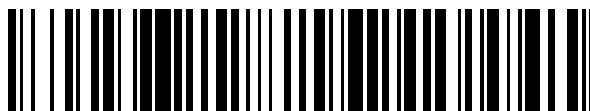


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 223**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 47/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.07.2011 PCT/IB2011/053092**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.01.2012 WO12007896**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2011 E 11745833 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018 EP 2593142**

54 Título: **Conjugados de anticuerpos multifuncionales**

30 Prioridad:

**12.07.2010 US 363507 P**

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

**15.03.2019**

73 Titular/es:

**PFIZER HEALTHCARE IRELAND (100.0%)  
9 Riverwalk National Digital Park Citywest  
Business Campus  
Dublin 24, IE**

72 Inventor/es:

**BHAT, ABHIJIT SURESH;  
BRADSHAW, CURT WILLIAM;  
LAURENT, OLIVIER ALEXANDRE;  
PRESTON, RICHARD RYAN;  
TUMELTY, DAVID;  
WOOD, LAUREN DIANE;  
YU, WEI HONG y  
LEE, ALICE**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 704 223 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Conjugados de anticuerpos multifuncionales

**Antecedentes**

5 El desarrollo de agentes terapéuticos bifuncionales tiene un gran potencial para aumentar las estrategias de terapia de combinación. Un agente terapéutico bifuncional puede proporcionar el beneficio de una terapia de combinación modulando dos rutas diferentes con una entidad terapéutica. Además, los agentes terapéuticos bifuncionales también pueden beneficiarse de sinergias entre rutas y demostrar una actividad aumentada en comparación con agente monofuncionales. Además, los agentes terapéuticos bifuncionales pueden proporcionar beneficios en términos de costes de fabricación, almacenamiento y envío reducidos, así como reducir el número de terapias administradas al paciente y simplificar los regímenes de dosificación.

10 El IGF1R es una proteína heterotetramérica transmembrana que tiene dos cadenas  $\alpha$  extracelulares y dos cadenas  $\beta$  transmembrana en una configuración unida por disulfuro ( $\beta$ - $\alpha$ - $\alpha$ - $\beta$ ). El IGF-1R se une al IGF-1 con gran afinidad. El IGF-1 es un péptido de 70 aminoácidos que se produce principalmente por el hígado en respuesta a la estimulación por hormona del crecimiento, pero puede sintetizarse por casi cualquier tejido en el cuerpo y circula en suero a concentraciones de 100-200 ng/ml. La señalización de IGF-1R puede desempeñar un papel en múltiples tipos tumorales y está específicamente implicada en el cáncer pulmonar. Por ejemplo, niveles plasmáticos elevados de IGF-1 se asocian con un riesgo aumentado de cáncer pulmonar. Además, IGF-1, IGF-2 e IGF-1R se expresan por células pulmonares normales pero se sobreexpresan por células de cáncer pulmonar. La señalización de IGF-1R también se ha implicado en el cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, sarcoma, mieloma múltiple y otros tumores malignos. Los documentos WO20053596, WO2005016967, WO2005005635y WO2009032145 describen anticuerpos de IGF1R y sus porciones de unión a antígeno.

15 La angiopoyetina-1 (Ang1) y la angiopoyetina-2 (Ang2) median el proceso de angiogénesis como ligandos del receptor de células endoteliales Tie2, junto con VEGF y otros reguladores de la angiogénesis. La Ang1 estimula la fosforilación de Tie2, recluta pericitos hacia vasos sanguíneos recién formados y promueve su maduración. Se sabe que la Ang2 es angiogénica y se sobreexpresa en muchos cánceres. La Ang2 compite con la Ang1 por la unión de Tie2, promueve la disociación de pericitos y da como resultado vasos sanguíneos inestables. En presencia de VEGF y otros factores angiogénicos, las células endoteliales en estos vasos inestables proliferan y migran para formar nuevos vasos sanguíneos.

20 Aproximadamente el 50 % de los pacientes con tumores sólidos tienen una expresión aumentada de Ang2, pero los niveles de Ang2 en tejidos cancerosos son muy variables. Una mayor expresión de Ang2 está claramente correlacionada con una escasa supervivencia, enfermedad en fase posterior y cánceres más invasivos. También se ha correlacionado una menor proporción entre Ang1 y Ang2 con un mal pronóstico para cáncer de ovario. Se describe que la expresión de Tie2 está regulada positivamente en el carcinoma hepatocelular, astrocitomas, sarcoma de Kaposi, angiosarcoma cutáneo y carcinoma pulmonar no microcítico. Tie2 se sobreexpresa en los vasos sanguíneos de muchos tumores. Los monocitos que expresan Tie2 contribuyen a la formación de vasos sanguíneos tumorales. Datos recién publicados demuestran que el secuestro de Ang2 específicamente puede inhibir el crecimiento tumoral y provocar la regresión de tumores en fase determinada. El documento WO2008056346 desvela péptidos de unión a Ang2.

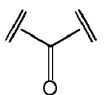
25 Dirigirse tanto a IGF1R como a Ang2 en la misma terapia puede mostrar ser una herramienta eficaz para los oncólogos la usen en múltiples entornos de tratamiento. Dichas estrategias se han postulado (por ejemplo, en los documentos WO2009088805 y WO2010040508), pero ninguna se ha autorizado hasta la fecha. Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar terapias oncológicas alternativas que se dirijan tanto a IGF-1R como a Ang2.

30 La referencia a cualquier técnica en el presente documento descriptiva no es, ni debe interpretarse como, un reconocimiento de ninguna forma o sugerencia de que la técnica citada forme parte del conocimiento general común.

**Sumario de la Invención**

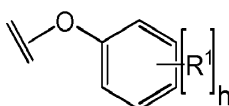
35 La presente invención proporciona un procedimiento para preparar un conjugado de anticuerpo multifuncional (MAC), comprendiendo el MAC:

- 50 (i) un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende al menos un fragmento de una región kappa constante de cadena ligera (CL<sub>K</sub>) que comprende K<sup>188</sup> y H<sup>189</sup> Según la numeración de Kabat;
- (ii) un enlazador que comprende la fórmula X-Y-Z, donde Z es un grupo de fórmula



55 y está covalentemente conectado al anticuerpo a través del grupo  $\epsilon$ -amino de la cadena lateral de K<sup>188</sup> (de acuerdo con la numeración de Kabat), Y es una cadena de conexión compatible biológicamente, lineal o ramificada, y X es un grupo conectado covalentemente a al menos una fracción efectora,

el método comprende unir covalentemente la fracción efectora a un enlazador que termina en un éster activado con un grupo saliente Z\* de fórmula:

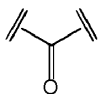


donde R<sup>1</sup> es F, y h = 3, 4 o 5,  
y reaccionando el complejo Fracción efectora-enlazador-Z \* así formado con el anticuerpo.

La presente invención también proporciona composiciones producidas de acuerdo con los métodos de la invención.

5 La presente invención proporciona una composición que comprende un conjugado de anticuerpo multifuncional (MAC), el MAC que comprende:

- (i) un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende al menos un fragmento de una región kappa constante de cadena ligera (CLk) que comprende K<sup>188</sup> y H<sup>189</sup> Según la numeración de Kabat;
- (ii) un enlazador que comprende la fórmula X-Y-Z, donde Z es un grupo de fórmula



10 y está covalentemente conectado al anticuerpo a través del grupo ε-amino de la cadena lateral de K<sup>188</sup> (de acuerdo con la numeración de Kabat), Y es una cadena de conexión compatible biológicamente, lineal o ramificada, y X es un grupo conectado covalentemente a al menos una fracción efectora,

15 en donde al menos aproximadamente el 50 % de la fracción efectora en la composición o muestra se conjuga con K<sup>188</sup>-CLk.

La presente divulgación proporciona un conjugado de anticuerpo multifuncional (MAC) que comprende un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo, conjugado a al menos una fracción efectora, y sales, estereoisómeros, tautómeros, solvatos y profármacos farmacéuticamente aceptables del mismo. La invención también proporciona composiciones farmacéuticas y muestras que comprenden los MAC de la invención.

20 La presente descripción también proporciona un conjugado de anticuerpo multifuncional (MAC) que comprende un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo, conjugado con al menos un péptido de unión a Ang2.

La presente divulgación proporciona un conjugado de anticuerpo multifuncional (MAC) que comprende un anticuerpo anti-IGF1R o una porción de unión a antígeno del mismo, conjugado con al menos un péptido de unión a Ang2.

25 En algunas realizaciones, el al menos un péptido de unión a Ang2 se conjuga con la cadena lateral de un resto de conjugación del anticuerpo mediante un enlazador.

30 En algunas realizaciones, la fracción efectora se une covalentemente a la cadena lateral de un residuo de lisina en la región Fab del anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo. En algunos aspectos de la divulgación, la fracción efectora se une covalentemente a la cadena lateral de un residuo de lisina en la región de cadena pesada constante (CH) o cadena ligera constante (CL). La reacción de la fracción efectora con el dominio CL del anticuerpo es particularmente deseable para minimizar, o prevenir, cualquier interferencia con la porción Fc del anticuerpo a los receptores Fc (como FcγR y FcRn) o la unión del anticuerpo a sus respectivos objetivo. A la inversa, la conjugación de la fracción efectora respectiva a la porción Fc del anticuerpo puede disminuir la vida media del anticuerpo *en vivo* y / o su capacidad para interactuar con el sistema inmunológico (función efectora). La conjugación de la fracción efectora en la región de cadena pesada variable (VH) o cadena ligera variable (VL) del anticuerpo conlleva el riesgo de disminuir la unión del anticuerpo a su cognado.

35 En realizaciones de la invención, la fracción efectora está unida covalentemente a la cadena lateral de un residuo de lisina en el dominio de la región kappa (CLk) de cadena ligera constante. La conjugación preferencial de la parte efectora al dominio CLk simplifica la creación de isotipos MAC al permitir los interruptores isotópicos de los dominios CH del anticuerpo sin afectar los sitios de conjugación de la parte efectora al anticuerpo.

40 La fracción efectora se puede unir covalentemente a la cadena lateral de K<sup>80</sup> de la región constante del dominio kappa de la cadena ligera (CLk), (SEC ID NO: 15, SEC ID NO: 45, SEC ID NO: 46 o SEC ID NO: 47) (K<sup>188</sup> Según la numeración de Kabat). En algunas realizaciones, la fracción efectora se une covalentemente a K<sup>80</sup> de SEC ID NO: 15. K<sup>80</sup> de la SEC ID NO: 15 se encuentra lejos de las regiones clave del anticuerpo respectivo, como la región paratópica, el dominio de unión a FcRn, la bisagra, los dominios de unión a FcR; esto proporciona la ventaja de que la vinculación preferencial en estos sitios limita la cantidad de interferencia a la interacción anticuerpo-antígeno cuando el MAC se conjuga con la fracción efectora.

45 En algunos aspectos, la fracción efectora está unida covalentemente a K \* del motivo K \* HK. El K \* del motivo K \* HK puede corresponder a K<sup>80</sup> de SEC ID NO: 15. En algunos aspectos, la fracción efectora está unida covalentemente a K<sup>188</sup> del motivo K<sup>188</sup>H ubicado en la región CLk, de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. En algún aspecto, la región CLk comprende al menos los residuos 62-103 de la SEC ID NO: 15, 45, 46 o 47. En algunos aspectos, la región CLk comprende la SEC ID NO: 15, 45, 46 o 47.

50 En algunos aspectos, la región CLk comprende al menos los residuos 62-103 de la SEC ID NO: 15. En algunos aspectos, la región CLk comprende la SEC ID NO: 15. En algún aspecto, la región CLk comprende al menos los residuos 62-103 de la SEC ID NO: 45. En algunos aspectos, la región CLk comprende la SEC ID NO: 45. En algún

aspecto, la región CLK comprende al menos los residuos 62-103 de la SEC ID NO: 46. En algunos aspectos, la región CLK comprende la SEQ ID NO: 46. En algún aspecto, la región CLK comprende al menos los residuos 62-103 de la SEC ID NO: 47. En algunos aspectos, la región CLK comprende la SEQ ID NO: 47.

5 En algunos aspectos, la región CLK comprende la SEC ID NO: 45 o 47. Cuando la región CLK comprende la SEC ID NO: 45 o 47 en parte o en su totalidad,  $x^{82}$  puede seleccionarse del grupo que consiste en K, R, G, A, V, L, I, S, T, C, M, N, Q, D, E, H, F, W o Y. En algunos aspectos,  $x^{82}$  puede ser G, A, V, L o I. En algunos aspectos,  $x^{82}$  puede ser K, R, N o Q. En algunos aspectos,  $x^{82}$  puede ser D, o E. En algunos aspectos,  $x^{82}$  puede ser K, R, G, A, V, L, I, N o Q. En algunos aspectos,  $x^{82}$  puede ser D, o E. En algunos aspectos,  $x^{82}$  puede ser K, R, G, A, V, L, I, N, Q, D o E. En algunos aspectos,  $x^{82}$  puede ser D, o E. En algunos aspectos,  $x^{82}$  puede ser H, F, W o Y. En algunos aspectos  $x^{82}$  no es prolina. En algunos aspectos,  $x^{82}$  (de las SEQ ID NO: 15, 45, 46 y / o 47) es R. En algunos aspectos,  $K^{190}$ -CLK es R.

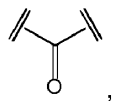
15 Las SEQ ID NO: 45 y 47 comprenden los polimorfismos identificados en el CLK; VIRGINIA<sup>153</sup> y L / V<sup>191</sup> (Según la numeración de Kabat). Así, los tres polimorfismos son: Km (1): V<sup>153</sup> / L<sup>191</sup>; Km (1,2): A<sup>153</sup> / L<sup>191</sup>, y Km (3) A<sup>153</sup> / V<sup>191</sup>. En algunos aspectos de la invención que comprenden la SEQ ID NO: 45 y / o 47,  $x^{45}$  es V,  $yx^{83}$  es L (Km (1)). En algunos aspectos de la invención que comprenden la SEQ ID NO: 45 y / o 47,  $x^{45}$  es A,  $yx^{83}$  es L (Km (1,2)). En algunos aspectos de la invención que comprenden la SEQ ID NO: 45 y / o 47,  $x^{45}$  es A,  $yx^{83}$  es V (Km (3)).

20 En algunos aspectos, el MAC comprende una fracción efectora conjugada con CLK  $K^{188}$  en ambas cadenas ligeras. En algunos aspectos, el MAC comprende una fracción efectora conjugada con CLK  $K^{188}$  solo en una cadena ligera. En algunos aspectos, el Efectador Moiety solo se conjuga con el MAC en  $K^{188}$  CLK. En algunos aspectos, la fracción efectora se conjuga con el MAC en  $K^{188}$  CLK en una cadena ligera y otra ubicación en el anticuerpo. En algunos aspectos, la fracción efectora se conjuga con el MAC en  $K^{188}$  CLK en una cadena ligera y otras 2 ubicaciones en el anticuerpo. En algunos aspectos, la fracción efectora se conjuga con el MAC en  $K^{188}$  CLK en una cadena ligera y otras 3 ubicaciones en el anticuerpo. En algunos aspectos, la fracción efectora se conjuga con el MAC en  $K^{188}$  CLK en ambas cadenas ligeras, y en otro lugar. En algunos aspectos, la fracción efectora se conjuga con el MAC en  $K^{188}$  CLK en ambas cadenas ligeras, y en otros 2 lugares. En algunos aspectos, la fracción efectora se conjuga con el MAC en  $K^{188}$  CLK en ambas cadenas ligeras, y en otros 3 lugares.

**Muestras y composiciones de la invención.**

En algunos aspectos, la invención proporciona una composición o muestra de un MAC que comprende

- 30 (i) un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende al menos un fragmento de una región kappa constante de cadena ligera (CLK) que comprende  $K^{188}$  y  $H^{189}$  Según la numeración de Kabat;  
 (ii) un enlazador que comprende la fórmula X-Y-Z, donde Z es un grupo de fórmula

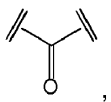


35 y está covalentemente conectado al anticuerpo a través del grupo ε-amino de la cadena lateral de  $K^{188}$  (de acuerdo con la numeración de Kabat), Y es una cadena de conexión compatible biológicamente, lineal o ramificada, y X es un grupo conectado covalentemente a al menos una fracción efectora,

en donde al menos aproximadamente el 50 % de la fracción efectora en la composición o muestra se conjuga con  $K^{188}$ -CLK.

En algunos aspectos, la invención proporciona una composición o muestra de un MAC que comprende

- 40 (i) un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende al menos un fragmento de una región kappa constante de cadena ligera (CLK) que comprende  $K^{188}$  y  $H^{189}$  Según la numeración de Kabat;  
 (ii) un enlazador que comprende la fórmula X-Y-Z, donde Z es un grupo de fórmula

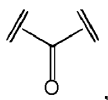


45 y está covalentemente conectado al anticuerpo a través del grupo ε-amino de la cadena lateral de  $K^{188}$  (de acuerdo con la numeración de Kabat), Y es una cadena de conexión compatible biológicamente, lineal o ramificada, y X es un grupo conectado covalentemente a al menos una fracción efectora,

en donde al menos aproximadamente el 60 % de la fracción efectora en la composición o muestra se conjuga con  $K^{188}$ -CLK.

En algunos aspectos, la invención proporciona una composición o muestra de un MAC que comprende

- 50 (i) un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende al menos un fragmento de una región kappa constante de cadena ligera (CLK) que comprende  $K^{188}$  y  $H^{189}$  Según la numeración de Kabat;  
 (ii) un enlazador que comprende la fórmula X-Y-Z, donde Z es un grupo de fórmula

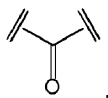


y está covalentemente conectado al anticuerpo a través del grupo ε-amino de la cadena lateral de K<sup>188</sup> (de acuerdo con la numeración de Kabat), Y es una cadena de conexión compatible biológicamente, lineal o ramificada, y X es un grupo conectado covalentemente a al menos una fracción efectora,

5 en donde al menos aproximadamente el 70 % de la fracción efectora en la composición o muestra se conjuga con K<sup>188</sup>-CLk.

En algunos aspectos, la invención proporciona una composición o muestra de un MAC que comprende

- 10 (i) un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende al menos un fragmento de una región kappa constante de cadena ligera (CLk) que comprende K<sup>188</sup> y H<sup>189</sup> Según la numeración de Kabat;  
 (ii) un enlazador que comprende la fórmula X-Y-Z, donde Z es un grupo de fórmula

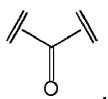


y está covalentemente conectado al anticuerpo a través del grupo ε-amino de la cadena lateral de K<sup>188</sup> (de acuerdo con la numeración de Kabat), Y es una cadena de conexión compatible biológicamente, lineal o ramificada, y X es un grupo conectado covalentemente a al menos una fracción efectora,

15 en donde al menos aproximadamente el 80 % de la fracción efectora en la composición o muestra se conjuga con K<sup>188</sup>-CLk.

En algunos aspectos, la invención proporciona una composición o muestra de un MAC que comprende

- 20 (i) un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende al menos un fragmento de una región kappa constante de cadena ligera (CLk) que comprende K<sup>188</sup> y H<sup>189</sup> Según la numeración de Kabat;  
 (ii) un enlazador que comprende la fórmula X-Y-Z, donde Z es un grupo de fórmula

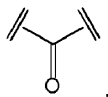


y está covalentemente conectado al anticuerpo a través del grupo ε-amino de la cadena lateral de K<sup>188</sup> (de acuerdo con la numeración de Kabat), Y es una cadena de conexión compatible biológicamente, lineal o ramificada, y X es un grupo conectado covalentemente a al menos una fracción efectora,

25 en donde al menos aproximadamente el 90 % de la fracción efectora en la composición o muestra se conjuga con K<sup>188</sup>-CLk.

En algunos aspectos, la invención proporciona una composición (o muestra) de un MAC que comprende

- 30 (i) un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende al menos un fragmento de una región kappa constante de cadena ligera (CLk) que comprende K<sup>188</sup> y H<sup>189</sup> Según la numeración de Kabat;  
 (ii) un enlazador que comprende la fórmula X-Y-Z, donde Z es un grupo de fórmula



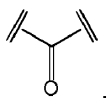
y está covalentemente conectado al anticuerpo a través del grupo ε-amino de la cadena lateral de K<sup>188</sup> (de acuerdo con la numeración de Kabat), Y es una cadena de conexión compatible biológicamente, lineal o ramificada, y X es un grupo conectado covalentemente a al menos una fracción efectora,

35 (iii) en donde al menos aproximadamente el 50 % de la fracción efectora en la composición o muestra se conjuga con K<sup>188</sup>-CLk, y

en el que al menos aproximadamente el 50 % del anticuerpo comprende una fracción efectora unida por covalencia a K<sup>188</sup>-CLk en al menos una cadena ligera.

En algunos aspectos, la invención proporciona una composición (o muestra) de un MAC que comprende

- 40 (i) un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende al menos un fragmento de una región kappa constante de cadena ligera (CLk) que comprende K<sup>188</sup> y H<sup>189</sup> Según la numeración de Kabat;  
 (ii) un enlazador que comprende la fórmula X-Y-Z, donde Z es un grupo de fórmula

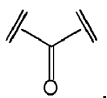


5 y está covalentemente conectado al anticuerpo a través del grupo ε-amino de la cadena lateral de K<sup>188</sup> (de acuerdo con la numeración de Kabat), Y es una cadena de conexión compatible biológicamente, lineal o ramificada, y X es un grupo conectado covalentemente a al menos una fracción efectora, (iii) en donde al menos aproximadamente el 50 % de la fracción efectora en la composición o muestra se conjuga con K<sup>188</sup>-Clk, y

en el que al menos aproximadamente el 60 % del anticuerpo comprende una fracción efectora unida por covalencia a K<sup>188</sup>-Clk en al menos una cadena ligera.

En algunos aspectos, la invención proporciona una composición (o muestra) de un MAC que comprende

10 (i) un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende al menos un fragmento de una región kappa constante de cadena ligera (CLk) que comprende K<sup>188</sup> y H<sup>189</sup> Según la numeración de Kabat; (ii) un enlazador que comprende la fórmula X-Y-Z, donde Z es un grupo de fórmula

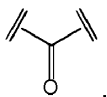


15 y está covalentemente conectado al anticuerpo a través del grupo ε-amino de la cadena lateral de K<sup>188</sup> (de acuerdo con la numeración de Kabat), Y es una cadena de conexión compatible biológicamente, lineal o ramificada, y X es un grupo conectado covalentemente a al menos una fracción efectora, (iii) en donde al menos aproximadamente el 50 % de la fracción efectora en la composición o muestra se conjuga con K<sup>188</sup>-Clk, y

20 en el que al menos aproximadamente el 70 % del anticuerpo comprende una fracción efectora unida por covalencia a K<sup>188</sup>-Clk en al menos una cadena ligera.

En algunos aspectos, la invención proporciona una composición (o muestra) de un MAC que comprende

(i) un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende al menos un fragmento de una región kappa constante de cadena ligera (CLk) que comprende K<sup>188</sup> y H<sup>189</sup> Según la numeración de Kabat; (ii) un enlazador que comprende la fórmula X-Y-Z, donde Z es un grupo de fórmula

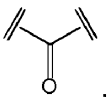


25 y está covalentemente conectado al anticuerpo a través del grupo ε-amino de la cadena lateral de K<sup>188</sup> (de acuerdo con la numeración de Kabat), Y es una cadena de conexión compatible biológicamente, lineal o ramificada, y X es un grupo conectado covalentemente a al menos una fracción efectora, (iii) en donde al menos aproximadamente el 50 % de la fracción efectora en la composición o muestra se conjuga con K<sup>188</sup>-Clk, y

30 en el que al menos aproximadamente el 80 % del anticuerpo comprende una fracción efectora unida por covalencia a K<sup>188</sup>-Clk en al menos una cadena ligera.

En algunos aspectos, la invención proporciona una composición (o muestra) de un MAC que comprende

35 (i) un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende al menos un fragmento de una región kappa constante de cadena ligera (CLk) que comprende K<sup>188</sup> y H<sup>189</sup> Según la numeración de Kabat; (ii) un enlazador que comprende la fórmula X-Y-Z, donde Z es un grupo de fórmula

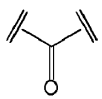


40 y está covalentemente conectado al anticuerpo a través del grupo ε-amino de la cadena lateral de K<sup>188</sup> (de acuerdo con la numeración de Kabat), Y es una cadena de conexión compatible biológicamente, lineal o ramificada, y X es un grupo conectado covalentemente a al menos una fracción efectora, (iii) en donde al menos aproximadamente el 50 % de la fracción efectora en la composición o muestra se conjuga con K<sup>188</sup>-Clk, y

45 en el que al menos aproximadamente el 90 % del anticuerpo comprende una fracción efectora unida por covalencia a K<sup>188</sup>-Clk en al menos una cadena ligera. En algunos aspectos, la fracción efectora se conjuga covalentemente con K<sup>188</sup>-Clk en ambas cadenas ligeras.

En algunos aspectos, la invención proporciona una muestra de MAC que comprende

- (i) un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende al menos un fragmento de una región kappa constante de cadena ligera (CLk) que comprende K<sup>188</sup> y H<sup>189</sup> Según la numeración de Kabat;  
 (ii) un enlazador que comprende la fórmula X-Y-Z, donde Z es un grupo de fórmula

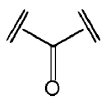


- 5 y está covalentemente conectado al anticuerpo a través del grupo ε-amino de la cadena lateral de K<sup>188</sup> (de acuerdo con la numeración de Kabat), Y es una cadena de conexión compatible biológicamente, lineal o ramificada, y X es un grupo conectado covalentemente a al menos una fracción efectora,  
 (iii) en donde al menos aproximadamente el 50 % de la fracción efectora en la composición o muestra se conjuga con K<sup>188</sup>-Clk, y

- 10 , en donde al menos aproximadamente el 30 % de la muestra comprende restos efectoras conjugados en aproximadamente 2 ubicaciones por anticuerpo, y en donde al menos un sitio de conjugación de grupo efector es K<sup>188</sup>-CLk. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor del 40 %. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor del 50 %. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor del 60 %. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor del 70 %. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor del 80 %. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor del 90 %. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor del 95 %. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor del 99 %.

En algunos aspectos, la invención proporciona una muestra de MAC que comprende

- 20 (i) un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende al menos un fragmento de una región kappa constante de cadena ligera (CLk) que comprende K<sup>188</sup> y H<sup>189</sup> Según la numeración de Kabat;  
 (ii) un enlazador que comprende la fórmula X-Y-Z, donde Z es un grupo de fórmula

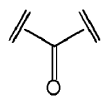


- 25 y está covalentemente conectado al anticuerpo a través del grupo ε-amino de la cadena lateral de K<sup>188</sup> (de acuerdo con la numeración de Kabat), Y es una cadena de conexión compatible biológicamente, lineal o ramificada, y X es un grupo conectado covalentemente a al menos una fracción efectora,  
 (iii) en donde al menos aproximadamente el 50 % de la fracción efectora en la composición o muestra se conjuga con K<sup>188</sup>-Clk, y

- 30 en la que al menos aproximadamente el 30 % de la muestra comprende restos efectoras conjugados en aproximadamente 3 ubicaciones por anticuerpo, y en la que al menos 2 sitios de conjugación de la fracción efectora son K<sup>188</sup>-CLk en cada cadena ligera. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor del 40 %. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor del 50 %. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor del 60 %. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor del 70 %. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor del 80 %. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor del 90 %. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor del 95 %. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor del 99 %.

En algunos aspectos, la invención proporciona una muestra de MAC que comprende

- 35 (i) un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende al menos un fragmento de una región kappa constante de cadena ligera (CLk) que comprende K<sup>188</sup> y H<sup>189</sup> Según la numeración de Kabat;  
 (ii) un enlazador que comprende la fórmula X-Y-Z, donde Z es un grupo de fórmula



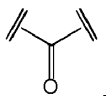
- 40 y está covalentemente conectado al anticuerpo a través del grupo ε-amino de la cadena lateral de K<sup>188</sup> (de acuerdo con la numeración de Kabat), Y es una cadena de conexión compatible biológicamente, lineal o ramificada, y X es un grupo conectado covalentemente a al menos una fracción efectora,  
 (iii) en donde al menos aproximadamente el 50 % de la fracción efectora en la composición o muestra se conjuga con K<sup>188</sup>-Clk, y

- 45 en la que al menos aproximadamente el 30 % de la muestra comprende restos efectoras conjugados en aproximadamente 4 ubicaciones por anticuerpo, y en la que al menos 2 sitios de conjugación de la fracción efectora son K<sup>188</sup>-CLk en cada cadena ligera. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor del 40 %. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor del 50 %. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor del 60 %. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor del 70 %. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor del 80 %. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor del 90 %. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor del 95 %. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor del 99 %.

En algunos aspectos, la invención proporciona una muestra de MAC que comprende

- (i) un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende al menos un fragmento de una

región kappa constante de cadena ligera (CLk) que comprende K<sup>188</sup> y H<sup>189</sup> Según la numeración de Kabat;  
 (ii) un enlazador que comprende la fórmula X-Y-Z, donde Z es un grupo de fórmula



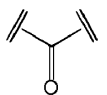
5 y está covalentemente conectado al anticuerpo a través del grupo ε-amino de la cadena lateral de K<sup>188</sup> (de acuerdo con la numeración de Kabat), Y es una cadena de conexión compatible biológicamente, lineal o ramificada, y X es un grupo conectado covalentemente a al menos una fracción efectora,  
 (iii) en donde al menos aproximadamente el 50 % de la fracción efectora en la composición o muestra se conjuga con K<sup>188</sup>-Clk, y

10 en la que al menos aproximadamente el 30 % de la muestra comprende restos efectoras conjugados en aproximadamente 5 ubicaciones por anticuerpo, y en la que al menos 2 sitios de conjugación de la fracción efectora son K<sup>188</sup>-CLk en cada cadena ligera. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor del 40 %. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor del 50 %. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor del 60 %. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor del 70 %. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor del 80 %. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor del 90 %. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor del 95 %.

15 %.

En algunos aspectos, la invención proporciona una muestra de MAC que comprende

(i) un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende al menos un fragmento de una región kappa constante de cadena ligera (CLk) que comprende K<sup>188</sup> y H<sup>189</sup> Según la numeración de Kabat;  
 (ii) un enlazador que comprende la fórmula X-Y-Z, donde Z es un grupo de fórmula

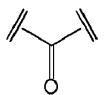


20 y está covalentemente conectado al anticuerpo a través del grupo ε-amino de la cadena lateral de K<sup>188</sup> (de acuerdo con la numeración de Kabat), Y es una cadena de conexión compatible biológicamente, lineal o ramificada, y X es un grupo conectado covalentemente a al menos una fracción efectora,  
 (iii) en donde al menos aproximadamente el 50 % de la fracción efectora en la composición o muestra se conjuga con K<sup>188</sup>-Clk, y

25 en el que al menos el 50 % de las moléculas de cadena ligera están conjugadas con al menos una fracción efectora. En algunos aspectos, al menos aproximadamente el 60 % de las moléculas de la cadena ligera están conjugadas con al menos una fracción efectora. En algunos aspectos, al menos aproximadamente el 65 % de las moléculas de cadena ligera están conjugadas con al menos una fracción efectora. En algunos aspectos, al menos aproximadamente el 70 % de las moléculas de la cadena ligera están conjugadas con al menos una fracción efectora. En algunos aspectos, al menos aproximadamente el 75 % de las moléculas de la cadena ligera están conjugadas con al menos una fracción efectora. En algunos aspectos, al menos aproximadamente el 80 % de las moléculas de cadena ligera están conjugadas con al menos una fracción efectora. En algunos aspectos, al menos aproximadamente el 85 % de las moléculas de cadena ligera están conjugadas con al menos una fracción efectora. En algunos aspectos, al menos aproximadamente el 90 % de las moléculas de cadena ligera están conjugadas con al menos una fracción efectora. En algunos aspectos, al menos aproximadamente el 95 % de las moléculas de cadena ligera se conjugan con al menos una fracción efectora.

En algunos aspectos, la invención proporciona una muestra de MAC que comprende

40 (i) un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende al menos un fragmento de una región kappa constante de cadena ligera (CLk) que comprende K<sup>188</sup> y H<sup>189</sup> Según la numeración de Kabat;  
 (ii) un enlazador que comprende la fórmula X-Y-Z, donde Z es un grupo de fórmula



45 y está covalentemente conectado al anticuerpo a través del grupo ε-amino de la cadena lateral de K<sup>188</sup> (de acuerdo con la numeración de Kabat), Y es una cadena de conexión compatible biológicamente, lineal o ramificada, y X es un grupo conectado covalentemente a al menos una fracción efectora,  
 (iii) en donde al menos aproximadamente el 50 % de la fracción efectora en la composición o muestra se conjuga con K<sup>188</sup>-Clk, y

50 en el que al menos aproximadamente el 70 % de las moléculas de la cadena pesada no están conjugadas con la fracción efectora. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor del 75 %. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor del 80 %. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor del 85 %. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor del 90 %. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor del 95 %. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor del 99 %. En algunos aspectos, sustancialmente todas las moléculas de la cadena pesada están no conjugadas con la fracción efectora.



En algunos aspectos, la divulgación proporciona un MAC que comprende un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, conjugado covalentemente a una fracción efectora a través de un enlazador, caracterizado porque el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo comprende el motivo KHK, y la fracción efectora es Conjugado a la cadena lateral de la K<sup>188</sup> residuo (según la numeración de Kabat).

5 En algunos aspectos, la cantidad de fragmentos de cadenas ligeras individuales que no están conjugados tiene un límite inferior seleccionado del grupo que consiste en aproximadamente 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 y 55 % y un límite superior seleccionado del grupo que consiste en aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60 %. En algunos aspectos, la cantidad de fragmentos de cadenas ligeras individuales que se conjugan en una ubicación tiene un límite inferior seleccionado del grupo que consiste en aproximadamente 25, 30, 35, 40, 45, 50 y 55 %, y un límite superior seleccionado del grupo que consta de aproximadamente 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 y 95 %. En algunos aspectos, la cantidad de fragmentos de cadena ligera individuales que se conjugan en 2 ubicaciones tiene un límite inferior seleccionado del grupo que consiste en aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 5, 10, 15, 20 y 25 %, y un límite superior seleccionado del grupo que consiste en aproximadamente 5, 16, 7, 8, 9, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 %.

15 En algunos aspectos, la cantidad de fragmentos de cadena pesada individuales que no están conjugados tiene un límite inferior seleccionado del grupo que consiste en aproximadamente 50, 55, 60, 65, 70, 75 y 80 % y un límite superior seleccionado del grupo que consiste en aproximadamente 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 y 99 %. En algunos aspectos, la cantidad de fragmentos de cadena pesada individuales que se conjugan en una ubicación tiene un límite inferior seleccionado del grupo que consiste en aproximadamente 1, 2, 5, 10, 15, 20 y 25 % y un límite superior seleccionado de grupo que consiste en aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 50 %. En algunos aspectos, la cantidad de fragmentos de cadena pesada individuales que se conjugan en 2 ubicaciones tiene un límite inferior seleccionado del grupo que consiste en aproximadamente 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10 y 15 % y un límite superior seleccionado del grupo que consiste en aproximadamente 2, 3, 4, 5, 10, 15 y 20 %.

25 En algunos aspectos, el número de conjugaciones por anticuerpo en una muestra o composición de la invención tiene un límite inferior seleccionado del grupo que consiste en aproximadamente 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,55, 1,6, 1,65, 1,7, 1,75, 1,8, 1,85, 1,9, 1,95 y 2, y un límite superior seleccionado del grupo que consiste en aproximadamente 1,6, 1,7, 1,75, 1,8, 1,85, 1,9, 1,95, 2,0, 2,05, 2,1, 2,15, 2,2, 2,25, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5 y 5. En algunos aspectos, el número de conjugaciones por anticuerpo en una muestra o composición de la invención está entre aproximadamente 1,5 y alrededor de 2,5. En algunos aspectos, el número de conjugaciones por anticuerpo en una muestra o composición de la invención está entre aproximadamente 1,6 y aproximadamente 2,4. En algunos aspectos, el número de conjugaciones por anticuerpo en una muestra o composición de la invención está entre aproximadamente 1,7 y aproximadamente 2,3. En algunos aspectos, el número de conjugaciones por anticuerpo en una muestra o composición de la invención está entre aproximadamente 1,8 y aproximadamente 2,2. En algunos aspectos, el número de conjugaciones por anticuerpo en una muestra o composición de la invención es una cantidad seleccionada del grupo que consiste en aproximadamente 1,5, aproximadamente 1,55, aproximadamente 1,6, aproximadamente 1,65, aproximadamente 1,7, aproximadamente 1,75, aproximadamente 1,8, aproximadamente 1,85, aproximadamente 1,9, aproximadamente 1,95, aproximadamente 2,0, aproximadamente 2,05, aproximadamente 2,1, aproximadamente 2,15, aproximadamente 2,2, aproximadamente 2,25, aproximadamente 2,3, aproximadamente 2,4 y aproximadamente 2,5. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor de 1,7. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor de 1,8. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor de 1,9. En algunos aspectos, la cantidad es aproximadamente 2. En algunos aspectos, la cantidad es aproximadamente 2,1. En algunos aspectos, la cantidad es de aproximadamente 2,1. En algunos aspectos, la cantidad es de alrededor de 2,3.

45 En algunos aspectos de la invención, el número de conjugaciones por anticuerpo es inferior a 2, con al menos el 50 % de la población de anticuerpos que tiene solo una conjugación única por anticuerpo. Estas muestras son ventajosas ya que permiten que las reacciones de conjugación adicionales se dirijan al sitio CLk restante. En algunos aspectos, el número de conjugaciones por anticuerpo en una muestra o composición de la invención está entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 1,5. En algunos aspectos, el número de conjugaciones por anticuerpo en una muestra o composición de la invención está entre aproximadamente 0,6 y aproximadamente 1,4.

50 En algunos aspectos, el número de conjugaciones por anticuerpo en una muestra o composición de la invención está entre aproximadamente 0,7 y aproximadamente 1,3. En algunos aspectos, el número de conjugaciones por anticuerpo en una muestra o composición de la invención está entre aproximadamente 0,8 y aproximadamente 1,2. En algunos aspectos, el número de conjugaciones por anticuerpo en una muestra o composición de la invención está entre aproximadamente 0,9 y aproximadamente 1,1.

55 Una de las ventajas de la invención es que, dependiendo de los reactivos y las condiciones de reacción (especialmente el éster del grupo saliente y la relación molar del enlazador: anticuerpo), se pueden generar composiciones y muestras de MAC con un número definido de Restos Efectores en relación con número de anticuerpos. Esto puede ser especialmente útil cuando se equilibran las reactividades relativas y las ventanas terapéuticas de la fracción efectora y el anticuerpo. Además, en algunas situaciones, aumentar el número de péptidos por anticuerpo más allá de un cierto umbral puede no resultar en un aumento de la unión a la diana o efecto terapéutico. Por lo tanto, es útil poder controlar el número de péptidos conjugados por anticuerpo y, al hacerlo, dirigir la ubicación de la conjugación para minimizar el Fc o combinar la interferencia del sitio. En algunas situaciones, por lo tanto, aspectos de la invención que permiten una conjugación reducida, decorando preferentemente solo un único K<sup>188</sup>-CLk puede ser ventajoso.

65 En algunos aspectos, una muestra de MAC puede ser una composición farmacéutica.

#### Anticuerpo IGFR

En algunas realizaciones, el al menos un péptido de unión a Ang2 se conjuga mediante la cadena lateral de un resto de lisina en el anticuerpo anti-IGF-1R. En algunas realizaciones, el al menos un péptido de unión a Ang2 se une

- covalentemente al dominio CL. En algunas realizaciones, el al menos un péptido de unión a Ang2 se une covalentemente a la región F(ab) del anticuerpo anti-IGF-1R. En algunas realizaciones, el al menos un péptido de unión a Ang2 se une covalentemente a la región constante de cadena ligera del anticuerpo anti-IGF-1R. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-IGF-1R se une covalentemente al péptido de unión a Ang2 mediante un enlazador.
- 5 En algunas realizaciones, el péptido de unión a Ang2 no está fusionado en el extremo C' o N' terminal del anticuerpo anti-IGF-1R.
- En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-IGF-1R se selecciona de los descritos en los documentos WO02053596 (US7,037,498) y WO2005016967 (US7,371,378) (incorporándose el contenido de cada uno de los mismos en el presente documento). En algunas realizaciones, el MAC comprende un dominio constante de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 5.
- 10 En algunas realizaciones, el MAC comprende un dominio variable de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 6, los restos 1-122 de la SEQ ID NO: 1 y los restos 1-122 de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el MAC comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende los restos 1-122 de la SEQ ID NO: 3.
- 15 En algunas realizaciones, la cadena pesada del MAC comprende una región VHCDR1 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 7, los restos 26-35 de la SEQ ID NO: 1 y los restos 26-35 de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el MAC comprende una región VHCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones, la cadena pesada del MAC comprende una región VHCDR<sup>2</sup> que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 8, los restos 50-64 de la SEQ ID NO: 3 y los restos 50-64 de la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, el MAC comprende una región VHCDR<sup>2</sup> que comprende la SEQ ID NO: 8.
- 20 En algunas realizaciones, la cadena pesada del MAC comprende una región VHCDR3 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 9, los restos 99-114 de la SEQ ID NO: 1 y los restos 99-114 de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el MAC comprende una región VHCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 9.
- 25 En algunas realizaciones, la cadena pesada del MAC comprende una región VHFR<sup>1</sup> que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 10, los restos 1-25 de la SEQ ID NO: 1, los restos 1-25 de la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 11. En algunas realizaciones, el MAC comprende una región VHFR<sup>1</sup> que comprende la SEQ ID NO: 11.
- 30 En algunas realizaciones, la cadena pesada del MAC comprende una región VHFR<sup>2</sup> que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 12, los restos 36-49 de la SEQ ID NO: 1 y los restos 36-49 de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el MAC comprende una región VHFR<sup>2</sup> que comprende la SEQ ID NO: 12.
- 35 En algunas realizaciones, la cadena pesada del MAC comprende una región VHFR3 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 14, los restos 65-98 de la SEQ ID NO: 1 y los restos 65-98 de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el MAC comprende una región VHFR3 que comprende la SEQ ID NO: 13.
- 40 En algunas realizaciones, la cadena pesada del MAC comprende una región VHFR4 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 14, los restos 115-122 de la SEQ ID NO: 1 y los restos 115-122 de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el MAC comprende una región VHFR4 que comprende la SEQ ID NO: 14.
- 45 En algunas realizaciones, las regiones VHCDR1, VHCDR<sup>2</sup> y VHCDR3 del anticuerpo anti-IGF1R comprenden los restos 26-35 de la SEQ ID NO: 3, los restos 50-64 de la SEQ ID NO: 3 y los restos 99-114 de la SEQ ID NO: 3, respectivamente.
- 50 En algunas realizaciones, las regiones VHFR<sup>1</sup>, VHFR<sup>2</sup>, VHFR3 y VHFR4 del anticuerpo anti-IGF1R comprenden los restos 1-25 de la SEQ ID NO: 3, los restos 36-49 de la SEQ ID NO: 3, los restos 65-98 de la SEQ ID NO: 3 y los restos 115-122 de la SEQ ID NO: 3, respectivamente.
- En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-IGF1R comprende una cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-IGF1R comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 3.
- 55 En algunas realizaciones, el MAC comprende un dominio constante de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 15. En algunas realizaciones, el MAC comprende un dominio constante de cadena ligera que comprende las SEQ ID NO: 45, 46 o 4.
- En algunas realizaciones, el MAC comprende un dominio variable de cadena ligera seleccionado del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 16, los restos 1-108 de la SEQ ID NO: 2 y los restos 1-108 de la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, el MAC comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende los restos 1-108 de la SEQ ID NO: 4.
- 60 En algunas realizaciones, la cadena ligera del MAC comprende una región VLCDR1 (región determinante de complementariedad 1 de la cadena ligera variable) que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 17, los restos 24-34 de la SEQ ID NO: 2 y los restos 24-34 de la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, el MAC comprende una región VLCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 17.

- En algunas realizaciones, la cadena ligera del MAC comprende una región VLCDR2 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 18, los restos 48-54 de la SEQ ID NO: 2 y los restos 48-54 de la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, el MAC comprende una región VLCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 18.
- 5 En algunas realizaciones, la cadena ligera del MAC comprende una región VLCDR3 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 19, los restos 89-97 de la SEQ ID NO: 2 y los restos 89-97 de la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, el MAC comprende una región VLCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 19.
- 10 En algunas realizaciones, la cadena ligera del MAC comprende una región VLFR1 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, los restos 1-23 de la SEQ ID NO: 2 y los restos 1-23 de la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, el MAC comprende una región VLFR1 que comprende la SEQ ID NO: 21.
- 15 En algunas realizaciones, la cadena ligera del MAC comprende una región VLFR<sup>2</sup> que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 22, los restos 35-47 de la SEQ ID NO: 2 y los restos 35-47 de la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, el MAC comprende una región VLFR<sup>2</sup> que comprende la SEQ ID NO: 22.
- 20 En algunas realizaciones, la cadena ligera del MAC comprende una región VLFR3 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 23, los restos 55-88 de la SEQ ID NO: 2 y los restos 55-88 de la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, el MAC comprende una región VLFR3 que comprende la SEQ ID NO: 23.
- En algunas realizaciones, la cadena ligera del MAC comprende una región VLFR4 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, los restos 98-108 de la SEQ ID NO: 2 y los restos 98-108 de la SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, el MAC comprende una región VLFR4 que comprende la SEQ ID NO: 25.
- 25 En algunas realizaciones, las regiones VLCDR1, VLCDR2 y VLCDR3 del anticuerpo anti-IGF-1R comprenden los restos 24-34 de la SEQ ID NO: 4, los restos 48-54 de la SEQ ID NO: 4 y los restos 89-96 de la SEQ ID NO: 4, respectivamente.
- En algunas realizaciones, las regiones VLFR1, VLFR<sup>2</sup>, VLFR3 y VLFR4 del anticuerpo anti-IGF1-R comprenden los restos 1-24 de la SEQ ID NO: 4, los restos 35-47 de la SEQ ID NO: 4, los restos 55-88 de la SEQ ID NO: 4 y los restos 97-108 de la SEQ ID NO: 4, respectivamente.
- 30 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-IGF1R comprende una cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-IGF1R comprende una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 4.
- En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-IGF1R comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 2.
- 35 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-IGF1R comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 3 y una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 4.
- El anticuerpo 2.12.1 se ha descrito en el documento WO02053596. Un hibridoma, el 2.12.1, que produce anticuerpos monoclonales específicos para IGF1R, se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, el 12 de diciembre de 2000 con el número de depósito PTA-2792.
- 40 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-IGF1R comprende el motivo K<sup>188</sup>H<sup>189</sup>X<sup>190</sup> en la región CLK, donde x es G, A, V, I, L, S, T, C, M, N, Q, D, E, F, Y, W, H, R o K, de acuerdo con la numeración de Kabat. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-IGF1R es uno seleccionado de los documentos WO2009032145 (US2009092614) o WO2005005635 (US7,579,157), incorporándose el contenido de ambos documentos en el presente documento. En algunas realizaciones, un MAC de la invención comprende un anticuerpo anti-IGF-1R o porción de unión a antígeno del mismo, conjugado con al menos un péptido de unión a Ang2 de un modo tal que no anule la afinidad de unión a IGF-1R del anticuerpo.
- 45 En algunos aspectos, el anticuerpo se dirige a un objetivo diferente dentro de la misma vía que la fracción efectora. En algunos aspectos, el anticuerpo se dirige a un objetivo diferente al grupo efector.
- 50 En algunos aspectos, el anticuerpo utilizado para la conjugación puede ser útil en el campo de la oncología. Los anticuerpos adecuados incluyen; Rituximab, (Rituxan<sup>™</sup>), un quimérico, IgG1<sub>κ</sub>, anticuerpo anti-CD20, usado para tratar el cáncer y en particular el linfoma no Hodgkin y también la artritis reumatoide; Cetuximab (Erbix<sup>™</sup>) un quimérico, IgG1<sub>κ</sub>, anticuerpo anti-receptor de EGF, utilizado para tratar el cáncer, y en particular cáncer de colon, cabeza y cuello.
- 55 En algunos aspectos, el anticuerpo utilizado para la conjugación puede ser útil en el campo de los trastornos autoinmunes y otros trastornos inmunológicos. Los anticuerpos adecuados incluyen Infliximab (Remicade<sup>™</sup>) un quimérico, IgG1<sub>κ</sub>, anticuerpo anti-TNF $\alpha$ , utilizado para tratar la artritis reumatoide, la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn, la psoriasis, la artritis psoriásica y la espondilitis anquilosante; Adalimumab (Humira<sup>™</sup>) un humano, IgG1<sub>κ</sub>, anticuerpo anti-TNF $\alpha$ , utilizado para tratar la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn, la psoriasis, la artritis psoriásica, la artritis idiopática juvenil y la espondilitis anquilosante; Natalizumab (Tysabri<sup>™</sup>) un IgG4 humanizado<sub>κ</sub>, anticuerpo anti- $\alpha$ 4-integrina usado para tratar esclerosis múltiple, artritis reumatoide, psoriasis, artritis
- 60

idiopática juvenil, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn; Omalizumab (Xolair™) un IgG1 humanizado<sub>K</sub>, anticuerpo anti-IgE usado para tratar el asma alérgica; Ranibizumab (Lucentis™) un IgG1 humanizado<sub>K</sub>, anticuerpo anti-VEGF, usado para tratar la DMAE húmeda; y Palivizumab (Synagis™) un IgG1 humanizado<sub>K</sub>, anticuerpo anti-RSV, utilizado para tratar enfermedades infecciosas, incluido el virus sincitiotico respiratorio.

En algún aspecto, los compuestos y composiciones de la invención se pueden usar para tratar las afecciones mencionadas anteriormente.

### Fraciones efectoras

La fracción efectora puede ser un agente terapéutico, proteína, péptido, ácido nucleico, aptámero, molécula pequeña, agonista de proteína, antagonista de proteína, regulador metabólico, hormona, toxina, factor de crecimiento u otra proteína reguladora, o puede ser un agente de diagnóstico, como una enzima que puede detectarse o visualizarse fácilmente, como la peroxidasa de rábano picante.

En algunos aspectos, la fracción efectora puede ser una proteína o péptido, y puede estar conectado al enlazador a través de un residuo de enlace peptídico. La proteína o el péptido pueden comprender uno o ambos de un grupo terminal de terminal amino R<sup>1</sup> y un grupo terminal de terminal carboxilo R<sup>2</sup>. R<sup>1</sup> puede ser CH<sub>3</sub>, C(O) CH<sub>3</sub>, C(O) CH<sub>3</sub>, C(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, C(O) CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, C(O) CH (CH<sub>3</sub>) CH<sub>3</sub>, C(O) CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, C(O) CH(CH<sub>3</sub>) CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, C(O)C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, C(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-5</sub>Me, diclorobenzoilo (DCB), difluorobenzoilo (DFB), piridinil carboxilato (PyC) o amido-2-PEG, un grupo protector de amino, un grupo de ácido graso lipídico o un carbohidrato. R<sup>2</sup> puede ser OH, NH<sub>2</sub>, NH (CH<sub>3</sub>), NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, NHCH (CH<sub>3</sub>) CH<sub>3</sub>NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, NHCH (CH<sub>3</sub>) CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, NHC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>NHOCH<sub>3</sub>NHOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, un grupo protector de carboxi, un grupo de ácido graso lipídico o un carbohidrato.

La proteína o el residuo de unión al péptido pueden ser K, K(SH), homólogos de lisina, Dap, Dab, Orn, R, C, residuos que contienen tiol, S, T, Y, D, E, N o Q. La proteína o el péptido se puede conectar al enlazador a través del término amino del aminoácido N-terminal. La proteína o el péptido se pueden conectar al enlazador a través del término carboxilo del aminoácido C-terminal. Se puede agregar un resto de aminoácido adicional al extremo N o C para funcionar como un residuo de enlace, ya sea por conexión a través de la cadena lateral del aminoácido, o el término amino o carboxilo.

### Péptidos de unión a Ang2

La fracción efectora puede ser un péptido de unión a Ang2. En algunas realizaciones, el péptido de unión a Ang2 puede comprender una secuencia seleccionada de las descritas en el documento WO2008056346 (US2008166364) (cuyo contenido se incorpora en el presente documento). En algunas realizaciones, el péptido de unión a Ang2 comprende la secuencia: Q<sup>1</sup> (AcK)<sup>2</sup> Y<sup>3</sup> Q<sup>4</sup> P<sup>5</sup> L<sup>6</sup> D<sup>7</sup> E<sup>8</sup> X<sup>9</sup> D<sup>10</sup> K<sup>11</sup> T<sup>12</sup> L<sup>13</sup> Y<sup>14</sup> D<sup>15</sup> Q<sup>16</sup> F<sup>17</sup> M<sup>18</sup> L<sup>19</sup> Q<sup>20</sup> Q<sup>21</sup> G<sup>22</sup> (SEQ ID NO: 26) en la que X<sup>9</sup> de la SEC ID N°: 26 es acil-lisina (AcK) o leucina, (en lo sucesivo denominada Ang2-X<sup>9</sup>) y en la que X<sup>9</sup>, K<sup>11</sup>, L<sup>13</sup>, Q<sup>16</sup>, M<sup>18</sup> o L<sup>19</sup> del péptido de unión a Ang2 se sustituye por un residuo de unión a Ang2 que comprende una cadena lateral nucleófila unida covalentemente al enlazador, seleccionándose el residuo de unión del grupo que consiste en K, Y, S, T, H, homólogos de lisina, tales como K(SH), homocisteína, homoserina, Dap y Dab. En algunas realizaciones, el residuo de enlace Ang2 puede seleccionarse del grupo que consiste en K, K(SH), Y, S, T, H, Dap y Dab. En algunas realizaciones, el residuo de enlace Ang2 es K. El residuo de enlace Ang2 puede ser K<sup>11</sup>. En algunas realizaciones, el residuo de enlace Ang2 puede ser K(SH). El residuo de enlace Ang2 puede ser K(SH)<sup>11</sup>.

En algunas realizaciones, el péptido de unión a Ang2 comprende la secuencia:

Q<sup>1</sup> (AcK)<sup>2</sup> Y<sup>3</sup> Q<sup>4</sup> P<sup>5</sup> L<sup>6</sup> D<sup>7</sup> E<sup>8</sup> (AcK)<sup>9</sup> D<sup>10</sup> K<sup>11</sup> T<sup>12</sup> L<sup>13</sup> Y<sup>14</sup> D<sup>15</sup> Q<sup>16</sup> F<sup>17</sup> M<sup>18</sup> L<sup>19</sup> Q<sup>20</sup> Q<sup>21</sup> G<sup>22</sup> (SEQ ID NO: 27) en la que Ang2-K<sup>11</sup> es el resto de unión a péptido.

En algunas realizaciones, el péptido de unión a Ang2 comprende la secuencia:

Q<sup>1</sup> (AcK)<sup>2</sup> Y<sup>3</sup> Q<sup>4</sup> P<sup>5</sup> L<sup>6</sup> D<sup>7</sup> E<sup>8</sup> L<sup>9</sup> D<sup>10</sup> K<sup>11</sup> T<sup>12</sup> L<sup>13</sup> Y<sup>14</sup> D<sup>15</sup> Q<sup>16</sup> F<sup>17</sup> M<sup>18</sup> L<sup>19</sup> Q<sup>20</sup> Q<sup>21</sup> G<sup>22</sup> (SEQ ID NO: 28) en la que Ang2-K<sup>11</sup> es el resto de unión a péptido.

En algunas realizaciones, el péptido de unión a Ang2 comprende la secuencia:

SEQ ID NO: 29 Q<sup>1</sup> (AcK)<sup>2</sup> Y<sup>3</sup> Q<sup>4</sup> P<sup>5</sup> L<sup>6</sup> D<sup>7</sup> E<sup>8</sup> K<sup>9</sup> D<sup>10</sup> (AcK)<sup>11</sup> T<sup>12</sup> L<sup>13</sup> Y<sup>14</sup> D<sup>15</sup> Q<sup>16</sup> F<sup>17</sup> M<sup>18</sup> L<sup>19</sup> Q<sup>20</sup> Q<sup>21</sup> G<sup>22</sup> en la que Ang2-K<sup>9</sup> es el resto de unión a péptido.

En algunas realizaciones, el péptido de unión a Ang2 comprende la secuencia:

SEQ ID NO: 30 Q<sup>1</sup> (AcK)<sup>2</sup> Y<sup>3</sup> Q<sup>4</sup> P<sup>5</sup> L<sup>6</sup> D<sup>7</sup> E<sup>8</sup> L<sup>9</sup> D<sup>10</sup> (AcK)<sup>11</sup> T<sup>12</sup> L<sup>13</sup> Y<sup>14</sup> D<sup>15</sup> K<sup>16</sup> F<sup>17</sup> M<sup>18</sup> L<sup>19</sup> Q<sup>20</sup> Q<sup>21</sup> G<sup>22</sup> en la que Ang2-K<sup>16</sup> es el resto de unión a péptido.

En algunas realizaciones, el péptido de unión a Ang2 comprende la secuencia:

SEQ ID NO: 31 Q<sup>1</sup> (AcK)<sup>2</sup> Y<sup>3</sup> Q<sup>4</sup> P<sup>5</sup> L<sup>6</sup> D<sup>7</sup> E<sup>8</sup> L<sup>9</sup> D<sup>10</sup> (AcK)<sup>11</sup> T<sup>12</sup> L<sup>13</sup> Y<sup>14</sup> D<sup>15</sup> Q<sup>16</sup> F<sup>17</sup> K<sup>18</sup> L<sup>19</sup> Q<sup>20</sup> Q<sup>21</sup> G<sup>22</sup> en la que Ang2-K<sup>18</sup> es el resto de unión a péptido.

En algunas realizaciones, el péptido de unión a Ang2 comprende la secuencia:

SEQ ID NO: 32 Q<sup>1</sup> (AcK)<sup>2</sup> Y<sup>3</sup> Q<sup>4</sup> P<sup>5</sup> L<sup>6</sup> D<sup>7</sup> E<sup>8</sup> L<sup>9</sup> D<sup>10</sup> (AcK)<sup>11</sup> T<sup>12</sup> L<sup>13</sup> Y<sup>14</sup> D<sup>15</sup> Q<sup>16</sup> F<sup>17</sup> M<sup>18</sup> K<sup>19</sup> Q<sup>20</sup> Q<sup>21</sup> G<sup>22</sup> en la que Ang2-K<sup>19</sup> es el resto de unión a péptido.

En algunas realizaciones, el péptido de unión a Ang2 comprende además un grupo protector N-terminal R<sup>1</sup>- en el que R<sup>1</sup> es CH<sub>3</sub>, C(O) CH<sub>3</sub>, C(O) CH<sub>3</sub>, C(O) CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, C(O) CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, C(O) CH (CH<sub>3</sub>) CH<sub>3</sub>, C(O) CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, C(O) CH (CH<sub>3</sub>) CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, C(O) C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, C(O) CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-5</sub>Me, diclorobenzoilo (DCB), difluorobenzoilo (DFB), piridinil carboxilato (PyC) o amido-2-PEG, un grupo protector amino, un grupo lipídico ácido graso o un carbohidrato.

En algunas realizaciones, el péptido de unión a Ang2 comprende además un grupo protector C-terminal -R<sup>2</sup> en el que -R<sup>2</sup> es donde R<sup>2</sup> es OH, NH<sub>2</sub>, NH (CH<sub>3</sub>), NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, NHCH (CH<sub>3</sub>) CH<sub>3</sub>NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, NHCH (CH<sub>3</sub>) CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, NHC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>NHOCH<sub>3</sub>NHOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, un grupo protector carboxi, un grupo lipídico ácido graso o un carbohidrato.

- 5 En algunas realizaciones R<sup>1</sup> puede ser C(O)CH<sub>3</sub>. En algunas realizaciones R<sup>2</sup> puede ser NH<sub>2</sub>.

El péptido de unión a Ang2 junto con grupos protectores N-terminal y C-terminal puede comprender la fórmula : [C(O)CH<sub>3</sub>]-[SEQ ID NO: 27]-[NH<sub>2</sub>].  
[C(O)CH<sub>3</sub>]-Q<sup>1</sup>(AcK)<sup>2</sup>Y<sup>3</sup>Q<sup>4</sup>P<sup>5</sup>L<sup>6</sup>D<sup>7</sup>E<sup>8</sup>(AcK)<sup>9</sup>D<sup>10</sup>K<sup>11</sup>T<sup>12</sup>L<sup>13</sup>Y<sup>14</sup>D<sup>15</sup>Q<sup>16</sup>F<sup>17</sup>M<sup>18</sup>L<sup>19</sup>Q<sup>20</sup>Q<sup>21</sup>G<sup>22</sup>-[NH<sub>2</sub>] en la que Ang2-K<sup>11</sup> es el grupo de unión a Ang2.

- 10 Los péptidos Ang2 descritos en el presente documento pueden conjugarse como se describe a numerosos tipos de anticuerpos, en particular anticuerpos útiles en el tratamiento de trastornos proliferativos tales como cáncer o angiogénesis incrementada, y también pueden conjugarse con anticuerpos catalíticos tales como h38C2, para formar MAC.

### Enlazadores

- 15 La fracción efectora (como una molécula pequeña, aptámero, ácido nucleico, proteína o péptido (por ejemplo, péptido de unión a Ang2)) puede unirse covalentemente al anticuerpo anti-IGF-1R o parte de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, un anticuerpo anti-IGF1R) mediante un enlazador. El enlazador puede unirse covalentemente al péptido de unión a Ang2 mediante el grupo ε-amino del resto de unión a péptido. Este puede ser un resto de lisina. En algunas realizaciones, el resto de unión es un residuo que contiene tiol, tal como Cys o K(SH) y el conector se une covalentemente al péptido a través del grupo tiol terminal del residuo de enlace.

- 20 El enlazador puede ser lineal o ramificado (para permitir la conjugación a más de un grupo efector por adición de conjugación), y, opcionalmente, incluye uno o más grupos carbocíclicos o heterocíclicos. La longitud del enlazador puede verse en términos del número de átomos lineales entre la fracción efectora y el anticuerpo contando los restos cíclicos tales como anillos aromáticos y similares tomando la vía más corta alrededor del anillo. En algunas realizaciones, el enlazador tiene una extensión lineal de entre 5-15 átomos, en otras realizaciones 15-30 átomos, en otras realizaciones más 30-50 átomos, en otras realizaciones más 50-100 átomos y en otras realizaciones más 100-200 átomos. En algunas realizaciones, la longitud del enlazador es un rango con un límite inferior seleccionado del grupo que consiste en 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, y un límite superior seleccionado del grupo que consiste en 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 y 200,

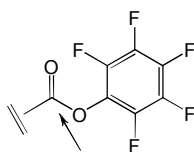
- 35 Otras consideraciones del enlazador incluyen el efecto sobre las propiedades físicas o farmacocinéticas del compuesto resultante, tales como la solubilidad, lipofilia, hidrofilia, hidrofobia, estabilidad (más o menos estable así como degradación planeada), rigidez, flexibilidad, inmunogenicidad, modulación de la unión de anticuerpo, capacidad para incorporarse en una micela o liposoma y similares.

- 40 El enlazador puede ser un enlazador de peptidilo. En algunas realizaciones, el enlazador peptidilo puede tener una longitud de entre 3-20 aminoácidos, tales como repeticiones de un solo resto aminoácido (por ejemplo, poliglicina) o combinaciones de restos aminoácidos para dar un enlazador peptídico que confiera una presentación favorable de la fracción efectora o de la farmacocinética. Los enlazadores peptídicos que serían más compatibles con la presencia de grupos activadores pueden carecer de restos de lisina e histidina. La SEQ ID NO: 59 es un enlazador peptídico ejemplar

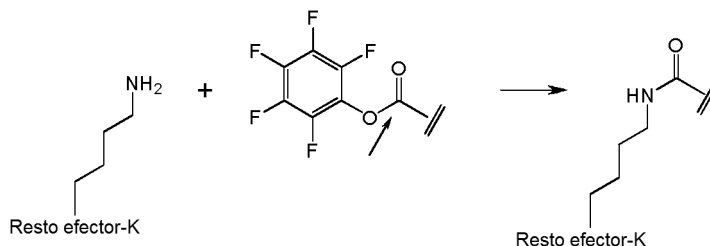
- 45 Como alternativa, el enlazador puede ser un enlazador no peptidilo. Serían ejemplos típicos de estos tipos de enlazador los basados en hidrocarburos de cadena lineal o ramificada o polietilenglicoles de longitudes variables. Estos pueden incorporar otros grupos para producir solubilidad, rigidez, punto isoeléctrico, tales como anillos aromáticos o no aromáticos, halógenos, cetona, aldehídos, ésteres, sulfonilos, grupos fosfato, etc.

- 50 En algunos aspectos de la divulgación, el enlazador puede comprender la fórmula: -X-Y-Z-; en la que X es el resto de unión a la fracción efectora (por ejemplo mediante un resto de unión a péptido). Y es una región espaciadora y Z es un resto de unión a la cadena lateral de un resto de lisina o cisteína en un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-IGF1R). En algunos aspectos de la divulgación, el enlazador puede ser de fórmula XYZ\* cuando no está unido al anticuerpo, donde Z\* es un grupo saliente, de modo que cuando se conjuga con el anticuerpo, el grupo saliente Z\* reacciona con el sitio de conjugación del anticuerpo para formar el enlazador XYZ conjugado.

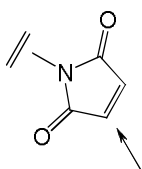
- 55 X puede seleccionarse para permitir una estrategia de unión covalente direccional específica con la fracción efectora (por ejemplo, mediante el resto de unión al péptido). En algunos aspectos, X puede seleccionarse del grupo que consiste en COOH, isocianato, isotiocianato, acil azida, ácido sulfónico, sulfonyl haluro, aldehído, cetona, epóxido, carbonato, reactivo de arilación, imidoéster, grupo amina y grupo maleimida. Por ejemplo, cuando el resto de unión a péptido comprende un grupo nucleófilo, X puede ser un grupo electrófilo y viceversa. Por ejemplo, si la cadena lateral del resto de unión a péptido comprende un grupo amina, tal como K, H, Ornitina, Dap o Dab, X puede ser COOH, u otro electrófilo reactivo de forma similar, por ejemplo, un isocianato, isotiocianato, acil azida, ácido sulfónico o sulfonyl haluro, aldehído o cetona, epóxido, carbonato, reactivo de arilación o imidoéster. Si el resto de unión a péptido es D o E, X puede comprender un grupo nucleófilo, tal como un grupo amina. Cualquiera de estas estrategias permite que se forme un enlace covalente entre el grupo X y el resto de unión a péptido por estrategias de formación de enlaces amida. Por ejemplo, cuando X es COOH, puede activarse como un éster pentafluorofenílico. En este caso, la reacción con un grupo amina en el péptido de unión a péptido conduce a la formación de un enlace amida, mientras que el pentafluorofenol es un grupo saliente (que puede denominarse X\*).



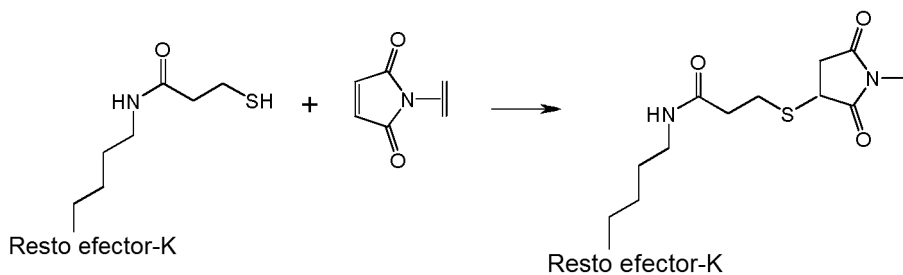
La flecha indica el punto de unión al resto de unión a péptido y la línea paralela representa la unión al grupo Y del enlazador.



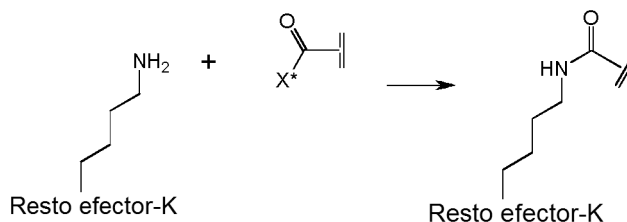
- 5 Cuando el grupo de unión a péptido es C, homólogos de C u otros restos que contienen un grupo tiol (tales como K(SH)), X puede comprender un grupo maleimida, permitiendo una estrategia de reacción de adición de tiol-maleimida para unir covalentemente el grupo X con el resto de unión a péptido. En algunos aspectos, X puede ser maleimida:



- 10 en la que la flecha indica el punto de unión al resto de unión a péptido y la línea paralela representa la unión al grupo Y del enlazador. Para facilitar la nomenclatura, los enlazadores descritos en el presente documento que se han construido utilizando grupos maleimida se describen como enlazadores que contienen maleimida, y pueden titularse MAL para indicar esto, aunque después de la construcción del enlazador, el grupo maleimida generalmente se convierte en un anillo de succinimida.

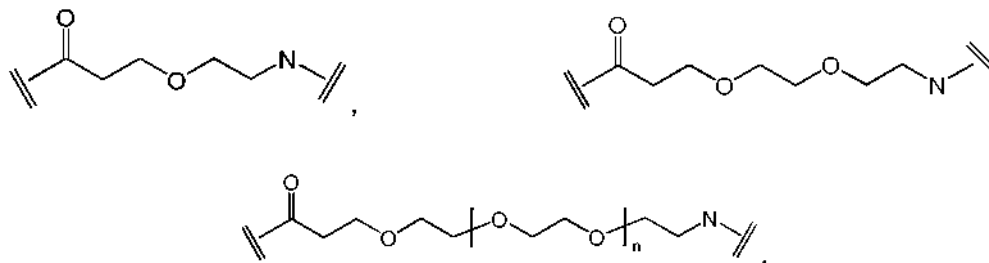


- 15 En algunos aspectos, el resto de unión es K(SH) y el grupo X es maleimida.  
En algunos aspectos, X puede comprender una función carboxilo activada por éster pentafluorofenílico que puede formar una amida con la cadena lateral de lisina en el péptido.



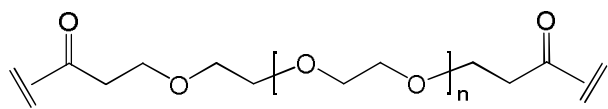
- 20 En algunos aspectos, X puede comprender un grupo tiol, que permite que se forme un puente disulfuro entre el resto de unión a péptido y el grupo X.  
En algunas realizaciones, Y es una cadena de conexión biológicamente compatible que incluye cualquier átomo seleccionado del grupo que consiste en C, H, N, O, P, S, F, Cl, Br e I, y puede comprender uno o más aminoácidos,

- 5 polímeros o copolímeros de bloque. Y puede seleccionarse para proporcionar una longitud global del enlazador de entre 2-100 átomos. Y puede seleccionarse de modo que la longitud global del enlazador sea de entre 5 y 30 átomos. Y puede seleccionarse de modo que la longitud global del enlazador sea de 15-25 átomos. Y puede seleccionarse de modo que la longitud global del enlazador sea de entre aproximadamente 17 y aproximadamente 19 átomos. En algunos aspectos, Y puede ser un ácido de amino polietilenglicol tal como:



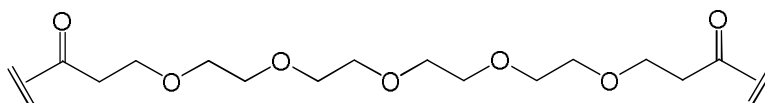
en el que  $n = 0$  a 10, en algunos aspectos 1-10, en algunos aspectos, 1-5 y en algunos aspectos, 1.

En algunos aspectos, Y puede ser un diácido de polietilenglicol, tal como:

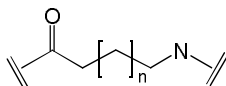


- 10 en el que  $n = 0$  a 10, en algunos aspectos 1-10, en algunos aspectos, 1-5 y en algunos aspectos, 1 y en algunos aspectos, 2.

En algunos aspectos de la invención, la porción Y del enlazador comprende la fórmula:

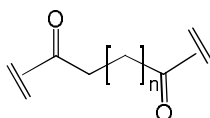


En algunos aspectos, Y puede ser un ácido amino alcanoico, tal como:



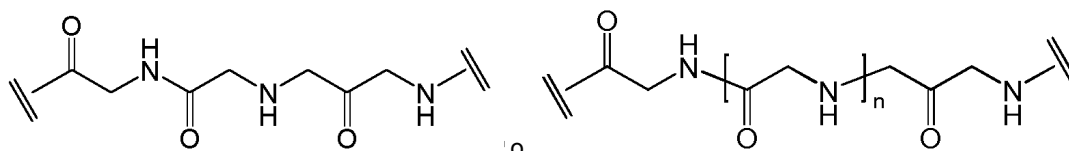
- 15 en el que  $n = 0$  a 20, en algunos aspectos 1-10, en algunos aspectos, 1-5 y en algunos aspectos, 1 y en algunos aspectos, 2.

En algunos aspectos, Y puede ser un diácido alcanoico, tal como:



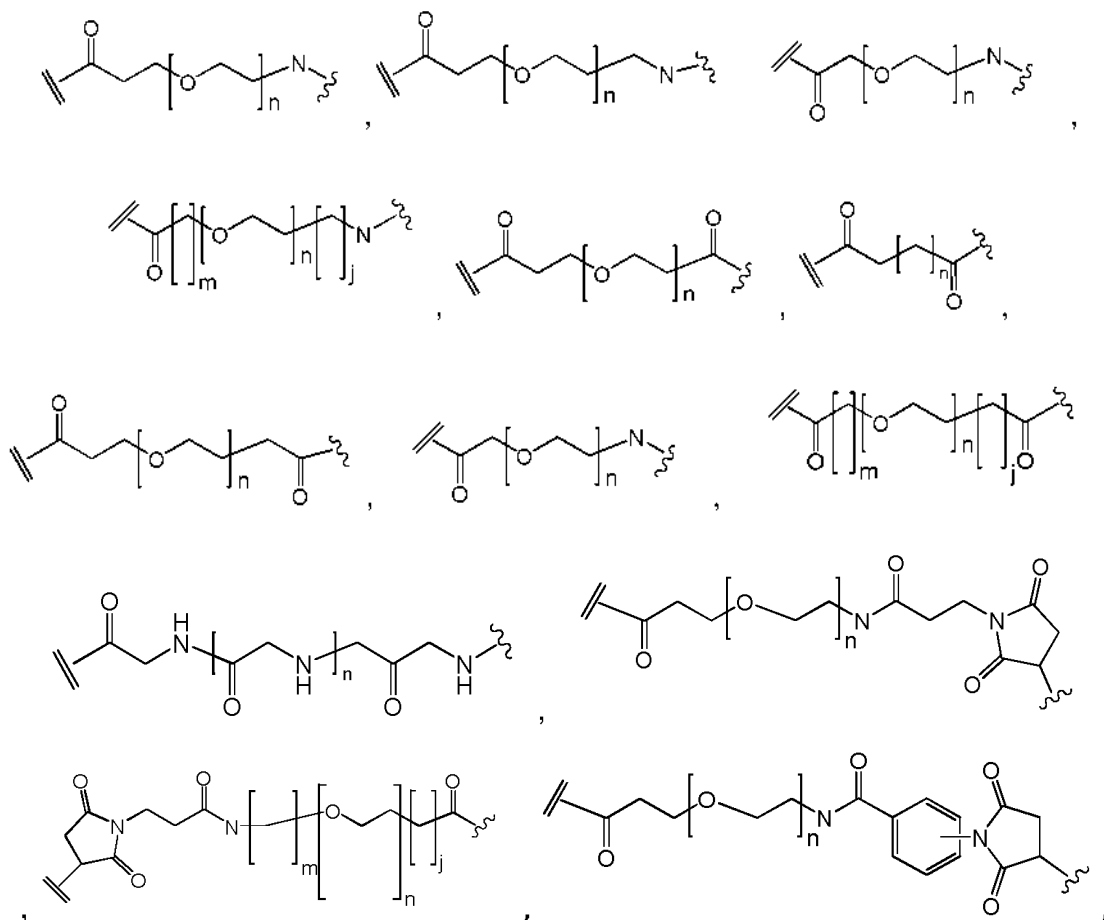
- 20 en el que  $n = 0$  a 20, en algunos aspectos 1-10, en algunos aspectos, 1-5 y en algunos aspectos, 1 y en algunos aspectos, 2.

En algunos aspectos, Y puede ser una poliglicina, tal como:

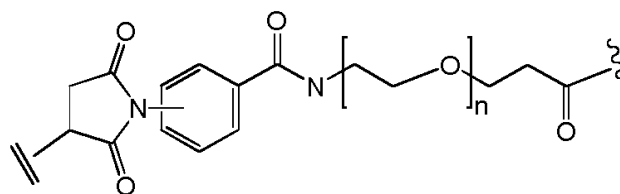


- 25 en la que  $n = 0$  a 10, en algunos aspectos 1-10, en algunos aspectos, 1-5 y en algunos aspectos, 1 y en algunos aspectos, 2.

En algunos aspectos, Y, X-Y, Y-Z y X-Y-Z pueden seleccionarse del grupo que consiste en:



5 y



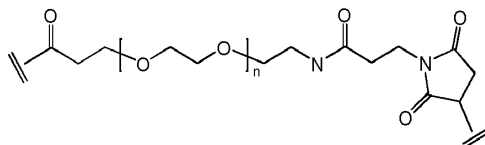
10 donde m, n y j son cada uno independientemente de 0 a 30, En algunos aspectos n = 1-10, en algunos aspectos, n = 1-5. En algunos aspectos, el límite inferior del rango de valores para n se selecciona del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20, y el límite superior para el rango de valores para n se selecciona del grupo que consiste en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30, N puede ser 1. N puede ser 2. N puede ser 3. N puede ser 4. N puede ser 5. N puede ser 6.

15 En algunos aspectos m = 1-10, en algunos aspectos, m = 1-5. En algunos aspectos, el límite inferior del rango de valores para m se selecciona del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20, y el límite superior para el rango de valores para m se selecciona del grupo que consiste en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30, M puede ser 1. M puede ser 2. M puede ser 3. M puede ser 4. M puede ser 5. M puede ser 6. En algunos aspectos j = 1-10, en algunos aspectos, j = 1-5. En algunos aspectos, el límite inferior del rango de valores para j se selecciona del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20, y el límite superior para el rango de valores para j se selecciona del grupo que consiste en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30, J puede ser 1. J puede ser 2. J puede ser 3. J puede ser 4. J puede ser 5. J puede ser 6. En algunos aspectos, la longitud total de Y no excede los 200 átomos. En algunos aspectos, la longitud total de Y no supera los 150 átomos. En algunos aspectos, la longitud total de Y no excede los 100 átomos. En algunos aspectos, la longitud total de Y no supera los 50 átomos. En algunos aspectos, el rango de longitud total de la cadena de Y en números de átomos puede tener un límite inferior seleccionado del grupo que consiste en 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60, y un límite superior seleccionado del grupo que consiste en 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 y 100, En algunos aspectos, el enlazador XYZ puede ser idéntico a los grupos Y anteriores. En algunos aspectos, la línea ondulada se conecta al grupo X. En algunos aspectos, las líneas paralelas se conectan al grupo X. En algunos aspectos, la línea ondulada se conecta al grupo Z. En algunos aspectos, las líneas paralelas se conectan al grupo Z. En algunos aspectos, la línea ondulada se



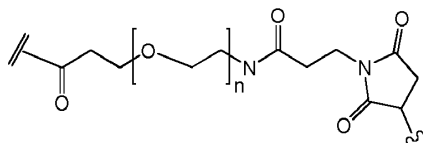
conecta a la cadena lateral de K<sup>188</sup>-CLK. En algunos aspectos, las líneas paralelas se conectan a la cadena lateral de K<sup>188</sup>-CLK. En algunos aspectos, la línea ondulada se conecta con la Efectora Efectora. En algunos aspectos, las líneas paralelas se conectan a Efector Moiety.

En algunos aspectos, Y, Y-Z y / o X-Y pueden ser un ácido de maleimida PEG, como:

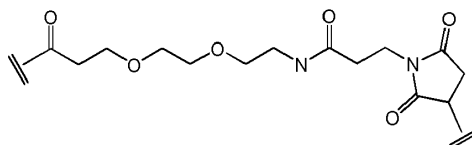


5 donde n = 1 a 12, en algunos aspectos 1-10, en algunos aspectos, 1-5, y en algunos aspectos, 1 y en algunos aspectos, 2.

En algunos aspectos, Y, Y-Z y / o X-Y pueden ser un ácido de maleimida PEG, como:



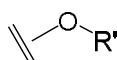
10 de tal manera que el límite inferior del rango de valores para n se seleccione del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20, y el límite superior para el rango de valores para n se seleccione del grupo que consiste en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30, N puede ser 1. N puede ser 2. N puede ser 3. N puede ser 4. N puede ser 5. N puede ser 6. En algunos aspectos, Y, YZ y / o XY comprenden la fórmula:



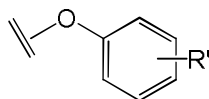
15 Z\* puede seleccionarse para permitir una estrategia de unión covalente direccional específica con una cadena lateral de lisina en el anticuerpo anti-IGF-1R. Por ejemplo, Z puede ser COOH u otro electrófilo reactivo de forma similar para reaccionar con ε-amino de las cadenas laterales de lisina de superficie usando una de varias estrategias posibles de formación de enlaces amida.

20 En algunos aspectos, Z\* puede usarse para formar un éster activo. Los ésteres activos conectan con aminas y, por lo tanto, pueden conjugarse con el ε-amino de una cadena lateral de lisina del anticuerpo. La función carboxilo Z para permitir la formación del éster activo estará presente en el extremo terminal del grupo Y. La función alcoholica o fenólica del éster activo actúa como grupo saliente Z\* durante la reacción de conjugación, permitiendo la conexión con la cadena lateral de lisina en el anticuerpo por generación de una amida.

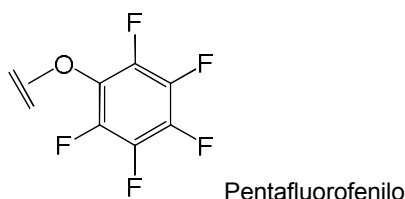
25 En algunas realizaciones, el grupo Z\* comprende una estructura de fórmula:



en la que R' es un grupo alifático o aromático. En algunas realizaciones, el grupo Z\* es de fórmula:



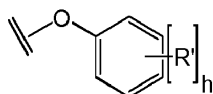
30 en la que R' = cualquiera de F, Cl, Br o I, nitro, ciano, trifluorometilo, solos o en combinación, y puede estar presente en una cantidad entre 1 y 5. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> puede ser un halógeno y pueden estar presentes 4 o 5 átomos de halógeno. En algunas realizaciones, puede haber átomos 4 R<sup>1</sup>. En algunas realizaciones, puede haber 5 átomos R<sup>1</sup>. En algunas realizaciones, Z\* puede ser tetrafluorofenilo. En algunas realizaciones, Z\* puede comprender la fórmula:



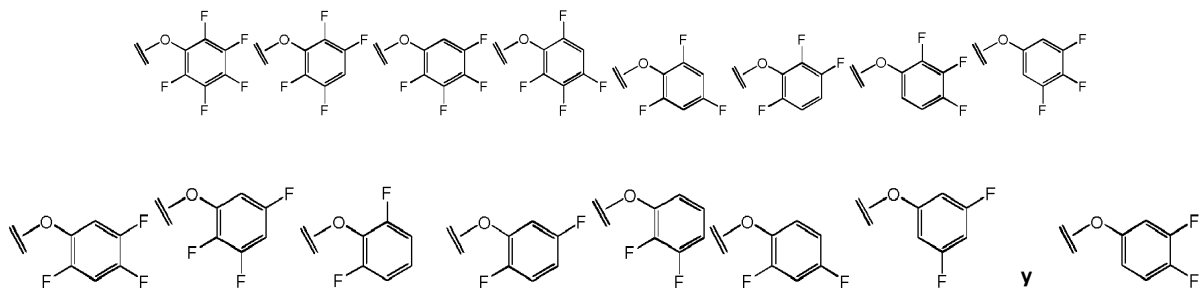
35 17

en la que la línea paralela representa el punto de unión a la porción Y del enlazador.

En algunos aspectos, el grupo Z\* es de la fórmula:

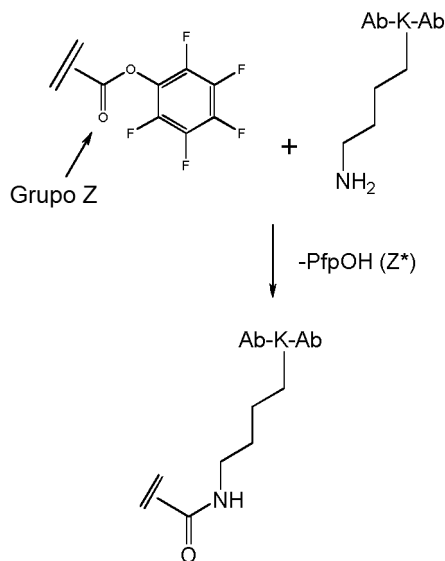


5 donde R' = cualquiera de F, Cl, Br o I, nitro, ciano, trifluorometilo, solo o en combinación, y h = 1, 2, 3, 4 o 5. En algunas realizaciones, R' puede ser un halógeno. En algunas realizaciones, R' es F o Cl, y h = 4 o 5. En algunas realizaciones, R' es F o Cl, y h = 5. En algunas realizaciones, R' es F, y h = 2, 3, 4 o 5. En algunas realizaciones, R' es F, y h = 3, 4 o 5. En algunas realizaciones, R' es F, y h = 4 o 5. En algunas realizaciones, R' es F, y h = 5. En algunos aspectos, Z\* puede seleccionarse del grupo que consiste en:

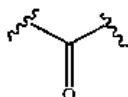


10

Para dichos ésteres activos, el grupo saliente es Z\* y el propio grupo Z es el carbonilo unido al grupo Y. Cuando reacciona con el anticuerpo, el grupo Z forma una amida, como se muestra a continuación

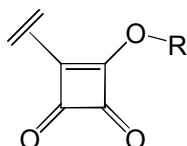


En algunas realizaciones, Z es

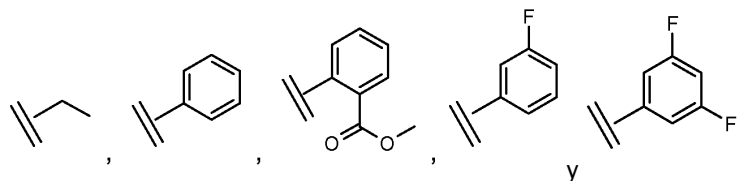


15

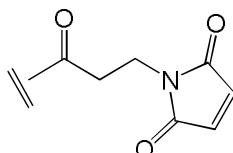
En algunas realizaciones, el grupo Z comprende un éster de escarato, tal como



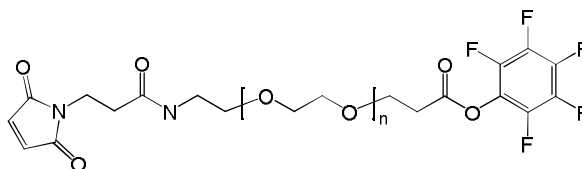
en el que R = grupo alifático o aromático sustituido y puede seleccionarse del grupo que consiste en:



En algunas realizaciones, el grupo Z\* comprende un grupo Maleimida:

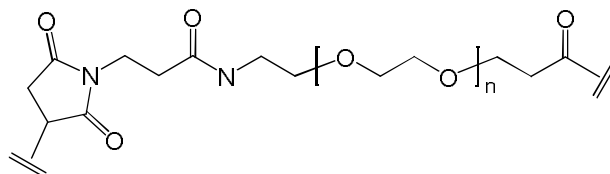


5 En algunos aspectos, el enlazador X\*YZ\* comprende un éster de Maleimida-PEG-Pfp de estructura:



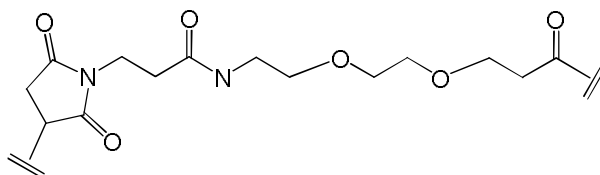
en la que n = 1 a 12. En algunos aspectos, n = 1 a 5, en algunos aspectos n = 2, en algunos aspectos n = 1.

En algunos aspectos, el MAC comprende un enlazador XYZ de fórmula:



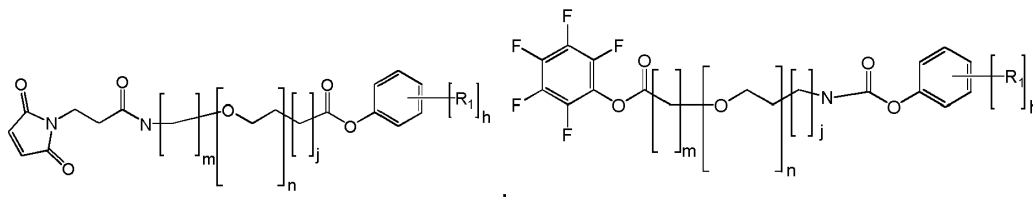
10 en la que n = 1-12. En algunos aspectos, n = 1 a 5. En algunos aspectos n = 1 a 3. En algunos aspectos n = 2. En algunos aspectos n = 1.

En algunos aspectos el MAC comprende un enlazador XYZ de fórmula:

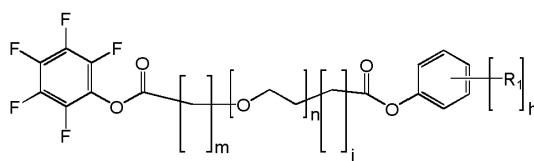


15 en la que n = 1-12. En algunos aspectos, n = 1 a 5. En algunos aspectos n = 1 a 3. En algunos aspectos n = 2. En algunos aspectos n = 1.

En algunos aspectos, el enlazador X \* YZ \* comprende una estructura seleccionada del grupo que consiste en:

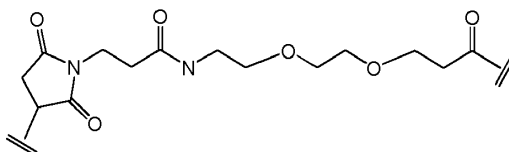


y

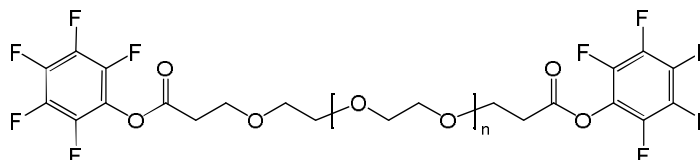


5 en la que m, n y j son cada uno independientemente de 0 a 30, R<sup>1</sup> es F y h = 2, 3, 4 o 5. En algunos aspectos n = 1-10, en algunos aspectos, n = 1-5. En algunos aspectos, el límite inferior del rango de valores para n se selecciona del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20, y el límite superior para el rango de valores para n se selecciona del grupo que consiste en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30, N puede ser 1. N puede ser 2. N puede ser 3. N puede ser 4. N puede ser 5. N puede ser 6. En algunos aspectos m = 1-10, en algunos aspectos, m = 1-5. En algunos aspectos, el límite inferior del rango de valores para m se selecciona del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20, y el límite superior para el rango de valores para m se selecciona del grupo que consiste en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30, M puede ser 1. M puede ser 2. M puede ser 3. M puede ser 4. M puede ser 5. M puede ser 6. En algunos aspectos j = 1-10, en algunos aspectos, j = 1-5. En algunos aspectos, el límite inferior del rango de valores para j se selecciona del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20, y el límite superior para el rango de valores para j se selecciona del grupo que consiste en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30, J puede ser 1. J puede ser 2. J puede ser 3. J puede ser 4. J puede ser 5. J puede ser 6. En algunos aspectos, la longitud total de Y no excede los 200 átomos. En algunos aspectos, la longitud total de Y no supera los 150 átomos. En algunos aspectos, la longitud total de Y no excede los 100 átomos. En algunos aspectos, la longitud total de Y no supera los 50 átomos. En algunos aspectos, el rango de longitud total de la cadena de Y en números de átomos puede tener un límite inferior seleccionado del grupo que consiste en 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60, y un límite superior seleccionado del grupo que consiste en 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 y 100,

En algunos aspectos, el MAC comprende un enlazador XYZ de la fórmula:

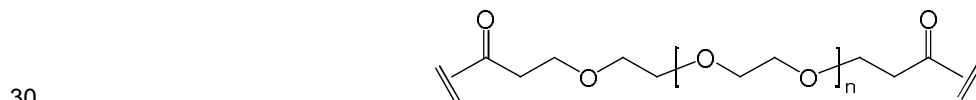


25 En algunos aspectos, el enlazador X\*Y\*Z\* comprende un éster PEG-bis-pentafluorofenílico de fórmula:

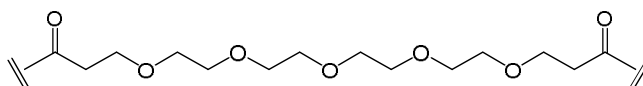


en la que n = 1 a 12. En algunos aspectos n = 1 a 10, En algunos aspectos n = 1 a 5. En algunos aspectos n = 2. En algunos aspectos n = 1.

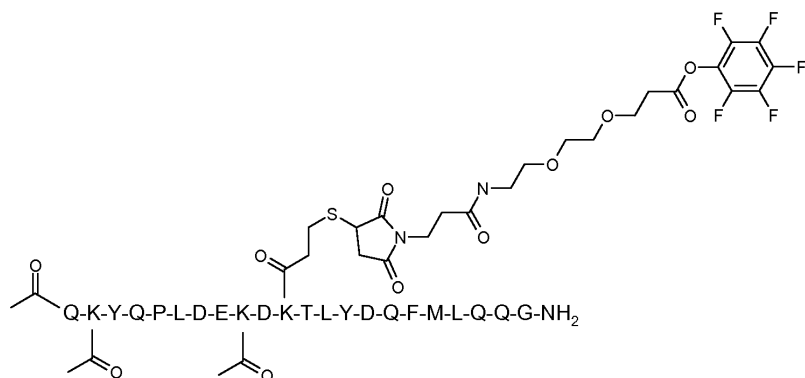
En algunos aspectos, el MAC comprende un enlazador XYZ de fórmula:



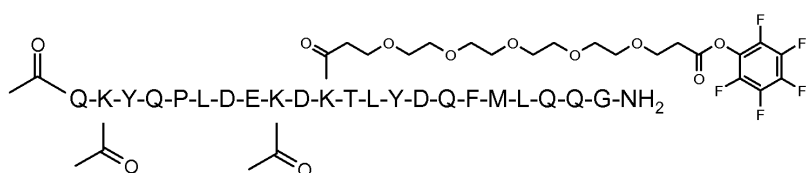
En algunos aspectos, el MAC comprende un enlazador XYZ de fórmula:



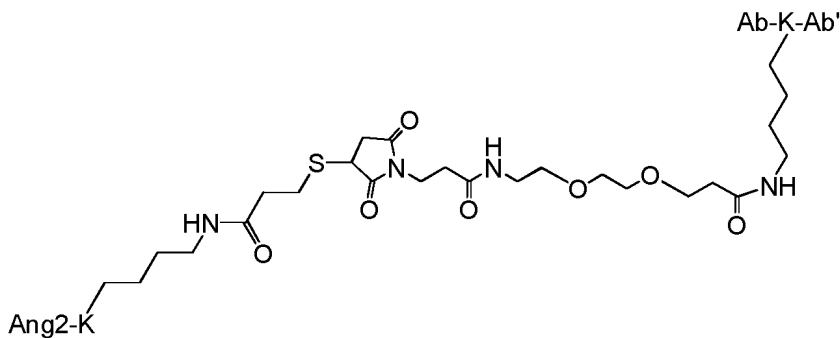
En algunas realizaciones, el péptido cuando está unido al enlazador XYZ\* comprende la fórmula:



En algunas realizaciones, el péptido unido al enlazador XYZ\* comprende la fórmula:



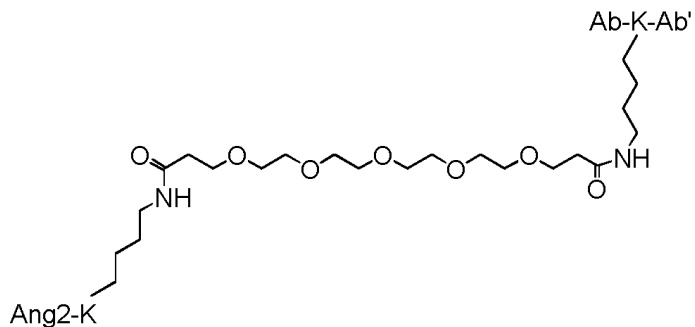
En algunos aspectos, el MAC comprende un compuesto de fórmula :



5

en la que Ang2-K es un resto de lisina o lisina modificada de un péptido de unión a Ang2 y Ab-K-Ab' es un resto de lisina en un anticuerpo anti-IGF-1R.

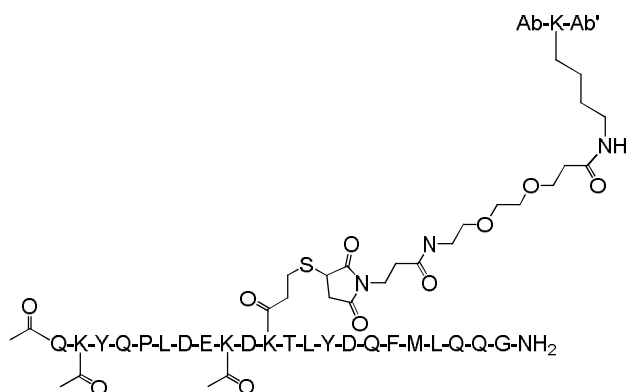
En algunos aspectos, el MAC comprende un compuesto de fórmula :



10

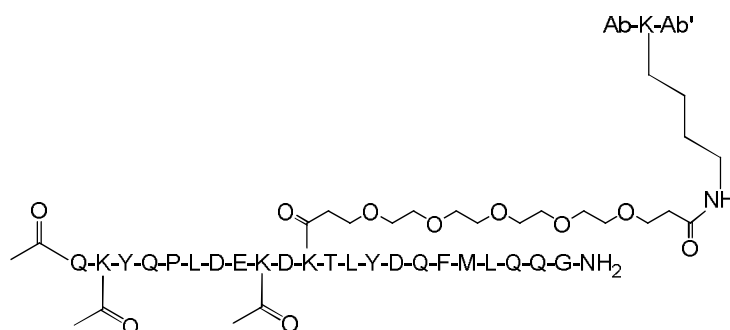
en la que Ang2-K es un resto de lisina o lisina modificada de un péptido de unión a Ang2 y Ab-K-Ab es un resto de lisina en un anticuerpo anti-IGF-1R.

En algunos aspectos, el MAC comprende la fórmula:



en la que Ab-K-Ab es K<sup>188</sup> del anticuerpo 2.12.1.fx.

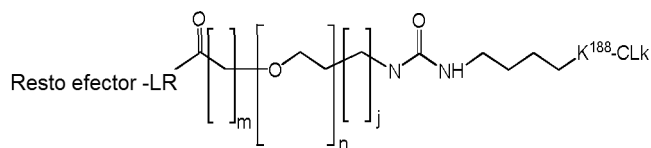
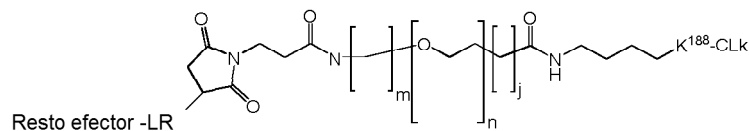
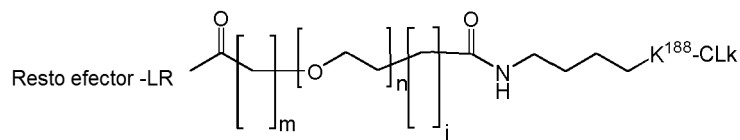
En algunos aspectos, el MAC comprende la fórmula :

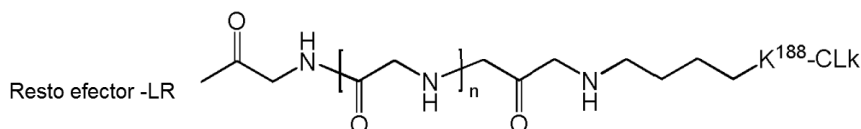
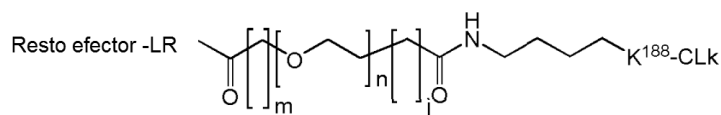
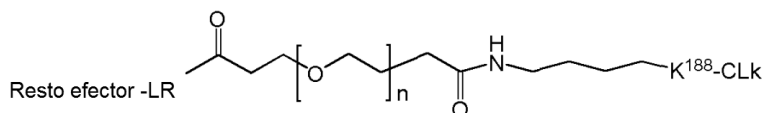
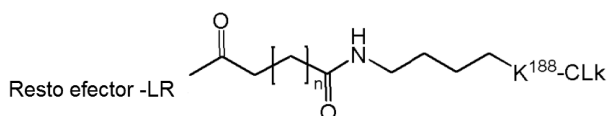
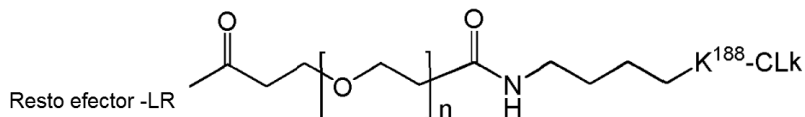
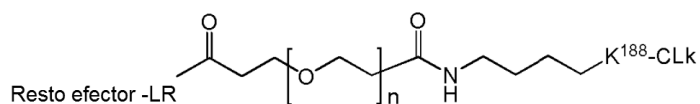


5 en la que Ab-K-Ab es K<sup>188</sup> del anticuerpo 2.12.1.fx.

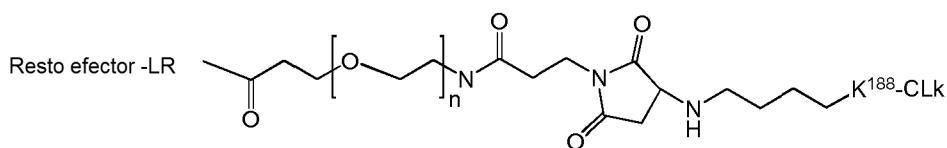
En algunos aspectos, el MAC comprende 2 péptidos (que pueden ser péptidos de unión a Ang2) conjugados por anticuerpo (que puede ser un anticuerpo anti-IGF1R). En algunos aspectos, un péptido se conjuga en cada uno de los 2 K<sup>188</sup> residuos del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (que puede ser el anticuerpo 2.12.1.fx).

10 En algunos aspectos, el MAC comprende una fórmula seleccionada del grupo que consiste en:





y

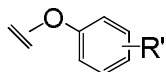


5 en la que  $K^{188}\text{-CLk}$  es un enlace covalente a la cadena lateral de dicho  $K^{188}\text{-CLk}$ , Efectador Moiety-LR es un enlace covalente al Efectador Moiety, y m, n y j son cada uno independientemente 0-30, En algunos aspectos n = 1-10, en algunos aspectos, n = 1-5. En algunos aspectos, el límite inferior del rango de valores para n se selecciona del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20, y el límite superior para el rango de valores para n se selecciona del grupo que consiste en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30, N puede ser 1. N puede ser 2. N puede ser 3. N puede ser 4. N puede ser 5. N puede ser 6. En algunos aspectos m = 1-10, en algunos aspectos, m = 1-5. En algunos aspectos, el límite inferior del rango de valores para m se selecciona del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20, y el límite superior para m se selecciona del grupo que consiste en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30, M puede ser 1. M puede ser 2. M puede ser 3. M puede ser 4. M puede ser 5. M puede ser 6. En algunos aspectos j = 1-10, en algunos aspectos, j = 1-5. En algunos aspectos, el límite inferior del rango de valores para j se selecciona del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20, y el límite superior para el rango de valores para j se selecciona del grupo que consiste en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30, J puede ser 1. J puede ser 2. J puede ser 3. J puede ser 4. J puede ser 5. J puede ser 6. En algunos aspectos, la longitud total de Y no excede los 200 átomos. En algunos aspectos, la longitud total de Y no supera los 150 átomos. En algunos aspectos, la longitud total de Y no excede los 100 átomos. En algunos aspectos, la longitud total de Y no supera los 50 átomos. En algunos aspectos, el rango de longitud total de la cadena de Y en números de átomos puede tener un límite inferior seleccionado del grupo que consiste en 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60, y un límite superior seleccionado del grupo

que consiste en 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 y 100-

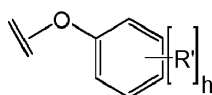
**Procedimientos de conjugación**

5 En algunos aspectos, la divulgación proporciona un procedimiento de preparación de un conjugado de anticuerpo multifuncional (MAC), que comprende un anticuerpo o porción de unión a antígeno, estando el anticuerpo conjugado covalentemente con al menos una fracción efectora a través de un enlazador unido a una cadena lateral de CLK-K<sup>188</sup> (según la numeración de Kabat), comprendiendo dicho procedimiento: unir covalentemente la fracción efectora a un enlazador que termina en un grupo saliente Z\* de fórmula:

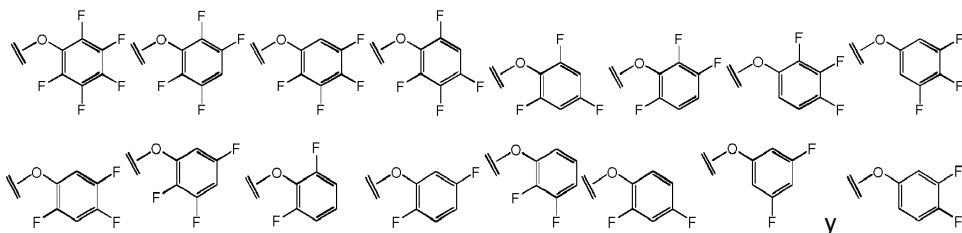


10 en la que R<sup>1</sup> es cualquiera de F, Cl, Br o I, nitro, ciano, trifluorometilo, solos o en combinación, y puede estar presente en una cantidad de entre 1 y 5, y hacer reaccionar el complejo de fracción efectora-enlazador-grupo saliente así formado con el anticuerpo a una proporción molar de entre aproximadamente 3,5:1 y aproximadamente 4,5:1 de Fracción efectora:anticuerpo. En algunos aspectos, la proporción molar es de aproximadamente 3,7:1 a aproximadamente 4,3:1.

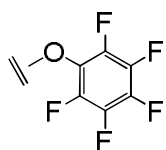
En algunos aspectos, el grupo Z\* es de la fórmula:



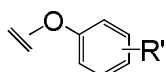
15 donde R<sup>1</sup> = cualquiera de F, Cl, Br o I, nitro, ciano, trifluorometilo, solo o en combinación, y h = 1, 2, 3, 4 o 5. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> Puede ser un halógeno. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es F o Cl, y h = 4 o 5. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es F o Cl, y h = 5. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es F, y h = 2, 3, 4 o 5. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es F, y h = 3, 4 o 5. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es F, y h = 4 o 5. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es F, y h = 5. En algunos aspectos, Z\* puede seleccionarse del grupo que consiste en:



25 R<sup>1</sup> puede estar presente en una cantidad entre 3 y 5. Puede haber 3 grupos R<sup>1</sup>. R<sup>1</sup> puede estar presente en una cantidad de entre 4 y 5. Puede haber 4 grupos R<sup>1</sup>. Puede haber 5 grupos R<sup>1</sup>. R<sup>1</sup> puede ser flúor. R<sup>1</sup> puede ser cloro. R<sup>1</sup> puede ser bromo. El grupo saliente puede comprender la fórmula:



30 En algunos aspectos, la divulgación proporciona procedimientos de producción de un MAC, en los que el MAC comprende un anticuerpo, o fragmento del mismo, unido covalentemente a al menos una fracción efectora que se une a una diana adicional (tal como un péptido, molécula pequeña, aptámero, molécula de ácido nucleico o proteína), caracterizados por que la fracción efectora comprende un enlazador con un grupo saliente PFP capaz de reaccionar con el ε-amino de restos de lisina de superficie del anticuerpo. En algunos aspectos, la invención proporciona un procedimiento para conjugar una fracción efectora (tal como un péptido) con un anticuerpo que comprende una región constante de cadena ligera kappa, que comprende los restos 62-103 de la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 45, la SEQ ID NO: 46 o la SEQ ID NO: 47 que comprende conjugar la fracción efectora con un enlazador que comprende un grupo saliente de fórmula:



40 en la que R<sup>1</sup> es cualquiera de F, Cl, Br o I, nitro, ciano, trifluorometilo, solos o en combinación, y puede estar presente en una cantidad de entre 1 y 5, y hacer reaccionar el grupo saliente con la cadena lateral de K80 de la SEQ ID NO: 15 para proporcionar un anticuerpo con una fracción efectora conjugada con la región constante de cadena ligera.

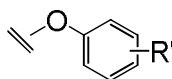
El anticuerpo puede comprender una región constante de cadena ligera sustancialmente homóloga a los restos 74-106 de la SEQ ID NO: 15. El anticuerpo puede comprender una región de cadena ligera sustancialmente homóloga a los restos 62-103 de la SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46 or SEQ ID NO:47. En algunos aspectos, el anticuerpo puede comprender una región de cadena ligera sustancialmente homóloga a los residuos 74-90 de la



SEC ID NO: 15. En algunos aspectos, la fracción efectora se conjuga en K<sup>80</sup> de SEC ID NO: 15. En algunos aspectos, la fracción efectora se conjuga en K<sup>82</sup>. En algunas formas, un péptido de unión a Ang2 se conjuga con un anticuerpo anti-IGF1R en CLK-K<sup>188</sup> (Según la numeración de Kabat).

5 En algunos aspectos de la divulgación, el procedimiento comprende combinar un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo con una fracción efectora, en el que la fracción efectora se une covalentemente a un enlazador que comprende un grupo saliente PFP.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un procedimiento de conjugación de una fracción efectora con una proteína, en el que la fracción efectora se une a un enlazador que termina en un grupo saliente Z\* de fórmula:



10 en la que R' = cualquiera de F, Cl, Br o I, nitro, ciano, trifluorometilo, solos o en combinación, y puede estar presente en una cantidad de entre 1 y 5, y la proteína comprende los residuos 62-103 de la SEC ID N° : 15, SEC ID NO: 45, SEC ID NO: 46 o SEC ID NO: 47 incluyendo K<sup>80</sup>, de modo que la fracción efectora se conjuga con el grupo ε-amino del K<sup>80</sup> residuo, que comprende hacer reaccionar la fracción efectora y el enlazador unido a la proteína en una relación molar de entre aproximadamente 3,7: 1 y aproximadamente 4,3: 1 de la fracción efectora: proteína.

15 En algunos aspectos, la fracción efectora, el enlazador y el grupo saliente pueden ser como se describe en el presente documento. En algunos aspectos, la proteína puede comprender una región constante de cadena ligera de anticuerpo. En algunos aspectos, la proteína puede comprender la SEQ ID NO: 15 y el sitio de conjugación es K80,

20 En algunos aspectos, la proporción molar de anticuerpo:Fracción efectora (por ejemplo, anticuerpo anti-IGF-1R:ABP) está entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 4,6:1. En algunos aspectos de la invención, la proporción molar es de aproximadamente 3,7:1 y aproximadamente 4,3:1. En algunos aspectos de la invención, la proporción molar de anticuerpo:Fracción efectora es de aproximadamente 4:1. En algunos aspectos, la relación molar está entre aproximadamente 2: 1 y aproximadamente 7: 1. En algunos aspectos, la relación molar está entre aproximadamente 3: 1 y aproximadamente 6: 1. En algunos aspectos, la relación molar está entre aproximadamente 3: 1 y aproximadamente 7: 1. En algunos aspectos, la relación molar está entre aproximadamente 3: 1 y aproximadamente 5: 1.

25 En los aspectos de la invención en los que es deseable tener menos de 1,5 conjugaciones por anticuerpo (como cuando se requiere una sola fracción efectora), la relación molar puede estar entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 6:1, en donde el tampón comprende HEPES en una concentración de al menos 0,02M. La concentración de HEPES puede estar entre aproximadamente 0,1M y aproximadamente 1M. La concentración de HEPES puede oscilar entre aproximadamente 0,1M y aproximadamente 0,5M. En los aspectos de la invención en los que es deseable tener menos de 1,5 conjugaciones por anticuerpo (como cuando se requiere una sola fracción efectora), la relación molar puede estar entre aproximadamente 1: 1 y aproximadamente 3: 1.

30 En algunos aspectos, la relación molar preferida es un rango con un límite inferior seleccionado del grupo que consiste en aproximadamente 1, aproximadamente 1,2, aproximadamente 1,4, aproximadamente 1,5, aproximadamente 1,6, aproximadamente 1,8, aproximadamente 2, aproximadamente 2,2, aproximadamente 2,4, aproximadamente 2,5, aproximadamente 2,6, aproximadamente 2,8, aproximadamente 3, aproximadamente 3,2, aproximadamente 3,3, aproximadamente 3,4, aproximadamente 3,6, aproximadamente 3,6, aproximadamente 3,7, aproximadamente 3,8, aproximadamente 3,9, aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,1, aproximadamente 4,2, aproximadamente 4,3, aproximadamente 4,4, aproximadamente 4,5, aproximadamente 4,6, aproximadamente 4,7, aproximadamente 4,8, aproximadamente 4,9, aproximadamente 5, aproximadamente 5,2, aproximadamente 5,4, aproximadamente 5,5, aproximadamente 5,6, aproximadamente 5,8, aproximadamente 6, aproximadamente 6,2, aproximadamente 6,4, aproximadamente 6,5, aproximadamente 6,6, aproximadamente 6,8, aproximadamente 7, aproximadamente 7,3, aproximadamente 7,5, aproximadamente 7,7, aproximadamente 8, aproximadamente 8,5, aproximadamente 9, aproximadamente 9,5 y aproximadamente 10 a 1, y un límite superior seleccionado del grupo que consiste en aproximadamente 1,5, aproximadamente 1,6, aproximadamente 1,8, aproximadamente 2, aproximadamente 2,2, aproximadamente 2,4, aproximadamente 2,5, aproximadamente 2,6, aproximadamente 2,8, aproximadamente 3, aproximadamente 3,2, aproximadamente 3,3, aproximadamente 3,4, aproximadamente 3,5, aproximadamente 3,6, aproximadamente 3,7, aproximadamente 3,8, aproximadamente 3,9, aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,1, aproximadamente 4,2, aproximadamente 4,3, aproximadamente 4,4, aproximadamente 4,5, aproximadamente 4,6, aproximadamente 4,7, aproximadamente 4,8, aproximadamente 4,9, aproximadamente 5, aproximadamente 5,2, aproximadamente 5,4, aproximadamente 5,5, aproximadamente 5,6, aproximadamente 5,8, aproximadamente 6, aproximadamente 6,2, aproximadamente 6,4, aproximadamente 6,5, aproximadamente 6,6, aproximadamente 6,8, aproximadamente 7, aproximadamente 7,3, aproximadamente 7,5, aproximadamente 7,7, aproximadamente 8, aproximadamente 8,5, aproximadamente 9, aproximadamente 9,5, aproximadamente 10 y aproximadamente 15 a 1.

35 En algunos aspectos, la invención comprende además conjugar la fracción efectora y la proteína en conjunto durante al menos aproximadamente 30 minutos. En algunos aspectos, la duración es de al menos aproximadamente 60 minutos. En algunos aspectos, la duración es de al menos aproximadamente 2 horas. En algún aspecto, la invención comprende además conjugar la fracción efectora y el anticuerpo entre aproximadamente 4 °C y aproximadamente 40 °C. En algún aspecto, la invención comprende además conjugar la fracción efectora y el anticuerpo entre aproximadamente 10 °C y aproximadamente 30 °C. En algún aspecto, la invención comprende además conjugar la fracción efectora y el anticuerpo entre aproximadamente 15 °C y aproximadamente 30 °C. En algunos aspectos, la reacción se lleva a cabo entre aproximadamente 18 °C y aproximadamente 25 °C. En algunos aspectos, la reacción se realiza a aproximadamente 22 °C. En algunos aspectos, la reacción se lleva a cabo aproximadamente a la temperatura ambiente.

- En algunos aspectos, la reacción de conjugación tiene lugar a entre aproximadamente pH 6,5 y aproximadamente pH 8,0. En algunos aspectos, la reacción de conjugación tiene lugar a entre aproximadamente pH 6,75 y aproximadamente pH 8,0. En algunos aspectos, la reacción de conjugación tiene lugar a aproximadamente pH 7,7. En algunos aspectos, la reacción de conjugación tiene lugar a aproximadamente pH 7. En algunos aspectos, la reacción de conjugación tiene lugar a aproximadamente pH 7,2. En algunos aspectos, la reacción de conjugación tiene lugar a aproximadamente pH 7,5. En algunos aspectos, la reacción de conjugación tiene lugar entre un rango de valores de pH, cuyo límite inferior se selecciona del grupo que consiste en 5,5, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 y 8, y cuyo límite superior se selecciona del grupo que consiste en 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,5 y 9.
- 5 En algunos aspectos, el pH puede estar por debajo de 6,5; esto puede ser particularmente útil en aplicaciones donde se requieren menos de aproximadamente 1,5 conjugaciones por anticuerpo. En algunos aspectos, el pH está entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 6,5.
- 10 En algunos aspectos, la concentración de sal puede estar por debajo de alrededor de 0,2M. La sal puede ser una sal de haluro (F, Cl, Br, I) y puede comprender un metal tal como Li, Na, K, Be, Mg, Ca. La sal puede ser NaCl. La sal puede ser KCl. Se pueden usar concentraciones de sal por encima de aproximadamente 0,1 M para limitar la velocidad y / o el número de conjugaciones por anticuerpo. La concentración de sal puede estar entre aproximadamente 0 y aproximadamente 0,1M. La concentración de sal puede estar entre aproximadamente 0 y aproximadamente 0,5M. La concentración de sal puede estar entre aproximadamente 0 y aproximadamente 0,3M.
- 15 En algunos aspectos, el procedimiento de la invención comprende formular el anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo en un tampón de formulación a aproximadamente pH 5,5. El tampón de formulación puede ser tampón de acetato sódico y trehalosa. Este tampón tiene la ventaja de no contener ninguna amina primaria y se presta bien de por sí al ajuste de pH. El anticuerpo puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 mg.ml<sup>-1</sup>. En algunos aspectos, el anticuerpo puede estar presente en una cantidad de 20 mg.ml<sup>-1</sup>.
- 20 El pH del tampón de formulación puede ajustarse a de aproximadamente pH 7,2 a aproximadamente pH 8,0; en algunas realizaciones, el tampón de formulación puede ajustarse a pH 7,7. El pH del tampón de formulación puede ajustarse con un tampón fosfato. El tampón fosfato puede estar a una concentración de entre aproximadamente 40 nM y aproximadamente 80 nM. El tampón fosfato puede estar en una concentración de entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 200 mM.
- 25 En algunos aspectos, la concentración de anticuerpo durante la reacción de conjugación con la fracción efectora / enlazador y el grupo saliente Z \* puede estar en un rango donde el límite inferior del rango se selecciona entre aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 30 y aproximadamente 40 mg.ml<sup>-1</sup>, y el límite superior del rango se selecciona del grupo que consiste en aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 60, aproximadamente 70, aproximadamente 70, aproximadamente 80, aproximadamente 90, aproximadamente 100, aproximadamente 150, aproximadamente 200, aproximadamente 500 mg.ml<sup>-1</sup>.
- 30 La fracción efectora (como péptido o ABP) puede reconstituirse a una concentración de al menos aproximadamente 2 mg.ml<sup>-1</sup>. La fracción efectora se puede reconstituir en una concentración de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 mg.ml<sup>-1</sup> en propilenglicol diluido antes de su uso y, en algunas realizaciones, puede estar a una concentración de 10 mg.ml<sup>-1</sup>.
- 35 La reacción de conjugación puede realizarse por combinación del anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo y la fracción efectora a una proporción molar de 4 moles de Fracción efectora respecto a 1 mol de anticuerpo, e incubación a de aproximadamente 18 °C a aproximadamente 25 °C durante de aproximadamente 2 a aproximadamente 24 horas. En algunas realizaciones, la reacción de conjugación entre el anticuerpo y la fracción efectora es a temperatura ambiente durante 2 horas. En algunas realizaciones, la reacción de conjugación es durante al menos aproximadamente 2 horas. En algunas realizaciones, la reacción de conjugación es de al menos aproximadamente 30 minutos.
- 40 La reacción puede inactivarse y ajustarse a de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,0. En algunas realizaciones, la reacción inactivada puede ajustarse a pH 5,5. Esto puede lograrse usando un tampón de succinato y glicina a, por ejemplo, aproximadamente pH 4,0. Este tampón tiene ventajas sobre otros tampones más comunes tales como TRIS, u otros tampones de aminoácidos. El succinato contribuye a limitar la agregación y la precipitación durante la diafiltración, que puede ser agresiva sobre la molécula conjugada, y la glicina contiene una amina primaria adicional (particularmente en los casos de MAC-1 y MAC-2).
- 45 La reacción puede concentrarse y la fracción efectora sin reaccionar (por ejemplo, péptido o ABP), especies relacionadas (tales como péptido en el que el enlazador se hidrolizó por reacción con disolvente acuoso) y otros elementos sin reaccionar de la mezcla de reacción (tales como PFP) pueden eliminarse por diafiltración, por ejemplo, usando una membrana de 50 kDa o una cromatografía de exclusión por tamaño en un tampón de succinato, glicina, cloruro sódico y trehalosa, pH 5,5 a 30 mg.ml<sup>-1</sup>.
- 50 En algunos aspectos de la divulgación, el procedimiento puede comprender conjugar una fracción efectora con a CLκ-K<sup>188</sup> (Según la numeración de Kabat). En algunos aspectos, la divulgación proporciona la conjugación de un péptido a un dominio λ de cadena ligera de un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo, que comprende sustituir una parte de la región CLλ con una parte correspondiente de una región CLκ, unir al péptido un enlazador que comprende un dejando el grupo Z \* como se define en el presente documento, y haciendo reaccionar dicho complejo de grupo péptido-enlazador saliente con el anticuerpo, caracterizado porque la región CLκ sustituida en el
- 55
- 60
- 65

anticuerpo comprende al menos los residuos 62-103 de las SEC ID NO: 15, 45, 46, o 47. En algunos aspectos, la región CLk comprende al menos los residuos 62-106 de las SEC ID NO: 15, 45, 46 o 47. En algunos aspectos, la región CLk comprende al menos los residuos 1-103 de las SEC ID NO: 15, 45, 46 o 47. En algunos aspectos, la región CLk comprende al menos los residuos 1-106 de las SEC ID NO: 15, 45, 46 o 47.

- 5 En algunos aspectos, la invención comprende conjugar un péptido con un dominio de cadena ligera de anticuerpo murino o parte de unión a antígeno del mismo, que comprende sustituir una parte de la región CL murina con una parte correspondiente de una región CLk humana, uniéndose al péptido un enlazador que comprende un grupo saliente Z \* como se define en el presente documento, y haciendo reaccionar dicho complejo de grupo péptido-enlazador saliente con el anticuerpo, caracterizado porque la región CLk humana sustituida en el anticuerpo  
10 comprende al menos los residuos 62-103 de las SEC ID NO: 15, 45, 46, o 47. En algunos aspectos, la región CLk humana comprende al menos los residuos 1-103 de SEQ ID NOs: 15, 45, 46 o 47. En algunos aspectos, la región CLk humana comprende al menos los residuos 1-106 de las SEQ ID NOs: 15, 45, 46 o 47. Estos aspectos pueden ser ventajosos, ya que Las regiones CLk no comprenden K<sup>188</sup> (La secuencia correspondiente en CLk murino es RHN; ver los residuos 79-81 de la SEC ID NO: 49).

### Composiciones farmacéuticas de la invención

- La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el MAC y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera de y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos,  
20 agentes retardantes de la absorción e isotónicos y similares, que sean fisiológicamente compatibles. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos, y pueden incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. Sustancias farmacéuticamente aceptables tales como humectantes o cantidades minoritarias de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que aumentan la vida útil o la eficacia del anticuerpo o porción de anticuerpo.

- Las composiciones de la presente invención pueden estar en una diversidad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infundibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo de administración deseado y de la aplicación terapéutica. Las composiciones típicas preferidas están en forma de soluciones inyectables o infundibles, tales como composiciones similares a las usadas para inmunización pasiva de seres humanos con anticuerpos en general. El modo de administración preferido es parental (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular). En una realización preferida, el anticuerpo se administra por infusión o inyección intravenosa. En otra realización preferida, el anticuerpo se administra por inyección intramuscular o subcutánea.

- La composición farmacéutica puede comprender además otro componente, tal como un agente antitumoral o un reactivo de formación de imágenes. Otro aspecto de la presente invención proporciona kits que comprenden MAC de la invención y composiciones farmacéuticas que comprenden estos anticuerpos. Un kit puede incluir, además del MAC o composición farmacéutica, agentes de diagnóstico o terapéuticos. Un kit también puede incluir instrucciones para su uso en un procedimiento de diagnóstico o terapéutico. En algunas realizaciones, el kit incluye el anticuerpo o una composición farmacéutica del mismo y un agente de diagnóstico. En otras realizaciones, el kit incluye el anticuerpo o una composición farmacéutica del mismo y uno o más agentes terapéuticos, tales como un agente antineoplásico, agente antitumoral o agente quimioterápico adicional.

- Estos agentes y compuestos de la invención pueden combinarse con vehículos farmacéuticamente aceptables tales como solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, y similares. El régimen de dosificación particular, es decir, dosis, momento de administración y repetición dependerán del individuo particular y de la historia médica del individuo.

- Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables, no son tóxicos para los destinatarios a las dosificaciones y concentraciones empleadas, y pueden comprender tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos, sales tales como cloruro sódico; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos, tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos de metales (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG).

- Se preparan liposomas que contienen compuestos de la invención por procedimientos conocidos en la técnica, tal como se describen en las Patentes de Estados Unidos N° 4.485.045 y 4.544.545. Se describen liposomas con un tiempo en circulación aumentado en la Patente de Estados Unidos N° 5.013.556. Pueden generarse liposomas particularmente útiles mediante el procedimiento de evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de un tamaño de poro definido para dar liposomas con el diámetro deseado.

Los principios activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y

microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20ª Ed., Mack Publishing (2000).

- 5 Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o 'poli(alcohol vinílico)), polilactidas (Patente de Estados Unidos N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y 7-  
10 étil-L-glutamato, acetato de etilvinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tal como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), acetato isobutirato de sacarosa y ácido poli-D(-)-3-hidroxi-butírico.

- 15 Las formulaciones a usar para la administración in vivo deben ser estériles. Esto se logra fácilmente, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles. Los compuestos terapéuticos de la invención se ponen generalmente en un recipiente que tiene un orificio de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

- 20 Pueden prepararse emulsiones adecuadas usando emulsiones de grasas disponibles en el mercado, tales como Intralipid™, Liposyn™, Infonutrol™, Lipofundin™ y Lipiphysan™. El principio activo puede disolverse en una composición en emulsión premezclada o, como alternativa, puede disolverse en un aceite (por ejemplo, aceite de soja, aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de maíz o aceite de almendra) y formarse una emulsión tras la mezcla con un fosfolípido (por ejemplo, fosfolípidos de huevo, fosfolípidos de la soja o lecitina de soja) y agua. Se apreciará que pueden añadirse otros ingredientes, por ejemplo, glicerol o glucosa, para ajustar la tonicidad de la emulsión. Las emulsiones adecuadas contendrán típicamente hasta el 20 % de aceite, por ejemplo, entre el 5 y el 20 %. La emulsión grasa puede comprender gotas de grasa de entre 0,1 y 1,0  $\mu\text{m}$ ,  
25 particularmente, 0,1 y 0,5  $\mu\text{m}$ , y tener un pH en el intervalo de 5,5 a 8,0,

Las composiciones en emulsión pueden ser las preparadas por mezcla de un compuesto de la invención con Intralipid™ o los componentes del mismo (aceite de soja, fosfolípidos del huevo, glicerol y agua).

- 30 Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en disolventes acuosos u orgánicos farmacéuticamente aceptables, o mezclas de los mismos, y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados como se ha expuesto anteriormente. En algunas realizaciones, las composiciones se administran por la vía respiratoria nasal u oral para un efecto local o sistémico. Las composiciones en disolventes farmacéuticamente aceptables preferentemente estériles pueden nebulizarse mediante el uso de gases. Las soluciones nebulizadas pueden respirarse directamente desde el dispositivo de nebulización o el dispositivo de nebulización puede estar unido a una mascarilla, tienda o respirador  
35 de presión positiva intermitente. Pueden administrarse composiciones en solución, suspensión o polvo, preferentemente por vía oral o por vía nasal, desde dispositivos que administran la formulación de una forma apropiada.

- 40 Los compuestos y composiciones de la invención se pueden usar junto con los tratamientos establecidos para la indicación relevante. Los ejemplos incluyen 5-fluorouracilo, irinotecán, oxilaplatino, cetuximab, sunitinib y rituximab para el tratamiento de trastornos angiogénicos en particular, especialmente el cáncer. Otros ejemplos incluyen ranibizumab, infliximab, adalimumab, natalizumab, omalizumab y palivizumab.

### Procedimientos terapéuticos de la invención

También se proporcionan por la invención procedimientos terapéuticos. Un procedimiento terapéutico comprende administrar un compuesto o composición de la invención a un sujeto que lo necesite.

- 45 La invención proporciona el uso de compuestos de la invención o composiciones farmacéuticas de la invención en un procedimiento de inhibición o reducción de la angiogénesis o para tratar o prevenir una enfermedad o síntoma asociado con un trastorno angiogénico. La invención proporciona procedimientos de inhibición o reducción de la angiogénesis o de tratamiento o prevención de una enfermedad o síntoma asociado con un trastorno angiogénico, que comprende administrar a un paciente una dosis terapéuticamente eficaz de compuestos y composiciones de la invención. También se proporcionan procedimientos de suministro o administración de compuestos y composiciones de la invención y procedimientos de tratamiento usando compuestos y composiciones de la invención. También se proporcionan procedimientos de tratamiento del cáncer que comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o composición farmacéutica de acuerdo con la invención. Como se usa en el presente documento, una afección mediada por la angiogénesis es una afección que está causada por una actividad de angiogénesis anormal o una en la que tienen utilidad terapéutica compuestos que modulan la actividad de angiogénesis. Las enfermedades y afecciones que pueden tratarse y/o diagnosticarse con compuestos y composiciones de la invención incluyen cáncer, artritis, hipertensión, enfermedad renal, psoriasis, angiogénesis del ojo asociada con trastorno ocular, infección o intervención quirúrgica, degeneración macular, retinopatía diabética y similares.

- 60 Más específicamente, los ejemplos del término "cáncer", cuando se usa en el presente documento en relación con la presente invención, incluyen cánceres de pulmón (NSCLC y SCLC), de cabeza y cuello, de ovario, de colon, de recto, de próstata, de la región anal, de estómago, de mama, de riñón o uréter, de pelvis renal, de glándula tiroidea, de vejiga, de cerebro, carcinoma de célula renal, carcinoma de, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, linfoma no Hodgkins, tumores de la médula espinal, carcinomas de orofaringe, hipofaringe, esófago, páncreas, hígado, vesícula biliar y conductos biliares, intestino delgado, tracto urinario; o linfoma o una combinación de uno o más de los cánceres anteriores. Aún más específicamente, los ejemplos del término "cáncer",  
65

cuando se usa en el presente documento en relación con la presente invención, incluyen cáncer seleccionado de cáncer pulmonar (NSCLC y SCLC), cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de próstata, cáncer de la región anal o una combinación de uno o más de los cánceres anteriores.

En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la invención se refieren a trastornos hiperproliferativos no cancerosos tales como, sin limitación, degeneración macular relacionada con la edad, reestenosis después de angioplastia y psoriasis. En otra realización, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas para el tratamiento de un mamífero que requiere la activación de IGF-1R y/o Ang2, en la que la composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo activador de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Pueden usarse composiciones farmacéuticas de la invención para tratar la osteoporosis, fragilidad o trastornos en los que el mamífero secreta demasiada poca hormona de crecimiento activa o es incapaz de responder a la hormona de crecimiento.

Como se usa en el presente documento, una "dosificación eficaz" o "cantidad eficaz" de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para ejercer uno o más de cualquier resultado deseado o beneficioso. Para uso profiláctico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad o retrasar el desenlace de la enfermedad, incluyendo síntomas bioquímicos, histológicos y/o conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. Para uso terapéutico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados clínicos tales como reducción del tamaño tumoral, de la propagación, de la vasculatura de los tumores, o de uno o más síntomas de cáncer u otras enfermedades asociadas con una angiogénesis aumentada, disminución de la dosis de otras medicaciones necesarias para tratar la enfermedad, aumento del efecto de otra medicación y/o retraso de la progresión de la enfermedad en pacientes. Puede administrarse una dosificación eficaz en una o más administraciones. Para los fines de la presente invención, una dosificación eficaz de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para lograr el tratamiento profiláctico o terapéutico directa o indirectamente. Como se entiende en el contexto clínico, una dosificación eficaz de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica puede o no conseguirse junto con otro fármaco, compuesto o composición farmacéutica. Por lo tanto, una "dosificación eficaz" puede considerarse en el contexto de la administración de uno o más agentes terapéuticos, y puede considerarse que un solo agente se administra en una cantidad eficaz si, junto con uno o más agentes distintos, puede conseguirse o se consigue un resultado deseable.

Un "individuo" o un "sujeto" es un mamífero, más preferentemente un ser humano. Los mamíferos también incluyen, pero sin limitación, animales de granja, animales deportivos, mascotas, primates y caballos.

Ventajosamente, la administración terapéutica de compuestos de la invención da como resultado una disminución de la angiogénesis y/o en el caso de cánceres, la estabilización o reducción del volumen tumoral. Preferentemente, el volumen tumoral es al menos aproximadamente un 10 % o aproximadamente un 15 % menor que antes de la administración de un MAC de la invención. Más preferentemente, el volumen tumoral es al menos aproximadamente un 20 % menor que antes de la administración del MAC. Aún más preferentemente, el volumen tumoral es al menos un 30 % menor que antes de la administración del MAC. Ventajosamente, el volumen tumoral es al menos un 40 % menor que antes de la administración del MAC. Más ventajosamente, el volumen tumoral es al menos un 50 % menor que antes de la administración del MAC. Muy preferentemente, el volumen tumoral es al menos un 60 % menor que antes de la administración del MAC. Más preferentemente, el volumen tumoral es al menos un 70 % menor que antes de la administración del MAC.

La administración de compuestos de la invención de acuerdo con el procedimiento de la presente invención puede ser continua o intermitente dependiendo, por ejemplo, del estado fisiológico del destinatario, de si el propósito de la administración es terapéutico o profiláctico, y de otros factores conocidos por los expertos en la materia. La administración de un compuesto de la invención puede ser esencialmente continua durante un periodo de tiempo preseleccionado o puede ser en una serie de dosis separadas en el tiempo.

### Anticuerpos

Una "inmunoglobulina" es una molécula tetramérica. En una inmunoglobulina natural, cada tetrámero está compuesto de 2 pares de cadenas polipeptídicas idénticas, cada par tiene una "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígenos. La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante responsable principalmente de la función efectora. Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras  $\kappa$  y  $\lambda$ . Las cadenas pesadas se clasifican como  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ , y definen el isotipo del anticuerpo como IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, respectivamente. Dentro de las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variable y constante están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, y la cadena pesada también incluye una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. Las regiones variables de cada par de cadenas ligeras / pesadas forman el sitio de unión del anticuerpo de modo que una inmunoglobulina intacta tiene 2 sitios de unión.

Las cadenas de inmunoglobulina exhiben la misma estructura general de regiones marco relativamente conservadas (FR) unidas por 3 regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes de complementariedad o CDR. Las CDR de las 2 cadenas de cada par están alineadas por las regiones marco, lo que permite la unión a un epítipo específico. Desde el extremo N al extremo C, tanto las cadenas ligeras como las pesadas comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio está de acuerdo con las definiciones de Secuencias de Kabat de proteínas de interés inmunológico (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991)).

La identidad de los residuos de aminoácidos en un anticuerpo particular que constituye una CDR se puede determinar usando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, las CDR de anticuerpos pueden identificarse como las regiones hipervariables definidas originalmente por Kabat et al (Kabat et al., 1992, Secuencias de

proteínas de interés inmunológico, 5ª ed., Servicio de salud pública, NIH, Washington D.C.). Las posiciones de las CDR también pueden identificarse como las estructuras de bucle estructurales originalmente descritas por Chothia y otros (Chothia et al., 1989, Nature 342: 877-883). Otros enfoques para la identificación de CDR incluyen la "definición de AbM", que es un compromiso entre Kabat y Chothia y se deriva utilizando el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular (ahora Accelrys®), o la "definición de contacto" de las CDR basadas en los contactos de antígenos observados, establecido en MacCallum et al., 1996, J. Mol. Biol., 262: 732-745. En otro enfoque, referido aquí como la "definición conformacional" de las CDR, las posiciones de las CDR pueden identificarse como los residuos que hacen contribuciones entálpicas a la unión del antígeno (Makabe et al., 2008, Journal of Biological Chemistry, 283: 1156-1166). Es posible que otras definiciones de límites de CDR no sigan estrictamente uno de los enfoques anteriores, pero que sin embargo se superpongan con al menos una parte de las CDR de Kabat, aunque pueden acortarse o alargarse a la ligera de la predicción o hallazgos experimentales de que residuos o grupos de residuos en particular o incluso las CDR completas no tienen un impacto significativo en la unión del antígeno. Como se usa en el presente documento, una CDR puede referirse a las CDR definidas por cualquier enfoque conocido en la técnica, incluidas combinaciones de enfoques. Los métodos utilizados en este documento pueden utilizar CDR definidas de acuerdo con cualquiera de estos enfoques. Para cualquier realización dada que contenga más de una CDR, las CDR (u otro residuo del anticuerpo) pueden definirse de acuerdo con cualquiera de las definiciones de Kabat, Chothia, extendidas, AbM, de contacto y / o conformacionales.

Tal como se usa en el presente documento, a ciertos residuos se les ha asignado su numeración Kabat; así, K<sup>188</sup>-CLK se refiere al residuo 188 de la cadena ligera kappa de acuerdo con la numeración de Kabat, contando desde el principio de la cadena ligera kappa. Se aprecia que la numeración del residuo puede alterarse dependiendo de la convención de numeración específica aplicada.

Un "anticuerpo" se refiere a una inmunoglobulina intacta o a una porción de unión a antígeno de la misma que compite con el anticuerpo intacto para la unión específica. Las porciones de unión a antígeno pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante o mediante escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Las porciones de unión al antígeno incluyen, entre otros, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, dAb, y fragmentos determinantes de la complementariedad (CDR), anticuerpos de cadena única (scFv), anticuerpos quiméricos, diacuerpos y polipéptidos que contienen al menos una porción de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir un antígeno específico al polipéptido. Un fragmento Fab es un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; un fragmento F(ab')<sub>2</sub> es un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd consiste en los dominios VH y CH1; un fragmento Fv consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; y un fragmento de dAb consiste en un dominio VH o un dominio VL (por ejemplo, humano, camélido o tiburón).

En general, las referencias a anticuerpos deben interpretarse como que también se refieren a las porciones de unión a antígeno de los mismos, y en particular, a las porciones de unión a antígeno de los mismos que comprenden al menos K<sup>188</sup> de CLK.

Un anticuerpo de cadena única (scFv) es un anticuerpo en el que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes a través de un conector sintético que les permite fabricarse como una cadena de proteína única. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, biespecíficos, en los que los dominios VH y VL se expresan en una sola cadena polipeptídica, pero utilizando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los 2 dominios en la misma cadena, lo que obliga a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y creando 2 sitios de unión al antígeno. Una o más CDR pueden incorporarse en una molécula covalentemente o no covalentemente para convertirla en una inmuno adhesina. Una inmuno adhesina puede incorporar la (s) CDR (s) como parte de una cadena polipeptídica más grande, puede enlazar covalentemente la (s) CDR (s) a otra cadena polipeptídica, o puede incorporar la (s) CDR (s) de manera no covalente. Las CDR permiten que la inmuno adhesina se una específicamente a un antígeno particular de interés.

Un anticuerpo puede tener uno o más sitios de unión. Si hay más de un sitio de enlace, los sitios de enlace pueden ser idénticos entre sí o pueden ser diferentes. Por ejemplo, una inmunoglobulina natural tiene 2 sitios de unión idénticos, un anticuerpo de cadena única o fragmento Fab tiene un sitio de unión, mientras que un anticuerpo "biespecífico" o "bifuncional" tiene 2 sitios de unión diferentes.

Un "anticuerpo aislado" es un anticuerpo que (1) no está asociado con componentes asociados de forma natural, incluidos otros anticuerpos asociados de forma natural, que lo acompañan en su estado nativo, (2) está libre de otras proteínas de la misma especie, (3) es expresado por una célula que no expresa naturalmente el anticuerpo, o es expresado por una célula de una especie diferente, o (4) no ocurre en la naturaleza.

El término "anticuerpo humano" incluye todos los anticuerpos que tienen una o más regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. En algunas realizaciones de la presente invención, todos los dominios variables y constantes del anticuerpo anti-IGF1R se derivan de secuencias de inmunoglobulina humana (un anticuerpo completamente humano). Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo derivado de una especie no humana, en el que ciertos aminoácidos en el marco y los dominios constantes de las cadenas pesada y ligera se han mutado para evitar o anular una respuesta inmune en los humanos. Alternativamente, un anticuerpo humanizado puede producirse fusionando los dominios constantes de un anticuerpo humano a los dominios variables de una especie no humana.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que contiene una o más regiones de un anticuerpo y una o más regiones de uno o más anticuerpos.

El término "epítipo" incluye cualquier proteína determinante capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o receptor de células T. Los determinantes epítipicos generalmente consisten en grupos de moléculas químicamente activas en la superficie, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar, y por lo general tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características específicas de carga. Se

dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando la constante de disociación es  $<1 \mu\text{M}$ , preferiblemente  $<100 \text{ nM}$  y más preferiblemente:  $<10 \text{ nM}$ .

El término conjugado de anticuerpo multifuncional, o MAC, se refiere a un anticuerpo como se define en el presente documento, o parte de unión a antígeno del mismo, conjugado covalentemente a al menos una fracción efectora que se une a un objetivo. La fracción efectora puede ser un péptido, molécula pequeña, proteína, molécula de ácido nucleico, toxina, aptámero, o anticuerpo de unión a antígeno o fragmento de la misma. Las referencias a la conjugación de péptidos y similares a las que se hace referencia a lo largo de la memoria descriptiva generalmente se aplican a la conjugación a proteínas y anticuerpos (de unión a antígeno) o fragmentos de las mismas. La unión entre la fracción efectora y el anticuerpo (o fragmento del mismo) puede ser un enlace covalente. En algunas realizaciones en las que la fracción efectora es una proteína o péptido, la fracción efectora puede fusionarse al extremo N o C de una de las cadenas de anticuerpos. Por fusionado, se entiende que la fracción efectora y el anticuerpo se fusionan por medio de un enlace peptídico entre sus respectivos esqueletos peptídicos. En algunos aspectos, la fracción efectora se conjuga covalentemente con el anticuerpo a través de un enlazador y no se fusiona a través de enlaces peptídicos que conectan los 2 pilares del péptido.

En algunas realizaciones, los MAC de la invención comprenden anticuerpos anti-IGF1R humanizados. Los MAC de la invención pueden comprender anticuerpos anti-IGF1R completamente humanos mediante la introducción de genes de inmunoglobulina humana en un roedor, de modo que el roedor produzca anticuerpos completamente humanos. También se proporcionan anticuerpos anti-IGF1R completamente humanos. Se espera que los anticuerpos anti-IGF1R completamente humanos minimicen las respuestas inmunogénicas y alérgicas intrínsecas a los anticuerpos monoclonales derivatizados de ratón o ratón (Mabs) y, por lo tanto, aumenten la eficacia y seguridad de los anticuerpos administrados. Se puede esperar que el uso de anticuerpos completamente humanos proporcione una ventaja sustancial en el tratamiento de enfermedades humanas crónicas y recurrentes, como la inflamación y el cáncer, que pueden requerir la administración repetida de anticuerpos. En otra realización, la invención proporciona un MAC que comprende un anticuerpo anti-IGF1R que no se une al complemento.

Los métodos para producir anticuerpos anti-IGF1R para uso en la invención se describen en WO02053596 y WO2005016967, los cuales se incorporan aquí por referencia.

En algunas realizaciones, no hay más de 10 cambios de aminoácidos en las regiones VH o VL del anticuerpo anti-IGF1R mutado en comparación con el anticuerpo anti-IGF1R antes de la mutación. En algunas realizaciones, no hay más de 5 cambios de aminoácidos en las regiones VH o VL del anticuerpo anti-IGF1R mutado. No puede haber más de 3 cambios de aminoácidos. En otras realizaciones, no hay más de 15 cambios de aminoácidos en los dominios constantes. No puede haber más de 10 cambios de aminoácidos en los dominios constantes. No puede haber más de 5 cambios de aminoácidos en los dominios constantes.

Además, se pueden crear anticuerpos de fusión en los que 2 (o más) anticuerpos de cadena única están vinculados entre sí. Esto es útil si uno quiere crear un anticuerpo divalente o polivalente en una sola cadena polipeptídica, o si quiere crear un anticuerpo biespecífico.

Un tipo de anticuerpo derivado se produce mediante la reticulación de 2 o más anticuerpos (del mismo tipo o de diferentes tipos; por ejemplo, para crear anticuerpos biespecíficos). Los reticuladores adecuados incluyen aquellos que son heterobifuncionales, que tienen 2 grupos claramente reactivos separados por un espaciador apropiado (por ejemplo, éster de m-maleimidobenzil-N-hidroxisuccinimida) u homobifuncionales (por ejemplo, suberato de disuccinimidilo).

Otro tipo de anticuerpo derivado es un anticuerpo marcado. Agentes de detección útiles con los que se puede derivar un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención incluyen compuestos fluorescentes, que incluyen fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, 5-dimetilamina-1-naftalensulfonilo cloruro, ficoeritrina, fosfato de lantano y similares. Un anticuerpo también puede marcarse con enzimas que son útiles para la detección, tales como peroxidasa de rábano picante, galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa y similares. Cuando un anticuerpo se marca con una enzima detectable, se detecta agregando reactivos adicionales que la enzima utiliza para producir un producto de reacción que se puede discernir. Por ejemplo, cuando está presente el agente peroxidasa de rábano picante, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina conduce a un producto de reacción coloreado, que es detectable. Un anticuerpo también puede marcarse con biotina y detectarse mediante la medición indirecta de la unión de avidina o estreptavidina. Un anticuerpo puede estar marcado con un agente magnético, como el gadolinio. Un anticuerpo también puede estar marcado con un epítipo polipeptídico predeterminado reconocido por un informador secundario (por ejemplo, secuencias de par de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas de epítipo). En algunas realizaciones, las etiquetas están unidas por brazos espaciadores de varias longitudes para reducir el potencial impedimento estérico.

El anticuerpo también puede derivatizarse con un grupo químico tal como polietilenglicol (PEG), un grupo metilo o etilo, o un grupo carbohidrato. Estos grupos pueden ser útiles para mejorar las características biológicas del anticuerpo, p. Ej. para aumentar la semivida sérica o para aumentar la unión al tejido.

### Anticuerpos Catalíticos

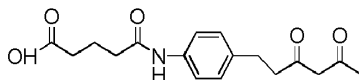
En algunos aspectos de la invención, el MAC comprende un anticuerpo catalítico, o parte de unión a antígeno del mismo. En algunos aspectos, el anticuerpo puede ser un anticuerpo aldolasa.

Los contenidos de US2006205670 se incorporan aquí por referencia, en particular los párrafos - [0233], que describen anticuerpos, fragmentos útiles y variantes y modificaciones de los mismos, sitios de combinación y CDR, preparación de anticuerpos, expresión, humanización, modificación de aminoácidos, glicosilación, ADCC, CDC, aumento de la vida media en suero de los anticuerpos, vectores de expresión, sistemas hospedadores de mamíferos

y plegamiento, entre otros elementos de la tecnología de anticuerpos.

"Sitio de combinación", como se usa en el presente documento, (también conocido como el sitio de unión del anticuerpo) se refiere a la región de los dominios de inmunoglobulina o Ig que se combinan (o pueden combinar) con el determinante de un antígeno apropiado (o una proteína estructuralmente similar). El término generalmente incluye las CDR y los residuos del marco adyacente que están involucrados en la unión al antígeno.

"Anticuerpos frente a aldolasa" como se usa en el presente documento, se refiere a anticuerpos que contienen porciones de sitio de combinación que, cuando no están comprometidas (por ejemplo, por conjugación), catalizan una reacción de adición aldólica entre un donante de cetona alifática y un aceptor de aldehído. Los anticuerpos aldolasa se pueden generar mediante la inmunización de un animal con respuesta inmunitaria con un inmunógeno que incluye un hapteno de 1,3 dicetona de fórmula:



acoplado a una proteína portadora, y caracterizado además por tener una lisina con un grupo  $\epsilon$ -amino reactivo en el sitio de combinación del anticuerpo. Los anticuerpos aldolasa se caracterizan además por su actividad catalítica sujeta a inhibición con el hapteno 1,3-dicetona por formación de un complejo entre el hapteno 1,3-dicetona y el grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina del anticuerpo catalítico.

Como se ha tratado anteriormente, en ciertas realizaciones, ciertos anticuerpos que pueden usarse para hacer MAC, composiciones y muestras de la invención pueden comprender una cadena lateral reactiva en el sitio de combinación de anticuerpos. Una cadena lateral reactiva puede estar presente naturalmente o puede colocarse en un anticuerpo por mutación. El residuo reactivo del sitio de combinación del anticuerpo puede asociarse con el anticuerpo, como cuando el residuo está codificado por el ácido nucleico presente en la célula linfocítica identificada por primera vez para producir el anticuerpo. Alternativamente, el residuo de aminoácido puede surgir al mutar intencionalmente el ADN para codificar el residuo particular. El residuo reactivo puede ser un residuo no natural que surge, por ejemplo, por incorporación biosintética utilizando un codón único, ARNt y aminoacil-ARNt como se discute aquí. En otro enfoque, el residuo de aminoácido o sus grupos funcionales reactivos (por ejemplo, un grupo amino nucleófilo o un grupo sulfhidrilo) se pueden unir a un residuo de aminoácido en el sitio de combinación del anticuerpo. Por lo tanto, el enlace covalente con el anticuerpo que se produce "a través de un residuo de aminoácido en un sitio de combinación de un anticuerpo" como se usa en este documento significa que el enlace puede ser directamente a un residuo de aminoácido de un sitio de combinación de anticuerpo o a través de un resto químico que está vinculado a una cadena lateral de un residuo de aminoácido de un sitio de combinación de anticuerpos. En algunas realizaciones, el aminoácido es cisteína, y el grupo reactivo de la cadena lateral es un grupo sulfhidrilo. En otras realizaciones, el residuo de aminoácido es lisina, y el grupo reactivo de la cadena lateral es el grupo  $\epsilon$ -amino. En algunas realizaciones, el aminoácido es K<sup>93</sup>. En la cadena pesada según la numeración de Kabat. En algunas realizaciones, el aminoácido es K<sup>99</sup> en el HC h38C2 de acuerdo con el empañamiento de las SEQ ID NO: 52 y 54.

Los anticuerpos catalíticos son una fuente de anticuerpos con sitios de combinación adecuados que comprenden una o más cadenas laterales de aminoácidos reactivos. Dichos anticuerpos incluyen anticuerpos aldolasa, anticuerpos beta lactamasa, anticuerpos esterasa y anticuerpos amidasa.

Una realización comprende un anticuerpo aldolasa tal como los anticuerpos monoclonales de ratón mAb 33F12 y mAb 38C2 (cuyas VL y VH comprenden la SEC ID NO: 56 y 57), así como versiones adecuadamente quiméricas y humanizadas de dichos anticuerpos (por ejemplo, h38C2IgG1: SEC ID NO: 51 y 52 y h38C2-IgG2: SEC ID NO: 53 y 54). El mAb 38C2 de ratón (y h38C2) tiene una lisina reactiva cerca de HCDR3 pero fuera de ella, y es el prototipo de una nueva clase de anticuerpos catalíticos que fueron generados por la inmunización reactiva y que imitan mecánicamente las enzimas de la aldolasa natural. Otros anticuerpos catalíticos de aldolasa que pueden usarse incluyen los anticuerpos producidos por el hibridoma 85A2, que tiene el número de acceso de ATCC PTA-1015; hibridoma 85C7, con número de acceso ATCC PTA-1014; hibridoma 92F9, con número de acceso ATCC PTA-1017; hibridoma 93F3, con número de acceso ATCC PTA-823; hibridoma 84G3, con número de acceso ATCC PTA-824; hibridoma 84G11, con número de acceso ATCC PTA-1018; hibridoma 84H9, que tiene número de acceso ATCC PTA-1019; hibridoma 85H6, con número de acceso ATCC PTA-825; Hibridoma 90G8, con número de acceso ATCC PTA-1016. A través de una lisina reactiva, estos anticuerpos catalizan reacciones aldólicas y retro-aldólicas utilizando el mecanismo de enamina de las aldolasas naturales.

Los compuestos de la invención también pueden formarse uniendo un agente de direccionamiento a una cisteína reactiva, como los que se encuentran en los sitios de combinación de los anticuerpos catalíticos de tioesterasa y esterasa. Los anticuerpos que contienen aminoácidos reactivos pueden prepararse por medios bien conocidos en la técnica, incluida la mutación de un anticuerpo del sitio de combinación para codificar el aminoácido reactivo o derivar químicamente una cadena lateral de aminoácido en un sitio de combinación de anticuerpos con un enlazador que contiene el grupo reactivo

El anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado. Cuando los compuestos de la invención se unen covalentemente al sitio de combinación de un anticuerpo, y tales anticuerpos se humanizan, es importante que dichos anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad de enlace para el grupo W. Se contemplan diversas formas de anticuerpos de aldolasa murina humanizados. Una realización utiliza el anticuerpo catalítico de la aldolasa humanizado h38c2 IgG1 o h38c2 Fab con dominios constantes humanos C<sub>K</sub> y C<sub>V1</sub>1. Se usaron la línea germinal humana DPK9 gen V<sub>K</sub> y JK4 deel gen de J<sub>K</sub> como marcos para la humanización del dominio variable de la cadena ligera kappa de m38c2, y el gen de la línea germinal humana DP-47 y JH4 del gen J<sub>H</sub> se usaron como marcos para la humanización del dominio variable de cadena pesada de m38c2. La FIGURA 18C ilustra una alineación de secuencia entre las cadenas ligeras y pesadas variables en m38c2, h38c2 y líneas germinales humanas. h38c2 puede utilizar los dominios constantes de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, incluyendo cualquiera de sus alotipos. Otra



realización utiliza un anticuerpo quimérico que comprende los dominios variables ( $V_L$  y  $V_H$ ) de h38c2 (SEQ ID NOS: 55 y 56) y los dominios constantes de un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 que comprende  $K^{188}$ -CLK. El anticuerpo puede ser un anticuerpo de longitud completa, Fab, Fab',  $F(ab')_2$ ,  $F_{vdsF_{vscF_v}}$ ,  $V_H$ ,  $V_L$ , diacuerpo o minicuerpo que comprende los dominios  $V_H$  y  $V_L$  desde h38c2. El anticuerpo puede ser un anticuerpo que comprende la  $V_L$  y  $V_H$  dominios de h38c2 y un dominio constante seleccionado del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. El anticuerpo puede ser h38C2 IgG1 (SEC ID N°: 51 y 52). El anticuerpo puede ser h38C2 IgG2 (SEQ ID NO: 53 y 54). El anticuerpo puede ser una versión humanizada de un anticuerpo de aldolasa murina que comprende una región constante de un anticuerpo humano IgG, IgA, IgM, IgD o IgE. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico que comprende la  $V_L$  y  $V_H$  región de un anticuerpo de aldolasa murina (por ejemplo, SEQ ID NO: 57 y 58) y una región constante de un anticuerpo IgG, IgA, IgM, IgD o IgE humana. En realizaciones adicionales, el anticuerpo es una versión completamente humana de un anticuerpo de aldolasa murina que comprende una secuencia polipeptídica de un anticuerpo natural o nativo humano IgG, IgA, IgM, IgD o IgE.

También se contemplan diversas formas de fragmentos de anticuerpos de aldolasa humanizados. Una realización utiliza h38c2  $F(ab')_2$ . h38c2  $F(ab')_2$  Puede ser producido por la digestión proteolítica de h38c2 IgG1. Otra realización utiliza un scFv h38c2 que comprende la  $V_L$  y  $V_H$  dominios de h38c2 que están conectados opcionalmente por el enlazador intermedio  $(Gly_4Ser)_3$  (SEQ ID NO: 59). Como alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras la inmunización (o inmunización reactiva en el caso de anticuerpos catalíticos) de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena.

Como se usa en el presente documento, "farmacocinética" se refiere a la concentración de un compuesto administrado en el suero a lo largo del tiempo. La farmacodinámica se refiere a la concentración de un compuesto administrado en tejidos diana y no diana a lo largo del tiempo y los efectos sobre el tejido diana (por ejemplo, la eficacia) y el tejido no diana (por ejemplo, la toxicidad). Las mejoras en, por ejemplo, la farmacocinética o la farmacodinámica pueden diseñarse para un agente de direccionamiento o agente biológico particular, como el uso de enlaces lábiles o la modificación de la naturaleza química de cualquier enlace (por ejemplo, cambio de solubilidad, carga y similares). El término " $k_{off}$ " se refiere a la constante de velocidad de disociación para la disociación de un anticuerpo del complejo anticuerpo / antígeno. El término " $K_d$ " se refiere a la constante de disociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno.

En algunas realizaciones, la porción de anticuerpo anti-IGF1R del MAC tiene una selectividad para IGF1R que es al menos 50 veces mayor que su selectividad para el receptor de insulina. En algunas realizaciones, la selectividad de la porción de anticuerpo anti-IGF1R del MAC es más de 100 veces mayor que su selectividad para el receptor de insulina. En algunas realizaciones, la porción de anticuerpo anti-IGF1R del MAC no muestra ninguna unión específica apreciable a ninguna otra proteína distinta de IGF1R.

En algunos aspectos de la invención, el MAC se une a IGF1R con alta afinidad. En algunas realizaciones, el MAC se une a IGF1R con una  $K_d$  de  $1 \times 10^{-8}$  M o menos. En algunas realizaciones, el MAC se une a IGF1R con una  $K_d$  o  $1 \times 10^{-9}$  M o menos. En algunas realizaciones, el MAC se une a IGF1R con una  $K_d$  o  $5 \times 10^{-11}$  M o menos. En algunas realizaciones, el MAC se une a IGF1R con una  $K_d$  o  $1 \times 10^{-11}$  M o menos.

En algunos aspectos de la invención, el MAC tiene una tasa de disociación baja de IGF1R. En una realización, el MAC tiene una  $K_{off}$  de  $1 \times 10^4$  s<sup>-1</sup> o bajo. En algunas realizaciones, la  $K_{off}$  es  $5 \times 10^5$  s<sup>-1</sup> o bajo.

En algunos aspectos, la invención proporciona sales, estereoisómeros, tautómeros, solvatos y profármacos farmacéuticamente aceptables de compuestos, muestras, composiciones y composiciones farmacéuticas de la invención.

### Enlazadores de anticuerpos catalíticos

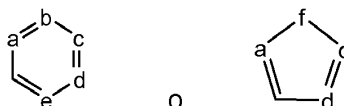
Ciertos enlazadores adecuados para conectar agentes de direccionamiento al sitio de combinación de anticuerpos catalíticos (enlazadores de anticuerpos catalíticos: enlazadores CA) se describen en US2009098130, cuyos contenidos se incorporan en el presente documento por referencia. El término "agentes de direccionamiento" se usa en el presente documento para distinguir el término "fracción efectora", pero es evidente que los tipos de moléculas unidas al final de un enlazador CA o un enlazador MAC pueden ser intercambiables. En particular, aspectos del documento US2009098130 perteneciente a las fórmulas generales que describen los enlazadores (CA-), la estructura específica del enlazador (CA-), la síntesis de los enlazadores (CA-) y las combinaciones de diferentes elementos de P, Q y W, y (en este caso se clasifican como grupos X, Y y Z) respectivamente) como se describe de manera específica y general, aquí se incluyen.

El enlazador CA puede ser lineal o ramificado CA, y opcionalmente incluye uno o más grupos carbocíclicos o heterocíclicos. La longitud del conector CA se puede ver en términos del número de átomos lineales, con los restos cíclicos como los anillos aromáticos y similares que se contarán tomando la ruta más corta alrededor del anillo. En algunas realizaciones, el enlazador CA tiene un estiramiento lineal de entre 5 y 15 átomos, en otras realizaciones 15 a 30 átomos, en otras realizaciones más de 30 a 50 átomos, en otras realizaciones de 50 a 100 átomos y en otras realizaciones más 100-200 átomos. Otras consideraciones sobre el enlazador CA incluyen el efecto sobre las propiedades físicas o farmacocinéticas del compuesto resultante, como la solubilidad, lipofilia, hidrofiliidad, hidrofobicidad, estabilidad (más o menos estable y degradación planificada), rigidez, flexibilidad, inmunogenicidad y modulación de unión de anticuerpos, la capacidad de incorporarse en una micela o liposoma, y similares.

En algunos aspectos, el enlazador de CA puede estar unido covalentemente a la cadena lateral del residuo de enlace TA. El enlazador puede comprender la fórmula: P-Q-W; en donde P es una cadena de conexión biológicamente compatible que incluye cualquier átomo seleccionado del grupo que consiste en C, H, N, O, P, S, F, Cl, Br e I, y puede comprender un polímero o copolímero de bloque, y es covalente unido al residuo de enlace (a través de la cadena lateral, el extremo amino o el extremo carboxilo, según corresponda) donde el enlazador es

lineal, Q es un grupo de reconocimiento opcionalmente presente que comprende al menos una estructura de anillo; y W es un resto de unión que comprende un enlace covalente a una cadena lateral de aminoácido en un sitio de combinación de un anticuerpo.

Cuando está presente, Q puede tener la estructura opcionalmente sustituida:



5 en donde a, b, c, d y e son independientemente carbono o nitrógeno; f es carbono, nitrógeno, oxígeno o azufre; Q está unido a P y W independientemente en cualquiera de las 2 posiciones de anillo de valencia suficiente; y no más de 4 de a, b, c, d, e o f son simultáneamente nitrógeno y preferiblemente a, b, c, d, y e en la estructura del anillo son cada uno carbono. En algunos aspectos, Q puede ser fenilo. Aunque no desea estar limitado por ninguna teoría, se cree que el grupo Q puede ayudar a posicionar el grupo reactivo en un sitio de combinación de anticuerpos adecuado para que el grupo W pueda reaccionar con una cadena lateral de aminoácidos reactiva.

10 El conector de CA se puede diseñar de manera que contenga un grupo reactivo capaz de formar un enlace covalente o no covalente con una macromolécula, como un anticuerpo, proteína o fragmento de la misma. El grupo reactivo se elige para usar con un residuo reactivo en un sitio de combinación particular. Por ejemplo, un resto químico para la modificación por un anticuerpo de aldolasa puede ser una cetona, dicetona, betalactámico, halocetona éster activa, lactona, anhídrido, maleimida, alfa-haloacetamida, ciclohexil dicetona, epóxido, aldehído, amidina, guanidina, imina, enamina, fosfato, fosfonato, epóxido, aziridina, tioepóxido, dicetona enmascarada o protegida (cetal por ejemplo), lactama, halocetona, aldehído y similares.

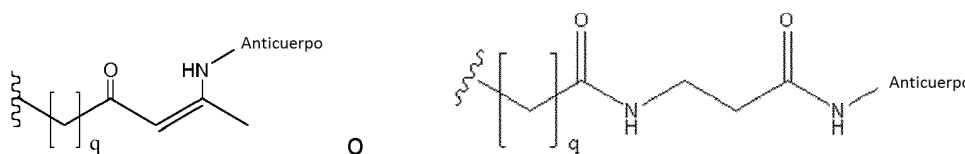
15 En algunas realizaciones, W, antes de la conjugación con la cadena lateral de un residuo en el sitio de combinación de un anticuerpo, incluye uno o más grupos C = O dispuestos para formar una azetidina, una dicetona, una acil beta-lactama, un éster activo, una halocetona, un grupo ciclohexil dicetona, un aldehído, una maleimida, un alqueno activado, un alquino activado o, en general, una molécula que comprende un grupo saliente susceptible de desplazamiento nucleófilo o electrófilo. Otros grupos pueden incluir una lactona, un anhídrido, una alfa-haloacetamida, una imina, una hidrazida o un epóxido. Los grupos reactivos electrófilos de engarce ejemplares que pueden unirse covalentemente a un grupo nucleófilo reactivo (por ejemplo, una cadena lateral de lisina o cisteína) en un sitio de combinación de anticuerpo incluyen acil beta-lactama, dicetona simple, éster activo de succinimida, maleimida, haloacetamida con enlazador, halocetona, ciclohexil dicetona, aldehído, amidina, guanidina, imina, enamina, fosfato, fosfonato, epóxido, aziridina, tioepóxido, una dicetona enmascarada o protegida (un cetal por ejemplo), lactama, sulfonato y similares, grupos C = O enmascarados, tales como como iminas, cetales, acetales y cualquier otro grupo electrofílico conocido. En ciertas realizaciones, el grupo reactivo incluye uno o más grupos C = O dispuestos para formar una acil beta-lactama, dicetona simple, éster activo de succinimida, maleimida, haloacetamida con enlazador, halocetona, ciclohexil dicetona o aldehído. W puede ser un alquilo sustituido, cicloalquilo sustituido, arilo sustituido, arilalquilo sustituido, heterociclilo sustituido o heterociclilalquilo sustituido, en el que al menos un sustituyente es un resto 1,3-diketona, un acil-beta-lactama, un éster activo, una alfa halocetona, un aldehído, una maleimida, una lactona, un anhídrido, una alfa-haloacetamida, una amina, una hidrazida o un epóxido. En algunos aspectos, el grupo W está unido covalentemente a un armazón de macromoléculas que puede proporcionar una mayor vida media a los péptidos de la invención. En algunos aspectos, el grupo W, si está presente, está enlazado covalentemente al sitio de combinación de un anticuerpo.

20 En algunos aspectos, antes de la conjugación (por ejemplo, con el sitio de combinación de un anticuerpo), W tiene la estructura:



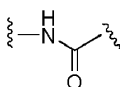
25 en donde q = 0-5. q puede ser 1 o 2. q puede ser 1. En otros aspectos, q puede ser 2.

En algunos aspectos, después de la conjugación con el sitio de combinación de anticuerpos, W tiene la estructura:

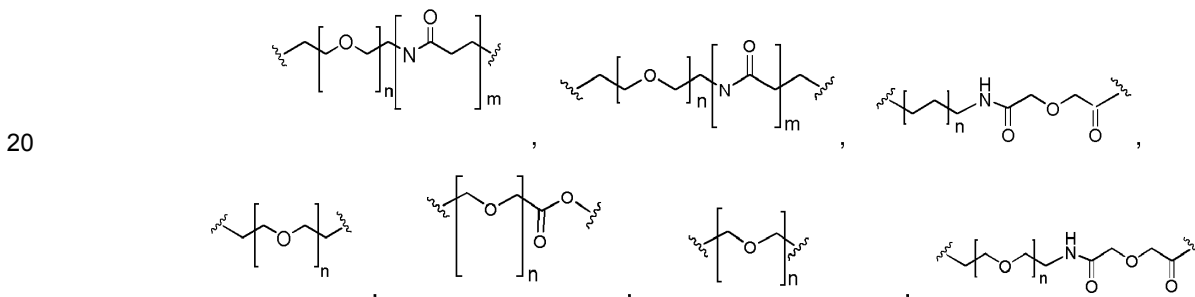


30 en la que q = 0-5 y el Anticuerpo-N- es un enlace covalente a una cadena lateral en un sitio de combinación de un anticuerpo. q puede ser 1 o 2. q puede ser 1. En otros aspectos, q puede ser 2.

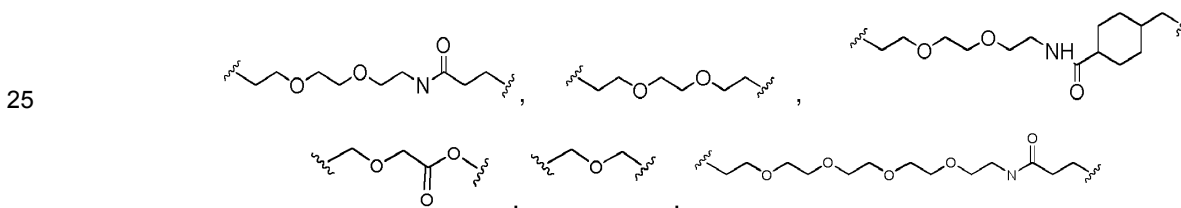
P puede ser un grupo que comprende tres componentes; Pp-Ps-Py, en donde Pp es un grupo específicamente adaptado para ser combinable con el agente de direccionamiento, Ps es una región espaciadora del grupo P, y Py es un grupo adaptado para unirse al grupo W. En algunos aspectos, Py se selecciona de un enlace amida, un enlace enamina o un enlace guanidinio. Py puede seleccionarse para proporcionar una molécula de hidrógeno adyacente (dentro de dos átomos) al grupo Q. Si bien no desea limitarse a ninguna teoría, se cree que el átomo de H puede ayudar al reconocimiento del grupo Q de una bolsa hidrófoba a través de la interacción del enlace H, particularmente con respecto a la bolsa hidrófoba de la hendidura de unión de un anticuerpo catalítico, como h38C2. Por lo tanto, el enlace amida, por ejemplo, puede estar orientado de tal manera que el grupo NH esté directamente unido al grupo Q, proporcionando la H del grupo NH para el enlace de hidrógeno. Alternativamente, el grupo C = O de una amida se puede unir al grupo Q, con la H del grupo NH aproximadamente 2 átomos adyacentes al grupo Q, pero todavía está disponible para el enlace H. En algunas realizaciones, Py está ausente. En algunas realizaciones, el grupo Py tiene la fórmula:



En algunos aspectos, Ps se selecciona de tal manera que Ps no proporciona ningún grupo demasiado reactivo. Se puede seleccionar Ps para proporcionar una longitud total de los grupos P de entre 2-15 átomos. Se puede seleccionar Ps para que la longitud total del grupo P esté entre 2 y 10 átomos. Las X pueden seleccionarse de modo que la longitud total del grupo P sea de 4-8 átomos. Se puede seleccionar Ps para que la longitud total del grupo P sea de 5 átomos. Se puede seleccionar Ps para que la longitud total del grupo P sea de 6 átomos. En algunos aspectos, Ps puede comprender una de las siguientes fórmulas:



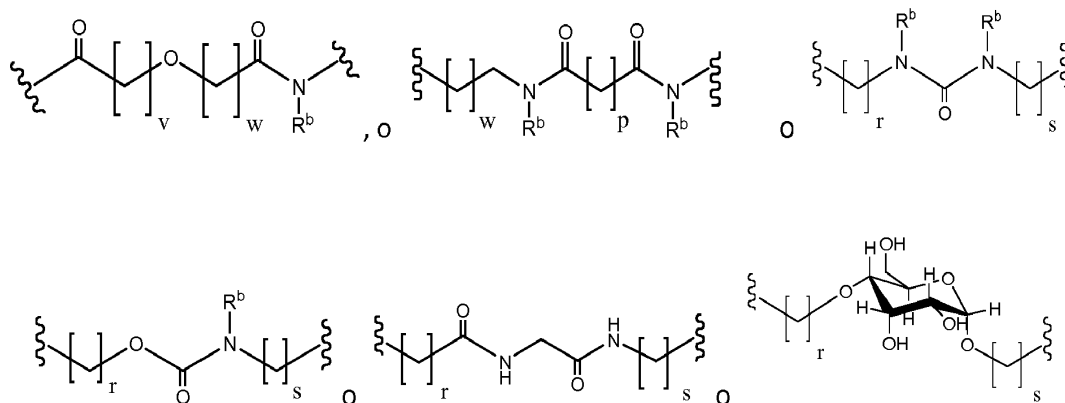
donde n = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, y m está presente o ausente; n puede ser 1, 2, 3, 4, 5 o 6; n puede ser 1, 2, 3 o 4; n puede ser 1; n puede ser 2; n puede ser 3; n puede ser 4. En algunos aspectos, Ps comprende una de las siguientes fórmulas:



Lo ideal es seleccionar Pp para permitir una estrategia de enlace covalente direccional específica al residuo de enlace de una molécula de dirección (residuo de enlace TA), como un péptido, proteína, molécula pequeña, ácido nucleico o aptámero. Por ejemplo, cuando el residuo de enlace TA comprende un grupo nucleófilo, Pp puede ser un grupo electrófilo y viceversa. Por ejemplo, si la cadena lateral del residuo de unión a TA comprende un grupo amina, tal como K, H, Y, ortinina, Dap o Dab, Xp puede ser COOH u otro electrófilo similarmente reactivo. Si el residuo de unión a TA es D o E, Pp puede comprender un grupo nucleófilo, tal como un grupo amina. Cualquiera de estas estrategias permite que se forme un enlace covalente entre el grupo Pp y el residuo de unión a TA mediante estrategias de formación de enlaces amida. Cuando el grupo de enlace TA es un grupo amina, Pp puede comprender la fórmula:

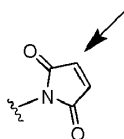


P puede ser un polímero o copolímero de bloque biológicamente compatible opcionalmente presente. P puede ser de la estructura:

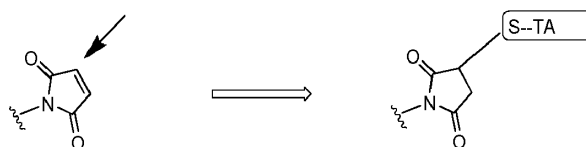


5 en donde p es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 32, 43, 44 o 45; w, r, v s son cada uno independientemente 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20; y R<sup>segundo</sup> en cada caso es independientemente hidrógeno, C sustituido o no sustituido.<sup>1-10</sup> alquilo, sustituido o no sustituido<sup>3-7</sup> cicloalquil-C<sub>0-6</sub> alquilo, o aril-C sustituido o no sustituido<sub>0-6</sub> alquilo

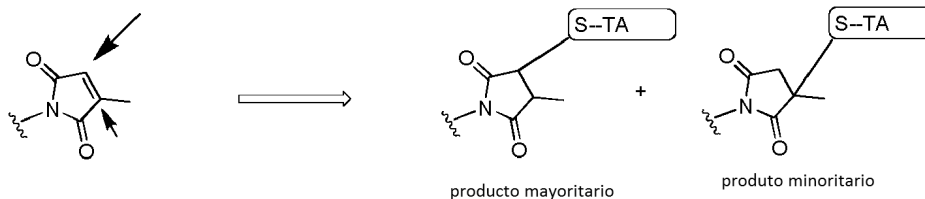
10 Cuando el residuo de unión a TA es C, homólogos de C u otros residuos que contienen grupos tiol, Pp puede comprender un grupo maleimida (o similar) que permita una estrategia de reacción de adición de tiol-maleimida para enlazar covalentemente el grupo Pp a la unión TA residuo. En algunos aspectos, Pp también puede comprender un grupo tiol, permitiendo que se forme un puente disulfuro entre el residuo de unión a TA y el grupo Pp. En algunos aspectos, Pp puede ser maleimida:



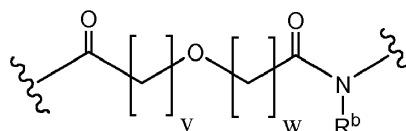
15 en el que la flecha indica el punto de unión a la molécula objetivo y la línea paralela representa la unión al grupo Q del enlazador. Cuando el punto de unión a la molécula objetivo comprende un residuo de cisteína u otra cadena lateral que contiene tiol, el mecanismo de conjugación puede ser el siguiente:



En algunos aspectos, el grupo Pp comprende una maleimida sustituida:

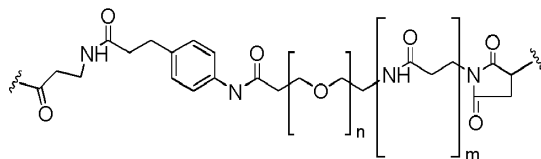


20 En algunos aspectos, P es



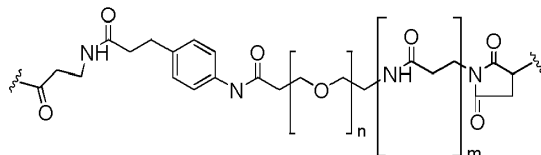
en donde v y w se seleccionan de tal manera que la longitud del esqueleto de X sea de 6-12 átomos;

En algunos aspectos, el TA-enlazador es de la fórmula:



en donde n = 1, o 2, o 3, o 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10; n puede ser 1, 2, 3, 4, 5 o 6; n puede ser 1; n puede ser 2; n puede ser 3; n puede ser 4. M puede estar ausente. M puede estar presente. En algunos aspectos, TA-enlazador es de la fórmula:

5



en donde n = 1, o 2, o 3, o 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10; n puede ser 1, 2, 3, 4, 5 o 6; n puede ser 1; n puede ser 2; n puede ser 3; n puede ser 4. M puede estar ausente. M puede estar presente.

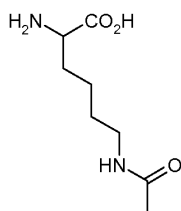
10

En algunos aspectos, la porción P de los enlazadores CA puede usarse como la porción de enlazadores Y, X-Y, Y-Z y X-Y-Z para un MAC de la invención.

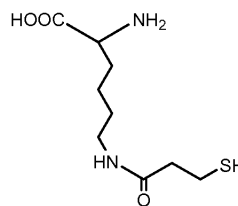
### Péptidos y Proteínas

Acil lisina, o

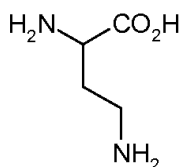
Kac (también AcK) se refiere a:



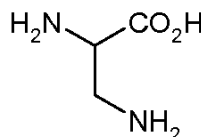
K(SH) se refiere a:



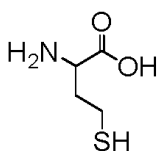
Acido diaminobutírico (Dab)



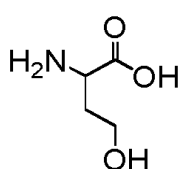
Acido diaminopropiónico (Dap)



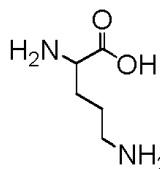
Homocisteína



Homoserina



Ornitina



15

20

25

En general las nomenclaturas usadas en relación con, y las técnicas de cultivo celular y tisular, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química de proteínas y ácidos nucleicos e hibridación descritas en el presente documento son aquellas bien conocidas y usadas comúnmente en la técnica. Los procedimientos y técnicas de la presente invención se realizan en general de acuerdo con procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y analizan a lo largo de toda la presente memoria descriptiva a menos que se indique otra cosa. Como se usan en el presente documento, los 20 aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente para referirse a un polímero de restos aminoacídicos. Como se usan en el presente documento, estos términos son aplicables a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos aminoacídicos son un análogo químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente. Estos términos también son aplicables a polímeros de aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos pueden estar en forma L o D siempre que se mantenga la unión y otras características deseadas del péptido. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico.

A menos que se indique otra cosa mediante un prefijo "D", por ejemplo, D-Ala o N-Me-D-Ile, o escrito en formato de minúsculas, por ejemplo, a, i, l, (versiones D de Ala, Ile, Leu), la estereoquímica del carbono alfa de los aminoácidos y restos aminoácido en péptidos descritos en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas es la configuración natural o "L".

5 Todas las secuencias peptídicas se escriben de acuerdo con la convención aceptada en general por la que el resto aminoacídico  $\alpha$ -N-terminal está a la izquierda y el resto aminoacídico  $\alpha$ -C-terminal está a la derecha. Como se usa en el presente documento, la expresión "extremo N-terminal" se refiere al grupo  $\alpha$ -amino libre de un aminoácido en un péptido, y la expresión "extremo C-terminal" se refiere al extremo  $\alpha$ -ácido carboxílico libre de un aminoácido en un péptido. Un péptido que está N-terminado con un grupo se refiere a un péptido que lleva un grupo en el nitrógeno alfa-amino del resto aminoacídico N-terminal. Un aminoácido que está N-terminado con un grupo se refiere a un aminoácido que lleva un grupo en el nitrógeno  $\alpha$ -amino.

Como se usa en el presente documento, "halo", "halógeno" o "haluro" se refiere a F, Cl, Br o I.

15 Como se usa en el presente documento, "actividad biológica" se refiere a las actividades *en vivo* de un compuesto, composición u otra mezcla, o respuestas fisiológicas que resultan de *en vivo* Administración de un compuesto, composición u otra mezcla. La actividad biológica, por lo tanto, abarca los efectos terapéuticos, los efectos de diagnóstico y la actividad farmacéutica de tales compuestos, composiciones y mezclas. El término "biológicamente activo" o "funcional" se refiere a un polipéptido que exhibe al menos una actividad que es característica o similar a un agente de dirección AA.

20 El término "biológicamente compatible" como se usa en este documento significa algo que es biológicamente inerte o no reactivo con moléculas biológicas intracelulares y extracelulares, y no tóxico.

La frase "alquilo sustituido" se refiere a un grupo alquilo en el que uno o más enlaces a un carbono (s) o hidrógeno (s) se reemplazan por un enlace a átomos que no son hidrógeno y no carbono, como, entre otros, un átomo de halógeno en haluros tales como F, Cl, Br e I; un átomo de oxígeno en grupos tales como grupos hidroxilo, grupos alcoxi, grupos ariloxi y grupos éster; un átomo de azufre en grupos tales como grupos tiol, grupos sulfuro de alquilo y arilo, grupos sulfona, grupos sulfonilo y grupos sulfóxido; un átomo de nitrógeno en grupos tales como aminas, amidas, alquilaminas, dialquilaminas, arilaminas, alquilamilaminas, diarilaminas, N-óxidos, imidas y enaminas; un átomo de silicio en grupos tales como en grupos triarilsililo, grupos dialquilarilsililo, grupos alquildiarilsililo y grupos triarilsililo; y otros heteroátomos en otros grupos. Los grupos alquilo sustituidos también incluyen grupos en los que uno o más enlaces a un átomo de carbono (s) o hidrógeno (s) se reemplazan por un enlace a un heteroátomo tal como oxígeno en grupos carbonilo, carboxilo y éster; nitrógeno en grupos tales como iminas, oximas, hidrazonas y nitrilos. Los grupos alquilo sustituidos incluyen, entre otros, grupos alquilo en los que uno o más enlaces a un átomo de carbono o hidrógeno están reemplazados por uno o más enlaces a átomos de flúor. Un ejemplo de un grupo alquilo sustituido es el grupo trifluorometilo y otros grupos alquilo que contienen el grupo trifluorometilo. Otros grupos alquilo incluyen aquellos en los que uno o más enlaces a un átomo de carbono o hidrógeno se reemplazan por un enlace a un átomo de oxígeno, de modo que el grupo alquilo sustituido contiene un grupo hidroxilo, alcoxi, ariloxi o heterociclioxi. Todavía otros grupos alquilo incluyen grupos alquilo que tienen una amina, alquilamina, dialquilamina, arilamina, (alquil) (aril) amina, diarilamina, heterocicliamina, (alquil) (heterocicliil) amina, (aril) (heterocicliil) amina, o diheterocicliilamina grupo.

40 La frase "alquilo no sustituido" se refiere a un grupo alquilo divalente no sustituido como se define anteriormente. Así, metileno, etileno y propileno son ejemplos de alquilenos no sustituidos. La frase "alquilo sustituido" se refiere a un grupo alquilo divalente sustituido como se definió anteriormente. Los grupos alquilenos inferiores sustituidos o no sustituidos tienen de 1 a aproximadamente 6 carbonos.

45 La frase "cicloalquilo no sustituido" se refiere a grupos alquilo cíclicos tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo y tales anillos sustituidos con grupos alquilo de cadena lineal y ramificada como se definió anteriormente. La frase también incluye grupos alquilo policíclicos tales como, pero no limitados a, adamantil norbornilo y biciclo [2.2.2] octilo y similares, así como tales anillos sustituidos con grupos alquilo de cadena lineal y ramificada como se definió anteriormente. Por lo tanto, la frase incluiría grupos metilciclohexilo entre otros. La frase no incluye grupos alquilo cíclicos que contienen heteroátomos. Los grupos cicloalquilo no sustituidos pueden estar unidos a uno o más átomos de carbono, átomo (s) de oxígeno, átomo (s) de nitrógeno y / o átomo (s) de azufre en el compuesto original. En algunas realizaciones, los grupos cicloalquilo no sustituidos tienen de 3 a 20 átomos de carbono. En otras realizaciones, dichos grupos alquilo no sustituidos tienen de 3 a 8 átomos de carbono, mientras que en otras, dichos grupos tienen de 3 a 7 átomos de carbono.

55 La frase "cicloalquilo sustituido" tiene el mismo significado con respecto a los grupos cicloalquilo no sustituidos que los grupos alquilo sustituidos tienen con respecto a los grupos alquilo no sustituidos. Por lo tanto, la frase incluye, pero no se limita a, grupos oxociclohexilo, clorociclohexilo, hidroxiciclohexilo y clorometilciclohexilo.

### **Descripción detallada de las figuras**

60 Figura 1A: Alineamientos de las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas de los anticuerpos 2.12.1 y 2.12.1.fx, con la secuencia de consenso para la región variable mostrada. Figura 1B: alineamientos de las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras de los anticuerpos 2.12.1 y 2.12.1.fx con la secuencia de consenso para la región variable mostrada. Las CDR están subrayadas y las regiones constantes se muestran en cursiva. Las secuencias de los anticuerpos 2.12.1 y 2.12.1.fx se desvelaron previamente en los documentos WO2005016967 y WO2005016967.

65 Figura 2: El análisis del peso molecular intacto de MAC por espectrometría de masas demuestra que múltiples péptidos se unen al anticuerpo anti-IGF-1R 2.12.1.fx. Figura 2A: datos de espectrometría de masas del anticuerpo anti-IGF-1R 2.12.1.fx. Figura 2B-2D: datos de espectrometría de masas de MAC-2, que muestran experimentos repetidos de tres lotes individuales.

Figure 3: Datos de espectrometría de masas de 2.12.1.fx (IGF-1R) y 3 lotes de MAC-2 (MAC) en los que se han reducido los enlaces disulfuro. Figura 3A: Datos de espectrometría de masas de 2.12.1.fx 2.12.1.fx (IGF-1R), cadena ligera. Figura 9B: Datos de espectrometría de masas de 2.12.1.fx (IGF-1R), cadena pesada. Figura 9C: datos de espectrometría de masas de cadena ligera de MAC-2, lote 1. Figura 3D: datos de espectrometría de masas de cadena pesada de MAC-2, lote 1. Figura 3E: datos de espectrometría de masas de cadena ligera de MAC-2, lote 2. Figura 3F: datos de espectrometría de masas de cadena pesada de MAC-2, lote 2. Figura 3G: datos de espectrometría de masas de cadena ligera de MAC-2, lote 3. Figura 9H: datos de espectrometría de masas de cadena pesada de MAC-2, lote 3.

Figure 4A: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo 2.12.1.fx con los sitios de escisión por quimotripsina señalados con puntos. Los fragmentos quimotrípticos que contienen un residuo de Lys (sitio de conjugación potencial) se marcan con el número N del término. El fragmento Y15 de la cadena ligera está subrayado. Figura 4B: secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo 2.12.1.fx con sitios de escisión de quimotripsina anotados con balas. Los fragmentos quimotrípticos que contienen un residuo de Lys (sitio de conjugación potencial) se marcan con el número N del término.

Figure 5A: Datos de espectrometría de masas de un péptido que contiene lisina:Y15 de cadena ligera conjugado, que muestra datos de espectrometría de masas para el anticuerpo anti-IGF-1R no conjugado 2.12.1.fx (IGF-1r) y MAC-2 (MAC), así como una representación del fragmento Y15. Figura 5B: Datos de espectrometría de masas de un fragmento de cadena ligera no conjugado Y15, que muestra datos de espectrometría de masas para el anticuerpo anti-IGF-1R no conjugado 2.12.1.fx (IGF-1r) y MAC-2 (MAC), así como una representación del fragmento Y15.

Figura 6A: Los datos de cromatograma de CLEM de ión seleccionado para el péptido tríptico de 2.12.1.fx. Figura 6B: Los datos de cromatograma de CLEM de ión seleccionado para el fragmento tríptico cuando K<sup>188</sup> está modificado con ABP de MAC-2.

Figure 7A: Los datos de cromatograma de CLEM de ión seleccionado para el péptido tríptico de 2.12.1.fx. Figura 15B: Los datos de cromatograma de CLEM de ión seleccionado para el péptido tríptico cuando K<sup>190</sup> está modificado con ABP de MAC-2.

Figura 8: Espectros de masas de MAC-2 intacto.

Figura 9A: Espectros de masas de cadena pesada reducida para MAC-2. Figura 9B: Espectros de masas de cadena ligera reducida para MAC-2.

Figure 10: ELISA de unión a Ang1-4. Gráfica representativa de la unión de MAC a miembros de la familia de Ang (Ang1-4).

Figure 11: ELISA de competición con Ang2. Gráfica representativa de la competición con la unión de Ang2 al receptor de Tie2 para MAC.

Figure 12: ELISA de competición con IGF-1R. Gráfica representativa de la competición con la unión de IGF-1 a IGF-1R para MAC.

Figure 13: Inhibición de la autofosforilación de IGF-1R inducida por IGF-1 por MAC en células 3T3-hIGF-1R.

Figura 14A: Volumen tumoral de xenoinjertos de adenocarcinoma de colon Colo205 después del tratamiento con vehículo, Ang2-h38c2, anticuerpo contra IGF-1R (2.12.1.fx) o MAC-2 (IP, 1x/sem). Los datos se representan como la media y ET de n = 10/grupo para los días 0-28 (n = 10 para todos los grupos más allá del día 28). \*: P < 0,05, anticuerpo contra IGF1R (2.12.1.fx) 10 mg/kg frente a MAC-2 10 mg/kg; \*\*: P < 0,01, Ang2-h38C2 frente a MAC-2; Anova de dos factores, post-prueba de Bonferroni. Figura 14B: Niveles de expresión de IGF-1R relativos en lisados preparados a partir de tumores escindidos y congelados.

Figura 15A: Volumen tumoral de xenoinjertos de adenocarcinoma de colon Colo205 después del tratamiento IP semanal con vehículo o MAC-2 (IP, 1x/sem, 0,3-10 mg/kg). Los datos se representan como la media y ET de n = 10/grupo. \*\*\*: P < 0,001, PBS frente a MAC-2 (todas las dosis); Anova de dos factores, post-prueba de Bonferroni.

Figura 15B: Pesos tumorales finales a Día 28. Figura 15C: Densidad de microvasos tumorales de xenoinjertos de adenocarcinoma de colon Colo205 después del tratamiento con vehículo o MAC-2 (IP, una vez por semana).

Figura 15D: Niveles de expresión de Ang2 relativos en lisados preparados a partir de tumores escindidos y congelados. Figura 15E: Niveles de expresión de IGF-1R relativos en lisados preparados a partir de tumores escindidos y congelados.

Figura 16A: volumen tumoral de xenoinjertos de adenocarcinoma de colon Colo205 después de un tratamiento IP semanal con vehículo, Ang2-h38c2 (10 mg / kg), anticuerpo IGF1R (2.12.1.fx) (10 mg / kg) o MAC-2 (1, 3 o 10 mg / kg). Figura 16B: Volumen tumoral de xenoinjertos de adenocarcinoma de colon Colo205 después del tratamiento IP una vez por semana con vehículo, anticuerpo contra IGF-1R (2.13.2) (10 mg/kg) o MAC-2 (10 mg/kg). Figura 22C: Volumen tumoral de xenoinjertos de adenocarcinoma de colon Colo205 después del tratamiento IP una vez por semana con vehículo, Ang2-h38c2 (10 mg/kg), anticuerpos contra IGF1R (2.12.1.fx y 2.13.2) (10 mg/kg), MAC-2 (1, 3 o 10 mg/kg) o Ang2-h38c2 (10 mg/kg) en combinación con 2.12.2.fx o 2.13.2 (10 mg/kg). Todos los datos se representan como la media y ET de n = 10/grupo.

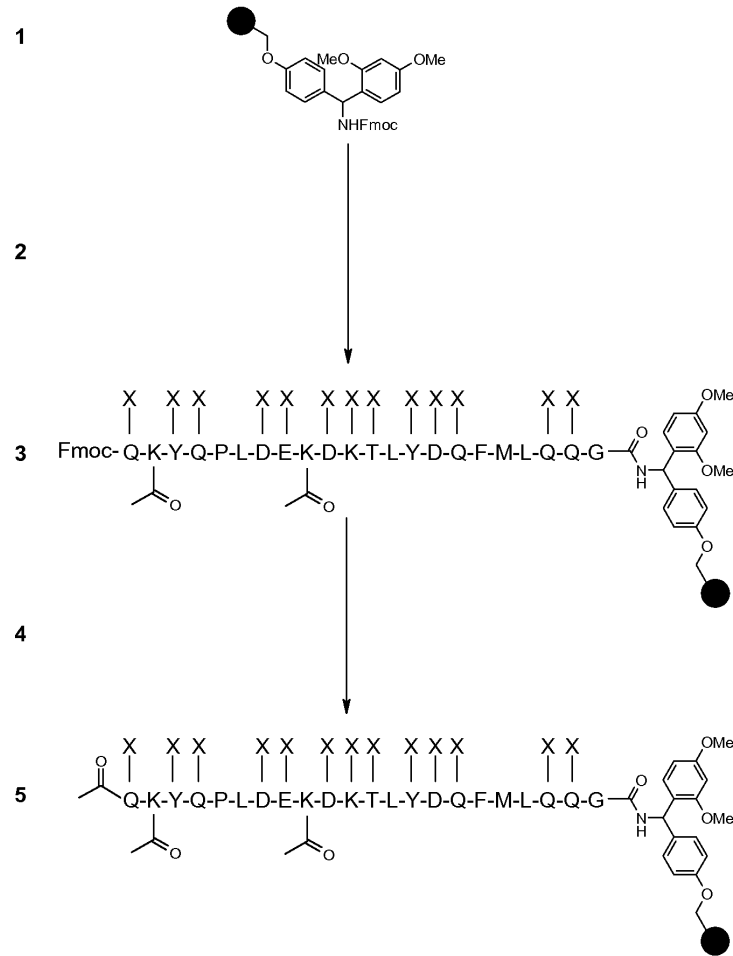
Figura 17: Volumen tumoral de melanoma MDA-MB-435 después del tratamiento semanal con vehículo o MAC-2 (IP, una vez por semana). \*\*: P < 0,05, PBS frente a MAC-2, 20mg/kg; \*\*\*: P < 0,01 PBS frente a Ang2-h38c2, 10 mg/kg o MAC-2, 3 mg/kg; Anova de dos factores, post-prueba de Bonferroni. Los datos se representan como la media y ET de n = 10/grupo.

Figura 18A: alineación de la secuencia de aminoácidos de los dominios variables de m38c2, h38c2 y líneas germinales humanas. Las regiones marco (FR) y las regiones determinantes de complementariedad (CDR) se definen de acuerdo con Kabat *et al.* Los asteriscos marcan diferencias entre m38c2 y h38c2 o entre h38c2 y las líneas germinales humanas. Figura 18B: Alineación de la secuencia de aminoácidos de la región kappa de la cadena ligera constante murina (mCLk), la región kappa de la cadena ligera constante humana (hCLk) y la región lambda de la cadena ligera constante humana (hCLλ). Diferencias entre mCLk y hCLk; y entre hCLk y hCLλ; se muestran como asteriscos, y las subestaciones conservadas se muestran como cruces.

Para que esta invención pueda entenderse mejor, se exponen los siguientes ejemplos. Estos ejemplos solo tienen fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención de ninguna manera.

**Ejemplos**

**Ejemplo 1 Síntesis de Péptidos usados en la invención**



Resina de amida de Rink

- 5 Etapas para SPPS usando química de Fmoc: (i) Eliminación de Fmoc con piperidina al 20 %/DMF; (ii) Acoplamiento de aminoácidos; la proporción de HBTU:Aminoácido:HOBt:NMM respecto a la carga de amina de la resina es de 5:5:5:20, El disolvente usado era NMP, (iii) Etapas repetidas para cada acoplamiento de aminoácido. X = grupo protector de cadena lateral inestable a ácido.

Ensamblaje completado de péptido unido a resina totalmente protegido:

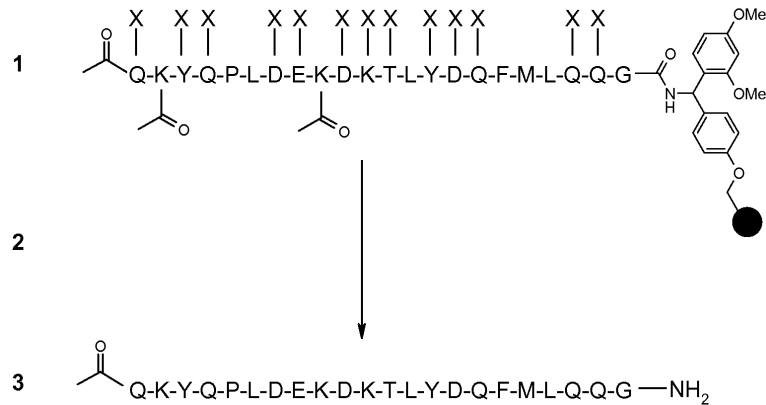
- 10 (i) Eliminación de Fmoc con piperidina al 20 %/DMF, (ii) Acetilación: anhídrido acético/NMM/NMP.

Ensamblaje completado de péptido unido a resina protegido N-acetilado.

**Esquema 1.** Síntesis en fase sólida de una cadena peptídica usando química de Fmoc (ejemplificada con un péptido de unión a Ang2 típico (ABP), SEQ ID NO: 27)



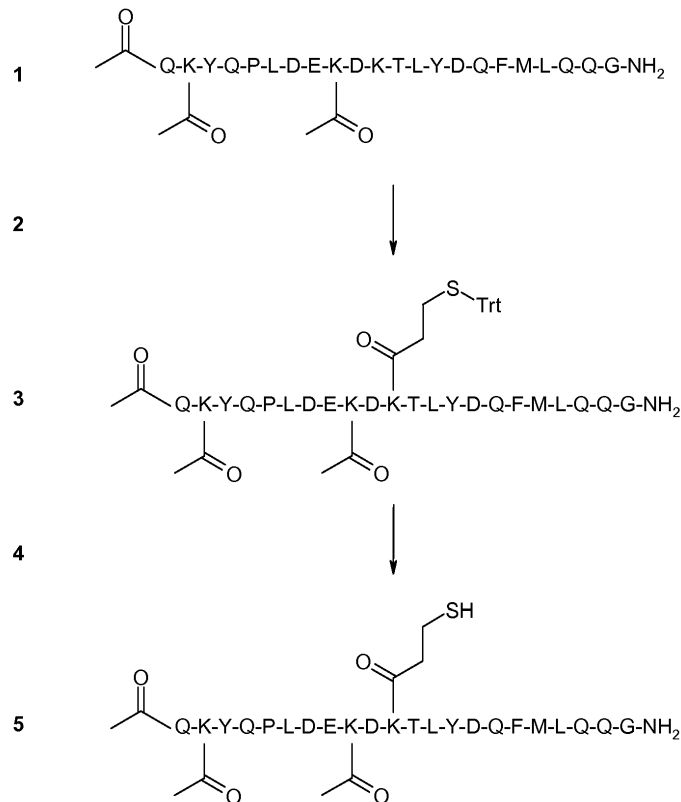
**Ejemplo 2: Escisión de la resina del péptido preparado como en el EJEMPLO 1.**



1. Ensamblaje completado de péptido unido a resina protegido N-acetilado.
2. TFA/agua/fenol/triisopropilsilano (90:4:4:2).

5 **Esquema 2: Escisión de ABP (SEQ ID NO: 27) de la resina.**

**Ejemplo 3 Síntesis de ABP de compuestos de ABP-tiol-enlazador**



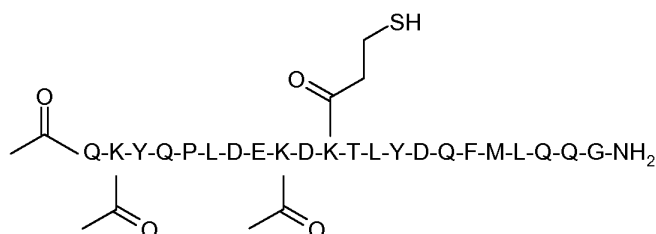
1. Péptido de unión a Ang2.
2. Ácido S-tritil-mercaptopropiónico/HBTU/NMM (proporción 5:5:10 con respecto al péptido Ang2).
3. Intermedio peptídico de Ang2 con tiol protegido con tritilo.
4. TFA/DCM/TIPS (proporción 5:93:2).
5. Péptido modificado Ang2 que lleva tiol.

**Esquema 3: Síntesis de ABP-1-ti (3.3) (SEQ ID NO: 27 con K<sup>11</sup> sustituido con resto de unión K(SH)).**

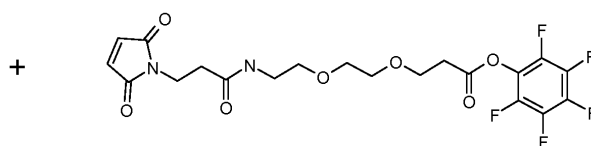
Se sintetizaron análogos de un péptido de unión a Ang-2 (ABP) con diferentes puntos de unión (véanse los Ejemplos 1 y 2). Inicialmente, el intermedio de ABP con tiol libre se sintetizó y se purificó y después se añadió un enlazador de maleimida-PEG2-PFP, seguido de una etapa de purificación final para obtener un ABP activado con PFP puro. El ensamblaje y la escisión de la cadena peptídica se llevaron a cabo como se resume en los esquemas 1 y 2 para generar el ABP puro.

El ABP (284 mg, 0,1 mmol) se disolvió en dimetilformamida (0,5 ml) con agitación. Por separado, se agitó ácido S-tritil-mercaptopropiónico (MPA, 62 mg, aproximadamente 0,125 mmol), HBTU (48 mg, 0,125 mmol) y N-metilmorfolina (0,025 ml, 0,25 mmol) en DMF (0,5 ml) durante 5 min hasta su disolución. La solución de ABP y las soluciones de MPA activado se mezclaron entre sí durante 2 h. El progreso de la reacción se controló mediante CLEM. Después de 2 h, la solución se añadió lentamente a éter helado (40 ml) para precipitar el producto ABP-S-tritil-MPA. El precipitado blanco se recogió por filtración y después se secó. El resto sólido se disolvió después en una solución de ácido trifluoroacético en diclorometano (1:10, 10 ml), añadiéndose triisopropilsilano (TIPS) (0,050 ml) y se agitó durante 1 h. La solución se evaporó a presión reducida hasta un aceite amarillo claro, después el péptido con tiol bruto se precipitó por adición de éter helado. El producto se recogió por centrifugación y se secó al vacío. El resto se disolvió en acetonitrilo acuoso al 50 %, después se liofilizó para dar el péptido con tiol bruto (pureza de aproximadamente el 80 % por análisis de HPLC). El péptido con tiol bruto se purificó por HPLC semipreparativa para dar 145 mg de SEQ ID NO: 27.

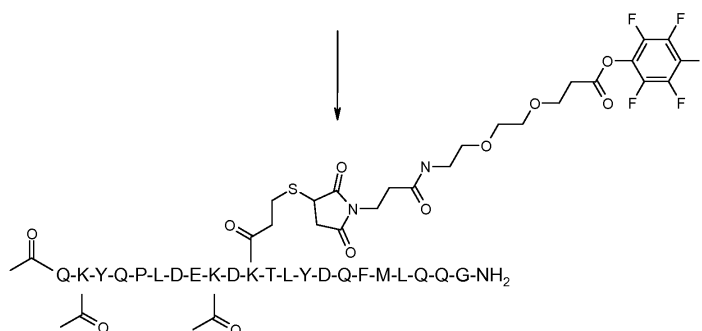
Síntesis de SEQ ID NO: 27-K(SH)<sup>11</sup>-MAL-2PEG-PFP



4.1 SEQ ID NO: 27-K(SH)<sup>11</sup>



4.2 (Enlazador de MAL-2PEG-PFP)



4,3 (SEQ ID NO: 27-K(SH)<sup>11</sup>-MAL-2PEG-PFP)

**Esquema 4** Síntesis de SEQ ID NO: 27-K(SH)<sup>11</sup>-MAL-2PEG-PFP

#### Ejemplo 4 Generación de intermedios de Péptido de Unión a Ang-2-tiol (ABP-ti)

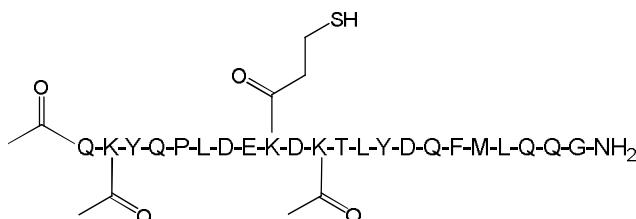
El ensamblaje de la cadena peptídica se realizó en una escala de 0,1 milimoles. La resina usada era resina Fmoc-Rink-PL (150 mg, sustitución 0,67 mmol/g). Se usaron protocolos de química de Fmoc convencionales para ensamblar el péptido. La eliminación de Fmoc era con piperidina al 20 %/DMF durante 3 x 5 min y todas las etapas de lavado de resina usaban DMF. Para incorporar los aminoácidos, se empleó una sola etapa de acoplamiento para cada resto, usando activación con HBTU/HOBt/NMM durante un periodo de 2 h. El Resto de Unión (K(SH)) se incorporó como Fmoc-Lys(N<sub>ε</sub>-mercaptopropionato-S-Trt)-OH. Tras el ensamblaje de la cadena, el grupo Fmoc N-terminal se eliminó y el péptido-resina se protegió terminalmente por acetilación. La resina final se lavó con DCM y se secó durante una noche al vacío. Los pesos de resina finales obtenidos eran los siguientes: SEQ ID NO: 29-K(SH)9: 627 mg, SEQ ID NO: 30-K(SH)16: 573 mg, SEQ ID NO: 31-K(SH)18: 642 mg y SEQ ID NO: 32-K(SH)19:

641 mg.

La eliminación acidolítica de grupos protectores y la escisión del péptido de la resina se consiguieron usando un cóctel de TFA/agua/ditiotreitol/trisopropilsilano (proporción 90:4:4:2, 5 ml) durante 2 h. La solución se filtró de la resina y la resina se lavó con otros 5 ml de TFA puro. Los filtrados combinados se evaporaron hasta un jarabe y después de la adición de éter helado precipitó un polvo blanco. El polvo se recogió por centrifugación, después se disolvió en acetonitrilo acuoso al 50 % (20 ml), se congeló y se liofilizó durante una noche.

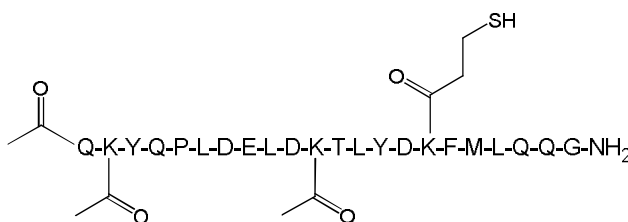
**Resultados:**

**SEQ ID NO: 29-K(SH)9**



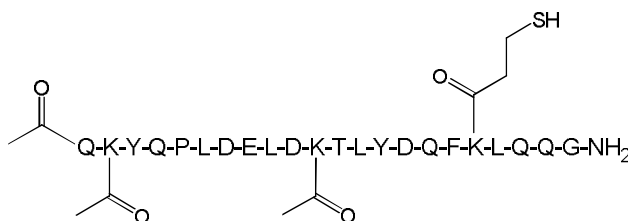
10 La cantidad de SEQ ID NO: 29-K(SH)9 bruto obtenido era de 252 mg. El análisis del SEQ ID NO: 29-K(SH)9 bruto por HPLC mostró un pico principal limpio; 5-95 %B/30 min, C18, Tp = 18,3 min. Un análisis de CLEM adicional del SEQ ID NO: 29-K(SH)9 bruto mostró que el pico principal era el producto deseado; [M+H]<sup>+</sup> = 2930, +2 = 1465, +3 = 977 observado.

**SEQ ID NO: 30-K(SH)16**



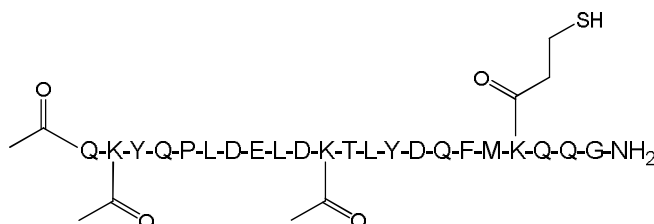
15 La cantidad de SEQ ID NO: 30-K(SH)16 bruto obtenido era de 229 mg. El análisis del SEQ ID NO: 30-K(SH)16 bruto por HPLC mostró un pico principal limpio; 5-95 %B/30 min, C18, Tp = 22,0 min. Un análisis de CLEM adicional del SEQ ID NO: 30-K(SH)16 bruto mostró que el pico principal era el producto deseado; [M+H]<sup>+</sup> = 2915, +2 = 1458, +3 = 972 observado.

**SEQ ID NO: 31-K(SH)18**



20 La cantidad de SEQ ID NO: 31-K(SH)18 bruto obtenido era de 252 mg. El análisis del SEQ ID NO: 31-K(SH)18 bruto por HPLC mostró un pico principal limpio; 5-95 %B/30 min, C18, Tp = 21,1 min. Un análisis de CLEM adicional del SEQ ID NO: 31-K(SH)18 bruto mostró que el pico principal era el producto deseado; [M+H]<sup>+</sup> = 2912, +2 = 1456, +3 = 971 observado.

**SEQ ID NO: 32-K(SH)19**



25 La cantidad de SEQ ID NO: 32-K(SH)19 bruto obtenido era de 261 mg. El análisis del SEQ ID NO: 32-K(SH)19 bruto por HPLC mostró un pico principal limpio; 5-95 %B/30 min, C18, Tp = 20,0 min. Un análisis de CLEM adicional del SEQ ID NO: 32-K(SH)19 bruto mostró que el pico principal era el producto deseado; [M+H]<sup>+</sup> = 2912, +2 = 1465, +3 = 977 observado.

977 observado.

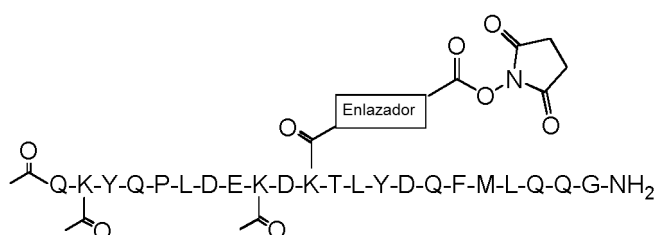
#### Purificación:

Una columna de HPLC preparativa se preequilibró con TFA acuoso diluido y acetonitrilo. Los intermediarios de ABP-tiol brutos (es decir, ABP con K(SH) como resto de unión) se disolvieron en DMF (3 ml), después se adsorbieron sobre la columna y se eluyeron por aplicación de un gradiente de acetonitrilo en TFA diluido. Las fracciones se recogieron automáticamente por la masa ( $M = 1465$ ). La elución de la columna se controló por UV, las fracciones obtenidas se analizaron por RP-HPLC analítica. Las fracciones más puras ( $>95\%$  por HPLC analítica) se combinaron y se liofilizaron para dar las cantidades siguientes: 87 mg de SEQ ID NO: 29-K(SH)9 puro, 50 mg de SEQ ID NO: 30-K(SH)16 puro, 59 mg de SEQ ID NO: 31-K(SH)18 puro y 39 mg de SEQ ID NO: 32-K(SH)19 puro.

#### 10 Síntesis de Enlazador

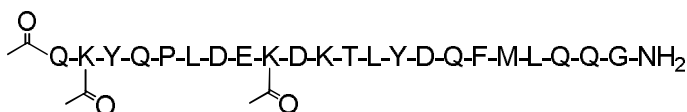
Se consideraron cinco estrategias de activación diferentes para conjugar un ABP con anticuerpos anti-IGF-1R de la invención, como se resume en los Ejemplos 5-9 (se muestran estructuras ejemplares usando el SEQ ID NO: 27-K(SH)<sup>11</sup>):

#### Ejemplo 5 Ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS) (SEQ ID NO: 27-K<sup>11</sup>-NHS)

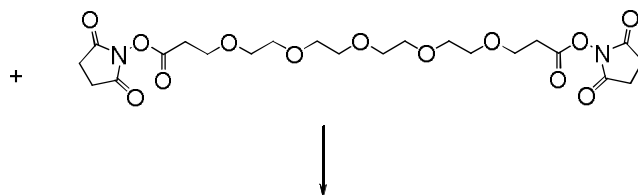


15

#### Ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS) (SEQ ID NO: 27-K<sup>11</sup>-NHS)

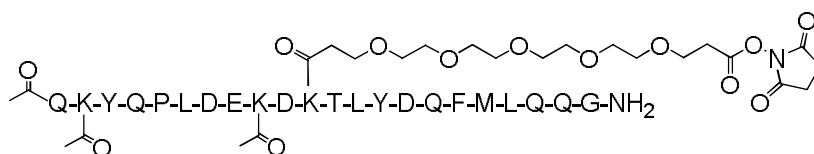


5.1 SEQ ID NO: 27



20

#### 5.2 Éster de Bis-PEG5-NHS



5.3 SEQ ID NO: 27-K<sup>11</sup>-5PEG-NHS

#### Esquema 5 Síntesis de SEQ ID NO: 27-K<sup>11</sup>-5PEG-NHS

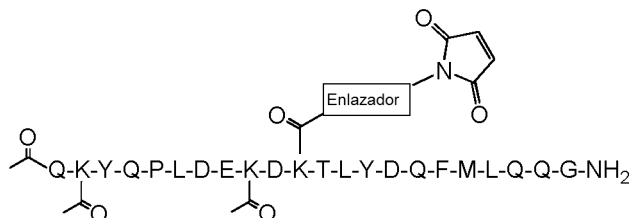
#### Síntesis de SEQ ID NO: 27-K<sup>11</sup>-5PEG-NHS

La SEQ ID NO: 27 (5.1) se hizo reaccionar con un Bis-NHS, PEG<sub>x</sub>-enlazador (5.2), de modo que el grupo carboxilo activado con NHS permaneció en el producto peptídico activado final (5.3) y permaneció disponible para la conjugación posterior. Esto requería la presencia de otros cuatro grupos carboxilo libres en el ABP. Estos excluían una estrategia de activación in situ simple ya que la posición del grupo activado no podía haberse controlado fácilmente y sería probable que se hubieran activado múltiples cadenas laterales carboxilo.

Se examinó la reacción entre el éster de bis-PEG<sub>5</sub>-NHS y el ABP (SEQ ID NO: 27). Usando un exceso de 10 veces del enlazador en DMSO, una solución del ABP y N-metilmorfolina (como base) en DMSO se valoró lentamente en una solución bien agitada. Se tomaron muestras y se examinaron por HPLC y CLEM a diversos puntos temporales. Después de aproximadamente 2 h había una formación de producto sustancial (conversión de aproximadamente el 80 % de 5.1 a forma 5.3) y éste se separaba fácilmente del reactivo de enlazador de bis-NHS. Sin embargo, incluso en DMSO, el producto 5.3 se convertía lentamente con el tiempo en la forma de ácido libre (en la que el grupo éster

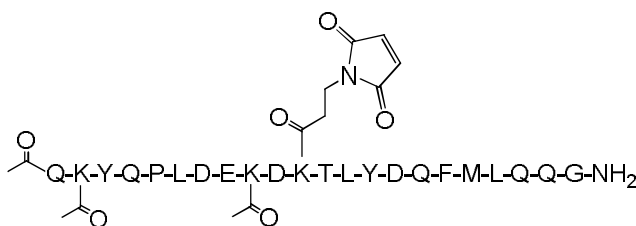
de NHS se convertía en el carboxilo libre inactivo). Además, cuando la mezcla de reacción bruta se fraccionó para aislar el producto deseado 5.3, éste también estaba sometido a hidrólisis durante las etapas de purificación y posterior liofilización. Aunque el procedimiento tenía éxito en la síntesis de cierto producto, se creía que la inestabilidad acuosa del éster de NHS resultante limitaría su aplicación en las reacciones de conjugación posteriores. Pruebas adicionales de MAL-PEG2-NHS se muestran en el Ejemplo 30 (que comprende el grupo Z \* Z13).

**Ejemplo 6 Maleimida (Mal) (SEQ ID NO: 27-K<sup>11</sup>-Mal)**

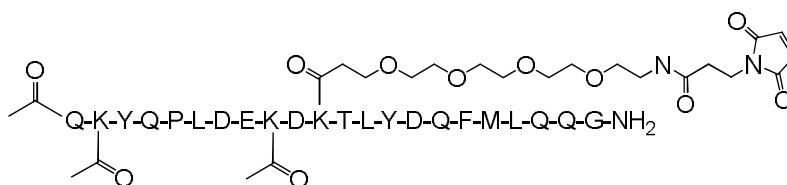


La activación de maleimida se usa generalmente de acuerdo con un compañero de conjugación con tiol libre. Aunque no están presentes restos de tiol libres en el anticuerpo 2.12.1.fx, hay varios procedimientos químicos que pueden usarse para introducir tioles libres en proteínas y de este modo proporcionar sitios de enlace para conjugación basada en maleimida.

Los péptidos que contienen Mal son en general relativamente sencillos de sintetizar usando enlazadores que contienen maleimida/ácido simples. Varios compuestos de SEQ ID NO: 27-MAL se sintetizaron como se muestra a continuación. En general, los péptidos activados con maleimida no se conjugaban bien con proteínas o anticuerpos que carecen de un tiol endógeno (derivado de una cadena lateral de cisteína libre) o un tiol introducido por otro medio químico, por ejemplo, por reactivo de Traut.

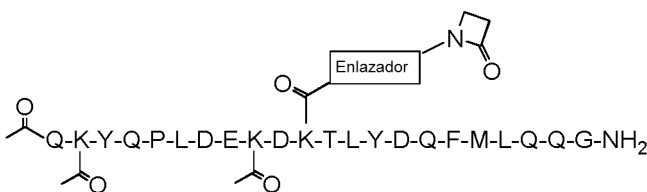


SEQ ID NO: 27-K<sup>11</sup>-Mal



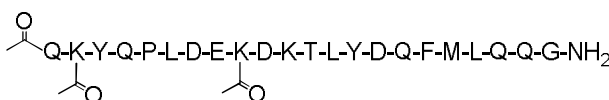
SEQ ID NO: 27-K<sup>11</sup>-4PEG-Mal-2

**Ejemplo 7 Azetidinona (AZD) (SEQ ID NO: 27-K<sup>11</sup>-AZD)**

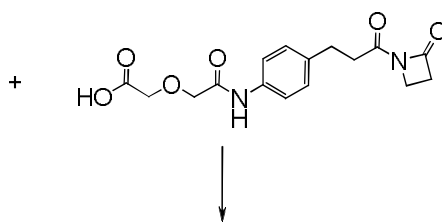


SEQ ID NO: 27-AZD

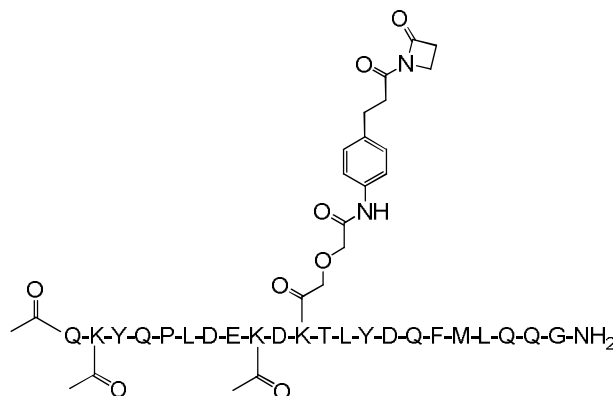
Se sintetizó ABP activado con AZD por unión de un enlazador de AZD-ácido al ABP en solución. Activación con AZD:



6.1 SEQ ID NO: 27



6.2 Enlazador de AZD-ácido

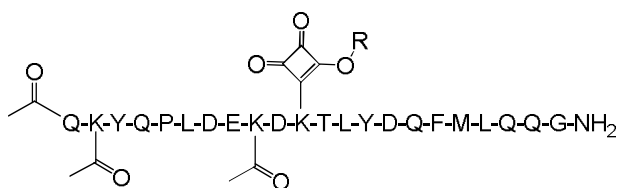


6.3 SEQ ID NO: 27-K<sup>11</sup>-AZD

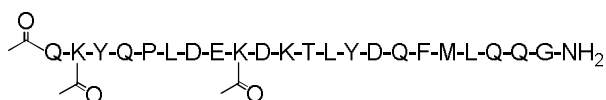
5 **Esquema 6: Síntesis de SEQ ID NO: 27-K<sup>11</sup>-AZD (6.3)**

El ABP activado con AZD reaccionaba muy lentamente con grupos amino de cadenas laterales de lisina. La conjugación se intentó a pH de 7 a 9 en tampón fosfato para aumentar la tendencia nucleófila de las lisinas de superficie es de aproximadamente 9,1 a 11,2). Las cuestiones de estabilidad del anticuerpo y la hidrólisis de AZD excluían el uso de un pH por encima de 9. Se añadieron 15 moles de ABP activado con AZD por 1 mol de anticuerpo durante tres días de tiempo de reacción, produciendo niveles de conjugación reducidos (un promedio de 2 ABP activados con AZD por anticuerpo). A pH básico, la hidrólisis de AZD se produce rápidamente (50 % después de 24 horas) contribuyendo a niveles disminuidos de conjugación.

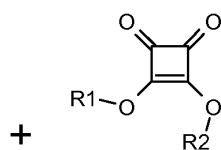
**Ejemplo 8 Ésteres de ácido escuarico (Escuaratos). (SEQ ID NO: 27-Escarato)**



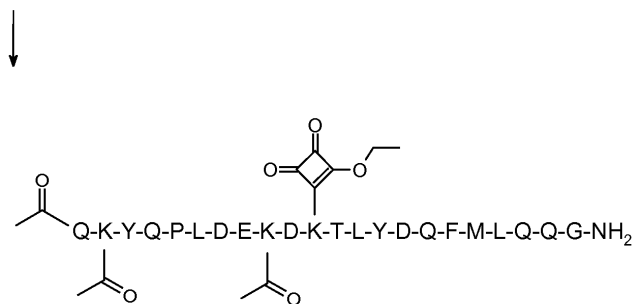
15 SEQ ID NO: 27-K<sup>11</sup> Escuarato-R



7.1 SEQ ID NO: 27



20 7.2 Escuarato derivado en R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup>, en este ejemplo, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son ambos CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>.

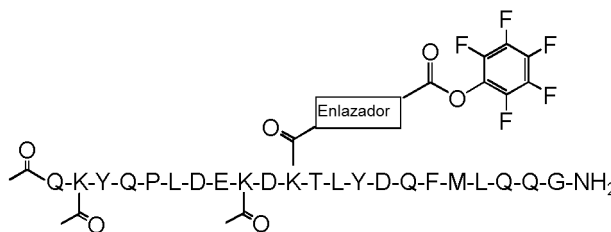


**Esquema 7:** 7.3 SEQ ID NO: 27-K<sup>11</sup>-Escarato-

**Esquema 7:** Derivados de ácido escuárico      Enlazador de SEQ ID NO: 27-K<sup>11</sup>-Escarato-1 → ABP-1-Escarato-1

5 Se sabe que los ésteres de alquilo generados a partir de ácido escuárico reaccionan selectivamente con tioles a pH neutro mientras que a pH mayores (aproximadamente 8,5 y superiores) también pueden reaccionar con aminas pero más lentamente. La reactividad de los escuaratos puede aumentarse significativamente por sustitución de grupos alquilo con arilo. La presente divulgación proporciona varios derivados de escuarato del ABP, en los que la naturales del “R” varía (R se selecciona del grupo que consiste en etilo, fenilo, 2-metoxicarbonilfenilo, 3-fluorofenilo y 3,5-difluorofenilo) y otros derivados en los que se ha variado la posición de enlazador. Los escuaratos de etilo se conjugan bien con tioles libres pero mal con aminas libres en proteínas y anticuerpos a menos que el pH esté por encima de 9. Los escuaratos de arilo demostraron mejor eficacia cuando se conjugaban con lisinas libres en los anticuerpos de la invención a pH neutro.

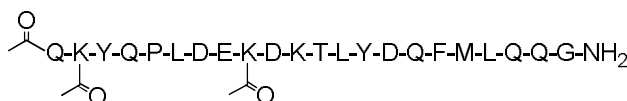
**Ejemplo 9 Ésteres pentafluorofenilicos (PFP) (SEQ ID NO: 27-PFP)**



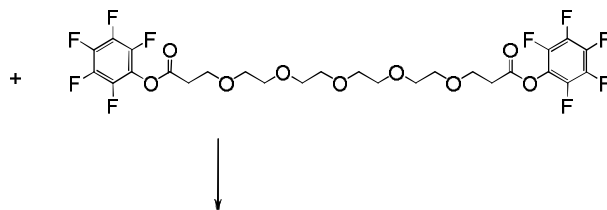
15 La presente invención también proporciona el uso de ésteres pentafluorofenilicos (PFP) para formar péptidos activados relativamente estables. Este procedimiento tiene varias ventajas sobre otras estrategias en el sentido de que el grupo PFP puede introducirse en solución fácilmente a partir de un producto peptídico activado estable que de por sí puede purificarse usando procedimientos de HPLC convencionales, observándose escasa hidrólisis de éster de PFP. El desafío en la síntesis de un ABP conectado covalentemente a un enlazador con un grupo reactivo capaz de conjugación con un anticuerpo es la presencia de cuatro cadenas laterales ácidas (tres ácidos aspárticos y un ácido glutámico) en la secuencia de ABP. Esto excluye una estrategia de activación simple usando el péptido y un agente activador puesto que no hay procedimientos simples conocidos que aseguren una activación específica de sitio en una cadena lateral ácida particular.

25 Para resolver este problema, la presente invención proporciona una ruta sintética por la que un grupo éster activado, tal como PFP, puede acoplarse directamente a una lisina de cadena lateral en el péptido por una reacción quimioselectiva (usando química de tiol/maleimida) o por uso de un reactivo de bis-éster activo que forma una amida con la cadena lateral peptídica pero deja el otro extremo como el éster activo.

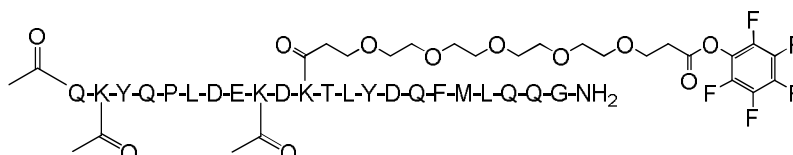
30 En algunas realizaciones, la estrategia puede ser un bis-ácido PEG con cada ácido activado como éster de PFP. En soluciones orgánicas, con alguna base presente, el extremo del enlazador de bis-PFP reaccionaba con la cadena lateral N-ε-amino de la lisina en la posición de unión necesaria para formar un enlace amida estable, mientras que el otro extremo mantenía el otro grupo PFP. Un problema potencial con esta estrategia es la posibilidad de formar dímeros de péptidos, en la que se añadiría un péptido a cada uno de los restos PFP presentes en cada extremo del enlazador. En algunos aspectos, la presente invención supera este problema adicional alterando la estequiometría y la adición del péptido y enlazador de bis-PEG-PFP respectivos. Una solución proporcionada por la invención es tener un exceso del enlazador de bis-PFP en solución y añadir lentamente el péptido en solución, de modo que esté siempre presente un exceso de enlazador por encima del péptido. Teniendo una proporción de entre aproximadamente 3,7:1 y aproximadamente 4,3:1, o en algunas realizaciones una proporción de aproximadamente 4:1 de enlazador sobre péptido, el péptido activado con PFP necesario puede sintetizarse sin dímero presente. El esquema de síntesis para el SEQ ID NO: 27-K<sup>11</sup>-5PEG-PFP se muestra a continuación en el Esquema 8:



SEQ ID NO: 27 (8.1)



Bis-dPEG5-OPfp (8.2)



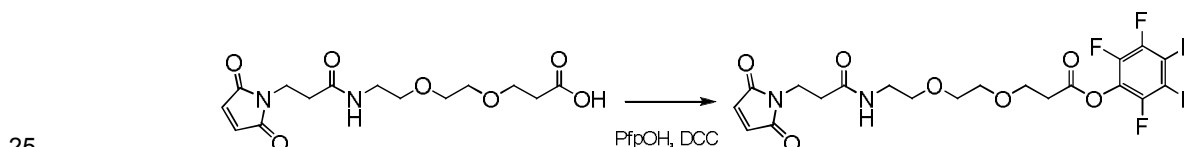
5

SEQ ID NO: 27-K<sup>11</sup>-5PEG-PFP (8.3)**Esquema 8** SEQ ID NO: 27-K<sup>11</sup>-5PEG-PFP**Síntesis de enlazador de bis-dPEG5-OPfp (8.2)**

Se disolvió bis-dPEG5-ácido (1 mmol, 338 mg) en diclorometano anhidro (5 ml), después se añadió pentafluorofenol (2 mmol, 368 mg), junto con dicitlohexcarbodiimida (1 mmol, 208 mg). La solución se agitó durante una noche a temperatura ambiente. Después de este tiempo, el producto secundario dicitlohexilurea blanco fino se eliminó por filtración y el filtrado se evaporó hasta sequedad para dar un aceite ligero amarillo pálido. El análisis por TLC y HPLC indicó un producto puro con una EM correcta = 670, El producto se usó en la siguiente etapa sin una purificación adicional. El producto es estable durante varios meses a -20 °C.

**Síntesis de SEQ ID NO: 27-K<sup>11</sup>-5PEG-PFP (8.3)**

El SEQ ID NO: 27 (8.1) (730 mg) se disolvió en dimetilformamida anhidra (8 ml) y se añadió N-metilmorfolina (0,05 ml). Se puso una alícuota de reactivo bis-dPEG5-OPfp puro (8.2) (0,5 ml) en un vial de vidrio (20 ml). Con agitación enérgica, la solución de SEQ ID NO: 27/NMM se añadió en 4 x alícuotas de 2 ml al reactivo de bis-dPEG5-OPfp durante 2 h, después la mezcla final se agitó durante 1 h adicional. El progreso de la conversión a producto SEQ ID NO: 27-K<sup>11</sup>-5PEG-PFP se controló por HPLC analítica. Al final de la reacción, la solución se filtró y se purificó directamente por HPLC semipreparativa en una columna 1" C8. Las fracciones más puras (>95 % por HPLC analítica) se combinaron y se liofilizaron para dar 400 mg (rendimiento del 48 %) de producto final de enlazador de péptido ABP-1-5PEG-PFP-2. Un mecanismo similar puede usarse para generar el SEQ ID NO: 27-K(SH)<sup>11</sup>-succinimida-2PEG-PFP (véase el Esquema 4).

**Síntesis de enlazador de maleimida-2PEG-PFP**

25

**Esquema 9** Maleimida-dPEG2-ácido (9.1) → Maleimida-2PEG-PFP (9.2)

Se disolvió maleimida-dPEG2-ácido (328 mg, 1 mmol, Quanta Biodesign), pentafluorofenol (0,103 ml, 1 mmol, PFP) y dicitlohexilcarbodiimida (206 mg, 1 mmol, DCC) en DCM seco (10 ml) y se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. El precipitado blanco fino (producto secundario DCU) que se formó se eliminó por filtración y el filtrado se evaporó hasta sequedad al vacío. El producto se obtuvo como un polvo blanco fino en alto rendimiento (490 mg, cuantitativo). La pureza era >95 % por HPLC analítica, la EM mostró [M+H]<sup>+</sup> = 495.

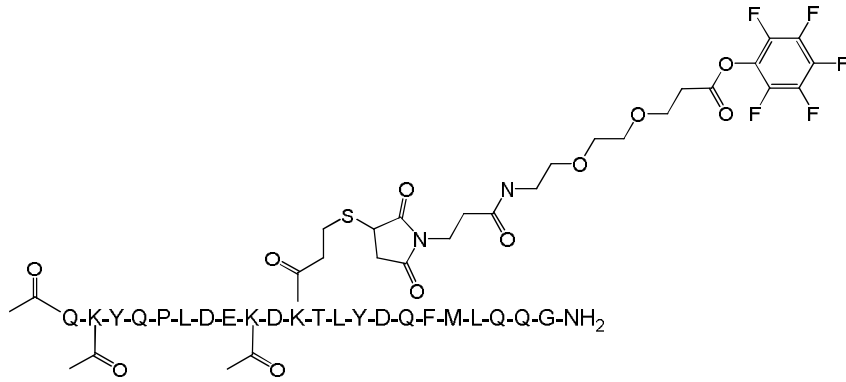
30

**Síntesis de análogos de ABP activados con PFP**

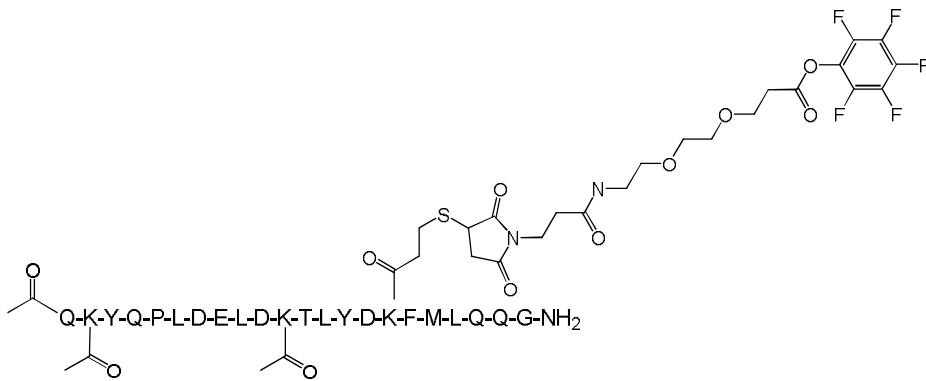
Una muestra (30-40 mg) de cada uno de los intermedios de ABP-tiol purificados (es decir, ABP con K(SH) como resto de unión) se disolvió en DMF anhidro (2 ml). Se añadió Mal-PEG2-PFP (20 mg) junto con N-metilmorfolina (5 ml). La reacción se agitó y se controló a temperatura ambiente por HPLC para seguir el curso temporal de formación de producto. La conversión completa de péptido de partida en producto ABP activado con PFP se observó en las primeras dos horas. La solución se filtró y el pico de producto se aisló directamente por HPLC semipreparativa. En cada caso, el producto se aisló en un rendimiento de aproximadamente el 40 % después de la liofilización.

35

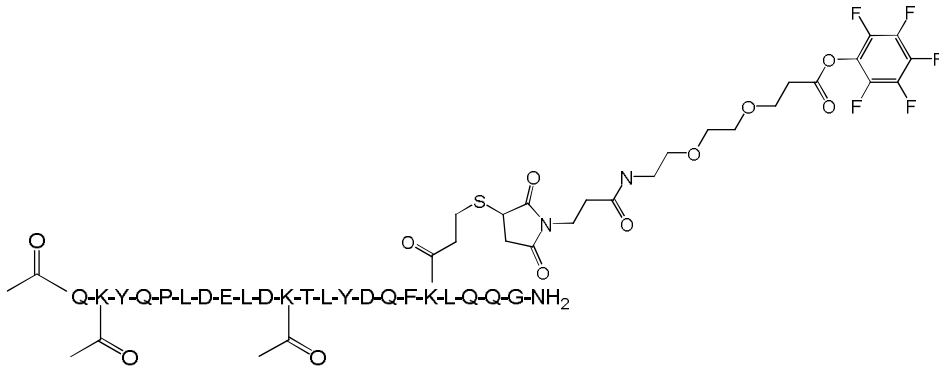




SEQ ID NO: 27-K(SH)<sup>11</sup>-MAL-2PEG-PFP: 21 mg

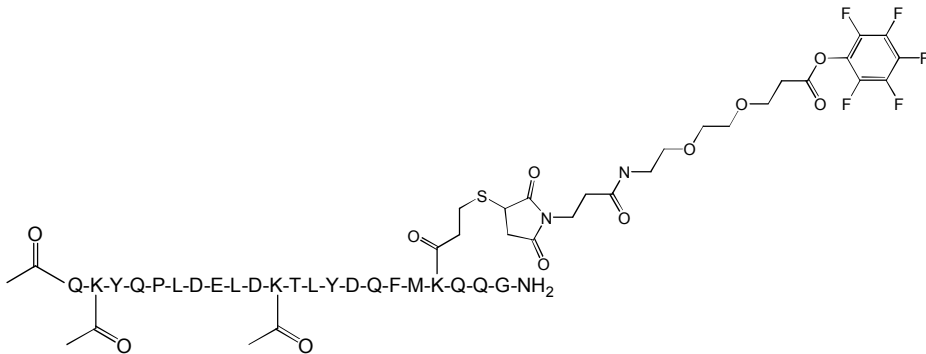


SEQ ID NO: 30-K(SH)<sup>16</sup>-MAL-2PEG-PFP: 6 mg



5

SEQ ID NO: 31-K(SH)<sup>18</sup>-MAL-2PEG-PFP: 9 mg



SEQ ID NO: 32-K(SH)<sup>19</sup>-MAL-2PEG-PFP: 12 mg

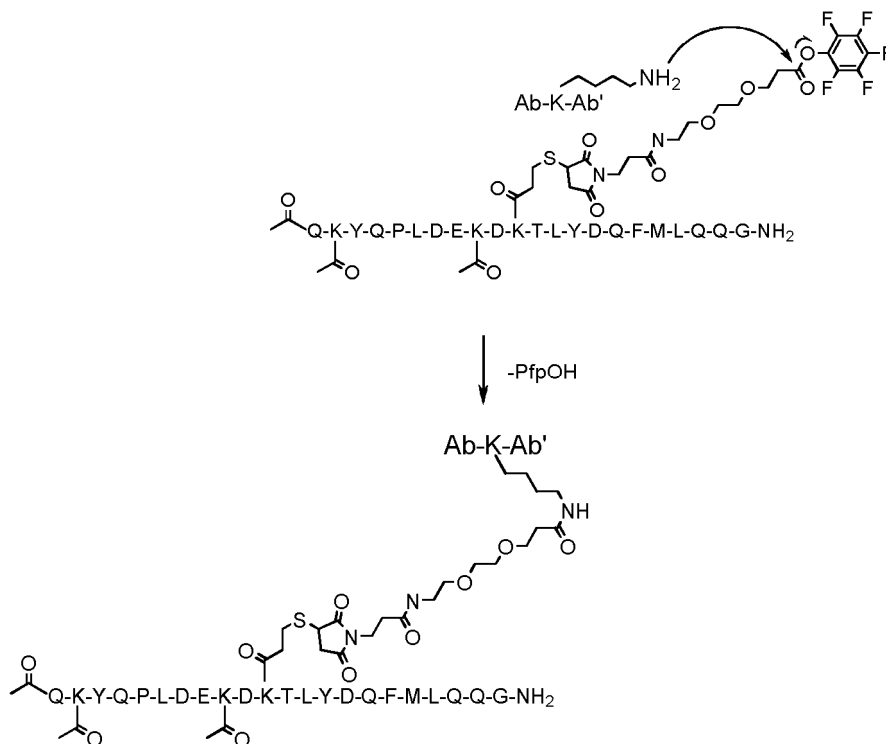
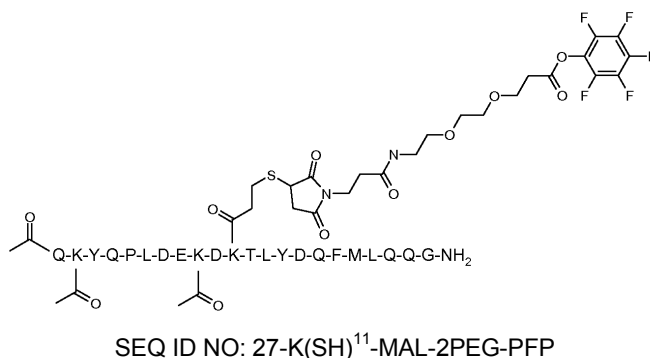
**Ejemplo 10 Conjugación de anticuerpo**

Los productos farmacológicos MAC-1 y MAC-2 se generaron por conjugación de 2.12.1.fx con un péptido de unión a Ang2. El MAC-1 está compuesto por 2.12.1.fx con SEQ ID NO: 27-K(SH)<sup>11</sup>-MAL-2PEG-PFP y el MAC-2 está compuesto por 2.12.1.fx con SEQ ID NO: 27-K<sup>11</sup>-5PEG-PFP. Se calculó el número de conjugaciones peptídicas por molécula de 2.12.1.fx en una muestra de cada MAC (véase la Tabla 1 2).

5

**Tabla 1: Perfil de conjugación de MAC-1 y MAC-2 Generación de MAC-1**

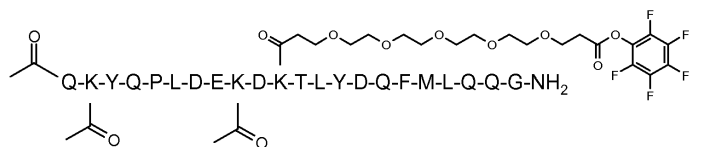
	Adiciones de conjugación (CA) (%)					CA prom.
	0	1	2	3	4	
<b>MAC-2</b>	2	20	47	26	5	2,12
<b>MAC-1</b>	3	26	42	25	3	1,97



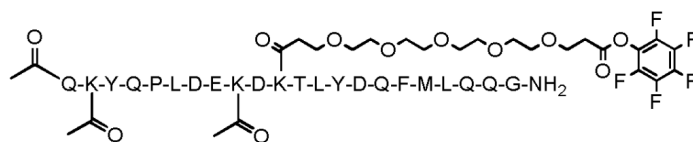
10 MAC-1

**Esquema 10:** Reacción de SEQ ID NO: 27-K(SH)<sup>11</sup>-MAL-2PEG-PFP con una cadena lateral de lisina de un anticuerpo (Ab-K-Ab): Cuando el anticuerpo es 2.12.1.fx, el MAC es MAC-1.

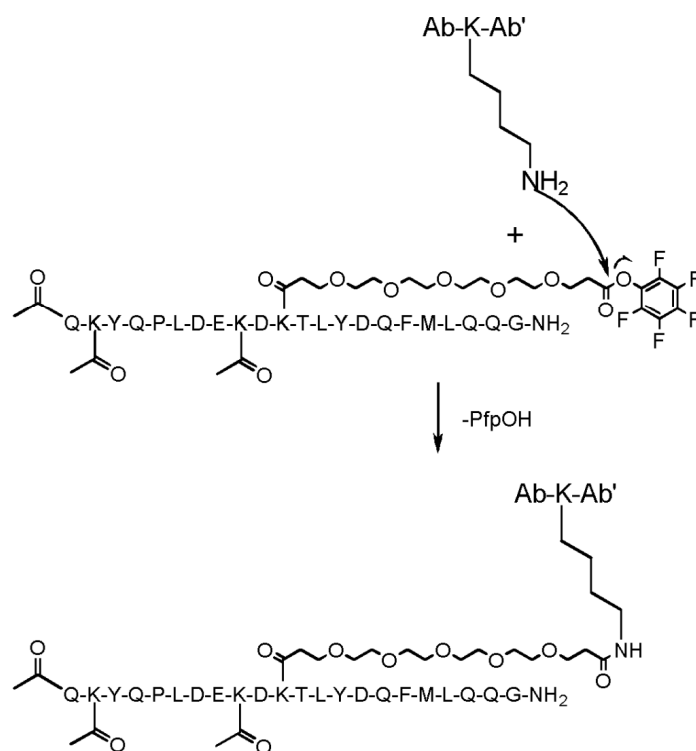
**Generación de MAC-2**



SEQ ID NO: 27-K<sup>11</sup>-5PEG-PFP



SEQ ID NO:27-K<sup>11</sup>-5PEG-PFP



MAC-2

- 5 **Esquema 11:** Reacción de SEQ ID NO: 27-K(SH)<sup>11</sup>-5PEG-PFP con una cadena lateral de lisina de una anticuerpo (Ab-K-Ab): Cuando el anticuerpo es 2.12.1.fx, el MAC es MAC-2.

**Ejemplo 11 Condiciones de optimización para conjugación basada en PFP**

- 10 Se realizaron una serie de ensayos para establecer condiciones de reacción óptimas para la conjugación dirigida. Al final de cada conjugación de reacción, la reacción se detuvo con un tampón de succinato y glicina, disminuyendo el pH a aproximadamente 5,5 y apagando cualquier péptido / enlazador libre. El análisis de MAC-2 se realizó midiendo el peso molecular intacto (MW) del MAC utilizando la detección por espectrometría de masas de tiempo de vuelo de electropulverización después de la separación de proteínas de sales y excipientes a través de una columna de cromatografía de exclusión de tamaño.

**Temperatura**

- 15 El anticuerpo 2.12.1.fx se ajustó a 18 mg.ml<sup>-1</sup> a pH 7,7 con un tampón de fosfato hasta una concentración final de fosfato de sodio 0,06M. El péptido / enlazador (SEC ID NO: 27-K<sup>11</sup>-5PEG-PFP) se reconstituyó en una solución de propilenglicol a 10 mg.ml<sup>-1</sup>. El péptido / enlazador se añadió a anticuerpo 2.12.1.fx en una relación molar de 4,3:1 y se dejó reaccionar durante 2 horas a 18, 22 o 25 °C. Los resultados se presentan en la Tabla 2.

**Tabla 2: Temperatura de reacción en fosfato 0,06 M a péptido: anticuerpo 4,3: 1 pH de la reacción**

Temperatura	CA (%)					CA prom.
	0	1	2	3	4	
<b>18C</b>	1	16	51	23	8	2,21
<b>22C</b>	3	15	57	21	5	2,11
<b>25C</b>	2	12	53	25	7	2,24

5 El anticuerpo 2.12.1.fx se ajustó a  $18 \text{ mg.ml}^{-1}$  a pH 6,5, 6,75, 7,0, 7,25, 7,5, 7,75, u 8,0 con un tampón de fosfato hasta una concentración final de fosfato de sodio 0,06M. SEC ID NO: 27-K<sup>11</sup> 5PEG-PFP (L2) se reconstituyó en una solución de propilenglicol a  $10 \text{ mg.ml}^{-1}$ . El péptido / enlazador se añadió a anticuerpo 2.12.1.fx en una relación molar de 4,3:1 y se dejó reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente. Los resultados se presentan en la Tabla 3.

**Tabla 3: pH en tampón de fosfato de sodio 0,06 M a una relación péptido:anticuerpo de 4,3:1**

pH	CA (%)					CA prom.
	0	1	2	3	4	
<b>6,5</b>	7	42	41	9	0	1,51
<b>6,75</b>	3	31	52	12	3	1,83
<b>7,0</b>	3	24	53	16	4	1,94
<b>7,25</b>	2	18	54	22	5	2,12
<b>7,5</b>	2	12	57	23	7	2,23
<b>7,75</b>	3	15	55	22	6	2,15
<b>8,0</b>	1	14	52	29	4	2,21

10 El anticuerpo 2.12.1.fx se ajustó a  $2 \text{ mg.ml}^{-1}$  a pH 7,0, 7,5. y 8,0 con un tampón HEPES hasta una concentración final de 0,02M. SEC ID NO: 27-K<sup>11</sup> 5PEG-PFP se reconstituyó en DMSO a  $10 \text{ mg.ml}^{-1}$ . El péptido / enlazador se añadió al anticuerpo 2.12.1.fx en una relación molar de 5: 1 y se dejó reaccionar durante la noche a temperatura ambiente. Los resultados se presentan en la Tabla 4. El nivel de conjugación disminuyó por encima de pH 8,0

**Tabla 4: pH en tampón HEPES 0,02 M a péptido:anticuerpo 5:1 Duración de la reacción de conjugación**

pH	Adiciones de ABP (%)					CA prom.
	0	1	2	3	4	
<b>7</b>	2	21	41	28	4	2,03
<b>7,5</b>	3	22	44	26	5	2,08
<b>8</b>	9	30	42	17	2	1,73

15 El anticuerpo 2.12.1.fx se ajustó a  $18 \text{ mg.ml}^{-1}$  a pH 7,7 con un tampón de fosfato hasta una concentración final de fosfato de sodio 0,06M. La SEQ ID NO: 27 / 5PEG-PFP se reconstituyó en una solución de propilenglicol a  $10 \text{ mg.ml}^{-1}$ . El péptido / enlazador se añadió a anticuerpo 2.12.1.fx en una relación molar de 4,3:1 y se dejó reaccionar durante 30, 60, 120, 180, 240, 300 o 2400 minutos a temperatura ambiente (Tabla 5).

**Tabla 5: Duración de la reacción de conjugación en fosfato de sodio 0,06M a una relación péptido:anticuerpo de 4,3:1**

Tiempo (minutos)	CA (%)					CA prom.
	0	1	2	3	4	
<b>30</b>	6	38	44	13	0	1,64
<b>60</b>	1	22	52	21	3	2,02
<b>120</b>	0	15	50	29	6	2,24
<b>180</b>	1	12	51	31	5	2,28
<b>240</b>	1	9	51	33	5	2,33
<b>300</b>	1	9	50	35	5	2,35
<b>2400</b>	1	10	48	35	6	2,35

**Proporción molar de péptido a proteína**

- 5 2.12.1.se ajustó el anticuerpo fx  $18 \text{ mg.ml}^{-1}$  a pH 7,5 con un tampón HEPES hasta una concentración final de HEPES 0,2M. SEC ID NO: 27-K<sup>11</sup> 5PEG-PFP se reconstituyó en una solución de propilenglicol a  $10 \text{ mg.ml}^{-1}$ . El péptido / enlazador se añadió a anticuerpo 2.12.1.fx en una relación molar de 1, 2, 3, 4 y 5: 1 (Tabla 6), y se dejó reaccionar durante al menos 2 horas a temperatura ambiente, pero la alta concentración de tampón HEPES dio como resultado un nivel disminuido de conjugación.

**Tabla 6: Relación molar de péptido a proteína 1:1-5:1 en HEPES 0,2M**

Péptido: 2.12.1.fx	CA (%)							CA prom.	
	0	1	2	3	4	5	6		7
1:1	80	20	0	0	0				0,20
2:1	60	35	5	0	0				0,45
3:1	39	49	12	0	0				0,73
4:1	27	51	19	3	0				0,98
5:1	11	47	37	5	0				1,36

- 10 2.12.1.se ajustó el anticuerpo fx  $18 \text{ mg.ml}^{-1}$  a pH 7,7 con un tampón de fosfato hasta una concentración final de fosfato de sodio 0,06M. SEC ID NO: 27-K<sup>11</sup> 5PEG-PFP se reconstituyó en una solución de propilenglicol a  $10 \text{ mg.ml}^{-1}$ . El péptido / enlazador se añadió a anticuerpo 2.12.1.fx en una relación molar de 5, 7, 10, 12 y 15: 1 (Tabla 7) y se dejó reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente para generar un MAC con un Mayor nivel de conjugación.

**Tabla 7: Relación molar de péptido a proteína 7:1-15:1 en fosfato de sodio 0,06M**

Péptido: 2.12.1.fx	CA (%)							CA prom.	
	0	1	2	3	4	5	6		7
7:1	1	1	29	39	17	10	2	0	3,06
10:1	1	1	18	33	25	19	3	0	3,49
12:1	3	1	11	22	26	26	8	3	3,92
15:1	1	2	9	19	23	32	12	3	4,22

- 15 Para optimizar aún más la relación molar de anticuerpo 2.12.1.fx y SEQ ID NO: 27-K<sup>11</sup> 5PEG-PFP, se ajustó el anticuerpo 2.12.1.fx  $18 \text{ mg.ml}^{-1}$  a pH 7,7 con un tampón de fosfato hasta una concentración final de fosfato de sodio 0,06M. El péptido / enlazador se reconstituyó en una solución de propilenglicol a  $10 \text{ mg.ml}^{-1}$ . El péptido / enlazador se agregó al anticuerpo 2.12.1.fx en una relación molar de 2,5, 2,8, 3,1, 3,4, 3,7, 4,0, 4,3 o 4,6: 1 (Tabla 8) y se dejó reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente.

**Tabla 8: Relación molar de péptido a proteína 2,5:1-4,6:1 en fosfato de sodio 0,06M**

Péptido: 2.12.1.fx	CA (%)							CA prom.	
	0	1	2	3	4	5	6		7
2,5:1	14	53	30	4	0				1,25
2,8:1	10	45	37	8	0				1,43
3,1:1	7	39	45	8	0				1,53
3,4:1	5	40	44	11	0				1,61
3,7:1	4	25	51	15	5				1,92
4,0:1	2	26	55	15	2				1,89
4,3:1	1	24	55	16	4				1,98
4,6:1	2	19	56	19	5				2,08

El anticuerpo 2.12.1.fx se ajustó a 2 mg.ml<sup>-1</sup> a pH 7,0 con un tampón HEPES hasta una concentración final de 0,02M. SEC ID NO: 27-K<sup>11</sup> 5PEG-PFP se reconstituyó en DMSO a 10 mg.ml<sup>-1</sup>. El péptido / enlazador se añadió a anticuerpo 2.12.1.fx en una relación molar de 5, 6, 7, 8, 10: 1 y se dejó reaccionar durante la noche a temperatura ambiente. Los resultados se presentan en la Tabla 9.

5

**Tabla 9: Relación molar de péptido a proteína 5: 1-10: 1 en HEPES 0,02M**

Péptido: 2.12.1.fx	CA (%)							CA prom.	
	0	1	2	3	4	5	6		7
5:1	2	21	49	24	4	0	0	0	2,07
6:1	2	15	42	32	9	0	0	0	2,31
7:1	1	11	34	42	13	0	0	0	2,57
8:1	0	9	32	42	16	1	0	0	2,68
10:1	0	4	21	47	25	4	0	0	3,07

#### Perfil de conjugación de 2.12.1.fx a varias concentraciones de proteínas

Los perfiles de conjugación de 2.12.1.fx con SEQ ID NO: 27-K<sup>11</sup>Se analizaron -5PEG-PFP a diversas concentraciones. 2.12.1.fx se concentró a > 50 mg / ml, se diluyó a la concentración deseada con acetato sódico 20 mM, 200 m trehalosa pH 5,5, y se enriqueció con fosfato sódico 60 mM pH 7,7 SEC ID NO: 27-K<sup>11</sup>La 5PEG-PFP se resuspendió con propilenglicol al 50 % y se mezcló con el anticuerpo en una relación molar de 4,3: 1 y se dejó reaccionar durante la noche a temperatura ambiente. Todas las muestras se diluyeron a 2 mg / ml y se analizaron como una proteína conjugada intacta por cromatografía de exclusión por tamaño - espectrometría de masas (SEC-MS) para determinar el número y la cuantificación de las formas conjugadas de la proteína. Esta técnica mide el peso molecular de cada forma de proteína; Se observan múltiples sitios de conjugación como señales distintas separadas por la diferencia de masa de un péptido. La cuantificación relativa de múltiples especies de conjugación se realiza midiendo la magnitud de la señal. La Tabla 10 muestra el perfil de conjugación de 2.12.1.fx con péptido a diversas concentraciones de anticuerpo. A concentraciones de anticuerpos de 10 mg / mL a 50 mg / ml, la conjugación ocurre en una distribución entre 0-5 adiciones con un promedio de 1,8 o más adiciones. A concentraciones de anticuerpos de 0,5 a 5 mg / ml, la conjugación ocurre en una distribución entre 0-3 adiciones con un promedio de 1,5 o menos adiciones.

**Tabla 10: Efecto de la concentración de anticuerpos**

Concentración de anticuerpos (mg / ml)	CA (%)						CA prom.
	0	1	2	3	4	5	
0,5	65	32	3	-	-	-	0,37
1	44	44	12	-	-	-	0,67
5	10	41	40	8	-	-	1,45
10	3	30	47	17	2	1	1,87
15	1	24	51	20	3	1	2,02
20	1	16	57	22	2	1	2,11
30	2	20	55	20	3	1	2,04
40	2	21	53	22	2	0	2,04
50	2	19	50	24	4	1	2,11

#### Selección del tampón de reacción

El anticuerpo 2.12.1.fx se ajustó a 18 mg.ml<sup>-1</sup> a pH 7,7 con un carbonato de sodio, borato de sodio o tampón de fosfato de sodio hasta una concentración final de fosfato de sodio 0,05M. SEC ID NO: 27-K<sup>11</sup>-5PEG-PFP se reconstituyó en una solución de propilenglicol a 10 mg.ml<sup>-1</sup>. El péptido / enlazador se añadió a anticuerpo 2.12.1.fx en una relación molar de 1, 2, 3, 4 o 5: 1 y se dejó reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente. El bajo pH de la reacción dio como resultado un nivel reducido de conjugación (Tabla 11).

30

Tabla 11: Tampón y alteraciones del pH.

Tampón	CA (%)					CA prom.
	0	1	2	3	4	
Carbonato de sodio 50mM pH 7,4	2	24	48	26	0	1,98
Borato de sodio 50mM pH 7,0	1	17	45	31	5	2,20
Fosfato de sodio 50mM pH 7,0	10	48	38	4	0	1,36

El anticuerpo 2.12.1.fx se ajustó a 18 mg.ml<sup>-1</sup> a pH 7,5, 7,7 y 8,0 con un borato de sodio y un tampón de fosfato de sodio hasta una concentración final de 0,04M. SEC ID NO: 27-K<sup>11</sup>-5PEG-PFP se reconstituyó en una solución de propilenglicol a 10 mg.ml<sup>-1</sup>. El péptido / enlazador se añadió a anticuerpo 2.12.1.fx en una relación molar de 4,3:1 y se dejó reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente (Tabla 12).

5

Tabla 12: Tampón y alteraciones del pH.

Tampón	CA (%)					CA prom.
	0	1	2	3	4	
Fosfato, pH 7,5	1	21	53	21	3	2,02
Fosfato, pH 7,7	0	15	50	29	6	2,26
Fosfato, pH 8,0	1	14	52	29	4	2,21
Borato, pH 7,5	46	44	10	0	0	0,64
Borato, pH 7,7	22	51	23	4	0	1,09
Borato, pH 8,0	1	17	48	30	4	2,19

El anticuerpo 2.12.1.fx se ajustó a 18 mg.ml<sup>-1</sup> a pH 7,7 con un tampón de fosfato hasta una concentración final de 0,04 M, 0,06 M o 0,08 M de fosfato de sodio. El péptido / enlazador (SEC ID NO: 27-K<sup>11</sup> 5PEG-PFP) se reconstituyó en una solución de propilenglicol a 10 mg.ml<sup>-1</sup>. El péptido / enlazador se añadió a anticuerpo 2.12.1.fx en una relación molar de 4,3: 1 y se dejó reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente. Los resultados se presentan en la Tabla 13.

10

Tabla 13: Concentración de fosfato

Concentración (mM) de fosfato a pH 7,7	CA (%)					CA prom.
	0	1	2	3	4	
40	2	23	54	16	4	1,95
60	2	28	51	15	4	1,91
80	2	29	51	13	4	1,86

#### Efecto de los constituyentes del tampón sobre la conjugación.

**Propilenglicol:** El anticuerpo 2.12.1.fx se ajustó a 18 mg.ml<sup>-1</sup> a pH 7,7 con un tampón de fosfato hasta una concentración final de fosfato de sodio 0,06M. El péptido / enlazador (SEC ID NO: 27-K<sup>11</sup> 5PEG-PFP) se reconstituyó en una solución de propilenglicol a 20 mg.ml<sup>-1</sup> (5 % propilenglicol en la reacción de conjugación). El péptido / enlazador se agregó al anticuerpo 2.12.1.fx en una relación molar de 4,3: 1 y se añadió un 0 a 15 % de propilenglicol adicional (porcentaje de propilenglicol final de 5, 10, 15 y 20 %) y se permitió Para reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente. Los resultados se presentan en la Tabla 14.

15

20

Tabla 14: Porcentaje de propilenglicol en fosfato de sodio 0,06M

Porcentaje (%) de propilenglicol	CA (%)					CA prom.
	0	1	2	3	4	
5	2	18	55	20	5	2,08
10	2	20	53	21	5	2,09
15	2	23	49	20	5	2,01
20	4	23	50	19	4	1,96

**Cloruro de sodio:** El anticuerpo 2.12.1.fx se ajustó a 2 mg.ml<sup>-1</sup> a pH 7,0 con un tampón HEPES hasta una concentración final de 0,02M en presencia y ausencia de cloruro de sodio 0,14M. SEC ID NO: 27-K<sup>11</sup> 5PEG-PFP se reconstituyó en DMSO a 10 mg.ml<sup>-1</sup>. El péptido / enlazador se añadió a anticuerpo 2.12.1.fx en una relación molar de 5: 1 y se dejó reaccionar durante la noche a temperatura ambiente. Los resultados se presentan en la Tabla 15. El nivel de conjugación disminuye en presencia de cloruro de sodio.

25

Tabla 15: Concentración de cloruro de sodio en HEPES 0,02M

Concentración de cloruro de sodio (mM)	Adiciones de ABP (%)					CA prom.
	0	1	2	3	4	
0	2	21	41	28	4	2,03
0,14	9	34	42	14	1	1,64

**HEPES:** El anticuerpo 2.12.1.fx se ajustó a 2 mg.ml<sup>-1</sup> a pH 7,0 con un tampón HEPES hasta una concentración final de 0,2M y 0,02M. SEC ID NO: 27-K<sup>11</sup>-5PEG-PFP se reconstituyó en 50 % de propilenglicol a 10 mg.ml<sup>-1</sup>. El péptido / enlazador se añadió a anticuerpo 2.12.1.fx en una relación molar de 5: 1 y se dejó reaccionar 2 h a temperatura ambiente. Los resultados se presentan en la Tabla 16. El nivel de conjugación se reduce a 0,2 M de tampón HEPES.

Tabla 16: Concentración de HEPES

Concentración de HEPES (mM)	Adiciones de ABP (%)					CA prom.
	0	1	2	3	4	
0,02	2	35	47	16	0	1,77
0,2	21	49	26	4	0	1,13

**DMSO:** El anticuerpo 2.12.1.fx se ajustó a 15 mg.ml<sup>-1</sup> a pH 7,7 con tampón de fosfato de sodio hasta una concentración final de 0,06 M y se añadió DMSO hasta una concentración final del 30 %. SEC ID NO: 27 K<sup>11</sup>-5PEG-PFP se reconstituyó en una solución de propilenglicol a 10 mg.ml<sup>-1</sup>. El péptido / enlazador se añadió a anticuerpo 2.12.1.fx en una relación molar de 4: 1 y se dejó reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente. Los resultados se presentan en la tabla 17.

Tabla 17: DMSO en fosfato de sodio 0,06M

Porcentaje de DMSO	Adiciones de ABP (%)					CA prom.
	0	1	2	3	4	
0	3	28	49	14	6	1,92
30	8	28	32	22	10	1,98

### Discusión de los parámetros de la reacción de conjugación

15 Cuando la proporción molar de ABP respecto a la fracción efectora (en este ejemplo, un péptido) anticuerpo se reduce por debajo de aproximadamente 3,5:, el nivel de conjugación se disminuye, como se observa en la Tabla 8. Como alternativa, la Tabla 9 muestra que el aumento de la proporción molar dará como resultado un aumento del nivel de conjugación. El aumento del número de péptidos por anticuerpo disminuye la eficacia de unión del anticuerpo (en este caso 2.12.1 fx) respecto a su antígeno (en este caso el receptor IGF1R), por lo tanto, la proporción molar del péptido respecto al anticuerpo se optimizó para maximizar la unión tanto antígeno-anticuerpo como péptido-afin.

También se descubrió que la variación del tampón de conjugación también puede alterar el patrón de conjugación. Los excipientes que contienen amina son menos preferibles en general ya que pueden reaccionar con el grupo PFP. Pueden usarse tampones tales como carbonato y borato para la conjugación pero se evitaron ya que sus pKa (ácido bórico con un pKa ~9 y carbonato con dos pKa de ~6 y ~11) estaban lejos del pH de conjugación de 7,7 que se identificó como óptimo para MAC-1 y MAC-2 (Tabla 11). El nivel de conjugación no solo depende de las condiciones químicas de la reacción sino que también se basa en el tiempo. Después de 2 horas, la mayoría del péptido activado por PFP había reaccionado con el anticuerpo o el PFP Z\* o se había hidrolizado (Tabla 5).

El péptido/enlazador activado con PFP reaccionaba rápidamente con grupos amino de la cadena lateral de lisina. La conjugación se realizó a pH de 6,5 a 8 en tampón fosfato para aumentar la tendencia nucleófila de las lisinas de la superficie del anticuerpo disminuyendo su carga (el pKa de las lisinas en las proteínas de superficie es de aproximadamente 9,1 u 11,2) como se muestra en las Tablas 3 y 4.

Las condiciones óptimas para la conjugación de MAC-1 y MAC-2 se describen de la forma siguiente: el anticuerpo 2.12.1.fx se ajustó a pH 7,7 con un tampón fosfato a una concentración final de fosfato sódico 0,06 M. El péptido/enlazador (SEQ ID NO: 27-K(SH)<sup>11</sup>-5PEG-PFP) se reconstituyó en una solución de propilenglicol a 10 mg.ml<sup>-1</sup> (concentración final de propilenglicol en la reacción del 10 %). El péptido/enlazador se añadió al anticuerpo 2.12.1.fx a una proporción molar de 4,3:1 y se dejó reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente. La reacción se inactivó con un tampón de succinato y glicina disminuyendo el pH hasta aproximadamente 6,0 e inactivando cualquier péptido libre. En algunos aspectos, la reacción puede concentrarse y pueden eliminarse especies relacionadas con ABP (tales como péptidos en los que el enlazador se hidrolizó por reacción con disolvente acuoso)



y otros elementos de la mezcla de reacción (tales como PFP) por diafiltración, por ejemplo, usando una membrana de 50 kDa o cromatografía de exclusión por tamaño en un tampón de succinato, glicina, cloruro sódico y trehalosa, pH 5,5 a 30 mg.ml-1.

- 5 Las condiciones de conjugación enumeradas anteriormente se variaron para determinar el intervalo de cada parámetro de procedimiento. Los intervalos de parámetros se ajustaron basándose en la variabilidad que podía ocurrir durante la conjugación y/o se ampliaron hasta que se observó un cambio superior al 10 % en la población de especies. La Tabla 18 resume los parámetros que dan como resultado perfiles de conjugación similares para MAC-2.

**Tabla 18: Parámetros de proceso optimizados para MAC-2**

Parámetros ensayados	Intervalo de parámetro ensayado	Intervalo deseable de los parámetros	Condición de reacción óptima
Temperatura	18-25 °C	18-25 °C	Temp. ambiente
pH de reacción	6,5 a 8,0	pH 7,25-8,0	7,7
Duración de la reacción	30-2400 min	180-2400 min	>aprox. 2 h
Proporción molar entrel péptido y el anticuerpo	2,5 a 4,6	3,7:1 a 4,3:1	4,3:1
Concentración de 2.12.1.fx añadido a a reacción de conjugación	0,5 a 50 mg/ml	10 a 50 mg/ml	20 mg/ml
Concentración de fosfato en el tampón de reacción	40 a 80 mM	40-80 mM	60 mM
Concentración final de propilenglicol	5 a 20 %	5-20 %	10 %

#### 10 Ejemplo 12 Sitio de enlazador en anticuerpo

En general, solo los grupos salientes de Z \* que comprenden halógeno fenil ésteres demostraron niveles consistentes de conjugación direccional, aunque los cuadrados y los ésteres de NHS mostraron cierto potencial de uso en ciertas circunstancias.

- 15 Solo dos de los cinco enlazadores propuestos (ésteres de PFP y escuaratos) tuvieron éxito en la preparación de MAC. Aunque se postula que los enlazadores electrofílicos permitirán generalmente la conjugación de péptidos (como los péptidos Ang2 (ABP)) a un anticuerpo (como el anticuerpo IGF1R), los enlazadores de azetidina no permitieron la conjugación de péptidos a anticuerpos a tasas aceptables (las reacciones requirieron excesos significativos de enlazadores de azetidina y fueron extremadamente lentas. La Tabla 19 presenta algunas consideraciones de cada uno de los enlazadores utilizados para preparar los MAC.

#### 20 Tabla 19: Procedimientos de activación a través de ésteres y cuadraratos de PFP

	PFP	Escuarato
<b>Facilidad de síntesis</b>	Fácil usando química de tiol/maleimida, más difícil con adición directa a péptidos	Fácil, reacciona con aminas
<b>Estabilidad de reactivo peptídico en condiciones que conducen a la reacción del enlazador con lisinas de superficie del anticuerpo</b>	Se hidroliza a ácido libre, semivida aprox. 4 h	Poca hidrólisis
<b>Enlace formado</b>	Amida	Escuaramida
<b>Velocidad de conjugación</b>	Rápida	Bastante lenta

	PPF	Escuarato
<b>Facilidad de alteración de la reactividad</b>	Fácil por adición de otros alcoholes, por ej., NHS, HOBt. Compuestos relacionados, por ej., éster de tetrafluorfenol son menos activos. La reactividad aumentada da como resultado un aumento concomitante de la velocidad de hidrólisis	Bastante fácil alterando el patrón de sustitución en fenol; como con PFP, formas más reactivas pueden estar sujetas a reacciones secundarias incluyendo la reacción con cadenas laterales de anticuerpo distintas de Lys

### Ejemplo 13 Localización de péptidos conjugados en el anticuerpo

Anticuerpo 2.12.1.fx ( $\alpha$ -IGF1R-1), usando el enlazador de 5PEG-PPF como se describe en el Esquema 11. Esto se determinó midiendo el peso molecular intacto (PM) del MAC-2 usando detección por espectrometría de masas por electronebulización, tiempo de vuelo después de la separación de proteína de sales y excipientes a través de una columna de cromatografía de exclusión por tamaño. Se muestran en la Figura 3 los datos de espectrometría de masas que demostraban el peso molecular intacto (PM) del anticuerpo 2.12.1.fx y 3 lotes del MAC-2. La Figura 2A muestra el 2.12.1.fx antes de la conjugación. Esta es una molécula uniforme que presenta un solo PM. Los lotes de MAC-2 presentan una distribución de péptidos conjugados a 2.12.1.fx; Se observan entre 1-4 adiciones de conjugación (CA). La cantidad relativa de cada forma es consistente entre los lotes y la forma más común en cada lote tiene 2 péptidos (SEQ ID NO: 27) unidos a cada anticuerpo 2.12.1.fx individual.

Por reducción de los enlaces disulfuro en el anticuerpo 2.12.1.fx, se observan por separado las cadenas ligeras y pesadas. La reducción de disulfuro se realiza tratando el anticuerpo 2.12.1.fx intacto con tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) 20 mM. La mezcla resultante de cadenas pesadas y ligeras se analiza para determinar el peso molecular intacto como se ha descrito anteriormente. Los datos mostrados en la Figura 9 proporcionan pruebas hacia la localización del ABP en el 2.12.1.fx. La mayoría de la cadena ligera (>65 %) en los lotes de MAC-2 está conjugada. La mayoría de la cadena ligera conjugada contiene 1CA. También se observa 2CA a un nivel menor. Casi todas las cadenas pesadas observadas (>90 %) no están modificadas, lo que sugiere que muy pocos de los péptidos conjugados se localizan en la cadena pesada.

Se usó un procedimiento de mapeo de péptidos para determinar la localización exacta de la conjugación. El procedimiento de mapeo de péptidos usado para analizar el MAC-2 era el siguiente: una alícuota de MAC-2 se desnaturizó con clorhidrato de guanidina 8M, se redujeron los puentes disulfuro con TCEP y los sulfhidrilos de cisteína resultantes se alquilaron con yodoacetamida. Esta muestra de proteína tratada se digirió después con la proteasa quimotripsina (proporción de MAC:proteasa 1:125 en peso). Los péptidos quimotripticos resultantes se detectaron después individualmente por espectrometría de masas después de la separación a través de una columna de cromatografía líquida C8. Con esta técnica, el MAC-2 se digirió por quimotripsina en las cadenas pesadas y ligeras en péptidos en las localizaciones señaladas en la secuencia (con balas) en la Figura 10. La detección por cromatografía líquida-espectrometría de masas (CL-EM) del PM de cada péptido se usó después para determinar qué restos de lisina estaban modificados por un péptido conjugado. Si un péptido estaba modificado por unión de un péptido conjugado, su PM se desplazaba en consecuencia.

Los fragmentos Y1, Y6, Y9, Y10, Y20, Y25, Y26, Y29, Y32, Y33, Y34, Y37, Y40 y Y43 de la cadena pesada contienen residuos de Lys. De estos, la conjugación peptídica se detectó en Y6, Y10, Y25, Y33 e Y37. Los fragmentos Y3, Y10, Y11, Y12, Y13, Y14, Y15 y Y16 de la cadena ligera contienen residuos de Lys. De estos, la conjugación se detectó en Y3, Y13 e Y15.

Se determinó que el fragmento de cadena ligera denominado Y15 (el 15º péptido quimotriptico en la cadena ligera desde el extremo N-terminal) estaba conjugado basándose en los datos mostrados en la Figura 11. El PM del fragmento Y15 modificado en MAC se detectó claramente. En la muestra de 2.12.1.fx no conjugado no había pruebas de fragmento Y15 modificado. El fragmento Y15 no modificado se observó tanto en MAC como en 2.12.1.fx. La magnitud de este fragmento es superior en la muestra de 2.12.1.fx porque todo este fragmento está presente en la forma no modificada. Como este fragmento está conjugado en el MAC-2, el nivel observado del fragmento Y15 no modificado disminuye, observándose en la Figura 11 como un pico con un área más pequeña.

La cantidad de conjugación de SEQ ID NO:27-5PEG observada en el fragmento de cadena ligera Y15 en MAC-2 se estima por medición del área de pico disminuida de Y15 no modificado. (Después de normalizar la intensidad de la señal, de modo que 2.12.1.fx no conjugado mostró 100 %, 3 lotes independientes de MAC-2 mostraron 17 %, 27 % y 22 % de fragmentos Y15 no conjugados, respectivamente.

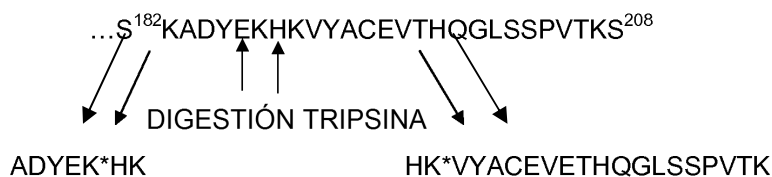
La magnitud observada de Y15 en las muestras de MAC se normalizó a la magnitud de Y15 en la muestra de 2.12.1.fx. Entre el 75-85 % de los fragmentos Y15 se determinan según se modifican en MAC-2. Teniendo en cuenta que MAC-2 contiene principalmente 1-2 adiciones de conjugación, esto sugiere que la mayor parte de la conjugación en MAC-2 se encuentra en uno de los residuos 2 K del fragmento de cadena ligera Y15 ( $K^{188}$  o  $K^{190}$ ). La ubicación del fragmento Y15 en relación con la secuencia de 2.12.1.fx se muestra en la Figura 4.

La digestión enzimática con tripsina se usó para discriminar entre  $K^{188}$  y  $K^{190}$  (la tripsina tiene especificidad por el extremo de K y R). Como la tripsina no digiere los restos de K conjugados, la digestión enzimática genera diferentes longitudes de péptidos dependiendo de qué resto de K esté conjugado. El examen de los datos de CLEM de MAC-2 que se digirió con tripsina proporciona pruebas de que el péptido se une específicamente a  $K^{188}$ ... No se observaron pruebas de  $K^{190}$  modificado.

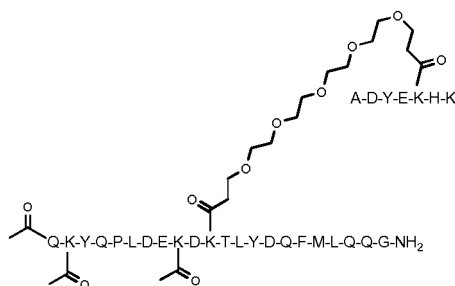
El MAC-2 se redujo con TCEP y se desnaturizó con clorhidrato de guanidina como se ha descrito anteriormente. La concentración de proteína se ajustó a 2 mg/ml y el pH a 7,8 con tampón de digestión con Tris. Se añadió tripsina

5 purificada a una proporción de MAC:proteasa de 1:125 en peso y se incubó a 30 °C durante 4 horas. Se almacenaron muestras a -20 °C hasta su análisis por CLEM. Se separaron muestras de fragmentos en una columna de fase inversa C18 usando fases móviles de agua/acetonitrilo + TFA al 0,1 %. La detección de fragmentos se controló tanto por UV a 214 nm como por espectrometría de masas IEN-TOF. Todos los análisis de datos se realizaron usando el programa informático MassLynx.

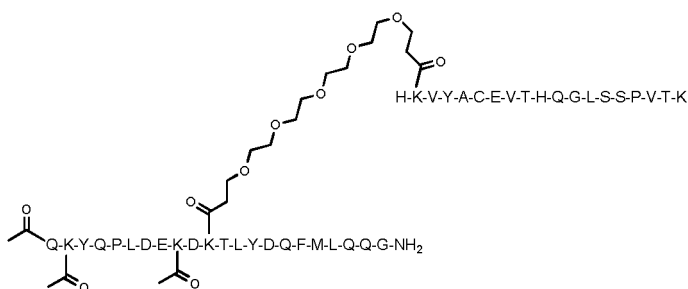
10 La formación de fragmentos tras la digestión con tripsina de MAC-2 depende del sitio de conjugación con péptido. Las lisinas son el resto diana para la conjugación. Los datos mostrados en las Figuras 2-5 indican que el sitio predominante de unión a péptido es K<sup>188</sup> o K<sup>190</sup>. El esquema a continuación muestra las reacciones de digestión con tripsina que se producen tras la conjugación en K<sup>188</sup> o K<sup>190</sup>,



Las estructuras químicas de los dos fragmentos de digestión potenciales en cuestión son las siguientes:



y



- 5 La Figura 6 muestra los datos de cromatograma de CLEM de ión seleccionado para el péptido con tripsina cuando  $K^{188}$  está modificado con ABP. La Figura 7 muestra los datos de cromatograma de CLEM de ión seleccionado para el fragmento de tripsina cuando  $K^{190}$  está modificado con un péptido conjugado. Estos datos sugieren que solo  $^{188}$  en solitario está conjugado; esta situación da como resultado una señal significativa que se detecta en MAC-2 pero está ausente en el experimento de control con 2.12.1.fx. Los resultados de la modificación en  $K^{190}$  no proporcionan ningún dato que sea único en comparación con el control negativo.
- 10 Al contrario de lo que podía esperarse, parece que el péptido/enlazador reviste preferentemente el  $K^{188}$  de la cadena ligera de 2.12.1.fx (K80 de SEQ ID NO: 15). Esto tiene la sorprendente ventaja de que la porción Fc del anticuerpo 2.12.1.fx no se ve afectada. Los ensayos muestran que la PK resultante de MAC-2 es aproximadamente igual a la PK del 2.12.1.fx no conjugado. La promiscua y no específica conjugación a múltiples sitios en un anticuerpo puede dar como resultado un producto con una PK más baja. La conjugación direccional de la invención, ejemplificada por
- 15 MAC-1 y MAC-2, proporciona la ventaja de minimizar algunos de los posibles efectos perjudiciales que pueden ser causados por la conjugación promiscua no específica, incluida la PK inferior.
- Para establecer la reproducibilidad del proceso, se repitió el experimento. MAC-2 se diluyó a 2 mg / ml y se analizó como una proteína conjugada intacta por cromatografía de exclusión por tamaño-espectrometría de masas (SEC-
- 20 MS) para determinar el número y la cuantificación de las formas conjugadas de la proteína. Esta técnica mide el peso molecular de cada forma de proteína; se observan múltiples sitios de conjugación como señales distintas separadas por la diferencia de masa de un péptido / conector conjugado. La cuantificación relativa de múltiples especies de conjugación se realiza midiendo la magnitud de la señal. La figura 8 muestra un espectro representativo de MAC-2; los cálculos utilizados para la cuantificación se muestran en la Tabla 20. Las adiciones de conjugación promedio para el MAC-2 intacto se calculan como 2.11 utilizando la siguiente fórmula: SUMPRODUCT (Número de adiciones de conjugación (CA), porcentaje por CA). Este ejemplo demuestra la conjugación de péptidos que se
- 25 produce como una distribución entre adiciones de péptidos 0-4, siendo la forma más grande 2 adiciones de péptidos y el número promedio de adiciones de péptidos es 2.11. El análisis de réplicas realizado por múltiples individuos demuestra que el perfil de conjugación es consistente y reproducible.

Tabla 20: promedio ponderado de las adiciones de conjugación: 2.11

Adiciones de conjugación	Masa pronosticada	Intensidad	Por ciento
0	149210	1615	1 %
1	152350	20533	17 %
2	155490	69395	56 %
3	158630	27708	22 %
4	161770	4818	4 %
		124069	100 %

La extensión de la conjugación de péptidos se examinó por separado en las cadenas ligera y pesada de 2.12.1.fx. El MAC-2 se desnaturalizó y los enlaces disulfuro se redujeron utilizando clorhidrato de guanidina y ditiotreitól. Las cadenas ligeras y pesadas libres resultantes se analizaron utilizando LCMS para determinar el perfil de conjugación en cada una. La figura 9 muestra un espectro representativo de cada cadena; el cálculo utilizado para la cuantificación se muestra en la Tabla 21. Las adiciones de conjugación promedio (CA prom.) para la cadena pesada reducida MAC-2 se calculan como 0,14 y la CA prom. para la cadena ligera reducida MAC-2 se calcula a 0,86 usando la siguiente fórmula:  $\text{SUMPRODUCT}(\text{Número de adiciones de conjugación (CA)}, \text{porcentaje por CA})$ . Estos datos demuestran que la ubicación de la conjugación es más alta en la cadena ligera; la forma más abundante en la cadena ligera contiene una adición de péptido y la cadena ligera contiene un promedio de 0,86 adiciones de péptidos. La conjugación en la cadena pesada se observa en un nivel significativamente más bajo. El análisis repetido de este experimento realizado por múltiples individuos demuestra que el perfil de conjugación es consistente y reproducible.

Tabla 21: Caracterización del mapeo de péptidos de MAC-2 que identifica la ubicación específica de la conjugación

Masa (da)	Adiciones de conj.	Especies	Intensidad	Por ciento	CA prom.
51020	0	HC	102093	86 %	
54165	1	HC + (1x) ABP-1	16204	14 %	
<b>HC total</b>			<b>118297</b>	<b>100 %</b>	<b>0,14</b>
23584	0	LC	19752	21 %	
26729	1	LC + (1x) ABP-1	68757	72 %	
29874	2	LC + (2x) ABP-2	6561	7 %	
<b>LC total</b>			<b>95070</b>	<b>100 %</b>	<b>0,86</b>

MAC-2 se redujo con ditiotreitól y los residuos de cisteína se alquilaron por carboximetilación con yodoacetamida. La quimotripsina se utilizó para la digestión proteolítica. Los fragmentos digeridos en solución se analizaron mediante cromatografía líquida de espectrometría de masas (LCMS). Los fragmentos individuales se separaron sobre una columna de HPLC C18 y su masa precisa se mide en un espectrómetro de masas Quarduple Time-of-Flight (Q-ToF). La masa del fragmento resultante se usó para identificar fragmentos no modificados o fragmentos modificados con un péptido conjugado. Este experimento se interpretó centrándose en fragmentos quimotripticos que contienen un residuo de lisina, ya que estos eran sitios posibles para la conjugación de péptidos. La Tabla 22 muestra una lista de todos estos fragmentos. Las entradas en blanco son fragmentos que no se detectan utilizando esta técnica. Los fragmentos detectados que se observan con un modificador peptídico se consideran sitios potenciales de conjugación. Las entradas de la tabla para la Tabla 16 se explican a continuación:

- Número de fragmento: Numeración de fragmentos de quimotripsina del extremo N; los fragmentos unidos (es decir, Y1-2) indican un sitio de escisión perdido.
- Inicio / Fin: Numeración de la ubicación del fragmento desde el N-terminal.
- Masa peptídica (Da): masa teórica del fragmento enumerado en Daltons.
- Tiempo de retención (control / analito): tiempo de retención / elución cromatográfica en el experimento de mapeo de fragmentos LCMS.
- Intensidad de la señal de la EM (control / analito): Magnitud de la señal observada por la EM.
- Error de masa - ppm (control / analito): comparación de la masa teórica con la masa observada del fragmento; los valores > 10, y especialmente más cerca de cero (0) demuestran una mejor precisión de la masa.
- Modificadores: Adiciones covalentes potenciales al fragmento; Fragmento de unión péptido-anticuerpo del residuo de Lys, CAM-carboximetilación del residuo de cisteína.
- Los asteriscos indican la versión modificada (por ejemplo, conjugada) del fragmento respectivo.

- Pep indica un conjugado peptídico.

5 La conjugación direccional de un péptido al fragmento Y15 se demuestra cuantificando el nivel de conjugación. El siguiente análisis se realizó en cada uno de los fragmentos de péptidos que se observaron con conjugación durante el experimento de mapeo de péptidos del producto de referencia 2.12.1.fx. La relación de la intensidad de la señal observada para el péptido no modificado en el control no conjugado (almazón 2.12.1.fx - sin conjugación) en comparación con el producto de referencia conjugado (MAC-2) se muestra en la Tabla 23. La señal no modificada se utiliza porque es posible una comparación directa de la misma señal peptídica en cada muestra. Por ejemplo, se espera que un péptido no conjugado tenga la misma intensidad de señal observada en las muestras de control frente a las del producto, lo que resulta en una relación de uno (1). La conjugación daría como resultado una disminución en la cantidad observada de péptido no modificado en la muestra del producto, lo que se indicaría con una relación mayor que uno (1). Los datos en la Tabla 23 se normalizaron aún más para corregir la muestra y la variación experimental entre el control y el producto. La Tabla 23 demuestra que el péptido de cadena ligera Y15 está conjugado a un nivel significativamente más alto que cada uno de los otros péptidos conjugados. Esto sugiere que la conjugación se produce de manera direccional y no se distribuye aleatoriamente a través de los residuos de K.

10

15

Tabla 22 - Caracterización del mapeo de péptidos del producto de referencia de la cadena ligera MAC-2

Número de fragmento	comienzo	Fin	Masa Peptídica (Da)	Tiempo de retención		Intensidad de la señal de MS		Error de masa (ppm)		Modificadores
				Controlar	Análito	Controlar	Análito	Controlar	Análito	
Y1	1	27	2617,3533							
Y1-2	1	29	2865,4695							
Y5-6	34	47	1657,8398							
Y6	37	47	1253,688	19,2	19,2	516640	583534	1,9	-1,1	
Y6-7	37	50	1602,8518	22,1	22,1	26537	37988	-1,6	-2,2	
Y6-7 *	37	50	3295,7017		21,8		6316		-19,4	Pep (1)
Y8-9	51	68	1931,9337	16,5	16,5	60894	85742	-2,2	0,4	
Y9	61	68	878,461	11,3	11,3	376224	412997	0	-1	
Y9-10	61	80	2241,1501							
Y10	69	80	1380,6997	13,3	13,3	261813	299847	-1,1	0,7	
Y10 *	69	80	3073,5498		23,4		6350		-8,7	Pep (1)
Y10-011	69	94	2972,4661							
Y19-20	111	157	4748,2773							
Y20	116	157	4160,0405							
Y20-21	116	166	5202,5527							
Y20-21 *	116	166	5316,5957	34,1		6445		0,5		CAM (2)
Y24-25	202	245	4702,2109							
Y25	207	245	4151,9722							
Y25 *	207	245	4437,0796	20,9	20,9	1495322	1800079	1,1	-3,1	CAM (5)

(continuación)

Número de fragmento	comienzo	Fin	Masa Peptídica (Da)	Tiempo de retención		Intensidad de la señal de MS		Error de masa (ppm)		Modificadores
				Controlar	Análito	Controlar	Análito	Controlar	Análito	
Y25 *	207	245	6129,9297		24,4		6652		-4,5	CAM (5) Pep (1)
Y25-26	207	279	7985,9092							
Y26	246	279	3851,9478							
Y26-27	246	281	4152,0698							
Y28-29	282	300	2245,1128							
Y29	283	300	2082,0493	14,6	14,6	20665	16662	-0,6	-3,8	
Y29-30	283	304	2531,2405							
Y31-32	305	323	2241,1907							
Y32	318	323	722,3599	7,9	7,9	93966	96639	0,1	2,6	
Y32	318	323	722,3599	17,7	18,4	37943	12802	11,4	30,6	
Y32	318	323	722,3599	18,4		11761		23,8		
Y32-33	318	353	4028,188							
Y33	324	353	3323,8386	20		5422		3,1		
Y33 *	324	353	3380,8601	19,7	19,7	2196329	2497507	-2,5	-3,1	CAM (1)
Y33 *	324	353	5073,71		24		5973		1,3	CAM (1) Pep (1)
Y33-34	324	376	5883,1577							
Y34	354	376	2577,3293							



(continuación)

Número de fragmento	comienzo	Fin	Masa Peptídica (Da)	Tiempo de retención		Intensidad de la señal de MS		Error de masa (ppm)		Modificadores
				Controlar	Analito	Controlar	Analito	Controlar	Analito	
Y34-35	354	385	3637,8159							
Y34-35 *	354	385	3694,8374	33	32,9	10095	20682	1,9	-2,4	CAM (1)
Y36-37	386	408	2527,0808							
Y37	396	408	1394,6388	19,6	19,6	62942	71902	-0,9	-0,4	
Y37-38	396	409	1541,7072	25,1	25,1	827336	878570	0	-1,9	
Y37-38 *	396	409	3234,5571		29,7		7749		-5,3	Pep (1)
Y39-40	410	421	1494,8195							
Y40	412	421	1218,672	15,8	15,8	77917	88243	-0,3	-1,6	
Y40-41	412	427	1891,9905	20,3	20,3	107513	149676	0,2	-2	
Y42-43	428	450	2525,1792							
Y43	441	450	1016,5502							
Y2-3	36	49	1688,9725	16,2	16,2	145374	170451	-1,7	-2,6	
Y2-3 *	36	49	3381,8225		24,2		7192		-9,2	Pep (1)
Y3	37	49	1525,9093	15,5	15,5	331068	393638	-2,7	-2,9	
Y3 *	37	49	3218,7593		24		28193		-9	Pep (1)
Y3-4	37	62	2882,6355							
Y9-10	88	116	3244,729							
Y10	99	116	1871,0992							
Y10-11	99	139	4331,335							

(continuación)

Número de fragmento	comienzo	Fin	Masa Peptídica (Da)	Tiempo de retención		Intensidad de la señal de MS		Error de masa (ppm)		Modificadores
				Controlar	Análito	Controlar	Análito	Controlar	Análito	
Y11	117	139	2478,2463		22,8		47035		-5,9	
Y11-12	117	148	3635,8445							
Y12	140	148	1175,6088							
Y12-13	140	173	3886,8245							
Y13	149	173	2729,2263	13,1	13,1	1140556	1218022	-1,1	0,1	
Y13 *	149	173	4422,0762		21,4		8424		-6,5	Pep (1)
Y13-14	149	186	4095,9243							
Y14	174	186	1384,7086							
Y14-15	174	192	2169,1318							
Y15	187	192	802,4337	7,5	7,5	275639	62720	-1,9	-0,2	
Y15 *	187	192	2495,2837		20,9		936267		-9,8	Pep (1)
Y15-16	187	209	2574,29							
Y16	193	209	1789,8668	18,7		5400		4,4		
Y16 *	193	209	1846,8883	18,1	18,1	169490	235914	-1,7	-2,5	CAM (1)
Y16-17	193	214	2349,0842	17,8		9211		0,1		

**Tabla 23: Conjugación direccional del péptido al fragmento Y15 en la cadena ligera**

Fragmento	Relación de intensidad no modificada: control / analito normalizado
Ligera y3	1,000
Ligera y13	1,112
Ligera y15	5,218
Y6 Pesada	0,831
Y10 Pesada	1,038
Pesada y25	0,988
Pesada y33	1,045
Pesada y37	1,120

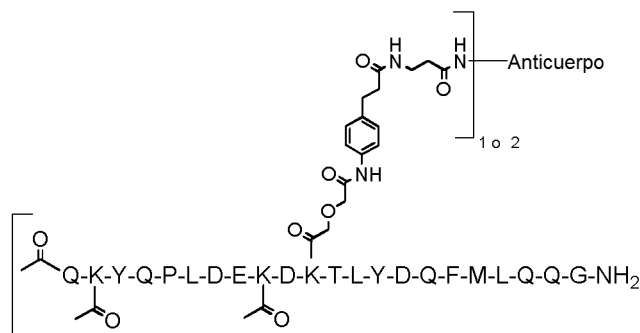
**Ejemplo 13 ELISA de Unión a Ang1-4**

Se revistieron placas de semipocillos de alta unión con Ang1 humana, Ang2 humana, Ang3 de ratón o Ang4 humana recombinante (todos los reactivos de R&D Systems, 250 µg/ml) en 50 µl de PBS y se incubaron a 4 °C durante una noche. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado (Tween 20 al 0,1 %, PBS, pH 7,4) y se bloquearon con Superblock, 150 µl/pocillo a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado. Después del lavado, se añadió una solución de dosificación preparada (intervalo: 0,005-50,000 ng/ml) a la placa y se incubó durante 1 hora para permitir la unión de los compuestos a los miembros de la familia Ang revestidos en las placas. Los controles positivos para cada angiopoyetina incluían anticuerpos monoclonales o policlonales contra cada miembro de la familia (suministrados por R&D Systems). Las placas se lavaron 3 veces y se añadieron 50 µl de anti-IgG humana conjugado con HP (0,8 µg/ml) (o de las especies respectivas para los controles positivos) y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavaron 3 veces y se añadieron 50 µl (25 µl TMB + 25 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) de solución de sustrato y se incubaron durante 1-5 minutos. El desarrollo de color se detuvo con 25 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M. Se midió la DO450 nm con una longitud de onda de corrección de 540 nm.

**Ejemplo 14 Ensayo de competición inverso de Ang2**

Para el ELISA de competición inverso de Ang2, se usó Tie2 humano-Fc, proteína angiopoyetina-2, anticuerpo anti-Ang2 humana biotinilado y estreptavidina HP (R&D Systems) y sustrato TMB de Pierce. Se revistieron placas de semipocillos de alta unión con Tie2-Fc (50 ng/pocillo) en 50 µl de PBS y se incubaron a 4 °C durante una noche. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado (Tween 20 al 0,1 %, PBS, pH 7,4) y se bloquearon con Superblock, 150 µl/pocillo a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado. Después del lavado, se añadieron 50 µl de un compuesto de péptido de unión a Ang2 (50 nM, dilución seriada 5x) en presencia de 50 ng/ml (0,83 nM) de Ang2 en Superblock y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavaron 3 veces, se añadieron 50 µl de anticuerpo de detección anti-Ang2 biotinilado 1 µg/ml en Superblock y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Las placas se lavaron 3 veces y se añadieron 50 µl de estreptavidina HP (dilución 1:200 en Superblock) a temperatura ambiente durante 20 minutos. Las placas se lavaron 3 veces y se añadieron 50 µl (25 µl TMB + 25 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) de solución de sustrato y se incubaron durante 20-30 minutos. Se detuvo el desarrollo de color con 25 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M. Se midió la DO450 nm con una longitud de onda de corrección de 540 nm. Se calcularon los valores de CI<sub>50</sub> (inhibición del 50 % de la unión de Ang2-Tie2) usando la función sigmoïdal no lineal de ajuste de curva de respuesta a la dosis en el programa informático Prism 4.

El Ang2-h38C2 se usó como control en ciertos ejemplos. La generación y la estructura del Ang2-h38C2 se describe totalmente como compuesto 43 en el documento WO2008056346, cuyo contenido se incorpora en el presente documento, con referencia particular a los aspectos relacionados con la generación de compuesto 43. En resumen, la estructura es la siguiente:



en la que el enlazador está unido covalentemente al grupo  $\epsilon$ -amino de K<sup>99</sup> (K<sup>93</sup> de acuerdo con la numeración de Kabat) del sitio de combinación del anticuerpo y el anticuerpo es h38C2-IgG1 (SEC ID NO: 51 y 52) (SEC ID NO: 189 y SEC ID NO: 190 de WO2008/056346).

#### Ejemplo 15 Ensayo de Competición de IGF1R

5 Para el ELISA de competición de IGF-1R, se usó IGF-1R humano recombinante (R&D Systems), IGF-1 biotinilado (GroPep Ltd.), estreptavidina-poli-HP20 (SDT), Superblock y sustrato TMB (Pierce). Se revistieron placas de semipocillos de alta unión con IGF-1R (62,5 ng/pocillo) en 50  $\mu$ l de PBS y se incubaron a 4 °C durante una noche. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado (Tween 20 al 0,1 %, PBS, pH 7,4) y se bloquearon con Superblock, 150  $\mu$ l/pocillo a temperatura ambiente durante 1 h. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado. Después del lavado, se añadieron 50  $\mu$ l de un compuesto de unión a IGF-1R (1  $\mu$ M, dilución seriada 5x) en presencia de 100 ng/ml (13,3 nM) de IGF1 biotinilado en Superblock y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavaron 3 veces y se añadieron 50  $\mu$ l de estreptavidina-poli-HP 20 (dilución 1:5000 en Superblock) a temperatura ambiente durante 20 minutos. Las placas se lavaron 3 veces y se añadieron 50  $\mu$ l (25  $\mu$ l TMB + 25  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) de solución de sustrato y se incubaron durante 5-10 minutos. El desarrollo de color se detuvo con 25  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M. Se midió la DO450 nm con una longitud de onda de corrección de 540 nm. Se calcularon los valores de Cl<sub>50</sub> (inhibición del 50 % de la unión de IGF1 a IGF1R) usando una función sigmoidal no lineal de ajuste de curva de respuesta a la dosis en el programa informático Prism 4. Cl<sub>50</sub>

#### Ejemplo 16 Ensayo de Inhibición de la Autofosforilación de IGF-1R Inducida por IGF1

20 Para el ensayo de inhibición de la autofosforilación de IGF-1R, las células eran células 3T3 de ratón modificadas por ingeniería genética para expresar IGF-1R humano y la fosforilación se determinó mediante un kit de ELISA de tipo sándwich de fosfo-receptor de IGF1  $\beta$  (TyR<sup>1131</sup>) N° 7302 de Cell Signaling Technologies. Se sembraron células intactas que expresaban IGF-1R humano (5,0 x 10<sup>4</sup> células/pocillo) en una placa de fondo redondo tratada con cultivo tisular de 96 pocillos, y se dejó que se unieran durante una noche en 50  $\mu$ l de medio de cultivo (37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %, medio de cultivo que consistía en DMEM con FBS al 10 %, L-Glutamina 2 mM, Penicilina-Estreptomina y Geneticina 500  $\mu$ g/ml). Después de 16 horas, el medio de cultivo se eliminó por aspiración y se añadieron 50  $\mu$ l por pocillo de nuevo medio de cultivo que contenía un compuesto de unión a IGF-1R (1 mM, dilución seriada 8x) en presencia de 100 ng/ml (13,3 nM) de IGF1 humano recombinante, y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. La placa se lavó mediante eliminación por aspiración del líquido y se añadieron 100  $\mu$ l por pocillo de PBS helado. El PBS frío se eliminó inmediatamente por aspiración y se añadieron 60  $\mu$ l de tampón de lisis (comenzando con el tampón de lisis, todos los reactivos siguientes se suministraron como parte de un kit comercial fabricado por Cell Signaling Technologies, diseñado para cuantificar la fosforilación de IGF-1R en la tirosina 1131) a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos con agitación. Después, las placas se centrifugaron a 4 °C durante 5 minutos. Después se retiró el sobrenadante (50  $\mu$ l por pocillo) y se añadió a una placa de 96 pocillos previamente revestida con un anticuerpo de conejo contra Fosfo-Receptor de IGF-1 beta (TyR<sup>1131</sup>) y que contenía 50  $\mu$ l por pocillo de un diluyente de muestra. Las placas se incubaron durante una noche durante 16 horas a 4 °C con agitación suave. Después de la incubación, las placas se lavaron 4 veces con tampón de lavado y se añadieron 100  $\mu$ l de un anticuerpo de detección de receptor de IGF1 humano (de origen murino) a cada pocillo durante 1 hora a 37 °C. Las placas se lavaron 4 veces con tampón de lavado y se añadieron 100  $\mu$ l de un anticuerpo secundario contra IgG de ratón unido a HP a cada pocillo durante 30 minutos a 37 °C. Las placas se lavaron 4 veces y se añadieron 100  $\mu$ l de sustrato TMB a cada pocillo y se incubaron durante 30 minutos. El desarrollo de color se detuvo con 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M. Se midió la DO450 nm con una longitud de onda de corrección de 540 nm. Los controles internos con y sin tratamiento con IGF1 confirmaron la especificidad del acontecimiento de fosforilación y determinaron el % de inhibición de la señalización transmembrana. Se calcularon los valores de CE50 (concentración a la que se consiguió la señal semimáxima) usando una función sigmoidal no lineal de ajuste de curva de respuesta a la dosis en el programa informático Prism 4.

#### Ejemplo 17 Ensayo de regulación negativa de IGF-1R

Para la regulación negativa de IGF-1R, se usaron células de adenocarcinoma de colon humano Colo205 y se determinó la expresión en superficie celular de IGF-1R por citometría de flujo. Se trataron placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos sembradas con 5 x 10<sup>4</sup> células/pocillo en medio de cultivo (RPMI, suero bovino fetal al 10 %, glutamina) con una valoración de compuesto durante 3 horas a 37 °C. Las células se aclararon con PBS, se levantaron con un CellStripper y se transfirieron a placas de 96 pocillos recién preparadas. Las células se lavaron tres veces con PBS con suero bovino fetal al 2,5 %. Las células se incubaron con un monoclonal de ratón anti-IGF1R humano conjugado con ficoeritrina (R&D FAB391P, 10  $\mu$ l/5 x 10<sup>5</sup> células) en la oscuridad durante una hora. Después, las células se lavaron tres veces con PBS con suero bovino fetal al 2,5 %. La presencia de IGF-1R en la superficie celular se determinó mediante citometría de flujo usando un FACSArray y los datos se analizaron con el programa informático FloJo. El número de receptores se calculó por ajuste de los datos a curvas patrón generadas usando perlas de PE QuantiBRITE (BD 340495). Los datos se describieron como el porcentaje de regulación negativa por compuesto de ensayo frente al control negativo hlgG2.

#### Resultados y Discusión

60 La capacidad de MAC-2 para unirse a Ang2 humana específicamente se muestra en la Figura 16. El MAC-2 y el Ang2-h38c2 eran capaces de unirse a la Ang2 humana pero no a Ang1 humana, Ang4 humana o Ang3 de ratón, mostrando alta especificidad por Ang2 y no por otros miembros de la familia de la angiopoyetina.

MAC-1 y MAC-2 eran capaces de unirse a Ang2 y evitar su unión a Tie2, como se muestra en el ensayo de competición de Ang2 (Figura 11 y Tabla 24). Sorprendentemente, en comparación con Ang2-h38c2, el MAC-1 y el MAC-2 mostraban ambos un aumento en la capacidad para unirse competitivamente a Ang2. Después de confirmar que los MAC conjugados se unían a e inhibían la unión de Ang2 a Tie2, la capacidad para competir por la unión de IGF-1 a IGF-1R se determinó por ensayo de competición de IGF-1R (Figura 18). El MAC-1 y el MAC-2 eran tan

eficaces como el anticuerpo anti-IGF-1R parental (2.12.1.fx) para competir con IGF-1 por la unión a IGF-1R. MAC-1 y MAC-2 mostraban valores de  $CI_{50}$  en el intervalo nanomolar bajo. Por el contrario, en ensayos con ciertos otros anticuerpos anti-IGF-1R, se observó que la conjugación del péptido interfería con la capacidad del anticuerpo para interactuar con IGF-1R (no se muestran los datos).

- 5 Para confirmar que la inhibición de IGF observada en el ensayo de competición se traduce en la inhibición de los acontecimientos de señalización inducidos por IGF, se usó un ensayo funcional basado en células para determinar la inhibición de la autofosforilación de IGF-1R después de la estimulación con IGF (Figura 13 y Tabla 24). MAC-1 y MAC-2 tienen una actividad similar a la del anticuerpo anti-IGF-1R precursor (2.12.2.fx); por lo tanto, la conjugación de péptidos Ang2 limitados no parece cambiar la unión e inhibición innatas de MAC.
- 10 Además de inhibir la autofosforilación de IGF-1R, el anticuerpo anti-IGF-1R también causa la internalización y la degradación de IGF1R, dando como resultado la regulación negativa del receptor. Este comportamiento se observa en las 2 horas siguientes al tratamiento y se mantiene durante 24 horas. Los MAC se ensayaron para determinar la capacidad para regular negativamente los niveles de IGF1R en una línea celular de carcinoma de colon humano Colo205. Las células se trataron durante 3 horas en cultivo con valoración de compuestos MAC. Las células se recogieron y se determinó la expresión en superficie de IGF-1R por citometría de flujo. Se determinó el porcentaje de IGF-1R regulado negativamente en comparación con el control negativo hlgG2 (Tabla 3). MAC-1 y MAC-2 tienen una actividad de regulación negativa de IGF-1R similar al anticuerpo contra IGF-1R precursor (2.12.1.fx).
- 15

**Tabla 24: Capacidad de MAC-1 y MAC-2 para unirse a y modular IGF1R y Ang2**

	Ang2 $CI_{50}$ (nM)	IGF-1R $CI_{50}$ (nM)	Fosforilación IGF-1R $CI_{50}$ (nM)	% IGF-1R regulado negativamente
MAC-1	0,092 ± 0,049	5,1 ± 1,1	150,7 ± 59,6	43 ± 5
MAC-2	0,057 ± 0,022	6,1 ± 1,1	91,4 ± 40,2	50 ± 5
Anticuerpo $\alpha$ -IGF-1R	nd	3,8 ± 0,8	48,7 ± 14,0	48 ± 3
Ang2-h38c2	0,582 ± 0,242	nd	nd	nd

- 20 Se demostró que la conjugación de 2 péptidos por anticuerpo era ideal en términos de efectuar la autofosforilación y regulación negativa de IGF1R y que la conjugación de más o menos de 2 péptidos por anticuerpo disminuye la capacidad del MAC para efectuar estas funciones.

Para evaluar el efecto del número de péptidos por anticuerpo sobre la capacidad de 2.12.1.fx para modular la actividad de IGF-1R, se prepararon dos muestras de MAC-1 en las que las condiciones de reacción se ajustaron para proporcionar una conjugación reducida (MAC-1 reducido) o una conjugación aumentada (MAC-1 elevado) (véase la Tabla 25). Las muestras se analizaron para determinar la capacidad de regular a la baja y fosforilar IGF1R (Tabla 25). Existe una diferencia significativa en la capacidad del MAC-1 alto en comparación con el MAC-1 bajo para modular de manera efectiva la vía IGF1R. La conjugación de más de aproximadamente 2 péptidos por anticuerpo limita la actividad funcional del MAC tanto para inhibir la autofosforilación de IGF1R como para inducir la regulación a la baja de IGF1R, en comparación con la conjugación de aproximadamente 2 o menos péptidos por anticuerpo. Por lo tanto, para modular eficientemente 2 rutas biológicas diferentes en una entidad bifuncional, la conjugación de aproximadamente 2 péptidos por anticuerpo puede ser ideal (dependiendo del perfil farmacocinético del péptido y de la diana).

25

30

**Tabla 25: análisis de MAC-1-Alto y MAC-1 Bajo.**

	Ang2 $CI_{50}$ (nM)	% IGF1R regulado a la baja	Fosforilación IGF1R $CI_{50}$ (nM)	CA (%)						CA prom.
				0	1	2	3	4	5	
MAC-1 bajo	0,103	32 ± 1	12.8	14	42	32	12	0	0	1,42
MAC-1 Alto	0,035	9 ± 2	>300	0	4	19	41	32	5	3,18
2.12.1.fx	ND	36 ± 3	3,5							
Ang2-h38c2-IgG1	0,252	ND	ND							

35

### Ejemplo 18 Farmacocinética *in vivo*

#### Protocolo

Se usó un procedimiento de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de unión directa validado para medir los niveles séricos de MAC en suero de ratón y mono. En resumen, el MAC en la muestra se une a IGF-1R o Ang2 que se ha absorbido pasivamente sobre una placa de microtitulación, y se usa un anti-IgG humana conjugado con peroxidasa de rábano picante junto con un sustrato cromogénico para generar una señal que sea proporcional a la concentración de MAC-2 en la muestra de suero. Los límites de cuantificación superior e inferior de MAC-2 en

40

suero de ratón son de 26,0 y 1000 ng/ml, y de 52,0 y 2000 ng/ml en suero de mono cynomolgus.

**ELISA Inverso de Ang2 e IGF-1R**

Se revistieron placas de semipocillos de alta unión con IGF1R (62,5 ng/pocillo) o Ang2 (6,25 ng/ml) en 50 µl de PBS y se incubaron a 4 °C durante una noche. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado (Tween 20 al 0,1 %, PBS, pH 7,4) y se bloquearon con Superblock, 150 µl/pocillo a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado. Después de lavar, se añadieron patrones de solución de dosificación preparados (intervalo: 3,91-500 ng/ml) y muestras de suero a la placa y se incubaron durante una hora para permitir la unión de los complejos de MAC al Ang2 o IGF1R revestido en las placas. Las placas se lavaron 3 veces y se añadieron 50 µl de un anti-IgG humana de cabra conjugado con HP (0,8 µg/ml) y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavaron 3 veces y se añadieron 50 µl (25 µl TMB + 25 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) de solución de sustrato y se incubaron durante 1-5 minutos. Se detuvo el desarrollo de color con 25 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M. Se midió la DO450 nm con una longitud de onda de corrección de 540 nm. Se calcularon las concentraciones en suero de los complejos de MAC usando las curvas patrón. Las concentraciones de complejo de MAC, según se determinaron por ELISA, estaban representadas en función del tiempo. Se emprendieron análisis de datos adicionales usando WinNonlin versión 4.1 (Pharsight Corporation) para determinar la semivida β (T1/2) y el área bajo la curva (AUC) para los complejos de MAC.

**Ratón**

Se realizaron estudios de PK usando ratones Swiss Webster macho (CFW, Charles River, Hollister, CA) que pesaban aproximadamente 20-22 gramos al inicio de la dosificación. Los compuestos de MAC se administraron por vía intravenosa. Se tomaron muestras de sangre de 4 ratones por punto temporal a los siguientes puntos temporales: 0,08, 0,5, 1, 3, 5, 7 y 24 horas. Se añadió cóctel inhibidor de proteasas a todos los tubos de sangre antes de la recogida de muestras. Se dejó que la sangre coagulara en hielo durante 30 minutos y después se centrifugó a 12000 rpm durante 5-10 minutos a 4 °C para recoger el suero y se almacenó inmediatamente a -80 °C hasta su análisis por ELISA. Se utilizaron soluciones de dosificación para establecer las curvas estándar para el análisis de muestras de suero mediante ELISA inverso con Ang2 o IGF1R. Las alícuotas de cada muestra de suero se analizaron mediante ELISA inverso con Ang2 o IGF1R.

**Mono**

Se determinó el perfil farmacocinético de MAC-2. Se usaron dos monos Cynomolgus macho (Macaca fascicularis) en el estudio; se administró MAC-2 mediante una inyección intravenosa (en embolada) a un nivel de dosis de 10 mg/kg. Todos los animales se observaron a 5 min, 15 min, 1 h, 4 h y 8 h post-dosis el Día 1 y dos veces al día después de eso para cualquier reacción al tratamiento. Los pesos corporales se midieron y se registraron los Días 1, 2, 3, 4, 5, 7 y 14. Se obtuvieron muestras de sangre para análisis toxicocinético a los puntos temporales designados y el suero se separó y se almacenó a -80 °C.

No se observaron signos clínicos adversos durante el estudio que pudieran estar relacionados con el tratamiento con MAC-2. Los perfiles de peso corporal eran satisfactorios. Se recogieron muestras de sangre de aproximadamente 1,0 ml de la vena femoral de cada animal y en tubos de coagulación lisos a los puntos temporales (0,08-504 horas). Las muestras de sangre se dejaron reposar durante una hora a temperatura ambiente después de la recogida y después se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Las muestras de suero resultantes se almacenaron a aproximadamente -80 °C antes del análisis.

**Resultados**

Se realizaron estudios farmacocinéticos (PK) no GLP exploratorios en ratones Swiss Webster macho y monos cynomolgus macho (Tablas 5 y 6). Se analizaron las actividades de unión tanto a Ang2 como a IGF1R del MAC. En ratones, MAC-1 y MAC-2 demostraron un tiempo de permanencia similar al del anticuerpo anti-IGF-1R precursor con semividas de fase beta de 383-397 horas. La capacidad de unión a Ang 2 de MAC-1 y MAC-2 demostró un tiempo de permanencia similar a Ang2-h38c2 con semividas de fase beta de 105-120 horas en ratón en estudios IV de dosis única. En mono cynomolgus, el MAC-2 demostró un tiempo de permanencia ligeramente más corto que el anticuerpo anti-IGF-1R precursor, con semividas de fase beta de 100,4 horas. La capacidad de unión a Ang2 de MAC-2 demostró un tiempo de permanencia similar a Ang2-h38c2 con semividas de fase beta de 97,8 horas.

**Tabla 26: dosis única de PK de IV administradas por MAC a 10 mg / mk en ratones**

Compuesto (mg.Kg <sup>-1</sup> )	Beta t <sup>1/2</sup> (hora)	Beta t <sup>1/2</sup> (hora)
	Porción ang2	Porción de IGF1R
Ang2-h38c2, (10)	95.2	--
anticuerpo α-IGF1R, (10)	--	390
MAC-1, (10)	105	383
MAC-2, (10)	120	397

50

Tabla 27: dosis única de PK de IV administrados por MAC a 10 mg / mk en mono cynomolgus

Compuesto (mg.Kg <sup>-1</sup> )	Beta t <sup>1/2</sup> (hora)	Beta t <sup>1/2</sup> (hora)
	Porción ang2	Porción de IGF1R
Ang2-h38c2, (10) mpk	95.3	--
anticuerpo α-IGF1R, (5) mpk	--	146.4
MAC-2, (10) mpk	97.8	100,4

### Ejemplo 19 Farmacología in vivo

#### Protocolo

La actividad antitumoral de MAC-2 se evaluó en el modelo de xenoinjerto de Colo205 (adenocarcinoma de colon humano) o MDA-MB-435 (melanoma). Se cultivaron células Colo205 o MDA-MB-435 con medio RPMI con FBS al 10 % y se inyectaron 3 x 10<sup>6</sup> células en 0,1 ml de solución salina equilibrada de Hank (HBSS) por vía subcutánea en el flanco derecho superior de ratones nu/nu hembra de 5-7 semanas de edad, y se dejó que se establecieran hasta un volumen de 200-400 mm<sup>3</sup> antes del inicio del tratamiento. Una vez que se establecieron los tumores, los ratones se aleatorizaron a grupos de tratamiento con volúmenes tumorales idénticos (n = 9-10/grupo) y el tratamiento con MAC-2 se administró una vez por semana por inyección intraperitoneal (IP). En estudios de combinación, se administraron agentes anticancerosos adicionales semanalmente por inyección IP, iniciándose los tratamientos concomitantes con el MAC-2. Se midieron los volúmenes tumorales una vez o dos veces por semana usando calibradores, y se midieron los pesos corporales semanalmente durante el periodo de tratamiento. En algunos estudios, todos los ratones se eutanasiaron por asfixia con CO<sub>2</sub> y los tumores se escindieron, se pesaron y se procesaron para evaluación histológica y/o inmunoquímica adicional una vez que el volumen tumoral en el grupo de control tratado con vehículo alcanzó los 2000 mm<sup>3</sup>. En estudios de pseudo-supervivencia, los ratones se eutanasiaron por asfixia con CO<sub>2</sub> y los tumores se escindieron y se pesaron una vez que el volumen tumoral medio de cada grupo de tratamiento superó los 2000 mm<sup>3</sup>.

#### Resultados

Un experimento realizado en el modelo de xenoinjerto de Colo205 (adenocarcinoma de colon humano) se ilustra en las Figuras 12A y 13A. La administración semanal de Ang2-h38c2 o anticuerpo anti-IGF1R (2.12.1.fx) inhibía el crecimiento del tumor Colo205. La combinación de Ang2-h38c2 y anticuerpo anti-IGF1R administrada semanalmente mostró un beneficio aditivo sobre la inhibición del crecimiento del tumor Colo205. La administración semanal de MAC-2 en solitario mostró un beneficio similar al de la combinación (Figura 14A). En un estudio separado, el MAC-2 inhibía de forma dependiente de la dosis el crecimiento del tumor Colo205 y los pesos tumorales finales (Figura 15A, B).

A día 28, los ratones tratados con compuesto se sacrificaron y los tumores se escindieron y se congelaron inmediatamente. Para evaluar el efecto antiangiogénico de MAC-2, se evaluó la densidad de microvasos tumorales inmunohistoquímicamente en secciones congeladas de tumores de xenoinjerto de adenocarcinoma de colon Colo205 tratados con Vehículo (PBS) o MAC-2 (respuesta a la dosis que varía de 0,3 mg/kg a 10 mg/kg). Los tumores se tiñeron con un anticuerpo monoclonal específico de ratón contra CD31 y se cuantificó la inmunorreactividad a partir de cinco áreas de tres secciones de cada tumor (Figura 13C). La densidad de microvasos tumorales se redujo significativamente ~42 % por MAC-2 (10 mg/kg, una vez por semana) en comparación con el grupo tratado con vehículo, confirmando la actividad antiangiogénica del tratamiento con MAC-2.

Para investigar si el MAC-2 se dirige tanto a Ang2 como a IGF1R in vivo, los efectos del MAC-2 sobre los niveles de expresión de Ang2 e IGF1R se evaluaron en dos tumores de xenoinjerto Colo205 independientes tratados con Vehículo, Ang2-h38c2, anticuerpo contra IGF-1R (2.12.1.fx) o MAC-2 (respuesta a la dosis que varía de 0,3 mg/kg a 10 mg/kg). Se prepararon lisados a partir de tumores escindidos congelados y se cuantificó la inmunorreactividad contra Ang2 e IGF-1R por ELISA. La inmunorreactividad contra Ang2 e IGF-1R se redujo significativamente por tratamiento con MAC-2 de una forma dependiente de la dosis (1, 3 y 10 mg/kg) en comparación con el grupo tratado con Vehículo (Figura 14B, 15D y 15E). El efecto de MAC-2 sobre los niveles de IGF-1R es similar al observado para un anticuerpo antagonizante de IGF-1R (2.12.1.fx) (Figura 14B). Además, los niveles de IGF-1R fosforilado se redujeron en tumores de animales tratados con MAC-2 (no se muestran los datos). La inmunofluorescencia en secciones fijadas de estos tumores también confirmó la reducción en IGF-1R y pIGF-1R (no se muestran los datos). Estos datos demuestran que el tratamiento con MAC-2 afecta a las rutas tanto de Ang2 como de IGF-1R en el modelo de xenoinjerto Colo205.

En tres estudios separados, el tratamiento con MAC-2 condujo a una inhibición tumoral sostenida en comparación con los grupos con vehículo (PBS), Ang2-h38c2 y anticuerpo contra IGF-1R (2.12.1.fx y 2.13.2) (Figuras 16A, 16B, 16C). El anticuerpo anti-IGF1R 2.13.1 se describe como las SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 47 en el documento WO02/053596, menos las secuencias señal respectivas. La inhibición tumoral por MAC-2 era similar a la combinación de Ang2-h38c2 y 2.12.1.fx y más activo que Ang2-h38c2 y 2.13.2 (Figura 16C). El tratamiento con MAC-2 no afectó al aumento de peso corporal (no se muestran los datos) y los ratones parecían estar en buen estado de salud durante todo el estudio. Se dejó que los tumores en cada grupo de animales progresaran hasta 2000 mm<sup>3</sup> como un estudio de pseudo-supervivencia. Los grupos tratados tanto con Ang2-h38c2 como con anticuerpo anti-IGF-1R tuvieron que interrumpirse a día 48; sin embargo, los tumores tratados con MAC-2 (3-10 mpk) estaban todavía por debajo de 2000 mm<sup>3</sup> a día 94 cuando el estudio se paró.

La eficacia antitumoral de MAC-2 también se evaluó en un modelo de xenoinjerto de melanoma MDA-MB-435. La administración semanal de MAC-2 (3 y 20 mg/kg IP) dio como resultado una reducción significativa del 40 % (día 67)

en el crecimiento tumoral en el modelo de MDA-MB-435 (Figura 17). Por lo tanto, el MAC-2 demuestra una eficacia antitumoral significativa en dos modelos de tumores de xenoinjerto humano diferentes.

**Ejemplo 20 Perfil de conjugación de péptidos de diversos anticuerpos**

Se analizaron los perfiles de conjugación de varios anticuerpos diferentes con péptidos, utilizando la SEC ID NO: 27 y 5PEG como un péptido y conector de ejemplo respectivamente. Todos los anticuerpos analizados fueron anticuerpos IgG humanos o totalmente humanizados con interacciones antigénicas bien definidas y caracterizadas. hAbλTest comprende un CLλ, mientras que 2.12.1.fx, mAbκTest1, h28C2-IgG1 (SEC ID NO: 51 y 52) y h38C2-IgG2 (SEC ID NO: 53 y 54) cada una comprende CLκ. Cada uno de los anticuerpos se intercambió con tampón en HEPES 20 mM, pH 7,0 y se concentró a 5-20 mg / ml. SEC ID NO: 27 / K<sup>11</sup>-5PEG-PFP se resuspendió con propilenglicol al 50 % y se mezcló con el anticuerpo relevante en una relación molar de 4,3: 1 y se dejó reaccionar durante al menos 2 horas a temperatura ambiente. Todas las muestras se diluyeron a 2 mg / ml y se analizaron como una proteína conjugada intacta por cromatografía de exclusión por tamaño - espectrometría de masas (SEC-MS) para determinar el número y la cuantificación de las formas conjugadas de la proteína. Esta técnica mide el peso molecular de cada forma de proteína; Se observan múltiples sitios de conjugación de péptidos como señales distintas separadas por la diferencia de masa de un péptido unido. La cuantificación relativa de múltiples especies de conjugación de péptidos se realiza midiendo la magnitud de la señal. La tabla 22 muestra el perfil de conjugación peptídica de diversos anticuerpos.

Para los anticuerpos que contienen un CLκ, la conjugación de péptidos se produce en una distribución entre 0-4 adiciones de péptidos, siendo la forma más grande de 2 a 3 adiciones de péptidos. En contraste, para el anticuerpo que comprende CLλ, hAbλTest, la conjugación del péptido se produce en una distribución entre 0-4 adiciones de péptidos, siendo la forma más grande de 1 a 2 adiciones de péptidos.

La extensión de la conjugación de péptidos se examinó por separado en las cadenas ligera y pesada. Cada muestra se desnaturalizó y los enlaces disulfuro se redujeron utilizando clorhidrato de guanidina y ditioneitol. Las cadenas ligeras y pesadas libres resultantes se analizaron utilizando LCMS para determinar el perfil de conjugación en cada una. El perfil de conjugación peptídica en la cadena ligera y pesada de varios anticuerpos se muestra en la Tabla 28. En 2.12.1.fx y hAbκTest1, los datos demuestran que la ubicación de la conjugación es más alta en la cadena ligera; la forma más abundante en la cadena ligera contiene una (1) adición de péptidos. La conjugación en la cadena pesada se observa en un nivel significativamente más bajo. En h38C2-IgG1 y h38C2-IgG2, se observan niveles comparables de conjugación en la cadena ligera y pesada, con una ligera preferencia de conjugación en la cadena ligera. En un anticuerpo que contiene CLλ (hAbλTest), la mayoría de la conjugación se produce en la cadena pesada con un bajo nivel de conjugación observado en la cadena ligera.

**Tabla 28: Perfil de conjugación de diversos anticuerpos**

Anticuerpo	CA (%)					CA prom.	% de CA de la cadena ligera			% de CA de la cadena pesada		
	0	1	2	3	4		0	1	2	0	1	2
2.12.1.fx	1	15	53	26	5	2,2	20	70	9	84	16	0
prueba de hAbλ	10	37	37	11	6	1,66	95	5	0	74	22	4
hAbκTest1	7	10	35	27	14	2,55	11	74	14	87	13	0
h38C2 IgG1	1	3	28	55	13	2,75	49	46	4	70	30	0
h38C2 IgG2	4	6	31	44	15	2,6	61	35	4	73	27	0

Cada uno de los anticuerpos 2.12.1.fx, hAbλTest y hAbκTest1 se evaluó después del proceso de conjugación para determinar el efecto de las adiciones de conjugación sobre la capacidad del anticuerpo para retener su unión al receptor (en comparación con el mAb natural) (Tabla 29). Los resultados muestran que la conjugación direccional de péptidos a los anticuerpos de prueba no parece alterar la unión del anticuerpo.

**Tabla 29: Unión de anticuerpo a antígeno nativo antes y después de la conjugación**

Anticuerpo	Unión del receptor	
	Nativo (CI <sub>50</sub> , nM)	Después de la conjugación (CI <sub>50</sub> , nM)
2.12.1.fx	3,2	5,7
prueba de hAbλ	0,4	1,7
hAbκTest1	59	53

**Ejemplo 21 Perfil de conjugación peptídica de un anticuerpo representativo de IgG2-κ**

Se analizó el perfil de conjugación de un anticuerpo IgG2 κ (hAbκTest2) con un péptido 39-mer. El anticuerpo se concentró a 8 mg / ml y se intercambió en tampón en HEPES 40 mM, pH 8,0. El péptido se resuspendió con DMSO al 100 % y se mezcló con el anticuerpo en una relación molar de 5,0: 1 y se dejó reaccionar durante la noche a temperatura ambiente. Todas las muestras se diluyeron a 2 mg / ml y se analizaron como una proteína conjugada



5 intacta por cromatografía de exclusión por tamaño - espectrometría de masas (SEC-MS) para determinar el número y la cuantificación de las formas conjugadas de la proteína. Esta técnica mide el peso molecular de cada forma de proteína; Se observan múltiples sitios de conjugación de péptidos como señales distintas separadas por la diferencia de masa de un péptido. La cuantificación relativa de múltiples especies de conjugación de péptidos se realiza midiendo la magnitud de la señal. La Tabla 30 muestra el perfil de conjugación peptídica de hAbkTest2 con el péptido 39-mer. La conjugación del péptido se produce en una distribución entre 0-4 adiciones de péptidos con un promedio de 2,03 adiciones de péptidos, y es consistente con la conjugación direccional en el CLK-K<sup>188</sup>.

**Tabla 30: Perfil de conjugación del péptido 39-mer y hAbkTest2**

Armazón anticuerpos	Péptido de unión	%CA					CA prom.
		0	1	2	3	4	
<b>hAbkTest2</b>	<b>39-mer péptido</b>	1	22	53	18	5	2.03

10 En un experimento separado, el péptido 39-mer se conjugó con h38C2-IgG2 con MAL-2PEG-PFP como se describe anteriormente, a diferentes concentraciones molares. Además, se ensayó la unión del receptor relacionado para el péptido 39-mer. Los resultados (Tabla 31) mostrados son consistentes con la conjugación direccional en K<sup>188</sup>-CLK. Además, el aumento del número promedio de péptidos por anticuerpo no aumentó sustancialmente la unión general al objetivo. Esto demuestra que en ciertos escenarios, aumentar la conjugación por anticuerpo puede no aumentar la unión a la diana, lo que demuestra una de las ventajas de la invención; el control del número de péptidos que conjugan por anticuerpo puede ayudar a lograr la máxima unión a la diana por unidad de péptido.

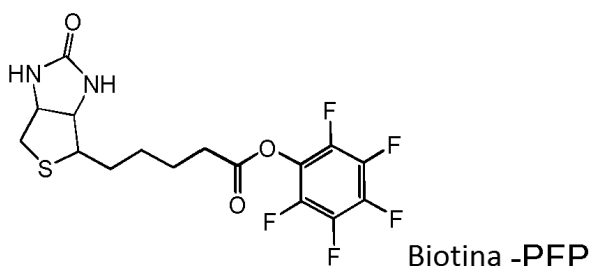
**Tabla 31: Perfil de conjugación del péptido 39-mer y H38C2-IgG2**

Péptido de 39-mer: h38C2-IgG2 relación molar	CA (%)				Prom. N.º de conjugados	Objetivo peptídico: CE <sub>50</sub> (nM)
	0	1	2	3		
<b>2:1</b>	57	32	10	0	0,52	0,99
<b>2,5:1</b>	19	56	25	0	1,06	1.06
<b>4:1</b>	20	25	35	20	1,55	1.01
<b>5:1</b>	0	16	45	40	2,26	0,82

### Ejemplo 22 Conjugación de biotina a 2.12.1.fx Fab

#### 20 Biotina-2.12.1.fx

Se analizó el perfil de conjugación de la región Fab de 2.12.1.fx (SEQ ID NO: 50 y 4) con PFP-Biotina. El anticuerpo Fab se concentró a 20 mg / ml y se intercambió en tampón en acetato de sodio 20 mM + trehalosa 200 mM, pH 5,5 y se enriqueció con fosfato de sodio 60 mM pH 7,7. La PFP-Biotina se resuspendió con DMSO al 100 % y se mezcló con el anticuerpo en relaciones molares sucesivas y se dejó reaccionar durante la noche a temperatura ambiente. Todas las muestras se diluyeron a 2 mg / ml y se analizaron como una proteína conjugada intacta por cromatografía de exclusión por tamaño - espectrometría de masas (SEC-MS) para determinar el número y la cuantificación de las formas conjugadas. Esta técnica mide el peso molecular de cada forma de proteína; se observan múltiples sitios de conjugación como señales distintas separadas por la diferencia de masa de un péptido conjugado. La cuantificación relativa de múltiples especies de conjugación se realiza midiendo la magnitud de la señal. La Tabla 32 muestra el perfil de conjugación de 2.12.1.fx Fab con PFP-Biotina en relaciones molares. La conjugación de ocurre en una distribución entre 0-2 adiciones a medida que aumenta la relación molar. El menor número de moléculas por anticuerpo fue consistente con los resultados anteriores, según la relación molar utilizada. Esta es una demostración útil de la flexibilidad del proceso para controlar la cantidad de conjugación al alterar uno o más de los parámetros de reacción.



35

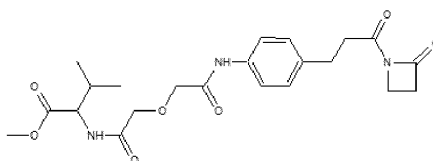
Tabla 32: Perfil de conjugación de biotina a 2.12.1.fx Fab

Armazón de anticuerpos	Péptido de unión	Péptido: Proporción molar de anticuerpo	%CA				CA prom.
			0	1	2	3	
2.12.1.fx Fab	Biotina-PFP	1:1	54	46	-	-	0,46
2.12.1.fx Fab	Biotina-PFP	1,5:1	42	51	7	-	0,65
2.12.1.fx Fab	Biotina-PFP	2:1	34	55	10	-	0,76
2.12.1.fx Fab	Biotina-PFP	3:1	28	55	17	-	0,88
2.12.1.fx Fab	Biotina-PFP	4:1	21	46	26	8	1,21

## Ejemplo 23 Conjugación de biotina con h38C2-IgG1

## Biotina-h38C2-IgG1

- 5 El anticuerpo h38C2-IgG1 se ajustó a 20 mg / ml con tampón HEPES de pH 7,5 a una concentración final de 0,02M. La biotina-PFP se reconstituyó en agua a 10 mg / ml y se añadió a h38C2-IgG1 en una proporción molar de 5: 1 y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas. La PFP-Biotina sin reaccionar se eliminó mediante
- 10 cromatografía de exclusión por tamaño y el tampón se intercambió en un tampón de histidina, glicina y sacarosa de pH 6,5. Las muestras se diluyeron a 2 mg / ml y se analizaron como una proteína conjugada intacta por cromatografía de exclusión por tamaño - espectrometría de masas (SEC-MS) para determinar el número y la
- 15 cuantificación de las formas conjugadas de la proteína. La Tabla 33 muestra el perfil de conjugación de h38C2-IgG1 con Biotina-PFP. La conjugación de h38C2-IgG1 ocurre en una distribución entre 0-3 CA con un promedio de 1,1 conjugaciones. Sería posible una mayor conjugación después de la optimización de las condiciones de reacción. La reactividad de VH-K<sup>39</sup> (K<sup>33</sup> según la numeración de Kabat) en h38C2-IgG1 se confirmó que era > 95 % cuando se hizo reaccionar con el compuesto de prueba de anticuerpos catalíticos CATC-1, y se analizó mediante cromatografía de fase inversa.



CATC-1

h38C2-IgG1

Tabla 33: Conjugación de biotina y

Anticuerpo	0	1	2	3	CA prom.
h38C2-IgG1	16	61	20	3	1,1

20 Ejemplo 24 Perfil de conjugación de 2.12.1.fx y mutantes K<sup>188</sup>, K<sup>190</sup>

- Basado en el mapeo de péptidos, hay 2 Lys en el fragmento Y15. Para distinguir el sitio de conjugación activa, K<sup>188</sup> y K<sup>190</sup> fueron mutados a R respectivamente o en combinación. Los mutantes se generaron siguiendo los protocolos descritos en el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange (Stratagene). Las mutaciones se introdujeron mediante cebadores oligonucleotídicos y se confirmaron mediante secuenciación del ADN. Los mAb mutados se expresaron transitoriamente en células HEK 293 y se purificaron usando una columna de afinidad de proteína A. Los mAb purificados se caracterizaron utilizando MS. Las SEQ ID NO: 33, 34 y 35 muestran las secuencias de la cadena ligera mutante IGF1r 2.12.1.fx.

- El anticuerpo se intercambió con tampón a 0,02 M de tampón HEPES pH 7,5 o 6,5 a 2 mg / ml. Si el pH era 6,5, el anticuerpo se añadía con fosfato de sodio 60 mM, pH 7,7. SEC ID NO: 27-K<sup>11</sup>La 5PEG-PFP se resuspendió con propilenglicol al 50 % y se mezcló con la proteína en una relación molar de 4,3: 1 y se dejó reaccionar durante la noche a temperatura ambiente. Todas las muestras se diluyeron a 2 mg / ml y se analizaron como una proteína conjugada intacta por cromatografía de exclusión por tamaño - espectrometría de masas (SEC-MS) para determinar el número y la cuantificación de las formas conjugadas de la proteína. Esta técnica mide el peso molecular de cada forma de proteína; Se observan múltiples sitios de conjugación como señales distintas separadas por la diferencia de masa de una proteína conjugada. La cuantificación relativa de múltiples especies de conjugación de proteínas se realiza midiendo la magnitud de la señal. La Tabla 34 muestra el perfil de conjugación de 2.12.1.fx sin modificar, 2.12.1.fx-K<sup>188</sup>R (LC: SEC ID N.º: 33), 2.12.1.fx-K<sup>190</sup>R (LC: SEC ID NO: 34) y 2.12.1.fx-K<sup>188</sup>R-K<sup>190</sup>R (LC: SEC ID N.º: 35). K<sup>188</sup>El mutante R mostró una conjugación reducida. K<sup>190</sup>R tenía una conjugación similar a la 2.12.1.fx no

conjugada. La conjugación de MAC-2 fue menor que la observada en otros ensayos debido al uso de una combinación de tampón HEPES / fosfato.

**Tabla 34: Perfil de conjugación de 2.12.1.fx, K<sup>188</sup> y R<sup>190</sup> mutantes**

LC SEQ ID NO:	Mutantes	CA (%)					CA prom.
		0	1	2	3	4	
15	MAC-2	14	49	31	5	1	1,29
33	K <sup>188</sup> R	82	14	4	0	0	0,22
34	K <sup>188</sup> R	11	46	36	6	0	1,37
35	K <sup>188</sup> R / K <sup>190</sup> R	51	37	9	3	0	0,63

**Ejemplo 25 2.12.1.fx mutantes para dilucidar el mecanismo de conjugación direccional en K<sup>188</sup>**

5 Residuos cerca de K<sup>188</sup> fueron examinados. H<sup>189</sup> La cadena lateral está muy cerca del grupo ε-amino de K<sup>188</sup>. Ya que His está a menudo involucrado en las reacciones de transferencia de protones, H<sup>189</sup> es muy probable que se requiera para K<sup>188</sup> conjugación. Para estudiar el papel de H<sup>189</sup> en K<sup>188</sup> En la conjugación específica del sitio, eliminamos el anillo de imidazol reemplazando la histidina con alanina.

10 D<sup>151</sup>A y D<sup>151</sup>A / H<sup>189</sup>A se hicieron mutantes para estudiar el papel de D<sup>151</sup> En la conjugación específica del sitio y el efecto combinado de D<sup>151</sup> y H<sup>189</sup>.

15 Los mutantes se generaron siguiendo los protocolos descritos en el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange (Stratagene). Las mutaciones se introdujeron mediante cebadores oligonucleotídicos y se confirmaron mediante secuenciación del ADN. Los mAb mutados se expresaron transitoriamente en células HEK 293 y se purificaron usando una columna de afinidad de proteína A. Los mAb purificados se caracterizaron utilizando MS. Se generaron los siguientes mutantes de la cadena ligera de 2.12.1.fx: D<sup>151</sup>A (SEC ID N°: 36), K<sup>188</sup>A (SEC ID N°: 37), H<sup>189</sup>A (SEC ID N°: 38), K<sup>190</sup>A (SEC ID NO: 39) y D<sup>151</sup>A / H<sup>189</sup>A (SEC ID N°: 40).

20 Cada uno de los anticuerpos se intercambió con tampón a acetato de sodio 20 mM, 200 m trehalosa pH 5,5 a 20 mg / ml. Las proteínas se enriquecieron con fosfato de sodio 60 mM, pH 7,7. SEC ID NO: 27-K<sup>188</sup>La 5PEG-PFP se resuspendió con propilenglicol al 50 % y se mezcló con el anticuerpo en una relación molar de 4,3: 1 y se dejó reaccionar durante la noche a temperatura ambiente. Todas las muestras se diluyeron a 2 mg / ml y se analizaron como una proteína conjugada intacta por cromatografía de exclusión por tamaño-espectrometría de masas (SEC-MS) para determinar el número y la cuantificación de las formas conjugadas de la proteína. Esta técnica mide el peso molecular de cada forma de proteína; se observan múltiples sitios de conjugación como señales distintas separadas por la diferencia de masa de un péptido conjugado. La cuantificación relativa de múltiples especies de conjugación se realiza midiendo la magnitud de la señal.

La Tabla 35 muestra el perfil de conjugación de 2.12.1.fx, 2.12.1.fx-D<sup>151</sup>A, 2.12.1.fx-K<sup>188</sup>A, 2.12.1.fx-H<sup>189</sup>A, 2.12.1.fx-K<sup>190</sup>A, y 2.12.1.fx-D<sup>151</sup>A / H<sup>189</sup>A mutantes. Todos los mutantes mostraron un nivel de conjugación promedio reducido en comparación con el anticuerpo 2.12.1.fx no modificado, excepto K<sup>190</sup>A, que mantenía la conjugación direccional.

30 La extensión de la conjugación se examinó por separado en las cadenas ligeras y pesadas. Cada muestra se desnaturizó y los enlaces disulfuro se redujeron utilizando clorhidrato de guanidina y ditiotreitól. Las cadenas ligeras y pesadas libres resultantes se analizaron utilizando LCMS para determinar el perfil de conjugación en cada una. El perfil de conjugación en la cadena ligera y pesada de 2.12.1.fx y los mutantes se muestran en la Tabla 35. Todos los mutantes enumerados en la tabla mostraron un nivel de conjugación reducido en la cadena ligera en comparación con el 2.12.1.fx no modificado, excepto K<sup>190</sup>A. El nivel de conjugación de la cadena pesada de los mutantes se encontraba en un nivel similar al del 2.12.1.fx no modificado.

**Tabla 35: Perfil de conjugación de MAC-2 y K<sup>188</sup>A, D<sup>151</sup> y H<sup>189</sup> mutantes**

SEQ ID NO: de CL	Mutantes	CA (%)					CA prom.	LC CA %			LC CA prom.-LC	HC CA %			HC CA prom.-HC
		0	1	2	3	4		0	1	2		0	1	2	
15	MAC-2	1	15	53	26	5	2.2	23	69	8	0,85	86	14	0	0,14
36	D <sup>151</sup> A	17	38	31	14	0	1,41	68	30	1	0,33	79	21	0	0,21
37	K <sup>188</sup> A	56	31	10	4	0	0,61	89	11	0	0,11	91	9	0	0,09
38	H <sup>189</sup> A	34	44	17	6	0	0,95	89	11	0	0,11	78	22	0	0,22
39	K <sup>190</sup> A	9	7	31	37	16	2,42	8	77	15	1.06	83	17	0	0,17
40	D <sup>151</sup> A / H <sup>189</sup> A	34	39	18	9	0	1,02	83	17	0	0,17	87	13	0	0,13

**Ejemplo 26 Sustitución de Lambda / kappa.**

El LCλ en hAbλTest1 se sustituyó con LCκ para determinar si esto aumentaba el nivel, la direccionalidad y / o el control de la derivatización del LC. Las construcciones híbridas de sustitución del dominio LCλ / LCκ se generaron utilizando PCR solapada. LVλ y LCκ se amplificaron por PCR utilizando hAbλTest y una cadena ligera kappa mAb como plantillas por separado. Estos 2 productos de PCR se mezclaron como plantillas; El cebador directo hAbλTest1 y el cebador inverso LCκ se usaron en la reacción de PCR solapada para amplificar el ADN de hAbλTest LV / LCκ de longitud completa. Las construcciones de anticuerpos híbridos se expresaron transitoriamente en células HEK 293 y se purificaron utilizando una columna de afinidad de proteína A. Los anticuerpos purificados se caracterizaron utilizando MS. El híbrido hAbλTest LCκ se unió a su receptor análogo de manera similar al mAb nativo (hAbλTest) (Tabla 36). Las SEQ ID NO: 41, 42 y 43 son las regiones constantes de la cadena ligera de hAbλTest, hAbλTest-λκ (con λJ), y hAbλTest-λκJ (con κJ).

**Tabla 36: Anticuerpo: unión al antígeno de la sustitución lambda / Kappa**

Habλtest1 Mutantes	SEQ ID NO: de CL	Unión del receptor (Cl <sub>50</sub> , nm)
Habλtest (CONTROL)	41	0,4
Habλtest-λκ	42	0,3
Habλtest-λκJ	43	0,3

**EJEMPLO 27 mutantes hAbλTest1: modificación del motivo**

Para establecer si el motivo corto "KH" era suficiente para la formación de MAC en la región correspondiente del CLA, un mutante con un simple cambio de secuencia de residuos CLA<sup>188/189</sup> en hAbλTest para colocar una histidina junto a K<sup>187</sup> se hizo, por lo tanto, "K<sup>187</sup>S<sup>188</sup>H<sup>189</sup>" se convirtió en "K<sup>187</sup>H<sup>188</sup>S<sup>189</sup>". Los mutantes se generaron siguiendo los protocolos descritos en el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange (Stratagene). Las mutaciones se introdujeron mediante cebadores oligonucleótidos y se confirmaron mediante secuenciación del ADN. Las construcciones de anticuerpos mutados se expresaron de forma transitoria en las células HEK 293 y se purificaron utilizando una columna de afinidad de proteína A. Los anticuerpos purificados se caracterizaron utilizando MS.<sup>188</sup>S.S<sup>189</sup> El mutante S (LC: SEQ ID NO: 44) se unió a su receptor, al igual que el anticuerpo parental hAbλTest (Tabla 37).

**Tabla 37: hAbλTest-S<sup>188</sup>S.S<sup>189</sup>S**

hAbλTest1 Mutantes	SEQ ID NO: de CL	Unión del receptor (Cl <sub>50</sub> , nM)
hAbλTest (CONTROL)	41	0,3
hAbλTest-S <sup>188</sup> S.S <sup>189</sup> S	44	0,4

**Ejemplo 28 Perfil de conjugación de mutantes hAbλTest1**

Cada anticuerpo (hAbλTest, hAbλTest-λκ, hAbλTest-λκJ y hAbλTest-S<sup>188</sup>S.S<sup>189</sup>S) se cambió el tampón a acetato de sodio 20 mM, 200 m trehalosa pH 5,5 a 20 mg / ml. Las proteínas se enriquecieron con fosfato de sodio 60 mM, pH 7,7. SEC ID NO: 27 / K<sup>11</sup> La 5PEG-PFP se resuspendió con propilenglicol al 50 % y se mezcló con el anticuerpo en una relación molar de 4,3: 1 y se dejó reaccionar durante la noche a temperatura ambiente. Todas las muestras se diluyeron a 2 mg / ml y se analizaron como una proteína conjugada intacta por cromatografía de exclusión por tamaño - espectrometría de masas (SEC-MS) para determinar el número y la cuantificación de las formas conjugadas de la proteína. Esta técnica mide el peso molecular de cada forma de proteína; Se observan múltiples sitios de conjugación de péptidos como señales distintas separadas por la diferencia de masa de un péptido. La cuantificación relativa de múltiples especies de conjugación de péptidos se realiza midiendo la magnitud de la señal. La Tabla 38 muestra que el nivel general de conjugación se ha incrementado en los 2 híbridos con cambio de LC (λκ y λκJ - el primero incluye un fragmento lambda J, el último incluye un fragmento kappa J). El nivel de conjugación aumenta con respecto al promedio de CA del control hAbλTest, yendo de 1,66 a 2,19 (λκ) y 2,53 (λκJ) respectivamente. El mutante tuvo poco efecto en comparación con la secuencia nativa, lo que sugiere que el motivo "KH" solo no es suficiente para la formación de MAC.

La extensión de la conjugación de péptidos se examinó por separado en las cadenas ligeras y pesadas (Tabla 38). Cada muestra se desnaturalizó y los enlaces disulfuro se redujeron utilizando clorhidrato de guanidina y ditiotreitól. Las cadenas ligeras y pesadas libres resultantes se analizaron utilizando LCMS para determinar el perfil de conjugación en cada una. En los análisis reducidos, el LC de hAbλTest nativo tiene solo un 5 % de 1CA, pero esto salta dramáticamente al 58 % de 1CA para hAbλTest-λκ y un 63 % de 1CA para hAbλTest-λκJ. El interruptor LC tuvo poco efecto sobre el nivel de conjugación de HC, que se mantuvo bastante constante (excepto para λκJ, donde la conjugación de HC aumentó moderadamente). Nuevamente, el mutante tuvo poco efecto en comparación con la secuencia nativa, lo que sugiere que el motivo "KH" solo no es suficiente para la formación de MAC.

Tabla 38: Perfil de conjugación de mutantes hAbλTest

hAbλTest Mutantes	SEQ ID NO: de CL	CA (%)					CA prom.	LC CA %			Promedio CA- LC	HC CA %			CA prom.- HC
		0	1	2	3	4		0	1	2		0	1	2	
prueba de hAbλ	41	10	37	37	11	6	1,66	95	5	0	0,05	74	22	4	0,3
hAbλTest-λκ	42	3	18	43	29	7	2,19	42	58	0	0,58	78	22	0	0,22
hAbλTest-λκJ	43	2	11	34	36	17	2,53	33	63	4	0,71	64	36	0	0,36
hAbλTest-S <sup>188</sup> S <sup>189</sup> S	44	7	34	37	16	6	1,79	82	18	0	0,18	79	21	0	0,21

5 Los atributos de unión al receptor de estas formas conjugadas también se evaluaron para determinar el efecto de la conjugación con la SEC ID NO: 27 / K<sup>11</sup>-5PEG-PFP sobre la capacidad de los anticuerpos conjugados para unirse todavía a su receptor (Tabla 39).

Tabla 39: Anticuerpo: unión al antígeno de lambda en los anticuerpos

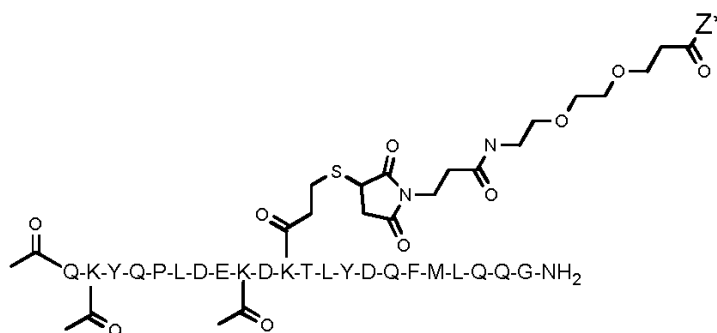
SEQ ID NO: 27 mutantes hAbλTest1 conjugados	SEQ ID NO: de CL	Unión del receptor (Cl <sub>50</sub> , nM)
prueba de hAbλ	41	1,7
hAbλTest-λκ	42	1,5
hAbλTest-λκJ	43	1,6
hAbλTest1-S <sup>188</sup> S <sup>189</sup> S	44	1,6

#### EJEMPLO 29 Generación de MAC utilizando diferentes grupos salientes.

10 Para investigar si el grado de activación y / o estructura del grupo saliente del éster activo fue importante para definir el efecto de conjugación direccional, una serie de análogos de éster activados alternativamente de la SEC ID NO: 27-K<sup>11</sup>(SH) Se sintetizaron MAC-2PEG-PFP. La distribución del producto conjugado se examinó por MS de los conjugados intactos, y el grado de adición de péptidos tanto a las cadenas ligeras como pesadas también se determinó por MS tras la reducción del conjugado intacto y la separación de las cadenas ligeras y pesadas.

15 La estructura y las designaciones de los ésteres activados alternativamente se muestran a continuación. Los péptidos activados alternativamente se sintetizaron utilizando las mismas estrategias y métodos mostrados anteriormente en los Ejemplos 1-3. En resumen, cada grupo activado se incorporó en un enlazador maleimida-2PEG-Z \*, donde Z \* representó el nuevo grupo saliente que reemplaza a la PFP. Para sintetizar los compuestos anteriores, se disolvió una muestra (30-40 mg) del péptido ABP-tiol purificado (es decir, ABP con K(SH) como residuo de enlace) en DMF anhídrico (2 ml). Se añadió MAL-PEG2-Z \* (20 mg) junto con N-metilmorfolina (5 ml). La reacción se agitó y se controló a temperatura ambiente por HPLC para seguir el curso de tiempo de formación del producto. La conversión completa del péptido de partida para activar el producto ABP unido a éster se observó dentro de 2 a 6 horas. La solución se filtró y el pico del producto se aisló directamente mediante HPLC semipreparativa. Los productos se aislaron en rendimientos que oscilan entre aproximadamente el 30 y el 50 %, después de la liofilización.

25 Las reacciones de conjugación se llevaron a cabo bajo las condiciones estándar. En resumen, la solución de anticuerpo 2.12.1.fx se preparó diluyendo la solución 2.12.1.fx con fosfato de sodio, pH 7,7 a una concentración final de 0,06M. Por separado, la solución de péptido se preparó disolviendo el péptido a 20 mg / ml en propilenglicol, luego diluyendo esta solución a 10 mg / ml con agua. Para la reacción de conjugación, las soluciones de péptido y anticuerpo se mezclaron en una relación molar de 4: 1 durante el período prescrito. Para los estudios de curso de tiempo, las muestras de la solución de conjugación se detuvieron en varios puntos de tiempo mezclando una muestra de la reacción de conjugación con una solución de ácido succínico 40 mM, glicina 200 mM, pH 4,0 (1: 1, v / v) . El transcurso del tiempo de las reacciones de conjugación fue seguido por HPLC. SEQ ID NO: 27 se usó como un péptido ejemplar.



SEC ID NO: 27-K<sup>11</sup>-MAL-2PEG-Z \*

**Tabla 40: ésteres reactivos - conjugación intacta a las 24 horas**

	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6	Z7	Z8	Z9	Z10	Z11	Z12
<b>CA</b>	PFP	2,3,4 TFP	2,3,6 TFP	2,3,6 TCP	2,6 DCP	2,4 DCN	5,7 DCQ	NH5 NB2,3 DCI	2HI 1,3 D	4NP	2,6- DFP	1 NAP
<b>0</b>	3	32	17	100	81	38	73	34	20	41	50	100
<b>1</b>	34	45	43	0	19	45	25	40	36	42	39	0
<b>2</b>	51	20	30	0	0	16	2	18	31	15	11	0
<b>3</b>	12	3	11	0	0	2	0	5	12	3	0	0

- 5 La Tabla 40 muestra la distribución final del producto de los conjugados intactos 24 horas después del inicio de la reacción de conjugación. Los resultados muestran que algunos de los ésteres no reaccionaron en absoluto (Z4, Z12), otros reaccionaron lentamente (por ejemplo, Z5), mientras que varios dieron perfiles que se aproximaban a los de PFP (Z1) (por ejemplo, Z3).

**Cinética de conjugación**

- 10 Las tasas de adición a lo largo del tiempo para cada uno de los conjugados finales se muestran en las Tablas 41, 42, 43 y 44. OCA representa el anticuerpo 2.12.1.fx sin derivar, mientras que 1, 2 o 3CA representan adiciones de 1, 2 o 3 péptidos a el anticuerpo 2.12.1.fx en cada uno de los periodos de tiempo examinados.

**Tabla 41: Cinética de conjugación de diferentes grupos Z\* que producen 0 CA**

OCA	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6	Z7	Z8	Z9	Z10	Z11	Z12
<b>tiempo (h)</b>	PFP	2,3,4 TFP	2,3,6 TFP	2,3,6 TCP	2,6 DCP	2,4 DCN	5,7 DCQ	NH5 NB2,3 DCI	2HI 1,3 D	4NP	2,6- DFP	1 nap
<b>0</b>	84	97	94	100	100	100	100	95	95	96	100	100
<b>1</b>	5	83	58	100	100	95	96	43	24	79	93	100
<b>2</b>	4	75	40	100	100	89	93	42	20	67	88	100
<b>4</b>	4	62	27	100	96	81	88	40	20	54	79	100
<b>24</b>	3	32	17	100	81	38	73	34	20	41	50	100

Tabla 42: Cinética de conjugación de diferentes grupos Z \* que producen 1 CA

1CA	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6	Z7	Z8	Z9	Z10	Z11	Z12
tiempo (h)	PFP	2,3,4 TFP	2,3,6 TFP	2,3,6 TCP	2,6 DCP	2,4 DCN	5,7 DCQ	NH5 NB2,3 DCI	2HI 1,3 D	4NP	2,6-DFP	1 nap
0	16	3	6	0	0	0	0	5	5	5	0	0
1	38	17	36	0	0	5	4	39	39	21	8	0
2	37	25	45	0	0	11	7	39	38	29	12	0
4	33	34	43	0	4	19	12	42	39	37	21	0
24	34	45	43	0	19	45	25	40	36	42	39	0

Tabla 43: Cinética de conjugación de diferentes grupos Z \* que dan 2 CA

2CA	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6	Z7	Z8	Z9	Z10	Z11	Z12
tiempo (h)	PFP	2,3,4 TFP	2,3,6 TFP	2,3,6 TCP	2,6 DCP	2,4 DCN	5,7 DCQ	NH5 NB2,3 DCI	2HI 1,3 D	4NP	2,6-DFP	1 nap
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	49	0	6	0	0	0	0	15	27	0	0	0
2	50	0	14	0	0	0	0	16	30	4	0	0
4	52	4	25	0	0	0	0	15	29	9	0	0
24	51	20	30	0	0	16	2	18	31	15	11	0

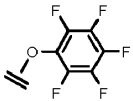
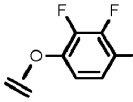
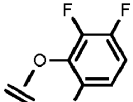
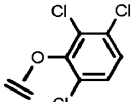
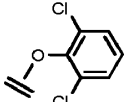
5 **Tabla 44: Cinética de conjugación de diferentes grupos Z \* que producen 3 CA Distribución de cadenas ligeras y pesadas**

3CA	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6	Z7	Z8	Z9	Z10	Z11	Z12
tiempo (h)	PFP	2,3,4 TFP	2,3,6 TFP	2,3,6 TCP	2,6 DCP	2,4 DCN	5,7 DCQ	NH5 NB2,3 DCI	2HI 1,3 D	4NP	2,6-DFP	1 nap
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	8	0	0	0	0	0	0	3	11	0	0	0
2	10	0	2	0	0	0	0	3	12	0	0	0
4	12	0	5	0	0	0	0	4	12	0	0	0
24	12	3	11	0	0	2	0	5	12	3	0	0

10 La extensión de la conjugación peptídica para cada uno de los ésteres activados alternativamente se examinó por separado en las cadenas ligeras y pesadas. Cada muestra se desnaturalizó y los enlaces disulfuro se redujeron utilizando clorhidrato de guanidina y ditiotreitól. Las cadenas ligeras y pesadas libres resultantes se analizaron utilizando LCMS para determinar el perfil de conjugación en cada una. El perfil de conjugación del péptido en la cadena ligera y pesada de 2.12.1.fx y los mutantes se muestran en la Tabla 45. Casi todos los péptidos activados enumerados en la tabla mostraron un nivel de conjugación reducido en la cadena ligera en comparación con el compuesto que usa PFP (Z1), excepto 2,3,6-trifluorofenilo (Z3), que mostró un nivel similar de conjugación. Los ésteres activados derivados de N-hidroxisuccinimide (NHS), es decir, la imida del ácido N-hidroxil-5-norborneno-2,3-dicarboxílico y la 2-hidroxil-isoindolina-1,3-diona (Z8 y Z9) mostraron una mayor propensión a la derivatización de las cadenas pesadas.

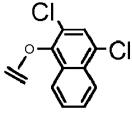
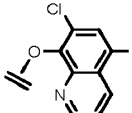
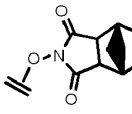
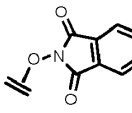
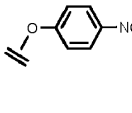
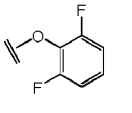
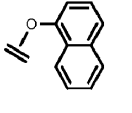
15

Tabla 45: Resumen de los resultados del éster activado. Algunos datos también se presentan en las Tablas 40-44.

Z n.º	Z* Nombre	Estructura Z*	Curso de tiempo de los aductos de conjugación [separe las 24 horas en negrita]					Reducción de la conjugación a las 24 h.			
			CA	0	1	2	4	24	LC	LC + 1CA	L + 2CA
1	Pentafluorofenilo		CA	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>24</b>	LC	LC + 1CA	L + 2CA
			0	84	5	4	4	3			
			1	16	38	37	33	34	30	64	7
			2	0	49	50	52	51	HC	HC + 1CA	HC + 2CA
			3	0	8	10	12	12			
							94	6	-		
2	2,3,4-trifluorofenilo		CA	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>24</b>	LC	LC + 1CA	L + 2CA
			0	97	83	75	62	32			
			1	3	17	25	34	45	59	41	-
			2	0	0	0	4	20	HC	HC + 1CA	HC + 2CA
			3	0	0	0	0	3			
							94	6	-		
3	2,3,6-trifluorofenilo		CA	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>24</b>	LC	LC + 1CA	L + 2CA
			0	94	58	40	27	17			
			1	6	36	45	43	43		64	7
			2	0	6	14	25	30	HC	HC + 1CA	HC + 2CA
			3	0	0	2	5	11			
							90	10	-		
4	2,3,6-triclorofenilo		CA	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>24</b>	LC	LC + 1CA	L + 2CA
			0	100	100	100	100	100			
			1	0	0	0	0	0	95	5	-
			2	0	0	0	0	0	HC	HC + 1CA	HC + 2CA
			3	0	0	0	0	0			
							100	-	-		
5	2,6 diclorofenilo		CA	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>24</b>	LC	LC + 1CA	L + 2CA
			0	100	100	100	96	81			
			1	0	0	0	4	19	89	11	-
			2	0	0	0	0	0	HC	HC + 1CA	HC + 2CA
			3	0	0	0	0	0			
							100	-	-		

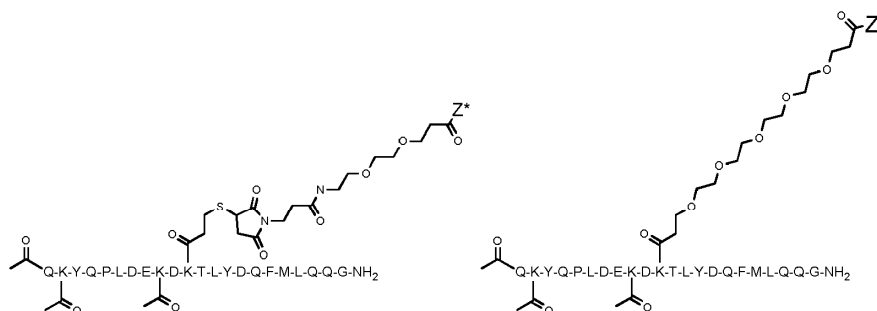


(continuación)

Z n.º	Z* Nombre	Estructura Z*	Curso de tiempo de los aductos de conjugación [separe las 24 horas en negrita]					Reducción de la conjugación a las 24 h.			
			CA	0	1	2	4	24	LC	LC + 1CA	L + 2CA
6	2,4-Diclorofenileno		CA	0	1	2	4	24	LC	LC + 1CA	L + 2CA
			0	100	95	89	81	38			
			1	0	5	11	19	45	HC	HC + 1CA	HC + 2CA
			2	0	0	0	0	16			
			3	0	0	0	0	2			
95	5	-									
7	5,7-dicloroquinolin-8-ilo		CA	0	1	2	4	24	LC	LC + 1CA	L + 2CA
			0	100	96	93	88	73			
			1	0	4	7	12	25	HC	HC + 1CA	HC + 2CA
			2	0	0	0	0	2			
			3	0	0	0	0	0			
95	5	-									
8	Ácido N-Hidroxi-1,5-norborneno-2,3-dicarboxílico imida		CA	0	1	2	4	24	LC	LC + 1CA	L + 2CA
			0	95	43	42	40	38			
			1	5	39	39	42	40	HC	HC + 1CA	HC + 2CA
			2	0	15	16	15	18			
			3	0	3	3	4	5			
82	18	-									
9	2-hidroxiisoindolin-1,3-diona		CA	0	1	2	4	24	LC	LC + 1CA	L + 2CA
			0	95	24	20	20	20			
			1	5	39	38	39	36	HC	HC + 1CA	HC + 2CA
			2	0	27	30	29	31			
			3	0	11	12	12	12			
50	50	-									
10	4-nitrofenilo		CA	0	1	2	4	24	LC	LC + 1CA	L + 2CA
			0	96	79	67	54	41			
			1	5	21	29	37	42	HC	HC + 1CA	HC + 2CA
			2	0	0	4	9	15			
			3	0	0	0	0	3			
92	8	-									
11	2,6-difluorofenilo		CA	0	1	2	4	24	LC	LC + 1CA	L + 2CA
			0	100	93	88	79	50			
			1	0	8	12	29	39	HC	HC + 1CA	HC + 2CA
			2	0	0	0	0	11			
			3	0	0	0	0	0			
92	8	-									
12	1-naftilo		CA	0	1	2	4	24	LC	LC + 1CA	L + 2CA
			0	100	100	100	100	100			
			1	0	0	0	0	0	HC	HC + 1CA	HC + 2CA
			2	0	0	0	0	0			
			3	0	0	0	0	0			
92	8	-									

**Ejemplo 30**

5 Otros ejemplos de ésteres activados alternativamente se muestran en la Tabla 45. Se examinó el curso temporal de la conjugación de varios análogos de ésteres de PFP. Al disminuir el número y la posición de los grupos de flúor en PFP, se pueden sintetizar e investigar formas de éster activo menos reactivas. El éster 2,3,5,6-tetrafluorofenílico y el éster 2,4,6-trifluorofenílico se analizaron después de la conjugación con la SEC ID N°: 27-K<sup>11</sup>(SH) MAC-2PEG-PFP. 1-hidroxil-pirrolidina-2,5-diona (NHS) se conjugó con la SEC ID N°: 27-K<sup>11</sup>-5PEG-PFP.



SEQ ID NO:27-K<sup>11</sup>(SH)MAC-2PEG-PFP  
5PEG-PFP

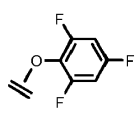
SEQ ID NO:27-K<sup>11</sup>-

10 Después de 2 horas de conjugación, estas formas menos activadas dieron una menor conjugación general a 2.12.1.fx que la PFP. El grupo NHS también mostró una menor conjugación global. Los péptidos que contenían NHS y PFP se conjugaron a 2.12.1.fx. Las formas reducidas se analizaron para ver la distribución a las 2 hrs. La PFP mostró una propensión mucho mayor a la derivatización de la cadena ligera (77 % en total a LC, solo 6 % a pesada) en comparación con 1-hidroxil-pirrolidina-2,5-diona (NHS) (31 % en total a LC, pero 34 % en total pesado).

**Tabla 46: Esteres alternativamente activados - ejemplos adicionales**

1	Nombre	Estructura	CA a las 2 h		Análisis de ésteres activos reducidos de conjugación a las 2 h.						
			CA	2 hora	LC	LC + 1CA	LC + 2CA	HC	HC + 1CA	HC + 2CA	
1	Pentafluorofenilo		0	3	LC	LC + 1CA	LC + 2CA	HC	HC + 1CA	HC + 2CA	
			1	40	23	72	5	94	6	0	
			2	42							
			3	14							
			4	1							
13	1-hidroxil-1-pirrolidin-2,5-diona (NHS)		0	18	LC	LC + 1CA	LC + 2CA	HC	HC + 1CA	HC + 2CA	
			1	44	70	28	3	66	31	3	
			2	24							
			3	12							
			4	3							
14	2,3,5,6-tetrafluorofenilo		0	21							
			1	44							
			2	29							
			3	5							
			4	2							

(continuación)

15	Nombre 2,4,6- trifluorofenilo	Estructura 	CA a las 2 h	Análisis de ésteres activos reducidos de conjugación a las 2 h.	
			CA	2 hora	
			0	80	
			1	27	
			2	2	
			3	0	
			4	0	

5 Los compuestos Z1-Z15 representan una variedad de diferentes tipos estructurales de éster activo. Es esclarecedor considerar la serie de ésteres activos aromáticos fluorados, que tienen un número y patrón diferente de sustitución de átomos de flúor alrededor del anillo aromático (compuestos Z1, Z2, Z3, Z11, Z14 y Z15) y considerar cómo influye su estructura en su estructura. Reactividad y propensión a la derivatización proteica. La cinética de la conjugación de anticuerpos de estos derivados se puede comparar convenientemente en el punto de tiempo de 2 h, cuando la reacción del pentafluorofenilo (Z1) se ha completado. Con un nivel creciente de sustitución de flúor alrededor del anillo, hay un nivel creciente de conjugación general y una disminución concomitante en el anticuerpo sin reaccionar. La velocidad de reacción está directamente relacionada con el pKa del grupo saliente de fenol fluorado, con los fenoles más ácidos dando mayores velocidades de reacción. Las tasas de conjugación son Z1> Z14> Z3> Z15> Z2> Z11. Los efectos sutiles de los patrones de sustitución de flúor se pueden ver comparando los compuestos Z2, Z3 y Z15.

15 La estructura del éster activo también afectó significativamente la direccionalidad de la reacción de conjugación. En general, los ésteres aromáticos fluorados mostraron una marcada propensión a la derivación de la cadena ligera (principalmente CLK-K).<sup>188</sup> como se mencionó antes). En contraste, varios ésteres basados en derivados de N-hidroxisuccinimida (Z8, Z9 y Z13) mostraron menos preferencia, con a menudo mayores niveles de derivatización de la cadena pesada observada.

### Ejemplo 31

20 Se evaluó la tasa de conjugación entre MAC-1 (enlazador PEG-2-maleimida-mercaptopropionilo entre el péptido y el grupo activador de PFP) y MAC-2 (enlazador de cadena lineal PEG-5 entre el péptido y el grupo activador de PFP). La Tabla 47 compara estos péptidos activados con 2.12.1x. Los resultados muestran que los péptidos activados se comportan de manera muy similar en términos de la velocidad y el grado de derivatización, a pesar de sus estructuras enlazadoras ligeramente diferentes.

25

**Tabla 47: Comparación de la conjugación entre MAC-1 y MAC-2**


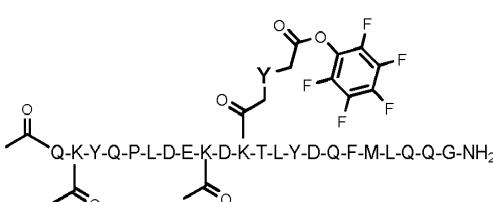
Tiempo intacto (min)	MAC-2					MAC-1				
	OCA	1CA	2CA	3CA	4CA	OCA	1CA	2CA	3CA	4CA
0	72	27	1	0	0	82	18	1	0	0
10	26	56	17	1	0	29	49	20	2	0
20	13	53	29	5	0	15	47	33	5	0
30	9	51	32	8	1	9	43	40	8	0
40	7	45	39	9	1	8	41	41	8	2
50	6	43	39	11	1	7	41	42	9	2
60	5	41	40	11	2	6	36	45	11	2
70	4	40	40	14	2	6	35	46	11	2
80	3	38	44	14	2	5	36	47	10	2
90	4	37	45	13	1	6	35	46	12	2
100	4	40	41	13	2	6	35	46	11	2
110	3	40	42	14	1	6	34	46	12	3
120	4	37	44	13	1	5	35	46	12	2

**Ejemplo 32 Efecto de la longitud del enlazador**

Se examinó el efecto sobre el perfil final de distribución conjugada de tener diferentes longitudes de enlazador. Los compuestos se sintetizaron con diferentes enlazadores de longitud de PEG que unían el péptido al grupo de PFP. Los resultados para la adición a 2.12.1.fx de 0, 1, 2, 3 y 4 péptidos se resumen en la Tabla 48. En general, el cambio de la longitud del enlazador PEG tuvo generalmente poco efecto sobre la distribución de los conjugados obtenidos.

5

**Tabla 48: Efecto de la longitud del enlazador**

Y=	CA (%)					
						
n	0	1	2	3	4	
2	8	39	44	8	0	 <p>Estructura de los compuestos del Ejemplo 32.</p>
3	6	34	47	10	2	
5	4	37	44	13	1	
7	4	35	49	11	0	
9	3	28	49	19	2	
13	3	32	54	10	0	
17	6	37	51	7	0	
21	4	43	45	5	2	
25	11	44	38	7	0	

**EJEMPLO 33: Conjugación de secuencias peptídicas alternativas**

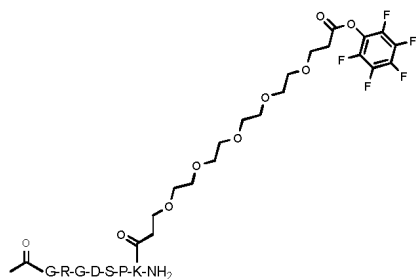
Para confirmar la aplicabilidad de la invención a través de otras secuencias peptídicas, SEQ ID NO: 60 y SEQ ID NO: 61 (Test-péptidos-1 y -2) se conjugaron. Las SEQ ID NO: 60 y 61 se sometieron a conjugación con 5-PEG-PFP y luego el anticuerpo 2.12.1.fx en condiciones previamente optimizadas para la reacción con las SEQ ID NO: 27-K<sup>11</sup>-5PEG-PFP. Los resultados del análisis del perfil de conjugación y la conjugación LC / HC se muestran en la Tabla 49. La SEC ID NO: 60 y la SEC ID NO: 61 mostraron ambas conjugación direccional a la cadena ligera. En un análisis adicional de las distribuciones de LC / HC, se observaron perfiles similares a los de MAC-2, con alrededor de 70 % de derivatización de LC y menos de 10 % en el HC.

10

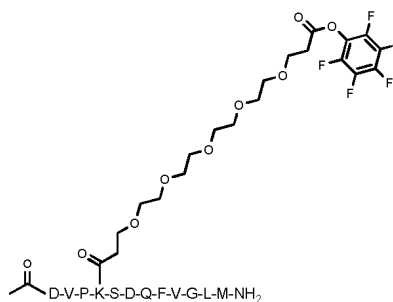
15

**Tabla 49: Perfil de conjugación de SEQ ID NO 60 y SEQ ID NO:61**

SEQ en ID NO:	% CA					LC % CA			HC % CA		
	0	1	2	3	4	LC	LC + 1	LC + 2	HC	HC + 1	HC + 2
27	2	24	55	17	3	24	65	11	91	9	-
60	11	39	43	8	0	32	68	-	95	5	-
61	8	35	48	10	0	29	71	-	94	6	-



SEQ ID NO:60/K<sup>7</sup>-5PEG-PFP



SEQ ID NO:61/K<sup>4</sup>-5PEG-PFP

20

**Ejemplo 34:**

Se realizaron experimentos de mapeo de péptidos en un rango de combinaciones de proteína / conjugado con el fin de confirmar los parámetros importantes que conducen a la conjugación direccional en K<sup>188</sup> en cadenas ligeras de anticuerpos. La Tabla 50 enumera los resultados de los experimentos de mapeo de péptidos realizados. Para cada parámetro de estudio, se utilizó el procedimiento de mapeo de péptidos descrito anteriormente. "\*\*\*\*" indica un alto nivel de conjugación direccional a K<sup>188</sup>-CLk. "\*\*\*\*" y, en menor medida, "\*\*\*", indica que aún se observa conjugación direccional, pero puede mostrar diferencias, como condiciones de reacción más lentas, menos conjugación global o promedios en una sola cadena ligera, y por lo tanto puede ser más adecuado en circunstancias especiales, como la generación de MAC con entre 0,5 y 1,5 péptidos por anticuerpo (por ejemplo). "-" indica que estas condiciones de reacción no parecían favorables hacia la conjugación direccional en K<sup>188</sup>-CLk.

PediR<sup>188</sup> Se observó que -CLk en MAC-2 era la ubicación de la conjugación direccional, los estudios de mapeo de péptidos en parámetros alternativos enfocados en esta ubicación. No se incluyen los datos detallados del mapeo de péptidos para cada parámetro del estudio, pero no se observaron niveles significativos de conjugación en otros residuos K, y las observaciones de otras MAC fueron consistentes con la conjugación direccional en K<sup>188</sup>-CLk.

K<sup>188</sup>R y K<sup>188</sup> Una mutación de 2.12.1.fx resultó en la pérdida de conjugación direccional en este sitio; Lo que sugiere un papel esencial para este residuo específico. K<sup>190</sup>R, y K<sup>190</sup>A las mutaciones no dificultaron la conjugación direccional a K<sup>188</sup>, y puede incluso mejorarlo. De los otros parámetros de estudio examinados, se observó que al menos una parte del subtipo de región constante de la cadena ligera tenía un impacto significativo en la conjugación direccional; se determinó que al menos una parte del subtipo de cadena ligera kappa era necesaria. La conjugación con un subtipo de cadena ligera lambda (utilizando un anticuerpo que contiene un ejemplo de λ, hAbλTest1), no demostró una conjugación direccional. Cuando el LCλ de hAbλTest1 se mutó a un LCκ, la conjugación direccional en K<sup>188</sup> fue recuperado

**Tabla: 50: Resumen de conjugación direccional en K<sup>188</sup>CLk**

Anticuerpo	LC	Mutaciones / Diferencias Vs MAC1 /2	SEC ID NO	Enlazador	Z *	Conjugación direccional
2.12.1.fx	K		27	MAL-2PEG	PFP	****
2.12.1.fx	K		27	5CLAVIJA	PFP	****
2.12.1.fx Fab	K		27	5CLAVIJA	PFP	****
h38C2-IgG1	K		27	5CLAVIJA	PFP	****
h38C2-IgG2	K		27	5CLAVIJA	PFP	****
prueba de hAbλ	λ	K <sup>100</sup> SH	27	5CLAVIJA	PFP	-
hAbκTest1	K		27	5CLAVIJA	PFP	****
hAbκTest3	K		39-mer	5CLAVIJA	PFP	****
prueba de hAbλ	λκ		27	5CLAVIJA	PFP	****
prueba de hAbλ	λκJ		27	5CLAVIJA	PFP	****
2.12.1.fx	K	K <sup>100</sup> R	27	5CLAVIJA	PFP	-
2.12.1.fx	K	K <sup>100</sup> R	27	5CLAVIJA	PFP	****
2.12.1.fx	K	K <sup>100</sup> R / R <sup>100</sup> R	27	5CLAVIJA	PFP	-
2.12.1.fx	K	D <sup>101</sup> A	27	5CLAVIJA	PFP	**
2.12.1.fx	K	K <sup>100</sup> A	27	5CLAVIJA	PFP	-
2.12.1.fx	K	H <sup>109</sup> A	27	5CLAVIJA	PFP	-
2.12.1.fx	K	K <sup>190</sup> A	27	5CLAVIJA	PFP	****
2.12.1.fx	K	D <sup>101</sup> A / H <sup>109</sup> A	27	5CLAVIJA	PFP	-
hAbλTest1	λ	S <sup>100</sup> S.S <sup>109</sup> S	27	5CLAVIJA	PFP	-
2.12.1.fx	K		39-mer	5CLAVIJA	PFP	****

(continuación)

Anticuerpo	LC	Mutaciones / Diferencias Vs MAC1 /2	SEC ID NO	Enlazador	Z *	Conjugación direccional
2.12.1.fx	K		60	5CLAVIJA	PFP	***
2.12.1.fx	K		61	5CLAVIJA	PFP	***
h38C2-IgG2	K		39-mer	5CLAVIJA	PFP	***
2.12.1.fx Fab	K		biotina	5CLAVIJA	PFP	***
2.12.1.fx	K		27	MAL-2PEG	PFP	***
2.12.1.fx	K		27	MAL-2PEG	2,3,4 PTF (2)	**
2.12.1.fx	K		27	MAL-2PEG	2,3,6 PTF (3)	**
2.12.1.fx	K		27	MAL-2PEG	2,3,6 TCP (4)	-
2.12.1.fx	K		27	MAL-2PEG	2,6 DCP (5)	-
2.12.1.fx	K		27	MAL-2PEG	2,4 DCN (6)	*
2.12.1.fx	K		27	MAL-2PEG	5,7 DCQ (7)	-
2.12.1.fx	K		27	MAL-2PEG	NH-5-N2,3DI (8)	*
2.12.1.fx	K		27	MAL-2PEG	2HI1,3 DIO (9)	*
2.12.1.fx	K		27	MAL-2PEG	4NP (10)	**
2.12.1.fx	K		27	MAL-2PEG	2,6 DFP (11)	**
2.12.1.fx	K		27	MAL-2PEG	NAP (12)	-
2.12.1.fx	K		27	MAL-2PEG	1HP 2,5D (13)	*
2.12.1.fx	K		27	MAL-2PEG	2,3,5,6 PTF (14)	**
2.12.1.fx	K		27	MAL-2PEG	2,4,6 PTF (15)	**
2.12.1.fx	K		27	MAL-2PEG	Cuadrar	*
2.12.1.fx	K		27	MAL-2PEG	AZD	*
2.12.1.fx	K		27	PEG 2-17	PFP	***
2.12.1.fx	K		27	PEG 17-21	PFP	**
2.12.1.fx	K		27	PEG 25	PFP	**

Por lo tanto, la invención se ha descrito ampliamente y se ha ilustrado en relación con realizaciones representativas descritas anteriormente.

Los expertos en la materia reconocerán que pueden realizarse diversas modificaciones en la presente invención sin alejarse del espíritu y alcance de la misma. Todas las publicaciones, solicitudes de patente y patentes expedidas se incorporan en el presente documento por referencia en la misma medida en que si se indicase específicamente e individualmente que cada publicación, solicitud de patente o patente expedida individual se incorpora por referencia en su totalidad. Las definiciones que están contenidas en el texto incorporado por referencia se excluyen en la medida que contradigan las definiciones en la presente divulgación.

Se aprecia que ciertas características de la invención, que se describen por claridad en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una sola realización. Por el contrario, diversas características de la invención que se describen, por brevedad, en el contexto de una sola realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada.

Se contempla específicamente que cualquier limitación analizada con respecto a una realización de la invención pueda ser aplicable a cualquier otra realización de la invención. Además, cualquier composición de la invención puede usarse en cualquier procedimiento de la invención y cualquier procedimiento de la invención puede usarse para producir o utilizar cualquier composición de la invención. En particular, cualquier aspecto de la invención descrito en las reivindicaciones, en solitario o en combinación con una o más reivindicaciones y/o aspectos adicionales de la descripción, debe entenderse como combinable con otros aspectos de la invención expuestos en otra parte en las reivindicaciones y/o descripción y/o listados de secuencia y/o dibujos.

En la medida en que los ejemplos específicos que se encuentran en el presente documento no se encuentren dentro del alcance de una invención, dicho ejemplo específico puede ser descartado explícitamente.

El uso del término “o” en las reivindicaciones se usa para significar “y/o” a menos que se indique explícitamente que se refiere a alternativas únicamente o que la alternativa sea mutuamente excluyente, aunque la divulgación respalda una definición que se refiera a las alternativas únicamente y “y/o”. Como se usan en la memoria descriptiva, “un” o “uno/a” pueden significar uno o más, a menos que se indique claramente otra cosa. Como se usan en el presente documento en la reivindicación o reivindicaciones, cuando se usan junto con la palabra “que comprende”, las palabras “un” o “uno/a” pueden significar uno o más de uno. Como se usa en el presente documento, “otro” puede significar al menos un segundo o más. A menos que se defina otra cosa en el presente documento, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente invención tendrán los significados que se entienden comúnmente por el experto en la materia. Además, a menos que se requiera otra cosa por el contexto, los términos en singular incluirán la pluralidad y los términos en plural incluirán el singular. Las palabras “comprende/que comprende” y las palabras “que tiene/que incluye”, cuando se usan en el presente documento con relación a la presente invención, se usan para especificar la presencia de las características, números enteros, etapas o componentes indicados, pero no excluyen la presencia o adición de una o más características, números enteros, etapas, componentes o grupos distintos de los mismos.

LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID	Descripción	Secuencia
1	Cadena pesada 2.12.1	Ver Figura 1
2	Cadena ligera 2.12.1	Ver Figura 1
3	Cadena pesada 2.12.1.fx	Ver Figura 1
4	Cadena ligera 2.12.1.fx	Ver Figura 1
5	CH 2.12.1 y 2.12.1.fx	Ver Figura 1
6	Consenso VH2.12.1 & 2.12.1.fx. X <sup>2</sup> = V / A	Q*QLVESGGGLVKPGGSLRSCAASGFTFSDYMSWIRQAPGKGL <del>EW</del> VS <del>Y</del> ISSGG STRDYADSVYKGRFTI <del>SR</del> DN <del>AK</del> NSLYLQMN <del>SL</del> RAEDTAVYCV <del>R</del> DGVETFFYY <del>Y</del> GMDVWGQGT <del>TV</del> T
7	VHCDR1 2.12.1 / 2.12.1.fx	GFTFS <del>D</del> YMS
8	VHCDR <sup>2</sup> 2.12.1 / 2.12.1.fx	YISSGGSTRD YADSV
9	VHCDR3 2.12.1 / 2.12.1.fx	DGVETFFYY YGMDV
10	VHCDR12.12.1 / 2.12.1.fx	<b>Q</b> XQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAAS [X <sup>2</sup> = V / A]
11	VHCDR1 2.12.1.fx	QVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAAS
12	VHFR2 2.12.1 / 2.12.1.fx	WIRGAPGKGL EWVS
13	VHFR3 2.12.1 / 2.12.1.fx	KGRFTISRDN AKNSLYLQMN SLRAEDTAVY YCVR
14	VHFR4 2.12.1 / 2.12.1.fx	WGQGT <del>TV</del> T
15	Clk humana 1-106 K <sup>60</sup> está en negrita y subrayado	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV <del>V</del> CLLNNFYPREAKVQW <del>K</del> V <del>D</del> NALQSGNSQESV TEQDSKDS <del>Y</del> SL <del>S</del> LT <del>L</del> SKADYE <del>K</del> H <del>K</del> VYACEVTHQGLSSP <del>V</del> TKSE <del>N</del> R <del>G</del> E <del>C</del>



(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
16	CL 2.12.1 y 2.12.1.fx x <sup>21</sup> = I / F x <sup>107</sup> = K / I	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDIRRDLGWTQQKPKAPKRLIYAASRLQ SGVPSRFGSGGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLOHNNYPRTEGQGTKLVIKR
17	VLCDR1 2.12.1 / 2.12.1.fx	CRASQDIRRDLGW
18	VLCDR2 2.12.1 / 2.12.1.fx	IYAASRL
19	VLCDR3 2.12.1 / 2.12.1.fx	LQHNNYPR
20	VLFR1 2.12.1 / 2.12.1.fx	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVIT [X <sup>21</sup> = I / F]
21	VLFR1 <sup>1</sup> 2.12.1.fx	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVIT
22	VLFR <sup>2</sup> 2.12.1 / 2.12.1.fx	YQQKPGKAPKRL
23	VLFR3 2.12.1 / 2.12.1.fx	QSGVPSRFGSGGTEFTLTISSLQPEDFA TYYC [X <sup>10</sup> = K / I]
24	VLFR4 2.12.1 / 2.12.1.fx	FGQGTKLVIKR
25	2.12.1.fx VLFR4	FGQGTKLVIK R
26	ABP X2 = AcK X9 = AcK / L	QXYQPLDEXD KTLYDQFMLQ QG
27	ABP X2 = AcK X9 = AcK	QXYQPLDEXD KTLYDQFMLQ QG
28	ABP X2 = AcK	QXYQPLDELD KTLYDQFMLQ QG
29	ABP X2 = AcK X11 = AcK	QXYQPLDEKD xTLYDQFMLQ QG
30	ABP X2 = AcK X11 = AcK	QXYQPLDELD xTLYDKFMLQ QG
31	ABP X2 = AcK X11 = AcK	QXYQPLDELD xTLYDQFKLQ QG
32	ABP X2 = AcK X11 = AcK	QXYQPLDELD xTLYDQFMKQ QG
33	2.12.1.fx K <sup>188</sup> R	LC
34	2.12.1.fx K <sup>190</sup> R	LC

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
35	2.12.1. fx K <sup>188</sup> R / K <sup>190</sup> R	LC
36	2.12.1. fx D <sup>151</sup> UNA	LC
37	2.12.1. fx K <sup>188</sup> UNA	LC
38	2.12.1. fx H <sup>189</sup> UNA	LC
39	2.12.1. fx K <sup>190</sup> UNA	LC
40	2.12.1. fx D <sup>151</sup> A / H <sup>189</sup> UNA	LC
41	hAbλTest LC región constante de la cadena ligera (lambda)	<b>FGGGTQLTVL</b> GGPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAKAD SSPVKAGVETTTTPSKQSNKYYAASSYLSLTPEQW <del>W</del> KSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV APTECS
42	hAbλTest-AK	FGGGTQLTVLRTVAAPSVFLFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMFY <b>P</b> REAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSYISLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
43	hAbλTest-AkJ	FGGGTAVETKRTVAAPSVFLFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMFY <b>P</b> REAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSYISLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
44	hAbλTest S <sup>188</sup> S.S <sup>189</sup> S	FGGGTQLTVLGGPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAKAD SSPVKAGVETTTTPSKQSNKYYAASSYLSLTPEQW <del>W</del> KSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV APTECS
45	hCLK 1-106 X <sup>82</sup> = cualquier AA notP X <sup>45</sup> = V / A X <sup>83</sup> = L / V	TVAAAPSVFLFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMFY <b>P</b> REAKVQWKVDHXLQSGNSQESV TEQDSKDSYISLSSTLTLSKADYE <b>K</b> HxxYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
46	CLK humano 1-106 X <sup>45</sup> = V / A X <sup>83</sup> = L / V	TVAAAPSVFLFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMFY <b>P</b> REAKVQWKVDHXLQSGNSQESV TEQDSKDSYISLSSTLTLSKADYE <b>K</b> HxxYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
47	CLK humano 1-106 X <sup>82</sup> = cualquier aa excepto p	TVAAAPSVFLFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMFY <b>P</b> REAKVQWKVDHXLQSGNSQESV TEQDSKDSYISLSSTLTLSKADYE <b>K</b> HxxYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
48	Humano CLA	Ver Figura 18
49	mCLK	Ver Figura 18
50	2.12.1.fx Fab HC	Ver Figura 1
51	h38C2-IgG1 LC	Ver Figura 18
52	h38C2-IgG1 HC	Ver Figura 18
53	h38C2-IgG2 LC	Como SEQ ID NO:51
54	h38C2-IgG2 HC:	
		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMSWRQSPKGLKLEWSEIRLRSNRYATHYAESVKGRFTISRDNK NTLYLQMNLSRAEDTGIYYCKTYFYSFYWGQGLTVVSASATKGPSVFPFLAPCSSESTSESTAALGCLVKDYFPEPVY VSWNSGALTSGVHTTFAVLQSSGLYSLSSVTVFSSNFGTQTYTCHVDHKPNTKVDKTVERRKCCVCEPFCAPPVAG PSVFLPPKPKDTLMSIRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTPRVYSLTIVVHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKTRGQPREPOVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPMLDSGGSPFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTKRSLSPGK
55	VL h38C2	Ver Figura 18
56	VH h38C2	Ver Figura 18
57	VL m38C2	Ver Figura 18
58	VH m38C2	Ver Figura 18
59	(Gly <sub>4</sub> Ser) <sub>3</sub>	GGGGGGGG SGGGS
60	Prueba péptido-1	GRGDSPK
61	Prueba péptido-2	DVPKSDQFVG LM

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> CovX Technologies Ireland Limited
- 5 <120> Conjugados de anticuerpos multifuncionales
- <130> PC34002.A.PCT
- <150> US61/363.507
- 10 <151> 12-07-2010
- <160> 61
- <170> PatentIn versión 3.5
- 15 <210> 1
- <211> 451
- <212> PRT
- 20 <213> *Homo sapiens*
- <400> 1

```

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

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

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

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

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

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

Val Arg Asp Gly Val Glu Thr Thr Phe Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
                               100                               105                               110

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

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

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

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

ES 2 704 223 T3

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser  
 180 185 190  
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys  
 195 200 205  
 Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu  
 210 215 220  
 Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala  
 225 230 235 240  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 245 250 255  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 260 265 270  
 Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 275 280 285  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe  
 290 295 300  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 305 310 315 320  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile  
 325 330 335  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 340 345 350  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 355 360 365  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 370 375 380  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385 390 395 400  
 Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 405 410 415  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430

ES 2 704 223 T3

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435 440 445

Pro Gly Lys  
 450

5 <210> 2  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 704 223 T3

<210> 3  
 <211> 451  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 3

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

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

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

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

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

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

Val Arg Asp Gly Val Glu Thr Thr Phe Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met  
 100 105 110

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

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

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

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

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

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys  
 195 200 205

ES 2 704 223 T3

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

Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala  
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe  
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 305 310 315 320

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

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

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

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385 390 395 400

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435 440 445

Pro Gly Lys  
 450



ES 2 704 223 T3

<210> 4  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10 <210> 5

ES 2 704 223 T3

<211> 329  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 5

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro  
 1 5 10 15

Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val  
 20 25 30

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala  
 35 40 45

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly  
 50 55 60

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly  
 65 70 75 80

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

Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
 130 135 140

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr  
 145 150 155 160

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
 165 170 175

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His  
 180 185 190

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
 195 200 205

Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln  
 210 215 220

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met  
 225 230 235 240

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

ES 2 704 223 T3

245 250 255

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
260 265 270

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
275 280 285

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
290 295 300

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
305 310 315 320

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325

5 <210> 6  
<211> 122  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2)..(2)  
<223> Xaa = V o A

15 <400> 6

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

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

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

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

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

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

Val Arg Asp Gly Val Glu Thr Thr Phe Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met  
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr

115 120

<210> 7

ES 2 704 223 T3

<211> 10  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 7

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Ser  
 1 5 10

<210> 8  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 8

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

<210> 9  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 9

Asp Gly Val Glu Thr Thr Phe Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 1 5 10 15

20

<210> 10  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

25

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa = V o A

30

<400> 10

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser  
 20 25

35

<210> 11  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

40

<400> 11

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser  
 20 25

45 <210> 12

ES 2 704 223 T3

<211> 14  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 12

Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
 1 5 10

<210> 13  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 13

15

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 1 5 10 15

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

Val Arg

<210> 14  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

20

<400> 14

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr  
 1 5

25

<210> 15  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

30

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 704 223 T3

<210> 16  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (21)..(21)  
 <223> Xaa = I o F

10

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (107)..(107)  
 <223> Xaa = K o I

15

<400> 16

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Val Ile Xaa Arg  
 100 105

20

<210> 17  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

25

<400> 17

Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Arg Asp Leu Gly Trp  
 1 5 10

30

<210> 18  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

35

<400> 18

Ile Tyr Ala Ala Ser Arg Leu  
 1 5

<210> 19

ES 2 704 223 T3

<211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 5 <400> 19  
  
 Leu Gln His Asn Asn Tyr Pro Arg Thr  
 1 5  
  
 <210> 20  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 10  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (21)..(21)  
 <223> Xaa = I o F  
 15  
  
 <400> 20  
 20  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
  
 Asp Arg Val Thr Xaa Thr  
 20  
  
 <210> 21  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 25  
  
 <400> 21  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr  
  
 30 20  
  
 <210> 22  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 35  
  
 <400> 22  
  
 Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu  
 1 5 10  
 40  
  
 <210> 23  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 45  
  
 <400> 23

ES 2 704 223 T3

Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu  
 1 5 10 15

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr  
 20 25 30

Tyr Cys

5 <210> 24  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa= K o l

<400> 24

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Val Ile Xaa Arg  
 1 5 10

15 <210> 25  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 25

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Val Ile Lys Arg  
 1 5 10

25 <210> 26  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa = AcK

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa= AcK o Leu

<400> 26

Gln Xaa Tyr Gln Pro Leu Asp Glu Xaa Asp Lys Thr Leu Tyr Asp Gln  
 1 5 10 15

Phe Met Leu Gln Gln Gly  
 20

45 <210> 27  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE



ES 2 704 223 T3

<222> (2)..(2)  
 <223> Xaa = AcK  
  
 <220>  
 5 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa= AcK  
  
 <400> 27  
 10  
           Gln Xaa Tyr Gln Pro Leu Asp Glu Xaa Asp Lys Thr Leu Tyr Asp Gln  
           1                  5                          10                          15  
  
           Phe Met Leu Gln Gln Gly  
                           20  
  
 <210> 28  
 <211> 22  
 15 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 20 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa = AcK  
  
 <400> 28  
  
           Gln Xaa Tyr Gln Pro Leu Asp Glu Leu Asp Lys Thr Leu Tyr Asp Gln  
           1                  5                          10                          15  
  
           Phe Met Leu Gln Gln Gly  
                           20  
 25  
  
 <210> 29  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 30 <213> *Homo sapiens*  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 35 <223> Xaa = AcK  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (11)..(11)  
 40 <223> Xaa = AcK  
  
 <400> 29  
  
           Gln Xaa Tyr Gln Pro Leu Asp Glu Lys Asp Xaa Thr Leu Tyr Asp Gln  
           1                  5                          10                          15  
  
           Phe Met Leu Gln Gln Gly  
                           20  
 45  
  
 <210> 30  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 50  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa = AcK  
 55

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Xaa = AcK  
 5 <400> 30  
  
           **Gln Xaa Tyr Gln Pro Leu Asp Glu Leu Asp Xaa Thr Leu Tyr Asp Lys**  
           1                                  5                                  10                                  15  
  
           **Phe Met Leu Gln Gln Gly**  
                                   20  
 10 <210> 31  
       <211> 22  
       <212> PRT  
       <213> *Homo sapiens*  
 15 <220>  
       <221> MISC\_FEATURE  
       <222> (2)..(2)  
       <223> Xaa = AcK  
 20 <220>  
       <221> MISC\_FEATURE  
       <222> (11)..(11)  
       <223> Xaa= AcK  
 25 <400> 31  
  
           **Gln Xaa Tyr Gln Pro Leu Asp Glu Leu Asp Xaa Thr Leu Tyr Asp Gln**  
           1                                  5                                  10                                  15  
  
           **Phe Lys Leu Gln Gln Gly**  
                                   20  
 30 <210> 32  
       <211> 22  
       <212> PRT  
       <213> *Homo sapiens*  
 35 <220>  
       <221> MISC\_FEATURE  
       <222> (2)..(2)  
       <223> Xaa = AcK  
 40 <220>  
       <221> MISC\_FEATURE  
       <222> (11)..(11)  
       <223> Xaa = AcK  
 45 <400> 32  
  
           **Gln Xaa Tyr Gln Pro Leu Asp Glu Leu Asp Xaa Thr Leu Tyr Asp Gln**  
           1                                  5                                  10                                  15  
  
           **Phe Met Lys Gln Gln Gly**  
                                   20  
 50 <210> 33  
       <211> 214  
       <212> PRT  
       <213> *Homo sapiens*  
       <400> 33

ES 2 704 223 T3

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

5 <210> 34  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 34

ES 2 704 223 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Arg Asp  
 20 25 30  
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Asn Tyr Pro Arg  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110  
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125  
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140  
 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 Arg 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> 35  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

ES 2 704 223 T3

<400> 35

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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 Arg His Arg 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

5 <210> 36  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 36

ES 2 704 223 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Arg Asp  
 20 25 30  
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Asn Tyr Pro Arg  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110  
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125  
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140  
 Lys Val Gln Trp Lys Val Ala 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> 37  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 37

ES 2 704 223 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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 Ala 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

5 <210> 38  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 38

ES 2 704 223 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Arg Asp  
 20 25 30  
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Asn Tyr Pro Arg  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110  
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125  
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140  
 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 Ala 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> 39  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5



ES 2 704 223 T3

<400> 39

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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 Ala 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

```

5 <210> 40  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 40

ES 2 704 223 T3

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

5 <210> 41  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 10 <400> 41

ES 2 704 223 T3

Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala  
 1 5 10 15

Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn  
 20 25 30

Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val  
 35 40 45

Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu  
 50 55 60

Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser  
 65 70 75 80

Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser  
 85 90 95

Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro  
 100 105 110

Thr Glu Cys Ser  
 115

<210> 42  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 42

5

Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Arg Thr Val Ala Ala Pro  
 1 5 10 15

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr  
 20 25 30

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys  
 35 40 45

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu  
 50 55 60

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser  
 65 70 75 80

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala  
 85 90 95

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe  
 100 105 110

Asn Arg Gly Glu Cys  
 115

10

ES 2 704 223 T3

<210> 43  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 43

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro  
 1 5 10 15  
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr  
 20 25 30  
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys  
 35 40 45  
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu  
 50 55 60  
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser  
 65 70 75 80  
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala  
 85 90 95  
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe  
 100 105 110  
 Asn Arg Gly Glu Cys  
 115

10

<210> 44  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 44

Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala  
 1 5 10 15  
 Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn  
 20 25 30  
 Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val  
 35 40 45  
 Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu  
 50 55 60  
 Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser  
 65 70 75 80  
 Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys His Ser Arg Ser Tyr Ser  
 85 90 95  
 Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro  
 100 105 110  
 Thr Glu Cys Ser  
 115

ES 2 704 223 T3

<210> 45  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 5  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (45)..(45)  
 <223> Xaa = V o A  
 10  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (82)..(82)  
 <223> Xaa = G, A, V, L, I, S, T, C, M, N, Q, F, Y, W, K, R, H, D o E  
 15  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (83)..(83)  
 <223> Xaa = L o V  
 20  
 <400> 45  
  
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
 1 5 10 15  
  
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
 20 25 30  
  
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Xaa Leu Gln Ser  
 35 40 45  
  
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 50 55 60  
  
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
 65 70 75 80  
  
 His Xaa Xaa Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
 85 90 95  
  
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 100 105  
 25  
 <210> 46  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 30  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (45)..(45)  
 <223> Xaa = V o A  
 35  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (83)..(83)  
 <223> Xaa = L o V  
 40  
 <400> 46

ES 2 704 223 T3

```

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

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

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

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

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

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

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

```

5 <210> 47  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <221> MISC FEATURE  
 <222> (82)..(82)  
 <223> Xaa = G, A, V, L, I, S, T, C, M, N, Q, F, Y, W, K, R, H, D o E  
 <400> 47

```

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

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

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

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

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

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

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

```

15 <210> 48  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 704 223 T3

<400> 48

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

5

<210> 49  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

10

<400> 49

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

ES 2 704 223 T3

<210> 50  
 <211> 230  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 50

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

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

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

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

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

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

Val Arg Asp Gly Val Glu Thr Thr Phe Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met  
 100 105 110

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

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

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

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

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

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys  
 195 200 205

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

Arg Lys Cys Cys Val Glu

225

230



ES 2 704 223 T3

<210> 51  
 <211> 219  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 51

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

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

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

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Ser Gln Gly  
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

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

10 <210> 52

ES 2 704 223 T3

<211> 448  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 52

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

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

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

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

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

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr  
 85 90 95

Tyr Cys Lys Thr Tyr Phe Tyr Ser Phe Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 704 223 T3

225					230					235					240
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
				245					250					255	
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro
			260					265					270		
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
		275					280						285		
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val
	290					295					300				
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
305					310					315					320
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
				325					330					335	
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu
			340					345					350		
Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys
		355					360					365			
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser
	370					375					380				
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp
385					390					395					400
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
				405					410					415	
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
			420				425						430		
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys
		435					440					445			

<210> 53  
 <211> 219  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 53

ES 2 704 223 T3

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

<210> 54  
 <211> 444  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 54

5

ES 2 704 223 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Glu Ile Arg Leu Arg Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu  
 50 55 60  
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Lys Thr Tyr Phe Tyr Ser Phe Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
 115 120 125  
 Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly  
 130 135 140  
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 145 150 155 160  
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 165 170 175  
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
 180 185 190  
 Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser  
 195 200 205  
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys  
 210 215 220  
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
 225 230 235 240  
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
 245 250 255  
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe  
 260 265 270  
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
 275 280 285

ES 2 704 223 T3

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
290 295 300

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
435 440

<210> 55  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 55

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

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

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

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
50 55 60

10

ES 2 704 223 T3

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Ser Gln Gly  
85 90 95

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

5 <210> 56  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
  
<400> 56

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

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

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

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

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

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr  
85 90 95

Tyr Cys Lys Thr Tyr Phe Tyr Ser Phe Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

10 Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

15 <210> 57  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> *Mus musculus*  
  
<400> 57

ES 2 704 223 T3

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Thr  
                   20                    25                    30

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

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
                   50                    55                    60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Gly  
                   85                    90                    95

Thr His Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
                   100                    105                    110

<210> 58  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 58

5

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

Thr Met Lys Leu Ser Cys Glu Ile Ser Gly Leu Thr Phe Arg Asn Tyr  
                   20                    25                    30

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

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

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

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

Tyr Cys Lys Tyr Tyr Phe Tyr Ser Phe Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
                   100                    105                    110

Leu Val Thr Val Ser Ala  
                   115

10



ES 2 704 223 T3

<210> 59  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 59

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5 10 15

<210> 60  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

15

<400> 60

Gly Arg Gly Asp Ser Pro Lys  
1 5

<210> 61  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

20

<400> 61

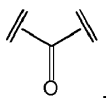
25

Asp Val Pro Lys Ser Asp Gln Phe Val Gly Leu Met  
1 5 10

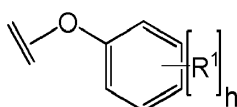
**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de preparación de un conjugado de anticuerpo multifuncional (MAC), comprendiendo el MAC:

- 5 (i) un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende al menos un fragmento de una región kappa constante de cadena ligera (CLk) que comprende  $K^{188}$  y  $H^{189}$  según la numeración de Kabat;  
 (ii) un enlazador que comprende la fórmula X-Y-Z, en la que Z es un grupo de fórmula

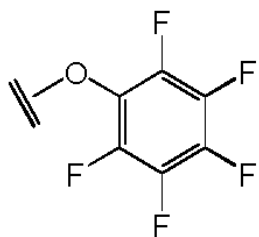


10 y está covalentemente conectado al anticuerpo a través del grupo ε-amino de la cadena lateral de  $K^{188}$  (según la numeración de Kabat), Y es una cadena de conexión compatible biológicamente, lineal o ramificada, y X es un grupo conectado covalentemente a al menos una fracción efectora, comprendiendo el procedimiento unir covalentemente la fracción efectora a un enlazador que termina en un éster activado con un grupo saliente Z \* de fórmula:



15 en la que  $R^1$  es F, y  $h = 3, 4$  o  $5$ ,  
 y hacer reaccionar el complejo fracción efectora-enlazador-Z \* así formado con el anticuerpo..

2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que Z \* es



3. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo comprende además  $D^{151}$ -CLk.

20 4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la región CLk comprende al menos los residuos 62-103 de uno de los grupos seleccionados de la SEC ID NO: 15, la SEC ID NO: 45, la SEC ID NO: 46 o la SEC ID NO: 47.

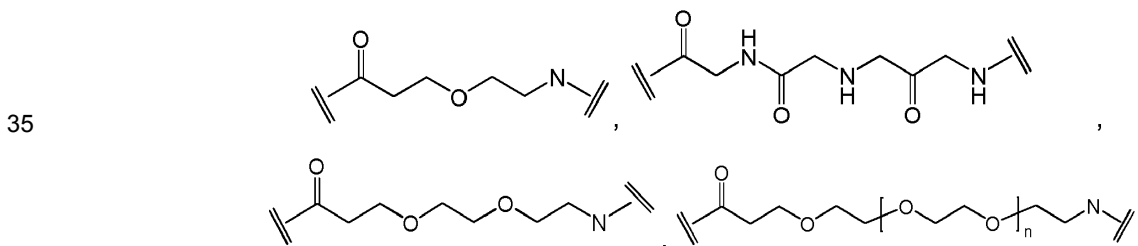
5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la región CLk comprende al menos los residuos 1-106 de uno de los grupos seleccionados de la SEC ID NO: 15, la SEC ID NO: 45, la SEC ID NO: 46 o la SEC ID NO: 47.

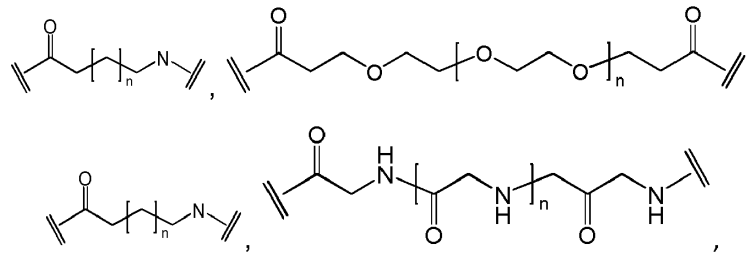
25 6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la fracción efectora es un agente terapéutico, proteína, péptido, ácido nucleico, aptámero, molécula pequeña, agonista de proteínas, antagonista de proteínas, regulador metabólico, hormona, toxina, factor de crecimiento o agente de diagnóstico

30 7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el al menos una fracción efectora es una proteína o péptido, y en el que el grupo X del enlazador está unido covalentemente al extremo amino, el extremo carboxilo o la cadena lateral de un residuo de enlace peptídico en la proteína o péptido.

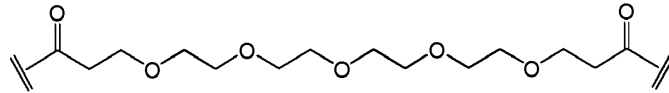
8. El procedimiento según la reivindicación 7, en el que el residuo de enlace peptídico se selecciona del grupo que consiste en K, R, C, T, Y, S, Dap, Dab, K(SH) y homólogos de K y C.

9. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que Y se selecciona del grupo que consiste en



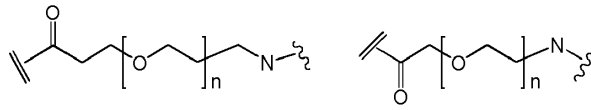
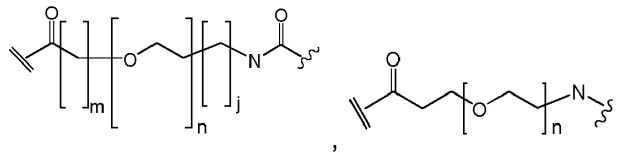
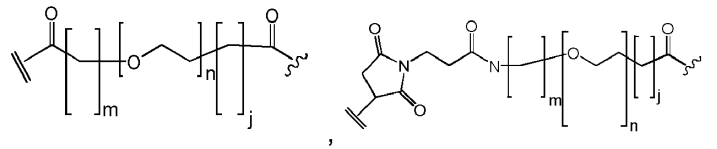


y

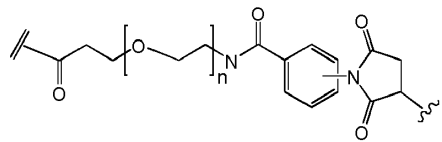
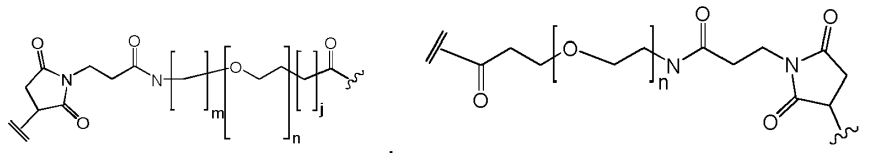
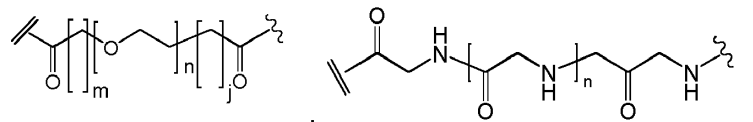
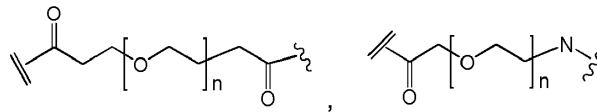
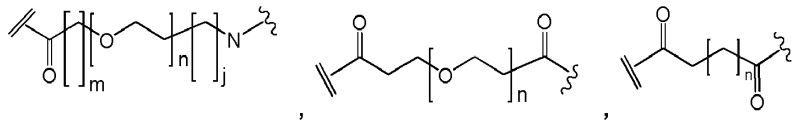


5 en las que  $n = 0$  a  $10$ ,

10. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que Y, X-Y, Y-Z o X-Y-Z se selecciona del grupo que consiste en:

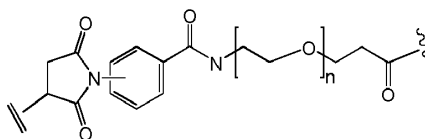


10



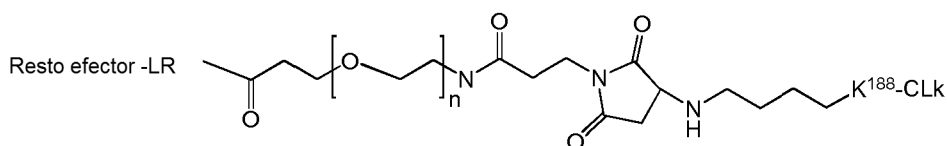
15

y



5 en las que m, n y j son cada uno independientemente un rango cuyos límites inferiores se seleccionan del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20, y cuyo límite superior se selecciona del grupo que consiste en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30, y en el que la longitud total del enlazador no excede los 200 átomos, y opcionalmente no supera los 60 átomos.

11. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende la fórmula:



10 en la que  $K^{188}$ -CLk es un enlace covalente a la cadena lateral de dicho  $K^{188}$ -CLk, Fracción efectora-LR es un enlace covalente a la Fracción efectora, y m, n y j son cada uno independientemente un rango cuyos límites inferiores se seleccionan del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20, y cuyo límite superior se selecciona del grupo que consiste en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30, y en el que la longitud total del enlazador no excede los 200 átomos.

15 12. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en rituximab, cetuximab, infliximab, adalimumab, natalizumab, omalizumab, ranibizumab y palivizumab.

13. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, además **caracterizado por** uno o más de los siguientes:

20 (a) la proporción de la fracción efectora: el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en entre aproximadamente 1: 1 y aproximadamente 15: 1, entre aproximadamente 2: 1 y aproximadamente 5: 1, entre aproximadamente 3: 1 y aproximadamente 6: 1, entre aproximadamente 3: 1 a aproximadamente 6: 1, entre aproximadamente 3,5: 1 y aproximadamente 5: 1, entre aproximadamente 5: 1 y aproximadamente 15: 1, entre aproximadamente 5:1 y aproximadamente 7:1; y entre aproximadamente 3,7:1 a aproximadamente 4,3:1;

25 (b) la relación molar de la fracción efectora: anticuerpo es un rango con un límite inferior seleccionado del grupo que consiste en aproximadamente 1, aproximadamente 1,2, aproximadamente 1,4, aproximadamente 1,5, aproximadamente 1,6, aproximadamente 1,8, aproximadamente 2, aproximadamente 2,2, aproximadamente 2,4, aproximadamente 2,5, aproximadamente 2,6, aproximadamente 2,8, aproximadamente 3, aproximadamente 3,2, aproximadamente 3,3, aproximadamente 3,4, aproximadamente 3,5, aproximadamente 3,6, aproximadamente 3,7, aproximadamente 3,8, aproximadamente 3,9, aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,1, aproximadamente 4,2, aproximadamente 4,3, aproximadamente 4,4, aproximadamente 4,5, aproximadamente 4,6, aproximadamente 4,7, aproximadamente 4,8, aproximadamente 4,9, aproximadamente 5, aproximadamente 5,2, aproximadamente 5,4, aproximadamente 5,5, aproximadamente 5,6, aproximadamente 5,8, aproximadamente 6, aproximadamente 6,2, aproximadamente 6,4, aproximadamente 6,5, aproximadamente 6,6, aproximadamente 6,8, aproximadamente 7, aproximadamente 7,3, aproximadamente 7,5, aproximadamente 7,7, aproximadamente 8, aproximadamente 8,5, aproximadamente 9, aproximadamente 9,5 y aproximadamente 10 a 1, y un límite superior seleccionado del grupo que consiste en aproximadamente 1,5, aproximadamente 1,6, aproximadamente 1,8, aproximadamente 2, aproximadamente 2,2, aproximadamente 2,4, aproximadamente 2,5, aproximadamente 2,6, aproximadamente 2,8, aproximadamente 3, aproximadamente 3,2, aproximadamente 3,3, aproximadamente 3,4, aproximadamente 3,5, aproximadamente 3,6, aproximadamente 3,7, aproximadamente 3,8, aproximadamente 3,9, aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,1, aproximadamente 4,2, aproximadamente 4,3, aproximadamente 4,4, aproximadamente 4,5, aproximadamente 4,6, aproximadamente 4,7, aproximadamente 4,8, aproximadamente 4,9, aproximadamente 5, aproximadamente 5,2, aproximadamente 5,4, aproximadamente 5,5, aproximadamente 5,6, aproximadamente 5,8, aproximadamente 6, aproximadamente 6,2, aproximadamente 6,4, aproximadamente 6,5, aproximadamente 6,6, aproximadamente 6,8, aproximadamente 7, aproximadamente 7,3, aproximadamente 7,5, aproximadamente 7,7, aproximadamente 8, aproximadamente 8,5, aproximadamente 9, aproximadamente 9,5, aproximadamente 10 y aproximadamente 15 a 1;

30 (c) la concentración de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en entre aproximadamente 1 y aproximadamente  $100 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ , al menos unos  $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ , al menos unos  $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ , y entre aproximadamente 5 y aproximadamente  $50 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ;

35 (d) la concentración de anticuerpo durante la reacción de conjugación con el resto / enlazador efector y el grupo saliente  $Z^*$  está en un rango donde el límite inferior del rango se selecciona entre aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 30 y aproximadamente  $40 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ , y el límite superior del rango se selecciona del grupo que consiste en aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 60, aproximadamente 70, aproximadamente 70, aproximadamente 80,

aproximadamente 90, aproximadamente 100, aproximadamente 150, aproximadamente 200, aproximadamente 500 mg.ml<sup>-1</sup>;

(e) la reacción se lleva a cabo a una temperatura entre aproximadamente 4 °C y aproximadamente 40 ° C, o entre aproximadamente 4 °C y aproximadamente 30 ° C, o entre aproximadamente 15 °C y aproximadamente 25 ° C;

(f) la reacción tiene lugar a un pH seleccionado del grupo que consiste en entre aproximadamente 6 y aproximadamente 9, y entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 8;

(g) la reacción de conjugación tiene lugar entre un rango de valores de pH, cuyo límite inferior se selecciona del grupo que consiste en 5,5, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 y 8, y cuyo límite superior se selecciona del grupo que consiste en 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,5 y 9;

(h) el anticuerpo comprende una región CLλ, y el procedimiento comprende además la etapa inicial de sustituir una porción correspondiente de la región CLλ (según la numeración de Kabat) con al menos los residuos 62-103, o al menos los residuos 1-106 de cualquiera del grupo que consiste en SEC ID NO: 15, SEC ID NO: 45, SEC ID NO: 46 o SEC ID NO: 47;

(i) la fracción efectora y la proteína se conjugan juntos durante un tiempo seleccionado del grupo que consiste en al menos aproximadamente 30 minutos, al menos aproximadamente 60 minutos y al menos aproximadamente 2 horas;

(j) la concentración de sal de la reacción de conjugación se selecciona del grupo que consiste en entre aproximadamente 0 y aproximadamente 0,1M, entre aproximadamente 0 y aproximadamente 0,5M, entre aproximadamente 0 y aproximadamente 0,3M, y por debajo de aproximadamente 0,2M;

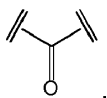
(k) la reacción de conjugación comprende una sal de haluro cuyo haluro se selecciona del grupo que consiste en F, Cl, Br, I, y cuyo metal se selecciona del grupo que consiste en Li, Na, K, Be, Mg, Ca;

(l) después de la conjugación del grupo Fracción efectora-Enlazador-Z \* con el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo, la reacción se detiene y se ajusta a aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,0, opcionalmente usando un tampón de succinato y glicina.

14. Una composición que comprende un conjugado de anticuerpo multifuncional (MAC) producido según el procedimiento reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 1-13.

15. Una composición que comprende un conjugado de anticuerpo multifuncional (MAC), comprendiendo el MAC:

- (i) un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende al menos un fragmento de una región kappa constante de cadena ligera (CLκ) que comprende K<sup>188</sup> y H<sup>189</sup> Según la numeración de Kabat;
- (ii) un enlazador que comprende la fórmula X-Y-Z, en la que Z es un grupo de fórmula



y está covalentemente conectado al anticuerpo a través del grupo ε-amino de la cadena lateral de K<sup>188</sup> (de acuerdo con la numeración de Kabat), Y es una cadena de conexión compatible biológicamente, lineal o ramificada, y X es un grupo conectado covalentemente a al menos una fracción efectora,

en el que al menos aproximadamente el 50 % de la fracción efectora en la composición o muestra se conjuga con K<sup>188</sup>-CLκ.

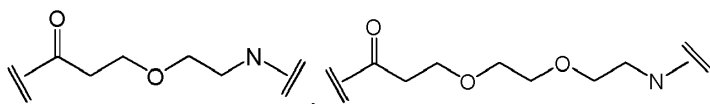
16. La composición según la reivindicación 15, en la que el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo comprende además D<sup>151</sup>-CLκ.

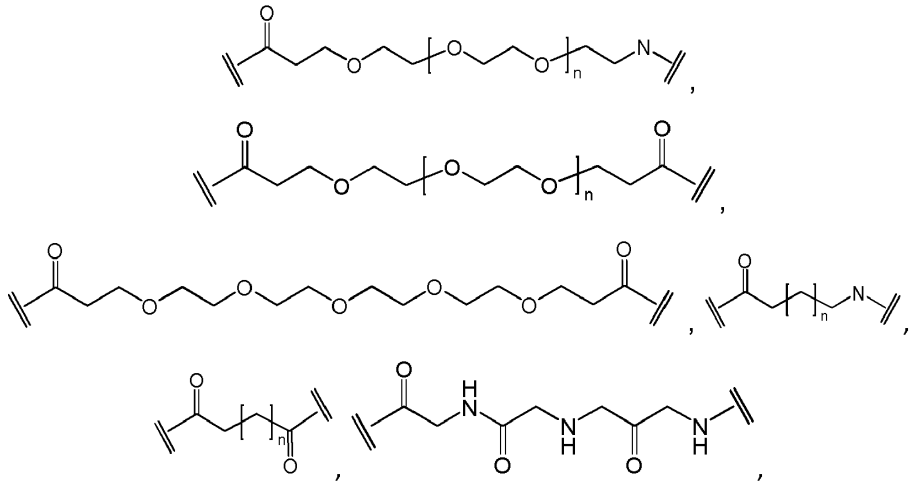
17. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 15-16, en la que la región CLκ comprende al menos los residuos 62-103 de uno de los grupos seleccionados de la SEC ID NO: 15, la SEC ID NO: 45, la SEC ID NO: 46 o la SEC. ID NO: 47, y preferiblemente al menos los residuos 1-106 de uno de los grupos seleccionados de la SEC ID NO: 15, la SEC ID NO: 45, la SEC ID NO: 46 o la SEC ID NO: 47.

18. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en la que la fracción efectora es un agente terapéutico, proteína, péptido, ácido nucleico, aptámero, molécula pequeña, agonista de proteína, antagonista de proteína, regulador metabólico, hormona, toxina, factor de crecimiento, o agente de diagnóstico.

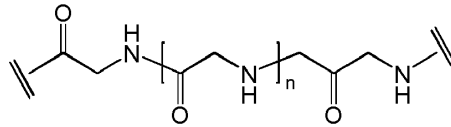
19. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, en la que el al menos una fracción efectora es una proteína o péptido, y en la que el grupo X del enlazador está unido covalentemente al extremo amino, al extremo carboxilo, o a la cadena lateral de un residuo de unión a péptido en la proteína o péptido, y en el que preferiblemente el residuo de unión a péptido se selecciona del grupo que consiste en K, R, C, T, Y, S, Dap, Dab, K(SH) y homólogos de K y C.

20. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 15-19, en la que Y se selecciona del grupo que consiste en



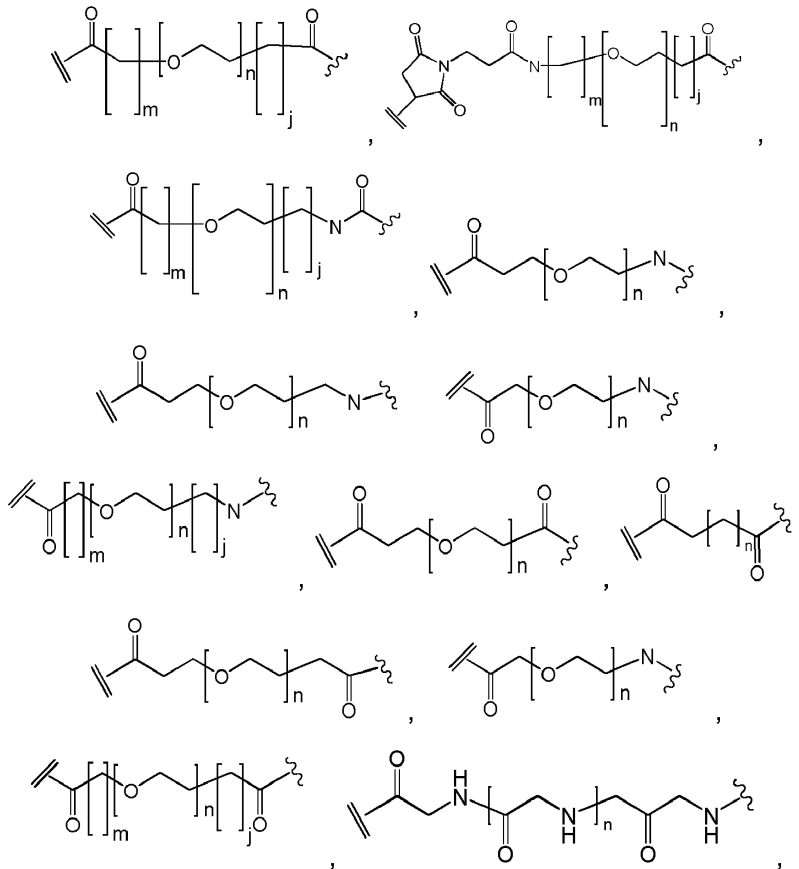


5 y



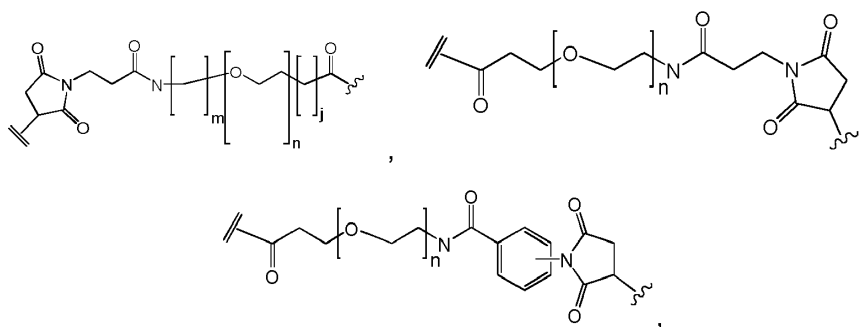
en las que n puede ser 0 a 10, 1-10 o 1-5.

21. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 15-20, en la que Y, X-Y, Y-Z o X-Y-Z se selecciona del grupo que consiste en:

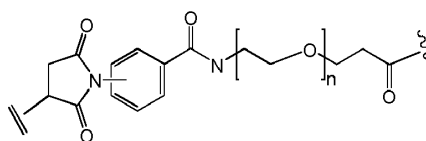


10

15

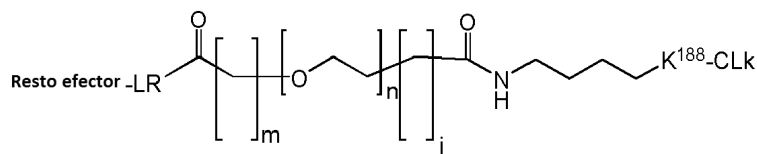


y



5 en las que  $m$ ,  $n$  y  $j$  son cada uno independientemente un rango cuyos límites inferiores se seleccionan del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20, y cuyo límite superior se selecciona del grupo que consiste en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30, y en la que la longitud total del enlazador no excede los 200 átomos, y opcionalmente no supera los 60 átomos.

10 22. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 21, que comprende la fórmula:



15 en la que  $K^{188}\text{-CLK}$  es un enlace covalente a la cadena lateral de dicho  $K^{188}\text{-CLK}$ , Fracción efectora-LR es un enlace covalente a la Fracción efectora, y  $m$ ,  $n$  y  $j$  son cada uno independientemente un rango cuyos límites inferiores se seleccionan del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20, y cuyo límite superior se selecciona del grupo que consiste en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30, y en el que la longitud total del enlazador no excede los 200 átomos.

23. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 15-22, en la que el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en, Rituximab, Cetuximab, Infliximab, Adalimumab, Natalizumab, Omalizumab, Ranibizumab y Palivizumab.

20 24. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 15-23, además **caracterizada por** uno o más de los siguientes:

25 (a) la relación molar de la fracción efectora: el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 4,6:1, entre aproximadamente 2:1 y aproximadamente 7:1, entre aproximadamente 3:1 y aproximadamente 6:1, entre aproximadamente 3:1 y aproximadamente 7:1, y entre aproximadamente 3:1 y aproximadamente 5:1;

30 (b) la relación molar de la fracción efectora: anticuerpo es un rango con un límite inferior seleccionado del grupo que consiste en aproximadamente 1, aproximadamente 1,2, aproximadamente 1,4, aproximadamente 1,5, aproximadamente 1,6, aproximadamente 1,8, aproximadamente 2, aproximadamente 2,2, aproximadamente 2,4, aproximadamente 2,5, aproximadamente 2,6, aproximadamente 2,8, aproximadamente 3, aproximadamente 3,2, aproximadamente 3,3, aproximadamente 3,4, aproximadamente 3,5, aproximadamente 3,6, aproximadamente 3,7, aproximadamente 3,8, aproximadamente 3,9, aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,1, aproximadamente 4,2, aproximadamente 4,3, aproximadamente 4,4, aproximadamente 4,5, aproximadamente 4,6, aproximadamente 4,7, aproximadamente 4,8, aproximadamente 4,9, aproximadamente 5, aproximadamente 5,2, aproximadamente 5,4, aproximadamente 5,5, aproximadamente 5,6, aproximadamente 5,8, aproximadamente 6, aproximadamente 6,2, aproximadamente 6,4, aproximadamente 6,5, aproximadamente 6,6, aproximadamente 6,8, aproximadamente 7, aproximadamente 7,3, aproximadamente 7,5, aproximadamente 7,7, aproximadamente 8, aproximadamente 8,5, aproximadamente 9, aproximadamente 9,5 y aproximadamente 10 a 1, y un límite superior seleccionado del grupo que consiste en aproximadamente 1,5, aproximadamente 1,6, aproximadamente 1,8, aproximadamente 2, aproximadamente 2,2, aproximadamente 2,4, aproximadamente 2,5,

aproximadamente 2,6, aproximadamente 2,8, aproximadamente 3, aproximadamente 3,2, aproximadamente 3,3, aproximadamente 3,4, aproximadamente 3,5, aproximadamente 3,6, aproximadamente 3,7, aproximadamente 3,8, aproximadamente 3,9, aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,1, aproximadamente 4,2, aproximadamente 4,3, aproximadamente 4,4, aproximadamente 4,5, aproximadamente 4,6, aproximadamente 4,7, aproximadamente 4,8, aproximadamente 4,9, aproximadamente 5, aproximadamente 5,2, aproximadamente 5,4, aproximadamente 5,5, aproximadamente 5,6, aproximadamente 5,8, aproximadamente 6, aproximadamente 6,2, aproximadamente 6,4, aproximadamente 6,5, aproximadamente 6,6, aproximadamente 6,8, aproximadamente 7, aproximadamente 7,3, aproximadamente 7,5, aproximadamente 7,7, aproximadamente 8, aproximadamente 8,5, aproximadamente 9, aproximadamente 9,5, aproximadamente 10 y aproximadamente 15 a 1;

(c) la concentración de anticuerpo durante la reacción de conjugación con el resto / enlazador efector y el grupo saliente Z \* está en un rango donde el límite inferior del rango se selecciona entre aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 30 y aproximadamente 40 mg.ml<sup>-1</sup>, y el límite superior del rango se selecciona del grupo que consiste en aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 60, aproximadamente 70, aproximadamente 70, aproximadamente 80, aproximadamente 90, aproximadamente 100, aproximadamente 150, aproximadamente 200, aproximadamente 500 mg.ml<sup>-1</sup>.

25. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 14-24, y además **caracterizada por** una o más de las siguientes características:

(a) la cantidad de la fracción efectora en la composición conjugada con K<sup>188</sup>-CLk se selecciona del grupo que consiste en al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 % y al menos aproximadamente 80 %;

(b) la cantidad del anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo que comprende una fracción efectora unida covalentemente a K<sup>188</sup>-CLk se selecciona del grupo que consiste en al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 % y al menos aproximadamente el 80 %;

(c) la cantidad de moléculas de cadena pesada no conjugadas con la fracción efectora se selecciona del grupo que consiste en al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 % y al menos aproximadamente el 90 %;

(d) la cantidad de fragmentos de cadena pesada individuales que no están conjugados tiene un límite inferior seleccionado del grupo que consiste en aproximadamente 50, 55, 60, 65, 70, 75 y 80 % y un límite superior seleccionado del grupo que consiste en aproximadamente 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 y 99 %;

(e) la cantidad de fragmentos de cadena ligera individuales que comprenden un solo sitio de conjugación para la fracción efectora está entre aproximadamente el 25 y el 95 %;

(f) el número de conjugaciones por anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo se selecciona del grupo que consiste en entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 5, entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 3, entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 1,5, entre aproximadamente 1,5 y aproximadamente 5,0, entre aproximadamente 1,5 y aproximadamente 3,0, entre aproximadamente 1,5 y aproximadamente 2,5, y entre aproximadamente 1,7 y aproximadamente 2,3;

(g) el número de conjugaciones por anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo en la composición tiene un límite inferior seleccionado del grupo que consiste en aproximadamente 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,55, 1,6, 1,65, 1,7, 1,75, 1,8, 1,85, 1,9, 1,95 y 2, y un límite superior seleccionado del grupo que consiste en aproximadamente 1,6, 1,7, 1,75, 1,8, 1,85, 1,9, 1,95, 2,0, 2,05, 2,1, 2,15, 2,2, 2,25, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5 y 5.

26. Una composición farmacéutica que comprende la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 14-25, y que comprende además un vehículo aceptable.



# FIG. 1A

## Cadena pesada

2.12.1	QAQLVESGGG	LVKPGGSLRL	SCAASGFTFS	DYMSWIRQA	PGKGLEWVSY	ISSSGSTRDY	ADSVKGRFTI	70
2.12.1.1.fx	QVQLVESGGG	LVKPGGSLRL	SCAASGFTFS	DYMSWIRQA	PGKGLEWVSY	ISSSGSTRDY	ADSVKGRFTI	
2.12.1	SRDNAKNSLY	LQMSLRAED	TAVYICVRDG	VETTFYYYYY	GMDVWGQGT	VTVSSASTKG	PSVFFLAPCS	140
2.12.1.1.fx	SRDNAKNSLY	LQMSLRAED	TAVYICVRDG	VETTFYYYYY	GMDVWGQGT	VTVSSASTKG	PSVFFLAPCS	
2.12.1	RSTSESTAAL	GCLVKDYFPE	PVTVSWNSGA	LTSGVHTFPA	VLQSSGLYSL	SSVTVVPSSN	FGTQTYTCNV	210
2.12.1.1.fx	RSTSESTAAL	GCLVKDYFPE	PVTVSWNSGA	LTSGVHTFPA	VLQSSGLYSL	SSVTVVPSSN	FGTQTYTCNV	
2.12.1	DHKPSNTKVD	KTVERKCCVE	CPPCPAPPVA	GPSVFLFFPK	PKDTLMISRT	PEVTCVVVDV	SHEDPEVQFN	280
2.12.1.1.fx	DHKPSNTKVD	KTVERKCCVE	CPPCPAPPVA	GPSVFLFFPK	PKDTLMISRT	PEVTCVVVDV	SHEDPEVQFN	
2.12.1	WYVDGVEVHN	AKTKPREEQF	NSTFRVVSVL	TVVHQDWLNG	KEYKCKVSNK	GLPAPIEKTI	SKTKGQPREP	350
2.12.1.1.fx	WYVDGVEVHN	AKTKPREEQF	NSTFRVVSVL	TVVHQDWLNG	KEYKCKVSNK	GLPAPIEKTI	SKTKGQPREP	
2.12.1	QVYTLPPSRE	EMTKNQVSLT	CLVKGFYPSD	IAVEWESNGQ	PENNYKTPPP	MLDSDGSFFL	YSKLTVDKSR	420
2.12.1.1.fx	QVYTLPPSRE	EMTKNQVSLT	CLVKGFYPSD	IAVEWESNGQ	PENNYKTPPP	MLDSDGSFFL	YSKLTVDKSR	
2.12.1	WQQGNVFSCS	VMHEALHNY	TQKSLSPG	K				451
2.12.1.1	WQQGNVFSCS	VMHEALHNY	TQKSLSPG	K				

# FIG. 1B

***Cadena ligera***

2.12.1 DIQMTQSPSS LSASVGDVRT **F**TCRASQDIR RDLGWYQQKP GKAPKRLIYA ASRLQSGVPS RFSGSGSGTE  
 2.12.1.fx DIQMTQSPSS LSASVGDVRT **I**TCRASQDIR RDLGWYQQKP GKAPKRLIYA ASRLQSGVPS RFSGSGSGTE  
 2.12.1 FTLLTISSLQP EDFATYYCLQ HNNYPRTFGQ GTEVEI**I**RTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY  
 2.12.1.fx FTLLTISSLQP EDFATYYCLQ HNNYPRTFGQ GTEVEI**K**RTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY  
 2.12.1 PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN  
 2.12.1.fx PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN  
 2.12.1 RGEC  
 2.12.1.fx RGEC

FIG. 2A

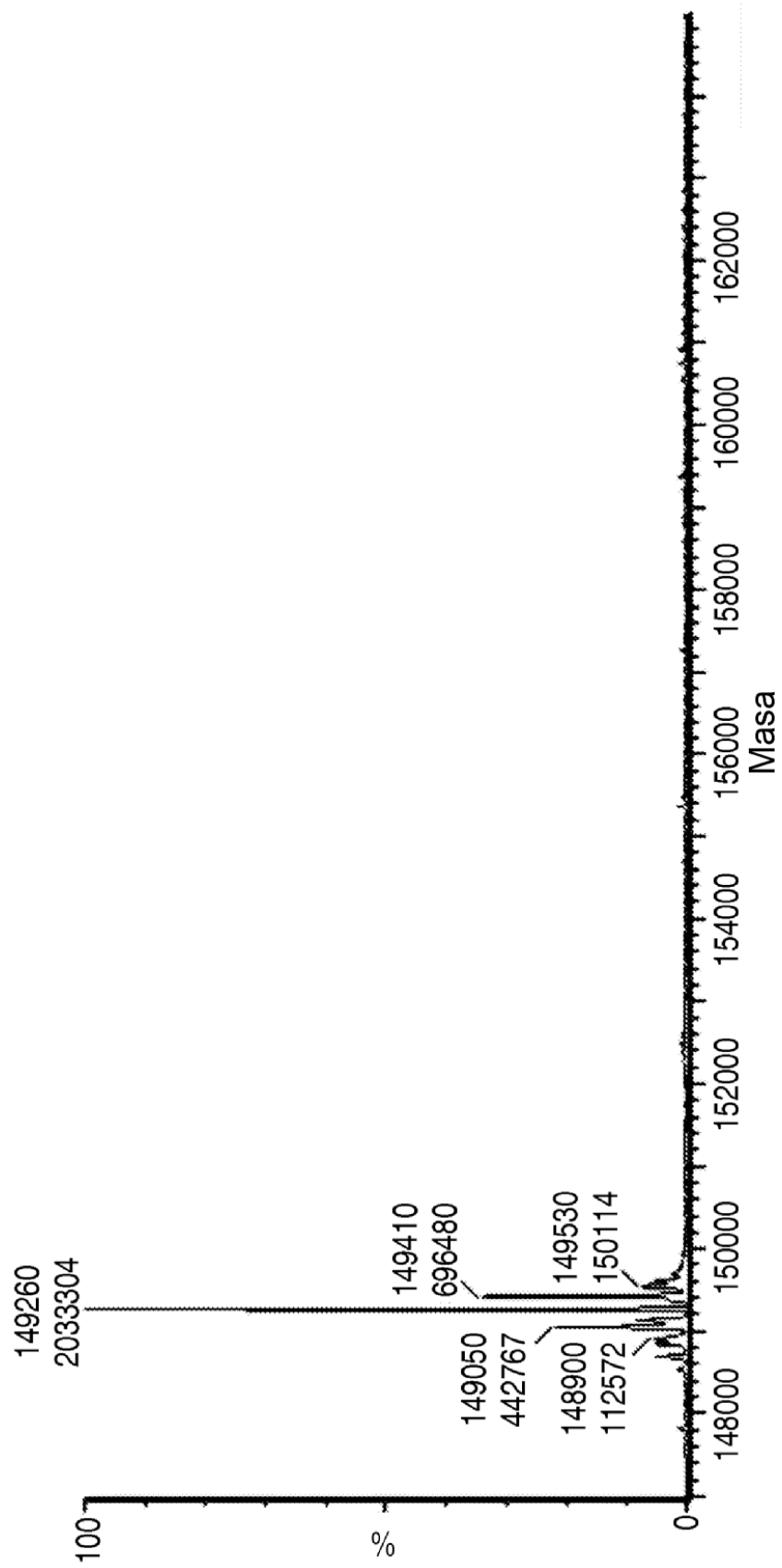
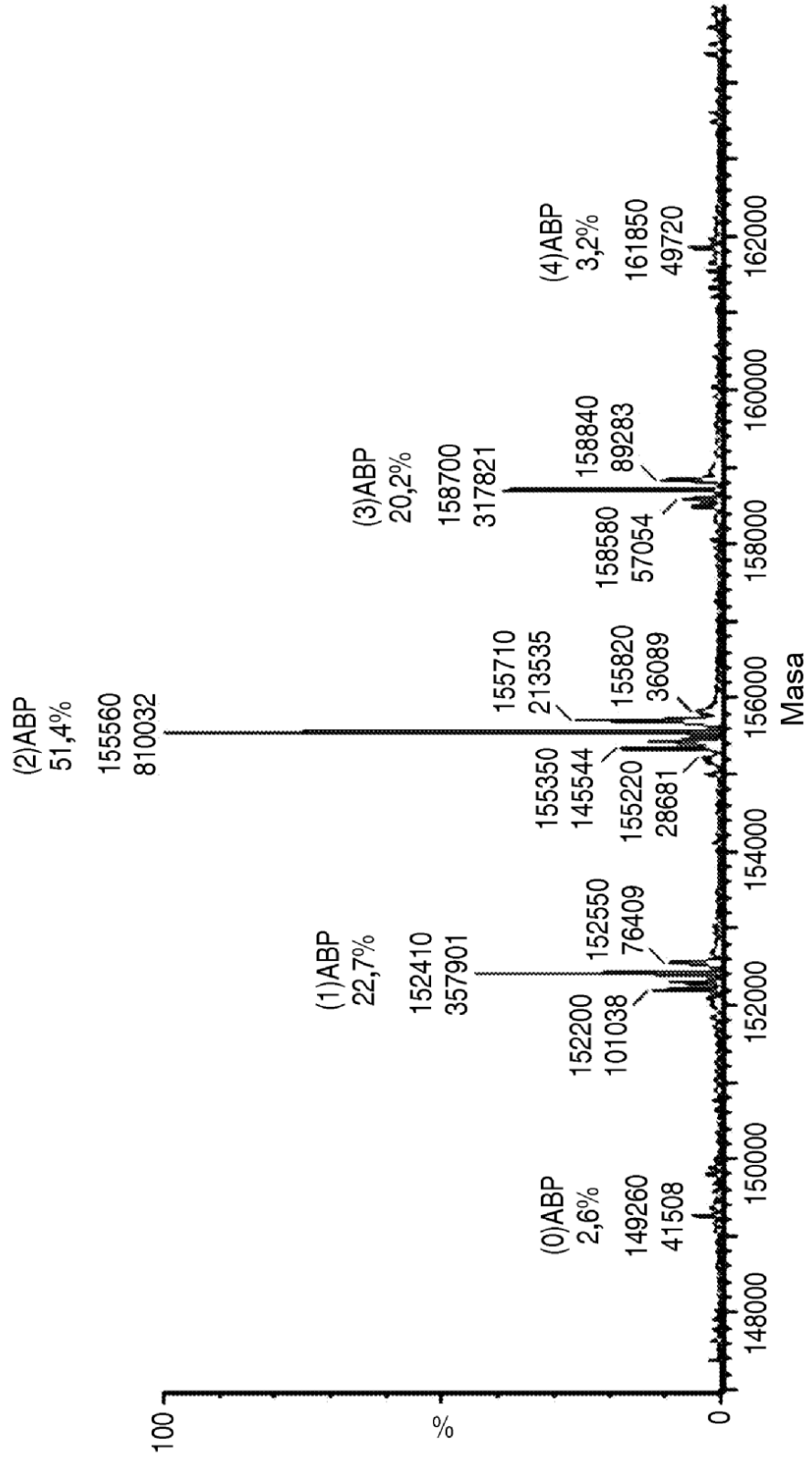
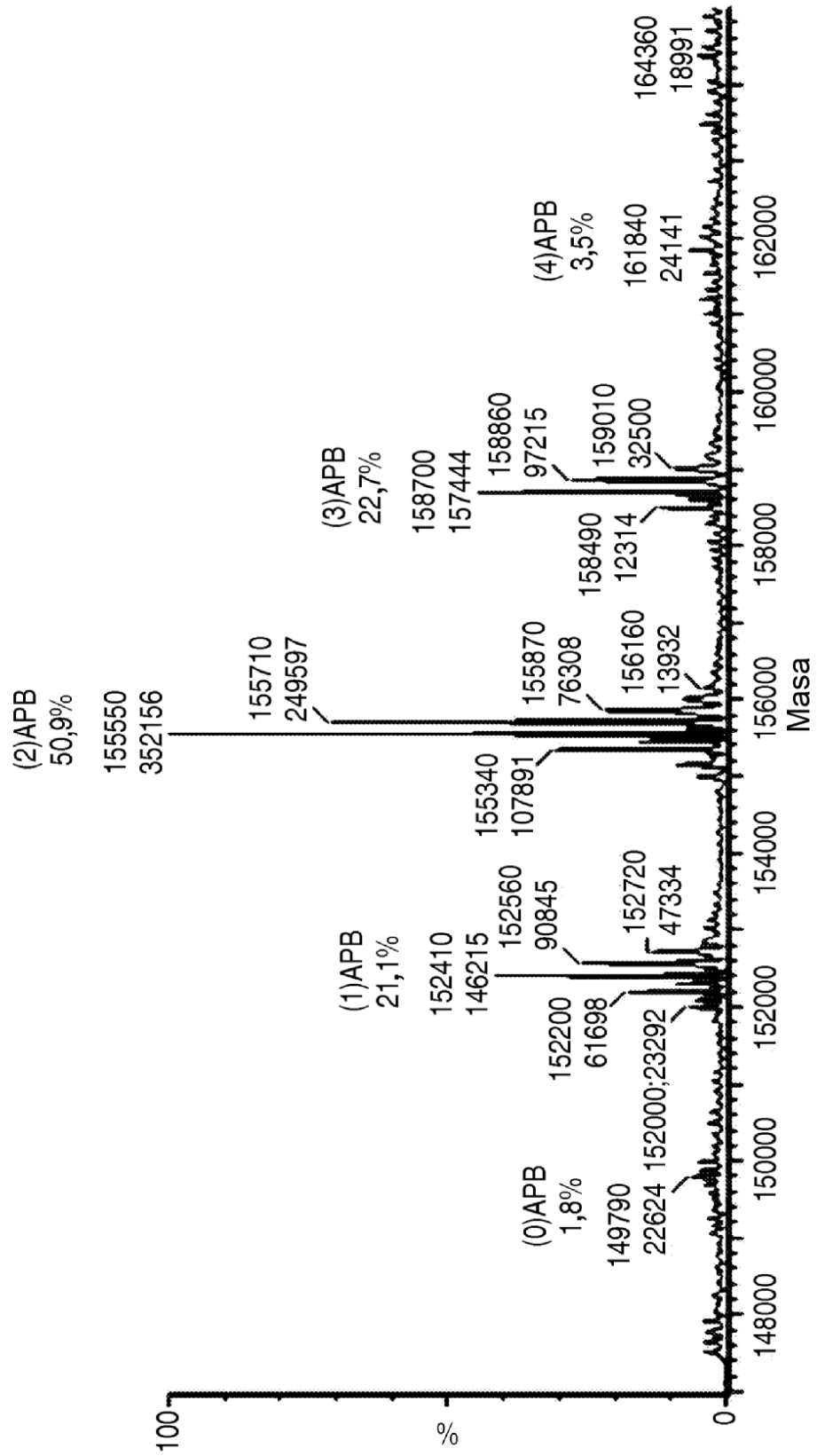


FIG. 2B



**FIG. 2C**



**FIG. 2D**

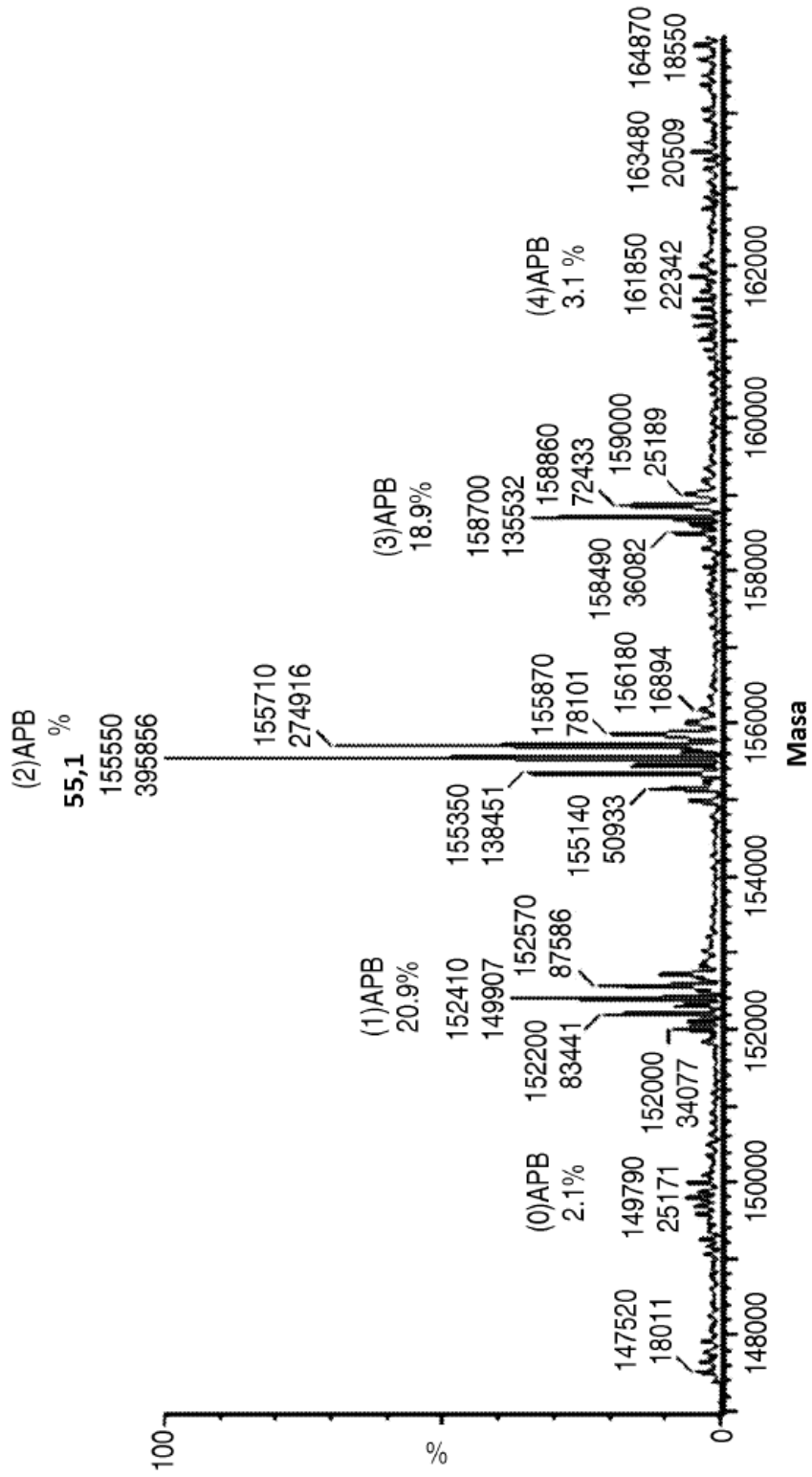


FIG. 3A

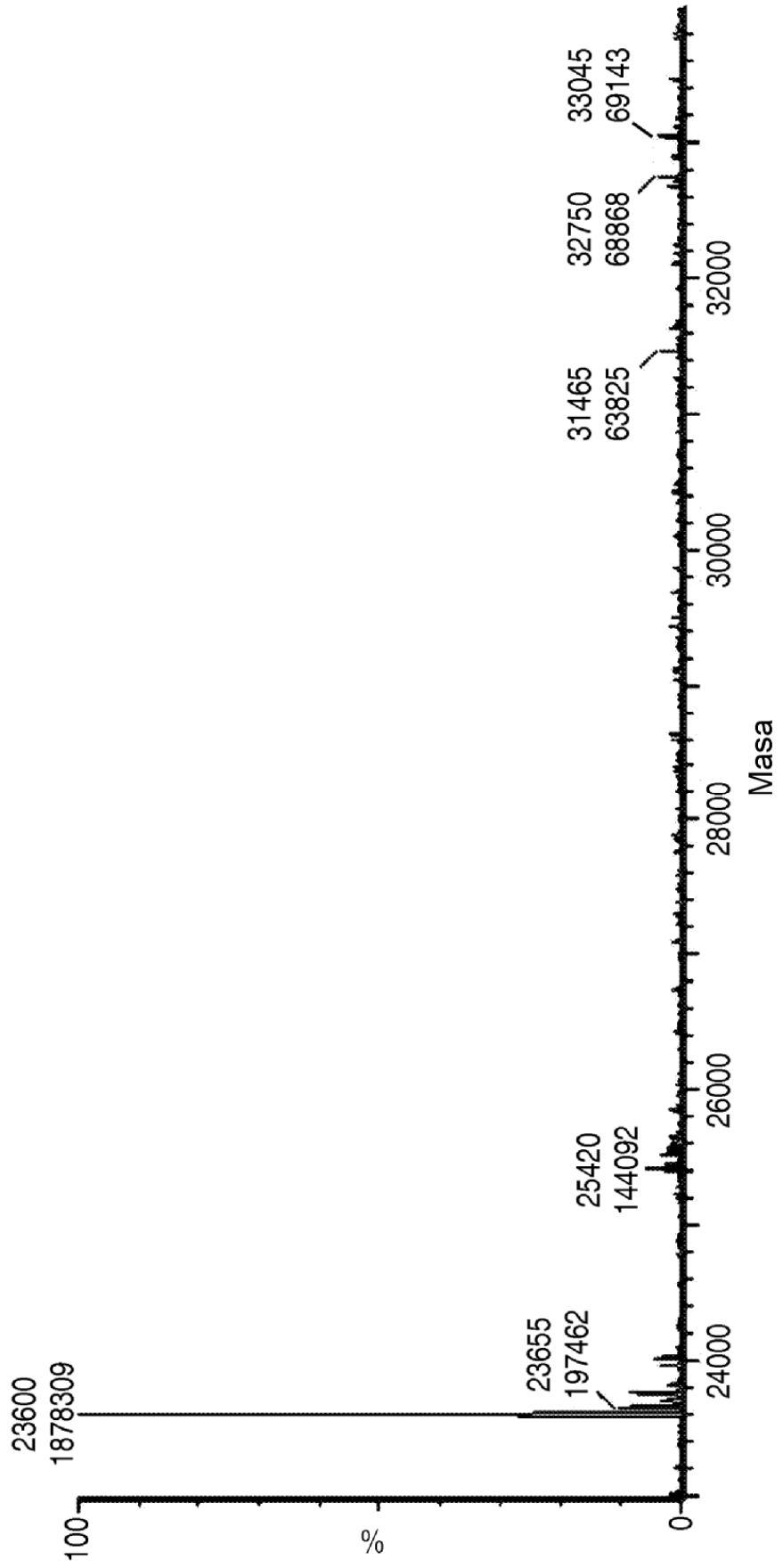


FIG. 3B

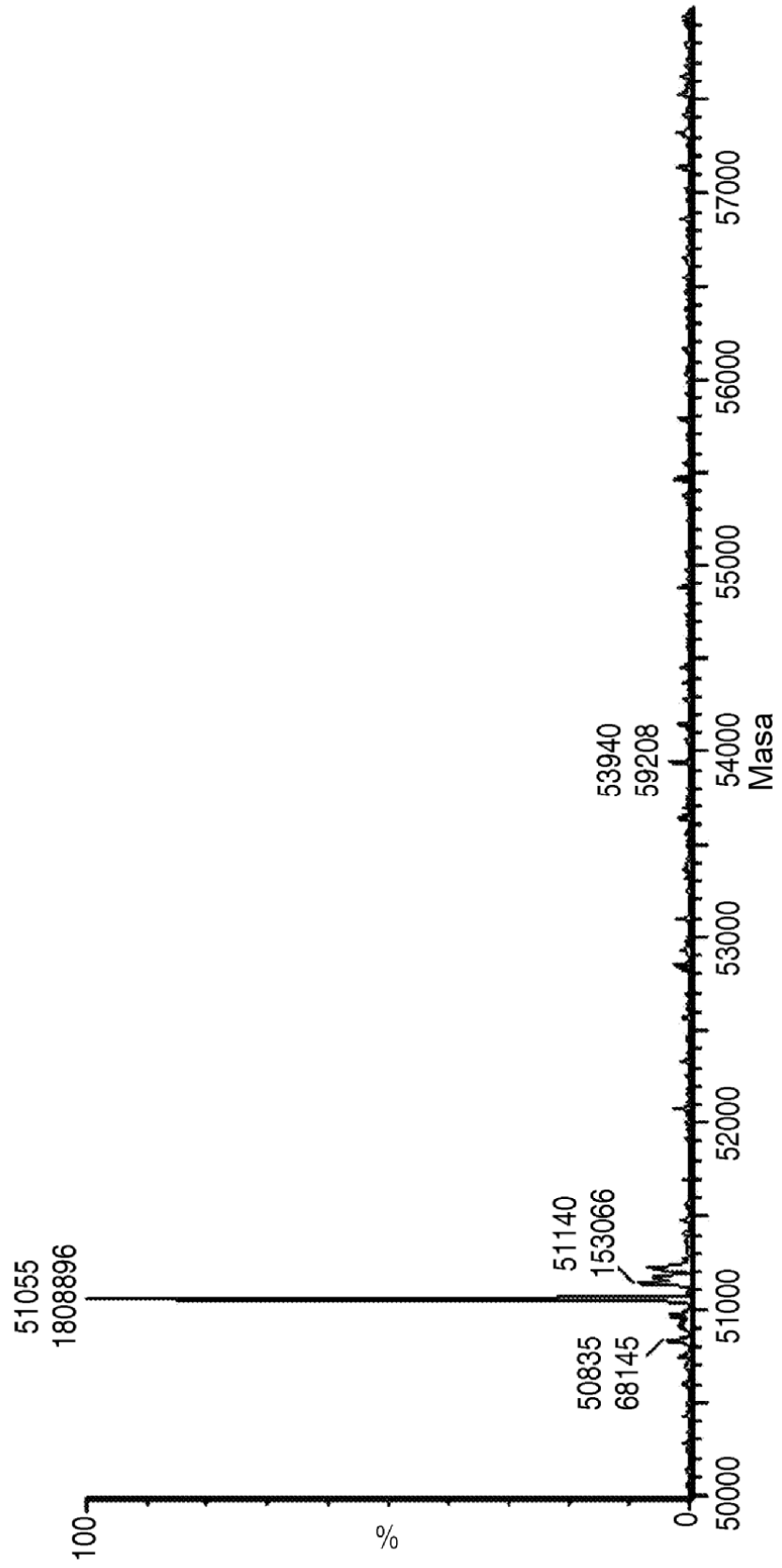




FIG. 3C

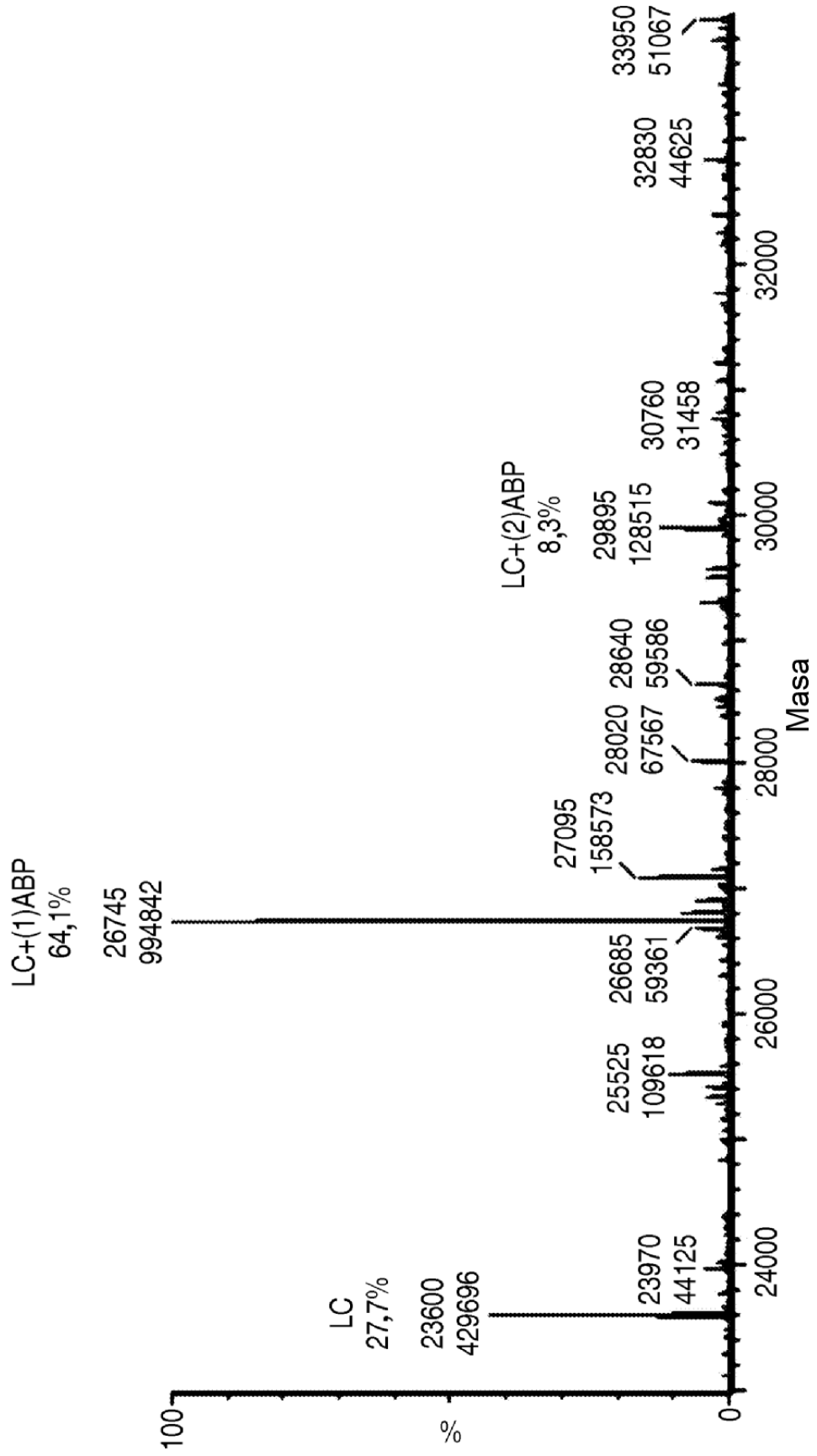


FIG. 3D



FIG. 3E

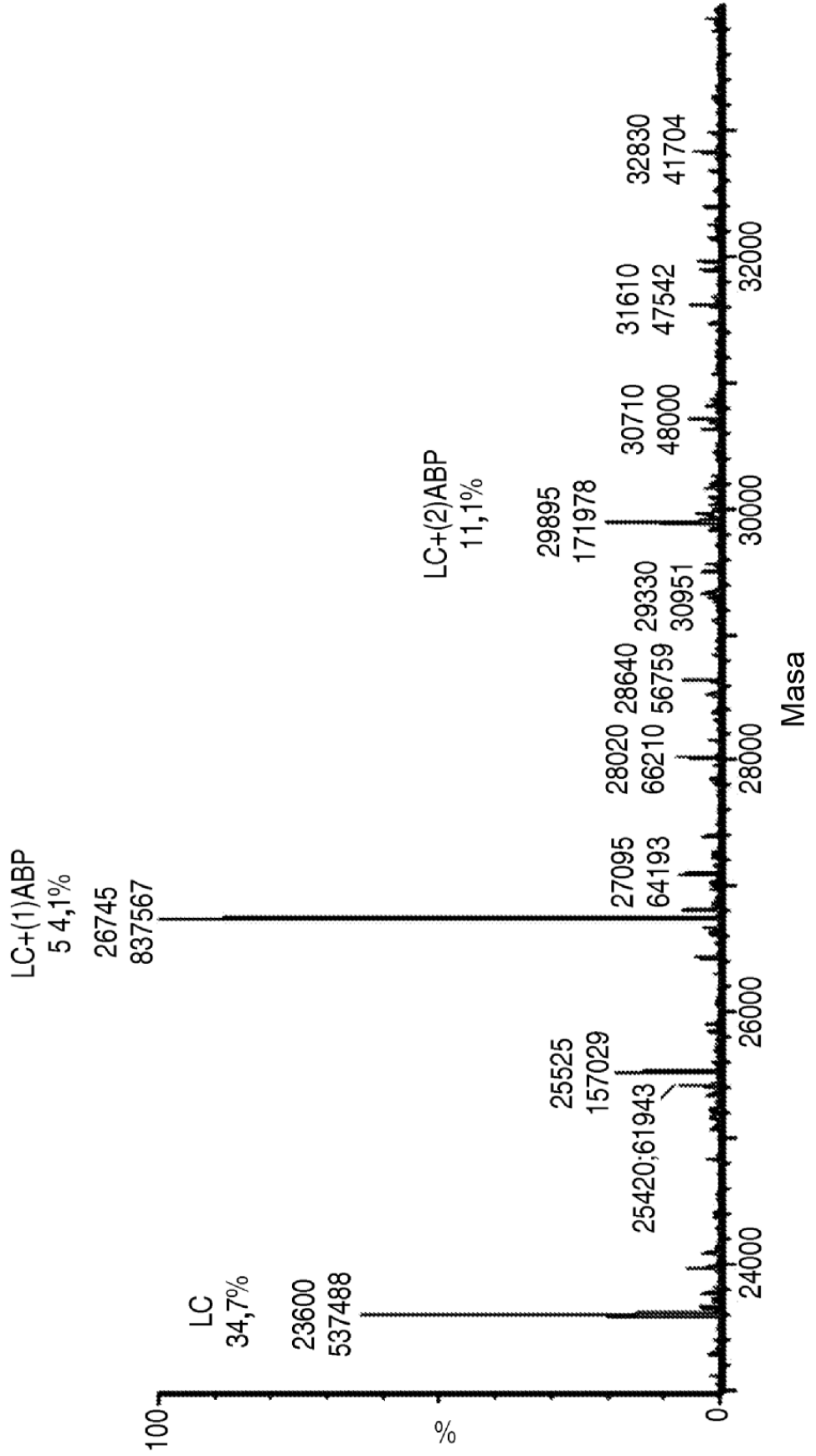


FIG. 3F

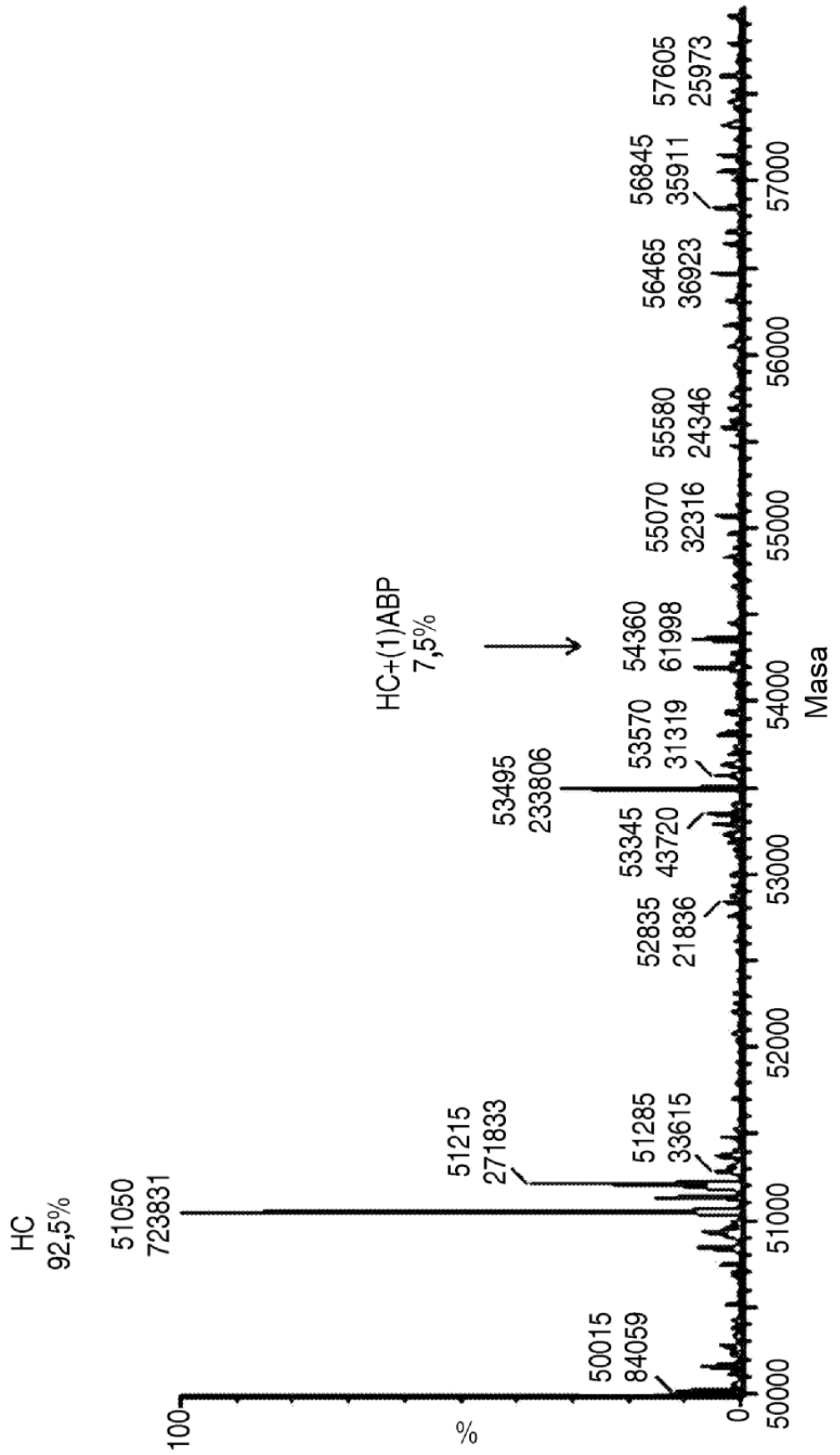


FIG. 3G

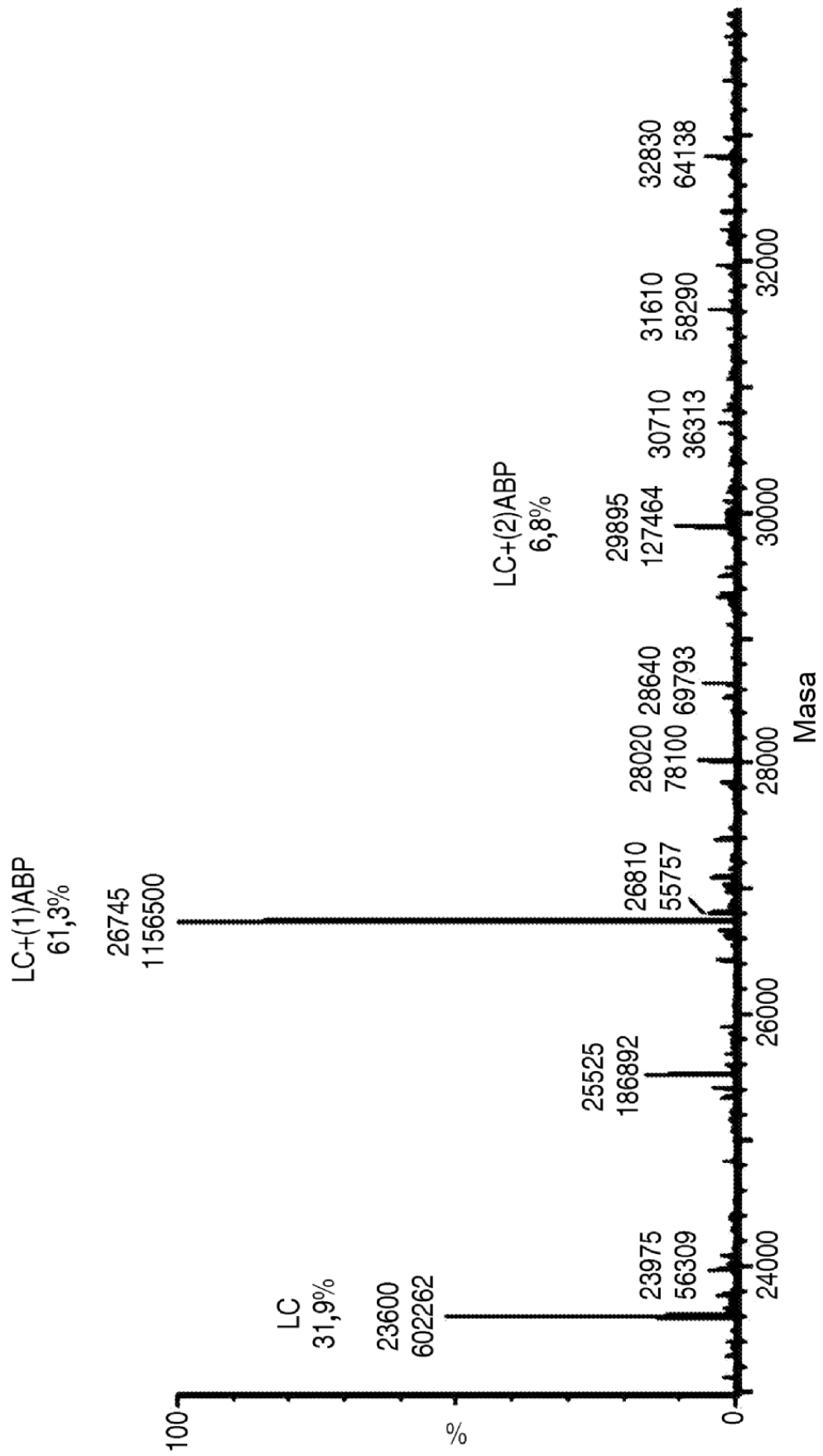


FIG. 3H



**FIG. 4A****CADENA LIGERA**

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIRRDLGW•Y•**(Y3)**QQKPGKAPKRLIY•AASRLQSGVPSRF•  
 SGGSGTEF•TITISSLQPEDF•ATY•Y•CLQHNNYPRTF•**(Y10)**GQGTKLVIKRTVAAPS VF•**(Y11)**  
 IFFPSDEQLKSGTASVVCLLNNF•Y•**(Y12)**PREAKVQW•**(Y13)**KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY  
 •**(Y14)**SLSSITLTLISKADY•**(Y15)**EKHKVY•**(Y16)**ACEVTHQGLSSPVTIKSF•NRGEC

**FIG. 4B****CADENA PESADA**

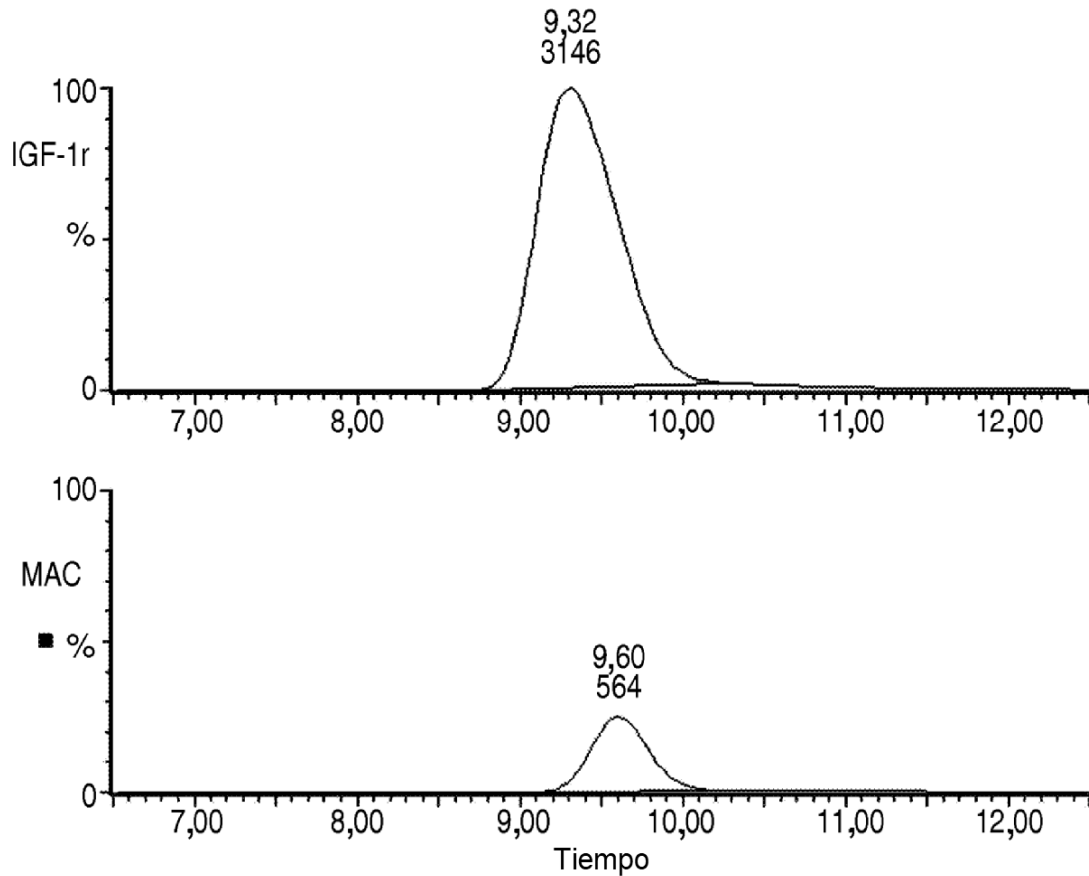
**(Y1)**QVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGF•TF•SDY•Y•MSW•**(Y6)**IRQAPGKGLEW•VSY•ISSSGSTRDY•  
**(Y9)**ADSVKGRF•**(Y10)**TISRDNAKNSLY•LQMNSLRAEDTAVY•Y•CVRDGVETTF•Y•Y•Y•Y•Y•GMDVW•  
**(Y20)**GQGTITVTVSSASTKGPSVFFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY•FPEPVTVSW•NSGALISGVHITFPAVLQS  
 SGLY•SLSSVTVPSNF•GTQTY•**(Y25)**TCNVDDHKPSNTKVDKTVVERKCCVCEPFPAPPVAGPSVF•**(Y26)**L  
 FPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF•NW•Y•**(Y29)**VDGVEVHNAKTKPREEQF•NSTF•RVVSVLTV  
 VHQDW•**(Y32)**LNGKEY•**(Y33)**KCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVY•**(Y34)**TLPPSRREEMTKNQVSLT  
 CLVKGF•YPSDI AVEW•ESNGQPENNY•**(Y37)**KTTPPMLDSDGSF•F•LY•**(Y40)**SKLITVDKSRW•QQGNVF•  
 SC SVMHEALHNY•**(Y43)**TQKSLSLSPG





# FIG. 5B

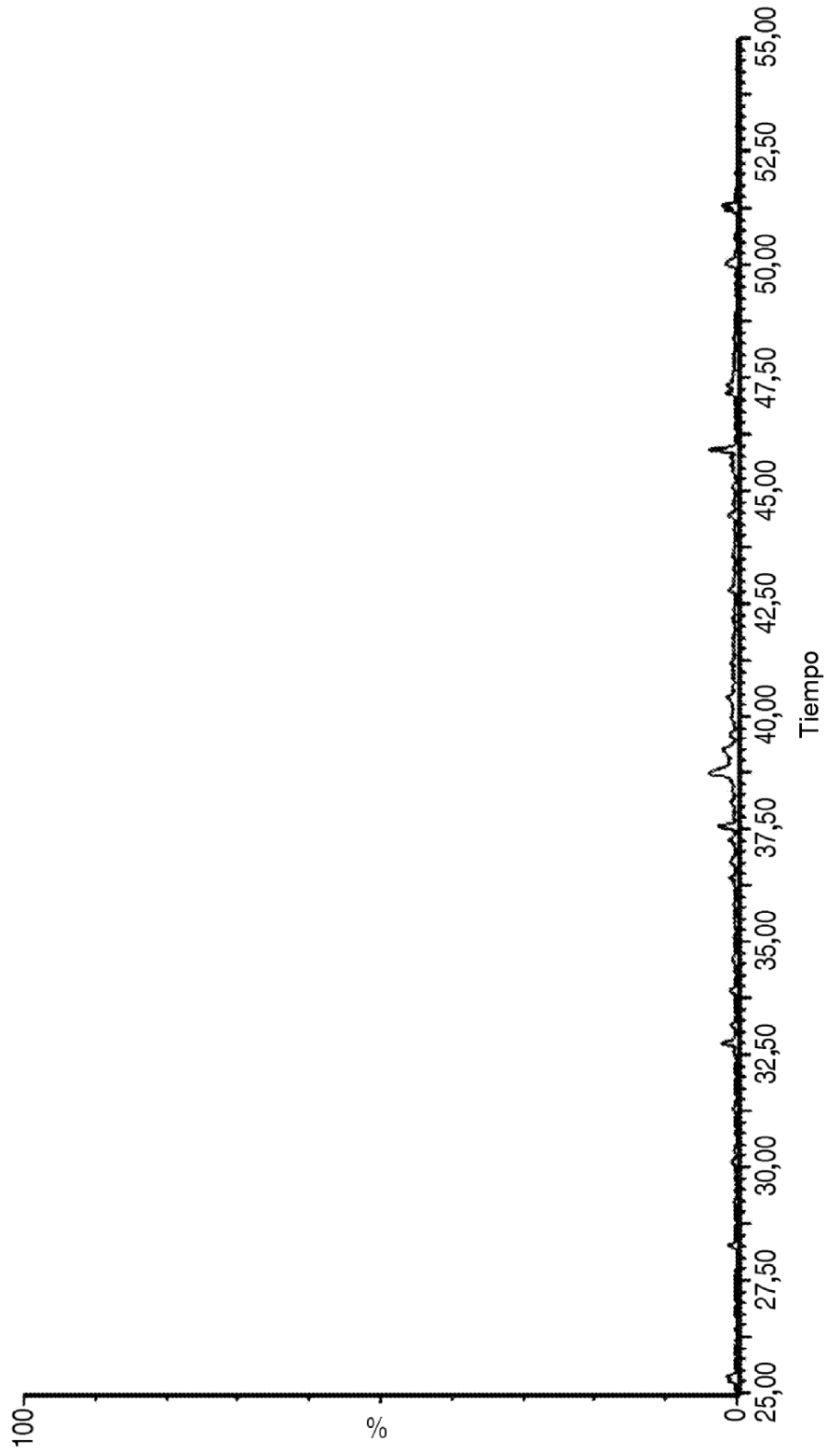
Cromatogramas de ión Y15: péptido no modificado

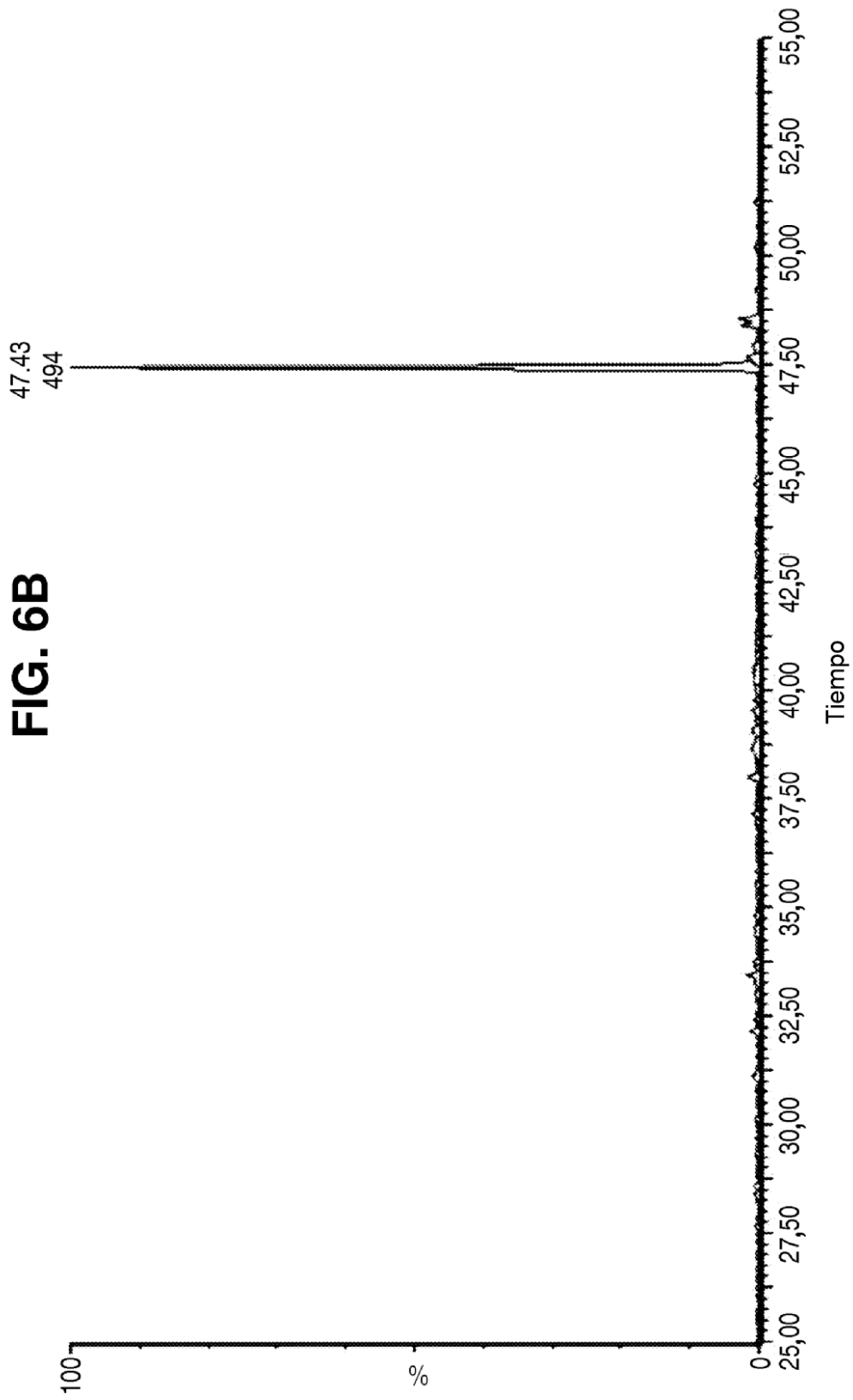


Y15 no modificado

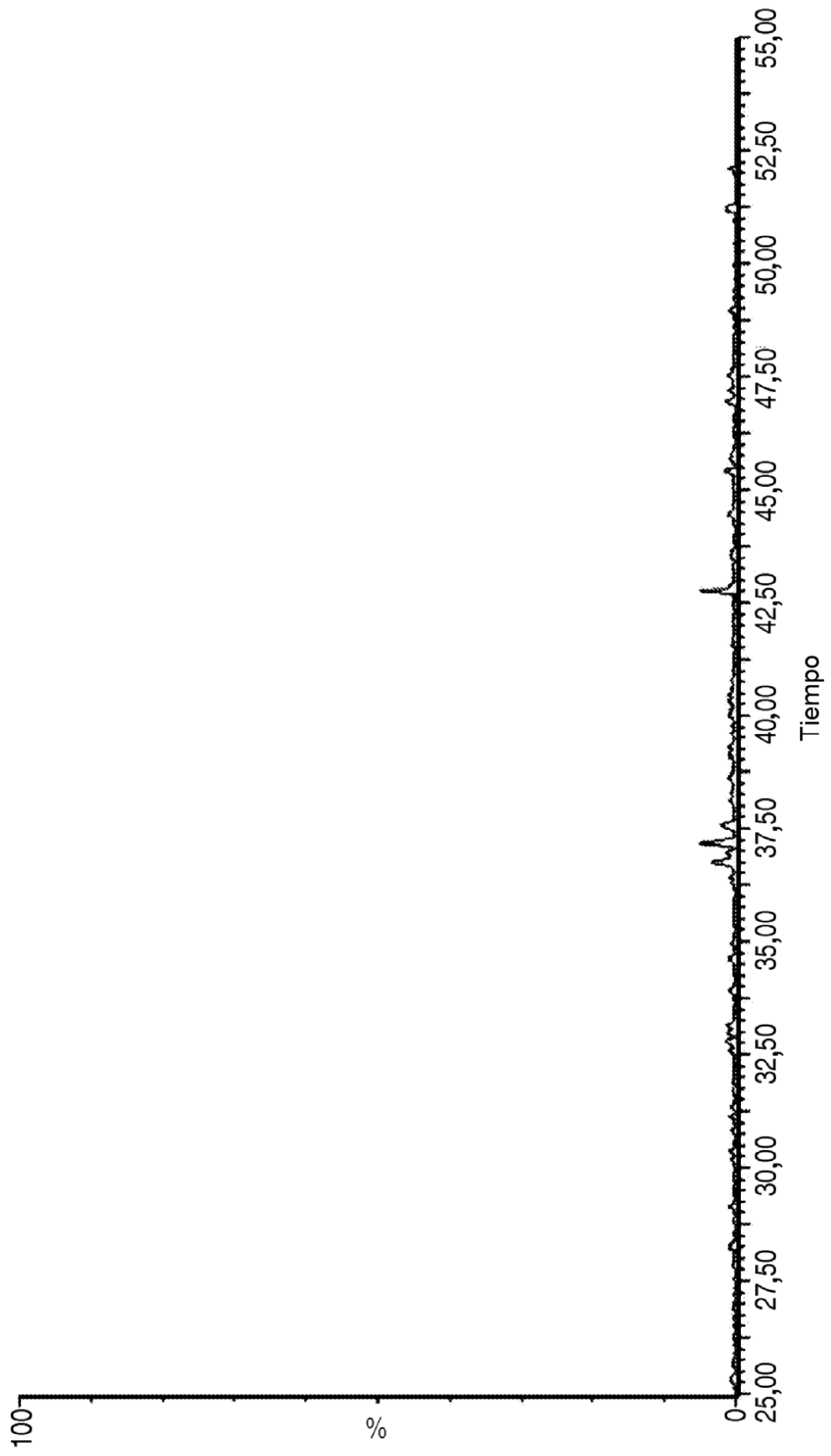
Peso molecular = 802,94

**FIG. 6A**

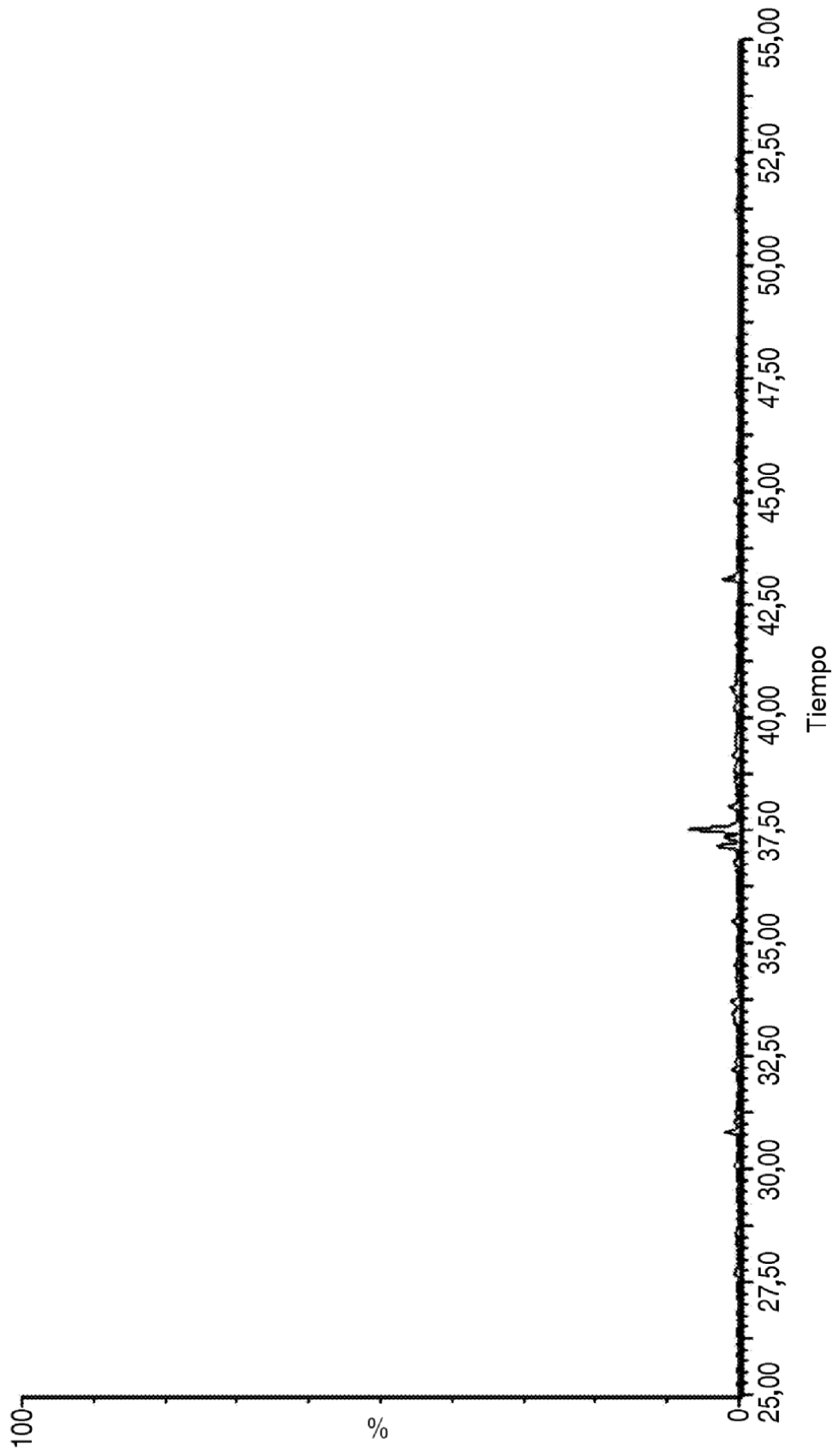




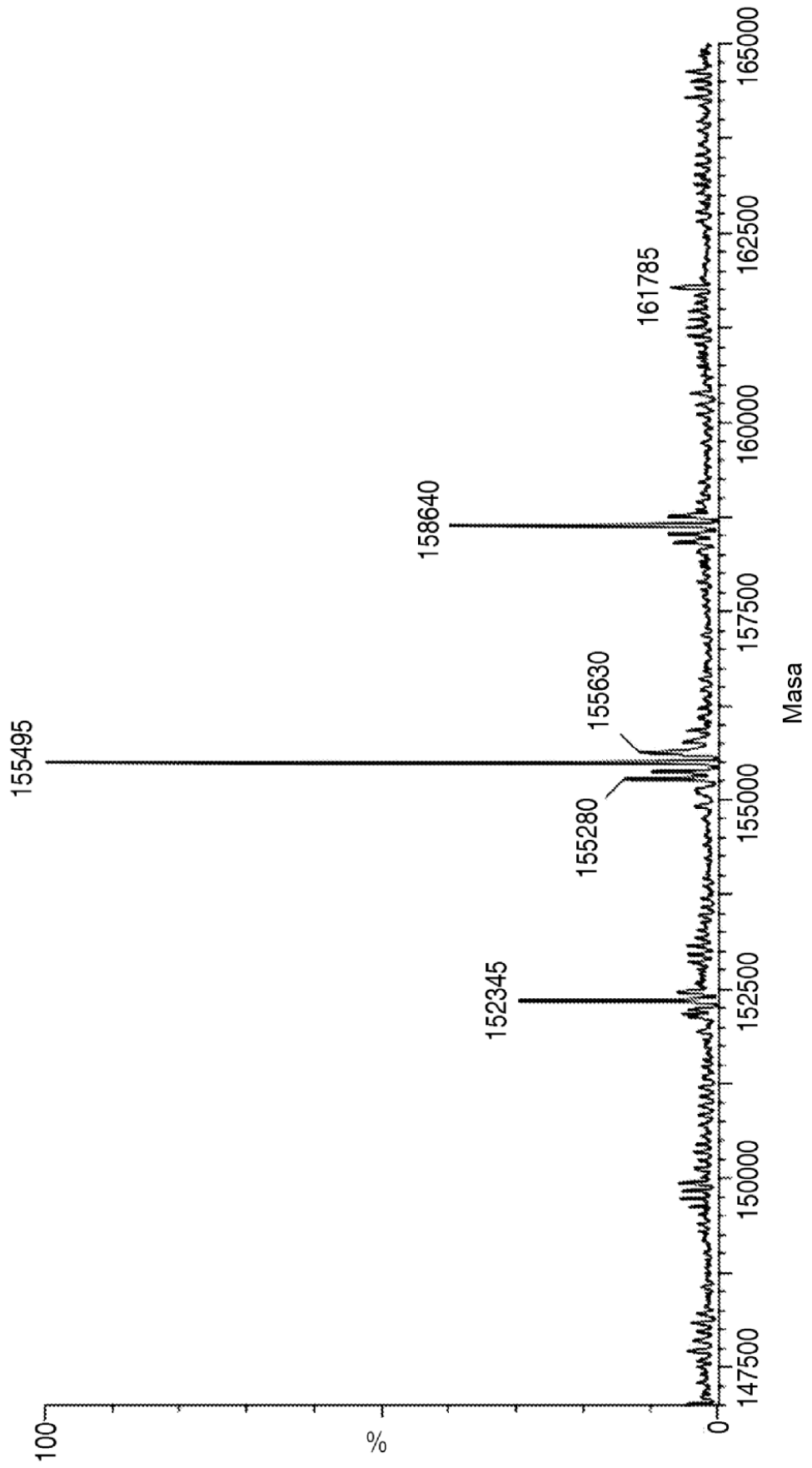
**FIG. 7A**



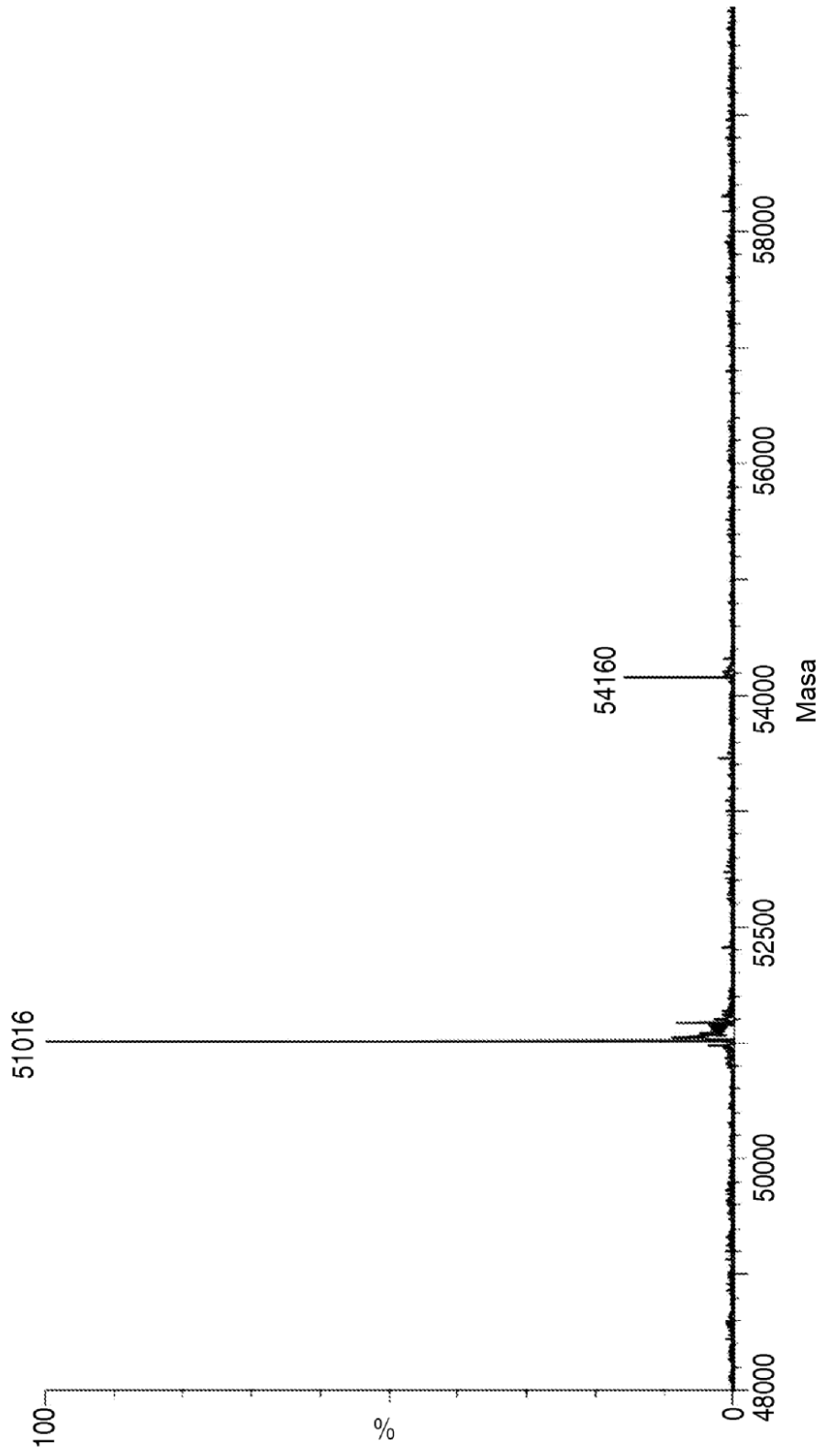
**FIG. 7B**



**FIG. 8**



**FIG. 9A**



**FIG. 9B**

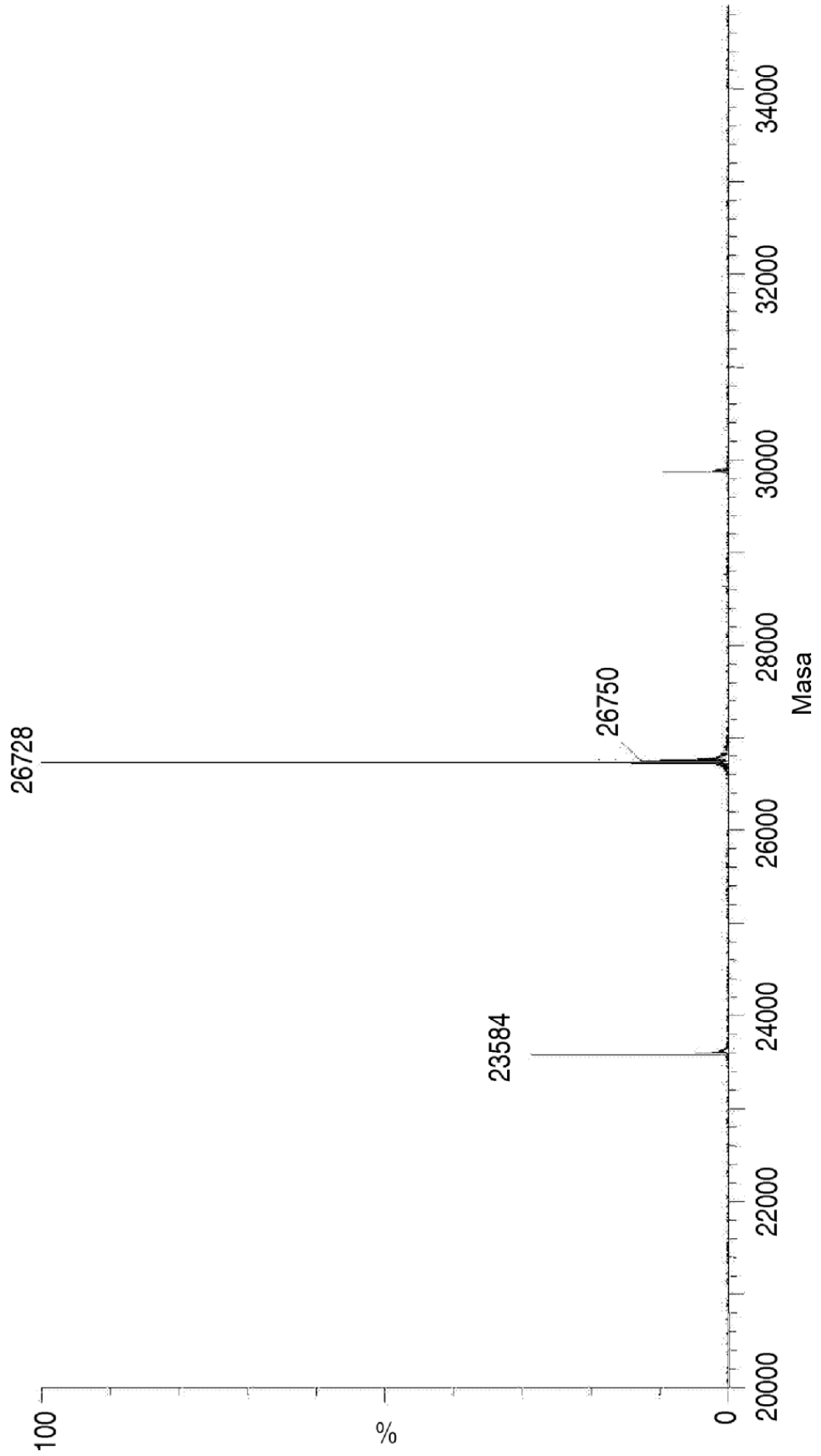
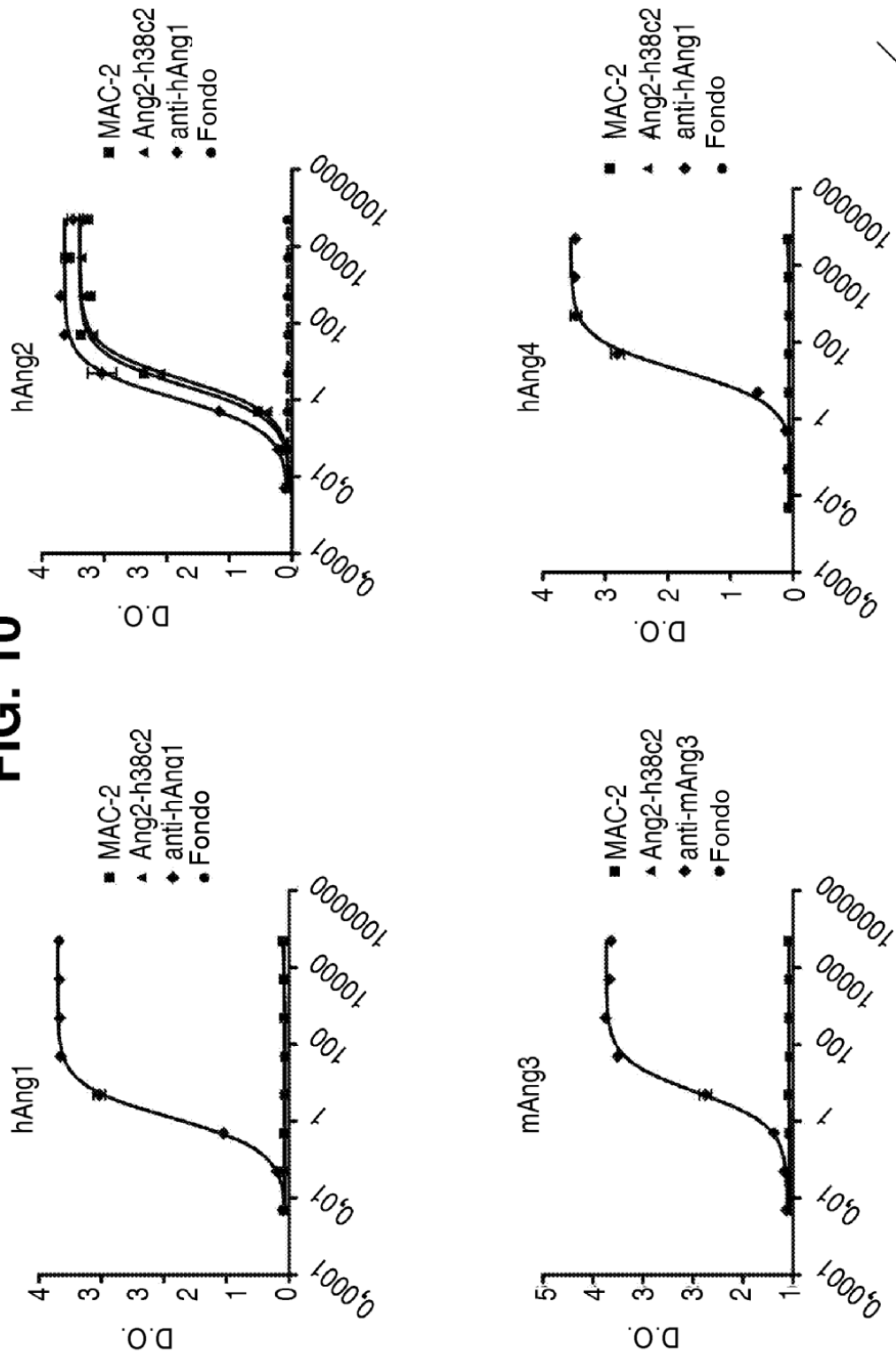
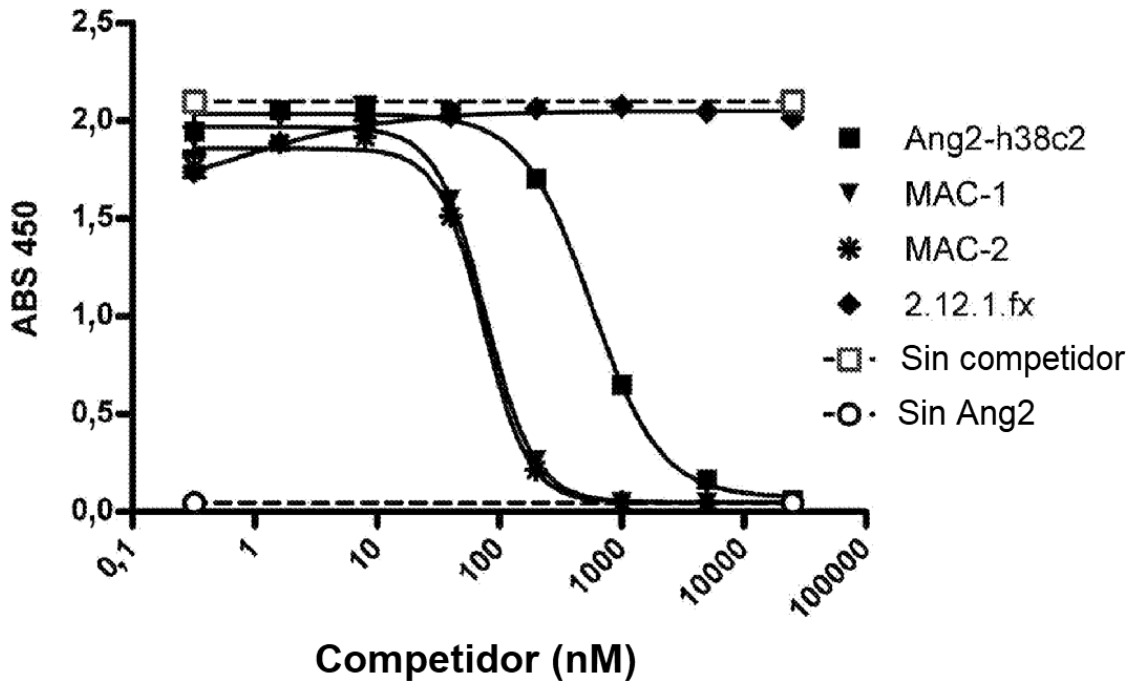




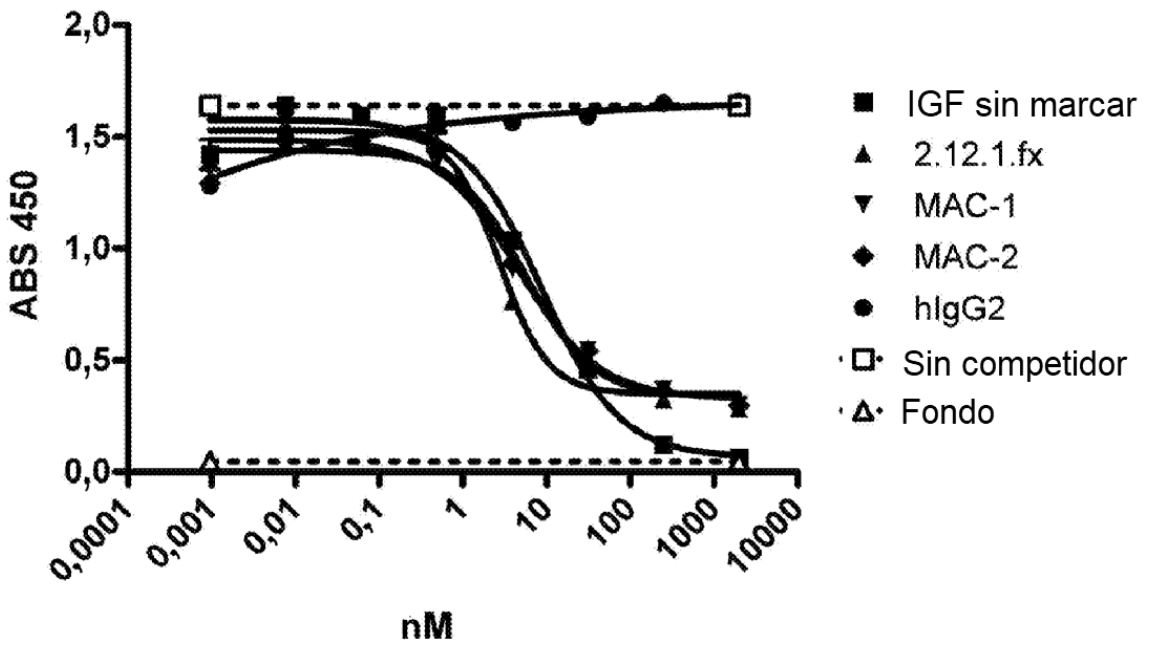
FIG. 10



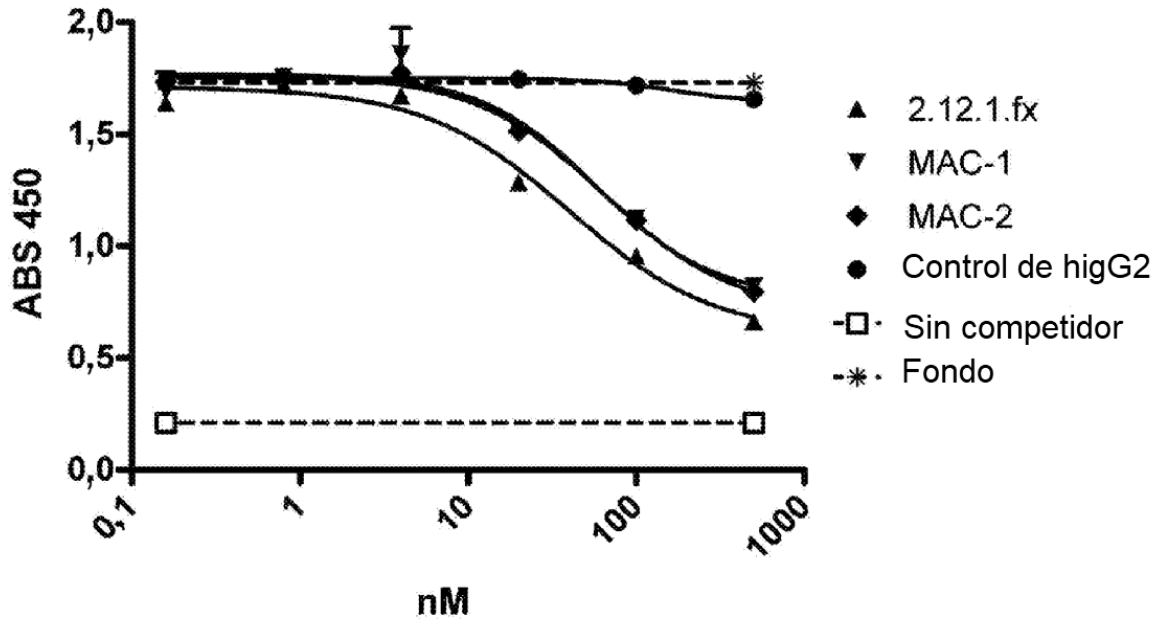
**FIG. 11**



**FIG. 12**

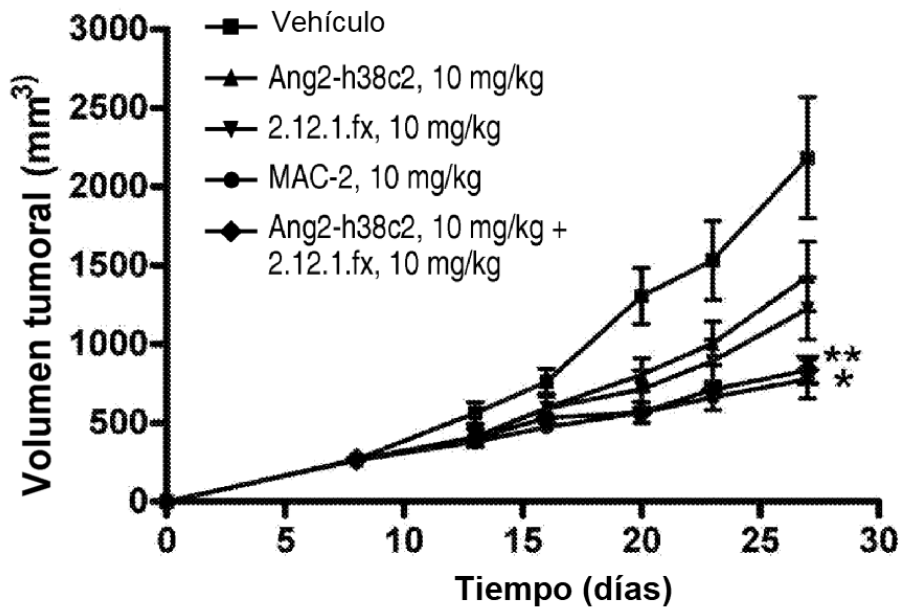


**FIG. 13**

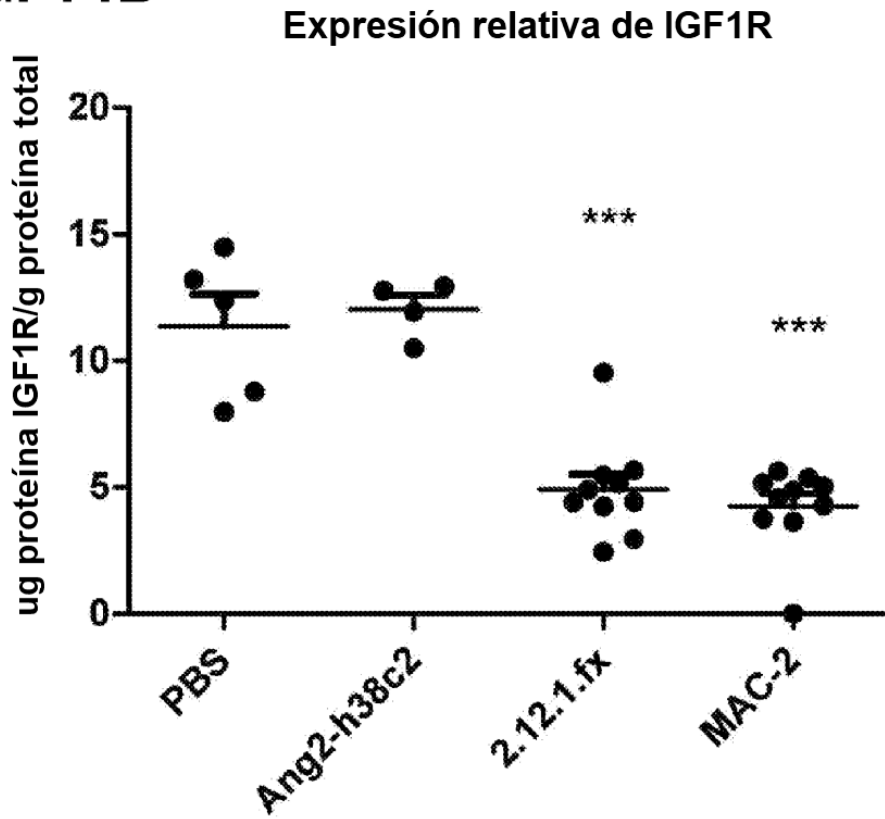


**FIG. 14A**

\*P<0,005, 2.12.1fx frente a MAC-2  
 \*\*P<0,001, Ang2-h38c2 frente a MAC-2  
 Anova de dos factores post-prueba de Bonferroni

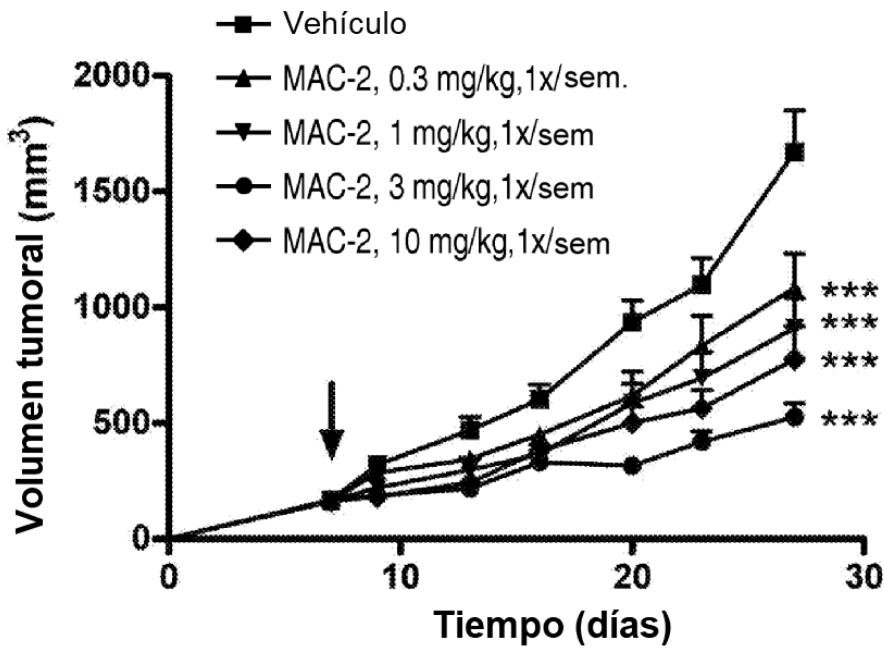


**FIG. 14B**

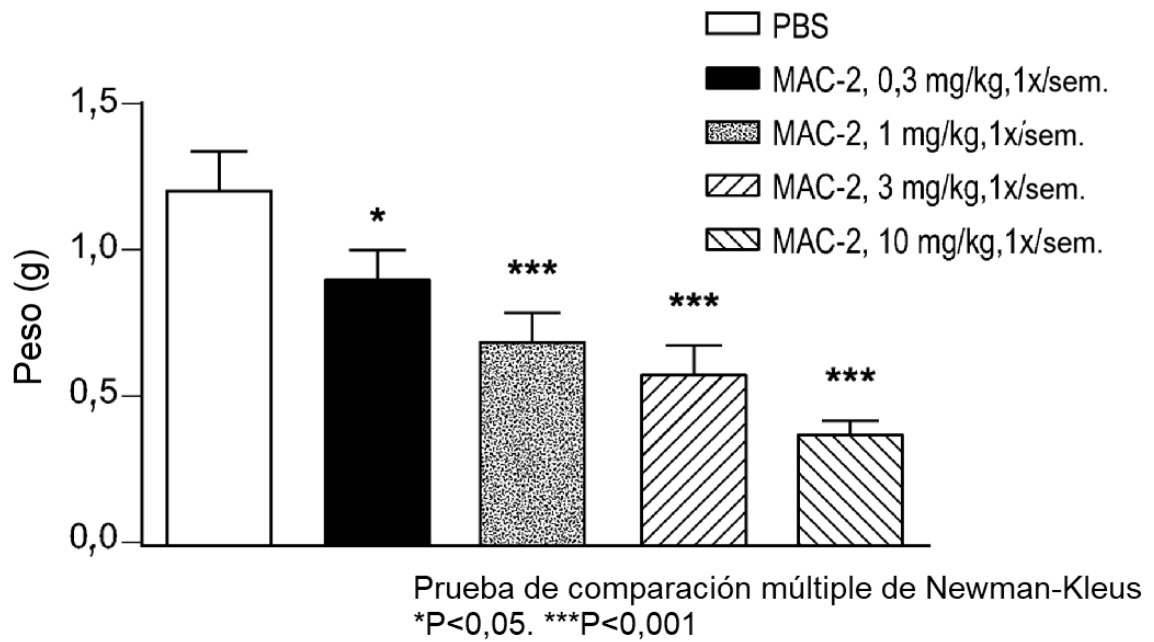


**FIG. 15A**

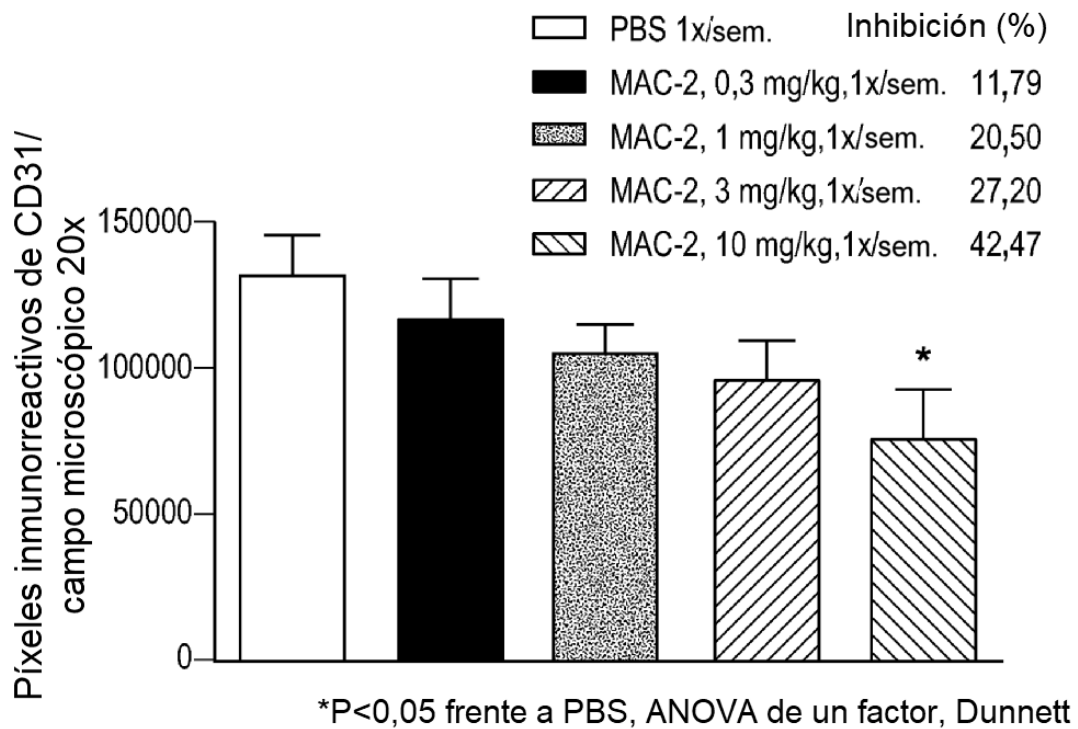
Anova de dos factores post-prueba de Bonferroni  
 \*\*\*P<0,001, PBS frente a MAC-2 (todas las dosis)



**FIG. 15B**



**FIG. 15C**



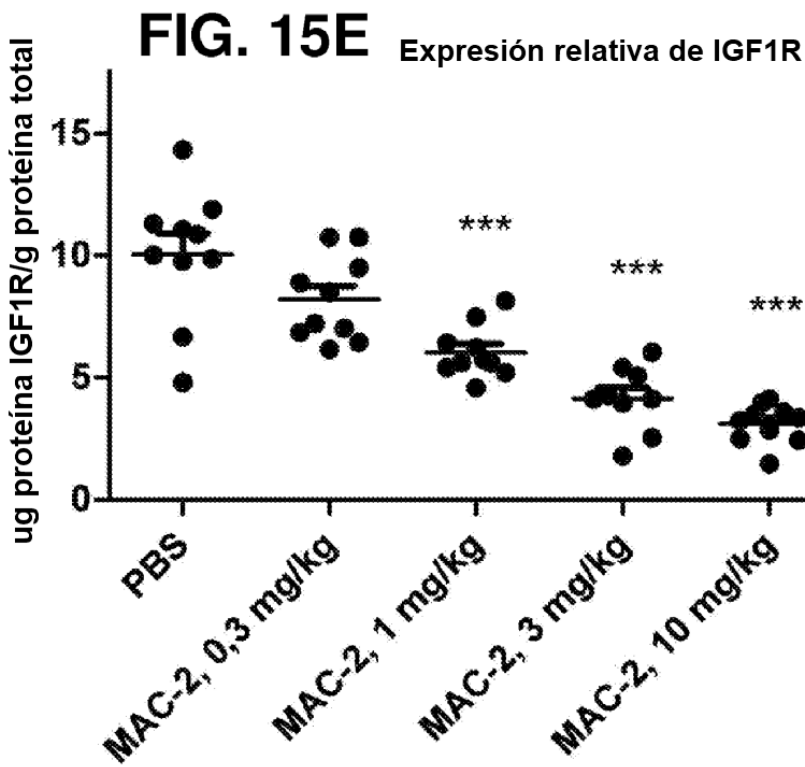
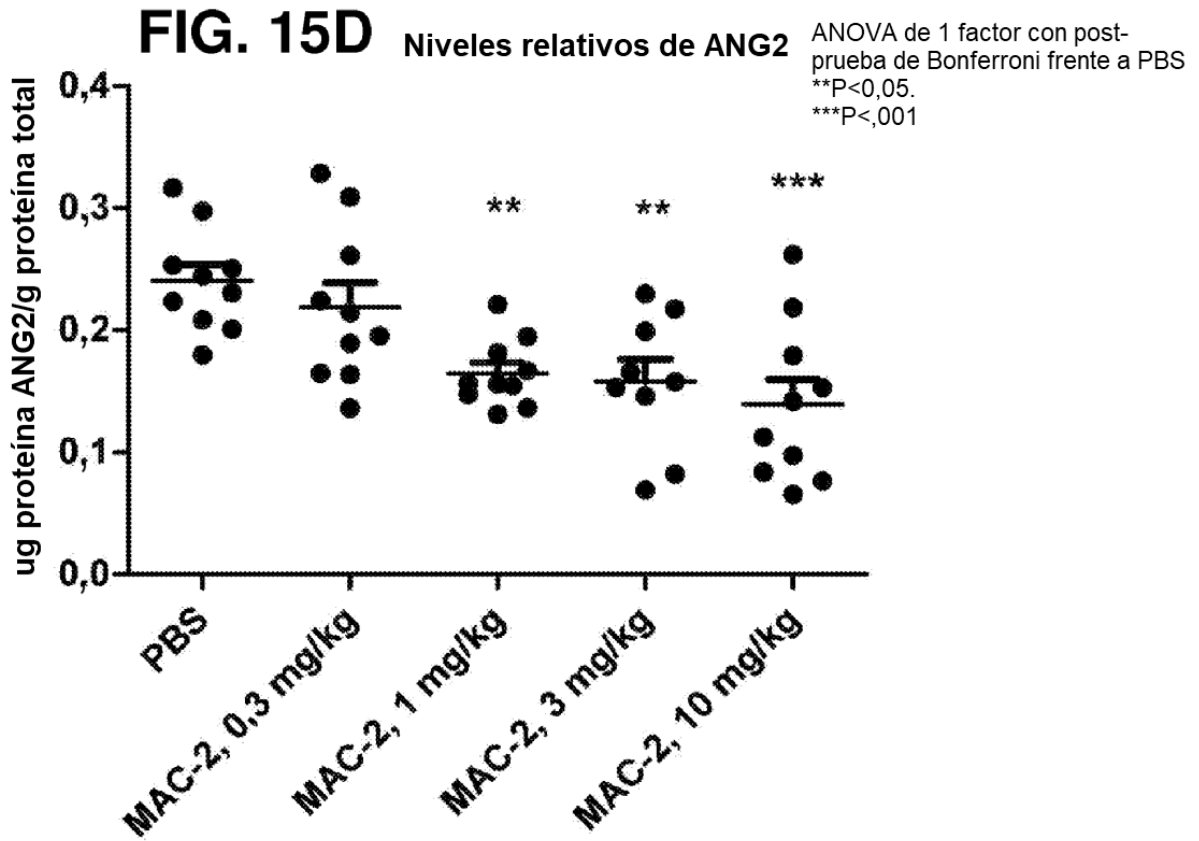


FIG. 16A

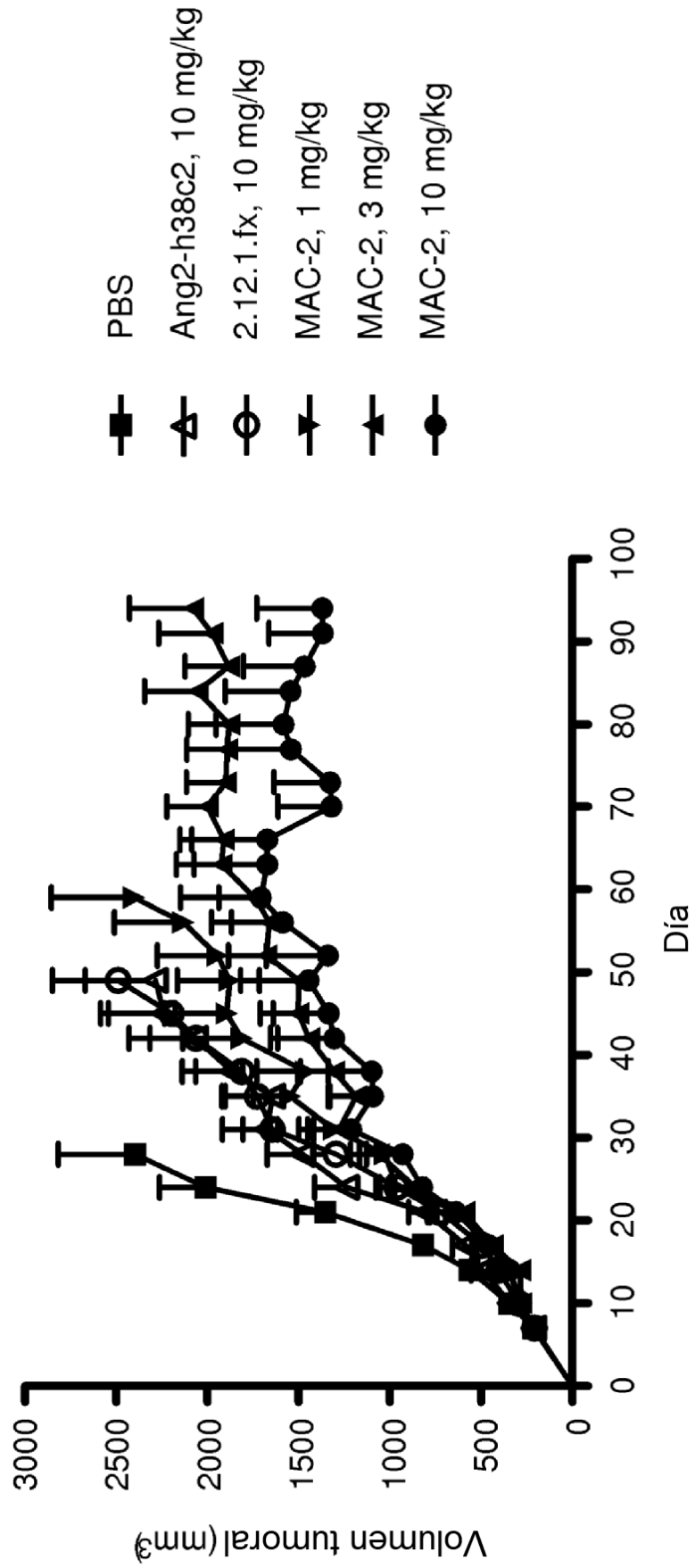
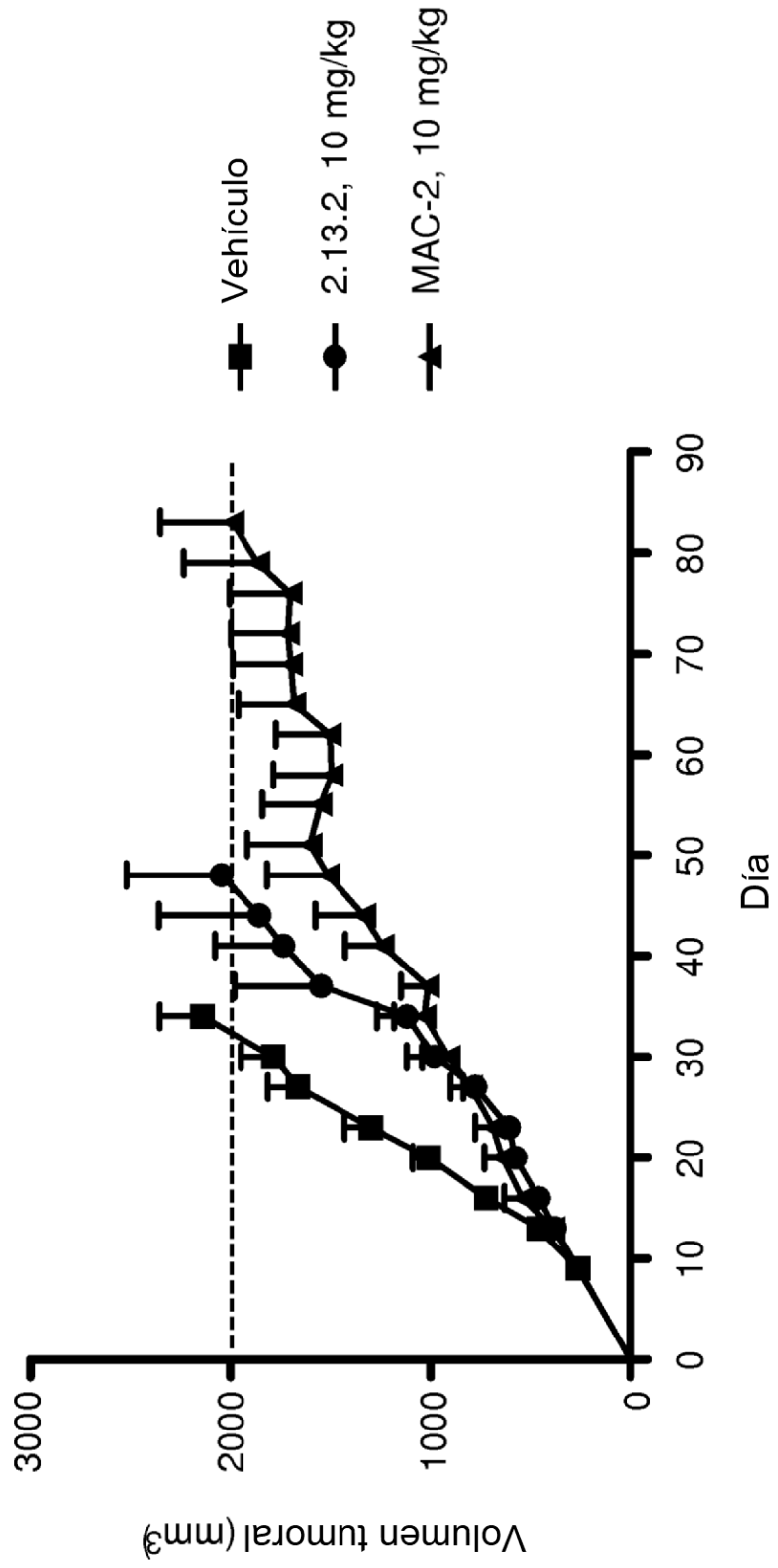


FIG. 16B





**FIG. 16C**

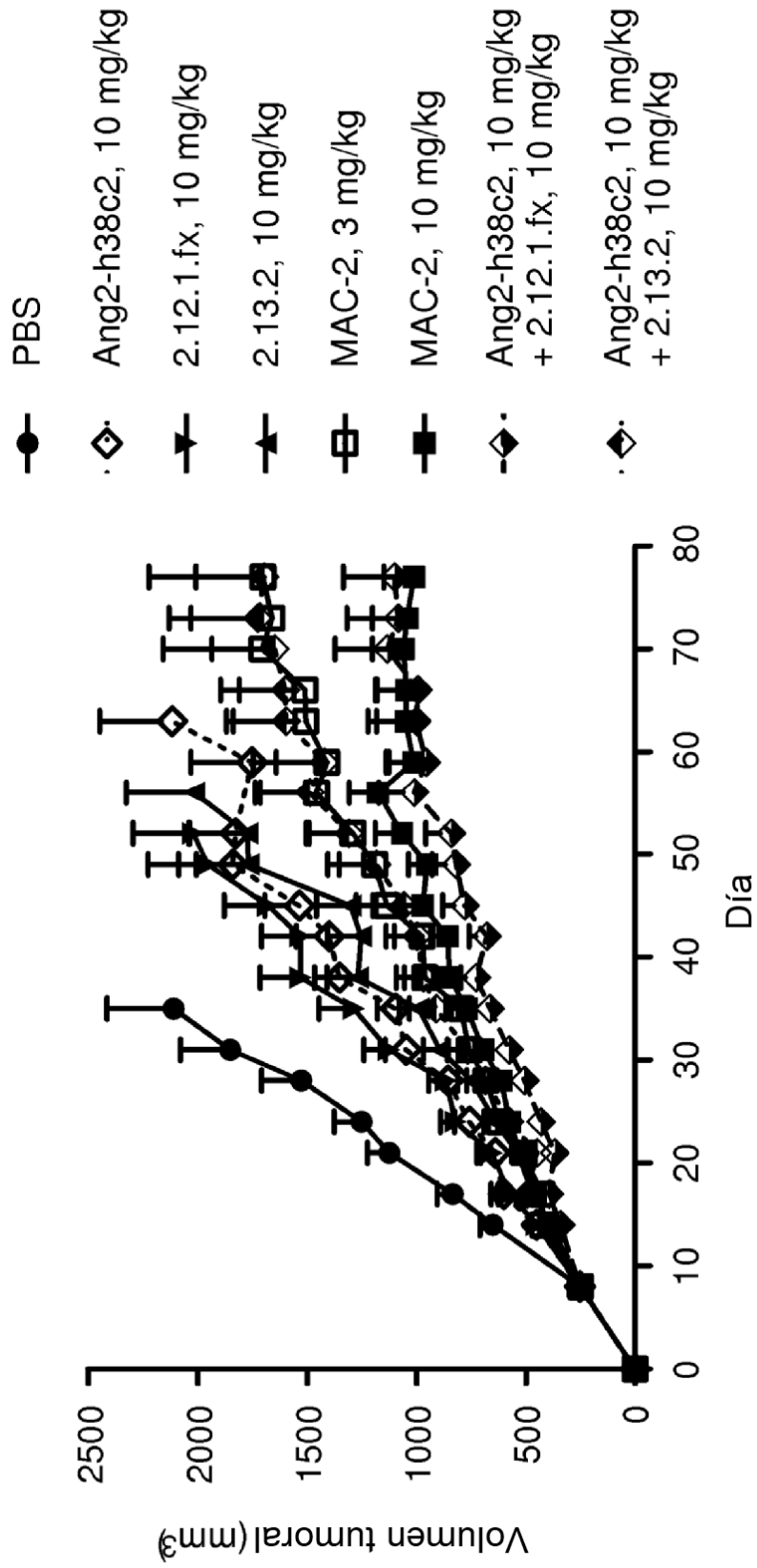


FIG. 17

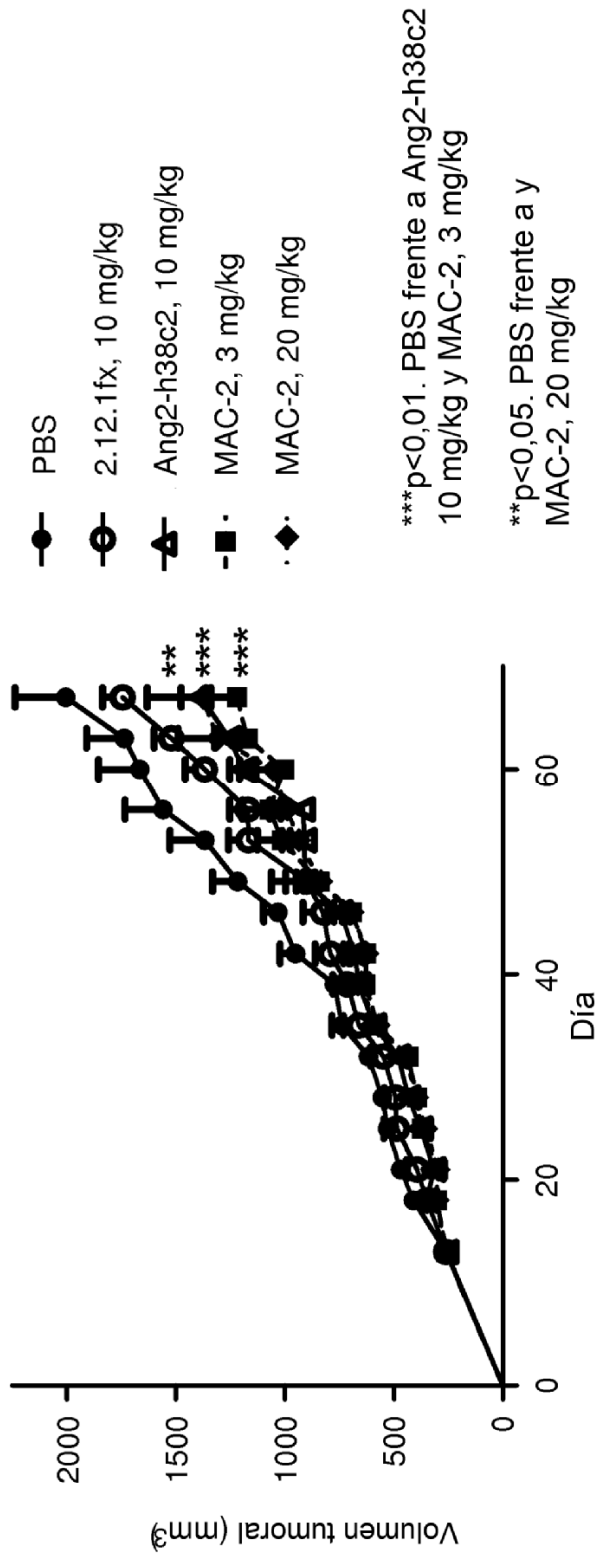


FIG. 18A

VL	Fr1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
	1	3	4	5	7	9	1
	2				8		0
	3						
12345678901234567890123	45678901abcde234	567890123456789	0123456	7890123456789012345678	901234567890123456789012345678	901234567	8901234567
m38c2	DVVMFQPLSLPVRFGDQASIS	RSSQSLHTVYSPYLN	WYLQKPGQSPKLLIY	KVSNRFS	GVPDRFSGSGGTDFLRI	SQTHLPT	FGGKTKLEIK
	*** * * **** * * * *		*	*	* **** **		*
h38c2	ELQMTQSPSSLSASVGDRTITC	RSSQSLHTVYSPYLN	WYLQKPGQSPKLLIY	KVSNRFS	GVPDRFSGSGGTDFLRI	SQTHLPT	FGGKTKLEIK
	**	* *****	* **	** ***	* **	* **** *	
DPK-9	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC	RASQISF-----YLN	WYQKPGKAPKLLIY	AASLQ	GVPDRFSGSGGTDFLRI	QSYSTP	LT FGGKTKLEIK
JK4							
VH	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
	1	3	4	5	7	9	1
	2				8		1
	3						
123456789012345678901234567890	1ab2345	67890123456789	012abc3456789012345	67890123456789012345	67890123456789012abc345678901234	56789012	34567890123
m38c2	EVKLVESGGGLVQPGGTMKLSCEISGLTFR	N--YVMS	WVRSPEKLEWVA	EIRLRSNDVATHYAESVKG	KFTISRDDSKSRLLYLQ	MSLRLEDTGIIYCKY	YFY-SFSY WGQGLTVVSA
	* *** ** * *		*	*	* ** *		*
h38c2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	N--YVMS	WVRSPEKLEWVS	EIRLRSNDVATHYAESVKG	RFTISRDNKNTLYLQ	MSLRLEDTGIIYCKT	YFY-SFSY WGQGLTVVSS
	*	* *	* **	** **** * *	** **	** **	** *
DP-47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	S--YAMS	WVRSPEKLEWVS	AISG--SGGTYIADSVK	RFTISRDNKNTLYLQ	MSLRLEDTGIIYCAK	YFDY WGQGLTVVSS
JH4							

FIG. 18B

mCLκ	--ADAAPT <sup>+</sup> VSIF	PPSSEQLTSG	GASVVCFLNN	FYP <sup>+</sup> RDINVKW	KIDGSE <sup>+</sup> RQNG-	VLSWTDQDS	
	**	*	*	+	***	*	
	+	*	*	+	***	*	+
hCLκ	--TVAAPS <sup>+</sup> VEIF	PPSDEQLKSG	TASVVC <sup>+</sup> LLNN	FYP <sup>+</sup> REAKVQW	KVDNA-LQSGN	SQESVTEQDS	60
	**	*	*	+	***	*	
	+	*	*	+	***	*	+
	**	*	*	+	***	*	+
hCLλ	GQPKAAP <sup>+</sup> SVTLF	PPSSEELQAN	KATLVCLISD	FYPGAVTVAW	KADSSPVKAG-	-VETTTPSKQ	
	*	*	*	*	*	*	
mCLκ	KDSTYSMSST	LTLIKDEYER	-HNSYICEATH	KTSTSPIVKS	FNRNEC		
	*	+	*	*	*	*	
	+	+	*	*	+	+	
hCLκ	KDSTYSLST	ITLSKADYEK	-HKVYACEVTH	QGLSSPVTKS	FNRGEC		106
	**	*	*	*	*	*	
	+	+	*	*	+	+	
hCLλ	SNNKYAASSY	LSLTPEQW-K	SHRSYSCQVTH	EG-ST-VEKT	VAPTEC		