, documento U.S. 5.677.171), CNTO 95 (Centocor), un anticuerpo humano dirigido contra la integrina αν (publicación PCT WO 02/12501), Rituxan® (IDEC/Genentech/Roche), un anticuerpo quimérico anti-CD20 autorizado para tratar linfoma no Hodgkin (por ejemplo, documento U.S. 5.736.137) γ Erbitux® (ImClone), un anticuerpo quimérico anti-EGFR (por

50

55

60

65

Hay varios posibles mecanismos por los que los anticuerpos destruyen células tumorales, que incluyen antiproliferación mediante el bloqueo de las vías de crecimiento necesarias, señalización intracelular que conduce a apoptosis, regulación potenciada por disminución y/o renovación de receptores, ADCC, CDC y promoción de una respuesta inmunitaria adaptativa (Cragg et al., 1999, Curr Opin Immunol 11:541-547; Glennie et al., 2000, Immunol Today 21:403-410). Sin embargo, a pesar del uso generalizado, los anticuerpos todavía no están optimizados para uso clínico y muchos tienen potencia antineoplásica inferior a la óptima. Así, hay una necesidad significativa de potenciar la capacidad de los anticuerpos para destruir células cancerosas elegidas como diana.

2.3 Conjugados de anticuerpo

ejemplo, documento U.S. 4.943.533).

2.0 Conjugados de anticuci pe

El uso de conjugados de anticuerpo, es decir, inmunoconjugados, para la administración local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir, fármacos para destruir o inhibir células tumorales en el tratamiento de cáncer (Lambert, J. (2005) Curr. Opinion in Pharmacology 5:543-549; Wu et al. (2005) Nature Biotechnology 23(9): 1137-1146; Payne,

G. (2003) Cancer Cell 3:207-212; Syrigos y Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997) Adv. Drug Del. Rev. 26:151-172; patente de EE.UU. N.º 4.975.278) permite teóricamente la administración dirigida del resto de fármaco a tumores, y la acumulación intracelular en su interior, donde la administración sistémica de estos agentes de fármaco sin conjugar puede producir niveles inaceptables de toxicidad a células normales, además de las células tumorales que se busca eliminar (Baldwin et al (1986) Lancet pp. (15 de marzo de 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera et al (ed.s), pp. 475-506). Así se busca la eficacia máxima con toxicidad mínima. Los esfuerzos para diseñar y refinar conjugados de anticuerpo se han centrado en la selectividad de anticuerpos monoclonales (mAb), además de propiedades de unión a fármaco y de liberación de fármaco (Lambert, J. (2005) Curr. Opinion in Pharmacology 5:543-549). Se ha informado de tanto anticuerpos policionales como de anticuerpos monocionales como útiles en estas estrategias (Rowland et al (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87). Los fármacos usados en estos métodos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato y vindesina (Rowland et al (1986)). Las toxinas usadas en conjugados de anticuerpotoxina incluyen toxinas bacterianas tales como toxina diftérica, toxinas de planta tales como ricina, toxinas de molécula pequeña tales como geldanamicina (Mandler et al (2000) J. of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581; Mandler et al (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028; Mandler et al (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791), maitansinoides (EP 1391213; Liu et al (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623) y caliqueamicina (Lode et al (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman et al (1993) Cancer Res. 53:3336-3342). Las toxinas pueden efectuar sus efectos citotóxicos y citostáticos por mecanismos que incluyen unión a tubulina, unión a ADN o inhibición de topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan con anticuerpos grandes o ligandos de receptor de proteína.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Varios conjugados de anticuerpo han sido autorizados por la FDA o están en ensayos clínicos. Por ejemplo, ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec) está compuesto por un anticuerpo monoclonal IgG1 kappa murino dirigido contra el antígeno CD20 encontrado en la superficie de linfocitos B normales y malignos y el radioisótopo ¹¹¹In o ⁹⁰Y unido por un conector-quelante de tiourea (Wiseman et al (2000) Eur. J. Nucl. Med. 27(7):766-77; Wiseman et al (2002) Blood 99(12):4336-42; Witzig et al (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63; Witzig et al (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69). Aunque ZEVALIN® tiene actividad contra linfoma no Hodgkin de linfocitos B (NHL), la administración produce citopenias graves y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MYLOTARG® (gemtuzumab ozogamicin, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto de un anticuerpo dirigido contra CD33 humano unido a caliqueamicina, también fue autorizado en 2000 para el tratamiento de leucemia mieloide aguda mediante inyección (Drugs of the Future (2000) 25(7):686; patentes de EE.UU. N.º 4.970.198; 5.079.233; 5.585.089; 5.606.040; 5.693.762; 5.739.116; 5.767.285; 5.773.001). Cantuzumab mertansine (Immunogen, Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto del anticuerpo dirigido contra C242 humano unido mediante el conector de disulfuro SPP al resto de fármaco maitansinoide, DM1 (Xie et al (2004) J. of Pharm. and Exp. Ther. 308(3):1073-1082), está avanzando en ensayos clínicos para el tratamiento de cánceres que expresan CanAq, tales como colon, pancreático, gástrico y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto del anticuerpo monoclonal anti-antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) unido al resto de fármaco maitansinoide, DM1, está en desarrollo para el posible tratamiento de tumores de próstata.

Los péptidos de auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de dolastatina (documento WO 02/088172), se han conjugado con: (i) anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específicos para Lewis Y en carcinomas); (ii) cAC10 que es específico para CD30 en tumores malignos hematológicos (Klussman, et al (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773; Doronina et al (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784; Francisco et al (2003) Blood 102(4):1458-1465; documento US 2004/0018194; (iii) anticuerpos anti-CD20 tales como RITUXAN® (documento WO 04/032828) para el tratamiento de cánceres que expresan CD20 y trastornos inmunitarios; (iv) anticuerpos anti-EphB2R 2H9 y anti-IL-8 para el tratamiento de cáncer colorrectal (Mao et al (2004) Cancer Research 64(3):781-788); (v) anticuerpo dirigido contra E-selectina (Bhaskar et al (2003) Cancer Res. 63:6387-6394); y (vi) otros anticuerpos anti-CD30 (documento WO 03/043583). Variantes de auristatina E se desvelan en la patente de EE.UU. N.º 5.767.237 y la patente de EE.UU. N.º 6.124.431. Se desvela monometil auristatina E conjugada con anticuerpos monoclonales en Senter et al, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volumen 45, Número de resumen 623, presentado el 28 de marzo de 2004. Los análogos de auristatina MMAE y MMAF se han conjugado con diversos anticuerpos (documento WO 2005/081711).

Medios convencionales de unión, es decir, enlace mediante enlaces covalentes, de un resto de fármaco a un anticuerpo generalmente conducen a una mezcla heterogénea de moléculas donde los restos de fármaco están unidos en varios sitios en el anticuerpo. Por ejemplo, los fármacos citotóxicos se han conjugado normalmente con anticuerpos mediante los restos de lisina o de cisteína frecuentemente numerosos de un anticuerpo, generando una mezcla heterogénea de conjugado de anticuerpo-fármaco. Dependiendo de las condiciones de reacción, la mezcla heterogénea normalmente contiene una distribución de anticuerpos con de 0 a aproximadamente 8, o más, restos de fármaco unidos. Además, dentro de cada subgrupo de conjugados con una relación de números enteros particular de restos de fármaco a anticuerpo, es una mezcla posiblemente heterogénea donde el resto de fármaco está unido en diversos sitios en el anticuerpo. Métodos analíticos y preparativos son inadecuados para separar y caracterizar las moléculas de especies de conjugado de anticuerpo-fármaco dentro de la mezcla heterogénea resultante de una reacción de conjugación. Los anticuerpos son biomoléculas grandes, complejas y estructuralmente diversas,

frecuentemente con muchos grupos funcionales reactivos. Sus reactividades con reactivos conectores y productos intermedios de fármaco-conector dependen de factores tales como el pH, concentración, concentración de sales y co-disolventes. Además, el proceso de conjugación multietapa puede ser no reproducible debido a dificultades en controlar las condiciones de reacción y caracterizar reactantes y productos intermedios.

Los tioles de cisteína son reactivos a pH neutro, a diferencia de la mayoría de las aminas que están protonadas y son menos nucleófilas cerca de pH 7. Como los grupos tiol libres (R-SH, sulfhidrilo) son relativamente reactivos, las proteínas con restos de cisteína frecuentemente existen en su forma oxidada como oligómeros unidos a disulfuro o tienen grupos disulfuro internamente unidos. Las proteínas extracelulares generalmente no tienen tioles libres (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, Londres, en la página 55). La cantidad de tiol libre en una proteína puede estimarse por el ensayo de Ellman convencional. IgM es un ejemplo de un pentámero unido por disulfuro, mientras que IgG es un ejemplo de una proteína con puentes disulfuro internos que unen las subunidades juntas. En proteínas tales como estas, se requiere la reducción de los enlaces disulfuro con un reactivo tal como ditiotreitol (DTT) o selenol (Singh et al (2002) Anal. Biochem. 304:147-156) para generar el tiol libre reactivo. Este enfoque puede producir pérdida de la estructura terciaria del anticuerpo y la especificidad de

Los grupos tiol de cisteína de anticuerpos son generalmente más reactivos, es decir, más nucleófilos, hacia reactivos de conjugación electrófila que los grupos amina o hidroxilo de anticuerpos. Se han introducido restos de cisteína en proteínas por técnicas de ingeniería genética para formar uniones covalentes con ligandos o para formar nuevos enlaces disulfuro intramoleculares (Better et al (1994) J. Biol. Chem. 13:9644-9650; Bernhard et al (1994) Bioconjugate Chem. 5:126-132; Greenwood et al (1994) Therapeutic Immunology 1:247-255; Tu et al (1999) Proc. Natl. Acad. Sci USA 96:4862-4867; Kanno et al (2000) J. of Biotechnology, 76:207-214; Chmura et al (2001) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 98(15):8480-8484; patente de EE.UU. N.º 6.248.564). Sin embargo, el diseño de grupos tiol de cisteína por la mutación de diversos restos de aminoácidos de una proteína a aminoácidos de cisteína es posiblemente problemático, particularmente en el caso de restos no emparejados (Cys libre) o aquellos que están relativamente accesibles para reacción u oxidación. En soluciones concentradas de la proteína, tanto en el periplasma de E. coli, sobrenadantes de cultivo, como proteína parcialmente o completamente purificada, los restos de Cys no emparejados en la superficie de la proteína pueden emparejarse y oxidarse para formar disulfuros intermoleculares y, por lo tanto, dímeros o multímeros de proteína. La formación de dímeros de disulfuro convierte la nueva Cys en no reactiva para la conjugación con un fármaco, ligando, u otra marca. Además, si la proteína forma oxidativamente un enlace disulfuro intramolecular entre la Cys recién manipulada y un resto de Cys existente, ambos grupos Cys no están disponibles para la participación del sitio activo e interacciones. Por tanto, la proteína puede convertirse en inactiva o no específica, por plegamiento erróneo o pérdida de estructura terciaria (Zhang et al (2002) Anal. Biochem. 311:1-9).

Se han intentado intentos previos para manipular los sitios de conjugación en anticuerpos. La patente de EE.UU. N.º 5.219.916 describe la modificación de restos del "bolsillo superficial" tales como Ser 156 o Thr 173 (según Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, 4th ed., US Dept. of Health and Human Services, 1987). En el estudio relacionado, los investigadores determinaron que solo los restos en los "bolsillos de superficie" eran capaces de soportar la sustitución por cisteína en un esfuerzo por manipular un sitio de conjugación (Lyons et al. (1990) Protein Eng. 3:8 pg 703-708).

El documento WO 2006/034488 desvela anticuerpos manipulados sustituyendo uno o más aminoácidos por cisteína 45 para formar fragmentos de anticuerpos manipulados con cisteína (TioFab) que tienen reactividad con tiol. Los aminoácidos están sustituidos en las posiciones, por ejemplo; S119C, A121C, S122C, A144C, A175C. Los anticuerpos manipulados con cisteína pueden conjugarse con fármacos quimioterapéuticos, toxinas, ligandos de afinidad y marcas de detección.

Así, hay una necesidad de desarrollar anticuerpos manipulados con cisteína estables que proporcionen grupos tiol libres capaces de conjugación con diversos agentes.

La citación o discusión de una referencia en el presente documento no debe interpretarse como una admisión de que tal sea estado de la técnica para la presente invención.

3. Sumario de la invención

5

10

15

20

25

30

35

40

55

60

65

unión al antígeno.

La presente invención proporciona anticuerpos que comprenden dominios CH1 modificados de forma que contengan restos de cisteína libres capaces de conjugación con diversos agentes. Los anticuerpos manipulados con cisteína de la invención comprenden uno o más aminoácidos de la región 131-139 de la cadena pesada de un anticuerpo sustituido por uno o más aminoácidos de cisteína que no existen de forma natural, por lo que el aminoácido de cisteína sustituido proporciona un grupo tiol libre capaz de conjugación. En una realización, los anticuerpos manipulados con cisteína de la invención comprenden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más aminoácidos de cisteína sustituidos. En otra realización, la región 131-139 del dominio CH1 del anticuerpo comprende sustituciones de restos de serina o treonina por cisteína.

Los anticuerpos manipulados con cisteína de la invención pueden comprender un enlace disulfuro que no existen de forma natural que conecta el dominio CH1 modificado con otra cadena de anticuerpo. En una realización, los anticuerpos manipulados con cisteína de la invención comprenden uno o más grupos tiol libres que se forman como resultado de la formación del enlace disulfuro que no existen de forma natural que conecta el dominio CH1 modificado con otra cadena de anticuerpo.

Otro aspecto de la invención proporciona ácidos nucleicos, vectores y células huésped para la generación de anticuerpos manipulados con cisteína.

- Otro aspecto de la invención proporciona conjugados de anticuerpo y métodos de preparación de tales conjugados que comprenden los anticuerpos manipulados con cisteína de la invención acoplados a un fármaco donde el fármaco puede ser un agente citotóxico, agente quimioterapéutico, péptido, peptidomimético, armazón de proteína, enzima, toxina, radionúclido, ADN, ARN, ARNip, microARN, ácido péptidonucleico, marca fluorescente o biotina.
- Otro aspecto de la invención proporciona anticuerpos que son capaces de ser internalizados cuando se unen a receptores de la superficie celular. En tales aspectos, los anticuerpos de la invención son útiles para la administración citoplásmica de moléculas y/o agentes de carga.
- Otro aspecto de la invención proporciona métodos de tratamiento, detección y diagnóstico de cáncer, enfermedades autoinmunitarias, inflamatorias o infecciosas con los conjugados de anticuerpo de la invención.

4. Breve descripción de las figuras

5

25

45

50

55

- La FIGURA 1A es una representación esquemática de la estructura de IgG. Se muestra en negro oscuro la región del resto 131 al resto 139 del dominio CH1 que se mutagenizó. El recuadro muestra una vista ampliada de la región IgG del resto 131 al resto 139 del dominio CH1.
- La FIGURA 1B es una representación de la estrategia de manipulación con cisteína para la posición 131 empleada para crear un tiol libre en un anticuerpo capaz de conjugación. Específicamente, se presentan la cadena ligera kappa y la cadena pesada de un anticuerpo específico para EphB4, 1C6, con los restos de cisteína representados en fuente negrita. Además, los enlaces disulfuro relativos que existen de forma natural en un formato de anticuerpo IgG1 se presentan como líneas continuas. La manipulación específica de la posición 131 de serina a cisteína (representada en la figura como negrita y subrayada) representa un posible enlace disulfuro intercatenario que se formaría sustituyendo el enlace disulfuro intercatenario canónico que conecta la cisteína del extremo carboxi de la cadena ligera con la cisteína 220 de la cadena pesada. Se presentan los posibles enlaces disulfuro que pueden formarse con la inclusión de 131Cys (líneas discontinuas). Los enlaces disulfuro como se presentan en el presente documento se confirmaron por resultados experimentales.
- La FIGURA 1C es un alineamiento de dominios CH1 de diversos formatos de anticuerpo que delinean la región equivalente que contiene restos de serina o treonina candidatos para la manipulación de cisteína. La región recuadrada representa la región equivalente del dominio CH1 de IgG1 en los otros formatos de anticuerpo.
 - La FIGURA 2A es un gel de PAGE teñido con Coomassie que documenta la expresión y purificación de anticuerpos ejecutados bajo condiciones no reductoras (recuadro i) y reductoras (recuadro ii). Los anticuerpos presentados en este panel incluyen 1C1 (carril 1) y diversos anticuerpos manipulados con cisteína derivados de 1C1 (carriles 2-15). Los anticuerpos se cargaron a una concentración de 2 µg/pocillo.
 - La FIGURA 2B es una comparación de mapeos de péptidos no reductores de IgG1 wt y Ser131 a Cys mutante. 1C1 es un anticuerpo específico para EphA2 de la subclase IgG1. El recuadro A es el anticuerpo 1C1 WT que mostró el enlace de unión de disulfuro regular entre la región bisagra de la cadena pesada y el extremo C de la cadena ligera (H11-L15) y el péptido que contiene Ser131 (H5). El recuadro B es 1C1 Ser131Cys mutante que mostró la disminución del enlace disulfuro regular entre la cadena ligera y pesada (H11-L15) y el péptido de 1C1 wt H5, y la aparición de nuevos enlaces de unión disulfuro formados entre cisteína mutada con el extremo C de la cadena ligera (H5m-L15) y con la región bisagra (H5m-H11). Solo se observaron cantidades traza de cisteína libre para Cys131 mutada.
 - La FIGURA 3 representa los resultados de un análisis de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) realizado en anticuerpos 1C6 WT (A) y 1C6 Ser131Cys (B) purificados. Los anticuerpos se expresaron y purificaron y se sometieron a cromatografía SEC. El trazado de puntos representa un conjunto de marcadores de peso molecular definidos usados para establecer el peso molecular aparente de los anticuerpos. Como se demuestra en (A), el anticuerpo 1C6 WT eluye de la columna de SEC con un peso molecular correspondiente a un anticuerpo monomérico. El análisis de SEC del anticuerpo 1C6 manipulado con cisteína (B) demuestra que este anticuerpo también existe en forma monomérica, similar al anticuerpo no mutante.
- La FIGURA 4 representa los resultados de un análisis de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) realizado en anticuerpos purificados, concretamente 1C1 WT (A), 1C1 Ser134Cys (B), 1C1 Ser132Cys (C) y 1C1 Ser131-

132-134-136Cys (D). El trazado de puntos representa un conjunto de marcadores de peso molecular definidos usados para establecer el peso molecular aparente de los anticuerpos. Como se demuestra en (A), el anticuerpo 1C1 WT eluye de la columna de SEC con un peso molecular correspondiente a un anticuerpo monomérico. El análisis de SEC de los anticuerpos manipulados con cisteína 1C1 Ser134Cys (B), 1C1 Ser132Cys (C) y 1C1 Ser131-132-134-136Cys (D) demostró que estos anticuerpos también existen en forma monomérica, similar al anticuerpo no mutante.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

La FIGURA 5 representa los resultados de un ensayo de unión al antígeno basado en ELISA realizado en anticuerpos purificados, concretamente 1C6 WT y 1C6 Ser131Cys. Estos anticuerpos reconocen específicamente el receptor de EphB4. Como se demuestra en la figura, el perfil de afinidad de unión medido en un formato de ELISA del anticuerpo WT y el anticuerpo Ser131Cys manipulado con cisteína son muy similares.

La FIGURA 6 representa los resultados de un ensayo de unión al antígeno basado en ELISA realizado en anticuerpos purificados, concretamente 1C1 WT y 1C1 Ser131Cys. Estos anticuerpos reconocen específicamente el receptor de EphA2. Como se demuestra en la figura, el perfil de afinidad de unión medido en un formato de ELISA del anticuerpo WT y el anticuerpo Ser131Cys manipulado con cisteína son muy similares. Además, la inclusión de DTT 1 mM no tuvo un efecto medible sobre el perfil de unión.

La FIGURA 7 representa termogramas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) del anticuerpo 1C6 WT (A) y el anticuerpo 1C6 Ser131Cys (B). Ambos anticuerpos presentan temperaturas de fusión (Tm) muy similares de 70 °C y 69 °C, respectivamente.

La FIGURA 8 representa termogramas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de los anticuerpos 1C1 WT (A), 1C1 Ser131Cys (B), 1C1 Ser134Cys (C), 1C1 Ser(131-132)Cys (D) y 1C1 Ser(131-132-134-136)Cys. Todos los anticuerpos presentan una temperatura de fusión (Tm) muy similar.

La FIGURA 9 representa los resultados de un estudio de conjugación con biotina del anticuerpo 1C6 (WT) y el anticuerpo 1C6 Ser131Cys (Mut) bajo diversas condiciones. En el panel A, los anticuerpos 1C6 y 1C6 Ser131Cys se sometieron a una reacción de conjugación con EZ-Link Biotin-HPDP (Pierce) a diversas temperaturas (4 °C, 37 °C, 45 °C y 55 °C). Se midió y representó la eficiencia de conjugación con biotina resultante. El anticuerpo 1C6 Ser131Cys presenta una eficiencia más alta de conjugación con biotina específica de sitio que el anticuerpo 1C6. En el panel B, los anticuerpos 1C6 y 1C6 Ser131Cys se sometieron a una reacción de conjugación con EZ-Link iodoacetyl-PEO2 Biotin a diversas temperaturas (4 °C, 37 °C, 45 °C y 55 °C). Se midió y representó la eficiencia de conjugación con biotina específica de sitio resultante. El anticuerpo 1C6 Ser131Cys presenta una eficiencia más alta de conjugación con biotina específica de sitio que el anticuerpo 1C6.

La FIGURA 10 representa los resultados de un ensayo BIACORE® que mide las afinidades relativas para los anticuerpos 1C1 WT y 1C1 Ser131Cys para diversos receptores de Fcγ. Los diversos receptores de Fcγ estudiados fueron FcγRI (A), FcγRIIA (B), FcγRIIA (C), FcγRIIB (D). Los anticuerpos 1C1 WT y 1C1 Ser131Cys presentan afinidades de unión muy similares para diversos receptores de Fcγ.

La FIGURA 11 representa los resultados de un ensayo BIACORE® que mide las afinidades relativas para los anticuerpos 1C1 WT y 1C1 Ser131Cys para el receptor FcRn a pH 6,0 y pH 7,4. El anticuerpo 1C1 Ser131Cys se une al receptor FcRn con un perfil de unión similar al anticuerpo 1C1 WT a tanto pH 6,0 como pH 7,4.

La FIGURA 12 representa los resultados de un estudio de internalización de anticuerpos realizado en células PC3. Se presenta un conjunto de controles en el primer panel. En (A) células no teñidas se contratiñen con DAPI. En (B) células teñidas con anticuerpo secundario solo se contratiñen con DAPI. En (C) un anticuerpo primario de control, R347, se incuba con las células, además de la contratinción con DAPI. En (D) las células se incuban durante una hora y posteriormente se tiñen con R347. Ninguno de los controles (A-D) presenta ninguna tinción de células específicas de anticuerpo. En (E) las células se incuban con el anticuerpo 1C1 wt a tiempo cero y durante una hora. Dos imágenes representativas en una hora indican internalización del anticuerpo1C1 WT. En (F) las células se incuban con el anticuerpo 1C1 Ser131Cys a tiempo cero y durante una hora. Dos imágenes representativas en una hora indican la internalización del anticuerpo 1C1 Ser131Cys. En (G) las células se incuban con el anticuerpo 1C1 Ser134Cys a tiempo cero y durante una hora. Dos imágenes representativas en una hora indican la internalización del anticuerpo 1C1 Ser134Cys. En (H) las células se incuban con el anticuerpo 1C1 Ser(131-132)Cys a tiempo cero y durante una hora. Dos imágenes representativas en una hora indican la internalización del anticuerpo 1C1 Ser(131-132)Cys. En (I) las células se incuban con el anticuerpo 1C1 Ser(131-132-134-136)Cys a tiempo cero y durante una hora. Dos imágenes representativas en una hora indican la internalización del anticuerpo 1C1 Ser(131-132-134-136)Cys. Todos los anticuerpos manipulados con cisteína se internalizaron a un grado similar en comparación con el anticuerpo no mutante.

La FIGURA 13 representa los resultados de un experimento de especificidad de unión en el que los anticuerpos manipulados con cisteína presentaron una especificidad de unión equivalente por EphA2 en comparación con 1C1 no mutante antes de la manipulación con cisteína. El uso de 2 anticuerpos sin relacionar (Anticuerpo de control 1 y 2) confirma la especificidad de este experimento de ELISA por EphA2. Por tanto, sustituciones

múltiples de restos de cisteína no alteran la especificidad de unión del anticuerpo por su antígeno relacionado. Estos resultados demuestran que la manipulación con cisteína de anticuerpos no altera las especificidades de unión en comparación con el anticuerpo antes de la manipulación con cisteína.

La FIGURA 14 representa los resultados de una reacción de conjugación con PRG usando diversos anticuerpos manipulados con cisteína antes (carriles 1-8) o después (carriles 9-16) del tratamiento con cisteína libre. Los carriles de tratamiento no con cisteína demuestran un nivel reducido de PEGilación (banda de peso molecular más alto) en comparación con un tratamiento de los anticuerpos manipulados con cisteína con cisteína libre 10 mM. Los pocillos de control que contienen anticuerpos antes de la manipulación con cisteína no presentan nivel detectable de pegilación en ninguna condición (carriles 1, 5, 9 y 13). La reacción de pegilación se realizó durante 120 minutos a 37 °C. Las muestras se ejecutaron en un gel al 10 % de NuPage MOP.

La FIGURA 15 representa los resultados de un experimento en el que anticuerpos manipulados con cisteína se sometieron a una reacción de desprotección. La reacción de desprotección libera la cisteína manipulada para la conjugación sin alterara la estructura global del anticuerpo. Los anticuerpos 1C1 (no mutante) (carriles 2, 8), 1C1 Ser134Cys (carriles 3, 9), 1C1Thr135Cys (carriles 4, 10), 1C1Ser136Cys (carriles 5, 11), 1C1Thr139Cys (carriles 6, 12) se sometieron a la reacción de desprotección y se analizaron por PAGE no reductora. Los perfiles de proteína presentados demuestran que la reacción de desprotección no desestabiliza la estructura global del anticuerpo (carriles 8-12) en comparación con los anticuerpos antes de la reacción de desprotección (carriles 2-6).

La FIGURA 16 representa los resultados de un experimento en el que diversos anticuerpos manipulados con cisteína se conjugaron con biotina. Brevemente, los anticuerpos manipulados con cisteína y los controles se sometieron a una reacción de desprotección y luego se pusieron en una reacción de conjugación con maleimida-PEG2-biotina. El conjugante sin reaccionar se eliminó posteriormente. El control positivo presenta una fuerte tinción de biotina por análisis de transferencia Western (Carril 1). El anticuerpo 1C1 de control no presentó biotina conjugada detectable (Carril 3). Los anticuerpos manipulados con cisteína 1C1 Ser134Cys (carril 4), 1C1 Phr135Cys (carril 5), 1C1 Ser136Cys (carril 6) y 1C1Thr139Cys (carril 7) muestran una fuerte tinción para biotina conjugada. Por tanto, es evidente de la figura que la cadena ligera de los anticuerpos manipulados con cisteína no presenta ninguna conjugación con biotina. La banda más baja del anticuerpo de control (Carril 1) demuestra un alto nivel de tinción mientras que las bandas más bajas de los anticuerpos manipulados con cisteína y homólogo wt no presentan ninguna tinción significativa en la banda más baja (cadena ligera) (Carriles 3-7).

La FIGURA 17 representa los resultados de un experimento que demuestra que los anticuerpos manipulados con cisteína retienen la especificidad de unión por sus antígenos relacionados después de la conjugación con un agente heterólogo. En este experimento, los anticuerpos manipulados con cisteína conjugados con biotina se analizaron para la retención de especificidad de unión a antígeno en comparación con los anticuerpos parentales antes de la manipulación con cisteína. El ensayo basado en ELISA demuestra que los anticuerpos manipulados con cisteína conjugados 1C1 Ser1 34Cys, 1C1 Thr135Cys, 1C1 Ser136Cys y 1C1 Thr139Cys presentan un perfil de unión muy similar con el antígeno EphA2 relacionado como el anticuerpo de origen antes de la manipulación con cisteína y conjugación.

5. Descripción detallada

15

20

25

30

35

40

60

65

La invención se basa en el hallazgo de que los restos presentes en la superficie del dominio CH1 de anticuerpos (véase la FIGURA 1A) son adecuados para la sustitución por cisteína en un esfuerzo por manipular un sitio capaz de conjugación con diversos agentes.

Los compuestos de la invención incluyen anticuerpos manipulados con cisteína donde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más aminoácidos de la región 131-139 del dominio CH1 en los que el sistema de numeración de la región constante es la del índice EU como se expone en Kabat et al. (1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, VA) de un anticuerpo de origen o no mutante están sustituidos con un aminoácido de cisteína. Debe observarse que una única sustitución por un resto de cisteína produce la presentación de dos restos de cisteína en el anticuerpo resultante debido a la naturaleza dimérica de las moléculas de IgG. Los anticuerpos manipulados con cisteína resultantes de la invención pueden presentar al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o más tioles libres con el fin de conjugación con un fármaco o compuesto.

En algunas realizaciones, los anticuerpos manipulados con cisteína de la invención comprenden una sustitución de serina a cisteína. En otras realizaciones, los anticuerpos manipulados con cisteína de la invención comprenden una sustitución de treonina a cisteína. En algunas realizaciones, los anticuerpos manipulados con cisteína de la invención comprenden tanto una sustitución de serina como una de treonina a cisteína.

En algunas realizaciones, los anticuerpos manipulados con cisteína de la invención comprenden al menos una sustitución en las posiciones seleccionadas de: 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138 y 139 del dominio CH1 de un anticuerpo, en los que el sistema de numeración de la región constante es la del índice EU como se expone en Kabat et al. (arriba). En otras realizaciones, los anticuerpos manipulados con cisteína de la invención comprenden al

menos dos sustituciones seleccionadas de las posiciones 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138 y 139 del dominio CH1 de un anticuerpo. En otras realizaciones, los anticuerpos manipulados con cisteína de la invención comprenden al menos tres sustituciones seleccionadas de las posiciones 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138 y 139 del dominio CH1 de un anticuerpo. En otras realizaciones, los anticuerpos manipulados con cisteína de la invención comprenden al menos cuatro sustituciones seleccionadas de las posiciones 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138 y 139 del dominio CH1 de un anticuerpo. En otras realizaciones, los anticuerpos manipulados con cisteína de la invención comprenden al menos cinco sustituciones seleccionadas de las posiciones 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138 y 139 del dominio CH1 de un anticuerpo. En otras realizaciones, los anticuerpos manipulados con cisteína de la invención comprenden al menos seis sustituciones seleccionadas de las posiciones 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138 y 139 del dominio CH1 de un anticuerpo. En otras realizaciones, los anticuerpos manipulados con cisteína de la invención comprenden al menos siete sustituciones seleccionadas de las posiciones 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138 y 139 del dominio CH1 de un anticuerpo. En otras realizaciones, los anticuerpos manipulados con cisteína de la invención comprenden al menos ocho sustituciones seleccionadas de las posiciones 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138 y 139 del dominio CH1 de un anticuerpo. En otras realizaciones, los anticuerpos manipulados con cisteína de la invención comprenden sustituciones de las posiciones 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138 y 139 del dominio CH1 de un anticuerpo.

10

15

20

25

30

35

40

45

55

60

65

En algunas realizaciones, los anticuerpos manipulados con cisteína de la invención no comprenden una sustitución en las posiciones 132 y/o 138. En otras realizaciones, los anticuerpos manipulados con cisteína de la invención comprende sustituciones en solos los aminoácidos treonina y/o serina que existen de forma natural en la región 131 a 139 del dominio CH1 de una molécula de IgG1, o equivalentes de la misma.

En una realización, los anticuerpos manipulados con cisteína de la invención incluyen una IgG1 que tiene una serina y/o una treonina sustituida con una cisteína en una posición seleccionada del grupo que consiste en: 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138 y 139. En otras realizaciones, los anticuerpos manipulados con cisteína de la invención se derivan de un formato de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En todavía otras realizaciones, los anticuerpos manipulados con cisteína de la invención se derivan de formatos no de IgG tales como IgA1, IgA2 IgM, IgD o IgE. En otras realizaciones, los anticuerpos de la invención comprenden la manipulación con cisteína de restos correspondientes a la región 131-139 de la región CH1 de IgG1. En otra realización, los anticuerpos de la invención comprenden la manipulación con cisteína de los restos delineados en los diversos formatos de anticuerpo presentados en la Figura 1C. En todavía otras realizaciones, los anticuerpos de la invención comprenden fragmentos de anticuerpos que incluyen, pero no se limitan a, formatos de moléculas de Fab y Fab2.

La región 131-139 del dominio CH1 de la molécula de IgG1 se expone a disolvente como se ilustra en la Figura 1A. Como tal, se prevé que el bucle 131-139 pueda expandirse (en otras palabras, inclusión de aminoácidos adicionales) para facilitar una superficie para la conjugación específica de sitio de diversos agentes. En algunas realizaciones, el bucle 131-139 del dominio CH1 de los anticuerpos de la invención se expande al menos 1, al menos 2. al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15 aminoácidos. En algunas realizaciones, una expansión del bucle 131-139 del dominio CH1 de anticuerpos de la invención se produce después del resto 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138 y 139.

En otras realizaciones, una expansión del bucle 131-139 de un dominio CH1 de una molécula de IgG1 puede comprender cualquier aminoácido, en otras realizaciones, dicha expansión comprende al menos un aminoácido de cisteína que no existe de forma natural. En otras realizaciones, dicha expansión comprende restos de treonina y/o serina. En otras realizaciones, dicha expansión también se acopla con la sustitución de restos de cisteína que existen de forma natural por restos no de cisteína.

50 En otra realización, los anticuerpos manipulados con cisteína comprenden la formación de al menos un enlace disulfuro que no existe de forma natural. El enlace disulfuro que no existen de forma natural puede ser enlace intracatenario o intercatenario. El enlace disulfuro que no existen de forma natural puede conectar juntas dos moléculas de anticuerpo separadas. La formación de un enlace disulfuro que no existe de forma natural puede liberar al menos un grupo tiol libre previamente unido a otro resto de cisteína.

La manipulación de restos de cisteína para presentar grupos tiol libres puede conducir a una mezcla de especies de anticuerpos, que presentan un grado de variabilidad de posiciones de enlaces disulfuro. Por ejemplo, el enlace disulfuro "canónico" que existe de forma natural (ilustrado en la Figura 1 B) puede solo representarse en algunos de los anticuerpos presentes en una muestra, se entiende que la manipulación de otras cisteínas que no existen de forma natural puede conducir a la formación de enlaces disulfuro distintos del enlace disulfuro "canónico". En algunas realizaciones, se forma un enlace disulfuro entre la cadena ligera y cualquier resto de cisteína que no existe de forma natural presente en la región 131-139 de la cadena pesada. En otras realizaciones, se forma un enlace disulfuro entre la cadena ligera y cualquier resto de cisteína que no existe de forma natural presente en la posición 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138 y/o 139 de la cadena pesada.

En un esfuerzo por limitar la variabilidad de posiciones de disulfuro presentes en anticuerpos en una muestra, los

anticuerpos manipulados con cisteína pueden comprender sustituciones compensatorias de restos de cisteína que existen de forma natural con otro resto, para eliminar un enlace disulfuro, en una realización específica, los anticuerpos manipulados con cisteína de la invención comprenden la sustitución de un resto de cisteína que existe de forma natural, tal como la cisteína que se encuentra en la posición 220 de la cadena pesada, con otro resto de aminoácido para eliminar un enlace disulfuro.

La formación de al menos un enlace disulfuro que no existen de forma natural puede influir en la estabilidad del anticuerpo modificado con cisteína de la invención en comparación con el anticuerpo antes de la modificación. En algunas realizaciones, el enlace disulfuro que no existe de forma natural puede aumentar la estabilidad del anticuerpo modificado con cisteína en comparación con el mismo anticuerpo antes de la manipulación con cisteína. En otras realizaciones, el enlace disulfuro que no existe de forma natural puede disminuir la estabilidad del anticuerpo modificado con cisteína en comparación con el mismo anticuerpo antes de la manipulación con cisteína.

Los anticuerpos manipulados con cisteína de la invención retienen la capacidad de unión al antígeno de su homólogo no mutante. En una realización, los anticuerpos manipulados con cisteína de la invención presentan esencialmente la misma afinidad en comparación con un anticuerpo antes de la manipulación con cisteína. En otra realización, los anticuerpos manipulados con cisteína de la invención presentan una afinidad reducida en comparación con un anticuerpo antes de la manipulación con cisteína. En otra realización, los anticuerpos manipulados con cisteína de la invención presentan una afinidad potenciada en comparación con un anticuerpo antes de la manipulación con cisteína.

Los anticuerpos de la invención pueden tener una alta afinidad de unión a uno o más de sus antígenos relacionados. Por ejemplo, un anticuerpo descrito en el presente documento pueden tener una constante de velocidad de asociación o velocidad kas (anticuerpo (Ab) + antígeno->Ab-Ag) de al menos 2 X 10⁵ M⁻¹s⁻¹, al menos 5 X 10⁵ M⁻¹s⁻¹, al menos 5 X 10⁶ M⁻¹s⁻¹.

En otra realización, un anticuerpo puede tener una velocidad k_{dis} (Ab-Ag -> Ab + Ag) inferior a $5x10^{-1}$ s⁻¹, inferior a 10^{-1} s⁻¹, inferior a 10^{-2} s⁻¹, inferior a 10^{-2} s⁻¹, inferior a 10^{-3} s⁻¹, inferior a 10^{-3} s⁻¹, inferior a 10^{-3} s⁻¹, inferior a 10^{-4} s⁻¹. En otra realización, un anticuerpo de la invención tiene una k_{dis} inferior a $5x10^{-5}$ s⁻¹, inferior a 10^{-5} s⁻¹, inferior a 10^{-6} s⁻¹, inferior a 10^{-6} s⁻¹, inferior a 10^{-6} s⁻¹, inferior a 10^{-9} s⁻¹, inferior a 10^{-9} s⁻¹, inferior a 10^{-9} s⁻¹, o inferior a 10^{-10} s⁻¹.

En otra realización, un anticuerpo puede tener una constante de afinidad o K_a (k_{as}/k_{dis}) 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 10^4 M $^{-1}$, al menos 10^5 M $^{-1}$, al menos 10^5 M $^{-1}$, al menos 10^6 M $^{-1}$, al menos 10^6 M $^{-1}$, al menos 10^8 M $^{-1}$, al menos 10^{10} M $^{-1}$,

Un anticuerpo usado según un método descrito en el presente documento puede tener una constante de disociación (K_d) inferior a 3000 pM, inferior a 2500 pM, inferior a 2000 pM, inferior a 1500 pM, inferior a 1000 pM, inferior a 750 pM, inferior a 500 pM, inferior a 250 pM, inferior a 200 pM, inferior a 150 pM, inferior a 100 pM, inferior a 75 pM como se evalúa usando un método descrito en el presente documento o conocido para un experto en la materia (por ejemplo, un ensayo BIAcore, ELISA) (Biacore International AB, Uppsala, Suecia).

Modulación de la región Fc

10

15

20

25

30

35

40

45

- La invención también proporciona anticuerpos manipulados con cisteína con regiones Fc alteradas (también denominadas en el presente documento "variantes de la región Fc"). Por consiguiente, en una realización, los anticuerpos de la invención comprenden una variante de la región Fc (es decir, regiones Fc que han sido alteradas como se trata más adelante). Los anticuerpos de la invención que comprenden una variante de la región Fc también se denominan aquí "proteína(s) de variante de Fc".
- 60 En la descripción de variantes de la región Fc, se entiende que las regiones Fc de los anticuerpos de la invención comprenden el esquema de numeración según el índice EU como en Kabat et al. (1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, VA).
- Se sabe que las variantes de la región Fc (por ejemplo, sustituciones y/o adiciones y/o deleciones de aminoácidos) potencian o disminuyen la función efectora (véase Presta et al., 2002, Biochem Soc Trans 30:487-490; patentes de EE.UU. 5.624.821, 5.885.573 y publicaciones PCT N.º WO 00/42072, WO 99/58572 y WO 04/029207). Por

consiguiente, en una realización, los anticuerpos de la invención comprenden variantes de la región Fc. En una realización, las variantes de la región Fc de anticuerpos presentan un nivel similar de inducción de la función efectora en comparación con Fc nativa. En otra realización, la variante de la región Fc presenta una inducción más alta de la función efectora en comparación con la Fc nativa. En otra realización, la variante de la región Fc presenta inducción más baja de función efectora en comparación con la Fc nativa. En otra realización, la variante de la región Fc presenta inducción más alta de ADCC en comparación con la Fc nativa. En otra realización, la variante de la región Fc presenta inducción más baja de ADCC en comparación con la Fc nativa. En otra realización, la variante de la región Fc presenta inducción más alta de CDC en comparación con la Fc nativa. En otra realización, la variante de la región Fc presenta inducción más baja de CDC en comparación con la Fc nativa. Realizaciones específicas de variantes de la región Fc se detallan más adelante.

5

10

15

30

35

También se conoce en la técnica que la glucosilación de la región Fc puede modificarse para aumentar o disminuir la función efectora (véanse, por ejemplo, Umana 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) patente de EE.UU. N.º 6.602.684; N.º de serie U.S. 10/277.370; N.º de serie U.S. 10/113.929; PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/292246A1; PCT WO 02/311140A1; PCT WO 02/30954A1; tecnología Potillegent™ (Biowa, Inc. Princeton, N.J.); tecnología de manipulación por glucosilación GlycoMAb™ (GLYCART Biotechnology AG, Zurich, Suiza).

Por consiguiente, en una realización, las regiones Fc de anticuerpos de la invención comprenden glucosilación alterada de restos de aminoácidos. En otra realización, la glucosilación alterada de los restos de aminoácidos produce función efectora reducida. En otra realización, la glucosilación alterada de los restos de aminoácidos produce función efectora aumentada. En una realización específica, la región Fc tiene fucosilación reducida. En otra realización, la región Fc está afucosilada (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2005/0226867).

Investigación reciente sugiere que la adición de ácido siálico a los oligosacáridos en moléculas de IgG potencia su actividad antiinflamatoria y altera su citotoxicidad (Keneko et al., Science 313, 670-673(2006), Scallon et al., Mol. Immuno. 2007 Mar;44(7):1524-34). Así, la eficacia de anticuerpos terapéuticos puede optimizarse por selección de una glucoforma que es la más adecuada para la aplicación prevista. Las dos cadenas de oligosacárido interpuestas entre los dos dominios CH2 de anticuerpos participan en la unión de la región Fc a sus receptores. Los estudios citados anteriormente demuestran que moléculas de IgG con elevada sialilación tienen propiedades antiinflamatorias, mientras que las moléculas de IgG con sialilación reducida tienen elevadas propiedades inmunoestimulantes. Por tanto, un anticuerpo terapéutico puede "hacerse a medida" con un perfil de sialilación apropiado para una aplicación particular. Métodos de modulación del estado de sialilación de anticuerpos se presentan en los documentos WO2007/005786 titulado "Methods And Compositions With Enhanced Therapeutic Activity" y WO2007/117505 titulado "Polypeptides With Enhanced Anti-Inflammatory And Decreased Cytotoxic Properties And Related Methods".

40 En una realización, las regiones Fc de anticuerpos de la invención comprenden un perfil de sialilación alterado en comparación con una región Fc no alterada de referencia. En una realización, las regiones Fc de anticuerpos de la invención comprenden un elevado perfil de sialilación en comparación con una región Fc no alterada de referencia. En algunas realizaciones, las regiones Fc de anticuerpos de la invención comprenden un aumento en la sialilación de aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 20 %, 45 aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 35 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 45 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 100 %, aproximadamente el 125 %, aproximadamente el 150 % o más en comparación con una región Fc no alterada de referencia. En algunas realizaciones, las regiones Fc de anticuerpos de la invención comprenden un aumento en la sialilación de aproximadamente 2 veces, 50 aproximadamente 3 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10 veces, aproximadamente 20 veces, aproximadamente 50 veces o más en comparación con una región Fc de referencia no

En otra realización, las regiones Fc de anticuerpos de la invención comprenden un perfil de sialilación reducido en comparación con una región Fc no alterada de referencia. En algunas realizaciones, las regiones Fc de anticuerpos de la invención comprenden una disminución en la sialilación de aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 35 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 45 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 100 %, aproximadamente el 125 %, aproximadamente el 150 % o más en comparación con una región Fc no alterada de referencia. En algunas realizaciones, las regiones Fc de anticuerpos de la invención comprenden una disminución en la sialilación de aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 20 veces, aproximadamente 50 veces o más en comparación con una región Fc de referencia no alterada.

También se conoce en la técnica que la región Fc puede modificarse para aumentar las semividas de proteínas. El aumento en la semivida permite la reducción en la cantidad de fármaco administrada a un paciente, además de reducir la frecuencia de administración. Por consiguiente, los anticuerpos de la invención con semividas elevadas pueden generarse modificando (por ejemplo, sustituyendo, delecionando o añadiendo) restos de aminoácidos identificado como implicados en la interacción entre Fc y el receptor FcRn (véanse, por ejemplos, las publicaciones PCT N.º 97/34631 y 02/060919 e). Además, la semivida de los anticuerpos de la invención puede aumentarse por conjugación con PEG o albúmina por técnicas ampliamente utilizadas en la materia. En algunas realizaciones, las regiones Fc de los anticuerpos de la invención comprenden un aumento en la semivida de aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 35 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 45 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 100 %, aproximadamente el 125 %, aproximadamente el 150 % o más en comparación con una región Fc no alterada de referencia. En algunas realizaciones, las regiones Fc de anticuerpos de la invención 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 una región Fc de referencia no alterada.

5

10

15

35

40

45

50

55

60

65

En una realización alternativa, las regiones Fc de los anticuerpos de la invención comprenden una disminución en la semivida. En algunas realizaciones, las regiones Fc de los anticuerpos de la invención comprenden una disminución en la semivida de aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 35 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 45 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 100 %, aproximadamente el 125 %, aproximadamente el 150 % o más en comparación con una región Fc no alterada de referencia. En algunas realizaciones, las regiones Fc de los anticuerpos de la invención 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 una región Fc de referencia no alterada.

La presente invención engloba proteínas de variantes de Fc que tienen propiedades de unión alteradas para un ligando de Fc (por ejemplo, un receptor de Fc, C1q) con respecto a una molécula comparable (por ejemplo, una proteína que tiene la misma secuencia de aminoácidos, excepto que tiene una región Fc no mutante). Ejemplos de propiedades de unión incluyen, pero no se limitan a, especificidad de unión, constante de disociación en equilibrio (K_D), velocidades de disociación y asociación (k_{dis} y k_{as}, respectivamente), afinidad de unión y/o avidez. Generalmente se entiende que una molécula de unión (por ejemplo, una proteína de variantes de 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_{as} o k_{dis} puede ser más relevante que el valor de K_D. Un experto en la materia puede determinar qué parámetro cinético es el más importante para una aplicación de anticuerpo dada.

Las afinidades y propiedades de unión de una región Fc por su ligando pueden determinarse mediante una variedad de métodos de ensayo *in vitro* (ensayos bioquímicos o basados en inmunología) conocidos en la técnica para determinar interacciones Fc-FcγR, es decir, unión específica de una región Fc con un FcγR que incluye, pero no se limita a, métodos de equilibrio (por ejemplo, enzimoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) o radioinmunoensayo (RIA)), o cinética (por ejemplo, análisis BIACORE®), y otros métodos tales como ensayos de unión indirecta, ensayos de inhibición competitiva, transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), electroforesis en gel y cromatografía (por ejemplo, filtración en gel). Estos y otros métodos pueden utilizar una marca en uno o más de los componentes que se examinan y/o emplear una variedad de métodos de detección que incluyen, pero no se limitan a, marcas cromogénicas, fluorescentes, luminiscentes o isotópicas. Una descripción detallada de las afinidades de unión y cinética puede encontrarse en Paul, W.E., ed., Fundamental Immunology, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999), que se basa en las interacciones anticuerpo-inmunogén.

En una realización, la proteína de variantes de Fc tiene unión potenciada a uno o más ligandos de Fc con respecto a una molécula comparable. En otra realización, la proteína de variantes de Fc tiene una afinidad por un ligando de 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 superior a la de una molécula comparable. En una realización específica, la proteína de variantes de Fc tiene unión potenciada a un receptor de Fc. En otra realización específica, la proteína de variantes de Fc tiene unión potenciada al receptor de Fc FcγRIIB. En otra realización específica adicional, la proteína de variantes de Fc tiene unión potenciada al receptor de Fc FcRn. En otra realización específica más, la proteína de variantes de Fc tiene unión potenciada al receptor de Fc FcRn. En otra realización específica más, la proteína de variantes de Fc tiene unión potenciada a C1q con respecto a una molécula comparable.

Puede ensayarse la capacidad de cualquier proteína de variantes de Fc particular para mediar en la lisis de la célula

diana por ADCC. Para evaluar la actividad de ADCC, se añade una proteína de variantes de Fc de interés a células diana en combinación con células efectoras inmunitarias, que pueden activarse por los complejos de antígeno-anticuerpo produciendo la citólisis de la célula diana. La citólisis se detecta generalmente por la liberación de marca (por ejemplo, sustratos radiactivos, colorantes fluorescentes o proteínas intracelulares naturales) de las células lisadas. Células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y linfocitos citolíticos espontáneos (NK). Ejemplos específicos de ensayos ADCC *in vitro* se describen en Wisecarver et al., 1985 79:277-282; 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 de ADCC de la proteína de variantes de Fc de interés también puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como aquél desvelado en Clynes et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:652-656.

10

15

30

35

40

45

50

55

En una realización, una proteína de variantes de Fc tiene actividad de ADCC potenciada con respecto a una molécula comparable. En una realización específica, una proteína de variantes de Fc tiene actividad de 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 superior a la de una molécula comparable. En otra realización específica, una proteína de variantes de Fc tiene unión potenciada al receptor de Fc FcyRIIIA y tiene actividad de ADCC potenciada con respecto a una molécula comparable. En otras realizaciones, la proteína de variantes de Fc tiene tanto actividad de ADCC potenciada como semivida en suero potenciada con respecto a una molécula comparable.

En una realización, una proteína de variantes de Fc tiene actividad de ADCC reducida con respecto a una molécula comparable. En una realización específica, una proteína de variantes de Fc tiene actividad de 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 inferior a la de una molécula comparable. En otra realización específica, una proteína de variantes de Fc tiene unión reducida al receptor de Fc FcyRIIIA y tiene actividad de ADCC reducida con respecto a una molécula comparable. En otras realizaciones, la proteína de variantes de Fc tiene tanto actividad de ADCC reducida como semivida en suero potenciada con respecto a una molécula comparable.

En una realización, una proteína de variantes de Fc tiene actividad de CDC potenciada con respecto a una molécula comparable. En una realización específica, una proteína de variantes de Fc tiene actividad de 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 superior a la de una molécula comparable. En otras realizaciones, la proteína de variantes de Fc tiene tanto actividad de CDC potenciada como semivida en suero potenciada con respecto a una molécula comparable. En una realización, la proteína de variantes de Fc tiene unión reducida a uno o más ligandos de Fc con respecto a una molécula comparable. En otra realización, la proteína de variantes de Fc tiene una afinidad por un ligando de 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 inferior a la de una molécula comparable. En una realización específica, la proteína de variantes de Fc tiene unión reducida a un receptor de Fc. En otra realización específica, la proteína de variantes de Fc tiene unión reducida al receptor de Fc FcyRIIIA. En otra realización específica, una variante de Fc descrita en el presente documento tiene una afinidad por el receptor de Fc FcyRIIIA que es al menos aproximadamente 5 veces inferior a la de una molécula comparable, en la que dicha variante de Fc tiene una afinidad por el receptor de Fc FcγRIIB que está dentro de aproximadamente 2 veces la de una molécula comparable. En otra realización específica adicional, la proteína de variantes de Fc tiene unión reducida al receptor de Fc FcRn. En otra realización específica más, la proteína de variantes de Fc tiene unión reducida a C1q con respecto a una molécula comparable.

En una realización, la presente invención proporciona variantes de Fc, en las que la región Fc comprende un resto de aminoácido que no existe de forma natural en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 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 como se expone en Kabat. Opcionalmente, la región Fc puede comprender un resto de aminoácido que no existe de forma natural en posiciones adicionales y/o alternativas conocidas para un experto en la materia (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 5.624.821; 6.277.375; 6.737.056; publicaciones de patente PCT 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 invención proporciona una variante de Fc, en la que la región Fc comprende al menos un resto de aminoácido que no existe de forma natural seleccionado del grupo que consiste en 234D, 234E, 234N, 234Q, 234T, 234H, 234Y, 234I, 234V, 234F, 235A, 235D, 235R, 235W, 235P, 235S, 235N, 235Q, 235T, 235H, 235Y, 235I, 235V, 235F, 236E, 239D, 239E, 239N, 239Q, 239F, 239T, 239H, 239Y, 240I, 240A, 240T, 240M, 241W, 241 L, 241Y, 241E, 241 R. 243W, 243L 243Y, 243R, 243Q, 244H, 245A, 247L, 247V, 247G, 251F, 252Y, 254T, 255L, 256E, 256M, 262I, 262A, 262T, 262E, 263I, 263A, 263T, 263M, 264L, 264I, 264W, 264T, 264R, 264F, 264M, 264Y, 264E, 265G, 265N, 265Q, 265Y, 265F, 265V, 265I, 265L, 265H, 265T, 266I, 266A, 266T, 266M, 267Q, 267L, 268E, 269H, 269Y, 269F, 269R, 270E, 280A, 284M, 292P, 292L, 296E, 296Q, 296D, 296N, 296S, 296T, 296L, 296I, 296H, 269G, 297S, 297D, 297E, 298H, 298I, 298T, 298F, 299I, 299L, 299A, 299S, 299V,

299H, 299F, 399E, 305I, 313F, 316D, 325Q, 325L, 325I, 325D, 325E, 325A, 325T, 325V, 325H, 327G, 327W, 327N, 327L, 328S, 328M, 328D, 328E, 328N, 328Q, 328F, 328I, 328V, 328T, 328H, 328A, 329F, 329H, 329Q, 330K, 330G, 330T, 330C, 330L, 330V, 330I, 330F, 330R, 330H, 331G, 331A, 331L, 331M, 331F, 331W, 331K, 331Q, 331E, 331S, 331V, 331I, 331C, 331Y, 331H, 331R, 331N, 331D, 331T, 332D, 332S, 332W, 332F, 332E, 332N, 332Q, 332T, 332H, 332Y, 332A, 339T, 370E, 370N, 378D, 392T, 396L, 416G, 419H, 421K, 440Y y 434W como se numera por el índice EU como se expone en Kabat. Opcionalmente, la región Fc puede comprender restos de aminoácidos que no existen de forma natural adicionales y/o alternativos conocidos para un experto en la materia (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 5.624.821; 6.277.375; 6.737.056; publicaciones de patente PCT WO 01/58957; WO 02/06919; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752 y WO 05/040217).

Métodos de producción de anticuerpos

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Los anticuerpos manipulados con cisteína de la invención pueden producirse por cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, en particular, por síntesis química o preferentemente, por técnicas de expresión recombinante.

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica que incluyen el uso de tecnologías de hibridomas, recombinantes y de presentación en fagos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden producirse usando técnicas de hibridomas que incluyen 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). El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, no se limita a anticuerpos producidos mediante tecnología de hibridomas. El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que deriva de un único clon, que incluye cualquier clon eucariota, procariota o de fago, y no al método por el que se produce.

Los métodos de producción y selección de anticuerpos específicos usando tecnología de hibridomas son rutinarios y muy conocidos en la técnica. Brevemente, pueden inmunizarse ratones con un antígeno diana (tanto la proteína de longitud completa como un dominio de la misma, por ejemplo, el dominio extracelular o el dominio de unión al ligando) y una vez se detecta una respuesta inmunitaria, por ejemplo, los anticuerpos específicos para el antígeno diana se detectan en el suero de ratón, se recoge el bazo del ratón y se aíslan los esplenocitos. Los esplenocitos se fusionan entonces por técnicas muy conocidas para cualquier célula de mieloma adecuada, por ejemplo, células de la línea celular SP20 disponible de ATCC. Los hibridomas se seleccionan y clonan por dilución limitada. Los clones de hibridoma se ensayan entonces por métodos conocidos en la técnica para células que secretan anticuerpos capaces de unirse a un polipéptido de la invención. Puede generarse líquido ascítico, que generalmente contiene altos niveles de anticuerpos, inmunizando ratones con clones de hibridoma positivos.

Por consiguiente, pueden generarse anticuerpos monoclonales cultivando una célula de hibridoma que secreta un anticuerpo de la invención en el que, preferentemente, el hibridoma se genera fusionando esplenocitos aislados de un ratón inmunizado con un antígeno diana con células de mieloma y entonces seleccionando los hibridomas resultantes de la fusión para clones de hibridoma que secretan un anticuerpo capaz de unirse a un antígeno diana específico.

Pueden generarse fragmentos de anticuerpos que reconocen epítopes de antígeno diana específicos por cualquier técnica conocida para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, pueden producirse fragmentos Fab y F(ab')2 de la invención por 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 invención también pueden generarse usando diversos métodos de presentación en fagos conocidos en la técnica.

En los métodos de presentación en fagos, dominios de anticuerpo funcionales se presentan sobre la superficie de partículas de fago que llevan las secuencias de polinucleótidos que los codifican. En particular, se amplifican secuencias de ADN que codifican dominios VH y VL de bibliotecas de ADNc de animal (por ejemplo, bibliotecas de ADNc humano o murino de tejidos linfoides). El ADN que codifica los dominios VH y VL se recombinan juntos con un conector de scFv por PCR y se clonan en un vector de fagémido (por ejemplo, pCANTAB 6 o pComb 3 HSS). El vector se electropora en *E. coli* y *E. coli* se infecta con fago auxiliar. El fago usado en estos métodos normalmente es fago filamentoso que incluye fd y M13 y los dominios VH y VL se fusionan normalmente recombinantemente con tanto el gen III como el gen VIII de fago. El fago que expresa un dominio de unión al antígeno que se une a un epítope de interés puede seleccionarse o identificarse con antígeno, por ejemplo, usando antígeno marcado o antígeno unido o capturado a una superficie sólida o perla. Ejemplos de métodos de presentación en fagos que pueden usarse para producir los anticuerpos de la presente invención incluyen los desvelados en Brinkman 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; solicitud internacional N.º PCT/GB91/01134; publicaciones internacionales N.º 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 de fago, las regiones codificantes de anticuerpo del fago pueden aislarse y usarse para generar anticuerpos completos, que incluyen anticuerpos humanos, o cualquier otro fragmento de unión al antígeno deseado, y expresarse en cualquier huésped deseado, que incluye células de mamífero, células de insecto, células vegetales, levadura y bacterias, por ejemplo, como se describe más adelante. También pueden emplearse técnicas para producir recombinantemente los fragmentos Fab, Fab' y F(ab')2 usando métodos conocidos en la técnica tales como los desvelados 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 ().

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Para generar anticuerpos completos, pueden usarse cebadores de PCR que incluyen secuencias de nucleótidos de VH o VL, un sitio de restricción y una secuencia flanqueante para proteger el sitio de restricción para amplificar las secuencias de VH o VL en clones de scFv. Utilizando técnicas de clonación conocidas para aquellos expertos en la materia, los dominios de VH ampliados por PCR pueden clonarse en vectores que expresan una región constante VH, por ejemplo, la región constante 4 gamma humana, y los dominios de VL ampliados 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 de EF-1α, 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 expresa las regiones constantes necesarias. Los vectores de conversión de cadena pesada y los vectores de conversión de cadena ligera se cotransfectan entonces en líneas celulares para generar líneas celulares estables o transitorias que expresan anticuerpos de longitud completa, por ejemplo, IgG, usando técnicas conocidas para aquellos expertos en la materia.

Para algunos usos, que incluyen el uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos y ensayos de detección *in vitro*, puede ser preferible usar anticuerpos humanos o quiméricos. Son particularmente deseables anticuerpos completamente humanos para el tratamiento terapéutico de sujetos humanos. Pueden prepararse anticuerpos humanos mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica que incluyen los métodos de presentación en fagos descritos anteriormente usando bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. Véanse también las patentes de EE.UU. N.º 4.444.887 y 4.716.111; y 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 la inmunoglobulina humana. Por ejemplo, pueden introducirse complejos de gen de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera humana aleatoriamente o por recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. Alternativamente, la región variable humana, región constante y región de diversidad pueden introducirse en células madre embrionarias de ratón, además de los genes de cadena pesada y ligera humanas. Los genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera de ratón pueden convertirse en no funcionales por separado o simultáneamente con la introducción de loci de inmunoglobulina humana por recombinación homóloga. En particular, la deleción homocigótica de la región ${\sf J_H}$ previene la producción de anticuerpos endógenos. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y microinyectan en blastocitos para producir ratones quiméricos. Los ratones quiméricos se crían entonces para producir descendencia homocigótica que expresa anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan en el modo normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, todo o una porción de un polipéptido de la invención. Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno a partir de los ratones transgénicos inmunizados usando tecnología de hibridomas convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana alojados por los ratones transgénicos se reordenan durante la diferenciación de linfocitos B, y posteriormente se someten a conmutación de clase y mutación somática. Así, 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, Int. Rev. Immunol. 13:65-93). Para una discusión detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir tales anticuerpos, véanse, por ejemplo, las publicaciones internacionales 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 proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando tecnología similar a la descrita anteriormente.

Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que 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 de producción de 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. Pueden producirse anticuerpos quiméricos que comprenden una o más CDR de una especie no humana y regiones estructurales de una molécula de inmunoglobulina humana usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica que incluyen, por ejemplo, injerto de CDR (EP 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), inactivación o acondicionamiento superficial

(documentos EP 592,106; EP 519,596; Padlan, 1991, Molecular Immunology 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Protein Engineering 7:805; y Roguska et al., 1994, PNAS 91:969) y barajado de cadenas (patente de EE.UU. N.º 5.565.332).

Frecuentemente, los restos de la región estructural en las regiones estructurales estarán sustituidos con el resto correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, preferentemente mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones de la región estructural se identifican por métodos muy conocidos en la técnica, por ejemplo, por modelado de las interacciones de los restos de CDR y de la región estructural para identificar restos de la región estructural importantes para la unión al antígeno y comparación de secuencias para identificar restos de la región estructural poco usuales en las posiciones particulares (véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.585.089; y Riechmann et al., 1988, Nature 332:323.).

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

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 estructural 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 todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables en los que todas o sustancialmente todas de las regiones CDR se corresponden con las de una inmunoglobulina no humana (es decir, anticuerpo donante) y todas o sustancialmente todas de las regiones estructurales son las 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 aquella de una inmunoglobulina humana. Generalmente, el anticuerpo contendrá tanto la cadena ligera, además de al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3 y CH4 de la cadena pesada. El anticuerpo humanizado puede seleccionarse de cualquier clase de inmunoglobulinas, que incluye IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, que incluye IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Normalmente, el dominio constante es un dominio constante de fijación del complemento donde se desea que el anticuerpo humanizado presente actividad citotóxica, y la clase normalmente es IgG1. Donde tal actividad citotóxica no sea deseable, el dominio constante puede ser de la clase IgG2. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo, y el seleccionar dominios constantes particulares para optimizar funciones efectoras deseadas está dentro de la experiencia habitual en la materia. Las regiones estructurales y CDR de un anticuerpo humanizado no necesitan corresponderse precisamente con las secuencias de origen, por ejemplo, la CDR de donante o la región estructural consenso pueden mutagenizarse por sustitución, inserción o deleción de al menos un resto de manera que el resto de CDR o de la región estructural en ese sitio no se corresponda con tanto el anticuerpo consenso como de importación. Tales mutaciones, sin embargo, no serán amplias. Normalmente, al menos el 75 % de los restos de anticuerpo humanizado se corresponderán con aquellos de las secuencias de la región estructural (FR) original y CDR, más frecuentemente el 90 %, o incluso superior al 95 %.

Pueden producirse anticuerpos humanizados usando variedad de técnicas conocidas en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, injerto de CDR (patente europea N.º EP 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), inactivación o acondicionamiento superficial (patentes europeas N.º EP 592.106 y EP 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, PNAS 91:969-973), barajado de cadenas (patente de EE.UU. N.º 5.565.332) y técnicas desveladas en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 6.407.213, 5.766.886, 5.585.089, publicación internacional N.º WO 9317105, Tan et al., 2002, J. Immunol. 169:1119-25, Caldas et al., 2000, Protein Eng. 13:353-60, Morea et al., 2000, Methods 20:267-79, Baca et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:10678-84, Roguska et al., 1996, Protein Eng. 9:895-904, Couto et al., 1995, Cancer Res. 55 (23 Supp):5973s-5977s, Couto et al., 1995, Cancer Res. 55:1717-22, Sandhu, 1994, Gene 150:409-10, Pedersen et al., 1994, J. Mol. Biol. 235:959-73, 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. Frecuentemente, los restos de la región estructural en las regiones estructurales estarán sustituidos con el resto correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, preferentemente mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones de la región estructural se identifican por métodos muy conocidos en la técnica, por ejemplo, por modelado de las interacciones de los restos de CDR y de la región estructural para identificar restos de la región estructural importantes para la unión al antígeno y comparación de secuencias para identificar restos de la región estructural poco usuales en las posiciones particulares (véanse, por ejemplo, Queen et al., patente de EE.UU. N.º 5.585.089; y Riechmann et al., 1988, Nature 332:323).

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

En otras realizaciones, la invención comprende la expresión de un dominio CH1 aislado que comprende restos manipulados con cisteína. Tales dominios CH1 aislados pueden ser útiles como armazones para fines de presentación. En otras realizaciones, los dominios CH1 aislados pueden usarse conjuntamente con subunidades Ckappa o Clambda de una cadena ligera del anticuerpo.

En todavía otras realizaciones, los anticuerpos de la invención pueden comprender una región bisagra que carece de al menos un resto de cisteína. En otras realizaciones, los anticuerpos de la invención pueden comprender una región bisagra que carece de restos de cisteína. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención pueden comprender una región bisagra en la que todos los restos de cisteína están sustituidos con tanto serina como treonina. Tales anticuerpos pueden presentar eficiencia de conjugación elevada y menos reordenamiento de disulfuros.

Adicionalmente, diversas publicaciones describen métodos de obtención de moléculas fisiológicamente activas cuyas semividas se modifican tanto introduciendo un polipéptido de unión a FcRn en las moléculas (documento WO 97/43316; patente de EE.UU. N.º 5.869.046; patente de EE.UU. N.º 5.747.035; documentos WO 96/32478; WO 91/14438) como fusionando las moléculas con anticuerpos cuyas afinidades de unión por FcRn se preservan, pero las afinidades por otros receptores de Fc han sido enormemente reducidas (documento WO 99/43713) o fusionando con dominios de unión a FcRn de anticuerpos (documento WO 00/09560; patente de EE.UU. N.º 4.703.039). También pueden encontrarse técnicas y métodos específicos de aumento de la semivida de moléculas fisiológicamente activas en la patente de EE.UU. N.º 7.083.784 concedida el 1 de agosto de 2006 titulada "Antibodies with Increased Half-lives". Específicamente, se contempla que los anticuerpos de la invención comprendan una región Fc que comprende mutaciones de restos de aminoácidos (como se numera por el índice EU en Kabat): M252Y/S2541/T256E o H433K/N434F/Y436H.

20 Polinucleótidos que codifican un anticuerpo

5

10

15

25

30

35

40

45

50

55

60

Los polinucleótidos pueden obtenerse, y la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos determinarse, por cualquier método conocido en la técnica. Como las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos son conocidas, pueden determinarse secuencias de nucleótidos que codifican estos anticuerpos usando métodos muy conocidos en la técnica, es decir, codones de nucleótido conocidos por codificar aminoácidos particulares se ensamblan de tal forma que generen un ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento del mismo de la invención. Un polinucleótido tal que codifica el anticuerpo puede ensamblarse a partir de oligonucleótidos químicamente sintetizados (por ejemplo, como se describe en Kutmeier et al., 1994, BioTechniques 17:242), que, brevemente, implica la síntesis de oligonucleótidos que se superponen que contienen porciones de la secuencia que codifica el anticuerpo, hibridación y ligamiento de aquellos oligonucleótidos, y luego amplificación de los oligonucleótidos ligados por PCR.

Alternativamente, puede generarse un polinucleótido que codifica un anticuerpo a partir de ácido nucleico de una fuente adecuada. Si no está disponible un clon que contiene un ácido nucleico que codifica un anticuerpo particular, pero se conoce la secuencia del anticuerpo, un ácido nucleico que codifica la inmunoglobulina puede sintetizarse químicamente u obtenerse a partir de una fuente adecuada (por ejemplo, una biblioteca de ADNc de anticuerpo, o una biblioteca de ADNc generada a partir de, o ácido nucleico, preferentemente ARN poli A+, aislado de, cualquier tejido o células que expresan el anticuerpo por amplificación por PCR usando cebadores sintéticos hibridables con los extremos 3' y 5' de la secuencia o clonando usando una sonda de oligonucleótidos específica para la secuencia de genes particular para identificar, por ejemplo, un clon de ADNc de una biblioteca de ADNc que codifica el anticuerpo. Los ácidos nucleicos amplificados generados por PCR pueden entonces clonarse en vectores de clonación replicables usando cualquier método muy conocido en la técnica.

Una vez se determina la secuencia de nucleótidos del anticuerpo, la secuencia de nucleótidos del anticuerpo puede manipularse usando métodos muy 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, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY y Ausubel et al., eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY), para generar anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo, para crear sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos.

En una realización específica, una o más de las CDR se inserta dentro de regiones estructurales usando técnicas de ADN recombinante rutinarias. Las regiones estructurales pueden ser regiones estructurales que existen de forma natural o consenso, y preferentemente regiones estructurales humanas (véase, por ejemplo, Chotia et al., 1998, J. Mol. Biol. 278: 457-479 para un listado de regiones estructurales humanas). Preferentemente, el polinucleótido generado por la combinación de las regiones estructurales y CDR codifica un anticuerpo que se une específicamente a EphA2 o EphA4. Preferentemente, como se ha tratado arriba, pueden hacerse una o más sustituciones de aminoácidos dentro de las regiones estructurales, y, preferentemente, las sustituciones de aminoácidos mejoran la unión del anticuerpo a su antígeno. Adicionalmente, pueden usarse tales métodos para hacer sustituciones o deleciones de aminoácidos de uno o más restos de cisteína de la región variable que participan en un enlace disulfuro intracatenario para generar anticuerpos que carecen de uno o más enlaces disulfuro intracatenarios. Otras alteraciones al polinucleótido están englobadas por la presente invención y dentro de la experiencia de la materia.

Expresión recombinante de un anticuerpo

5

10

25

La expresión recombinante de un anticuerpo de la invención, derivado, análogo o fragmento del mismo, requiere la construcción de un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el anticuerpo. Una vez se ha obtenido un polinucleótido que codifica un anticuerpo o una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, o porción del mismo, de la invención, el vector para la producción del anticuerpo puede producirse por tecnología de ADN recombinante usando técnicas muy conocidas en la técnica. Así, en el presente documento se describen métodos de preparación de una proteína expresando un polinucleótido que contiene un anticuerpo que codifica secuencias de nucleótidos. Pueden usarse métodos que son muy conocidos para aquellos expertos en la materia para construir vectores de expresión que contienen 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 invención, así, proporciona vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo de la invención, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, un dominio variable de la cadena pesada o ligera de un anticuerpo o una porción del mismo, o una CDR de cadena pesada o ligera, operativamente unidos a un promotor. Tales vectores pueden incluir la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante del anticuerpo (véanse, por ejemplo, las publicaciones internacionales 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 un vector tal para la expresión de la cadena pesada entera, la ligera entera, o tanto las cadenas pesadas como ligeras enteras.

El vector de expresión se transfiere a una célula huésped por técnicas convencionales y las células transfectadas se cultivan entonces por técnicas convencionales para producir un anticuerpo de la invención. Así, la invención incluye células huésped que contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la invención o fragmentos del mismo, o una cadena pesada o ligera del mismo, o porción del mismo, o un anticuerpo monocatenario de la invención, operativamente unido a un promotor heterólogo. En ciertas realizaciones para la expresión de anticuerpos bicatenarios, los vectores que codifican tanto las cadenas pesadas como ligeras pueden co-expresarse en la célula huésped para la expresión de la molécula de inmunoglobulina entera, como se detalla más adelante.

- 30 Puede utilizarse una variedad de sistemas huésped-vector de expresión para expresar los anticuerpos de la invención (véase, por ejemplo, la patente de EE.UÚ. N.º 5.807.715). Tales sistemas huésped-expresión representan vehículos por los que las secuencias codificantes de interés pueden producirse y posteriormente purificarse, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, expresar un anticuerpo de la invención in situ. Éstos incluyen, pero no se limitan a, 35 microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, E. coli y B. subtilis) transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, ADN de plásmido o ADN de cósmido que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; levadura (por ejemplo, Saccharomyces pichia) transformada con vectores de expresión en levadura recombinantes que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células de insecto infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias codificantes de 40 anticuerpos; sistemas de células de planta 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 plasmídicos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; o sistemas de célula de mamífero (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, NS0 y 3T3) que alojan construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de 45 mamífero (por ejemplo, promotor de la metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío del adenovirus; el promotor 7.5K del virus de la variolovacuna). Preferentemente, se usan células bacterianas tales como Escherichia coli, y más preferentemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de anticuerpo recombinante completo, para la expresión de un anticuerpo recombinante.
- Por ejemplo, las células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO), conjuntamente con un vector tal como el elemento promotor del gen temprano intermedio principal 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 sistemas bacterianos, pueden seleccionarse ventajosamente varios vectores de expresión que dependen del uso previsto para el anticuerpo que se expresa. Por ejemplo, cuando va a producirse una gran cantidad de una proteína tal, para la generación de composiciones farmacéuticas de un anticuerpo, pueden ser deseables vectores que dirigen la expresión de altos niveles de productos de proteína de fusión que son fácilmente purificados. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther et al., 1983, EMBO 12:1791), en el que la secuencia codificante de anticuerpos puede unirse individualmente en el vector en marco con la región codificante lac Z de manera que se produzca una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24:5503-5509); y similares. También pueden usarse vectores PGEX para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión 5-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células lisadas por adsorción y unión a perlas de glutatión-agarosa de matriz, seguido de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX se diseñan para incluir sitios de escisión por trombina o proteasa del factor Xa de

manera que el producto génico diana clonado pueda ser liberado del resto de GST.

5

10

15

20

25

30

50

55

60

65

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

En células huésped de mamífero, pueden utilizarse varios sistemas de expresión basados en virus. En los casos en los que se usa un adenovirus como vector de expresión, la secuencia codificante de anticuerpos de interés puede unirse a un complejo de control de transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia conductora tripartita. Este gen quimérico puede entonces insertarse en el genoma del adenovirus por recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, región El o E3) producirá un virus recombinante que es viable y capaz de expresar el anticuerpo en huéspedes infectados (por ejemplo, véase Logan & Shenk, 1984, PNAS 8 1:6355-6359). También pueden requerirse señales de iniciación específicas para la eficiente traducción de secuencias codificantes insertadas de anticuerpos. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. Además, 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 traduccional exógenas y codones de iniciación pueden ser de una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficiencia de expresión puede potenciarse por la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados, terminadores de la transcripción, etc. (véase, por ejemplo, Bittner et al., 1987, Methods in Enzymol. 153:516-544).

Además, puede elegirse una cepa de células huésped que modula la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa el producto génico en el modo específico deseado. Tales modificaciones (por ejemplo, glucosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos de proteína pueden ser importantes para la función de la proteína. Células huésped diferentes tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento postraduccional y modificación de proteínas y productos génicos. Pueden elegirse líneas celulares o sistemas de huésped apropiados para garantizar la correcta modificación y procesamiento de la proteína extraña expresada. Para este fin, pueden usarse células huésped eucariotas que poseen la maquinaria celular para el apropiado procesamiento del transcrito primario, glucosilación y fosforilación del producto génico. Tales células huésped de mamífero incluyen, pero no se limitan a, células CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT2O, NS1 y T47D, NS0 (una línea de células de mieloma murino que no produce endógenamente ninguna cadena de inmunoglobulina), CRL7O30 y HsS78Bst.

Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes, se prefiere expresión estable. Por ejemplo, pueden manipularse líneas celulares que expresan establemente el anticuerpo. En vez de usar vectores de expresión que contienen orígenes virales de replicación, pueden transformarse células huésped con ADN controlado por elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador de selección. Tras la introducción del ADN foráneo, las células manipuladas pueden dejarse crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido, y luego se cambian a un medio selectivo. El marcador de selección en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células se integren establemente en el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos que a su vez pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este método puede usarse ventajosamente para manipular líneas celulares que expresan el anticuerpo. Tales líneas celulares manipuladas pueden ser particularmente útiles en el cribado y la evaluación de composiciones que interaccionan directa o indirectamente con el anticuerpo.

Pueden usarse varios sistemas de selección, que incluyen, pero no se limitan a, los genes de timidina cinasa del virus del herpes simple (Wigler et al., 1977, Cell 11:223), glutamina sintetasa, hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202) y adenina fosforribosiltransferasa (Lowy et al., 1980, Cell 22:8-17) pueden emplearse en células tk, gs, hgprt o aprt, respectivamente. Por tanto, puede usarse resistencia a antimetabolitos como la base de selección para los siguientes genes: *dhfr*, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler et al., 1980, PNAS 77:357; O'Hare et al., 1981, PNAS 78:1527); *gpt*, que confiere resistencia a ácido micofenólico (Mulligan & 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, 1993, TIB TECH 11:155); e *hygro*, que confiere resistencia a higromicina (Santerre et al., 1984, Gene 30:147). Métodos comúnmente conocidos en la técnica de tecnología de ADN recombinante pueden ser rutinariamente aplicados para seleccionar el clon recombinante deseado, y tales métodos se describen, por ejemplo, en Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & 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 & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol. 150:1.

Los niveles de expresión de un anticuerpo pueden aumentarse por amplificación de vector (para una revisión, véase Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3. (Academic Press, New York, 1987)). Cuando un marcador en el sistema de

vector que expresa el anticuerpo es amplificable, el aumento en el nivel de inhibidor presente en el cultivo de célula huésped aumentará el número de copias del gen marcador. Como la región amplificada está asociada al gen de anticuerpo, también aumentará la producción de anticuerpo (Crouse et al., 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257).

La célula huésped puede co-transfectarse con dos vectores de expresión de la invención, el primer vector que codifica un polipéptido derivado de cadena pesada y el segundo vector que codifica un polipéptido derivado de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores de selección idénticos que permiten la expresión igual de polipéptidos de cadena pesada y ligera. Alternativamente, puede usarse un único vector que codifica, y es capaz de expresar, tanto polipéptidos de cadena pesada como ligera. En tales situaciones, la cadena ligera debe ponerse 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 pesadas y ligeras pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Una vez se ha producido un anticuerpo modificado con cisteína de la invención por expresión recombinante, puede purificarse por cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad por el antígeno específico después de Proteína A, y cromatografía de exclusión molecular), centrifugación, solubilidad diferencial o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos de la presente invención o fragmentos de los mismos pueden fusionarse con secuencias de polipéptidos heterólogas descritas en el presente documento o conocidas de otro modo en la técnica para facilitar la purificación.

Producción escalable de anticuerpos manipulados con cisteína

40

45

50

55

60

65

En un esfuerzo por obtener grandes cantidades de los anticuerpos manipulados con cisteína de la invención, pueden producirse por un proceso escalable (denominado en lo sucesivo "proceso escalable de la invención"). En algunas realizaciones, los anticuerpos manipulados con cisteína pueden producirse por un proceso escalable de la invención en el laboratorio de investigación que puede aumentarse de escala para producir las proteínas de la invención en biorreactores a escala analítica (por ejemplo, pero no se limitan a, biorreactores de 5 l, 10 l, 15 l, 30 l o 50 l) mientras que se mantiene la actividad funcional de las proteínas. Por ejemplo, en una realización, las proteínas producidas por procesos escalables de la invención presentan niveles de bajos a indetectables de agregación como se mide por HPSEC o rCGE, es decir, no superiores al 5 %, no superiores al 4 %, no superiores al 3 %, no superiores al 2 %, no superiores al 1 %, o no superiores al 0,5 % de agregado en peso de proteína, y/o niveles de bajos a indetectables de fragmentación, es decir, 80 % o más alta, 85 % o más alta, 90 % o más alta, 95 % o más alta, 98 % o más alta, o 99 % o más alta, o 99,5 % o más alta del área de pico total en el (los) pico(s) que representa(n) anticuerpos manipulados con cisteína intactos.

En otras realizaciones, los anticuerpos manipulados con cisteína pueden producirse por un proceso escalable de la invención en el laboratorio de investigación que puede aumentarse de escala para producir las proteínas de la invención en los biorreactores a escala de producción (por ejemplo, pero no se limitan a, 75 I, 100 I, 150 I, 300 I, o 500 I). En algunas realizaciones, el proceso escalable de la invención produce poca o ninguna reducción en la eficiencia de producción en comparación con el proceso de producción realizado en el laboratorio de investigación. En otras realizaciones, el proceso escalable de la invención produce anticuerpos manipulados con cisteína a eficiencia de producción de aproximadamente 10 mg/l, aproximadamente 20 mg/l, aproximadamente 30 mg/l, aproximadamente 50 mg/l, aproximadamente 75 mg/l, aproximadamente 100 mg/l, aproximadamente 125 mg/l, aproximadamente 150 mg/l, aproximadamente 200 mg/l, aproximadamente 250 m

En otras realizaciones, el proceso escalable de la invención produce anticuerpos manipulados con cisteína a eficiencia de producción de al menos aproximadamente 10 mg/l, al menos aproximadamente 20 mg/l, al menos aproximadamente 30 mg/l, al menos aproximadamente 75 mg/l, al menos aproximadamente 100 mg/l, al menos aproximadamente 125 mg/l, al menos aproximadamente 150 mg/l, al menos aproximadamente 175 mg/l, al menos aproximadamente 200 mg mg/l, al menos aproximadamente 250 mg/l, al menos aproximadamente 300 mg/l, o más alta.

En otras realizaciones, el proceso escalable de la invención produce anticuerpos manipulados con cisteína a eficiencia de producción de aproximadamente 10 mg/l a aproximadamente 300 mg/l, de aproximadamente 10 mg/l a aproximadamente 250 mg/l, de aproximadamente 10 mg/l a aproximadamente 250 mg/l, de aproximadamente 10 mg/l a aproximadamente 150 mg/l, de aproximadamente 10 mg/l a aproximadamente 150 mg/l, de aproximadamente 10 mg/l a aproximadamente 300 mg/l, de aproximadamente 20 mg/l a aproximadamente 20 mg/l, de 20 mg/l a aproximadamente 175 mg/l, de aproximadamente 20 mg/l a aproximadamente 150 mg/l, de aproximadamente 20 mg/l a aproximadamente 150 mg/l, de aproximadamente 20 mg/l a aproximadamente 100 mg/l, de aproximadamente 30 mg/l a aproximadamente 30 mg/l, de aproximadamente 30 mg/l a aproximadamente 30 mg/l, de aproximadamente 30 mg/l a aproximadamente 30 mg/l a aproximadamente 30 mg/l a aproximadamente 30 mg/l a aproximadamente 30 mg/l, de aproximadamente 30 mg/l a aproximadamente

mg/l a aproximadamente 300 mg/l, de aproximadamente 50 mg/l a aproximadamente 250 mg/l, de aproximadamente 50 mg/l a aproximadamente 200 mg/l, de 50 mg/l a aproximadamente 175 mg/l, de aproximadamente 50 mg/l a aproximadamente 150 mg/l, de aproximadamente 50 mg/l a aproximadamente 125 mg/l, de aproximadamente 50 mg/l a aproximadamente 100 mg/l.

Para garantizar la estabilidad de los anticuerpos de la invención, se han desarrollado ensayos adecuados. En una realización, la estabilidad de las proteínas de la invención se caracteriza por técnicas conocidas en la técnica. En otras realizaciones, la estabilidad de las proteínas de la invención puede evaluarse por la tasa o perfil de agregación y/o fragmentación. Para determinar el nivel de agregación o fragmentación, pueden usarse muchas técnicas. En una realización, el perfil de agregación y/o fragmentación puede evaluarse por el uso de ultracentrifugación analítica (AUC), cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (HPSEC), temperatura de fusión (T_m), electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), electroforesis en gel capilar (CGE), dispersión de la luz (SLS), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), dicroísmo circular (CD), técnicas de despliegue de proteínas inducido por urea, fluorescencia intrínseca de triptófano, calorimetría diferencial de barrido o técnicas de unión de proteína a ácido 1-anilino-8-naftalenosulfónico (ANS). En otra realización, la estabilidad de las proteínas de la invención se caracteriza por análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE). En otra realización, la estabilidad de las proteínas de la invención se caracteriza por análisis del perfil de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

20 Conjugados de anticuerpo

5

10

15

25

30

35

40

45

50

55

60

65

La presente invención engloba el uso de anticuerpos manipulados con cisteína recombinantemente fusionados o químicamente conjugados (incluyendo conjugaciones tanto covalentes como no covalentes) con un agente heterólogo para generar una proteína de fusión como restos de direccionamiento (denominados en lo sucesivo "conjugados de anticuerpo"). El agente heterólogo puede ser un polipéptido (o porción del mismo, preferentemente para un polipéptido de al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 aminoácidos), ácido nucleico, molécula pequeña (inferior a 1000 dalton), o compuesto inorgánico o orgánico. La fusión no necesita necesariamente ser directa, pero puede producirse mediante secuencias conectoras. Pueden usarse anticuerpos fusionados o conjugados con agentes heterólogos in vivo para detectar, tratar, gestionar o monitorizar la progresión de un trastorno usando métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la publicación internacional WO 93/21232; documento EP 439.095; Naramura et al., 1994, Immunol. Lett. 39:91-99; patente de EE.UU. 5.474.981; Gillies et al., 1992, PNAS 89:1428-1432; y Fell et al., 1991, J. Immunol. 146:2446-2452. En algunas realizaciones, el trastorno que va a detectarse, tratarse, gestionarse o monitorizarse es una enfermedad autoinmunitaria, inflamatoria, infecciosa o trastorno relacionado con el cáncer. Se conocen en la técnica métodos de fusión o conjugación de polipéptidos con porciones de anticuerpo. 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; documentos EP 307.434; EP 367.166; publicaciones internacionales N.º WO 96/04388 y WO 91/06570; Ashkenazi et al., 1991, PNAS 88: 10535-10539; Zheng et al., 1995, J. Immunol. 154:5590-5600; y Vil et al., 1992, PNAS 89:11337-11341.

Pueden generarse proteínas de fusión adicionales mediante técnicas de barajado de genes, barajado de motivos, barajado de exones y/o barajado de codones (denominados conjuntamente "barajado de ADN"). Puede emplearse barajado de ADN para alterar las actividades de anticuerpos manipulados con cisteína de la invención (por ejemplo, anticuerpos con afinidades más altas y velocidades 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. Opinion Biotechnol. 8:724-33; Harayama, 1998, Trends Biotechnol. 16:76; Hansson, et al., 1999, J. Mol. Biol. 287:265; y los anticuerpos codificados o fragmentos de los mismos, pueden alterarse sometiéndose a mutagénesis al azar por PCR propensa a error, inserción de nucleótidos al azar u otros métodos antes de la recombinación. Pueden recombinarse una o más porciones de un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc. de uno o más agentes heterólogos.

En una realización, los anticuerpos manipulados con cisteína de la presente invención o fragmentos o variantes de los mismos se conjugan con una secuencia de marcador, tal como un péptido, para facilitar la purificación. En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del marcador es un péptido de hexa-histidina, tal como la marca proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otros, muchos de los cuales están comercialmente disponibles. Como se describe en Gentz et al., 1989, PNAS 86:821, por ejemplo, la hexa-histidina proporciona purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras marcas de péptido útiles para la purificación incluyen, pero no se limitan a, la marca de hemaglutinina "HA", que se corresponde con un epítope derivado de la proteína de hemaglutinina de la gripe (Wilson et al., 1984, Cell 37:767) y la marca "flag".

En otras realizaciones, los anticuerpos de la presente invención de los mismos están conjugados con agente de diagnóstico o detectable. Tales anticuerpos pueden ser útiles para monitorizar o pronosticar el desarrollo o la progresión de un trastorno (tal como, pero no se limita a, cáncer) como parte de un procedimiento de prueba clínica, tal como determinar la eficacia de una terapia particular.

Tal diagnóstico y detección pueden realizarse acoplando el anticuerpo a sustancias detectables que incluyen, pero

no se limitan a, diversas enzimas, tales como, pero no se limitan a, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; grupos prostéticos, tales como, pero no se limitan a, estreptavidina/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes, tales como, pero no se limitan a, umbeliferona, fluorescena, isotiocianato de fluorescena, rodamina, diclorotriazinilamina fluorescena, cloruro de dansilo o ficoeritrina; materiales luminiscentes tales como, pero no se limitan a, luciferasa, luciferina y aecuorina; materiales radiactivos tales como, pero no se limitan a, bismuto (213 Bi), carbono (14 C), cromo (51 Cr), cobalto (17 Co), flúor (18 F), gadolinio (153 Gd, 159 Gd), galio (68 Ga, 67 Ga), germanio (68 Ge), holmio (166 Ho), indio (115 In, 113 In, 111 In), yodo (131 I, 125 I, 123 I, 121 I), lantano (140 La), lutecio (177 Lu), manganeso (54 Mn), molibdeno (99 Mo), paladio (103 Pd), fósforo (32 P), praseodimio (142 Pr), prometio (149 Pm), renio (186 Re, 188 Re), rodio (105 Rh), rutenio (97 Ru), samario (153 Sm), escandio (147 Sc), selenio (75 Se), estroncio (85 Sr), azufre (35 S), tecnecio (99 Tc), talio (201 Ti), estaño (113 Sn, 117 Sn), tritio (3 H), xenón (133 Xe), iterbio (169 Yb, 175 Yb), itrio (90 Y), cinc (65 Zn); metales emisores de positrones usando diversas tomografías de emisión de positrones, e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos.

5

10

45

50

55

- En otras realizaciones, los anticuerpos manipulados con cisteína de la presente invención están conjugados con un 15 agente terapéutico tal como una citotoxina, por ejemplo, un agente citostático o citocida, un agente terapéutico o un ión metálico radiactivo, por ejemplo, emisores alfa. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para las células. Ejemplos incluyen paclitaxel, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, 20 dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, puromicina, epirubicina y ciclofosfamida, y análogos u homólogos de los mismos. Agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracildecarbazina), agentes alquilantes mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalan, carmustina (BCNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cisdiclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por 25 ejemplo, daunorubicina (antiguamente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (antiguamente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)) y agentes antimitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).
- En una realización, el agente citotóxico está seleccionado del grupo que consiste en una enediína, una lexitropsina, una duocarmicina, un taxano, una puromicina, una dolastatina, un maitansinoide y un alcaloide de la vinca. En otras realizaciones, el agente citotóxico es paclitaxel, docetaxel, CC-1065, SN-38, topotecan, morfolino-doxorubicina, rizoxina, cianomorfolino-doxorubicina, dolastatina-10, equinomicina, combretastatina, caliqueamicina, maitansina, DM-1, una auristatina u otros derivados de dolastatina, tales como auristatina E o auristatina F, AEB, AEVB, AEFP, MMAE (monometilauristatina E), MMAF (monometilauristatina F), eleuterobina o netropsina. La síntesis y estructura de la auristatina E, también conocida en la técnica como dolastatina-10, y sus derivados se describen en las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2003/0083263 A1 y 2005/0009751 A1; en la solicitud de patente internacional N.º: PCT/US02/13435, en las patentes 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.
 - En otras realizaciones, el agente citotóxico de un conjugado de anticuerpo de la invención es un agente antitubulina. Los agentes anti-tubulina son una clase bien establecida de compuestos de terapia para el cáncer. Ejemplos de agentes anti-tubulina incluyen, pero no se limitan a, taxanos (por ejemplo, Taxol® (paclitaxel), docetaxel), T67 (Tularik), vincas y auristatinas (por ejemplo, auristatina E, AEB, AEVB, MMAE, MMAF, AEFP). Los agentes anti-tubulina incluidos en esta clase también son: alcaloides de la vinca, que incluyen vincristina y vinblastina, vindesina y vinorelbina; taxanos tales como paclitaxel y docetaxel y derivados de baccatin, epitilona A y B, nocodazol, 5-fluorouracilo y colcimid, estramustina, criptofisinas, cemadotin, maitansinoides, combretastatinas, dolastatinas, discodermolida y eleuterobina. En realizaciones más específicas, el agente citotóxico está seleccionado del grupo que consiste en un alcaloide de la vinca, una podofilotoxina, un taxano, un derivado de baccatin, una criptofisina, un maitansinoide, una combretastatina y una dolastatina. En realizaciones más específicas, el agente citotóxico es vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina, VP-16, camptotecina, paclitaxel, docetaxel, epitilona A, epitilona B, nocodazol, colchicina, colcimid, estramustina, cemadotin, discodermolida, maitansina, DM-1, una auristatina u otros derivados de dolastatina, tales como auristatina E o auristatina F, AEB, AEVB, AEFP, MMAE (monometilauristatina E), MMAF (monometilauristatina F), eleuterobina o netropsina.
 - En una realización específica, el fármaco es un maitansinoide, un grupo de agentes anti-tubulina. 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). La maitansina, un producto natural, inhibe la polimerización de tubulina produciendo un bloqueo mitótico y muerte celular. Así, el mecanismo de acción de la maitansina parece ser similar al de la vincristina y vinblastina. La maitansina, sin embargo, es aproximadamente 200 a 1.000 veces más citotóxica *in vitro* que estos alcaloides de la vinca. En otra realización específica, el fármaco es AEFP.
- 65 En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden conjugarse con otra molécula pequeña o toxinas de proteína, tales como, pero no se limitan a, abrina, brucina, cicutoxina, toxina diftérica, toxina botulínica, toxina Shiga, endotoxina,

toxina tetánica, toxina Pertussis, toxina del ántrax, toxina del cólera, falcarinol, toxina alfa, geldanamicina, gelonina, lotaustralina, ricina, estricnina y tetrodotoxina.

Ejemplos adicionales de toxinas, espaciadores, conectores, estiradores y similares, y sus estructuras, pueden encontrarse en las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2006/0074008 A1, 2005/0238649 A1, 2005/0123536 A1, 2005/0180972 A1, 2005/0113308 A1, 2004/0157782 A1, la patente de EE.UU. N.º 6.884.869 B2, la patente de EE.UU. N.º 5.635.483.

5

20

25

30

35

40

55

Como se trata en el presente documento, los compuestos usados para la conjugación con los conjugados de anticuerpo de la presente invención pueden incluir quimioterapéuticos convencionales, tales como doxorubicina, paclitaxel, carboplatino, melfalan, alcaloides de la vinca, metotrexato, mitomicina C, etopósido, y otros. Además, agentes potentes tales como análogos de CC-1065, caliqueamicina, maitansina, análogos de dolastatina 10, rizoxina y palitoxina pueden unirse a los anticuerpos usando los conectores condicionalmente estables para formar potentes inmunoconjugados.

En ciertas 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 invención, el agente citotóxico o citostático es MMAE. En otra realización específica de la invención, el agente citotóxico o citostático en AEFP. En otra realización específica de la invención, el agente citotóxico o citostático es MMAF.

En otras realizaciones, los anticuerpos de la presente invención están conjugados con un agente terapéutico o resto de fármaco que modifica una respuesta biológica dada. Agentes terapéuticos o restos de fármaco no debe interpretarse como limitados a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de Pseudomonas, toxina del cólera o toxina diftérica; una proteína tal como factor de necrosis tumoral, α-interferón, β-interferón, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador tisular del plasminógeno, un agente apoptósico, por ejemplo, TNF-α, TNF-β, AIM I (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-15 ("IL-15"), interleucina-12 ("IL-12"), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos ("GM-CSF") y factor estimulante de colonias de granulocitos ("GM-CSF")), o un factor de crecimiento (por ejemplo, hormona de crecimiento ("GH")).

En otras realizaciones, los anticuerpos de la presente invención están conjugados con un polipéptido que comprende restos de poli-arginina o poli-lisina. 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 poli-arginina 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 poli-lisina 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 de la presente invención se conjugan con un agente terapéutico tal como un material radiactivo o quelante macrocíclico útil para conjugar iones radiometálicos (véase anteriormente para ejemplos de materiales radiactivos). En ciertas realizaciones, el quelante macrocíclico es ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N",N"-tetraacético (DOTA) que puede unirse al anticuerpo mediante una molécula conectora. Tales moléculas conectoras, tratadas además en el presente documento más adelante, 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-.

En otras realizaciones, los anticuerpos de la presente invención están conjugados con un ácido nucleico. El ácido nucleico puede seleccionarse del grupo que consiste en ADN, ARN, ARN interferente pequeño (ARNip), microARN, miméticos de horquilla o de ácido nucleico 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 5000 o más pares de bases. En algunas realizaciones, el ácido nucleico conjugado es monocatenario. En realizaciones alternativas, el ácido nucleico conjugado es bicatenario.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico conjugado codifica un marco de lectura abierto. En algunas realizaciones, el marco de lectura abierto codificado por el ácido nucleico conjugado se corresponde con una proteína inductora de la apoptosis, una proteína viral, una enzima o una proteína supresora de tumores. Técnicas para la administración de tales ácidos nucleicos a las células pueden encontrarse en Song et al. Nature Biotechnology, 2005, Vol23:6 p709-717, y también la patente de EE.UU. N.º 6.333.396.

Técnicas para conjugar restos terapéuticos con anticuerpos son muy conocidas. Los restos pueden conjugarse con

anticuerpos por cualquier método conocido en la técnica, que incluye, pero no se limita a, enlace aldehído/Schiff, enlace sulfhidrilo, enlace lábil a ácidos, enlace cis-aconitilo, enlace hidrazona, enlace enzimáticamente degradable (véase generalmente Garnett, 2002, Adv. Drug Deliv. Rev. 53:171-216). Técnicas adicionales para conjugar restos terapéuticos con anticuerpos son muy conocidas, véanse, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (2ª Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy" en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985) y Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev. 62:119-58. Métodos de fusion o conjugación de anticuerpos con restos de polipéptido son conocidos 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; EP 307.434; EP 367.166; publicaciones internacionales N.º WO 96/04388 y WO 91/06570; Ashkenazi et al., 1991, PNAS 88: 10535-10539; Zheng et al., 1995, J. Immunol. 154:5590-5600; y Vil et al., 1992, PNAS 89:11337-11341. La fusión de un anticuerpo con un resto no necesita ser necesariamente directa, pero puede producirse mediante secuencias conectoras. Tales moléculas conectoras 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.

20

25

30

45

55

60

65

10

15

Pueden tomarse dos enfoques para minimizar la actividad del fármaco fuera de las células que son elegidas como diana por los conjugados de anticuerpo de la invención: primero, un anticuerpo que se une al receptor de membrana celular, pero puede usarse receptor no soluble, de manera que el fármaco, que incluye fármaco producido por las acciones de la enzima conversora de profármaco, se concentra en la superficie celular del linfocito activado. Otro enfoque para minimizar la actividad de fármacos unidos a los anticuerpos de la invención es conjugar los fármacos de un modo que reduzcan su actividad, a menos que se hidrolicen o escindan del anticuerpo. Tales métodos emplearían unir el fármaco a los anticuerpos con conectores que son sensibles al entorno en 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 conjugado que el conjugado encuentra cuando se recoge por el linfocito activado (por ejemplo, en el entorno endosómico o, por ejemplo en virtud de la sensibilidad al pH o sensibilidad a proteasa, en el entorno lisosómico). Ejemplos de conectores que pueden usarse en la presente invención se desvelan en las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2005/0123536 A1, 2005/0180972 A1, 2005/0113308 A1, 2004/0157782 A1, y la patente de EE.UU. N.º 6.884.869 B2.

En una realización, el conector es una hidrazona lábil a ácidos o grupo hidrazida que se hidroliza en el lisosoma (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.622.929). En realizaciones alternativas, los fármacos pueden unirse a los anticuerpos mediante otros conectores lábiles a ácidos, 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). Tales conectores son relativamente estables bajo condiciones de pH neutro, tales como aquellas en la sangre, pero son inestables por debajo de pH 5, el pH aproximado del lisosoma.

En otras realizaciones, los fármacos se unen a los anticuerpos de la invención usando espaciadores de péptido que se escinden por proteasas intracelulares. Enzimas diana incluyen catepsinas B y D y plasmina, todas las cuales son conocidas por hidrolizar derivados de fármaco de dipéptido produciendo la liberación de fármaco activo dentro de las células diana (Dubowchik y Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123). La ventaja de uso de la liberación de fármaco proteolítico intracelular es que el fármaco es altamente atenuado cuando se conjuga y las estabilidades en suero de los conjugados pueden ser extraordinariamente altas.

En todavía otras realizaciones, el conector es un conector de malonato (Johnson et al., 1995. Anticancer Res. 15:1387-93), un conector de maleimidobenzoílo (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(103:1305-12).

Como se trata anteriormente, los conjugados de anticuerpo se preparan generalmente conjugando un compuesto o un fármaco con un anticuerpo mediante un conector. Puede usarse cualquier conector que se conoce en la técnica en los conjugados de la presente invención, por ejemplo, agentes bifuncionales (tales como dialdehídos o imidoésteres) o conectores de hidrazona ramificados (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.824.805).

En ciertas realizaciones no limitantes de la invención, la región de conector entre el resto de conjugado y el resto de anticuerpo es escindible bajo ciertas condiciones, en las que la escisión o hidrólisis del conector libera el resto de fármaco del resto de anticuerpo. En algunas realizaciones, el conector es sensible a la escisión o hidrólisis bajo condiciones intracelulares.

En una realización, la región de conector entre el resto de conjugado y el resto de anticuerpo es escindible si el pH cambia un cierto valor o supera un cierto valor. En otra realización de la invención, el conector es escindible en el medio del lisosoma, por ejemplo, en condiciones ácidas (es decir, a pH de aproximadamente 5-5,5 o menos). En otras realizaciones, el conector es un conector de peptidilo que se escinde por una enzima peptidasa o proteasa,

que incluye, pero no se limita a, una enzima proteasa lisosómica, una proteasa asociada a membrana, una proteasa intracelular o una proteasa endosómica. Normalmente, el conector tiene al menos dos aminoácidos de longitud, más normalmente al menos tres aminoácidos de longitud. Por ejemplo, puede usarse un conector de peptidilo que es escindible por catepsina-B (por ejemplo, un conector de Gly-Phe-Leu-Gly), una proteasa dependiente de tiol que se expresa altamente en tejido canceroso. Otros de tales conectores se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N.º 6.214.345.

En otras realizaciones no mutualmente exclusivas de la invención, el conector por el que el anticuerpo y el compuesto de un conjugado de anticuerpo de la invención se conjugan promueve la internalización celular. En ciertas realizaciones, el conector-resto de fármaco promueve la internalización celular. En ciertas realizaciones, el conector se elige de forma que la estructura del conjugado de anticuerpo entero promueva la internalización celular. En una realización, el conector es un conector de tioéter (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.622.929 a Willner et al., que se incorpora por referencia en el presente documento en su totalidad). En otra realización, el conector es un conector de hidrazona (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 5.122.368 a Greenfield et al. y 5.824.805 a King et al).

En todavía otras realizaciones, el conector es un conector de disulfuro. Se conocen en la técnica una variedad de conectores de disulfuro, que incluyen, pero no se limitan a, aquellos que pueden formarse usando SATA (N-succinimidil-S-acetiltioacetato), SPDP (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato), SPDB (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)butirato) y SMPT (N-succinimidil-oxicarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridil-ditio)tolueno). SPDB y SMPT (véanse, por ejemplo, Thorpe et al., 1987, Cancer Res., 47:5924-5931; Wawrzynczak et al., 1987, en Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimagery and Therapy of Cancer, ed. C. W. Vogel, Oxford U. Press, pp. 28-55; véase también la patente de EE.UU. N.º 4.880.935 a Thorpe et al.).

Una variedad de conectores que puede usarse con las composiciones y métodos de la presente invención se describe en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º US 2004/0018194 A1.

En todavía otras realizaciones de la presente invención, la unidad de conector de un conjugado de anticuerpo une el agente citotóxico o citostático (unidad de fármaco; -D) y la unidad de anticuerpo (-A). En ciertas realizaciones, la unidad de conector tiene la fórmula general:

i. -Ta-Ww-Yy- en la que:

ii. -T- es una unidad de estirador:

iii. a es 0 o 1;

5

10

15

20

30

35

55

65

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

v. w es independientemente un número entero que oscila de 2 a 12;

vi. -Y- es una unidad de espaciador; y

vii. y es 0, 1 o 2.

40 La unidad de estirador (-T-), cuando está presente, une la unidad de anticuerpo con una unidad de aminoácido (--W-). Grupos funcionales útiles que pueden estar presentes en un anticuerpo, tanto naturalmente como mediante manipulación química, incluyen, pero no se limitan a, sulfhidrilo, amino, hidroxilo, el grupo hidroxilo anomérico de un hidrato de carbono, y carboxilo. Los anticuerpos manipulados con cisteína de la invención presentan al menos un grupo sulfhidrilo libre para la conjugación. Otros métodos de introducción de grupos sulfhidrilo libres implican la
 45 reducción de los enlaces disulfuro intramoleculares de un anticuerpo. Alternativamente, los grupos sulfhidrilo pueden generarse haciendo reaccionar un grupo amino de un resto de lisina de un anticuerpo con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) u otros reactivos que generan sulfhidrilo.

La unidad de aminoácido (--W--) une la unidad de estirador (-T-) con la unidad de espaciador (--Y--) si la unidad de espaciador está presente, y une la unidad de estirador con el agente citotóxico o citostático (unidad de fármaco; D) si está ausente la unidad de espaciador.

En algunas realizaciones, -W_w- es una unidad de dipéptido, teripéptido, tetrapéptido, pentapéptido, hexapéptido, heptapéptido, octapéptido, nonapéptido, decapéptido, undecapéptido o dodecapéptido. La unidad de aminoácido de la unidad de conector puede escindirse enzimáticamente por una enzima que incluye, pero no se limita a, una proteasa asociada a tumor para liberar la unidad de fármaco (-D) que se protona *in vivo* tras la liberación para proporcionar un fármaco citotóxico (D).

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

La unidad de espaciador (--Y--), cuando está presente, une una unidad de aminoácido con la unidad de fármaco. Las unidades de espaciador son de dos tipos generales: auto-inmolativas y no auto-inmolativas. Una unidad de espaciador no auto-inmolativa es una en la que parte o toda la unidad de espaciador sigue unida a la unidad de fármaco después de la escisión enzimática de una unidad de aminoácido del conjugado anticuerpo-conector-fármaco o el compuesto fármaco-conector. Ejemplos de una unidad de espaciador no auto-inmolativa incluyen, pero

no se limitan a, una unidad de espaciador (glicina-glicina) y una unidad de espaciador de glicina. Cuando un conjugado anticuerpo-conector-fármaco de la invención que contiene una unidad de espaciador glicina-glicina o una unidad de espaciador de glicina experimenta escisión enzimática mediante una proteasa asociada a célula tumoral, una proteasa asociada a célula de cáncer o una proteasa asociada a linfocitos, una glicina-glicina-resto de fármaco o una glicina-resto de fármaco se escinde de A-T-W_w--. Para liberar el fármaco, una reacción de hidrólisis independiente debe tener lugar dentro de la célula diana para escindir el enlace glicina-unidad de fármaco.

Otros ejemplos de espaciadores auto-inmolativos incluyen, pero no se limitan a, compuestos aromáticos que son electrónicamente equivalentes al grupo PAB tales como derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol (véase Hay et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1999, 9, 2237, para ejemplos) y orto o para-aminobencilacetales. Pueden usarse espaciadores que experimentan ciclación fácil tras la hidrólisis del enlace amida, tales como amidas de ácido 4aminobutírico sustituidas y sin sustituir (Rodrigues et al., Chemistry, Biology, 1995, 2, 223), sistemas de anillos apropiadamente sustituidos (Storm, et al., J. Amer. Chem. Soc., 1972, 94, 5815) y amidas de ácido 2aminofenilpropiónico (Amsberry, et al., J. Org. Chem., 1990, 55, 5867). La eliminación de fármacos que contienen amina que están sustituidos en la posición α de glicina (Kingsbury, et al., J. Med. Chem., 1984, 27, 1447) también son ejemplos de estrategias de espaciador auto-inmolativas que pueden aplicarse a los conjugados anticuerpoconector-fármaco de la invención.

Métodos de conjugación de una molécula heteróloga con un anticuerpo

Moléculas heterólogas, tales como aquellas descritas en el presente documento, pueden conjugarse eficazmente con anticuerpos de la invención mediante los grupos tiol libres provistos de los restos de cisteína manipulados. En un aspecto, la invención proporciona métodos de conjugación eficiente de las moléculas heterólogas con anticuerpos manipulados con cisteína. En una realización, la conjugación de una molécula heteróloga puede producirse en un grupo tiol libre provisto de al menos un resto de cisteína manipulado seleccionado de las posiciones 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138 y 139 del dominio CH1 de un anticuerpo. En otras realizaciones, el método de la invención comprende la conjugación eficiente de una molécula heteróloga en un grupo tiol libre provisto de al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, o al menos ocho restos de cisteína manipulados seleccionados de las posiciones 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138 y 139 del dominio CH1 de un anticuerpo.

La manipulación de restos de cisteína que no existen de forma natural en anticuerpos puede alterar el emparejamiento por disulfuro de las cadenas pesadas y ligeras de forma que un resto de cisteína que existe de forma natural que era parte de un enlace disulfuro se libere y presente un grupo tiol libre capaz de conjugación. En otra realización, el método comprende la conjugación eficiente de una molécula heteróloga con un anticuerpo modificado con cisteína en un grupo tiol libre no provisto de al menos un resto de cisteína manipulado seleccionado de las posiciones 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138 y 139 del dominio CH1 de un anticuerpo.

La presencia de grupos tiol libres en los anticuerpos puede determinarse por diversas técnicas aceptadas en la 40 técnica, tales como aquellas descritas en el Ejemplo 1. La eficiencia de conjugación de una molécula heteróloga con un anticuerpo puede determinarse evaluando la presencia de tioles libres que quedan después de la reacción de conjugación. En una realización, la invención proporciona un método de conjugación eficiente de una molécula heteróloga con un anticuerpo modificado con cisteína. En una realización, la eficiencia de conjugación es al menos del 5 %, al menos del 10 %, al menos del 15 %, al menos del 20 %, al menos del 25 %, al menos del 30 %, al menos 45 del 35 %, al menos del 40 %, al menos del 45 %, al menos del 50 %, al menos del 55 %, al menos del 60 %, al menos del 70 %, al menos del 75 %, al menos del 80 %, al menos del 85 %, al menos del 90 %, al menos del 95 %, al menos del 98 % o más como se mide por el nivel de grupos tiol libres que quedan después de la reacción de conjugación.

50 En otra realización, la invención proporciona un método de conjugación de una molécula heteróloga con un anticuerpo en el que el anticuerpo comprende al menos una sustitución de aminoácidos, tal que se formen 2 o más grupos tiol libres. En otra realización, el método comprende un anticuerpo en el que el anticuerpo comprende al menos una sustitución de aminoácidos, tal que se formen al menos 2, al menos 4, al menos 6, al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 14, al menos 16 o más grupos tiol libres.

Los anticuerpos de la invención capaces de conjugación pueden contener restos de cisteína libres que comprenden grupos sulfhidrilo que están bloqueados o protegidos. Tales protecciones incluyen proteínas, péptidos, iones y otros materiales que interaccionan con el grupo sulfhidrilo y previenen o inhiben la formación de conjugados. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención pueden requerir la desprotección antes de una reacción de conjugación. En realizaciones específicas, los anticuerpos de la invención no están protegidos y muestran un grupo sulfhidrilo libre capaz de conjugación. En otras realizaciones específicas, los anticuerpos de la invención se someten a una reacción de desprotección que no altera o reordena los enlaces disulfuro que existen de forma natural, en otras realizaciones, los anticuerpos de la invención se someten a una reacción de desprotección como se presenta en los Ejemplos 9 o 10,

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención pueden someterse a reacciones de conjugación en las que

26

55

60

65

5

10

15

20

25

30

el anticuerpo que va a conjugarse está presente a 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 o más alta.

Métodos de uso de los conjugados de anticuerpo

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Se contempla que los conjugados de anticuerpo de la presente invención puedan usarse para tratar diversas enfermedades o trastornos, por ejemplo, caracterizadas por la expresión en exceso de un antígeno de tumor. Afecciones o trastornos hiperproliferativos a modo de ejemplo incluyen tumores benignos o malignos, leucemia y tumores malignos linfoides. Otros incluyen tumores malignos neuronales, de la glía, astrocitales, hipotalámicos, glandulares, macrofágicos, epiteliales, endoteliales y del estroma. Otros cánceres 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, ovario, testículos, tiroides, sangre, ganglios linfáticos, riñón, hígado, páncreas, cerebro o sistema nervioso central. Ejemplos de cánceres que pueden prevenirse, gestionarse o tratarse o mejorarse según los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, cáncer de la cabeza, cuello, ojo, boca, garganta, esófago, pecho, hueso, pulmón, colon, recto, estómago, próstata, mama, ovario, riñón, hígado, páncreas y cerebro. Cánceres adicionales incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: leucemias tales como, pero no se limitan a, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemias mielocíticas agudas tales como leucemias mieloblásticas, promielocíticas, mielomonocíticas, monocíticas, eritroleucemia y síndrome mielodisplásico, leucemias crónicas tales como, pero no se limitan a, leucemia mielocítica crónica (granulocítica), leucemia linfocítica crónica, leucemia de células pilosas; policitemia vera; linfomas tales como, pero no se limitan a, enfermedad de Hodgkin, enfermedad no Hodgkin; mielomas múltiples tales como, pero no se limitan a, melanoma múltiple asintomático, mieloma no secretor, mieloma osteosclerótico, leucemia de células plasmáticas, plasmacitoma solitario y plasmacitoma extramedular; macroglobulinemia de Waldenstrom; gammapatía monoclonal de significación indeterminada; gammapatía monoclonal benigna; enfermedad de las cadenas pesadas; cáncer de huesos y sarcomas de tejido conjuntivo tales como, pero no se limitan a, sarcoma de huesos, enfermedad ósea por mieloma, mieloma múltiple, osteosarcoma óseo inducido por colesteatoma, enfermedad ósea de Paget, osteosarcoma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, tumor maligno de células gigantes, fibrosarcoma de hueso, cordoma, sarcoma periosteal, sarcomas de tejido blando, angiosarcoma (hemangiosarcoma), fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiosarcoma, liposarcoma. linfangiosarcoma, neurilemoma, rabdomiosarcoma y sarcoma sinovial; tumores cerebrales tales como, pero no se limitan a, glioma, astrocitoma, glioma de tronco encefálico, ependimoma, oligodendroglioma, tumor no de la glía, neurinoma acústico, craneofaringioma, meduloblastoma, meningioma, pineocitoma, pineoblastoma y linfoma cerebral primario; cáncer de mama que incluye, pero no se limita a, adenocarcinoma, carcinoma lobular (células pequeñas), carcinoma intraductal, cáncer medular de mama, cáncer mucinoso de mama, cáncer tubular de mama, cáncer papilar de mama, enfermedad de Paget (que incluye enfermedad juvenil de Paget) y cáncer inflamatorio de mama; cáncer suprarrenal tal como, pero no se limita a, feocromocitoma y carcinoma adrenocortical; cáncer de tiroides tal como, pero no se limita a, cáncer papilar o folicular de tiroides, cáncer medular de tiroides y cáncer anaplásico de tiroides; cáncer pancreático tal como, pero no se limita a, insulinoma, gastrinoma, glucagonoma, vipoma, tumor secretor de somatostatina y tumor carcinoide o de células de los islotes; cánceres pituitarios tales como, pero limitado a, enfermedad de Cushing, tumor secretor de prolactina, acromegalia y diabetes insípida; cánceres de ojo tales como, pero no se limitan a, melanoma ocular tal como melanoma del iris, melanoma coroideo y melanoma de cuerpos ciliares y retinoblastoma; cánceres vaginales tales como carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma y melanoma; cáncer vulvar tal como carcinoma de células escamosas, melanoma, adenocarcinoma, carcinoma de células basales, sarcoma y enfermedad de Paget; cánceres de cuello uterino tales como, pero no se limitan a, carcinoma de células escamosas, y adenocarcinoma; cánceres uterinos tales como, pero no se limitan a, carcinoma endometrial y sarcoma uterino; cánceres de ovario tales como, pero no se limitan a, carcinoma epitelial de ovario, tumor limítrofe, tumor de células germinativas y tumor del estroma; cánceres esofágicos tales como, pero no se limitan a, cáncer escamoso, adenocarcinoma, carcinoma quístico adenoide, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma adenoescamoso, sarcoma, melanoma, plasmacitoma, carcinoma verrugoso y carcinoma de células en avena (células pequeñas); cánceres de estómago tales como, pero no se limitan a, adenocarcinoma, fungante (polipoide), ulcerante, de dispersión superficial, de dispersión difusa, linfoma maligno, liposarcoma, fibrosarcoma y carcinosarcoma; cánceres de colon; cánceres rectales; cánceres de hígado tales como, pero no se limitan a, carcinoma hepatocelular y hepatoblastoma, cánceres de vesícula biliar tales como adenocarcinoma; colangiocarcinomas tales como, pero no se limitan a, papilar, nodular y difuso; cánceres de pulmón tales como cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de células escamosas (carcinoma epidermoide), adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y cáncer de pulmón de células pequeñas; cánceres testiculares tales como, pero no se limitan a, tumor germinal, seminoma, anaplásico, clásico (típico), espermatocítico, no seminoma, carcinoma embrionario, carcinoma por teratoma, coriocarcinoma (tumor del saco vitelino), cánceres de próstata tales como, pero no se limitan a, adenocarcinoma, leiomiosarcoma y rabdomiosarcoma; cánceres de pene; cánceres orales tales como, pero no se limitan a, carcinoma de células escamosas; cánceres basales; cánceres de la glándula salival tales como, pero no se limitan a, adenocarcinoma, carcinoma mucoepidermoide y carcinoma adenoide quístico; cánceres de faringe tales como, pero no se limitan a, cánceres de células escamosas y verrugosos; cánceres de piel tales como, pero no se limitan a, carcinoma de células basales, carcinoma y melanoma de células escamosas, melanoma de dispersión superficial, melanoma nodular, melanoma lentigo maligno, melanoma lentiginoso acral; cánceres de riñón tales como, pero no se limitan a, cáncer de células renales, adenocarcinoma, hipernefroma, fibrosarcoma, cáncer de células de transición (pelvis renal y/o uréter); tumor de Wilms; cánceres de vejiga tales como, pero no se limitan a, carcinoma de células de transición, cáncer de células escamosas, 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 tales trastornos véanse Fishman et al., 1985, Medicine, 2d Ed., J. B. Lippincott Co., Philadelphia and 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 producidos por aberraciones en la apoptosis puedan también ser tratados por los métodos y composiciones de la invención. Tales cánceres pueden incluir, pero no limitarse a, linfomas foliculares, carcinomas con mutaciones p53, tumores dependientes de hormonas de la mama, próstata y ovario, y lesiones precancerosas tales como poliposis adenomatosa familiar, y síndromes mielodisplásicos.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

65

Las proteínas de la invención y composiciones que comprenden las mismas son útiles para muchos fines, por ejemplo, como terapéuticos contra una amplia variedad de enfermedades y trastornos crónicos y agudos que incluyen, pero no se limitan a, trastornos autoinmunitarios y/o inflamatorios, que incluyen síndrome de Sjogren, artritis reumatoide, lupus, psoriasis, aterosclerosis, retinopatías diabéticas y otras, fibroplasia retrolental, degeneración macular senil, glaucoma neovascular, hemangiomas, hiperplasias de la tiroides (incluyendo enfermedad de Graves), trasplante de cornea y de 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 de órganos, lesión por reperfusión, lesión de la médula espinal y rechazo de aloinjerto. Otros ejemplos de trastornos autoinmunitarios y/o inflamatorios incluyen, pero no se limitan a, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípidos, enfermedad autoinmunitaria de Addison, enfermedades autoinmunitarias de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, ooforitis y orquitis autoinmune, síndrome de Sjogren, psoriasis, aterosclerosis, retinopatías diabéticas y otras, fibroplasia retrolental, degeneración macular senil, glaucoma neovascular, hemangiomas, hiperplasias de la tiroides (incluyendo enfermedad de Graves), trasplante de cornea y de 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 de órganos, lesión por reperfusión, lesión de la médula espinal y rechazo de aloinjerto, trombocitopenia autoinmune, enfermedad de Behcet, penfigoide bulloso, cardiomiopatía, dermatitis por celiaquía, síndrome de disfunción inmunitaria por fatiga crónica (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de CREST, enfermedad de aglutininas frías, enfermedad de Crohn, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), neuropatía de IgA, artritis juvenil, liquen plano, lupus eritematoso, enfermedad de Ménière, enfermedad de tejido conjuntivo mixto, esclerosis múltiple, diabetes mellitus de 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, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjogren, síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis tales como vasculitis por dermatitis herpetiforme, vitíligo y granulomatosis de Wegener. Ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen, pero no se limitan a, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía indiferenciada, artropatía indiferenciada, artritis, osteólisis inflamatoria e inflamación crónica resultante de infecciones crónicas virales o por bacterias. Las composiciones y métodos de la invención pueden usarse con una o más terapias convencionales que se usan para prevenir, gestionar o tratar las enfermedades anteriores.

La invención también proporciona métodos de uso de anticuerpos y/o conjugados de anticuerpo para inactivar diversos agentes infecciosos tales como virus, hongos, microbios eucariotas y bacterias. En algunas realizaciones, los anticuerpos o conjugados de anticuerpo de la invención pueden usarse para inactivar RSV, hMPV, PIV o virus de la gripe. En otras realizaciones, los anticuerpos y/o conjugados de anticuerpo de la invención pueden usarse para inactivar patógenos fúngicos, tales como, pero no se limitan a, miembros de los géneros *Naegleria*, *Aspergillus*, *Blastomyces, Histoplasma, Candida* o *Tinea*. En otras realizaciones, los anticuerpos y/o conjugados de anticuerpo de la invención pueden usarse para inactivar microbios eucariotas, tales como, pero no se limitan a, miembros de los géneros *Giardia, Toxoplasma, Plasmodium, Trypanosoma y Entamoeba*. En otras realizaciones, los anticuerpos y/o conjugados de anticuerpo de la invención pueden usarse para inactivar patógenos bacterianos, tales como, pero no se limitan a, miembros de los géneros *Staphylococcus, Streptococcus, Pseudomonas, Clostridium, Borrelia, Vibro* y *Neisseria*.

Los anticuerpos y/o conjugados de anticuerpo de la invención y composiciones que comprenden los mismos son útiles para muchos fines, por ejemplo, como terapéuticos contra una amplia gama de enfermedades y trastornos crónicos y agudos que incluyen, pero no se limitan a, enfermedad infecciosa, que incluye enfermedades virales, bacterianas y fúngicas. Ejemplos de patógenos virales incluyen, pero no se limitan a: adenoviridae (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, fase enterobacteriana MS2, allolevirus), poxviridae (por ejemplo, cordopoxvirinae, parapoxvirus, avipoxvirus, capripoxvirus, leporipoxvirus, suipoxvirus, molluscipoxvirus y entomopoxvirinae), papovaviridae (por ejemplo, virus del polioma y virus del papiloma), paramixoviridae (por ejemplo, paramixovirus, virus paragripal 1, mobilivirus (por ejemplo, virus del sarampión), rubulavirus (por ejemplo, virus de las paperas), pneumonovirinae (por ejemplo, virus de la neumonía, virus respiratorio sincitial humano) y metapneumovirus (por ejemplo, virus de la neumonía aviar y virus de la metaneumonía humana)), picornaviridae (por ejemplo, enterovirus, rinovirus, hepatovirus (por ejemplo, virus de la hepatitis A humana), cardiovirus y aftovirus), reoviridae (por ejemplo, ortoreovirus, orbivirus, rotavirus, cipovirus, fijivirus, fitoreovirus y oryzavirus), retroviridae (por ejemplo, retrovirus tipo B de mamífero, retrovirus tipo C de 10 mamífero, 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 2), espumavirus), flaviviridae (por ejemplo, virus de la hepatitis C), hepadnaviridae (por ejemplo, virus de la hepatitis B), togaviridae (por ejemplo, alfavirus (por ejemplo, virus de Sindbis) y rubivirus (por ejemplo, virus de la rubeola)), rabdoviridae (por ejemplo, vesiculovirus, lyssavirus, ephemerovirus, cytorhabdovirus y necleorhabdovirus), arenaviridae (por ejemplo, arenavirus, virus de la 15 coriomeningitis linfocítica, virus de Ippy y virus de Lassa) y coronaviridae (por ejemplo, coronavirus y torovirus). Ejemplos de patógenos bacterianos incluyen, pero no se limitan a: pero no se limitan a, la familia de Aquaspirillum, familia de Azospirillum, familia de Azotobacteraceae, familia de Bacteroidaceae, especies de Bartonella, familia de Bdellovibrio, especies de Campylobacter, especies de Chlamydia (por ejemplo, Chlamydia pneumoniae), clostridium, familia de Enterobacteriaceae (por ejemplo, especies de Citrobacter, Edwardsiella, Enterobacter aerogenes, especies de Erwinia, Escherichia coli, especies de Hafnia, especies de Klebsiella, especies de Morganella, Proteus 20 vulgaris, Providencia, especies de Salmonella, Serratia marcescens y Shigella flexneri), familia de Gardinella, Haemophilus influenzae, familia de Halobacteriaceae, familia de Helicobacter, familia de Legionallaceae, especies de Listeria, familia de Methylococcaceae, Mycobacteria (por ejemplo, Mycobacterium tuberculosis), familia de Neisseriaceae, familia de Oceanospirillum, familia de Pasteurellaceae, especies de Pneumococcus, especies de Pseudomonas, familia de Rhizobiaceae, familia de Spirillum, familia de Spirosomaceae, Staphylococcuss (por 25 ejemplo, Staphylococcus aureus resistente a meticilina y Staphylococcus pyrogenes), Streptococcus (por ejemplo, Streptococcus enteritidis, Streptococcus fasciae y Streptococcus pneumoniae), familia de Vampirovibr Helicobacter y familia de Vampirovibrio. 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, 30 Candida parapsilosis, Candida pseudotropicalis, Candida quillermondii, 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 35 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 Zygomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes, Deuteromycetes y Oomycetes.

La invención también proporciona métodos de uso de anticuerpos para agotar una población de células. En una realización, los métodos de la invención son útiles en el agotamiento de los siguientes tipos de células: eosinófilo, basófilo, neutrófilo, linfocito T, linfocito B, mastocito, monocitos, célula endotelial y célula tumoral.

Los anticuerpos de la invención y conjugados de los mismos también pueden ser útiles en el diagnóstico y la detección de enfermedades o síntomas de las mismas. En otra realización, las composiciones de la invención pueden ser útiles en la monitorización de la progresión de la enfermedad. En otra realización, las composiciones de la invención pueden ser útiles en la monitorización de pautas de tratamiento. En otra realización, las composiciones de la invención son útiles para diagnosticar una aplicación ex vivo, tal como un kit de diagnóstico.

Las composiciones de la invención pueden ser útiles en la visualización de antígenos diana. En algunas realizaciones, los antígenos diana son receptores de la superficie celular que 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 o conjugados anticuerpo-fármaco de la invención una vez unidos, se internalizan en células en las que la internalización es al menos aproximadamente el 10 %, al menos del aproximadamente el 20 %, al menos del aproximadamente el 30 %, al menos del aproximadamente el 40 %, al menos del aproximadamente el 70 %, al menos del aproximadamente el 80 %, o al menos aproximadamente el 90 %, al menos del aproximadamente el 100 %, al menos del aproximadamente el 110 %, al menos del aproximadamente el 130 %, al menos del aproximadamente el 150 %, al menos del aproximadamente el 160 %, o al menos aproximadamente el 140 %, al menos del aproximadamente el 150 %, al menos del aproximadamente el 160 %, o al menos aproximadamente el 170 % superior a anticuerpos de control como se describe en el presente documento.

En otra realización, los anticuerpos de la invención una vez unidos, se internalizan en células en las que la internalización es el 1-10 %, 10-20 %, 20 - 30 %, 30- 40 %, 40- 50 %, 50-60 %, 60-70 %, 70-80 %, 80-90 %, 90-100 %, 100-110 %, 110-120 %, 120-130 %, 130-140 %, 140-150 %, 150-160 %, 160-170 % superior a anticuerpos de control como se describe en el presente documento.

En otra realización, los anticuerpos de la invención una vez unidos, se internalizan en células en las que la internalización es el 1-10%, 10-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90%, 90-100%, 100-110%, 110-120%, 120-130%, 130-140%, 140-150%, 150-160%, 160-170% superior a anticuerpos de control como se ha determinado por el ensayo de internalización usando un anticuerpo secundario.

Composiciones farmacéuticas

5

10

40

55

60

65

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo, pero no se limita a, una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de anticuerpos, o conjugados de anticuerpo de la presente invención, formulada junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones pueden incluir uno o una combinación de, por ejemplo, pero no se limita a, dos o más anticuerpos diferentes de la invención. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la invención puede comprender una combinación de anticuerpos que se unen a diferentes epítopes en el antígeno diana o que tienen actividades complementarias.

- Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden administrarse en terapia de combinación, tal como, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un anticuerpo de la presente invención combinado con al menos otra terapia, en la que la terapia puede ser cirugía, inmunoterapia, quimioterapia, tratamiento con radiación o terapia con fármacos.
- Los compuestos farmacéuticos de la invención pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Ejemplos de tales sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Sales de adición de ácido incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, además de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos mono- y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanoicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Sales de adición de base incluyen aquellas derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, además de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.
- Una composición farmacéutica de la invención también puede incluir un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.
 - Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención 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 oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y por el uso de tensioactivos.
- 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 por procedimientos de esterilización como por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenolsórbico, y similares. También puede desearse incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico y similares en las composiciones. Además, puede provocarse la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable por la inclusión de agentes que retrasan la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.
 - Las composiciones farmacéuticas normalmente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada a alta concentración de fármaco. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por 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 provocarse incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por microfiltración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros componentes

requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado a vacío y secado por congelación (liofilización) que dan un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional de una solución previamente filtrada por esterilización del mismo.

En una realización, las composiciones de la invención 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 son liberadas cuando los microorganismos se descomponen o mueren. Sustancias pirogénicas también incluyen sustancias termoestables inductoras de fiebre (glucoproteínas) de la membrana externa de bacterias y otros microorganismos. Ambas de estas sustancias pueden producir fiebre, hipotensión y choque si se administran a los seres humanos. Debido a los posibles efectos perjudiciales, es ventajoso eliminar incluso cantidades bajas de endotoxinas de soluciones de fármaco farmacéutico administradas por vía intravenosa. La Agencia Estadounidense del Medicamento ("FDA") ha establecido un límite superior de 5 unidades de endotoxina (UE) por dosis por kilogramo de peso corporal en un único periodo de una hora para administraciones de fármaco intravenoso (The United States Pharmacopeial Convention, Pharmacopeial Forum 26 (1):223 (2000)). Cuando las proteínas terapéuticas se administran en cantidades de varios cientos o miles de miligramos por kilogramo de peso corporal es ventajoso eliminar cantidades incluso traza de endotoxina. En una realización, los niveles de endotoxina y de pirógeno 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 endotoxina y de pirógeno 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 invención comprende administrar una composición en la que dicha administración es oral, parenteral, intramuscular, intranasal, vaginal, rectal, lingual, sublingual, bucal, intrabucal, intravenosa, cutánea, subcutánea o transdérmica.

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

Dosificación / administración

5

10

15

20

30

35

40

60

Para preparar composiciones farmacéuticas o estériles que incluyen un anticuerpo o conjugado de anticuerpo de la invención, el anticuerpo/conjugado de anticuerpo se mezcla con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Pueden prepararse formulaciones de agentes terapéuticos y de diagnóstico mezclando con vehículos, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables en forma de, por ejemplo, polvos liofilizados, suspensiones, soluciones acuosas, lociones o suspensiones (véase, por ejemplo, Hardman, et al. (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y.; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New 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 and Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.).

La selección de una pauta posológica para un terapéutico depende de varios factores, que incluyen el suero o la tasa de renovación de tejido de la entidad, el nivel de síntomas, la inmunogenicidad de la entidad y la accesibilidad de las células diana en la matriz biológica. En ciertas realizaciones, una pauta posológica maximiza la cantidad de terapéutico administrado al paciente de acuerdo con un nivel aceptable de efectos secundarios. Por consiguiente, la cantidad de biológico administrado depende en parte de la entidad particular y la gravedad de la afección que está tratándose. Está disponible orientación en la selección de dosis apropiadas de anticuerpos, citocinas y moléculas pequeñas (véase, por ejemplo, Wawrzynczak (1996) Antibody Therapy, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (ed.) (1991) Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis, Marcel Dekker, New York, N.Y.; Bach (ed.) (1993) Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases, Marcel Dekker, New 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. 348:24-32; Lipsky, et al. (2000) New Engl. J. Med. 343:1594-1602).

La determinación de la dosis apropiada se hace por el profesional clínico, por ejemplo, usando parámetros o factores conocidos o que se sospecha en la materia que afectan el tratamiento o se predice que afectan el tratamiento. Generalmente, la dosis empieza con una cantidad algo inferior a la dosis óptima y aumenta pequeños incrementos a partir de aquí hasta que se logra el efecto deseado u óptimo con respecto a cualquier efecto secundario negativo. Medidas de diagnóstico importantes incluyen aquellas de síntomas de, por ejemplo, la inflamación o nivel de citocinas inflamatorias producidas.

Pueden variarse los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención para obtener una cantidad de principio activo que es eficaz para lograr la respuesta terapéutica

deseada para un paciente particular, composición y modo de administración, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o el éster, sal o amida de las mismas, la vía de administración, el momento de administración, la tasa de eliminación del compuesto particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, afección, salud general e historia médica previa del paciente que está tratándose, y factores similares muy conocidos en las artes médicas.

5

55

Las composiciones que comprenden anticuerpos o conjugados de anticuerpo de la invención pueden proporcionarse 10 por infusión continua, o por dosis a intervalos de, por ejemplo, un día, una semana, o 1-7 veces por semana. Las dosis pueden proporcionarse por vía intravenosa, subcutánea, tópica, oral, nasal, rectal, intramuscular, intracerebral o por inhalación. Un protocolo de dosis específico es uno que implica la máxima dosis o frecuencia de dosis que evita efectos secundarios no deseables significativos. Un dosis semanal total puede ser al menos 0,05 μg/kg de peso corporal, al menos 0,2 µg/kg, al menos 0,5 µg/kg, al menos 1 µg/kg, al menos 10 µg/kg, al menos 100 µg/kg, al 15 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 (véase, 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. (20003) Cancer Immunol. Immunother. 52:133-144). La dosis puede ser al menos 15 μg, al menos 20 μg, al menos 25 μg, al menos 30 μg, al menos 35 μg, al menos 40 μg, al menos 45 μg, al menos 50 μg, al menos 55 μg, al menos 60 μg, al menos $65~\mu g$, al menos $70~\mu g$, al menos $75~\mu g$, al menos $80~\mu g$, al menos $85~\mu g$, al menos $90~\mu g$, al menos $95~\mu g$, o al 20 menos 100 µg. La dosis administrada a un sujeto puede ascender a al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12, o más.

Para anticuerpos o conjugados de anticuerpo de la invención, la dosificación administrada a un paciente puede ser 0,0001 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal del paciente. La dosificación puede ser 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 de peso corporal del paciente.

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

Dosis unitarias de los anticuerpos o conjugados de anticuerpo de la invención pueden ser 0,1 mg a 20 mg, 0,1 mg a 40 15 mg, 0,1 mg a 12 mg, 0,1 mg a 10 mg, 0,1 mg a 8 mg, 0,1 mg a 7 mg, 0,1 mg a 5 mg, 0,1 a 2,5 mg, 0,25 mg a 20 mg, 0,25 a 15 mg, 0,25 a 12 mg, 0,25 a 10 mg, 0,25 a 8 mg, 0,25 mg a 7 m g, 0,25 mg a 5 mg, 0,5 mg a 2,5 mg, 1 mg a 20 mg, 1 mg a 15 mg, 1 mg a 12 mg, 1 mg a 10 mg, 1 mg a 8 mg, 1 mg a 7 mg, 1 mg a 5 mg, 0 1 mg a 2,5 mg.

La dosificación de los anticuerpos o conjugados de anticuerpo de la invención puede alcanzar un título del suero de al menos 0,1 μg/ml, al menos 0,5 μg/ml, al menos 1 μg/ml, al menos 2 μg/ml, al menos 5 μg/ml, al menos 6 μg/ml, al menos 10 μg/ml, al menos 15 μg/ml, al menos 150 μg/ml, al menos 175 μg/ml, al menos 200 μg/ml, al menos 225 μg/ml, al menos 225 μg/ml, al menos 225 μg/ml, al menos 250 μg/ml, al menos 275 μg/ml, al menos 375 μg/ml, o al menos 400 μg/ml en un sujeto. Alternativamente, la dosificación de los anticuerpos de la invención puede alcanzar un título del suero de al menos 0,1 μg/ml, al menos 0,5 μg/ml, al menos 1 μg/ml, al menos, 2 μg/ml, al menos 5 μg/ml, al menos 6 μg/ml, al menos 10 μg/ml, al menos 15 μg/ml, al menos 20 μg/ml, al menos 25 μg/ml, al menos 25 μg/ml, al menos 25 μg/ml, al menos 375 μg/ml, al menos 3

La dosis de anticuerpos o conjugados de anticuerpo de la invención puede repetirse y la administraciones puede separarse 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.

60 Una cantidad eficaz para un paciente particular puede variar dependiendo de factores tales como la afección que está tratándose, la salud general del paciente, el método, vía y dosis de administración, y la gravedad de los efectos secundarios (véase, 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., London, RU).

La vía de administración puede ser, por ejemplo, por administración tópica o cutánea, inyección o infusión por sistemas intravenosos, intraperitoneales, intracerebrales, intramusculares, intraoculares, intracerebrales,

intracerebroespinales, intralesionales, o por sistemas de liberación sostenida o un implante (véanse, 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. USA 82:3688-3692; Hwang, et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030-4034; patentes de EE.UU. N.º 6.350.466 y 6.316.024). Donde sea 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, la administración pulmonar también puede emplearse, por ejemplo, por uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente aerosolizante. Véanse, por ejemplo, las patentes 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 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, terapia de combinación, o una composición de la invención, se administra usando la tecnología de administración de fármacos pulmonares Alkermes AlR™ (Alkermes, Inc., Cambridge, Masa.).

Una composición de la presente invención también puede administrarse mediante una o más vías de administración usando uno o más de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como será apreciado por el experto, la vía y/o modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Vías de administración seleccionadas para anticuerpos de la invención incluyen vías de administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías de administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección o infusión. La administración parenteral puede representar modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, inyección intravenosa, intramuscular, intrarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intrarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal, e infusión. Alternativamente, una composición de la invención puede administrarse mediante una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, por vía intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica.

25

30

35

40

10

15

20

Si los anticuerpos de la invención o conjugados de los mismos 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, arriba; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20; Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574). Pueden usarse materiales poliméricos para lograr la liberación controlada o sostenida de las terapias de la invención (véanse, 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 and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, 1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; véanse también Levy et al., 1985, Science 228:190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 7 1:105); patente de EE.UU. N.º 5.679.377; patente de EE.UU. N.º 5.916.597; patente de EE.UU. N.º 5.912.015; patente de EE.UU. N.º 5.989.463; patente de EE.UU. N.º 5.128.326; publicación PCT N.º WO 99/15154; y publicación PCT N.º WO 99/20253. Ejemplos de polímeros usados en las formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero no se limitan a, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(etileno-co-acetato de vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicolidas (PLG), polianhídridos, poli(Nvinilpirrolidona), poli(alcohol vinílico), poliacrilamida, poli(etilenglicol), polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicolidas) (PLGA) y poliortoésteres. 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 ponerse en la proximidad de la diana profiláctica o terapéutica, requiriendo así solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).

45

50

Los sistemas de liberación controlada se tratan en la revisión por Langer (1990, Science 249:1527-1533). Puede usarse cualquier técnica conocida para un experto en la materia para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más anticuerpos de la invención o conjugados de los mismos. Véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 4.526.938, publicación PCT WO 91/05548, publicación PCT WO 96/20698, Ning et al., 1996, "Intratumoral Radioimmunotheraphy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel", Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song et al., 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions", PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397, Cleek et al., 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application", Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854, y Lam et al., 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery", Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760.

55

60

65

Si el anticuerpo o conjugado de anticuerpo de la invención se administra tópicamente, puede formularse en forma de una pomada, crema, parche transdérmico, loción, gel, champú, espray, aerosol, solución, emulsión, u otra forma muy conocida para un experto en la materia. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19th ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995). Para formas de dosificación tópica no pulverizables, normalmente se emplean formas de viscosas a semi-sólidas o sólidas que comprenden un vehículo o uno o más excipientes compatibles con la administración tópica y que tienen una viscosidad dinámica, en algunos casos, superior a la del agua. Formulaciones adecuadas incluyen, sin limitación, soluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, pomadas, polvos, linimentos, bálsamos, y similares, que, si se desea, se esterilizan o mezclan con agentes auxiliares (por ejemplo, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, tampones, o sales) para influir en diversas propiedades, tales como, por ejemplo, presión osmótica.

Otras formas de dosificación tópica adecuadas incluyen preparaciones de aerosol pulverizables en las que el principio activo, en algunos casos, en combinación con un vehículo inerte sólido o líquido, se envasa en una mezcla con un volátil presurizado (por ejemplo, un propulsor gaseoso, tal como freón) o en un frasco atomizador. También pueden añadirse hidratantes o humectantes a las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación, si se desea. Ejemplos de tales componentes adicionales son muy conocidos en la técnica.

Si las composiciones que comprenden anticuerpos o conjugados de anticuerpo se administran por vía intranasal, pueden formularse en una forma de aerosol, espray, niebla o en forma de gotas. En particular, agentes profilácticos o terapéuticos para su uso según la presente invención pueden administrarse convenientemente en forma de una presentación de espray en aerosol de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor apropiado (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 para administrar una cantidad dosificada. Pueden formularse cápsulas y cartuchos (compuestos de, por ejemplo, gelatina) para su uso en un inhalador o insuflador que contiene una mezcla en polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

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

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

Los anticuerpos o conjugados de anticuerpo de la invención 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 periodo de tiempo, seguido de la administración de una segunda terapia (por ejemplo, un segundo agente profiláctico o terapéutico) durante un periodo de tiempo, opcionalmente, seguido de la administración de una tercera terapia (por ejemplo, agente profiláctico o terapéutico) durante un periodo de tiempo, etc., y repetir 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 ciertas realizaciones, los anticuerpos y conjugados de anticuerpo de la invención pueden formularse para garantizar la apropiada distribución *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrófilos. Para garantizar que los compuestos terapéuticos de la invención crucen la BBB (si se desea), pueden formularse, por ejemplo, en liposomas. Para los métodos de fabricación de liposomas, véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o más restos que se transportan selectivamente en células u órganos específicos, así potencian la administración de fármaco dirigida (véase, por ejemplo, V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685). Restos de direccionamiento a modo de ejemplo incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.416.016 a Low et al.); manósidos (Umezawa et al., (1988) 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; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273.

La invención proporciona protocolos para la administración de composición farmacéutica que comprende anticuerpos o conjugados de anticuerpo de la invención solos o en combinación con otras terapias a un sujeto en necesidad de los mismos. Las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) de las terapias de

combinación de la presente invención pueden administrarse concomitantemente o secuencialmente a un sujeto. La terapia (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) de las terapias de combinación de la presente invención también pueden administrarse cíclicamente. La terapia cíclica implica la administración de una primera terapia (por ejemplo, un primer agente profiláctico o terapéutico) durante un periodo de tiempo, seguido de la administración de una segunda terapia (por ejemplo, un segundo agente profiláctico o terapéutico) durante un periodo de tiempo y repetir 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.

10 Las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) de las terapias de combinación de la invención pueden administrarse a un sujeto simultáneamente. El término "simultáneamente" no se limita a la administración de terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) en exactamente el mismo momento, sino que indica que una composición farmacéutica que comprende anticuerpos o conjugados de anticuerpo de la invención se administra a un sujeto en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo de forma que los anticuerpos de la invención o 15 conjugados de los mismos puedan actuar junto con la(s) otra(s) terapia(s) para proporcionar un aumento del beneficio que si se administraron de otro modo. Por ejemplo, cada terapia puede administrarse a un sujeto al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden en diferentes momentos de tiempo; sin embargo, si no se administran al mismo tiempo, deben administrarse suficientemente próximos en el tiempo de manera que se proporcione el efecto terapéutico o profiláctico deseado. Cada terapia puede administrarse a un sujeto por separado, en cualquier 20 forma apropiada y por cualquier vía adecuada. En diversas realizaciones, las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) se administran a un sujeto separadas menos de 15 minutos, menos de 30 minutos, menos de 1 hora, separadas aproximadamente 1 hora, separadas aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas, separadas aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas, separadas aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas, separadas aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas, separadas 25 aproximadamente 5 horas a aproximadamente 6 horas, separadas aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 horas, separadas aproximadamente 7 horas a aproximadamente 8 horas, separadas aproximadamente 8 horas a aproximadamente 9 horas, separadas aproximadamente 9 horas a aproximadamente 10 horas, separadas aproximadamente 10 horas a aproximadamente 11 horas, separadas aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas, separadas 24 horas, separados 48 horas, separadas 72 horas, o separadas 1 semana. 30 En otras realizaciones, dos o más terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) se administran en una misma visita del paciente.

Los agentes profilácticos o terapéuticos de las terapias de combinación pueden administrarse a un sujeto en la misma composición farmacéutica. Alternativamente, los agentes profilácticos o terapéuticos de las terapias de combinación pueden administrarse simultáneamente a un sujeto en composiciones farmacéuticas separadas. Los agentes profilácticos o terapéuticos pueden administrarse a un sujeto por la misma vía de administración o diferente.

Realizaciones específicas

5

35

50

- 40 1. Un anticuerpo modificado con cisteína, en el que el anticuerpo modificado con cisteína comprende una sustitución de uno o más aminoácidos a un resto de cisteína en la región 131-139 de la cadena pesada de un anticuerpo como se define por el sistema de numeración del índice EU, en el que el anticuerpo modificado con cisteína comprende al menos un grupo tiol libre.
- 2. El anticuerpo modificado con cisteína de la realización 1, en el que dicho anticuerpo comprende 2 o más grupos tiol libres.
 - 3. El anticuerpo modificado con cisteína de la realización 1, en el que dicho anticuerpo comprende 4 o más grupos tiol libres.
 - 4. El anticuerpo modificado con cisteína de la realización 1, en el que dicho anticuerpo comprende 6 o más grupos tiol libres.
- 5. El anticuerpo modificado con cisteína de la realización 1, en el que dicho anticuerpo comprende 8 o más grupos tiol libres.
 - 6. El anticuerpo modificado con cisteína de la realización 1, en el que dicho anticuerpo comprende 10 o más grupos tiol libres.
- 7. El anticuerpo modificado con cisteína de la realización 1, en el que dicho anticuerpo comprende 12 o más grupos tiol libres.
 - 8. El anticuerpo modificado con cisteína de la realización 1, en el que dicho anticuerpo comprende 14 o más grupos tiol libres.
 - 9. El anticuerpo modificado con cisteína de la realización 1, en el que dicho anticuerpo comprende 16 o más

grupos tiol libres.

5

15

20

35

40

- 10. El anticuerpo modificado con cisteína de la realización 1, en el que los aminoácidos sustituidos están seleccionados del grupo que consiste en: 131, 132, 134, 135, 136 y 139 de la cadena pesada del anticuerpo, según el sistema de numeración del índice EU.
- 11. El anticuerpo modificado con cisteína de cualquiera de realizaciones 1-10, en el que dicho anticuerpo es un fragmento de anticuerpo en un formato Fab o Fab₂.
- 10 12. El anticuerpo modificado con cisteína de cualquiera de realizaciones 1-11, en el que el anticuerpo modificado con cisteína comprende la formación de al menos un enlace disulfuro que no existe de forma natural.
 - 13. El anticuerpo modificado con cisteína de cualquiera de realizaciones 1- 12, en el que dicho anticuerpo modificado presenta la misma afinidad de unión o más alta por una diana específica que el anticuerpo antes de la manipulación con cisteína.
 - 14. El anticuerpo modificado con cisteína de cualquiera de realizaciones 1- 13, en el que dicho anticuerpo modificado presenta la misma afinidad o más baja por una diana específica que el anticuerpo antes de la manipulación con cisteína.
 - 15. El anticuerpo modificado con cisteína de cualquiera de realizaciones 1-14, en el que dicho anticuerpo modificado presenta la misma afinidad de unión o más alta que el anticuerpo por receptores de Fc que el anticuerpo antes de la manipulación con cisteína.
- 16. El anticuerpo modificado con cisteína de cualquiera de realizaciones 1-15, en el que dicho anticuerpo 25 modificado induce el mismo nivel o más alto de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) que el anticuerpo antes de la manipulación con cisteína.
- 17. El anticuerpo modificado con cisteína de cualquiera de realizaciones 1-15, en el que dicho anticuerpo 30 modificado induce un nivel más bajo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) que el anticuerpo antes de la manipulación con cisteína.
 - 18. El anticuerpo modificado con cisteína de cualquiera de realizaciones 1-17, en el que dicho anticuerpo modificado induce el mismo nivel o más alto de anticuerpo dependiente citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) que el anticuerpo antes de la manipulación con cisteína.
 - 19. El anticuerpo modificado con cisteína de cualquiera de realizaciones 1-17, en el que dicho anticuerpo modificado induce un nivel más bajo de anticuerpo dependiente citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) que el anticuerpo antes de la manipulación con cisteína.
 - 20. El anticuerpo modificado con cisteína de cualquiera de realizaciones 1-19, en el que dicho anticuerpo modificado presenta el mismo nivel o más alto de estabilidad medida por perfil de fragmentación y/o agregación que el anticuerpo antes de la manipulación con cisteína.
- 45 21. El anticuerpo modificado con cisteína de cualquiera de realizaciones 1-20, en el que dicho anticuerpo modificado presenta un nivel más bajo de estabilidad medida por perfil de fragmentación y/o agregación que el anticuerpo antes de la manipulación con cisteína.
- 22. El anticuerpo modificado con cisteína de cualquiera de realizaciones 1-21, en el que dicho anticuerpo 50 modificado presenta semivida reducida en comparación con el anticuerpo antes de la manipulación con cisteína.
 - 23. El anticuerpo modificado con cisteína de cualquiera de realizaciones 1-22, en el que dicho grupo tiol libre es capaz de conjugación química con un agente citotóxico, agente quimioterapéutico, toxina, radionúclido, ADN, ARN, ARNip, microARN, ácido nucleico peptídico, péptido de aminoácido no natural, enzima, marca fluorescente o biotina.
 - 24. El anticuerpo modificado con cisteína de la realización 23, en el que dicho agente citotóxico está seleccionado del grupo que consiste en un agente anti-tubulina, un ligante del surco menor del ADN, un antimitmaitansanoide y una auristatina.
 - 25. El anticuerpo modificado con cisteína de la realización 23, en el que dicho agente quimioterapéutico está seleccionado del grupo que consiste en taxol, paclitaxel, doxorubicina, metotrexato, dolastatina, alcaloides de la vinca y metotrexato.
- 26. El anticuerpo modificado con cisteína de la realización 23, en el que dicha toxina está seleccionada del grupo 65 que consiste en abrina, brucina, cicutoxina, toxina diftérica, toxina botulínica, toxina Shiga, endotoxina, toxina

36

55

tetánica, toxina Pertussis, toxina del ántrax, toxina del cólera, falcarinol, toxina alfa, geldanamicina, gelonina, lotaustralina, ricina, estricnina y tetrodotoxina.

- 27. El anticuerpo modificado con cisteína de la realización 23, en el que dicho radionúclido está seleccionado del grupo que consiste en cromo (5¹Cr), cobalto (5²Co), flúor (¹8F), gadolinio (¹5³Gd, ¹59Gd), germanio (⁶⁸Ge), holmio (¹66Ho), indio (¹15In, ¹13In ¹12In, ¹111In), yodo (¹3¹I, ¹25I, ¹23I, ¹21I), lantano (¹40La), lutecio (¹77Lu), manganeso (⁵4Mn), molibdeno (³9Mo), paladio (¹03Pd), fósforo (³2P), praseodimio (¹42Pr), prometio (¹49Pm), renio (¹86Re, ¹88Re), rodio (¹05Rh), rutenio (³97Ru), samario (¹53Sm), escandio (⁴7Sc), selenio (²5Se), estroncio (85Sr), azufre (³5S), tecnecio (³97C), talio (²01Ti), estaño (¹13Sn, ¹17Sn), tritio (³H), xenón (¹33Xe), iterbio (¹69Yb, ¹75Yb), itrio (³0Y) y cinc (⁵5Zn).
 - 28. El anticuerpo modificado con cisteína de la realización 23, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo internalizante.
- 29. El anticuerpo modificado con cisteína de cualquiera de realizaciones 1-28, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, quimérico, humanizado, biespecífico o multiespecífico.
 - 30. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio variable de la cadena pesada o un dominio variable de la cadena ligera de anticuerpo modificado con cisteína de cualquiera de las realizaciones 1-29.
 - 31. Un vector que comprende los ácidos nucleicos de la realización 30.

10

20

45

55

- 32. Una célula huésped que comprende el vector de la realización 31.
- 25 33. Un conjugado de anticuerpo de los anticuerpos manipulados con cisteína de cualquiera de las realizaciones 1-29.
 - 34. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de anticuerpo de la realización 33.
- 35. Un método de detección de cáncer, enfermedades autoinmunitarias, inflamatorias o infecciosas o trastornos en un sujeto en necesidad del mismo, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto la composición de la realización 34.
- 36. El método de la realización 35 en el que dicha enfermedad o trastorno comprende células que expresan en exceso un antígeno de la superficie celular que está unido por dicho conjugado de anticuerpo.
 - 37. Un método de inhibición de la proliferación de una célula diana, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha célula con una cantidad eficaz del conjugado de anticuerpo de la realización 33.
- 40 38. Un método de inhibición de la proliferación de una célula diana en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar una cantidad eficaz de la composición de la realización 34.
 - 39. El método de la realización 37 o 38, en el que dicha célula diana expresa en exceso un antígeno de la superficie celular que está unido por dicho conjugado de anticuerpo.
 - 40. Un método de tratamiento de cáncer, enfermedades autoinmunitarias, inflamatorias o infecciosas o trastornos en un sujeto en necesidad del mismo, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de la realización 34.
- 41. El método de la realización 40, en el que dicha enfermedad o trastorno comprende células que expresan en exceso un antígeno de la superficie celular que está unido por dicho conjugado de anticuerpo.
 - 42. El método de la realización 40, en el que dicho método comprende destruir o reducir la tasa de crecimiento de células asociadas a dichas enfermedades.
 - 43. El método de la realización 40, en el que dicho método comprende agotar los linfocitos B o linfocitos T.
 - 44. El método de la realización 40, que comprende la administración de una terapia adicional, en el que dicha terapia adicional está seleccionada del grupo que consiste en quimioterapia, terapia biológica, inmunoterapia, radioterapia, terapia hormonal y cirugía.
 - 45. Un método de conjugar eficazmente una molécula heteróloga con los anticuerpos manipulados con cisteína de cualquiera de las realizaciones 1-29.
- 46. El método de la realización 45, en el que dicho método comprende conjugar dicha molécula heteróloga con al menos una posición seleccionada del grupo que consiste en 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137 y 139 del dominio CH1 del anticuerpo.

- 47. El método de la realización 45 o 46, en el que dicha molécula heteróloga está seleccionado del grupo que consiste en un agente citotóxico, agente quimioterapéutico, toxina, radionúclido, ADN, ARN, ARNip, microARN, ácido nucleico peptídico, péptido, enzima, marca fluorescente o biotina.
- 48. El método de la realización 47, en el que dicho agente citotóxico está seleccionado del grupo que consiste en un agente anti-tubulina, un ligante del surco menor del ADN, un anti-mitmaitansanoide y una auristatina.
 - 49. El método de la realización 47, en el que dicho agente quimioterapéutico está seleccionado del grupo que consiste en taxol, paclitaxel, doxorubicina, metotrexato, dolastatina, alcaloides de la vinca y metotrexato.
 - 50. El método de la realización 47, en el que dicha toxina está seleccionada del grupo que consiste en abrina, brucina, cicutoxina, toxina diftérica, toxina botulínica, toxina Shiga, endotoxina, toxina tetánica, toxina Pertussis, toxina del ántrax, toxina del cólera, falcarinol, toxina alfa, geldanamicina, gelonina, lotaustralina, ricina, estricnina y tetrodotoxina.
 - 51. El método de la realización 47, en el que dicho radionúclido está seleccionado del grupo que consiste en cromo (⁵¹Cr), cobalto (⁵⁷Co), flúor (¹⁸F), gadolinio (¹⁵³Gd, ¹⁵⁹Gd), germanio (⁶⁸Ge), holmio (¹⁶⁶Ho), indio (¹¹⁵In, ¹¹³In, ¹¹¹In), yodo (¹¹³I, ¹²⁵I, ¹²³I, ¹²¹I), lantano (¹⁴⁰La), lutecio (¹⁷⁷Lu), manganeso (⁵⁴Mn), molibdeno (⁹⁹Mo), paladio (¹⁰³Pd), fósforo (³²P), praseodimio (¹⁴²Per), prometio (¹⁴⁹Pm), renio (¹⁸⁸Re, ¹⁸⁸Re), rodio (¹⁰⁵Rh), rutenio (⁹⁷Ru), samario (¹⁵³Sm), escandio (⁴⁷Sc), selenio (⁷⁵Se), estroncio (⁸⁵Sr), azufre (³⁵S), tecnecio (⁹⁹Tc talio (²⁰¹Ti), estaño (¹¹³Sn, ¹¹⁷Sn), tritio (³H), xenón (¹³³Xe), iterbio (¹⁶⁹Yb, ¹⁷⁵Yb), itrio (⁹⁰Y) y cinc (⁶⁵Zn).
 - 52. El método de cualquiera de realizaciones 45-51, en el que dicha eficiencia es al menos el 5 % o más como se mide por grupos tiol libres residuales que quedan después de la reacción de conjugación.
 - 53. El método de cualquiera de realizaciones 45-52, en el que dicha eficiencia es al menos el 25 % o más como se mide por grupos tiol libres residuales que quedan después de la reacción de conjugación.
- 54. El método de cualquiera de realizaciones 45-53, en el que dicha eficiencia es al menos el 75 % o más como se mide por grupos tiol libres residuales que quedan después de la reacción de conjugación.
 - 55. El anticuerpo modificado con cisteína de cualquiera de realizaciones 1-29, en el que dicho anticuerpo no comprende una sustitución a cisteína en la posición 132 y/o 138.
- 56. El anticuerpo modificado con cisteína de cualquiera de realizaciones 1 -29 o 55, en el que dicho anticuerpo comprende una sustitución en la posición 132 y/o 138, en el que dicha sustitución no es cisteína.
 - 57. El anticuerpo modificado con cisteína de cualquiera de realizaciones 1-29 o 55-56, en el que dicho anticuerpo comprende al menos una expansión de la región de bucle 131-139.
 - 58. El anticuerpo modificado con cisteína de cualquiera de realizaciones 1-29 o 55-57, en el que dicho anticuerpo comprende una expansión de la región de bucle 131-139, en el que dicha expansión comprende la inserción de al menos 1 a al menos 15 aminoácidos.
- 45 59. El anticuerpo modificado con cisteína de cualquiera de realizaciones 1-29 o 55-58, en el que dicho anticuerpo comprende una expansión de la región de bucle 131-139, en el que dicha expansión se produce después de posiciones seleccionadas del grupo que consisten en los restos 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138 y 139.
- 60. El anticuerpo modificado con cisteína de cualquiera de realizaciones 1-29 o 55-59, en el que dicho anticuerpo comprende una expansión de la región de bucle 131-139, en el que dicha expansión se produce después de posiciones seleccionadas del grupo que consiste en los restos 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138 y 139.
- 61. El anticuerpo modificado con cisteína de cualquiera de realizaciones 1-29 o 55-69, en el que dicho anticuerpo comprende al menos una primera y una segunda expansión de la región de bucle 131-139, en el que dicha primera expansión se produce después de una posición seleccionada del grupo que consiste en los restos 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138 y 139 y en el que dicha segunda expansión se produce después de dicha primera expansión, en el que dicha segunda expansión se produce después de una posición seleccionada del grupo que consiste en los restos 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138 y 139.

60 Equivalentes

65

10

15

20

25

40

La anterior memoria descriptiva escrita se considera que es suficiente para permitir que un experto en la materia ponga en práctica la invención. La anterior descripción y ejemplos detallan ciertas realizaciones preferidas de la invención y describen el mejor modo contemplado por los inventores. Se apreciará, sin embargo, que no importa cuánto de detallada pueda aparecer lo anterior en el texto, la invención puede ponerse en práctica de muchas formas y la invención debe interpretarse según las reivindicaciones adjuntas y cualquier equivalente de las mismas.

6. EJEMPLOS

5

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

La invención se describe ahora con referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan con el fin de ilustración solo y la invención no debe interpretarse de ninguna forma como limitada a estos ejemplos, sino que debe interpretarse para englobar todas y cada una de las variaciones que llegan a ser evidentes como resultado de las enseñanzas proporcionadas en el presente documento.

6.1 Ejemplo 1. Expresión y caracterización de anticuerpos manipulados con cisteína

Se hicieron una serie de sustituciones de serina o treonina por cisteína a la región 131-139 del dominio CH1 de una molécula de IgG1. Las moléculas de IgG1 manipuladas con cisteína se generaron usando tecnologías recombinantes de ADN convencionales conocidas para los profesionales de las artes biológicas (véase, por ejemplo, Sambrook et al. Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Diciembre de 2000, Cold Spring Harbor Lab Press). La región 131-139 del dominio CH1 presente en una molécula de IgG1 representa una región flexible que se expone a disolvente (véase la Figura 1A). La exposición a disolvente que esta región muestra permite el acceso para los reactivos de conjugación a los restos específicos. Un alineamiento de secuencias de otros diversos formatos de anticuerpo que representan las posiciones equivalentes de 131-139 en el dominio CH1 de IgG1 se presenta en la Figura 1C. Los restos de serina y/o treonina contenidos en esta región son aminoácidos candidatos particulares para ser sustituidos por restos de cisteína.

Un ejemplo de una estrategia de anticuerpo modificado con cisteína se presenta en la Figura 1B. Se presentan en negrita los restos de cisteína que existen de forma natural en esta secuencia, junto con el patrón de pares de enlace disulfuro predichos (líneas continuas). Está subrayada la posición de una sustitución de cisteína de un resto de serina en la posición 131. Posibles enlaces disulfuro que comprenden la cisteína introducida se presentan como líneas discontinuas.

En la Figura 2A, 1C1 no mutante y derivados manipulados con cisteína del mismo se expresaron, purificaron y sometieron a análisis de PAGE. El anticuerpo 1C1 no mutante (Carril 1) y diversos derivados manipulados con cisteína del mismo (Carriles 2-15) presentaron perfiles de peso molecular muy similares en condiciones no reductoras (recuadro i) y reductoras (recuadro ii).

En la Figura 2B, una comparación de mapeos de péptidos no reductores de 1C1 wt y 1C1 Ser131Cys mutante. En este ejemplo, se usó proteólisis limitada y cromatografía de fase inversa/espectrometría de masas (RP-EM/CL) para caracterizar los patrones de enlace disulfuro y restos de cisteína libres en anticuerpos 1C1 y 1C6 no mutantes y manipulados con cisteína.

Materiales y Métodos: Mapeo de péptidos no reductor. Los mAb se protegieron con N-etilmaleimida (NEM) 5 mM en tampón ácido a temperatura ambiente durante 20 min, seguido de desnaturalizante en tampón fosfato 10 mM, NaCl 250 mM, guanidina 6 M, pH 7,0 a 37 °C durante 30 min. Las soluciones de mAb desnaturalizadas se diluyeron entonces 6 veces con tampón fosfato 100 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,0. Se añadió endopeptidasa Lys-C a relación 1:10 de enzima con respecto a proteína. Las mezclas de reacción se incubaron a 37 °C durante 16 a 24 horas. La mitad de la mezcla de reacción se redujo añadiendo 5-10 µl de DTT 500 mM y se incubó a 37 °C durante 15 min. Tanto los digestos no reducidos como reducidos se analizaron por EM/CL. Se logró separación por HPLC usando HPLC de fase inversa (Phenomenex Jupiter 5m C18 columna; 250 x 2 mm) y se detectó por detector de UV y un espectrómetro de masas LTQ lon Trap en línea (Termo Fisher). La fase móvil A de RP-HPLC fue 0,1 % de TFA en H₂O y la fase móvil B fue 0,1 % de TFA en acetonitrilo. El caudal es 0,2 ml/min y el gradiente fue 0 al 60 % de B en 150 min. El espectrómetro de masas LTQ ion trap con interfaz de electropulverización operó en modo de ión positivo con un intervalo de m/z de 300-2000. Cada pico en los mapas de péptido se identificó por barrido completo de EM y análisis de los barridos con aumento. También se recogieron los espectros de EM/EM para verificar las secuencias de los péptidos. Se determinaron enlaces de unión disulfuro por masas de péptidos a partir de experimentos de CL-EM, y se confirmaron comparando los mapas de péptidos de digestos reducidos y no reducidos. Los péptidos que contienen tiol libre se identificaron buscando las masas de péptido con aductos de NEM.

Resultados: 1C1 es un anticuerpo específico para EphA2 de la subclase IgG1. Figura 2B El recuadro A es el anticuerpo 1C1 WT que mostró el enlace de unión disulfuro regular entre la región bisagra de cadena pesada y el extremo C de cadena ligera (H11-L15) y el péptido que contiene Ser131 (H5). Figura 2B El recuadro B es 1C1 Ser131Cys mutante que mostró disminución del enlace disulfuro regular entre la cadena ligera y pesada (H11-L15) y el péptido de 1C1 wt H5, y la aparición de enlaces de unión disulfuro recién formados entre cisteína mutada con el extremo C de la cadena ligera (H5m-L15) y con la región bisagra (H5m-H11). Usando el método descrito anteriormente los presentes inventores determinaron el enlace de unión disulfuro para 1C1, 1C1 Ser131Cys y para los otros mutantes. Además, los presentes inventores determinaron que el anticuerpo 1C1 Ser131Cys forma un nuevo puente disulfuro intercatenario entre la cadena ligera y pesada y la cisteína en la posición 220 de la cadena pesada está libre para la conjugación de fármaco específico de sitio. También se identificaron tioles libres usando los métodos anteriores. Se obtuvieron resultados similares con otros anticuerpos manipulados con cisteína (datos no mostrados).

En la Figura 3, se presentan gráficas que representan los resultados de un análisis de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) de anticuerpos 1C6 (un anticuerpo específico para EphB4) no mutante (A) y 1C6 Ser131Cys. La cromatografía de exclusión por tamaño es un método muy conocido en la técnica para determinar el peso molecular aparente de moléculas (por ejemplo, proteínas) en su estado nativo. En este ejemplo, los anticuerpos purificados 1C6 no mutante (A) o 1C6 Ser131Cys (B) se cargaron sobre una columna de SEC (TSK-GEL G3000SWXL) en un tampón que contenía sulfato de sodio 100 mM, fosfato de sodio 100 mM a pH 6,8. La columna se ejecutó a un caudal de 1 ml/min. Los patrones de calibración incluidos para la determinación del peso molecular aparente incluyeron: Tiroglobulina (670 kDa), gamma-globulina bovina (158 kDa), ovoalbúmina de pollo (44 kDa), mioglobina equina (17 kDa) y vitamina B12 (1,35 kDa). Como se demuestra por los trazados muy similares presentados en el panel (A y B), 1C6 no mutante y 1C6 1Ser131Cys existen en un estado monomérico. Se obtuvieron resultados similares con otros anticuerpos manipulados con cisteína (datos no mostrados).

En la Figura 4, se presentan gráficas que representan los resultados de un análisis de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) de anticuerpos 1C1 no mutante (A) 1C1 Ser134Cys (B), 1C1 Ser131-132Cys (C) y 1C1 Ser131-132-134-136Cys (D). La cromatografía de exclusión por tamaño se realizó como antes. Como se demuestra por los trazados muy similares presentados en el panel (A - D), 1C1 no mutante y diversos mutantes manipulados con cisteína del mismo existen en un estado monomérico. Se obtuvieron resultados similares con otros anticuerpos manipulados con cisteína (datos no mostrados).

20 6.2 Ejemplo 2. Características de unión a epítope de anticuerpos manipulados con cisteína

5

10

15

En este ejemplo, las características de unión de un anticuerpo modificado con cisteína se compararon con el anticuerpo no mutante de origen.

25 Materiales y métodos: El ensayo de unión se llevó a cabo en 1 % de BSA en 1X PBS, todas las etapas de incubación se llevaron a cabo a temperatura ambiente usando un agitador de placas de titulación Lab-Line Instrument a una velocidad de agitación de 6,5. Se incubaron EphB4 o EphA2 biotinilados y anti-kappa humana marcada con rutenio (marca BV) con perlas M280 de estreptavidina y con una dilución sucesiva de 1C6, 1C6 Ser131Cys y 1C1 y 1C1 Ser131Cys, respectivamente. La concentración de receptor y de anti-kappa humana fue 1 30 μg/ml y la concentración de anticuerpo fue de 1 μg/ml a 7,8 ng/ml. La unión específica se reveló usando el analizador de serie M de Bioveris. La máquina aspira la mezcla de la placa y la hace circular sobre un electroimán. Las perlas M280 se pegan a la plataforma y entonces se hace circular una solución de lavado sobre las perlas para eliminar cualquier anticuerpo sin unir o receptor. Se aplicó una carga estática a la plataforma que se desplaza hasta la marca de rutenio en el sándwich haciendo que emita luz. La solución de lectura actúa de aceptor final de 35 electrones, permitiendo que el rutenio emita continuamente luz en tanto que se aplique carga. Entonces, el electroimán se soltó y se lavó la muestra. El lavado y la lectura se hicieron automáticamente por la máquina y fue coherente entre pocillos.

Resultados: En este ejemplo, se realizó un ensayo de unión al antígeno basado en ELISA (en formato de solución)
en anticuerpos purificados, concretamente 1C6 WT y 1C6 Ser131Cys. Estos anticuerpos reconocen específicamente
el receptor EphB4. Como se demuestra en la Figura 5, el perfil de afinidad de unión medido en un formato de ELISA
del anticuerpo WT y el anticuerpo Ser131Cys manipulado con cisteína fueron muy similares. Similarmente, para
anticuerpos manipulados con cisteína basados en 1C1, el perfil de afinidad de unión medido en un formato de ELISA
para los anticuerpos 1C1 no mutante y 1C1 Ser131Cys fueron muy similares (véase la Figura 6). La inclusión de un
agente reductor tal como DTT 1 mM no tuvo efecto sobre el perfil de unión presentado por el anticuerpo modificado
con cisteína 1C1 Ser131Cys. Se obtuvieron resultados similares con otros anticuerpos manipulados con cisteína
(datos no mostrados). Estos resultados demuestran que la manipulación de restos de cisteína en el dominio CH1 no
altera las características de unión al epítope del anticuerpo resultante en comparación con el anticuerpo de origen.

50 6.3 Ejemplo 3. Caracterización de estabilidad de anticuerpos manipulados con cisteína

En este ejemplo, se comparan las temperaturas de fusión (Tm) de los anticuerpos de origen (no mutantes) con los anticuerpos manipulados con cisteína.

Materiales y métodos: Se usó calorimetría diferencial de barrido (DSC) para determinar la temperatura de fusión (Tm) para anticuerpos no mutantes y manipulados con cisteína. La Tm es una representación de la estabilidad del anticuerpo, Tm más alta se refiere a anticuerpo muy estable y no agregado. Los experimentos de DSC midieron la capacidad térmica del anticuerpo estudiado en la presente invención (anticuerpos no mutantes y manipulados con cisteína) en función de la temperatura en un intervalo de 10 °C a 110 °C. Las mediciones de DSC se llevaron a cabo usando un microcalorímetro de barrido ultrasensible Microcal VP-DSC. Los experimentos de DSC se llevaron a cabo en histidina-HCl 25 mM a pH6, EDTA 5 mM. Todas las soluciones y muestras usadas para DSC se filtraron usando un filtro de 0,22 micrómetros y se desgasificaron justo antes de cargar en el calorímetro. Para cada conjunto de mediciones, primero se obtuvo una serie del tampón frente al nivel inicial. Inmediatamente después de esto, la solución de tampón se eliminó de las celdas de muestra. Las celdas de muestra se cargaron con 0,5 ml de una solución de anticuerpo (no mutante y manipulado con cisteína) a concentración que oscilaba de 0,5 a 1 mg/ml. Durante la medición la celda de referencia se cargó con el tampón de muestra. De cada experimento de muestra

frente a tampón, se restó la serie de tampón frente al nivel inicial de tampón correspondiente. Los datos sin procesar se normalizaron para concentración y velocidad de barrido. Los datos se ajustaron usando el software Origin DSC proporcionado por Microcal. Los experimentos de DSC también se llevaron a cabo con anticuerpos conjugados (con EZ-Link Biotin-HPDP (Pierce) y Z-Link iodoacetyl-PE02 Biotin y se obtuvieron termogramas similares a los de los anticuerpos no mutantes y manipulados con cisteína.

Resultados: En este ejemplo, se usó calorimetría diferencial de barrido (DSC) para determinar la curva del fundido de diversos anticuerpos no mutantes y manipulados con cisteína. En la Figura 7 se presentan termogramas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) del anticuerpo 1C6 WT (A) y el anticuerpo 1C6 Ser131Cys (B). Ambos anticuerpos presentan temperaturas de fusión (Tm) muy similares de 70 °C y 69 °C, respectivamente. En la Figura 8, termogramas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de los anticuerpos 1C1 WT (A), 1C1 Ser131Cys (B), 1C1 Ser134Cys (C), 1C1 Ser (131-132)Cys (D) y 1C1 Ser(131-132-134-136)Cys. Todos los anticuerpos presentan una temperatura de fusión (Tm) muy similar. Se obtuvieron resultados similares con otros anticuerpos manipulados con cisteína (datos no mostrados). Estos resultados demuestran que la manipulación de restos de cisteína en el dominio CH1 no altera la estabilidad de los anticuerpos resultantes.

6.4 Ejemplo 4. Conjugación con biotina de anticuerpos manipulados con cisteína

5

10

15

20

25

30

35

55

60

65

En este ejemplo, se demuestran sitios de conjugación libres en anticuerpos manipulados con cisteína por un aumento de la incorporación de biotina.

Materiales y métodos: Se obtuvieron EZ-Link Biotin-HPDP (Reactivo de conjugación 1 = CR1) y EZ-Link iodoacetyl-PEO2 Biotin (Reactivo de conjugación 2 = CR2) de Pierce. Se incubaron anticuerpos no mutantes y manipulados con cisteína durante 3 h a 37 °C en tampón fosfato 100 mM, NaCl 100 mM pH 8,0, DTT 0,02 mM, EDTA 5 mM bajo nitrógeno. Después de esta incubación, las muestras de anticuerpo se intercambiaron de tampón usando diálisis en 1PBS 1X, EDTA 1 mM bajo nitrógeno. Se disolvió CR1 a 2 mg/ml en 100 % de DMSO y se disolvió CR2 en agua destilada. Se mezclaron siete μg/ml de reactivo de conjugación y 0,5 mg/ml de tanto anticuerpos no mutantes como ser131cys por separado, se agitaron con vórtex y luego se incubaron durante 90 minutos a 4 °C, 37 °C, 45 °C y 55 °C. Se eliminaron CR1 y CR2 sin unir usando tanto SEC (cromatografía de exclusión por tamaño) como columnas de desalación (ZEBA, Desalt Spin Columns de Pierce). La incorporación de biotina se determinó usando un ensayo de unión a estreptavidina. El ensayo de unión se llevó a cabo en 1 % de BSA en 1X PBS, todas las etapas de incubación se llevaron a cabo a temperatura ambiente usando un agitador de placas de titulación Lab-Line Instrument a ajuste de velocidad de 6,5. Se mezclaron perlas M280 de estreptavidina y anti-kappa humana marcada con ruterio (marca BV) con una dilución sucesiva de ser131cys y no mutantes biotinilados, respectivamente. La concentración de anti-kappa humana fue 1 μg/ml y la concentración de anticuerpo fue de 1 μg/ml a 7,8 ng/ml. La unión específica se evaluó usando el analizador de serie M de Bioveris.

Resultados: En la FIGURA 9 se presentan los resultados de un estudio de conjugación con biotina de anticuerpo 1C6 (WT) y anticuerpo 1C6 Ser131Cys (Mut) en diversas condiciones. En el panel A, los anticuerpos 1C6 y 1C6 Ser131Cys se sometieron a una reacción de conjugación con EZ-Link Biotin-HPDP (Pierce) a diversas temperaturas (4 °C, 37 °C, 45 °C y 55 °C). Se midió y representó la eficiencia de conjugación con biotina resultante. El anticuerpo 1C6 Ser131Cys presentó una eficiencia más alta de conjugación con biotina específica de sitio que el anticuerpo 1C6. En el panel B, los anticuerpos 1C6 y 1C6 Ser131Cys se sometieron a una reacción de conjugación con EZ-Link iodoacetyl-PEO2 Biotin a diversas temperaturas (4 °C, 37 °C, 45 °C y 55 °C). Se midió y representó la eficiencia de conjugación con biotina específica de sitio resultante. El anticuerpo 1C6 Ser131Cys presentó una eficiencia de conjugación con biotina específica de sitio más alta que el anticuerpo 1C6. Estos resultados demuestran que los anticuerpos manipulados con cisteína, tales como el anticuerpo 1C3 Ser131Cys, muestran cisteínas capaces de conjugación con diversos agentes (por ejemplo, conjugación con biotina).

50 6.5 Ejemplo 5. Caracterización de la afinidad de unión para receptores de Fcγ presentada por anticuerpos manipulados con cisteína

En este ejemplo, se compararon las características de unión específicas para receptores de Fcγ presentadas por anticuerpos manipulados con cisteína con anticuerpos no mutantes.

Materiales y métodos: Se llevaron a cabo experimentos BIAcore[®] usando un instrumento BIAcore[®] 3000 (Biacore International) y usando protocolos convencionales. Brevemente, se acoplaron 7444 UR (unidad de resonancia) de 1C1-wt y 7781 UR de 1C1 ser131cys con la matriz de dextrano de un chip sensor CM5 (Pharmacia Biosensor) usando un kit de acoplamiento de amina convencional. Se inactivaron los ésteres reactivos en exceso mediante la inyección de 70 μl de clorhidrato de etanolamina 1,0 M (pH 8,5). Se inyectaron FcγR (I, IIA, IIIA, IIB) a 500 nM a un caudal de 5 μl/min. Los niveles de unión de FcγR son similares para 1C1 no mutante y 1C1 ser131cys. Se usó ovoalbúmina como control negativo. Después de los experimentos de unión, se regeneró la superficie del chip sensor para 1C1 no mutante y 1C1 ser131cys mutante usando NaCl 1 M / NaOH 50 mM. Se usaron los chips de superficie regenerada para determinar la unión a FcRn humano en tanto tampón fosfato 50 mM a pH 6,0 que contenía 0,05 % de Tween 20 como en tampón fosfato 50 mM a pH 7,4 que contenía 0,05 % de Tween 20. Se hizo circular una solución que contenía FcRn humano sobre los chips sensores a 5 μl/min. El nivel de unión para tanto no

mutante como mutante es similar. Se usó ovoalbúmina como control negativo.

Resultados: En la FIGURA 10 se presentan los resultados de un ensayo BIAcore[®] que mide las afinidades relativas para los anticuerpos 1C1 WT y 1C1 Ser131Cys para diversos receptores de Fcγ. Los diversos receptores de Fcγ estudiados fueron FcγRI (A), FcγRIIA (B), FcγRIIA (C), FcγRIIB (D). Los anticuerpos 1C1 WT y 1C1 Ser131Cys presentan afinidades de unión muy similares para diversos receptores de Fcγ. Por tanto, en la Figura 11 se presentan los resultados de un ensayo BIACORE® que mide las afinidades relativas por los anticuerpos 1C1 WT y 1C1 Ser131Cys para el receptor FcRn a pH 6,0 y pH 7,4. El anticuerpo 1C1 Ser131Cys se une al receptor FcRn con un perfil de unión similar para el anticuerpo 1C1 WT a tanto pH 6,0 como pH 7,4. Se obtuvieron resultados similares con los otros anticuerpos manipulados con cisteína probados. Estos resultados demuestran que la manipulación de restos de cisteína en el dominio CH1 de un anticuerpo no afecta la afinidad de unión por receptores de Fcγ y así no afecta la capacidad para controlar funciones efectoras.

6.6 Ejemplo 6. Internalización de anticuerpos manipulados con cisteína

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

65

En este ejemplo, se probaron los anticuerpos manipulados con cisteína para la capacidad para internalizar tras la unión a antígeno de superficie de la célula.

Materiales y métodos. Se llevó a cabo el ensayo de internalización usando placa de fondo en U de 96 pocillos. Se incubaron células PC3 (las células PC3 expresan naturalmente un alto nivel de EphA2) a concentración de 10⁶ células/ml con anticuerpo de control (R347), anticuerpos 1C1 no mutante y 1C1 manipulado con cisteína, todos a 1 mg/ml en hielo durante 30 minutos. Después de esta incubación, las células se lavaron dos veces en 1X PBS. Las células se fijaron entonces a temperatura ambiente durante 20 minutos en 3,7 % de paraformaldehído y se lavaron dos veces en 1X PBS. Las células se permeabilizaron con 0,5 % de Triton X-100 en 1X PBS durante 5 min a temperatura ambiente y se lavaron dos veces en 1X PBS. Se añadió un microgramo de anticuerpo secundario (Alexa-Fluor 488-anti-IgG humana de cabra (H+L), Molecular Probes #A11013) en 1X PBS, 2 % de FBS a las células y se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 min. Después de esta incubación, las células se lavaron dos veces en 1X PBS y se recubrieron directamente sobre portaobjetos tratados de microscopio. Las células se montaron entonces debajo de un cubreobjetos de microscopio (Cubreobjetos VWR#48382-138) usando medio de montaje que contenía DAPI (medio de montaje VectaShield HardSet con DAPI. Vector Laboratories #H-1500). Los portaobjetos se incubaron entonces durante la noche a 4 °C y posteriormente se visualizaron usando un microscopio fluorescente Kikon Eclipse 55i Fluroscent.

Resultados: En la FIGURA 12 se presentan los resultados de un estudio de internalización de anticuerpos realizado en células PC3. Se presentan un conjunto de controles en el primer panel. En (A) células no teñidas se contratiñen con DAPI. En (B) células teñidas con anticuerpo secundario solo se contratiñen con DAPI. En (C) un anticuerpo primario de control, R347, se incuba con las células, además de contratinción con DAPI. En (D) las células se incuban durante una hora y posteriormente se tiñen con R347. Ninguno de los controles (A-D) presenta tinción de células específica de anticuerpo. En (E) células se incuban con anticuerpo 1C1 wt a tiempo cero y durante una hora. Dos imágenes representativas en una hora indican internalización del anticuerpo 1C1 WT. En (F) las células se incuban con anticuerpo 1C1 Ser131Cys a tiempo cero y durante una hora. Dos imágenes representativas en una hora indican la internalización del anticuerpo 1C1 Ser131Cys. En (G) las células se incuban con anticuerpo 1C1 Ser134Cys a tiempo cero y durante una hora. Dos imágenes representativas en una hora indican la internalización del anticuerpo 1C1 Ser134Cys. En (H) las células se incuban con anticuerpo 1C1 Ser(131-132)Cys a tiempo cero y durante una hora. Dos imágenes representativas en una hora indican la internalización de anticuerpo 1C1 Ser(131-132)Cys. En (I) las células se incuban con anticuerpo 1C1 Ser(131-132-134-136)Cys a tiempo cero y durante una hora. Dos imágenes representativas en una hora indican la internalización del anticuerpo 1C1 Ser(131-132-134-136)Cys. Todos los anticuerpos manipulados con cisteína se internalizaron a un grado similar en comparación con el anticuerpo no mutante. Estos resultados demuestran que la internalización del anticuerpo no está afectada por la manipulación de restos de cisteína en el dominio CH1.

6.7 Ejemplo 7. Cuantificación de tioles libres en anticuerpos manipulados con cisteína

En este ejemplo, se determinaron los tioles libres en anticuerpos manipulados con cisteína.

usando el reactivo DNTB de Ellman (DNTB: ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)). Se disolvió DNTB en DMF a 25 mM. Una solución de este compuesto produce un producto de color amarillo medible (TNB; coeficiente de extinción de 13600 M-1 cm-1) que cuando se liberó tras la unión de DNTB al sulfhidrilo libre absorbe en el intervalo visible a 412 nm a pH 8,0. Se prepararon muestras de anticuerpos usando los mismos métodos usados para la conjugación. Se estimaron grupos sulfhidrilo en el anticuerpo no mutante y en los anticuerpos manipulados con cisteína por una comparación simple con una curva patrón compuesta de concentraciones conocidas de un compuesto que contiene

grupos sulfhidrilo, tal como cisteína. Alternativamente, el grupo sulfhidrilo puede cuantificarse usando el coeficiente de extinción de TNB, que se libera tras la unión de DNTB a tioles libres y su cantidad se asocia directamente a los grupos sulfhidrilo libres totales. Se diluyeron veinte microlitros de solución de trabajo de DNTB a concentración de 25 mM en 990 µl de muestra a concentración de 1 mg/ml. El mismo volumen de DNTB se diluyó en 990 µl de tampón

Materiales y métodos: La determinación cuantitativa de grupos sulfhidrilo (-SH) libres en anticuerpos se determinó

de diálisis de muestra para el tubo de ensayo en blanco, y para patrones de cisteína (si se usan) a una concentración estándar de 10 µM. Se mezclaron vigorosamente DNTB y muestras y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos a 37 °C. Se midieron la absorbancia óptica a 412 nm y a 280 nm usando espectroscopía de UV-visible Agilent 8453 y usando una cubeta de cuarzo de 50 µl. Para calcular los tioles libres presentes en anticuerpos se dividió la absorbancia promediada de dos mediciones independientes a 412 nm entre 13600 M-1 cm-1 (el coeficiente de extinción del TNB) para conseguir la molaridad en el ensayo, también se determinó la molaridad del anticuerpo. Se calculó sulfhidrilo libre dividiendo la molaridad de TNB entre la molaridad de anticuerpo en solución.

Resultados: Usando los métodos descritos anteriormente, se realizó una determinación del número de tioles libres en los anticuerpos 1C6 y 1C1 no mutantes y los anticuerpos 1C6 y 1C1 Ser131Cys. La integración de las lecturas de absorbancia en un número entero que representa el número de tioles libres presentados para la unión de reactivo de Ellman da los datos presentados en la Tabla 1. Estos datos demuestran que los anticuerpos manipulados con cisteína resultantes presentan 2 tioles libres (uno para cada dominio CH1 modificado en el anticuerpo dímero) como se produce. Se obtuvieron resultados similares con otros anticuerpos manipulados con cisteína (datos no mostrados). Estos resultados demuestran que los anticuerpos manipulados con cisteína muestran tioles libres como se predijo.

Tabla 1. Determinación de grupos tiol libres en anticuerpos no mutantes y manipulados con cisteína

Anticuerpo	N.º de tioles libres
1C6 no	0
mutante	
1C6	2
Ser131Cys	
1C1 no	0
mutante	
1C1	2
Ser131Cys	

6.8 Ejemplo 7. Especificidad de unión de anticuerpos modificados con cisteína

En este ejemplo, se determinaron las especificidades de unión de diversos anticuerpos manipulados con cisteína en una comparación con el anticuerpo antes de la manipulación con cisteína.

Materiales y métodos: En este ejemplo, se realizó un ensayo basado en ELISA para determinar las especificidades de unión relativas a EphA2 de diversos anticuerpos manipulados con cisteína derivados de 1C1. Se recubrió EphA2-Fc de ratón recombinante en la placa de ELISA. Cada anticuerpo se formuló a 2 µg/ml y se analizó para la unión con un anticuerpo anti-kappa conjugado con HRP. Los datos es un promedio de tres experimentos independientes.

Resultados: En la FIGURA 13 se presentan los resultados de este experimento en el que los anticuerpos manipulados con cisteína presentaron una especificidad de unión equivalente por EphA2 en comparación con 1C1 no mutante antes de la manipulación con cisteína. El uso de 2 anticuerpos sin relacionar (anticuerpo de control 1 y 2) confirma la especificidad de este experimento de ELISA por EphA2. Por tanto, múltiples sustituciones de restos de cisteína no alteran la especificidad de unión del anticuerpo por su antígeno relacionado. Estos resultados demuestran que la manipulación con cisteína de anticuerpos no altera las especificidades de unión en comparación con el anticuerpo antes de la manipulación con cisteína. 3 Ejemplo 9. Anticuerpos manipulados con cisteína pueden conjugarse con PEG.

40 En este ejemplo, se conjugaron diversos anticuerpos manipulados con cisteína con polietilenglicol (PEG) mediante un conector de maleimida. Las cisteínas manipuladas libres presentes en los anticuerpos requieren desprotección para exponer el grupo sulfhidrilo libre para la conjugación.

Materiales y métodos: Se prepararon mutantes de anticuerpo con cisteína (1C1 WT, 1C1 Ser134Cys, 1C1 Ser136Cys y 1C1 Ser132Cys-Ser134Cys, etc.) usando expresión transitoria de mamífero tradicional. Durante la purificación las muestras estuvieron continuamente bajo una corriente de gas nitrógeno con el fin de minimizar la oxidación de cisteína por el aire (oxígeno). Todos los tampones de purificación de anticuerpo contuvieron al menos EDTA 25 mM con el fin de quelar cualquier agente que pudiera bloquear o unirse a las cisteínas libres. Toda la manipulación se llevó a cabo en tampón de conjugación (CB) que contenía: fosfato de sodio 0,1 M, NaCl 0,15 M, EDTA 0,025 M, pH 7,2. El pH 7,2 es óptimo para maximizar la especificidad de la conjugación de maleimida-cisteína. El resto de conjugación (Maleimida-PEG2000) se prepara nuevo cada vez en CB. Los mutantes de anticuerpo se incubaron en CB con cisteína-HCl 10 mM durante 30 minutos a 37 °C con rotación constante. Después del tratamiento con cisteína, la cisteína libre se eliminó por desalación de proteína en CB, usando columnas de desalación comercialmente disponibles (columna Zeba comprada de Pierce). Después de desalar los mutantes de anticuerpos con cisteína, se incubaron con aproximadamente 3 excesos molares de reactivo de conjugación (en este caso Maleimida-PEG2000, comprado de NOF North America Corporation). La conjugación se llevó a cabo durante 2

20

25

30

35

45

horas a 37 °C con rotación constante. Después de la conjugación, el exceso de Maleimida-PEG20000 se elimina por desalación de proteína. Las muestras se monitorizaron por análisis de densitometría de la relación de bandas de cadena pesada conjugada/no conjugada como se observa en SDS-PAGE.

- 5 Resultados: En la FIGURA 14 se presenta el análisis de SPS-PAGE de la desprotección y conjugación de los anticuerpos manipulados con cisteína con maleimida-PEG2000. La conjugación se visualizó como una banda de peso molecular más alto observada en los carriles que representan anticuerpos más PEG (carriles 5-8, 13-16) en comparación con el perfil de bandas observado en los carriles que representan anticuerpos en ausencia de PEG (carriles 1-4, 9-12). Los anticuerpos manipulados con cisteína (1C1 Ser134Cys, 1C1 Ser136Cys, 1C1Ser132-10 134Cys) antes de la reacción de desprotección muestran un nivel bajo pero detectable de conjugación con PEG (carriles 2-4, 6-8). Los anticuerpos manipulados con cisteína después del tratamiento con cisteína libre muestran un nivel más alto de conjugación (carriles 10-12, 14-16) en comparación con los anticuerpos manipulados con cisteína antes de la reacción de desprotección (carriles 2-4, 6-8). Los carriles de tratamiento no con cisteína demuestran un nivel reducido de PEGilación (banda de peso molecular más alto) en comparación con un tratamiento de los 15 anticuerpos manipulados con cisteína con cisteína libre 10 mM. Los pocillos de control que contienen anticuerpos antes de la manipulación con cisteína no presentan nivel detectable de pegilación en ninguna condición (carriles 1, 5, 9 y 13). Estos resultados sugieren que los anticuerpos manipulados con cisteína (1C1 Ser134Cys, 1C1 Ser136Cys, 1C1 Ser132-134Cys) muestran una cisteína libre que está parcialmente protegida. La protección del grupo sulfhidrilo se elimina eficientemente por la reacción de desprotección y libera el grupo sulfhidrilo para que sea 20 reactivo con un conjugado.
 - 7.10 Ejemplo 10. La desprotección de anticuerpos manipulados con cisteína no altera la estructura global del anticuerpo
- En este ejemplo, se desprotegieron diversos anticuerpos manipulados con cisteína para exponer restos de cisteína libres para la conjugación en un esfuerzo por determinar la estabilidad global de la estructura de anticuerpo.
- Materiales y métodos: El procedimiento de desprotección para este ejemplo fue el siguiente: Se incubaron anticuerpos de origen y mutantes a 37 °C en PBS 1X a pH 7,4, EDTA 10 mM con cisteína-HCl usando una relación molar de 75 (cisteína-HCl/anticuerpo) con rotación constante y gas nitrógeno. El exceso de cisteína-HCl se eliminó por intercambio de tampón y diálisis durante la noche en PBS 1X a pH 7,4, EDTA 10 mM. La diálisis se llevó a cabo a temperatura ambiente bajo gas nitrógeno con el fin de minimizar la oxidación de las cisteínas desprotegidas. Se analizaron anticuerpos no tratados y desprotegidos por electroforesis en SDS-PAGE para determinar la integridad de la estructura del anticuerpo.
- Resultados: En la FIGURA 15 se presentan los resultados de este experimento que demuestran que el protocolo de desprotección para liberar las cisteínas no emparejadas en los anticuerpos manipulados con cisteína no altera los enlaces disulfuro intercatenarios y, por tanto, la estructura de anticuerpo global. Comparando los carriles sin tratar y tratados relacionados, los anticuerpos manipulados con cisteína (1C1 Ser134Cys, 1C1 Thr135Cys, 1C1 Ser136Cys, 1C1 Ser139Cys) no demuestran ninguna diferencia en el perfil de SDS-PAGE que sugiera que los anticuerpos no han sido reducidos por tratamiento con cisteína. Por tanto, como control, el anticuerpo no mutante (carriles 2, 8) no presenta ningún cambio en el perfil de SDS-PAGE, complementando adicionalmente los datos que sugieren que la estructura global del anticuerpo sigue intacta durante y después del protocolo de desprotección.
- 45 7.11 Ejemplo 11. Los anticuerpos manipulados con cisteína pueden conjugarse con PEG-biotina
 - En este ejemplo, diversos anticuerpos manipulados con cisteína se conjugaron con PEG-biotina mediante un conector de maleimida.
- Materiales y métodos: Se prepararon anticuerpos manipulados con cisteína y los anticuerpos de control no mutantes como se presentó anteriormente. La conjugación se llevó a cabo a 37 °C en PBS 1X a pH 7,4, EDTA 10 mM usando maleimida-PEG2-biotina y usando una relación molar de 1:6 (maleimida-PEG2-biotina:anticuerpo) durante 2 horas a 37 °C con rotación constante. Se eliminó la maleimida-PEG2-biotina no reaccionada por una amplia diálisis en PBS 1X a pH 7,4, 10 mM EDTA a 4 °C. Los anticuerpos se analizaron por análisis de transferencia Western y se visualizaron para biotina. El anticuerpo estuvo presente a una concentración de 1 mg/ml. Sin embargo, se obtuvieron resultados similares con concentraciones de anticuerpo de hasta 5 mg/ml.
- Resultados: En la FIGURA 16 se presentan los resultados de una reacción de conjugación con biotina con diversos anticuerpos manipulados con cisteína. El Carril 1 es un anticuerpo de control marcado con biotina para visualizar el tamaño predicho de un anticuerpo con biotina conjugado con una cisteína libre. El anticuerpo no mutante 1C1 no mostró conjugación con biotina debido a la falta de cisteínas libres (carril 3). Los diversos anticuerpos manipulados con cisteína (1C1 Ser134Cys, 1C1 Thr135Cys, 1C1 Ser136Cys, 1C1 Ser139Cys) presentaron una eficiente conjugación con biotina al peso molecular esperado (carriles 4-7). Estos resultados demuestran que los anticuerpos manipulados con cisteína 1C1 Ser134Cys, 1C1 Thr135Cys, 1C1 Ser136Cys, 1C1 Ser139Cys presentan una cisteína libre capaz de conjugación con biotina.

7.12 Ejemplo 12. Los anticuerpos manipulados con cisteína conjugados retienen la unión a antígenos relacionados.

En este ejemplo, se probaron diversos anticuerpos manipulados con cisteína conjugados con biotina para la retención de especificidad de unión en comparación con un anticuerpo de control no conjugado.

5

Materiales y métodos: Se prepararon anticuerpos manipulados con cisteína como se presenta en el Ejemplo 11. La placa de ELISA se preparó con EphA2-FLAG recombinantemente producido recubierto a 2 μg/ml. Los diversos anticuerpos se incubaron con la placa de ELISA, se lavaron y se detectaron con anti-estreptavidina conjugada con HRP.

10

Resultados: En la FIGURA 17 se presentan los resultados de un experimento de unión a placa de ELISA en el que los diversos anticuerpos manipulados con cisteína conjugados con biotina se probaron para la retención de especificidad por antígenos relacionada. No pudieron visualizarse anticuerpos de control en la placa ya que no contienen biotina conjugada para la detección. En este experimento, los anticuerpos manipulados con cisteína conjugados con biotina 1C1 Ser134Cys, 1C1 Thr135Cys, 1C1 Ser136Cys, 1C1 Ser139Cys retuvieron la unión para EphA2. Estos resultados sugieren que la conjugación de los diversos anticuerpos manipulados con cisteína no afecta adversamente la unión a sus antígenos relacionados.

15

7.13 Ejemplo 13. Cuantificación de la conjugación con biotina con manipulados con cisteína

20

En este ejemplo, diversos anticuerpos manipulados con cisteína conjugados con biotina se analizaron para el contenido específico de biotina por molécula de anticuerpo.

25

Materiales y métodos: Se prepararon anticuerpos manipulados con cisteína como se presentó en el Ejemplo 11. Se emplearon técnicas analíticas de espectrometría de masas convencional para determinar la masa aparente de los anticuerpos respectivos. Se determinó la masa intacta de los anticuerpos sin conjugar y conjugados. La diferencia entre la masa sin conjugar y la masa conjugada se determinó por espectrometría. Usando la masa predicha de dos moléculas de biotina como aproximadamente 1051,24 Da, la diferencia de la masa sin conjugar y conjugada puede reflejar las moléculas de biotina adicionales.

30

Tabla 2: Contenido de biotina de diversos anticuerpos manipulados con cisteína

Anticuerpo	Masa sin conjugar (Da)	Masa conjugada (Da)	Masa *D (Da)	Número	de
				biotinas	
1C1 no mutante + Biotina	149440,7	149439,0	1,7	0	
1C1 Ser134Cys + Biotina	149472,8	150527,0	1054,2	2	
1C1 Thr135Cys + Biotina	149444,0	150497,0	1053,0	2	
1C1 Ser136Cys + Biotina	149471,7	150533,0	1061,3	2	
1C1 Thr139Cys + Biotina	149453,0	150511,0	1058,0	2	

35

Resultados: En la Tabla 2 se presentan los resultados de un análisis de espectrometría de masas de diversos anticuerpos conjugados con biotina. El anticuerpo no mutante 1C1 (incluso cuando se trató con biotina) no muestra diferencia significativa de la masa sin conjugar en comparación con la masa conjugada, sugiriendo que no hay moléculas de biotina conjugadas con ese anticuerpo. 1C1 Ser134Cys, 1C1 Thr135Cys, 1C1 Ser136Cys, 1C1 Ser139Cys muestran todos una diferencia en la masa entre la masa conjugada y la masa sin conjugar. Esta diferencia es aproximadamente igual a la masa predicha de dos moléculas de biotina de 1051,24 Da. Así, debido a la naturaleza homodimérica de cadenas pesadas del anticuerpo, la sustitución de una única cisteína en la cadena pesada de cada anticuerpo.

40

7.14 Ejemplo 14. La conjugación con anticuerpos manipulados con cisteína es específica de sitio y altamente eficiente

45

En este ejemplo se determinó la eficiencia y posición de la conjugación de biotina con diversos anticuerpos manipulados con cisteína.

50

Materiales y métodos: Se prepararon anticuerpos manipulados con cisteína como se presenta en el Ejemplo 11. Se emplearon técnicas de mapeo de péptidos estándar para determinar la posición relativa y eficiencia de la reacción de conjugación con biotina. Basándose en la secuencia primaria del anticuerpo se determinó una masa teórica y perfil de fragmentación de péptidos. Esta masa teórica se comparó con la masa observada presentada por los péptidos y se determinó la diferencia. Se identificó el cambio de la masa predicha presentado por la molécula de biotina conjugada con un péptido específico. Además, se determinó la intensidad relativa del péptido que contiene biotina y el péptido no conjugado como la eficiencia de conjugación. Los resultados de la eficiencia de conjugación se presentan a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3. Eficiencia de conjugación de diversos anticuerpos manipulados con cisteína en complejo con biotina

Anticuerpo	Eficiencia de conjugación
1C1 No mutante	0 %
1C1 Ser134Cys	53 %
1C1 Thr135Cys	48 %
1C1 Ser136Cys	63 %
1C1 Thr139Cys	70 %

Resultados: En el análisis de mapeo de péptidos de diversos anticuerpos conjugados con biotina, se identificó el péptido específico con el que se conjugó la biotina. Específicamente, para cada anticuerpo, 1C1 Ser134Cys, 1C1 Thr135Cys, 1C1 Ser136Cys, 1C1 Thr139Cys, la biotina se conjugó con la cisteína sin aparear predicha. Además, se analizaron las proporciones relativas de especie de biotina conjugada y sin conjugar para determinar la eficiencia de conjugación. En la Tabla 3 se presentan las eficiencias de conjugación de los diversos anticuerpos manipulados con cisteína. El anticuerpo no mutante no presentó conjugación ya que no retiene un sitio fácilmente disponible para la conjugación. Los anticuerpos manipulados con cisteína presentaron eficiencias de conjugación con biotina que oscilaron del 48 % al 70 %. Estos datos demuestran que la conjugación específica de sitio se produce a un alto nivel de eficiencia para los diversos anticuerpos manipulados con cisteína.

Aunque la anterior invención se ha descrito en algún detalle para fines de claridad y entendimiento, será evidente para un experto en la materia a partir de una lectura de la presente divulgación que pueden hacerse diversos cambios en la forma y detalle sin apartarse del verdadero alcance de la invención. Por ejemplo, todas las técnicas y aparatos descritos anteriormente pueden usarse en diversas combinaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

20 <110> MedImmune, LLC.

<120> ANTICUERPOS MANIPULADOS CON CISTEÍNA PARA CONJUGACIÓN ESPECÍFICA DE SITIO

25 <130> MED0032.EP

<140> EP09702787.4 <141> 16-01-2009

<150> 61/022.073

<151> 18-01-2008

<160> 11

30

35 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 214

<212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

45 <400> 1

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

<210> 2 <211> 453 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10 <400> 2

 Glu Val
 Val
 Glu Leu
 Leu Glu Ser
 Gly Gly Gly Leu
 Val
 Gln Pro Gly Gly Gly Gly Ser
 Gly Phe Thr
 Phe Ser
 Phe Tyr

 Ser
 Leu Arg Leu Ser
 Cys
 Ala
 Ala
 Ser
 Gly Phe Thr
 Phe Ser
 Phe Tyr

 Gln Met Met Gly Trp
 Val
 Arg Gln Ala
 Pro Gly Lys
 Gly Leu Glu Trp
 Val

 Ser
 Tyr
 Ile Ser
 Pro Ser Gly Gly Gly Thr Lys
 Tyr Ala
 Asp Ser
 Val

 Lys
 Gly Arg
 Phe Thr
 The Ser Arg
 Asp Asn Ser Lys
 Asn Thr Leu Tyr
 Tyr

 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Ser
 Fro Gly Tyr
 Asp Pro Thr Ala Val Tyr
 Tyr
 Tyr

 Ala Arg Gly Gly Gly Asn Leu Tyr Ser Gly Tyr
 Fro Gly Tyr
 Asp Pro Thr Leu Asp Tyr

 Trp Gly Gly Gly Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Gly

 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Gly

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

 Thr Val Ser Trp Asp Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val 180 185 190 Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val 195 200 205 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys 210 220 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu 225 230 240 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr 245 250 255 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val 260 270 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val 275 280 285 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser 290 295 300 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu 305 310 315 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala 325 330 335Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro 340 345 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln 355 360 365 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala 370 380 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr 385 390 395 400 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu 405 415 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser 420 425 430 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser 445 Leu Ser Pro Gly Lys

450

<210> 3
<211> 97
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Construcción sintética
10

<400> 3

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser 10 15

Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe $20 \hspace{1.5cm} 25 \hspace{1.5cm} 30$

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly 35 40 45

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu 50 60

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr 65 75 80

Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr 85 90 95

Va1

15 <210> 4 <211> 97 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220> <223> Construcción sintética

<400> 4

```
Ser<br/>Thr<br/>Ser<br/>ThrLys<br/>20Gly<br/>SerSer<br/>Ser<br/>AlaPhe<br/>AlaPro<br/>25Leu<br/>CysAla<br/>AlaPro<br/>AlaPro<br/>25Cys<br/>AsnLeu<br/>AlaPro<br/>AlaPro<br/>AsnSer<br/>AsnGly<br/>AlaAla<br/>Asp<br/>AsnLeu<br/>AsnSer<br/>AsnGly<br/>AsnAla<br/>Asp<br/>AsnLeu<br/>AsnSer<br/>AsnSer<br/>AsnGly<br/>AsnLeu<br/>AsnSer<br/>AsnSer<br/>AsnSer<br/>AsnLeu<br/>Asp<br/>ArgThrCysAsnValAsp<br/>AspHisLysProSer<br/>AsnSerSer<br/>AsnLysValAsp<br/>AspLysArg
```

<210> 5

<211>97

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10 <400> 5

5

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser $1 \hspace{1cm} 15$

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

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly 35 40 45

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu 50 60

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr 65 70 75 80

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys 85 90 95

va1

15 <210> 6

<211>97

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400>6 5 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser $1 \hspace{1cm} 5 \hspace{1cm} 10 \hspace{1cm} 15$ Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe 20 25 30 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly 35 40 45 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu 50 60 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr 65 70 75 80 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys 85 90 95٧al <210>7 <211> 102 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> Construcción sintética 15 <400> 7

Ser Thr Gln Ser Pro Ser Val Phe Pro Leu Thr Arg Cys Cys Lys Asn Ile Pro Ser Asn Ala Thr Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Ala Thr Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Met Val Thr Cys Asp Thr Gly Ser Leu Asn 35 Gly Thr Thr Met Thr Leu Pro Ala Thr Thr Leu Thr Leu Ser Gly His 50 Tyr Ala Thr Ile Ser Leu Leu Thr Val Ser Gly Ala Trp Ala Lys Gln Met Phe Thr Cys Arg Val Ala His Thr Pro Ser Ser Thr Asp Trp Val Asp Asn Lys Thr Phe Ser

<210>8

<211> 103

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 8

10

Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn Ser 10 15

Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp Phe 20 25 30

Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser Asp 35 40 45

Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys Tyr 50 60

Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln Gly 65 75 80

Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn Lys 85 90 95

Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro 100

15 <210> 9 <211> 101 <212> PRT

<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Construcción sintética
5
<400> 9

Ser Pro Thr Ser Pro Lys Val Phe Pro Leu Ser Leu Cys Ser Thr Gln 10 15

Pro Asp Gly Asn Val Val Ile Ala Cys Leu Val Gln Gly Phe Phe Pro 20 25 30

Gln Glu Pro Leu Ser Val Thr Trp Ser Glu Ser Gly Gln Gly Val Thr 35 40 45

Ala Arg Asn Phe Pro Pro Ser Gln Asp Ala Ser Gly Asp Leu Tyr Thr $50 \hspace{1cm} 55$

Thr Ser Ser Gln Leu Thr Leu Pro Ala Thr Gln Cys Leu Ala Gly Lys 70 75 80

Ser Val Thr Cys His Val Lys His Tyr Thr Asn Pro Ser Gln Asp Val $85 \hspace{1.5cm} 90 \hspace{1.5cm} 95$

Thr Val Pro Cys Pro

10 <210> 10 <211> 101 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220> <223> Construcción sintética <400> 10

<210> 11

<211> 100

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10 <400> 11

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

Phe Arg Trp Pro

REIVINDICACIONES

- 1. Un anticuerpo modificado con cisteína, en el que el anticuerpo modificado con cisteína comprende una sustitución de uno o más aminoácidos a un resto de cisteína en la región 131-139 de la cadena pesada de un anticuerpo como se define por el sistema de numeración del índice EU, en el que el anticuerpo modificado con cisteína comprende al menos un grupo tiol libre.
 - 2. El anticuerpo modificado con cisteína de la reivindicación 1, en el que los aminoácidos sustituidos se eligen de 131, 132, 134, 135, 136 y 139 de la cadena pesada del anticuerpo, según el sistema de numeración del índice EU.
- 3. El anticuerpo modificado con cisteína de la reivindicación 1 o 2, en el que dicho grupo tiol libre es capaz de conjugación química con un agente citotóxico, agente quimioterapéutico, toxina, radionúclido, ADN, ARN, ARNip, microARN, ácido nucleico peptídico, aminoácido no natural, péptido, enzima, marca fluorescente o biotina.
- 4. El anticuerpo modificado con cisteína de la reivindicación 3, en el que dicho agente citotóxico se elige de un agente anti-tubulina, un ligante del surco menor del ADN, un anti-mitmaitansanoide y una auristatina.
 - 5. El anticuerpo modificado con cisteína de la reivindicación 3, en el que dicho agente quimioterapéutico se elige de taxol, paclitaxel, doxorubicina, metotrexato, dolastatina, alcaloides de la vinca, metotrexato y duocarmicina.
 - 6. El anticuerpo modificado con cisteína de la reivindicación 3, en el que dicha toxina se elige de abrina, brucina, cicutoxina, toxina diftérica, toxina botulínica, toxina Shiga, endotoxina, toxina tetánica, toxina Pertussis, toxina del ántrax, toxina del cólera, falcarinol, toxina alfa, geldanamicina, gelonina, lotaustralina, ricina, estricnina y tetrodotoxina.
- 7. El anticuerpo modificado con cisteína de la reivindicación 3, en el que dicho radionúclido se elige de cromo (⁵¹Cr), cobalto (⁵⁷Co), flúor (¹⁸F), gadolinio (¹⁵³Gd, ¹⁵⁹Gd), germanio (⁸⁸Ge), holmio (¹⁶⁶Ho), indio (¹¹⁵In, ¹¹³In, ¹¹¹²In, ¹¹¹¹In), yodo (¹³¹I, I¹²⁵, I¹²³, I¹²¹), lantano (¹⁴⁰La), lutecio (¹⁷⁷Lu), manganeso (⁵⁴Mn), molibdeno (⁹⁹Mo), paladio (¹⁰³Pd), fósforo (³²P), praseodimio (¹⁴²Pr), prometio (¹⁴⁹Pm), renio (¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re), rodio (¹⁰⁵Rh), rutenio (⁹⁷Ru), samario (¹⁵³Sm), escandio (⁴⁷Sc), selenio (⁷⁵Se), estroncio (⁸⁵Sr), azufre (³⁵S), tecnecio (⁹⁹Tc), talio (²⁰¹Ti), estaño (¹¹³Sn, ¹¹⁷Sn), tritio (³H), xenón (¹³³Xe), iterbio (⁹⁰Yb, ¹⁷⁵Yb), itrio (⁹⁰Y) y cinc (⁶⁵Zn).
 - 8. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
 - 9. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 8.

5

10

20

35

- 10. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 9.
- 40 11. Un conjugado de anticuerpo del anticuerpo modificado con cisteína de cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
 - 12. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de anticuerpo de la reivindicación 11.
- 13. La composición farmacéutica de la reivindicación 12 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno en un sujeto que la necesite, en la que la enfermedad o el trastorno es cáncer, una enfermedad o un trastorno autoinmunitario, una enfermedad o un trastorno inflamatorio, o una enfermedad o un trastorno infeccioso.
 - 14. El anticuerpo modificado con cisteína de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que dicho anticuerpo comprende la inclusión de aminoácido(s) adicional(es), en el que dicha inclusión de aminoácido(s) adicional(es) se produce después de una posición elegida de los restos 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138 y 139.
- 15. El anticuerpo modificado con cisteína de la reivindicación 14, en el que dicho anticuerpo comprende además una segunda inclusión de aminoácido(s) adicional(es) en la región del bucle 131-139, en el que dicha segunda inclusión de aminoácido(s) adicional(es) se produce después de dicha primera inclusión de aminoácido(s) adicional(es), en el que dicha segunda inclusión de aminoácido(s) adicional(es) se produce después de una posición elegida de los restos 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138 y 139.

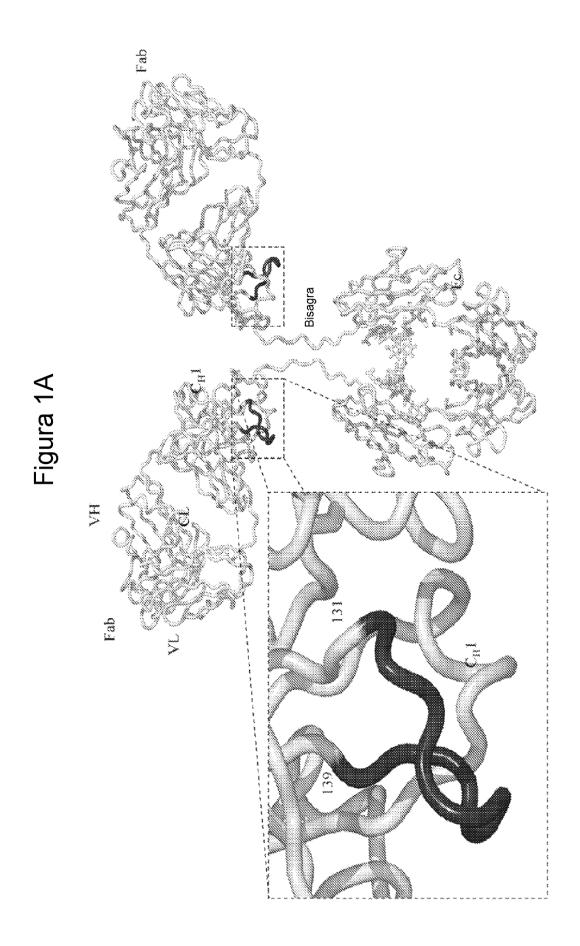


Figura 1B

106 K Cadena ligera

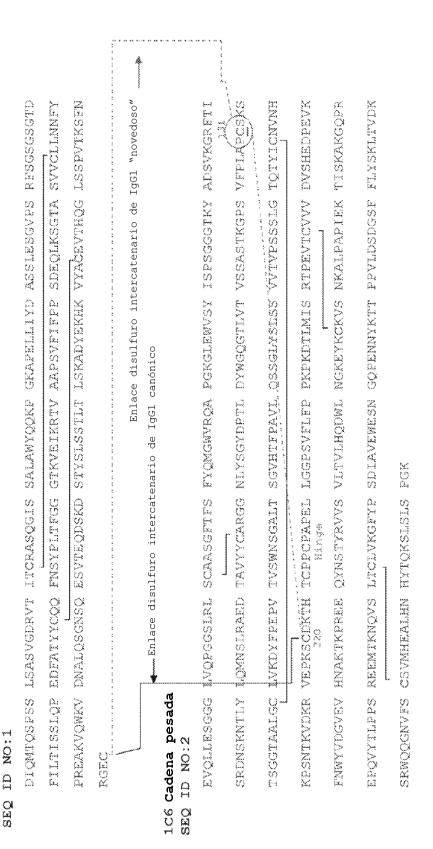
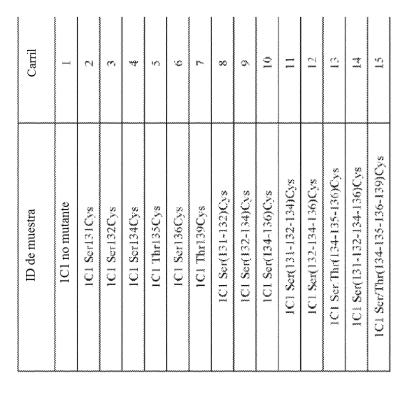


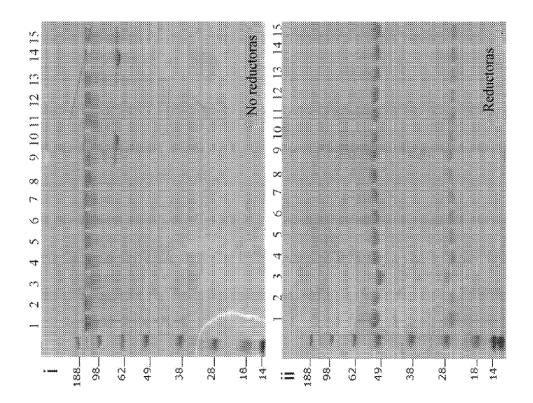
Figura 1C

N.º 131 para IgG1 (índice EU)

ພັງ	ŵ	(C)	ń	un)	เป	w)	เมา	ಟ್									
STRGPSVFPLAPCSRSTSESTPALGCLVKDYFP-EPVTVSWNSGALTSGVHTFPA-	STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP-EPVTVSWNSGALTSGVHTFPA-	STROPSVFPLAPSSKSTSCOTPALGCLVRDYFP-EPVTVSWNSGALTSGVHTFPA-	STKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFP-EPVTVSWNSGALTSGVHTFPA-	STOSPSVEPLTRCCKNIPSNATSVTLGCLATGYEP-EPVMVTCDTGSLNGTTMTLPAT	SASAPILFPLVSCENS-PSDISSVAVGCLAQDFLP-DSITFSWKYKNNSDISSTRGFPS-	SPISPKVEPLSICSIQ-PDGNVVIACLVQGFEPQEPLSVIMSESGQGVIARNEPPS	SPTSPKVFPLSLBSTP-QDGNVVVACLVQGFFPQEPLSVTWSESGQNVTARNFPPS	PTRAPDVEPIISGCRH-PRDNSPVVLACLIIGYHP-TSVTVIWYMGTQSQPQRTEPEI	VLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTK-VDKTV 97	VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTK-VDKRV 97	VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK-VDKKV 97	VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTK-VDKRV 97	THISGHYATISHIVSG-AWAKQMFTCRVAHTPSSTDWVDNKTFS 102	-VLRGGKYAATSQVLLPSKDVMQGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVPLP 103	QDASGOLYTTSSQLTLPATQCLAGKSVYCHVKHYTNPSQ-DVTVPCP 101	QDASGDLYTTSSQLTLPATQCPDGKSVTCHVKHYTNPSQ-DVTVPCF 101	QRRD-SYYMTSSQLSTPLQQWRQGEYKCVVQHTASKSK-KEIFRWP 100
J00230-IgG2	K01316-1964	J00228-1gG1	M12958-1963	J00222-IgE	X57331-IgM	J00220-IgA1	J00221-19A2	K02875-1gD	VIQSSGLY	VLQSSGLY	VLQSSGLY	VLQSSGLY	TLILSCHY	-VLRGGKY	QUASGULY	QDASGDLY	QRRD-SYY
SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:7	SEC ID NO:8	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	J00230-19G2	K01316-1gG4	J00228-IgG1	M12958-1gG3	J00222-IgE	X57331-1gM	J00220-19A1	J06221-19A2	K02875-IqD

Figura 2A





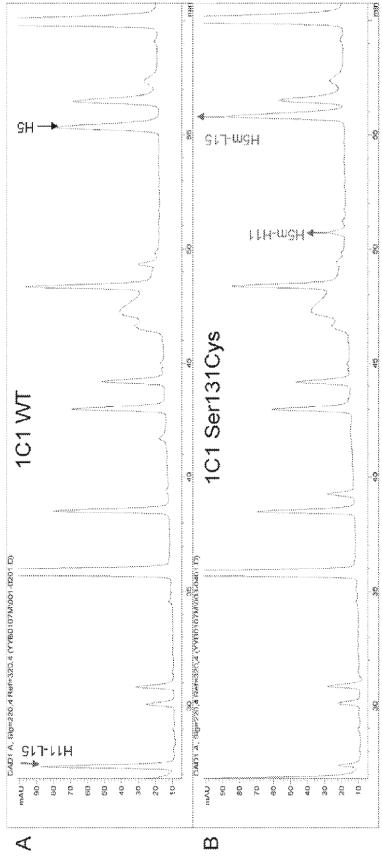


Figura 2B

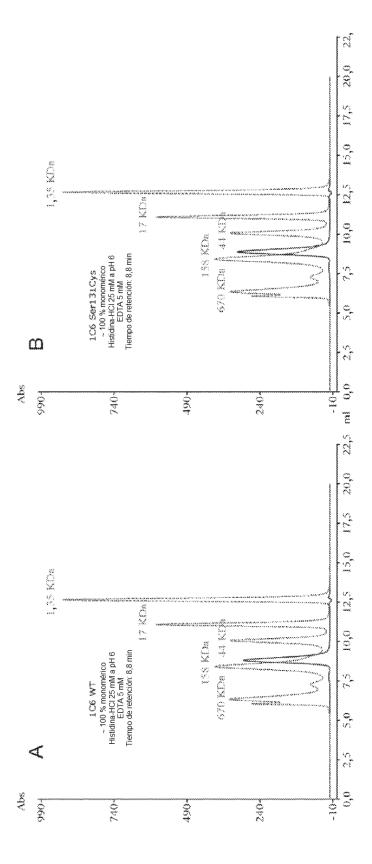
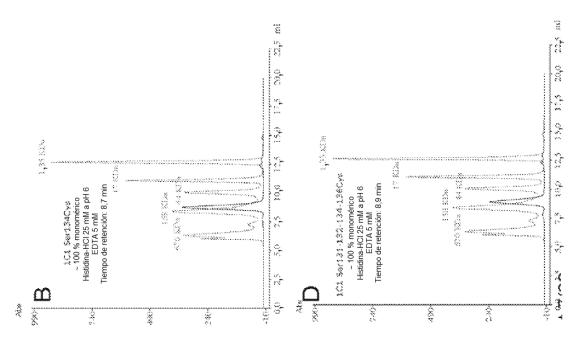


Figura 3

Figura 4



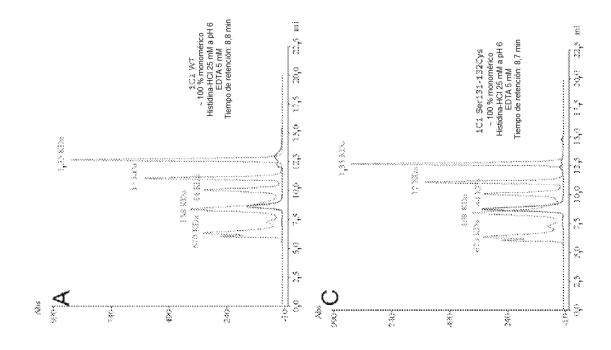


Figura 5



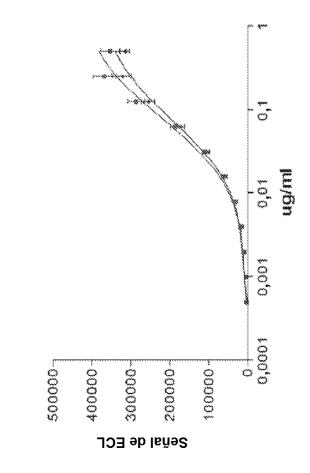


Figura 6

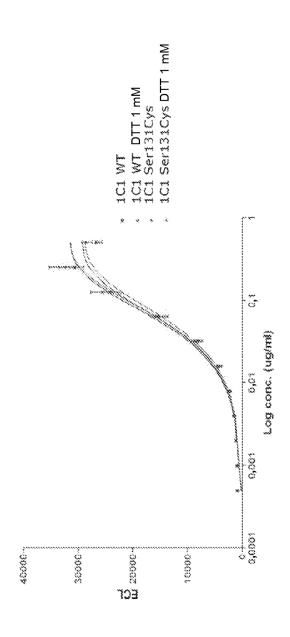
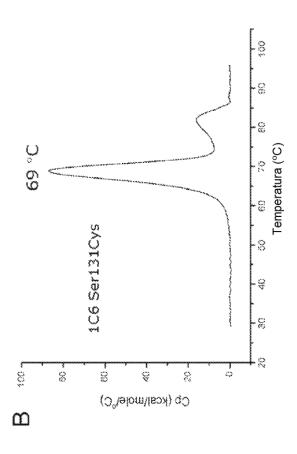


Figura 7



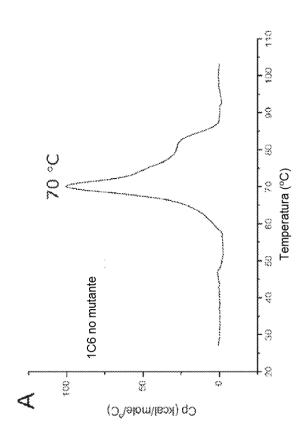
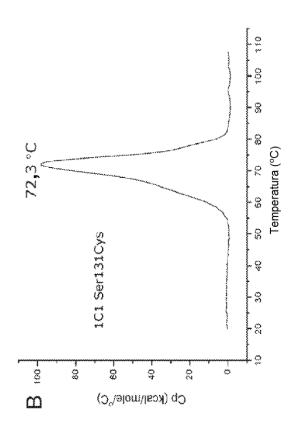


Figura 8



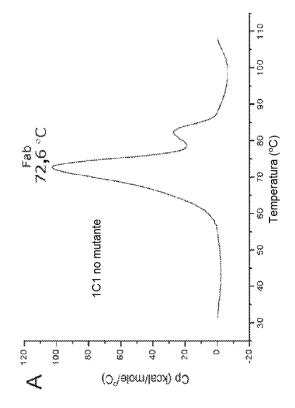
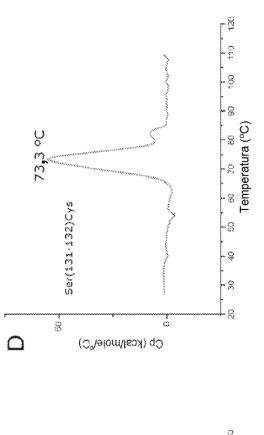


Figura 8 continuación



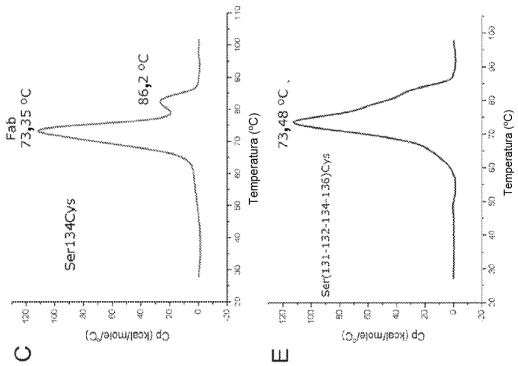
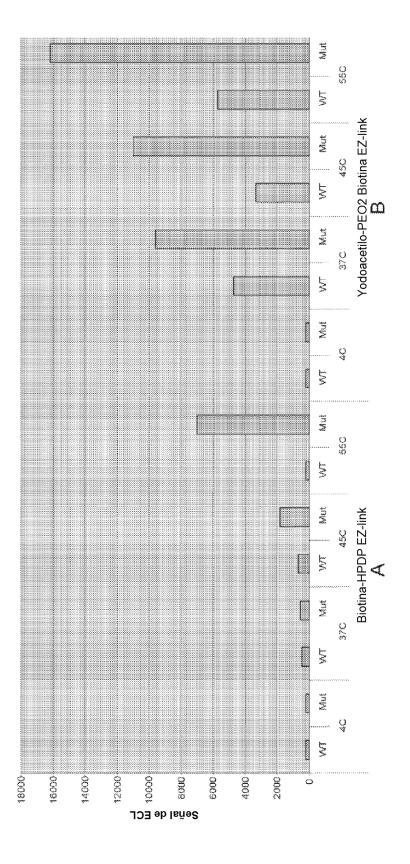


Figura 9



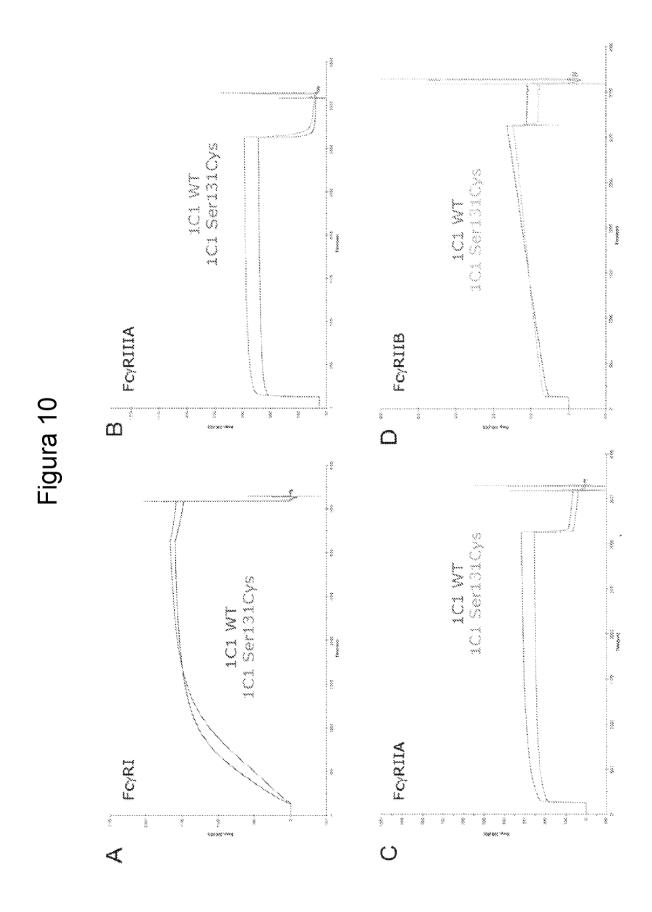
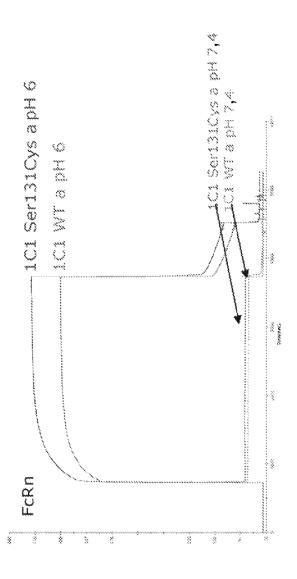
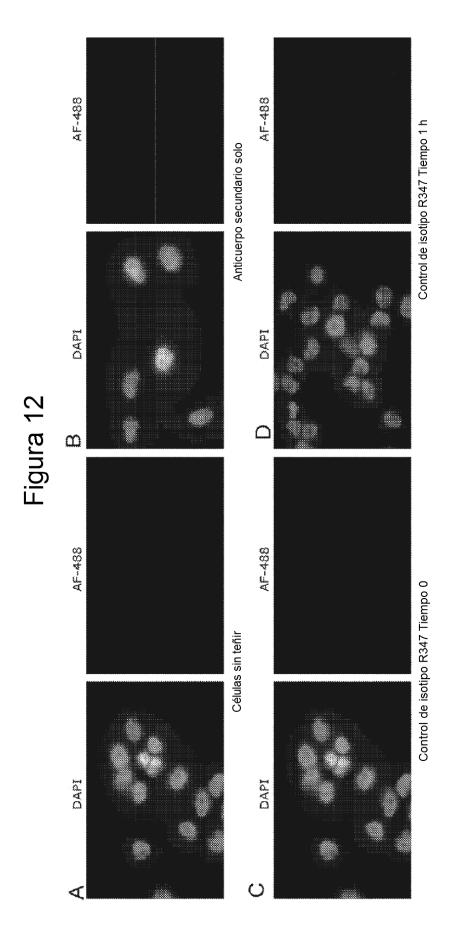


Figura 11

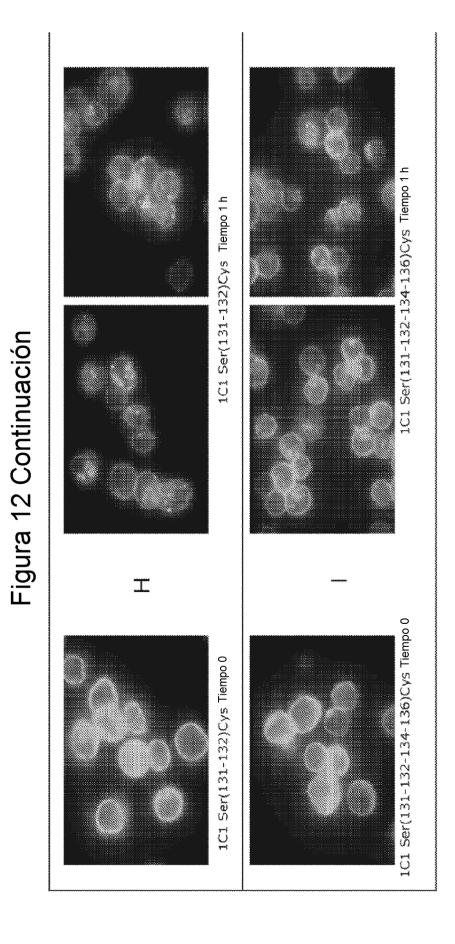


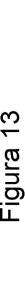


1C1 Ser134Cys Tiempo 1h 1C1 Ser131Cys Tiempo 1 h 1C1 WT Tiempo 1 h Ш ш ෆ 1C1 Ser134Cys Tiempo 0 1C1 Ser131Cys Tiempo 0 1C1 W/T Tiempo 0

Figura 12 Continuación

73





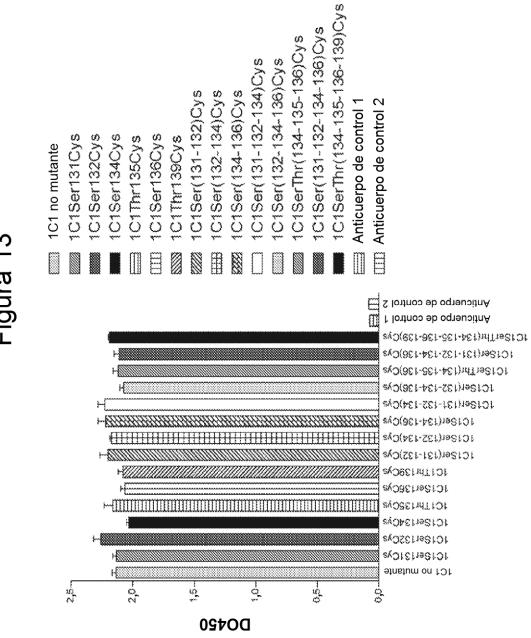


Figura 14

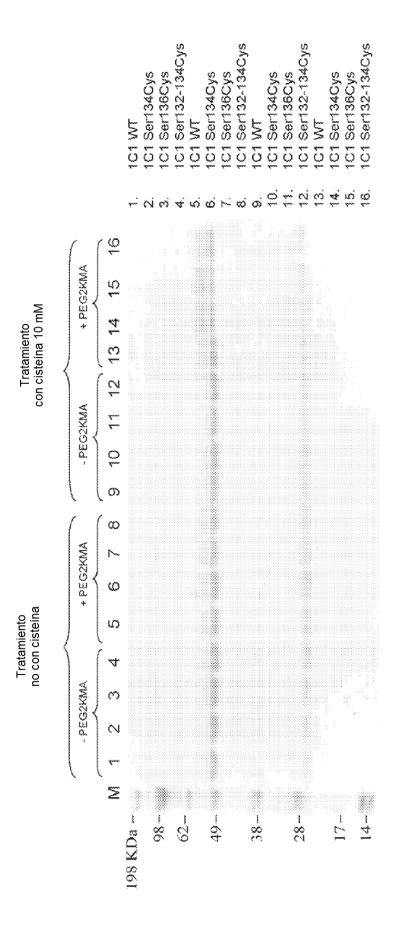
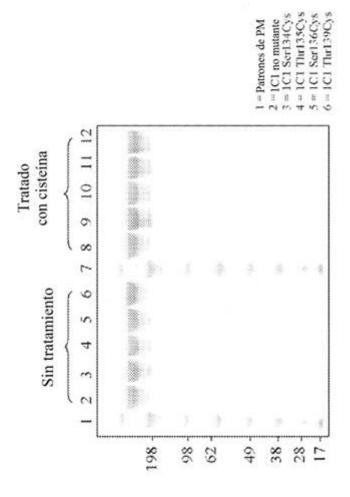


Figura 15



1 -- Anticuerpo de control Lys-biotina 2 -- Patrones de PM 3 -- IC1 no mutante 4 -- IC1 Ser134Cys 5 -- IC1 Thr135Cys 6 -- IC1 Thr135Cys 7 -- IC1 Thr139Cys

Figura 16

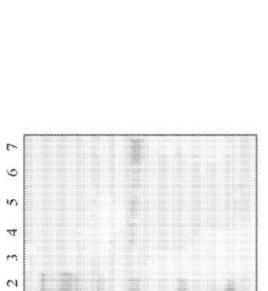


Figura 17

