

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 804 614**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/68** (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.07.2014 PCT/IB2014/063566**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.02.2015 WO15015448**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2014 E 14777814 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2020 EP 3027224**

54 Título: **Conjugados de polipéptidos manipulados usando transglutaminasa**

30 Prioridad:

**31.07.2013 US 201361860757 P**  
**23.07.2014 US 201462028236 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.02.2021**

73 Titular/es:

**RINAT NEUROSCIENCE CORP. (100.0%)**  
**230 East Grand Avenue**  
**South San Francisco, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**FARIAS, SANTIAGO ESTEBAN;**  
**GALINDO CASAS, MERITXELL y**  
**STROP, PAVEL**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

**ES 2 804 614 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 polipéptidos manipulados usando transglutaminasa

**Solicitudes relacionadas**

5 Esta solicitud reivindica los beneficios de la Solicitud Provisoria de los Estados Unidos Núm. 61/860,757, presentada el 31 de julio de 2013, y la Solicitud Provisoria de los Estados Unidos Núm. 62/028.236, presentada el 23 de julio de 2014.

**Campo**

10 La presente invención se refiere generalmente a conjugados de polipéptidos manipulados (por ejemplo, conjugados de anticuerpo-fármaco) que comprenden etiquetas que contienen glutamina donante de acilo y agentes donantes de amina. La invención también se refiere a procedimientos de obtención de tales conjugados de polipéptidos manipulados usando transglutaminasa y procedimientos de uso de los mismos.

**Antecedentes**

15 La terapia de anticuerpos proporciona un tratamiento terapéutico dirigido en pacientes con diversos trastornos, tal como cánceres y enfermedades inmunológicas, y por lo tanto ha cumplido un papel importante en la investigación biológica. Se han explorado diferentes enfoques de terapia con anticuerpos dirigidos, que incluyen los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC). Véase, por ejemplo Doronian *et al.*, *Bioconj. Chem.* 19:1960-1963 (2008); y Junutula *et al.*, *Nature Biotechnology* 26: 925-932 (2008). Pavel Strop *et al.*, "Location Matters: Site of Conjugation Modulates, Stability and Pharmacokinetics of Antibody Drug Conjugates", *Chemistry & Biology*, vol. 20, no. 2, 1 February 2013, pages 161-167, desvela procedimientos de conjugación de fármacos y anticuerpos específicos del sitio usando transglutaminasa microbiana. El documento WO 2013/068946 A2 (RINAT Neuroscience Corp [US]) 16 May, 2013 también se refiere al campo de la conjugación de fármacos y anticuerpos específicos del sitio usando transglutaminasa microbiana. Simone Jeger, "Site-Specific Conjugation of Tumour-Targeting Antibodies Using Transglutaminase", a dissertation submitted to ETH Zurich for the degree of Doctor of Sciences, University of Basel, [Online] no. DISS. ETH 18696, 1 January 2009, pages 51-85, desvela la conjugación de Ab chCE7agi antitumoral a través de transglutaminasa a varios restos de imágenes y terapéuticos.

20 En el caso de los conjugados anticuerpo-fármaco (es decir, inmunoconjugados), las pequeñas moléculas citotóxicas (fármacos) están generalmente unidas o conjugadas a anticuerpos para la administración local dirigida de los restos farmacológicos a los tumores. La modificación química ha sido usada ampliamente para conjugar fármacos con anticuerpos, ya sea a través de aminas de cadena lateral de lisina o mediante grupos cisteína sulfhidrido activados mediante la reducción de enlaces disulfuro intercatenarios. Sin embargo, estos tipos de conjugación "específica de residuo" llevan a una mezcla heterogénea de conjugados que tienen diferentes relaciones molares de fármaco a anticuerpo, sitios de conjugación diferentes y no específicos, diferente eficiencia, seguridad y farmacocinética, y una depuración diferente de los conjugados de fármacos y anticuerpos. Véase, por ejemplo, Tanaka *et al.*, *FEBS Letters* 579: 2092-2096 (2005); y Wang *et al.*, *Protein Sci.* 14: 2436-2446 (2005). Además, también se pueden formar cuerpos de inclusión o puentes de disulfuro incorrectos en los anticuerpos introducidos por cisteína. Véase, por ejemplo, Gentle *et al.*, *Bioconj. Chem* 15: 658-663 (2004). También han sido explorados residuos reactivos de cisteína manipulados en sitios específicos de anticuerpos (por ejemplo, THIOMAB) para la conjugación específica de fármacos con estequiometría definida. Véase Junutula *et al.*, *Nature Biotechnology*, 26: 925-932 (2008). Sin embargo, la expresión y la conjugación de tales anticuerpos manipulados con cisteína y conjugados de anticuerpo-fármaco son procesos complicados que requieren largos procedimientos de reacción (por ejemplo, reducciones y oxidaciones). Véase, por ejemplo, Gomez *et al.*, *Biotechnology and Bioengineering*, 105 (4): 748-760 (2009). Los agregados de anticuerpos también se pueden generar durante el proceso de fabricación de los anticuerpos manipulados con cisteína y los conjugados anticuerpo-fármaco.

35 Recientemente han sido explorados enfoques enzimáticos usando una transglutaminasa para la conjugación de proteínas como una alternativa a la conjugación "específica de residuos" de anticuerpos/proteínas y fármacos. Las transglutaminasas (EC2.3.2.13; proteína-glutamina: gamma-glutamilttransferasa; proteína-glutamina: amina  $\gamma$ -glutamilttransferasa; CAS 80146-85-6) pertenecen a una familia de enzimas que catalizan la adición del acilo a una amina primaria en la que el grupo gamma-carboxamida del residuo de  $\gamma$ -glutanilo unido a péptido es el donante de acilo y la amina primaria es el aceptor de acilo y el donante de amina. Las transglutaminasas se han usado, por ejemplo, para la unión de proteínas a proteínas. Véase, por ejemplo, Tanaka *et al.*, *FEBS Letters* 579: 2092-2096 (2005). También se ha informado de modificaciones enzimáticas de anticuerpos que usan transglutaminasas. Véase Josten *et al.* *J. of Immunological Methods* 240: 47-54 (2000); Takazawa *et al.*, *Biotechnology and Bioengineering* 86 (4): 399-404 (2004); Mindt *et al.*, *Bioconj. Chem* 19: 271-27 (2008), y Jeger *et al.*, *Angewandte Chemie*, 49 (51): 9995-9997 (2010). La conjugación o modificación de proteínas usando transglutaminasa proporciona las ventajas de alta selectividad, procedimientos de reacción simplificados y condiciones de reacción leves. El documento WO2012059882 describe la conjugación específica de sitio de anticuerpos y moléculas pequeñas mediadas por una transglutaminasa.

**Sumario**

La presente invención proporciona conjugados de anticuerpo y fármaco mediados por transglutaminasa que comprende una etiqueta específica que contiene glutamina donante de acilo manipulada en un sitio específico del anticuerpo y un agente donante de amina (por ejemplo, carga útil de conector). La presente invención es como se expone en las reivindicaciones. En particular la presente invención proporciona un conjugado de polipéptido manipulado que comprende la fórmula: polipéptido-T-A, en el que T es una etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina manipulada en un sitio específico, en el que A es un agente donante de amina, en el que el agente donante de amina está conjugado en forma específica de sitio a la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina en un extremo terminal carboxilo en el polipéptido, en el que el polipéptido es un polipéptido que contiene Fc, polipéptido que contiene Fab, o anticuerpo y en el que la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina comprende una secuencia de aminoácidos GLLQGPP (SEQ ID NÚM.:13).

La invención también proporciona un conjugado de fármaco y anticuerpo mediado por transglutaminasa específico de sitio y homogéneo (por ejemplo, al menos aproximadamente 99.8% específico de sitio) que comprende la sustitución de aminoácidos de glutamina (Q) a asparagina (N) en la posición 295 del anticuerpo (Q295N; esquema de numeración EU).

En un aspecto, esta invención proporciona un conjugado de polipéptido manipulado que comprende la fórmula: polipéptido-T-A, en el que el T es una etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina manipulada en un sitio específico, en el que A es un agente donante de amina, en el que el agente donante de amina está conjugado en forma específica de sitio a la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina en un extremo terminal carboxilo, o como se desvela un extremo amino terminal, o en otro sitio del polipéptido, y de acuerdo con la invención en el que la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina comprende una secuencia de aminoácidos GLLQGPP (SEQ ID NÚM.:13), o como se describe LLQGPA (SEQ ID NÚM.:4), o LLQGPP (SEQ ID NÚM.: 11).

La presente divulgación proporciona un conjugado de polipéptido que contiene Fc manipulado que comprende la fórmula: (polipéptido-T-A que contiene Fc), en el que T es una etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina manipulada en un sitio específico, en el que A es un agente donante de amina, en el que el agente donante de amina está conjugado de manera sitio específica a la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina en un extremo terminal carboxilo, un extremo amino terminal, o en otro sitio en el polipéptido que contiene Fc, en el que la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina comprende una secuencia de aminoácidos XXQX (SEQ ID NÚM.:35), en la que X es cualquier aminoácido (por ejemplo, X puede ser el mismo o diferente aminoácido), y en el que el conjugado de polipéptido que contiene Fc manipulado comprende una sustitución de aminoácido de glutamina a asparagina en la posición 295 (Q295N; esquema de numeración EU). En algunas realizaciones, la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina es LLQGPA (SEQ ID NÚM.:4), LLQGP (SEQ ID NÚM.:5), LLQGPP (SEQ ID NÚM.:11) o GLLQGPP (SEQ ID NÚM.:13).

En algunas realizaciones de la invención, la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina no está espacialmente adyacente a una Lys reactiva (es decir, la capacidad de formar un enlace covalente como un donante de amina en presencia de un donante de acilo y una transglutaminasa) en el polipéptido o el polipéptido que contiene Fc.

En algunas realizaciones, el polipéptido o el polipéptido que contiene Fc comprende una modificación de aminoácido en la última posición de aminoácidos en el extremo terminal carboxilo con respecto a un polipéptido tipo salvaje en la misma posición. La modificación de aminoácidos puede ser una supresión, inserción, sustitución, mutación de aminoácidos o cualquiera de sus combinaciones.

En algunas realizaciones de la invención, el conjugado de polipéptido comprende una cadena pesada de anticuerpo de longitud completa y una cadena ligera de anticuerpo, en el que la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina está ubicada en el extremo terminal carboxilo de una cadena pesada, una cadena ligera o la cadena pesada y la cadena ligera.

En algunas realizaciones de la invención, el conjugado de polipéptido comprende un anticuerpo, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo biespecífico, un minicuerpo, un diacuerpo o un fragmento de anticuerpo. En algunas realizaciones, el anticuerpo es una IgG.

En algunas realizaciones de la invención, el agente donante de amina comprende la fórmula: X-Y-Z, en la que X es una unidad donante de amina; Y es un conector; y Z es un resto de agente. En algunas realizaciones, el conector de la unidad donante de amina (X-Y) es una unidad ramificada (por ejemplo, al menos 2 unidades) y el resto de agente comprende al menos aproximadamente 2 restos de agente.

En algunas realizaciones de la invención, el conector de la unidad donante de amina (X-Y) está seleccionado del grupo que consiste en Ac-Lys-Gly, ácido aminocaproico, Ac-Lys-β-Ala, amino-PEG2-C2, amino-PEG3-C2, amino-PEG6-C2, Ac-Lys-Val-Cit-PABC, amino-PEG6-C2-Val-Cit-PABC, aminocaproil-Val-Cit-PABC, [(3R,5R)-1-{3-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]propanoil}piperidin-3,5-dii]bis-Val-Cit-PABC, [(3S,5S)-1-{3-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]propanoil}piperidin-3,5-dii]bis-Val-Cit-PABC, putrescina, y Ac-Lys-putrescina.

En algunas realizaciones de la invención, el resto de agente es un agente citotóxico, que incluye, pero sin limitación, una antraciclina, una auristatina, una camptotecina, una combretastatina, una dolastatina, una duocarmicina, una enedfina, una geldanamicina, un dímero de indolinobenzodiazepina, una maitansina, una puromicina, un dímero de pirrolobenzodiazepina, un taxano, un alcaloide de vinca, una tubulisina, una hemiasterlina, una espliceostatina, una pladienolida, y estereoisómeros, isómeros, análogos o derivados de los mismos. Por ejemplo, el agente citotóxico es MMAD (Monometil Auristatina D) o 0101 (2-metilalanil-N-[(3R, 4S, 5S)-3-metoxi-1-((2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[[[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino]propil]piperolidin-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida).

En algunas realizaciones de la invención, el agente donante de amina (X-Y-Z) incluye, pero sin limitación, Alexa 488 cadaverina, 5-FITC cadaverina, Alexa 647 cadaverina, Alexa 350 cadaverina, 5-TAMRA cadaverina, 5-FAM cadaverina, SR101 cadaverina, 5,6-TAMRA cadaverina, 5-FAM lisina, Ac-Lys-Gly (acetil-lisina-glicina)-MMAD, amino-PEG3-C2- MMAD, amino-PEG6-C2-MMAD, amino-PEG3-C2-amino-nonanoil-MMAD, aminocaproil-Val-Cit-PABC-MMAD, amino-PEG-C2-Val-Cit-PABC-MMAD, Ac-Lys-Val-Cit-PABC (acetil-lisina-valine-citrulina-p-aminobenciloicarbonyl)-MMAD, aminocaproil-MMAD, Ac-Lys-β-Ala-MMAD, amino-PEG2-C2-MMAE, aminocaproil-MMAE, amino-PEG3-C2-MMAE, aminocaproil-MMAF, aminocaproil-Val-Cit-PABC-MMAE, Ac-Lys-Val-Cit-PABC-MMAE, aminocaproil-Val-Cit-PABC-MMAF, amino-PEG-6-C2-Val-Cit-PABC-MMAF, Ac-Lys-Val-Cit-PABC-MMAF, Ac-Lys-Val-Cit-PABC-0101, putrescinil-geldanamicina, Ac-Lys-putrescinil-geldanamicina, aminocaproil-3377, aminocaproil-0131, [(3R,5R)-1-{3-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]propanoil}piperidin-3,5-diil]bis-Val-Cit-PABC-MMAD,[(3R,5R)-1-{3-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]propanoil}piperidine-3,5-diil]bis-Val-Cit-PABC-MMAE, y 2-aminoetoxi-PEG6-NODAGA.

La presente divulgación proporciona un procedimiento de preparación de un conjugado de polipéptido que contiene Fc manipulado que comprende la fórmula: (polipéptido que contiene Fc-T-A), en el que T es una etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina manipulada en un sitio específico, en el que A es un agente donante de amina, en el que el agente donante de amina está conjugado de manera sitio específica con la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina en un extremo terminal carboxilo, un extremo amino terminal, o en otro sitio del polipéptido que contiene Fc, en el que la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina comprende una secuencia de aminoácidos XXQX (SEQ ID NÚM.:35), en la que X es cualquier aminoácido (por ejemplo, X puede ser el mismo o diferente aminoácido), y en el que el conjugado de polipéptido que contiene Fc manipulado comprende una sustitución de aminoácidos de glutamina a asparagina en la posición 295 (Q295N; esquema de numeración EU), que comprende las etapas de: a) proporcionar una molécula T (polipéptido que contiene Fc) manipulado que comprende el polipéptido que contiene Fc y la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina; b) poner en contacto el agente donante de amina con la molécula T (polipéptido que contiene Fc) manipulado en presencia de una transglutaminasa; y c) dejar que el T (polipéptido que contiene Fc) manipulado se una de manera covalente con el agente donante de amina para formar el conjugado de polipéptido que contiene Fc manipulado. En algunas realizaciones, el polipéptido T que contiene Fc manipulado es expresado en las células CHO.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento de preparación de un conjugado de polipéptido manipulado que comprende la fórmula: polipéptido-T-A, en el que T es una etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina manipulada en un sitio específico, en el que A es un agente donante de amina, en el que el agente donante de amina está conjugado de manera sitio específica a la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina en un extremo terminal carboxilo, de acuerdo con La presente divulgación un extremo amino terminal, o en otro sitio en el polipéptido, y de acuerdo con la invención en el que la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina comprende una secuencia de aminoácidos como se describe LLQGPX, en el que X es A o P (SEQ ID NÚM.:14), o de acuerdo con la invención GLLQGPP (SEQ ID NÚM.:13), que comprende las etapas de: a) proporcionar una molécula de polipéptido T manipulado que comprende el polipéptido y la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina; b) poner en contacto el agente donante de amina con la molécula de polipéptido T manipulado en la presencia de una transglutaminasa; y c) dejar que el polipéptido-T manipulado se una de manera covalente al agente donante de amina para formar el conjugado de polipéptido que contiene Fc manipulado. En algunas realizaciones, la molécula de polipéptido T manipulado es expresada en las células CHO.

En algunas realizaciones de la invención, el conjugado de polipéptido manipulado (por ejemplo, el conjugado de polipéptido que contiene Fc manipulado, el conjugado de polipéptido que contiene Fab manipulado, o el conjugado de anticuerpo manipulado) como se describe en la presente memoria tiene una eficiencia de conjugación de al menos aproximadamente 51%.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el conjugado de polipéptido manipulado de la invención como se describe en la presente memoria (por ejemplo, el conjugado de polipéptido que contiene Fc manipulado, el conjugado de polipéptido que contiene Fab manipulado, o el conjugado de anticuerpo manipulado) y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, La presente divulgación proporciona un procedimiento de tratar un cáncer en un individuo necesitado de dicho tratamiento, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de la composición farmacéutica que comprende el conjugado de polipéptido manipulado (por ejemplo, el conjugado de polipéptido que contiene Fc manipulado, el conjugado de polipéptido que contiene Fab manipulado, o el conjugado de anticuerpo manipulado) como se describe en la presente memoria.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento de inhibición del crecimiento o progresión tumoral en un individuo necesitado de dicho tratamiento, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de la composición farmacéutica que comprende el conjugado de polipéptido manipulado (por ejemplo, el conjugado de polipéptido que contiene Fc manipulado, el conjugado de polipéptido que contiene Fab manipulado, o el conjugado de anticuerpo manipulado) como se describe en la presente memoria.

La presente divulgación proporciona un procedimiento de diagnóstico de cáncer en un sujeto que sufre de cáncer, que comprende a) poner en contacto una muestra del sujeto con el conjugado de polipéptido manipulado (por ejemplo, el conjugado de polipéptido que contiene Fc manipulado, el conjugado de polipéptido que contiene Fab manipulado, o el conjugado de anticuerpo manipulado) como se describe en la presente memoria en condiciones que producen la unión del conjugado de polipéptido manipulado con una proteína relacionada con el cáncer, y b) determinar la unión del conjugado de polipéptido manipulado con la proteína relacionada con el cáncer.

La presente divulgación proporciona un conjugado de polipéptido manipulado (por ejemplo, el conjugado de polipéptido que contiene Fc manipulado, el conjugado de polipéptido que contiene Fab manipulado, o el conjugado de anticuerpo manipulado) purificado por los procedimientos descritos en la presente memoria.

### 15 **Breve descripción de los dibujos**

Las Figuras 1A-1D representan gráficos que muestran diferentes porcentajes de recorte de cuatro etiquetas diferentes que contienen glutamina donante de acilo (las "etiquetas de glutamina") expresadas en células CHO. La Figura 1A representa los resultados de la etiqueta de glutamina TG6 (SEQ ID NÚM.: 1) en Ab-TG6. La Figura 1B representa los resultados de la etiqueta de glutamina TG9 (SEQ ID NÚM.: 4) en Ab-TG9. La Figura 1C representa los resultados de la etiqueta de glutamina TG10 (SEQ ID NÚM.: 5) en Ab-TG10. La Figura 1D muestra los resultados para la etiqueta de glutamina TG17 (SEQ ID NÚM.: 11) en Ab-TG17.

Las Figuras 2A-2B muestran que la etiqueta de glutamina LCQ04 (SEQ ID NÚM.: 12) expresada en células CHO es recortada del extremo terminal C de una cadena ligera de anticuerpo (2A), mientras que no se observó recorte en la etiqueta de glutamina LCQ05 (SEQ ID NÚM.: 13) en Ab-LCQ05 (2B).

Las Figuras 3A-3B muestran que se observaron niveles bajos similares de agregados para las etiquetas de glutamina TG6 (SEQ ID NÚM.: 1) y TG17 (SEQ ID NÚM.: 11) en Ab-TG6-AcLys-VC-PABC-0101 (Figura 3A) y Ab-TG17-AcLys-VC-PABC-0101 (Figura 3B) usando cromatografía de exclusión analítica por tamaño (SEC).

Las Figuras 4A-4B muestran que se observó una relación de fármaco-anticuerpo (DAR) similar para las etiquetas de glutamina TG6 (SEQ ID NÚM.: 1) y TG17 (SEQ ID NÚM.: 11) en Ab-TG6 y Ab-TG6-AcLys-VC - PABC-0101 (Figura 4A) y Ab-TG17 y Ab-TG17-AcLys-VC-PABC-0101 (Figura 4B) usando cromatografía de interacción hidrófoba (HIC).

Las Figuras 5A-5B muestran que se observó una relación de fármaco-anticuerpo (DAR) similar para las etiquetas de glutamina TG6 (SEQ ID NÚM.: 1) y TG17 (SEQ ID NÚM.: 11) en Ab-TG6 y Ab-TG17 (Figura 5A) y Ab-TG6-AcLys-VC-PABC-0101 y Ab-TG17-AcLys-VC-PABC-0101 (Figura 5B) usando espectrometría de masas (MS).

Las Figuras 6A-6B muestran que los conjugados de anticuerpos Ab-TG6-AcLys-VC-PABC-0101 y Anticuerpo-TG17-AcLys-VC-PA-BC-0101 tienen una eficacia *in vitro* similar para la citotoxicidad en la línea celular BxPC3 (Figura 6A) y línea celular OVCAR3 (Figura 6B).

Las Figuras 6A-6B muestran que los anticuerpos conjugados Ab-TG6-AcLys-VC-PABC-0101 y Antibody-TG17-AcLys-VC-PA-BC-0101 tienen una eficacia *in vitro* similar para la citotoxicidad en la línea celular BxPC3 (Figura 6A) y Línea celular OVCAR3 (Figura 6B).

Las Figuras 7A-7B muestran que el conjugado de anticuerpos (Ab-TG17-AcLys-PABC-0101) que tiene la etiqueta de glutamina TG17 (SEQ ID NÚM.: 11) tiene una actividad similar en modelos tumorales *in vivo* (% de cambio de peso corporal en la Figura 7A; y volumen del tumor en la Figura 7B) en comparación con el anticuerpo conjugado (Ab-TG6-AcLys-PABC-0101) que tiene la etiqueta de glutamina TG6 (SEQ ID NÚM.: 1).

La Figura 8 muestra la farmacocinética de los conjugados de anticuerpos Ab-TG6-AcLys-VC-PABC-0101, Anticuerpo-TG17-AcLys-VC-PABC-0101, Ab-TG6 y Ab-TG17.

La Figura 9A muestra que la transglutaminasa puede reconocer Q295 en IgG aglicosiladas, y la conjugación se puede lograr en este sitio (conjugación de Amino-PEG6-MMAD a un péptido tríptico (SEQ ID NÚM.: 15)).

La Figura 9B muestra que 1,3% del péptido Q295 inyectado total es conjugado con amino-PEG6-MMAD en la cadena pesada del anticuerpo, asumiendo una eficiencia de digestión del 100%.

**Descripción detallada**

La presente invención proporciona conjugados de anticuerpo-fármaco mediados por transglutaminasa que comprende una etiqueta específica que contiene glutamina donante de acilo manipulada en un sitio específico del anticuerpo y un agente donante de amina (por ejemplo, carga útil de conector). La invención también proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco mediado por transglutaminasa específico de sitio homogéneo que comprende la sustitución de aminoácidos de glutamina (Q) a asparagina (N) en la posición 295 (Q295N; esquema de numeración EU). Los inventores han descubierto que la proteólisis de una etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina manipulada en el extremo terminal C de la cadena pesada o ligera de un anticuerpo, cuando se expresa en células CHO, se puede prevenir mediante el uso de varias etiquetas que contienen glutamina recientemente manipuladas genéticamente que tienen secuencias únicas (por ejemplo, como se describe LLQGPA (SEQ ID NÚM.: 4), LLQG-PP (SEQ ID NÚM.: 11), y de acuerdo con la invención GLLQGPP (SEQ ID NÚM.: 13)). Los inventores también han descubierto que la mutación en la posición 295 (es decir, Q295N; esquema de numeración EU) del conjugado de fármaco y anticuerpo elimina la conjugación fuera del objetivo de un pequeño porcentaje de anticuerpo aglicosilado en la posición 295 y produce conjugados altamente homogéneos que son mejores de 99,8% específico del sitio.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona un conjugado de polipéptido manipulado que comprende la fórmula: polipéptido-T-A, en el que T es una etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina manipulada en un sitio específico; en el que A es un agente donante de amina; en el que el agente donante de amina está conjugado de manera sitio específica a la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina en un extremo terminal carboxilo, o como se describe un extremo amino terminal, o en otro sitio en el polipéptido, y en el que la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina comprende una secuencia de aminoácidos descrito como LLQGPX, en el que X es A o P (SEQ ID NÚM.:14), o de acuerdo con la invención GLLQGPP (SEQ ID NÚM.:13). En algunas realizaciones, el polipéptido es un polipéptido que contiene Fc o a polipéptido que contiene Fab.

La presente divulgación proporciona un conjugado de polipéptido que contiene Fc manipulado que comprende la fórmula: (polipéptido que contiene Fc)-T-A, en el que T es una etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina manipulada en un sitio específico; en el que A es un agente donante de amina; en el que el agente donante de amina está conjugado de manera sitio específica a la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina en un extremo terminal carboxilo, un extremo amino terminal, o en otro sitio en el polipéptido que contiene Fc, en el que la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina comprende una secuencia de aminoácidos XXQX (SEQ ID NÚM.:35), en el que X es cualquier aminoácido, y en el que el conjugado de polipéptido que contiene Fc manipulado comprende una sustitución de aminoácidos de glutamina a asparagina en la posición 295 (Q295N; esquema de numeración EU).

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento de preparación de un conjugado de polipéptido manipulado que comprende la fórmula: polipéptido-T-A, en el que T es una etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina manipulada en un sitio específico, en el que A es un agente donante de amina; en el que el agente donante de amina está conjugado de manera sitio específica con la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina en un extremo terminal carboxilo, o como se describe un extremo amino terminal, o en otro sitio en el polipéptido, y en el que la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina comprende una secuencia de aminoácidos descrita como LLQGPX, en el que X es A o P (SEQ ID NÚM.:14), o de acuerdo con la invención GLLQGPP (SEQ ID NÚM.:13), que comprende las etapas de: a) proporcionar una molécula de polipéptido T manipulado que comprende el polipéptido and la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina; b) poner en contacto el agente donante de amina con la molécula de polipéptido T manipulado en presencia de una transglutaminasa; y c) dejar el polipéptido-T manipulado para unirse de manera covalente al agente donante de amina para formar el conjugado de polipéptido manipulado. En algunas realizaciones, el polipéptido manipulado es un polipéptido que contiene Fc o un polipéptido que contiene Fab. En algunas realizaciones, la molécula de polipéptido T manipulado se expresa en las células CHO.

**Técnicas y definiciones generales**

A menos que se defina lo contrario en la presente memoria, los términos científicos y técnicos usados con relación a la presente invención tienen los significados que comúnmente entienden los expertos en la técnica. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular. Generalmente, la nomenclatura usada en relación con y las técnicas de cultivo de células y tejidos, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química de proteínas y ácidos nucleicos e hibridación descritas en la presente memoria son las bien conocidas y comúnmente usadas en la técnica.

Los procedimientos y técnicas de la presente invención se realizan generalmente de acuerdo con procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en varias referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva a menos que se indique lo contrario. Véase, por ejemplo, Sambrook J. & Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2000); Ausubel *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, John & Sons, Inc. (2002); Harlow and Lane *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1998); and Coligan *et al.*, *Short Protocols in Protein Science*, Wiley, John & Sons, Inc. (2003). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como se logra comúnmente en la técnica o como se describe en la presente memoria. La nomenclatura usada en conexión con los procedimientos y técnicas

de laboratorio de biología molecular, bioquímica, inmunología, química analítica, química orgánica sintética y química medicinal y farmacéutica descritas en la presente memoria son las bien conocidas y comúnmente usadas en la técnica. A lo largo de esta memoria descriptiva y reivindicaciones, se entenderá que la palabra "comprende" o variaciones tales como "comprende" o "que comprende" implican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros establecido, pero no la exclusión de ningún otro número entero o grupo de números enteros.

Los términos "polipéptido", "oligopéptido", "péptido" y "proteína" son usados indistintamente en la presente memoria para referir a cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, preferentemente, relativamente cortas (por ejemplo, 10-100 aminoácidos). La cadena puede ser lineal o ramificada, puede comprender aminoácidos modificados y/o puede estar interrumpida por no aminoácidos. Los términos también abarcan una cadena de aminoácidos que se ha modificado naturalmente o por intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como la conjugación con un componente de etiquetado. También se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (que incluyen, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Se entiende que los polipéptidos se pueden presentar como cadenas únicas o cadenas asociadas.

El término "polipéptido que contiene Fc" como se usa en la presente memoria se refiere a un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo o una inmunoadhesina) que comprende las secuencias de polipéptidos terminales carboxilo de una cadena pesada de inmunoglobulina. El polipéptido que contiene Fc puede comprender regiones Fc nativas o variantes (es decir, secuencias). La región Fc de una inmunoglobulina generalmente comprende dos dominios constantes, un dominio CH<sub>2</sub> y un dominio CH<sub>3</sub>, y opcionalmente comprende un dominio CH<sub>4</sub>. Un polipéptido que contiene Fc puede comprender parte o la totalidad de una secuencia de bisagra de tipo salvaje (generalmente en el extremo amino terminal del polipéptido que contiene Fc). Un polipéptido que contiene Fc también puede ser un dímero. Un polipéptido que contiene Fc se puede obtener o derivar de cualquier inmunoglobulina adecuada, tal como de al menos uno de los diversos subtipos de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, o de IgA, IgE, IgD o IgM. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, por ejemplo, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana generalmente se define para extenderse desde un residuo de aminoácido en la posición Glu216, o desde Ala231, hasta el extremo terminal carboxilo del mismo.

Un polipéptido que contiene Fc puede ser un polipéptido de fusión que contiene Fc, en el que uno o más polipéptidos están unidos operativamente a un polipéptido que contiene Fc. Una fusión Fc combina el polipéptido Fc de una inmunoglobulina con un compañero de fusión, que en general puede ser cualquier proteína, polipéptido o molécula pequeña. Prácticamente cualquier proteína o molécula pequeña se puede unir a la región Fc para generar un polipéptido de fusión que contiene Fc. Los compañeros de fusión que contienen Fc pueden incluir, pero sin limitación, la región de unión a la diana de un receptor, una molécula de adhesión, un ligando, una enzima, una citoquina, una quimioquina o alguna otra proteína o dominio de proteínas.

El término "etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina", "etiqueta de glutamina", "etiqueta que contiene Q" o "etiqueta Q" como se usa en la presente memoria se refiere a un polipéptido o una proteína que contiene uno o más residuos Gln que actúan como un aceptor de transglutaminasa amina.

El término "agente donante de amina" o "aceptor de acilo" como se usa en la presente memoria se refiere a un agente que contiene uno o más aminas reactivas (por ejemplo, aminas primarias). Por ejemplo, el agente donante de amina puede comprender una unidad donante de amina (por ejemplo, amina primaria NH<sub>2</sub>), un conector y un resto de agente (por ejemplo, una molécula pequeña). El agente donante de amina también puede ser un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo) o un polímero biocompatible que contiene una Lys reactiva (por ejemplo, una Lys endógena).

Como se usa en la presente memoria, el término "polímero biocompatible" se refiere a un polímero (por ejemplo, unidades monoméricas o estructurales repetitivas) que es adecuado para el tratamiento terapéutico o médico en un receptor (por ejemplo, ser humano) sin provocar ningún efecto local o sistémico indeseable en el receptor. Un polímero biocompatible (sintético, recombinante o nativo) puede ser un polímero soluble en agua o insoluble en agua. Un polímero biocompatible también puede ser un polímero lineal o ramificado.

Como se usa en la presente memoria, el término, el término "especificidad de sitio", "conjugado de manera sitio específica" o "reticulado de manera sitio específica" se refiere a la conjugación o reticulación específica del agente donante de amina al polipéptido manipulado con una etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina en un sitio específico (por ejemplo, extremo terminal carboxilo o extremo amino terminal del polipéptido de anticuerpo o toxina, sitio accesible en el anticuerpo (por ejemplo, bucles de cadena ligera y/o cadena pesada de anticuerpo) o polipéptido de toxina (por ejemplo, bucles de polipéptido)). El polipéptido manipulado con una etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina puede ser un polipéptido que contiene Fc, un polipéptido que contiene Fab o un polipéptido de toxina (por ejemplo, una proteína unida a un canal iónico). El término "especificidad de sitio", "conjugado en forma específica de sitio" o "reticulado en forma específica de sitio" también se puede referir a la conjugación o reticulación específica del polipéptido (por ejemplo, polipéptido de toxina) al polímero biocompatible manipulado con una etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina en un sitio específico (por ejemplo, un sitio accesible en el polímero biocompatible). La especificidad del sitio se puede medir mediante diversas técnicas, que incluyen, pero sin limitación, la espectrometría de masas (por ejemplo, espectrometría de masas por ionización-desorción por láser asistida por

matriz (MALDI-MS), espectrometría de masas por ionización por electroaspersión (ESI-MS), espectrometría de masas en tándem (MS) y espectrometría de masas de tiempo de vuelo (TOF-MS), cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de intercambio iónico, mutagénesis dirigida al sitio, marcación con fluorescencia, cromatografía de exclusión por tamaño y cristalografía de rayos X.

- 5 Como se usa en la presente memoria, el término "espacialmente adyacente a" se refiere a la interferencia con la reacción de transglutaminasa deseada (por ejemplo, el residuo de lisina que está ubicado de tal manera que pueda interferir en la reacción de conjugación al servir como un agente donante de amina).

Como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo" es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a una diana, tal como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno, ubicado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en la presente memoria, a menos que el contexto indique lo contrario, se considera que el término abarcar no solo anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también fragmentos de los mismos (como Fab, Fab', F (ab')<sub>2</sub>, Fv), anticuerpos de cadena simple (ScFv) y de dominio, que incluyen los anticuerpos de tiburón y camélido), y proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos siempre que exhiban la actividad biológica deseada) y fragmentos de anticuerpos como se describe en la presente memoria y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgG, IgA o IgM (o una subclase del mismo), y el anticuerpo no necesita ser de ninguna clase en particular. De acuerdo con la secuencia de aminoácidos del anticuerpo del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden ser divididas en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras de subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. En un aspecto, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina humana, murina o de conejo.

El término "polipéptido que contiene Fab", como se usa en la presente memoria, se refiere a un polipéptido que comprende un fragmento Fab, fragmento Fab' o "fragmento (Fab')<sub>2</sub>". Un polipéptido que contiene Fab puede comprender parte o la totalidad de una secuencia de bisagra tipo salvaje (generalmente en el extremo terminal carboxilo de la porción Fab del polipéptido). Un polipéptido que contiene Fab se puede obtener o derivar de cualquier inmunoglobulina adecuada, tal como de al menos uno de los diversos subtipos de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, o de IgA, IgE, IgD o IgM. Un polipéptido que contiene Fab puede ser un polipéptido de fusión que contiene Fab, en el que uno o más polipéptidos están unidos operativamente a un polipéptido que contiene Fab. Una fusión Fab combina el polipéptido Fab de una inmunoglobulina con un compañero de fusión, que en general puede ser cualquier proteína, polipéptido o molécula pequeña. Prácticamente cualquier proteína o molécula pequeña se puede unir al polipéptido Fab para generar un polipéptido de fusión que contiene Fab. Los compañeros de fusión que contienen Fab pueden incluir, pero sin limitación, la región de unión a la diana de un receptor, una molécula de adhesión, un ligando, una enzima, una citoquina, una quimioquina o alguna otra proteína o dominio de proteínas.

Un "fragmento Fab" está compuesto por una cadena ligera y el CH1 y las regiones variables de una cadena pesada. La cadena pesada de una molécula Fab no puede formar un enlace disulfuro con otra molécula de cadena pesada.

40 Un "fragmento Fab'" contiene una cadena ligera y una porción de una cadena pesada que contiene el dominio VH y el dominio CH1 y también la región entre los dominios CH1 y CH<sub>2</sub>, de modo que se puede formar un enlace disulfuro intercatenario entre las dos cadenas pesadas de dos fragmentos Fab' para formar una molécula F (ab')<sub>2</sub>.

45 Un "fragmento F (ab')<sub>2</sub>" contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que contienen una porción de la región constante entre los dominios CH1 y CH<sub>2</sub>, de modo que se forma un enlace disulfuro intercatenario entre las dos cadenas pesadas. Por lo tanto, un fragmento F (ab')<sub>2</sub> está compuesto por dos fragmentos Fab' que se mantienen unidos mediante un enlace disulfuro entre las dos cadenas pesadas.

Los "fragmentos de anticuerpos" como se usan en la presente memoria comprenden solo una porción de un anticuerpo intacto, en el que la porción preferentemente retiene al menos una, preferentemente la mayoría o todas las funciones normalmente asociadas con esa porción cuando está presente en un anticuerpo intacto.

50 Un "anticuerpo multiespecífico" es uno que se dirige a más de un antígeno o epítipo. Un anticuerpo "biespecífico", "específico dual" o "bifuncional" es un anticuerpo híbrido que tiene dos sitios de unión al antígeno diferentes. Los anticuerpos biespecíficos son una especie de anticuerpos multiespecíficos y se pueden producir mediante una variedad de procedimientos que incluyen, pero sin limitación, fusión de hibridomas o unión de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai & Lachmann (1990), Clin. Exp. Immunol. 79:315-321; y Kostelny *et al.* (1992), J. Immunol. 148:1547-1553. Los dos sitios de unión de un anticuerpo biespecífico se unirán a dos epítopos diferentes, que pueden residir en las mismas o diferentes dianas proteicas.

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la



población son idénticos, excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y se dirigen contra un antígeno único. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno.

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención, en ciertas realizaciones, pueden incluir específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a un clase o subclase particular de anticuerpos, mientras que el resto de las cadenas es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (Patente de los Estados Unidos Núm. 4,816,567; y Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan con los residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados, además, pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos al menos uno, y típicamente dos dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones *et al.*, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992). Véanse también los siguientes artículos de revisión y referencias citadas allí: Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995); Hurlle and Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994).

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha obtenido usando cualquiera de las técnicas para fabricar anticuerpos humanos descritos en la presente memoria. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humano.

Como se usa en la presente memoria, el término "inmuno adhesina" designa moléculas tipo anticuerpos o tipo inmunoglobulinas que combinan el "dominio de unión" de una proteína heteróloga (una "adhesina", por ejemplo, un receptor, ligando o enzima) con el componente efector de los dominios constantes de la inmunoglobulina (es decir, dominio Fc). Estructuralmente, las inmuno adhesinas comprenden una fusión de la secuencia de aminoácidos de la adhesina con la especificidad de unión deseada que es diferente del sitio de reconocimiento y unión de antígeno (sitio de combinación de antígeno) de un anticuerpo (es decir, es "heterólogo") y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina en la inmuno adhesina se puede obtener de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, IgA, IgE, IgD o IgM.

La "región de bisagra", la "secuencia de bisagra" y la variación de la misma, como se usa en la presente memoria, incluye el significado conocido en la técnica, ilustrado, por ejemplo, por Janeway *et al.*, ImmunoBiology: the immune system in health and disease, (Elsevier Science Ltd., NY) (4th ed., 1999); Bloom *et al.*, Protein Science (1997), 6:407-415; Humphreys *et al.*, J. Immunol. Methods (1997), 209:193-202.

Como se usa en la presente memoria, el término "aminoácido de tipo salvaje", "IgG de tipo salvaje", "anticuerpo biespecífico de tipo salvaje" o "mAb de tipo salvaje" se refiere a una secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos que se presenta naturalmente dentro de una determinada población (por ejemplo, seres humanos, ratones, ratas, células, etc.). Como se usa en la presente memoria, el término "eficiencia de conjugación" o "eficiencia de reticulación" es la relación entre la cantidad medida experimentalmente de conjugado de polipéptido manipulado dividido por la cantidad máxima esperada de conjugado de polipéptido manipulado. La eficiencia de conjugación o la eficiencia de reticulación pueden ser medidas mediante diversas técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica, tal como la cromatografía de interacción hidrófoba. La eficiencia de conjugación también puede ser medida a diferentes temperaturas, tal como temperatura ambiente o 37 °C.

El término "función efectora" se refiere a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen, pero sin limitación, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), unión al receptor Fc, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), fagocitosis, unión a C1q y disminución de la regulación de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B; BCR). Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.737.056. Dichas funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y se

puede evaluar usando varios ensayos conocidos en la técnica para evaluar tales funciones efectoras de anticuerpos. Un ejemplo de medición de la función efectora es a través de la unión de Fc $\gamma$ 3 y/o C1q.

Como se usa en la presente memoria, "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una reacción mediada por células en la que las células citotóxicas inespecíficas que expresan receptores de Fc (FcR) (por ejemplo, células citolíticas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente provocan la lisis de la célula diana. La actividad de ADCC de una molécula de interés se puede evaluar usando un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células NK. Alternativa o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal como el descrito en Clynes *et al.*, 1998, PNAS (USA), 95: 652-656.

La "citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una diana en presencia de complemento. La vía de activación del complemento se inicia mediante la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) complejada con un antígeno cognado. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, J. Immunol. Methods, 202: 163 (1996).

Como se usa en la presente memoria, "receptor Fc" y "FcR" describen un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es aquel que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, Fc $\gamma$ RIII y Fc $\gamma$ RIV, que incluye las variantes alélicas y formas empalmadas alternativamente de estos receptores. Los receptores Fc $\gamma$ RII incluyen Fc $\gamma$ RIIA (un "receptor activador") y Fc $\gamma$ RIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplasmáticos. Los FcR se revisan en Ravetch and Kinet, 1991, Ann. Rev. Immunol., 9:457-92; Capel *et al.*, 1994, Immunomethods, 4:25-34; de Haas *et al.*, 1995, J. Lab. Clin. Med., 126:330-41; Nimmerjahn *et al.*, 2005, Immunity 23:2-4. "FcR" también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, 1976, J. Immunol., 117:587; y Kim *et al.*, 1994, J. Immunol., 24:249).

Como se usa en la presente memoria, "tratamiento" es un enfoque para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Para los fines de la presente invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: reducir la proliferación de (o destruir) células neoplásicas o cancerosas, inhibir la metástasis de las células neoplásicas, reducir o disminuir el tamaño de tumor, remisión del cáncer, disminuir los síntomas del cáncer, aumentar la calidad de vida de los que sufren de cáncer, de acuerdo con la divulgación, disminuir la dosis de otros medicamentos necesarios para tratar el cáncer, retrasar la progresión del cáncer, curar el cáncer y/o prolongar la supervivencia de pacientes con cáncer.

Como se usa en la presente memoria, una "dosis efectiva" o "cantidad eficaz" de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para efectuar uno o más resultados beneficiosos o deseados. Para el uso profiláctico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad o retrasar el inicio de la enfermedad, que incluye los síntomas bioquímicos, histológicos y/o conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y los 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 la reducción de la incidencia o la mejora de uno o más síntomas de diversas enfermedades o afecciones relacionadas con el cáncer (tal como los cánceres gástrico, de cabeza y cuello, pulmón, ovario y páncreas), disminuir la dosis de otros medicamentos necesarios para tratar la enfermedad, mejorar el efecto de otro medicamento y/o retrasar la progresión del cáncer en los pacientes. Se puede administrar una dosis efectiva en una o más administraciones. Para los propósitos de esta divulgación, una dosis efectiva de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para lograr un tratamiento profiláctico o terapéutico, ya sea directa o indirectamente. Como se entiende en el contexto clínico, una dosis efectiva de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica se puede lograr o no junto con otro fármaco, compuesto o composición farmacéutica. Por lo tanto, se puede considerar una "dosis efectiva" en el contexto de la administración de uno o más agentes terapéuticos, y se puede considerar que un único agente se administra en una cantidad eficaz si, junto con uno o más agentes, se puede lograr o se logra un resultado deseable.

El término "purificar", y sus variaciones gramaticales, son usados para significar la eliminación, ya sea total o parcialmente, de al menos una impureza de una mezcla que contiene el polipéptido y una o más impurezas, lo que así mejora el nivel de pureza del polipéptido en la composición (es decir, mediante la disminución de la cantidad (ppm) de impurezas en la composición).

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

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, caballos, perros, gatos, ratones y

ratas.

Se entiende que dondequiera se describan realizaciones en la presente memoria con el lenguaje "que comprende", de otro modo también son proporcionadas realizaciones análogas o descritas en términos de "que consiste en" y/o "que consiste esencialmente en". Cuando los aspectos o realizaciones de la presente divulgación son descritos en términos de un grupo Markush u otro grupo de alternativas, la presente divulgación abarca no solo el grupo completo enumerado como una totalidad, sino cada miembro del grupo individualmente y todos los subgrupos posibles del grupo principal, pero también el grupo principal ausente uno o más de los miembros del grupo. La presente divulgación también prevé la exclusión explícita de uno o más de cualquiera de los miembros del grupo en la presente divulgación reivindicada.

Las designaciones de residuos en esta solicitud se basan en el esquema de numeración EU del dominio constante (Edelman *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 63 (1): 78-85 (1969).

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado comúnmente entendido por los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención. Los ejemplos de procedimientos y materiales se describen en la presente memoria, aunque los procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria también se pueden usar en la práctica o prueba de la presente divulgación. A lo largo de esta memoria descriptiva y reivindicaciones, se entenderá que la palabra "comprende" o variaciones tales como "comprende" o "que comprende" implica la inclusión de un número entero o grupo de números enteros establecido, pero no la exclusión de ningún otro número entero o grupo de números enteros. A menos que el contexto requiera lo contrario, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular. Los materiales, procedimientos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

#### **Conjugados de polipéptidos manipulados**

Los conjugados de polipéptidos manipulados de la presente memoria comprenden un polipéptido (por ejemplo, polipéptido que contiene Fc, polipéptido que contiene Fab, o anticuerpo) manipulado a una etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina específica, en el que el polipéptido está conjugado de manera sitio específica a un agente donante de amina (por ejemplo, una pequeña molécula acoplada a un conector) por medio de la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina. El polipéptido manipulado (por ejemplo, polipéptido o anticuerpo que contiene Fc) también se puede modificar para eliminar la conjugación fuera de la diana entre la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina y el agente donante de amina para obtener conjugados de polipéptidos altamente homogéneos que son al menos aproximadamente 99% específicos de sitio.

En un aspecto, es proporcionado un conjugado de polipéptido manipulado que comprende la fórmula: polipéptido-T-A, en el que T es una etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina manipulada en un sitio específico, en el que A es un agente donante de amina, en el que el agente donante de amina está conjugado de manera sitio específica a la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina en un extremo terminal carboxilo, o como se describe, un extremo amino terminal, o en otro sitio de del polipéptido, y en el que la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina comprende una secuencia de aminoácidos descrito como LLQGPX, en el que X es A o P (SEQ ID NÚM.:14), o de acuerdo con la invención GLLQGPP (SEQ ID NÚM.:13). En algunas realizaciones, el polipéptido es un polipéptido que contiene Fc o un polipéptido que contiene Fab.

En otra divulgación, es proporcionado un conjugado de polipéptido que contiene Fc manipulado que comprende la fórmula: (polipéptido que contiene Fc)-T-A, en el que T es una etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina manipulada en un sitio específico, en el que A es un agente donante de amina, en el que el agente donante de amina está conjugado de manera sitio específica a la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina en un extremo terminal carboxilo, un extremo amino terminal, o en otro sitio en el polipéptido que contiene Fc, en el que la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina comprende una secuencia de aminoácidos XXQX (SEQ ID NÚM.:35), en el que X es cualquier aminoácido y en el que el conjugado de polipéptido que contiene Fc manipulado comprende una sustitución de aminoácidos de glutamina a asparagina en la posición 295 (por ejemplo, Q295N; esquema de numeración EU).

Tanto la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina como el agente donante de amina descritos en la presente memoria son sustratos para la transglutaminasa, y la unión entre la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina y el agente donante de amina es de la fórmula  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-NH-}$ , en el que NH- está unido a un conector y un resto de agente. La transglutaminasa usada en la invención descrita en la presente memoria se puede obtener o preparar a partir de una variedad de fuentes. En algunas divulgaciones, la transglutaminasa es una transglutaminasa dependiente de calcio que requiere calcio para inducir cambios de conformación enzimática y permitir la actividad enzimática. Por ejemplo, la transglutaminasa se puede derivar del hígado de cobayo y obtener a través de fuentes comerciales (por ejemplo, Sigma-Aldrich (St Louis, MO) y MP Biomedicals (Irvine, CA)). En algunas divulgaciones, la transglutaminasa es una transglutaminasa independiente del calcio que no requiere calcio para inducir cambios de conformación enzimática y permitir la actividad enzimática. En algunas divulgaciones, la transglutaminasa es una transglutaminasa microbiana derivada de un genoma microbiano, tal como la transglutaminasa de *Streptovercillium* o *Streptomyces* (por ejemplo, *Streptomyces mobarensis* o *Streptovercillium mobarensis*). La transglutaminasa

independiente del calcio disponible comercialmente, tal como ACTIVA™ (Ajinomoto, Japan) es adecuada para la presente divulgación. En ciertas divulgaciones, la transglutaminasa es una proteína de mamífero (por ejemplo, transglutaminasa humana), una proteína bacteriana, una proteína vegetal, una proteína fúngica (por ejemplo, transglutaminasas de *Oomycetes* y *Actinomycetes*) o una proteína procariota. En cierta divulgación, la transglutaminasa es de *Micrococcus*, *Clostridium*, *Turolpsis*, *Rhizopus*, *Monascus*, o *Bacillus*.

En ciertas divulgaciones, la transglutaminasa usada en la divulgación descrita en la presente memoria es una transglutaminasa manipulada, que cataliza la transamidación de 1) uno o más residuos de glutamina exógena en la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina y en forma adicional/opcional 2) residuos de glutamina endógena en el anticuerpo, con uno o más de residuos de lisina o aminos reactivas en el agente donante de amina. Por ejemplo, uno o más residuos de aminoácidos de tipo salvaje en la transglutaminasa natural se eliminan, reemplazan o sustituyen con otros residuos de aminoácidos para obtener la transglutaminasa modificada.

En cierta divulgación, la transglutaminasa usada en la divulgación descrita en la presente memoria también puede ser una proteína recombinante producida usando técnicas recombinantes conocidas por los expertos en la técnica. En ciertas divulgaciones, la transglutaminasa usada en la divulgación descrita en la presente memoria puede ser una proteína purificada. Por ejemplo, la transglutaminasa purificada es al menos aproximadamente 50% pura. Como se usa en la presente memoria, la proteína "pura" o "purificada" se refiere a una proteína (por ejemplo, transglutaminasa) libre de otros contaminantes proteicos. En ciertas divulgaciones, la transglutaminasa purificada es al menos aproximadamente cualquiera de 55%-60%, 60%-65%, 65%-70%, 70%-75%, 75%-80%, 80%-85%, 85%-90%, 90%-95%, 95%-98%, o 99% puro. En ciertas divulgaciones, la transglutaminasa purificada es aproximadamente cualquiera de 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% puro.

En algunas realizaciones, la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina del conjugado de polipéptido manipulado (por ejemplo, polipéptido que contiene Fc, que contiene Fab, o anticuerpo) como se describe en la presente memoria no es espacialmente adyacente a una Lys reactiva en el polipéptido. Por ejemplo, la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina no es espacialmente adyacente a una Lys reactiva en el extremo terminal carboxilo, o como se describe el extremo amino terminal, o los extremos terminales carboxilo y amino del polipéptido.

En ciertas divulgaciones, la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina comprende una secuencia de aminoácidos XXQX (SEQ ID NÚM.: 35), en la que X puede ser un aminoácido convencional o no convencional, como se describe en la presente memoria, y puede ser del mismo aminoácido o de un aminoácido diferente. En ciertas divulgaciones, X es L (Leu), A (Ala), G (Gly), S (Ser), V (Val), F (Phe), Y (Tyr), H (His), R (Arg), N (Asn), E (Glu), D (Asp), C (Cys), Q (Gln), I (Ile), M (Met), P (Pro), T (Thr), K (Lys), o W (Trp). En ciertas divulgaciones, la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en LLQGG (SEQ ID NÚM.:16), LLQG (SEQ ID NÚM.:17), LLSLSQG (SEQ ID NÚM.:18), GGGLLQGG (SEQ ID NÚM.:19), GLLQG (SEQ ID NÚM.:20), LLQ, GSPLAQSHGG (SEQ ID NÚM.:21), GLLQGGG (SEQ ID NÚM.:22), GLLQGG (SEQ ID NÚM.:23), GLLQ (SEQ ID NÚM.:24), LLQLLQA (SEQ ID NÚM.:25), LLQA (SEQ ID NÚM.:26), LLQYQGA (SEQ ID NÚM.:27), LLQGSG (SEQ ID NÚM.:28), LLQYQG (SEQ ID NÚM.:29), LLQLLQG (SEQ ID NÚM.:30), SLLQG (SEQ ID NÚM.:31), LLQLQ (SEQ ID NÚM.:32), LLQLLQ (SEQ ID NÚM.:33), LLQGR (SEQ ID NÚM.:34), LLQGPP (SEQ ID NÚM.:11), LLQGA (SEQ ID NÚM.:4), GLLQGPP (SEQ ID NÚM.:13), GLLQGA (SEQ ID NÚM.:12), LLQGA (SEQ ID NÚM.:1), LLQPGK (SEQ ID NÚM.:2), LLQGP (SEQ ID NÚM.:3), LLQP (SEQ ID NÚM.:6), LLQPGK (SEQ ID NÚM.:7), LLQAPGK (SEQ ID NÚM.:8), LLQGAPG (SEQ ID NÚM.:9), and LLQGAP (SEQ ID NÚM.:10). En ciertas divulgaciones, la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina comprende una secuencia de aminoácidos LLQGA (SEQ ID NÚM.:4), LLQP (SEQ ID NÚM.:5), LLQGPP (SEQ ID NÚM.:11), o de acuerdo con la invención GLLQGPP (SEQ ID NÚM.:13). En ciertas divulgaciones, la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina no comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en LGGQGGG (SEQ ID NÚM.:41), GGGQGG (SEQ ID NÚM.:42), GXGQGGG (SEQ ID NÚM.:43), GGXQGGG (SEQ ID NÚM.:44), GGGQXGG (SEQ ID NÚM.:45), y GGGQGXG (SEQ ID NÚM.:46), en el que X es G, A, S, L, V, F, Y, R, N, o E).

En algunas realizaciones, el polipéptido (por ejemplo, polipéptido que contiene Fc, polipéptido que contiene Fab, o anticuerpo) del conjugado de polipéptido manipulado comprende una modificación de aminoácido en la última posición de aminoácidos en el extremo terminal carboxilo con respecto a un polipéptido tipo salvaje en la misma posición. En ciertas divulgaciones, la modificación es una supresión, inserción, sustitución, mutación de aminoácidos, o cualquiera de sus combinaciones. En ciertas divulgaciones, la sustitución comprende reemplazar un aminoácido tipo salvaje con otro (por ejemplo, un aminoácido de tipo no salvaje). En ciertas divulgaciones, la inserción comprende insertar uno o más aminoácidos (por ejemplo, insertar uno, dos, tres o más aminoácidos). En ciertas divulgaciones, el otro aminoácido (por ejemplo, de tipo no salvaje) o insertado es Arg. En ciertas divulgaciones, el otro aminoácido (por ejemplo, de tipo no salvaje) es Ala, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, o Val. Por ejemplo, en ciertas divulgaciones, se puede suprimir el último aminoácido en el extremo terminal carboxilo del polipéptido (por ejemplo, la cadena pesada de un anticuerpo), y la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina manipulada al extremo terminal C del polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos LLQGA (SEQ ID NÚM.:4) o LLQGPP (SEQ ID NÚM.:11).

En ciertas divulgaciones, el polipéptido (por ejemplo, polipéptido que contiene Fc o anticuerpo) del conjugado de polipéptido manipulado comprende una modificación de aminoácido en la posición 222, 340, o 370 (numeración EU)

con respecto al polipéptido tipo salvaje en la misma posición. En ciertas divulgaciones, la modificación es una supresión, inserción, sustitución, mutación de aminoácidos, o cualquiera de sus combinaciones. En ciertas divulgaciones, la sustitución comprende el reemplazo de un aminoácido tipo salvaje con otro (por ejemplo, un aminoácido de tipo no salvaje). En ciertas divulgaciones, el otro aminoácido (por ejemplo, de tipo no salvaje) o insertado es Arg (por ejemplo, K222R, K340R, o K370R (numeración EU)). En ciertas divulgaciones, la inserción comprende insertar uno o más aminoácidos (por ejemplo, insertar uno, dos, tres o más aminoácidos). En ciertas divulgaciones, el otro aminoácido (por ejemplo, de tipo no salvaje) es Ala, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, o Val. Por ejemplo, en ciertas divulgaciones, el polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo) que comprende la sustitución K222R está manipulado en la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina en el extremo terminal C de la cadena ligera del anticuerpo, en el que la etiqueta que contiene la glutamina comprende una secuencia de aminoácidos de GLLQGPP (SEQ ID NÚM.:13).

En ciertas divulgaciones, el polipéptido (por ejemplo, polipéptido que contiene Fc, polipéptido que contiene Fab, o anticuerpo) comprende una modificación de aminoácido en la primera posición de aminoácido en el extremo amino terminal con respecto a un polipéptido tipo salvaje en la misma posición. En ciertas divulgaciones, la modificación es una supresión, inserción, sustitución, mutación de aminoácidos, o cualquiera de sus combinaciones. En ciertas divulgaciones, la sustitución comprende reemplazar un aminoácido tipo salvaje con otro aminoácido (por ejemplo, de tipo no salvaje). En ciertas divulgaciones, la inserción comprende insertar un aminoácido. En ciertas divulgaciones, el aminoácido de tipo no salvaje o insertado es Arg. En ciertas divulgaciones, el otro aminoácido (de tipo no salvaje o insertado) es Ala, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, o Val.

En algunas realizaciones, el conjugado de polipéptido descrito en la presente memoria comprende una cadena pesada de anticuerpos de longitud completa y una cadena ligera del anticuerpo. En algunas realizaciones, la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina se une a/ubica en el polipéptido en el extremo terminal carboxilo de una cadena pesada, una cadena ligera, o ambas de la cadena pesada y la cadena ligera. Por ejemplo, la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina GLLQGPP (SEQ ID NÚM.:13) se une al polipéptido en el extremo terminal carboxilo de una cadena ligera. En una variación, la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina GLLQGPP (SEQ ID NÚM.:13) se une al polipéptido que comprende la mutación Q295N (esquema de numeración EU) en el extremo terminal carboxilo de una cadena ligera. En otra divulgación, la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina LLQGPA (SEQ ID NÚM.:4), LLQGP (SEQ ID NÚM.:5), o LLQGPP (SEQ ID NÚM.:11) se une al polipéptido que comprende la mutación Q295N en el extremo terminal carboxilo de una cadena pesada.

En algunas realizaciones, el polipéptido descrito en la presente memoria es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo biespecífico, un minicuerpo, un diacuerpo o un fragmento de anticuerpo.

En algunas realizaciones, el anticuerpo es una IgG. En ciertas divulgaciones, la IgG está seleccionado del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4.

En algunas realizaciones, el anticuerpo es una IgA, IgE, IgD, o IgM.

En ciertas divulgaciones, la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina está ubicada en el polipéptido mediante inserción o mediante reemplazo de uno o más aminoácidos tipo salvaje en otro sitio en el polipéptido descrito en la presente memoria (por ejemplo, polipéptido que contiene Fc, polipéptido que contiene Fab, o anticuerpo), en el que el otro sitio no es un extremo amino o carboxilo terminal. Por ejemplo, la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina es parte de un bucle del anticuerpo. La etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina se puede unir a uno o más bucles de cadena pesada. La etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina también se puede unir a uno o más bucles de cadena ligera del anticuerpo. En ciertas divulgaciones, la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina está ubicada tanto en los bucles de cadena pesada como cadena ligera. En ciertas divulgaciones, el otro sitio es las posiciones de aminoácido) 108, 135, 160, 168, 189-192, 190-192, 200-202, 222-223, 251-254, 252-253, 222-223, 293-297, 294-297, 295, 297, o 385 (esquema de numeración EU) del anticuerpo de IgG1 humana.

En ciertas divulgaciones, la función efectora (por ejemplo, medida por unión a Fcγ3 y/o C1q) del conjugado de polipéptido manipulado (por ejemplo, polipéptido que contiene Fc o anticuerpo) descrito en la presente memoria disminuye no más de aproximadamente cualquiera de 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, o 5 veces con relación a un polipéptido tipo salvaje (por ejemplo, polipéptido que contiene Fc o anticuerpo). En ciertas divulgaciones, el conjugado de polipéptido manipulado es una IgG, en el que la función efectora de la IgG disminuye no más de aproximadamente 2 veces con relación a una IgG de tipo salvaje. En otras divulgaciones, la función efectora de la IgG disminuye aproximadamente 2 veces con relación a una IgG de tipo salvaje. En otras divulgaciones, la función efectora de la IgG disminuye más que aproximadamente 2 veces con relación a una IgG de tipo salvaje. En ciertas divulgaciones, el conjugado de polipéptido que contiene Fc manipulado es una IgG, en el que la función efectora de la IgG disminuye no más de aproximadamente 1 vez con relación a una IgG de tipo salvaje. En otras divulgaciones, la función efectora de la IgG disminuye aproximadamente 1 vez con relación a una IgG de tipo salvaje. En ciertas divulgaciones, la función efectora de la IgG disminuye más que aproximadamente cualquiera de 1 vez, 3 veces, 4 veces, o 5 veces con relación a una IgG de tipo salvaje.

En ciertas divulgaciones, la función efectora (por ejemplo, medida por la unión a Fcγ3 y/o C1q) del conjugado de

polipéptido manipulado (polipéptido que contiene Fc o anticuerpo) descrito en la presente memoria aumenta al menos aproximadamente 1 vez a 3000 veces con relación a un polipéptido tipo salvaje (por ejemplo, polipéptido que contiene Fc o anticuerpo). En ciertas divulgaciones, la función efectora del conjugado de polipéptido manipulado (por ejemplo, polipéptido que contiene Fc o anticuerpo) aumenta al menos aproximadamente cualquiera de 1- a 5 veces, 6- a 10 veces, 11- a 15 veces, 16- a 20 veces, 21- a 25 veces, 26- a 30 veces, 31- a 35 veces, 36- a 40 veces, 41- a 45 veces, 46- a 50 veces, 51- a 55 veces, 56- a 60 veces, 61- a 65 veces, 66- a 70 veces, 71- a 75 veces, 76- a 80 veces, 81- a 85 veces, 86- a 90 veces, 91- a 95 veces, 96- a 100 veces, 101- a 200 veces, 201- a 300 veces, 301- a 500 veces, 501- a 1000 veces, 1001- a 1500 veces, 1501- a 2000 veces, 2001- a 2500 veces, 2501- a 3000 veces con relación a un polipéptido tipo salvaje (por ejemplo, polipéptido que contiene Fc o anticuerpo). En ciertas divulgaciones, el conjugado de polipéptido manipulado es una IgG, en la que la función efectora de la IgG aumenta aproximadamente 1 vez a 300 veces con relación a una IgG de tipo salvaje. En ciertas divulgaciones, la función efectora de la IgG aumenta aproximadamente cualquiera de 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 40 veces, 60 veces, 80 veces, 100 veces, 150 veces, 200 veces, 250 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 600 veces, 700 veces, 800 veces, 900 veces, 1000 veces, 1500 veces, 2000 veces, 2500 veces, o 3000 veces con relación a una IgG de tipo salvaje.

En ciertas realizaciones, el agente donante de amina tiene la fórmula: X-Y-Z, en el que X es una unidad donante de amina; Y es un conector; y Z es un resto de agente.

El número de agentes donantes de amina que se puede conjugar por medio de la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina al polipéptido (por ejemplo, polipéptido que contiene Fc, polipéptido que contiene Fab, o anticuerpo) es dependiente del número de etiquetas que contienen glutamina donante de acilo que se unen/insertan al polipéptido así como el número de Gln en la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina. Por ejemplo, dos agentes donantes de amina pueden estar conjugados en forma específica de sitio con un anticuerpo en el extremo terminal carboxilo de las dos cadenas pesadas y/o dos agentes donantes de amina pueden estar conjugados de manera sitio específica con el mismo anticuerpo en el extremo terminal carboxilo de las dos cadenas ligeras.

La unidad donante de amina de la presente divulgación es una amina primaria (NH<sub>2</sub>) que proporciona un sustrato para la transglutaminasa para permitir la conjugación del resto de agente al polipéptido por medio de la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina. Por consiguiente, la unión entre la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina y la unidad donante de amina es de la fórmula CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-NH-, en la que NH-se une a un conector y un resto de agente.

El conector de la presente divulgación puede ser un conector escindible o no escindible. Por ejemplo, el conector (con la unidad donante de amina) o el agente donante de amina se pueden liberar del polipéptido. En ciertas divulgaciones, el conector puede ser un conector peptídico (por ejemplo, aminoácido convencional o no convencional) y/o un conector no peptídico. Los ejemplos de un conector no peptídico incluyen un conector alquilo y un conector PEG.

En ciertas realizaciones, el conector de la unidad donante de amina (por ejemplo, X-Y) es una unidad lineal que comprende un resto de agente. En otras realizaciones, el conector de la unidad donante de amina es una unidad ramificada (por ejemplo, al menos 2 unidades) que comprenden al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o más restos de agente.

Los ejemplos de conector de la unidad donante de amina incluyen, pero sin limitación, Ac-Lys-Gly, ácido aminocaproico, Ac-Lys-β-Ala, amino-PEG2-C2, amino-PEG3-C2, amino-PEG6-C2, Ac-Lys-Val-Cit (citrulina)-PABC (p-aminobenziloxycarbonilo), aminocaproil-Val-Cit-PABC, amino-PEG6-C2-Val-Cit-PABC, aminocaproil-Val-Cit-PABC, [(3R,5R)-1-{3-[2-(2-aminoetoxy)etoxy]propanoil}piperidine-3,5-dii]bis-Val-Cit-PABC, [(3S,5S)-1-{3-[2-(2-aminoetoxy)etoxy]propanoil}piperidin-3,5-dii]bis-Val-Cit-PABC-, Ac-Lys-putrescina, o 2-aminoetoxy.

El resto de agente del polipéptido manipulado de la presente invención incluye una molécula pequeña, o de acuerdo con La presente divulgación incluye una proteína o polipéptido, y un polímero biocompatible.

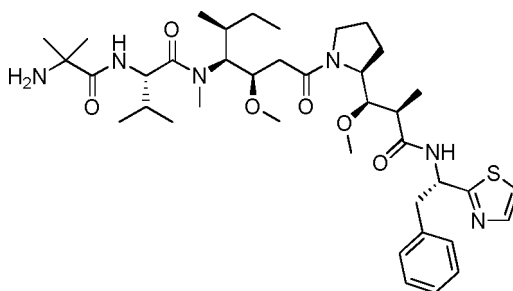
En ciertas realizaciones, una molécula pequeña es un agente citotóxico, o como se describe un agente inmunosupresor, o un agente de imágenes (por ejemplo, un fluoróforo). En ciertas realizaciones, el agente citotóxico es un agente quimioterapéutico.

Los ejemplos de un agente citotóxico incluyen, pero sin limitación, una antraciclina, una auristatina, una camptotecina, una combretastatina, una dolastatina, una duocarmicina, un enediina, una geldanamicina, un dímero de indolino-benzodiazepina, una maitansina, un puromicina, un taxano, un alcaloide de vinca, SN-38, una tubulisina, una hemiasterlina, una espliceostatina, una pladienolida, y estereoisómeros, isómeros, análogos o derivados de los mismos.

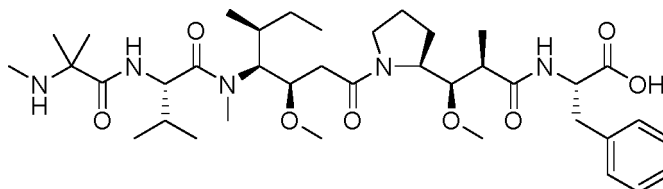
Las antraciclinas se derivan de la bacteria *Streptomycetes* y se han usado para tratar una amplia variedad de cánceres, tales como leucemias, linfomas, cáncer de mama, útero, ovario y pulmón. Los ejemplos de antraciclinas incluyen, pero sin limitación, daunorrubicina, doxorrubicina (es decir, adriamicina), epirubicina, idarrubicina, valrubicina y mitoxantrona.

Las dolastatinas y sus análogos peptídicos y derivados, las auristatinas, son agentes antimitóticos altamente potentes

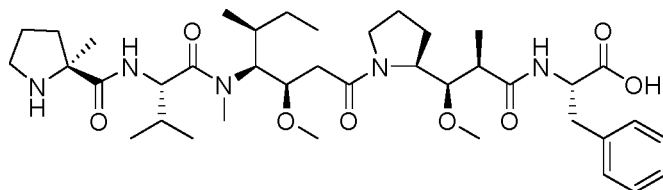
que tienen actividad anticáncer y antifúngicas. Véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.663.149 y Pettit *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965, 1998. Los ejemplos de dolastatinas y auristatinas incluyen, pero sin limitación, dolastatina 10, auristatina E, auristatina EB (AEB), auristatina EFP (AEFP), MMAD (Monometil Auristatina D o monometil dolastatina 10), MMAF (Monometil Auristatina F o N-metilvalina-valina-dolaisoleucina-dolaproine-henilalanina), MMAE (Monometil Auristatina E o N-metilvalina-valina-dolaisoleuina-dolaproin-norefedrina), éster del ácido 5-benzoilvalérico-AE (AEVB), y otras nuevas auristatinas (tales como los descritos en la Publicación U.S. Núm. 2013/0129753). En ciertas realizaciones, la auristatina es 0101 (2-metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-((2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino)propil]pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida) que tiene la siguiente estructura:



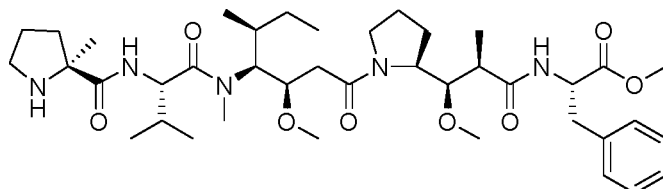
En ciertas divulgaciones, la auristatina es 3377 (N,2-dimetilalanil-N-[(1S,2R)-4-((2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il)-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil]-N-metil-L-valinamida) que tiene la siguiente estructura:



En otras divulgaciones, la auristatina es 0131 (2-metil-L-proliil-N-[(3R,4S,5S)-1-((2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida) que tiene la siguiente estructura:



En otras divulgaciones, la auristatina es 0121 (2-metil-L-proliil-N-[(3R,4S,5S)-1-((2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida) que tiene la siguiente estructura:



- 5 La camptotecina es un alcaloide de quinolina citotóxico que inhibe la enzima topoisomerasa I. Los ejemplos de camptotecina y sus derivados incluyen, pero sin limitación, topotecano e irinotecano, y sus metabolitos, tales como SN-38.
- Las combretastatinas son fenoles naturales con propiedades de ruptura vascular en tumores. Los ejemplos de combretastatina y sus derivados incluyen, pero sin limitación, combretastatina A-4 (CA-4) y ombrabulina.
- 10 Las duocarmicinas son agentes alquilantes de ADN con potencia citotóxica. Véase Boger and Johnson, PNAS 92:3642-3649 (1995). Los ejemplos de duocarmicinas incluyen, pero sin limitación, duocarmicina A, duocarmicina B1, duocarmicina B2, duocarmicina C1, duocarmicina C2, duocarmicina D, duocarmicina SA, y CC-1065.
- Las enediínas son una clase de productos bacterianos antitumorales caracterizados por anillos de nueve y diez miembros o la presencia de un sistema cíclico de enlaces triple-doble-triple conjugados. Los ejemplos de enediínas incluyen, pero sin limitación, calicheamicina, esperamicina y dinemicina.
- 15 Las geldanamycinas son antibióticos de benzoquinona ansamicina que se unen a Hsp90 (proteína de choque térmico 90) y se han usado medicamentos antitumorales. Los ejemplos de geldanamycinas incluyen, pero sin limitación, 17-AAG (17-N-Alilamino-17-Demetoxigeldanamicina) y 17-DMAG (17-Dimetilaminoetilamino-17-demetoxigeldanamicina).
- La hemisterlina y sus análogos (por ejemplo, HTI-286) se unen a la tubulina, alteran la dinámica normal de los microtúbulos y, en cantidades estequiométricas, despolimerizan los microtúbulos.
- 20 Las maitansinas o sus derivados maytansinoides inhiben la proliferación celular mediante la inhibición de la formación de microtúbulos durante la mitosis mediante la inhibición de la polimerización de la tubulina. Véase Remillard *et al.*, Science 189: 1002-1005 (1975). Los ejemplos de maitansinas y maitansinoides incluyen, pero sin limitación, mertansina (DM1) y sus derivados, así como ansamitocina.
- 25 Los dímeros de pirrolobenzodiazepina (PBD) y los dímeros de indolino-benzodiazepina (IGN) son agentes antitumorales que contienen uno o más grupos funcionales imina, o sus equivalentes, que se unen al ADN dúplex. Las moléculas PBD e IGN se basan en el producto natural de la atramicina e interactúan con el ADN de una manera selectiva de secuencia, con preferencia para las secuencias de purina-guanina-purina. Los ejemplos de PBD y sus análogos incluyen, pero sin limitación, SJG-136.
- 30 Las espliceostatinas y pladienolidas son compuestos antitumorales que inhiben el empalme e interactúan con el espliceosoma, SF3b. Los ejemplos de espliceostatinas incluyen, pero sin limitación, espliceostatina A y FR901464. Los ejemplos de pladienolidas incluyen, pero sin limitación, Pladienolida B, Pladienolida D y E7107.
- Los taxanos son diterpenos que actúan como agentes anti-tubulina o inhibidores mitóticos. Los ejemplos de taxanos incluyen, pero sin limitación, paclitaxel (por ejemplo, TAXOL®) y docetaxel (TAXOTERE®).
- 35 Las tubulisinas son productos naturales aislados de una cepa de mixobacterias que se ha demostrado que despolimeriza los microtúbulos e induce el paro mitótico. Los ejemplos de tubulisinas incluyen, pero sin limitación tubulisina A, tubulisina B, y tubulisina D.
- Los alquiloides de vinca también son agentes anti-tubulina. Los ejemplos de alquiloides de vinca incluyen, pero sin limitación, vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina.
- 40 En ciertas divulgaciones, el resto de agente es un agente inmunosupresor. Los ejemplos de un agente inmunosupresor incluyen, pero sin limitación, ganciclovir, etanercept, tacrolimus, sirolimus, voclosporina, ciclosporina, rapamicina, ciclofosfamida, azatioprina, micofenolato mofetil, metotrexato y glucocorticoides y sus análogos.
- En ciertas divulgaciones, el resto de agente es un agente de imágenes (por ejemplo, un fluoróforo o un quelante), tal como fluoresceína, rodamina, fósforos lantánidos y sus derivados. Los ejemplos de fluoróforos incluyen, pero sin limitación, isotiocianato de fluoresceína (FITC) (por ejemplo, 5-FITC), amidita de fluoresceína (FAM) (por ejemplo, 5-FAM), eosina, carboxifluoresceína, eritrosina, Alexa Fluor® (por ejemplo, Alexa 350, 405, 430, 488, 500, 514, 532, 546, 555, 568, 594, 610, 633, 647, 660, 680, 700, o 750), carboxitetrametilrodamina (TAMRA) (por ejemplo, 5-TAMRA), tetrametilrodamina (TMR), y sulforodamina (SR) (por ejemplo, SR101). Los ejemplos de quelantes incluyen, pero sin limitación, ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA), ácido 1,4,7-triazaciclono-nano-1,4,7-triacético (NOTA), ácido 1,4,7-triazaciclono-nano,1-glutárico-ácido 4,7-acético (NODAGA), ácido dietilentriaminedipentaacético (DTPA), y ácido 1,2-bis(o-aminofenoxi)etano-N,N',N'',N'-tetraacético (BAPTA).
- 50 En ciertas divulgaciones, el resto de agente es un polipéptido. En ciertas divulgaciones, el polipéptido es un anticuerpo, tal como un anticuerpo humanizado, humano, quimérico o murino.

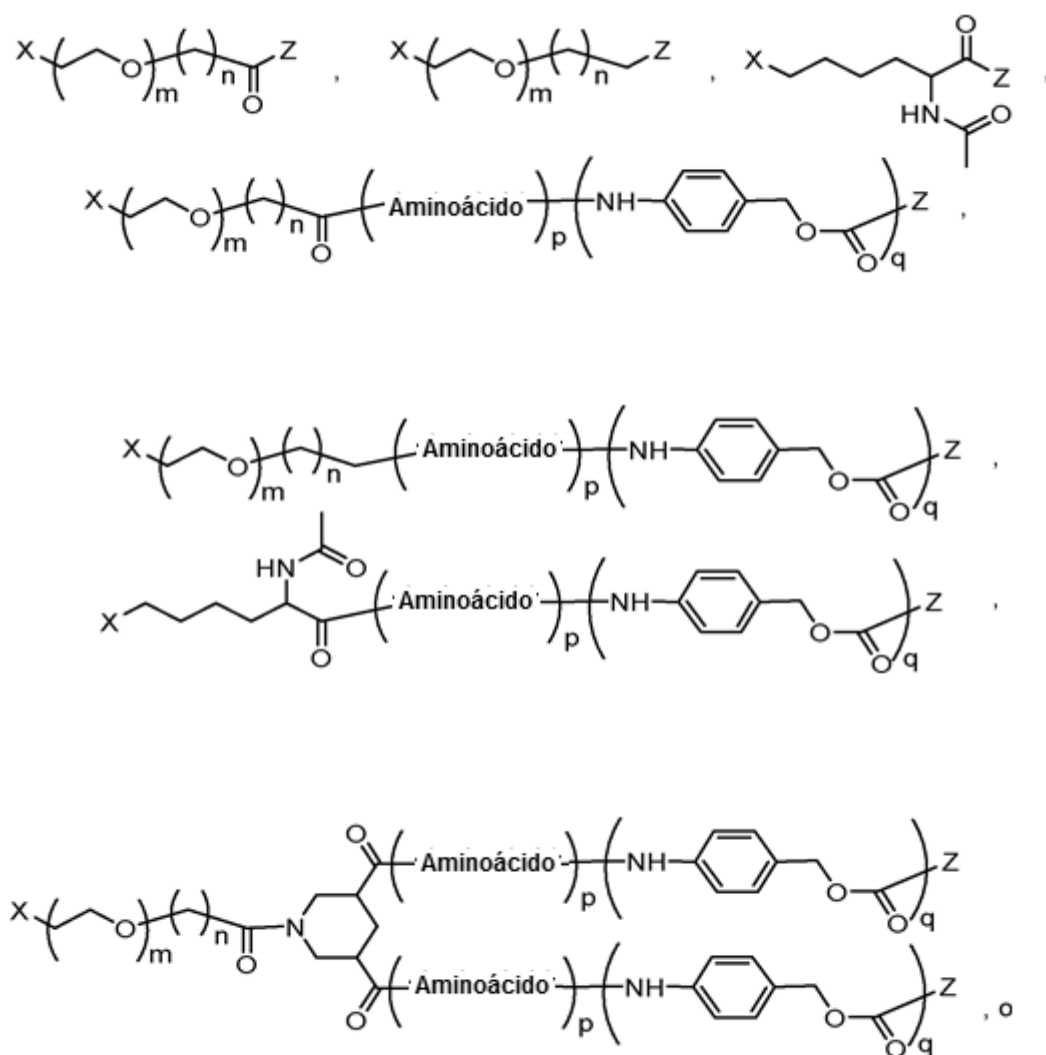


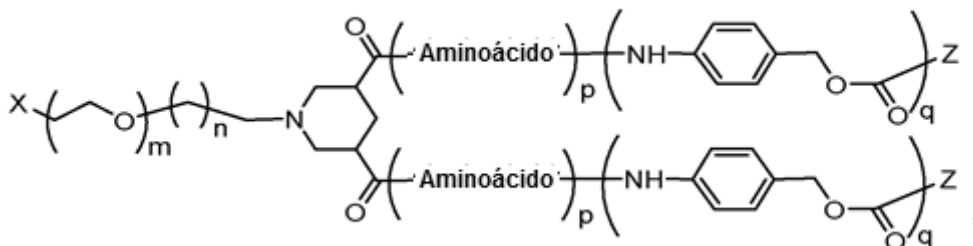
5 En ciertas divulgaciones, el resto de agente es un polipéptido de toxina (o una proteína de toxina). Los ejemplos de un polipéptido de toxina incluyen, pero sin limitación, cadena A de difteria, fragmentos activos de unión de toxina de difteria, cadena A de exotoxina, cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de saponaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, tricotecenos, péptido inhibidor del nudo de cistina (ICK) (por ejemplo, ceratotoxinas) y conotoxina (por ejemplo, KIIIA o SmIIIA).

10 En ciertas divulgaciones, se pueden incorporar radioisótopos terapéuticos u otras marcas en el resto de agente (por ejemplo, mediante la unión a un quelante) para la conjugación de un polipéptido (por ejemplo, un polipéptido que contiene Fc o Fab) a un agente donante de amina que lleva un quelante. Los ejemplos de un radioisótopo u otras etiquetas incluyen, pero sin limitación, <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>35</sup>S, <sup>18</sup>F, <sup>32</sup>P, <sup>33</sup>P, <sup>64</sup>Cu, <sup>68</sup>Ga, <sup>89</sup>Zr, <sup>90</sup>Y, <sup>99</sup>Tc, <sup>123</sup>I, <sup>124</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>111</sup>In, <sup>131</sup>In, <sup>153</sup>Sm, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>211</sup>At, <sup>212</sup>Bi y <sup>153</sup>Pb.

15 En ciertas divulgaciones, el resto de agente es un polímero biocompatible. El polipéptido se puede conjugar con el polímero biocompatible a través de la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina para mejorar las características biológicas del polipéptido, por ejemplo, para aumentar la vida media y la bioactividad en suero, y/o extender la vida media *in vivo*. Los ejemplos de polímeros biocompatibles incluyen polímeros solubles en agua, tales como polietilenglicol (PEG) o sus derivados y polímeros biocompatibles que contienen zwitterión (por ejemplo, un polímero que contiene fosforilcolina).

20 En ciertas divulgaciones, el agente donante de amina (X-Y-Z) es





en el que X es NH<sub>2</sub> (de este modo, forma un enlace covalente con glutamina como CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-NH-), m es un 0 a 20, n es 1 a 8, p es 0 a 3, q es 0 o 1, aminoácido es cualquier aminoácido convencional o no convencional y Z es un agente citotóxico o un agente de imágenes.

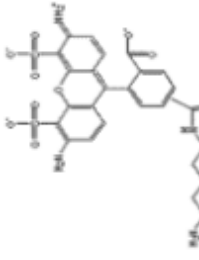
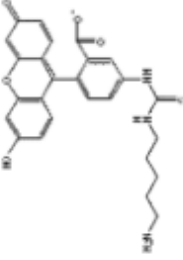
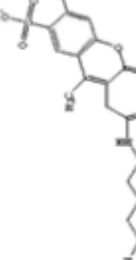
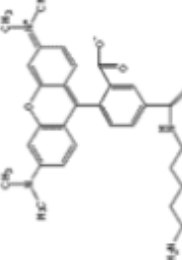
5 Los aminoácidos convencionales o naturales son divididos en grupos en función de las propiedades comunes de la cadena lateral:

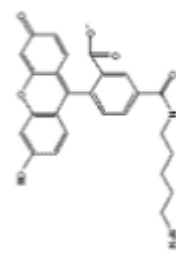
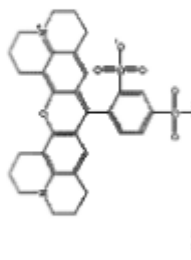
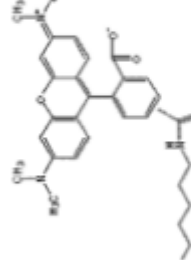
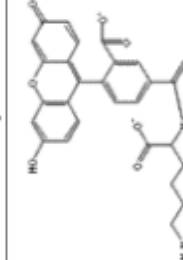
(1) no polar: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) polar sin carga: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) ácido (cargado negativamente): Asp, Glu; (4) básico (con carga positiva): Lys, Arg; y (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; y (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe, His. Los aminoácidos convencionales incluyen estereoquímica L o D.

10 Los aminoácidos no convencionales son aminoácidos no naturales. Los ejemplos de un aminoácido no convencional incluyen, pero sin limitación, ácido aminoadípico, beta-alanina, ácido beta-aminopropiónico, ácido aminobutírico, ácido piperidínico, ácido aminocaproico, ácido aminoheptanoico, ácido aminoisobutírico, ácido aminopimélico, citrulina, ácido diaminobutírico, desmosina, ácido diaminopimélico, ácido diaminopropiónico, N-etilglicina, N-etilaspargina, hidroxilisina, alo-hidroxilisina, hidroxiprolina, isodesmosina, alo-isoleucina, N-metilglicina, sarcosina, N-metilisoleucina, N-metil-valina, norvalina, norleucina, ornitina, 4-hidroxiprolina, γ-carboxiglutamato, ε-N,N,N-trimetilisina, ε-N-acetililisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, σ-N-metilarginina, y otros aminoácidos similares y aminoácidos (por ejemplo, 4-hidroxiprolina).

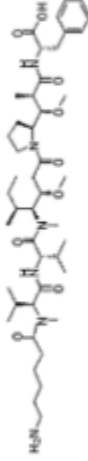
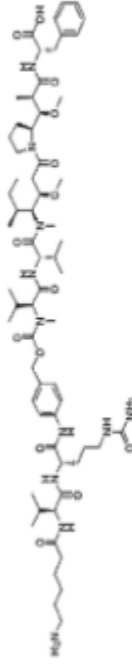
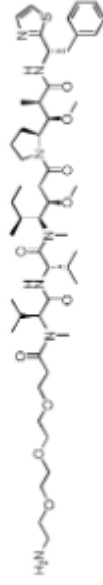
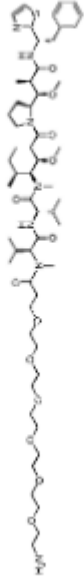

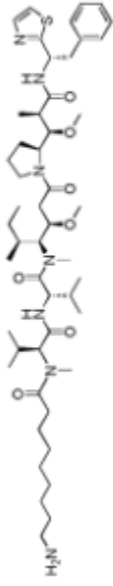
20 En ciertas realizaciones, el agente donante de amina está seleccionado del grupo que consiste en Alexa 488 cadaverina, 5-FITC cadaverina, Alexa 647 cadaverina, Alexa 350 cadaverina, 5-TAMRA cadaverina, 5-FAM cadaverina, SR101 cadaverina, 5,6-TAMRA cadaverina, 5-FAM lisina, Ac-Lys-Gly-MMAD, amino-PEG3-C2-MMAD, amino-PEG6-C2-MAD, amino-PEG3-C2-amino-nonanoil-MMAD, aminocaproil-Val-Cit-PABC-MMAD, Ac-Lys-β-Ala-MMAD, Aminocaproil-MMAD, amino-PEG6-C2-Val-Cit-PABC-MMAD, Ac-Lys-Val-Cit-PABC-MMAD, Ac-Lys-Val-Cit-PABC-0101, amino-PEG3-C2-Val-Cit-PABC-MMAD, amino-PEG3-C2-Val-Cit-PABC-MMAD, amino-PEG6-C2-Val-Cit-PABC-0101, aminocaproil-MMAE, amino-PEG3-C2-MMAE, amino-PEG2-C2-MMAE, aminocaproil-MMAF, aminocaproil-Val-Cit-PABC-MMAE, amino-PEG6-C2-Val-Cit-PABC-MMAF, aminocaproil-Val-Cit-PABC-MMAF, amino-PEG2-C2-MMAF, amino-PEG3-C2-MMAF, putrescinil-geldanamicina, Ac-Lys-putrescinil-geldanamicina, aminocaproil-3377, aminocaproil-0131, aminocaproil-0121, [(3R,5R)-1-{3-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]propanoil}piperidin-3,5-dii]bis-Val-Cit-PA-BC-MMAD, [(3R,5R)-1-{3-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]propanoil}piperidin-3,5-dii]bis-Val-Cit-PABC-MMAE, y 2-aminoetoxi-PEG6-NODAGA (o ácido 2,2'-(7-(1-amino-28-carboxi-25-oxo-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxa-24-azaocacosan-28-il)-1,4,7-triazonano-1,4-dii)diacético). En ciertas divulgaciones, la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina comprende la secuencia de aminoácidos LQGPA (SEQ ID NÚM.:4), LLQGP (SEQ ID NÚM.:5), LLQGPP (SEQ ID NÚM.:11), o de acuerdo con la invención GLLQGPP (SEQ ID NÚM.:13) y de acuerdo con la invención el agente donante de amina es Ac-Lys-Val-Cit-PABC-MMAD, Ac-Lys-Val-Cit-PABC-0101, o amino-PEG6-C2-MMAD. Los ejemplos de estructuras del agente donante de amina son enumerados en la Tabla 1.

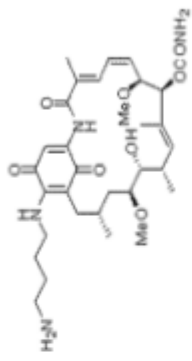
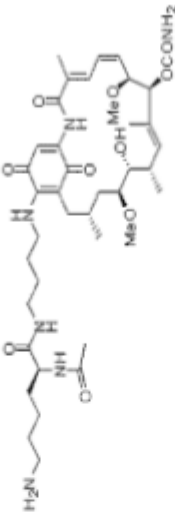
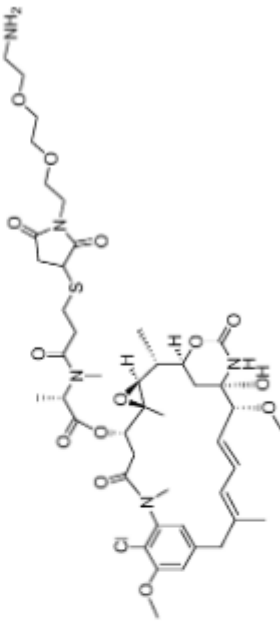
Tabla 1


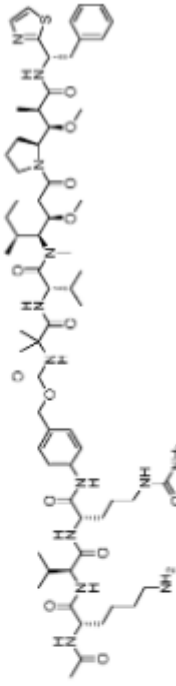
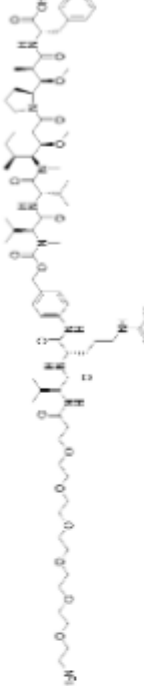
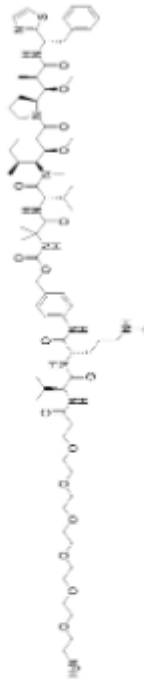
<p>Alexa 488 cadaverina</p>	 <p>The structure shows a fluorescein core with a succinimidyl ester group at the 5-position, which is linked to a cadaverine molecule (6-aminocaproic acid). The fluorescein core has a sulfonate group at the 2-position and a dimethylamino group at the 7-position.</p>
<p>5-FITC cadaverina</p>	 <p>The structure shows a fluorescein core with a succinimidyl ester group at the 5-position, which is linked to a cadaverine molecule. The fluorescein core has a sulfonate group at the 2-position and a hydroxyl group at the 7-position.</p>
<p>Alexa 350 cadaverina</p>	 <p>The structure shows a fluorescein core with a succinimidyl ester group at the 5-position, which is linked to a cadaverine molecule. The fluorescein core has a sulfonate group at the 2-position and a dimethylamino group at the 7-position.</p>
<p>5-TAMRA cadaverina</p>	 <p>The structure shows a fluorescein core with a succinimidyl ester group at the 5-position, which is linked to a cadaverine molecule. The fluorescein core has a sulfonate group at the 2-position and a dimethylamino group at the 7-position.</p>

<p>5-FAM cadaverina</p> 	<p>SR101 cadaverina</p> 
<p>5,6-TAMRA cadaverina</p> 	<p>5-FAM lisina</p> 

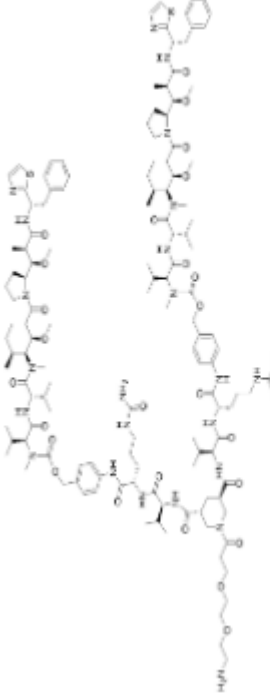
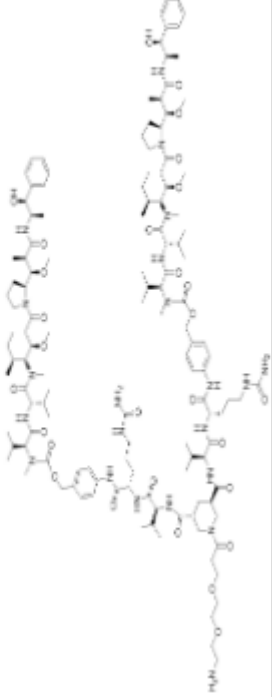
Ac-Lys-Gly-MMAD	 <p>The structure shows a linear peptide chain: Ac-Lys-Gly-MMAD. The N-terminus is an acetylated lysine (Ac-Lys) with a side chain containing a primary amine. It is followed by a glycine (Gly) residue. The C-terminus is a methyl methacrylate (MMA) unit with a methyl ester group and a methacrylate backbone.</p>
Ac-Lys-β-Ala-MMAD	 <p>The structure shows a linear peptide chain: Ac-Lys-β-Ala-MMAD. The N-terminus is an acetylated lysine (Ac-Lys). It is followed by a beta-alanine (β-Ala) residue. The C-terminus is a methyl methacrylate (MMA) unit.</p>
Aminocaproil-MMAD	 <p>The structure shows a linear peptide chain: Aminocaproil-MMAD. The N-terminus is a primary amine (H<sub>2</sub>N) attached to a six-carbon aliphatic chain. The C-terminus is a methyl methacrylate (MMA) unit.</p>
Ac-Lys-Val-Cit-PABC-MMAD	 <p>The structure shows a linear peptide chain: Ac-Lys-Val-Cit-PABC-MMAD. The N-terminus is an acetylated lysine (Ac-Lys). It is followed by valine (Val), citrulline (Cit), and a PABC (poly(2-vinylpyridine)-block-poly(2-dimethylaminoethyl methacrylate)-block-poly(2-ethylhexyl methacrylate)) copolymer. The C-terminus is a methyl methacrylate (MMA) unit.</p>
Aminocaproil-MMAE	 <p>The structure shows a linear peptide chain: Aminocaproil-MMAE. The N-terminus is a primary amine (H<sub>2</sub>N) attached to a six-carbon aliphatic chain. The C-terminus is a methyl methacrylate (MMA) unit with a hydroxyl group on the side chain.</p>
Amino-PEG2-C2-MMAE (o Amino-PEG2-Propionil-MMAE)	 <p>The structure shows a linear peptide chain: Amino-PEG2-C2-MMAE. The N-terminus is a primary amine (H<sub>2</sub>N) attached to a PEG2 chain (two ethylene glycol units). The C-terminus is a methyl methacrylate (MMA) unit with a hydroxyl group on the side chain.</p>
Amino-PEG3-C2-MMAE (o Amino-PEG3-Propionil-MMAE)	 <p>The structure shows a linear peptide chain: Amino-PEG3-C2-MMAE. The N-terminus is a primary amine (H<sub>2</sub>N) attached to a PEG3 chain (three ethylene glycol units). The C-terminus is a methyl methacrylate (MMA) unit with a hydroxyl group on the side chain.</p>

<p>Aminocaproil-MMAF</p>	
<p>Aminocaproil-VaI-Cit-PABC-MMAF</p>	
<p>Amino-PEG3-C2-MMAD (o Amino-PEG3-Propionil-MMAD)</p>	
<p>Amino-PEG6-C2-MMAD (o Amino-PEG6-Propionil-MMAD)</p>	
<p>Amino-PEG3-C2-amino-nonanoil-MMAD (o Amino-PEG3-Propionil-amino-nonanoil-MMAD)</p>	
<p>Amino-nonanoil-MMAD</p>	

<p>Putrescínil-Geldanamicina</p>	 <p>The structure shows a putrescine chain (H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-) attached to the C-7 position of the geldanamycin aglycone. The aglycone features a central pyridone ring with a methoxy group at C-2, a methyl group at C-3, and a methyl group at C-4. A hydroxyl group is at C-5, and a methyl group is at C-6. A methyl group is also attached to the C-8 position of the aglycone.</p>
<p>Ac-Lys-Putrescínil-Geldanamicina</p>	 <p>This structure is similar to Putrescínil-Geldanamicina but includes an acetyl group (CH<sub>3</sub>-CO-) attached to the terminal amino group of the putrescine chain. The aglycone part is identical to the previous structure.</p>
<p>Análogo de Maitansina</p>	 <p>The structure shows a complex molecule with a putrescine chain (H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-) attached to a maitansin-like aglycone. The aglycone features a central pyridone ring with a methoxy group at C-2, a methyl group at C-3, and a methyl group at C-4. A hydroxyl group is at C-5, and a methyl group is at C-6. A methyl group is also attached to the C-8 position of the aglycone. The molecule is further substituted with a chlorine atom, a methoxy group, and a long chain containing a thioether linkage and a terminal primary amine group.</p>

<p>2-aminoethoxi-PEG8-NODAGA</p>	 <p>The structure shows a PEG8 chain (8 repeating units of -CH2-CH2-O-) attached to a NODAGA chelator. The NODAGA core consists of a central nitrogen atom coordinated to two carboxylic acid groups and two secondary amine groups, with a 2-aminoethoxy group attached to one of the nitrogens.</p>
<p>Ac-Lys-Vai-Cit-PABC-0101</p>	 <p>The structure shows a PEG8 chain attached to a PABC chelator. The PABC core consists of a central nitrogen atom coordinated to two carboxylic acid groups and two secondary amine groups, with a 2-aminoethoxy group attached to one of the nitrogens. The PABC is linked to a citrate moiety, which is further linked to a valine (Vai) and a lysine (Lys) residue, which is acetylated (Ac).</p>
<p>Amino-PEG8-C2-Vai-Cit-PABC-MMAF</p>	 <p>The structure shows a PEG8 chain attached to a PABC chelator. The PABC core consists of a central nitrogen atom coordinated to two carboxylic acid groups and two secondary amine groups, with a 2-aminoethoxy group attached to one of the nitrogens. The PABC is linked to a citrate moiety, which is further linked to a valine (Vai) and a lysine (Lys) residue, which is acetylated (Ac). The PABC is also linked to a MMAF moiety.</p>
<p>Amino-PEG8-C2-Vai-Cit-PABC-0101</p>	 <p>The structure shows a PEG8 chain attached to a PABC chelator. The PABC core consists of a central nitrogen atom coordinated to two carboxylic acid groups and two secondary amine groups, with a 2-aminoethoxy group attached to one of the nitrogens. The PABC is linked to a citrate moiety, which is further linked to a valine (Vai) and a lysine (Lys) residue, which is acetylated (Ac).</p>



<p>[(3R, 5R)-1-[3-[2-[2-(2-aminoethoxy)-ethoxy]propanoyl]piperidin-3,5-diyl]bis-Val-Cit-PABC-MMAD</p>	 <p>The chemical structure shows a central piperidine ring substituted at the 3 and 5 positions with two identical bis-valine-citrate units. Each unit consists of a valine residue linked to a citrate moiety, which is further connected to a propanoic acid chain. This chain is substituted with a 2-aminoethoxy group and a 2-(2-aminoethoxy)ethoxy group. The piperidine ring also has a 2-(2-aminoethoxy)ethoxy group attached to its nitrogen atom.</p>
<p>[(3R, 5R)-1-[3-[2-[2-(2-aminoethoxy)-ethoxy]propanoyl]piperidin-3,5-diyl]bis-Val-Cit-PABC-MMAE</p>	 <p>The chemical structure is identical to the one above, but the terminal amino group of the propanoic acid chain is methylated, forming a methylammonium cation (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>Me).</p>

La presente divulgación proporciona un conjugado de polipéptido de toxina manipulado que comprende la fórmula: (polipéptido de toxina)-T-A, en el que T es una etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina manipulada en un sitio específico, en el que A es un agente donante de amina, en el que el agente donante de amina es un polímero biocompatible que comprende una amina reactiva, en el que el polímero biocompatible está conjugado de manera sitio específica a la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina en un extremo terminal carboxilo, un extremo amino terminal, o en otro parte en otro sitio del polipéptido de toxina, y en el que la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina comprende una secuencia de aminoácidos LLQGPX, en el que X es A o P (SEQ ID NÚM.:14), o GLLQGPP (SEQ ID NÚM.:13). Por ejemplo, el polipéptido de toxina también se puede conjugar de manera sitio específica al polímero biocompatible por medio de la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina como se describe en la presente memoria para mejorar las características biológicas del polipéptido de toxina, por ejemplo, para aumentar la vida media y bioactividad en suero, y/o para extender su vida media *in vivo*. En ciertas divulgaciones, el polipéptido de toxina es una ceratotoxina o una conotoxina (por ejemplo, KIIIA o SmlIIa). En ciertas divulgaciones, el polímero biocompatible es un polímero soluble en agua tal como derivado de PEG o un polímero biocompatible que contiene zwitterión.

### **Procedimientos de fabricación de los conjugados de polipéptidos manipulados**

Los procedimientos de fabricación de los conjugados de polipéptidos manipulados descritos en la presente memoria también son proporcionados en la presente invención. En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento de preparación de un conjugado de polipéptido manipulado que comprende la fórmula: polipéptido-T-A, en el que T es una etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina manipulada en un sitio específico, en el que A es un agente donante de amina, y en el que el agente donante de amina está conjugado de manera sitio específica a la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina en un extremo terminal carboxilo, o como se describe un extremo amino terminal, o en otro lugar en otro sitio en el polipéptido, y en el que la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con La presente divulgación LLQGPX, en el que X es A o P (SEQ ID NÚM.:14), o de acuerdo con la invención GLLQGPP (SEQ ID NÚM.:13), que comprende las etapas de: a) proporcionar una molécula de polipéptido T manipulado que comprende el polipéptido y la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina; b) poner en contacto el agente donante de amina con la molécula de polipéptido-T manipulada en presencia de una transglutaminasa; y c) dejar el polipéptido-T manipulado que se una de modo covalente al agente donante de amina para formar el conjugado de polipéptido manipulado. En ciertas realizaciones, el polipéptido es un polipéptido que contiene Fc o que contiene Fab, o un anticuerpo. En ciertas realizaciones, la molécula de polipéptido-T manipulada es expresada en células CHO.

La presente divulgación proporciona un procedimiento para preparar un conjugado de polipéptido que contiene Fc manipulado que comprende la fórmula: (polipéptido que contiene Fc)-T-A, en el que T es una etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina manipulada en un sitio específico; en el que A es un agente donante de amina; y en el que el agente donante de amina está conjugado de manera sitio específica a la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina en un extremo terminal carboxilo, o de acuerdo con La presente divulgación un extremo amino terminal, o en otra parte en otro sitio en el polipéptido que contiene Fc, en el que la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina comprende una secuencia de aminoácidos XXQX (SEQ ID NÚM.: 35), en el que X es cualquier aminoácido (por ejemplo, X puede ser el mismo o diferente aminoácido), y en el que el conjugado de polipéptido que contiene Fc manipulado comprende una sustitución de aminoácidos de glutamina a asparagina en la posición 295 (por ejemplo, Q295N; esquema de numeración EU), que comprende las etapas de: a) proporcionar una molécula T (polipéptido que contiene Fc) manipulado que comprende el polipéptido que contiene Fc y la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina; b) poner en contacto el agente donante de amina con la molécula T (polipéptido que contiene Fc) manipulado en presencia de una transglutaminasa; y c) dejar que el T (polipéptido que contiene Fc) manipulado se una de manera covalente al agente donante de amina para formar el conjugado de polipéptido que contiene Fc manipulado. En ciertas realizaciones, el T (polipéptido que contiene Fc) manipulado es expresado en células CHO. En ciertas divulgaciones, la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en LLQGG (SEQ ID NÚM.:16), LLQG (SEQ ID NÚM.:17), LSLSQG (SEQ ID NÚM.:18), GGGLLQGG (SEQ ID NÚM.:19), GLLQG (SEQ ID NÚM.:20), LLQ, GSPLAQSHGG (SEQ ID NÚM.:21), GLLQGGG (SEQ ID NÚM.:22), GLLQGG (SEQ ID NÚM.:23), GLLQ (SEQ ID NÚM.:24), LLQLLQGA (SEQ ID NÚM.:25), LLQGA (SEQ ID NÚM.:26), LLQYQGA (SEQ ID NÚM.:27), LLQGSG (SEQ ID NÚM.:28), LLQYQG (SEQ ID NÚM.:29), LLQLLQG (SEQ ID NÚM.:30), SLLQG (SEQ ID NÚM.:31), LLQLQ (SEQ ID NÚM.:32), LLQLLQ (SEQ ID NÚM.:33), LLQGR (SEQ ID NÚM.:34), LLQGPP (SEQ ID NÚM.:11), LLQGPA (SEQ ID NÚM.:4), GLLQGPP (SEQ ID NÚM.:13), GLLQGA (SEQ ID NÚM.:12), LLQGA (SEQ ID NÚM.:1), LLQGPGK (SEQ ID NÚM.:2), LLQGPG (SEQ ID NÚM.:3), LLQGP (SEQ ID NÚM.:5), LLQP (SEQ ID NÚM.:6), LLQPGK (SEQ ID NÚM.:7), LLQAPGK (SEQ ID NÚM.:8), LLQGAPG (SEQ ID NÚM.:9), and LLQGAP (SEQ ID NÚM.: 10). En ciertas divulgaciones, la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina comprende una secuencia de aminoácidos LLQGPA (SEQ ID NÚM.:4), LLQGP (SEQ ID NÚM.:5), LLQGPP (SEQ ID NÚM.:11), o GLLQGPP (SEQ ID NÚM.:13).

En ciertas realizaciones, el conjugado de polipéptido manipulado preparado usando los procedimientos descritos en la presente memoria tiene una eficiencia de conjugación de al menos aproximadamente 51%. En ciertas divulgaciones, el conjugado de polipéptido manipulado tiene eficiencia de conjugación de al menos aproximadamente cualquiera de 51%-60%, 61%-70%, 71%-80%, 81%-90%, o 91%-100%. En ciertas divulgaciones, el conjugado de polipéptido

manipulado tiene eficiencia de conjugación de aproximadamente cualquiera de 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, o 100%. Por ejemplo, el polipéptido manipulado (por ejemplo, polipéptido que contiene Fc) que comprende la mutación Q295N (esquema de numeración EU) tiene eficiencia de conjugación de al menos aproximadamente 99.8%.

5 En ciertas divulgaciones, la relación de concentración entre el agente donante de amina en contacto y la molécula de polipéptido-T manipulada en contacto es de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 800:1. Por ejemplo, la relación de concentración entre el agente donante de amina (por ejemplo, un fármaco citotóxico) y el polipéptido manipulado unido a una etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina cargada o usada para la reacción de conjugación catalizada por transglutaminasa puede ser de aproximadamente 20:1. En ciertas divulgaciones, la relación de  
10 concentración entre el agente donante de amina en contacto y la molécula de polipéptido T manipulado en contacto es aproximadamente cualquiera de 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1, 60:1, 70:1, 80:1, 90:1, 100:1, 200:1, 300:1, 400:1, 500:1, 600:1, 700:1, o 800:1.

En ciertas divulgaciones, cuando un polipéptido (por ejemplo, anticuerpo) está conjugado con un agente donante de amina por medio de una etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina en un sitio específico (por ejemplo, extremo terminal C), el conjugado de anticuerpo-fármaco es más estable (por ejemplo, vida media *in vivo* más prolongada). Por consiguiente, en ciertas divulgaciones, el conjugado de polipéptido manipulado como se describe en la presente memoria está presente en un sujeto (por ejemplo, un mamífero) al menos aproximadamente 50% después de al menos aproximadamente 1 día *in vivo*. Por ejemplo, el conjugado de polipéptido manipulado está presente en un sujeto en al menos aproximadamente cualquiera de 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%,  
15 20 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% después de al menos aproximadamente cualquiera de 2 horas, 2-6 horas, 6-12 horas, 12-18 horas, 18-24 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, o 2 semanas *in vivo*.

En ciertas divulgaciones, los procedimientos proporcionados en la presente memoria comprenden además una etapa de purificación. Los conjugados de polipéptidos que contienen Fc manipulados descritos en la presente memoria se pueden purificar usando diversos procedimientos de purificación, tales como, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita; diálisis; cromatografía de afinidad; cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) (por ejemplo, fraccionamiento en un HIC); precipitación con sulfato de amonio; precipitación con polietilenglicol o derivado de polietilenglicol, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico; HPLC de fase inversa; cromatografía sobre sílice; cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de partición débil.  
25

30 En ciertas divulgaciones, al menos una etapa de purificación comprende una etapa del procedimiento de cromatografía de afinidad. El ligando de proteína A (sintético, recombinante o nativo) se puede usar para purificar por afinidad los conjugados de polipéptidos que contienen Fc manipulados en la presente memoria. El ligando de proteína A sintético o recombinante se puede comprar en el comercio en GE Healthcare (Piscataway, NJ), Pierce (Rockford, IL), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), o Applied Biosystems (Foster City, CA), y el ligando de Proteína A nativo (por ejemplo, MABSELECT™, PROSEP™ Va, y PROSEP™ Ultra Plus) se puede adquirir en comercio de GE Healthcare (Piscataway, NJ) o Millipore (Billerica, MA).  
35

En ciertas divulgaciones, el conjugado de polipéptido que contiene Fc manipulado purificado, el conjugado de polipéptido que contiene Fc manipulado purificado, o los conjugados de polipéptidos de toxina purificados resultantes de la etapa de purificación es altamente puro, es decir, al menos aproximadamente cualquier de 70%-75%, 75%-80%, 80%-85%, 85%-90%, 90%-95%, 95%-98%, o 99% puro. Por ejemplo, el conjugado de polipéptido manipulado purificado es aproximadamente cualquiera de 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% puro.  
40

### **Procedimientos de uso de los conjugados de polipéptidos manipulados**

45 Los conjugados de polipéptidos manipulados de la presente invención son útiles en diversas aplicaciones que incluyen, pero sin limitación, procedimientos de tratamiento terapéutico y los procedimientos de tratamiento de diagnóstico descritos.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para tratar un cáncer en un sujeto. Por consiguiente, en algunos casos, se proporciona un procedimiento para tratar un cáncer en un individuo necesitado de dicho tratamiento que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición (por ejemplo, composición farmacéutica) que comprende los conjugados de polipéptidos manipulados como se describe en la presente memoria. Como se usa en la presente memoria, los cánceres incluyen, pero sin limitación, un cáncer sólido (tal como cáncer de vejiga, mama, cuello uterino, coriocarcinoma, colon, esófago, gástrico, glioblastoma, cabeza y cuello, riñón, hígado, pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), oral, ovario, páncreas, próstata y piel); y un cáncer líquido (tal como leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mielógena aguda (AML), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia de células pilosas (HCL), leucemia prolinfocítica de células T (T-PLL), leucemia linfocítica granular grande y leucemia de células T adultas).  
50 55

En algunos casos, es proporcionado un procedimiento de inhibición del crecimiento o la progresión tumoral en un individuo necesitado de dicho tratamiento, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una

composición que comprende los conjugados de polipéptidos manipulados como se describe en la presente memoria. En otras realizaciones, es proporcionado un procedimiento de inhibición de la metástasis de células cancerosas o tumores (por ejemplo, tumores sólidos o líquidos) en un individuo necesitado de dicho tratamiento, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende los conjugados de polipéptidos manipulados como se describe en la presente memoria. En otros casos, es proporcionado un procedimiento de inducción de la regresión tumoral en un individuo necesitado de dicho tratamiento, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende los conjugados de polipéptidos manipulados como se describe en la presente memoria.

En otro caso, es proporcionado un procedimiento de detección, diagnóstico y/o control de una afección asociada con una proteína relacionada con el cáncer (por ejemplo, Trop-2, BRCA1, BRCA2, HER2, VEGF, CD20, CD25, EFGR, 5T4, CD22, etc.) *in vivo* o *in vitro*. Por consiguiente, en algunos casos, se proporciona un procedimiento para diagnosticar cáncer en un individuo que se sospecha que sufre de cáncer, que comprende a) poner en contacto una muestra del sujeto con los conjugados de polipéptidos manipulados como se describe en la presente memoria en condiciones que dan como resultado la unión de los conjugados de polipéptidos manipulados con una proteína relacionada con el cáncer, y b) determinar la unión de los conjugados de polipéptidos manipulados a la proteína relacionada con el cáncer.

El resto de agente en los conjugados de polipéptidos manipulados como se describe en la presente memoria puede ser un resto detectable tal como un agente para imágenes y una marca de sustrato enzimático. Los conjugados de polipéptidos manipulados como se describe en la presente memoria también pueden ser usados para ensayos de diagnóstico *in vivo*, tales como exámenes de imágenes *in vivo* (por ejemplo, PET o SPECT), o un reactivo de tinción.

En algunos casos, los procedimientos descritos en la presente memoria comprenden además una etapa de tratar a un sujeto con una forma adicional de terapia. En algunos casos, la forma adicional de terapia es una terapia anticáncer adicional que incluye, pero sin limitación, quimioterapia, radiación, cirugía, terapia hormonal y/o inmunoterapia adicional.

En ciertos casos, la forma adicional de terapia comprende administrar uno o más agentes terapéuticos además de los conjugados de polipéptidos manipulados como se describe en la presente memoria. Los agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, un conjugado de anticuerpo-fármaco (por ejemplo, Brentuximab vedotina (ADCETRIS®) y adotrastuzumab emtansina (KAD-CYLA®)), un anticuerpo (por ejemplo, Un anticuerpo anti-VEGF, un anticuerpo anti-HER2, anticuerpo anti-CD25 y/o un anticuerpo anti-CD20), un inhibidor de la angiogénesis, un agente citotóxico (por ejemplo, docetaxel, cisplatino, doxorubicina, mitomicina, tamoxifeno o fluorouracilo) y un agente antiinflamatorio (por ejemplo, prednisona y progesterona).

### **Composiciones farmacéuticas**

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende los conjugados de polipéptidos manipulados como se describe en la presente memoria en un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable. De acuerdo con La presente divulgación los conjugados de polipéptidos manipulados se pueden administrar solos o en combinación con uno o más de otros conjugados de polipéptidos manipulados de la invención o en combinación con uno o más de otros fármacos (o como cualquiera de sus combinaciones). Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas, los procedimientos y los usos de La presente divulgación también abarcan divulgaciones de combinaciones (coadministración) con otros agentes activos, como se detalla a continuación.

Como se usa en la presente memoria, el término "coadministración", "coadministrado" o "en combinación con" pretende significar y hace referencia a lo siguiente: (i) administración simultánea de una combinación de un conjugado de polipéptido manipulado descrito en la presente memoria y un agente terapéutico a un paciente que necesita tratamiento, cuando dichos componentes se formulan juntos en una forma de dosis única que libera dichos componentes sustancialmente al mismo tiempo a dicho paciente; (ii) administración sustancialmente simultánea de dicha combinación de un conjugado de polipéptido manipulado descrito en la presente memoria y agentes terapéuticos a un paciente que necesita tratamiento, cuando dichos componentes se formulan separados entre sí en formas de dosis separadas que son tomadas prácticamente al mismo tiempo por dicho paciente, después de lo cual dichos componentes se liberan sustancialmente al mismo tiempo en dicho paciente; (iii) administración secuencial de dicha combinación de un conjugado de polipéptido manipulado descrito en la presente memoria y agente terapéutico a un paciente que necesita tratamiento, cuando dichos componentes se formulan separados entre sí en formas de dosis separadas que son tomadas en tiempos consecutivos por dicho paciente con un intervalo de tiempo significativo entre cada administración, después de lo cual dichos componentes se liberan en tiempos sustancialmente diferentes en dicho paciente; y (iv) la administración secuencial de dicha combinación de un conjugado de polipéptido manipulado descrito en la presente memoria y agentes terapéuticos a un paciente que necesita tratamiento, cuando dichos componentes se formulan juntos en una forma de dosis única que libera dichos componentes de manera controlada después de lo cual se liberan de manera concurrente, consecutiva y/o superpuesta en el mismo momento y/o en diferentes momentos en dicho paciente, en el que cada parte puede ser administrada por la misma vía o por una vía diferente.

Generalmente, los conjugados de polipéptidos manipulados descritos en la presente memoria son adecuados para

administrarse como una formulación en asociación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. El término "excipiente" se usa en la presente memoria para describir cualquier ingrediente que no sea el compuesto de la invención. La selección de los excipientes depende en gran medida de factores tal como el modo particular de administración, el efecto del excipiente sobre la solubilidad y estabilidad, y la naturaleza de la forma de dosis. Como se usa en la presente memoria, "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Algunos ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables son agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En ciertas divulgaciones, se incluyen agentes isotónicos, que incluyen, pero sin limitación, azúcares, polialcoholes (por ejemplo, manitol, sorbitol) o cloruro de sodio en la composición farmacéutica. Los ejemplos adicionales de sustancias farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, agentes humectantes o cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que mejoran la vida útil o la efectividad del anticuerpo.

En ciertas divulgaciones, los conjugados de polipéptidos manipulados descritos en la presente memoria se pueden desinmunizar para reducir la inmunogenicidad después de la administración a un sujeto usando técnicas conocidas tal como las descritas, por ejemplo, en la publicación PCT WO98/52976 y WO00/34317.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención y los procedimientos para su preparación son fácilmente evidentes para los expertos en la técnica. Tales composiciones y procedimientos para su preparación pueden ser hallados, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 22° ed. (Mack Publishing Company, 2012). Las composiciones farmacéuticas se fabrican preferentemente en condiciones de GMP.

Una composición farmacéutica de la presente divulgación puede ser preparada, empacada o comercializada a granel, como una dosis unitaria única, o como una pluralidad de dosis unitarias únicas. Como se usa en la presente memoria, una "dosis unitaria" es una cantidad discreta de la composición farmacéutica que comprende una cantidad predeterminada del ingrediente activo. La cantidad del ingrediente activo es generalmente igual a la dosis del ingrediente activo que se puede administrar a un sujeto o una fracción conveniente de dicha dosis tal como, por ejemplo, la mitad o un tercio de dicha dosis. Cualquier procedimiento para administrar péptidos, proteínas o anticuerpos aceptados en la técnica se puede emplear adecuadamente para los conjugados de los conjugados de polipéptidos manipulados descritos en la presente memoria.

Las composiciones farmacéuticas de la invención son típicamente adecuadas para administración parenteral. La administración parenteral de una composición farmacéutica incluye cualquier vía de administración caracterizada por la ruptura física de un tejido de un sujeto y la administración de la composición farmacéutica a través de la ruptura en el tejido, en consecuencia generalmente produce la administración directa en el torrente sanguíneo, en el músculo o en un órgano interno. Por ejemplo, la administración parenteral incluye, pero sin limitación, la administración de una composición farmacéutica mediante inyección de la composición, mediante la aplicación de la composición a través de una incisión quirúrgica, mediante la aplicación de la composición a través de una herida no quirúrgica que penetra en el tejido, y similares. En particular, es contemplado que la administración parenteral incluye, pero sin limitación, inyección o infusión subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intraesternal, intravenosa, intraarterial, intratecal, intraventricular, intrauretral, intracraneal, intrasinovial; y técnicas de infusión dialítica renal. En ciertas divulgaciones, la administración parenteral es la vía intravenosa o subcutánea.

Las formulaciones de una composición farmacéutica adecuada para administración parenteral generalmente comprenden el ingrediente activo combinado con un portador farmacéuticamente aceptable, tal como agua estéril o solución salina isotónica estéril. Dichas formulaciones se pueden preparar, envasar o vender en una forma adecuada para administración en bolo o para administración continua. Las formulaciones inyectables se pueden preparar, envasar o vender en forma de dosis unitaria, tal como en ampollas o en envases multidosis que contienen un conservante. Las formulaciones para administración parenteral incluyen, pero sin limitación, suspensiones, soluciones, emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, pastas y similares. Dichas formulaciones pueden comprender además uno o más ingredientes adicionales que incluyen, pero sin limitación, agentes de suspensión, estabilizantes o dispersantes. En una descripción de una formulación para administración parenteral, el ingrediente activo se proporciona en forma seca (es decir, en polvo o granular) para la reconstitución con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua libre de pirógenos estéril) antes de la administración parenteral de la composición reconstituida. Las formulaciones parenterales también incluyen soluciones acuosas que pueden contener excipientes tales como sales, carbohidratos y agentes tampón (preferentemente a un pH de 3 a 9), pero, para algunas aplicaciones, se pueden formular más adecuadamente como una solución no acuosa estéril o como una forma seca para usar junto con un vehículo adecuado tal como agua libre de pirógenos estéril. Los ejemplos de formas de administración parenteral incluyen soluciones o suspensiones en soluciones acuosas estériles, por ejemplo, soluciones acuosas de propilenglicol o dextrosa. Dichas formas de dosis se pueden tamponar adecuadamente, si se desea. Otras formulaciones administrables por vía parenteral que son útiles incluyen las que comprenden el ingrediente activo en forma microcristalina, o en una preparación liposómica. Las formulaciones para administración parenteral se pueden formular para ser de liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen formulaciones de liberación controlada, retrasada, sostenida, pulsada, dirigida y programada. Por ejemplo, en un aspecto, las soluciones inyectables estériles se pueden preparar mediante la incorporación del polipéptido que contiene Fc manipulado, por ejemplo, conjugado anticuerpo-fármaco o anticuerpo biespecífico, en la cantidad requerida en un

disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son el secado al vacío y la liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución filtrada previamente estéril del mismo. La fluidez apropiada de una solución se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede producir mediante la inclusión en la composición de un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Los regímenes de dosis pueden ser ajustados para proporcionar la respuesta óptima deseada. Por ejemplo, se puede administrar un bolo único, se pueden administrar varias dosis divididas con el tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosis para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de la unidad de dosis, como se usa en la presente memoria, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los pacientes/sujetos para tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. De acuerdo con la divulgación, la especificación para las formas de unidad de dosis de la invención generalmente está dictada por y depende directamente de (a) las características únicas del resto de agente (por ejemplo, moléculas pequeñas tales como el agente citotóxico) y el efecto terapéutico o profiláctico particular para obtener, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de combinar dicho compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

Por lo tanto, el experto en la técnica puede apreciar, sobre la base de la presente divulgación proporcionada en la presente memoria, que la dosis y el régimen de dosis se ajustan de acuerdo con procedimientos bien conocidos en las técnicas terapéuticas. Es decir, la dosis máxima tolerable se puede establecer fácilmente, y también se puede determinar la cantidad eficaz que proporciona un beneficio terapéutico detectable a un paciente, al igual que los requerimientos temporales para administrar cada agente para proporcionar un beneficio terapéutico detectable al paciente. Por consiguiente, aunque se ejemplifican ciertos regímenes de dosis y administración en la presente memoria, estos ejemplos de ninguna manera limitan la dosis y el régimen de administración que se pueden proporcionar a un paciente en la práctica de la presente divulgación.

Cabe señalar que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y la gravedad de la afección para aliviar, y pueden incluir dosis únicas o múltiples. Se debe entender además que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosis específicos se deben ajustar con el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación establecidos en la presente memoria son solo ejemplos y no están destinados a limitar el alcance o la práctica de la composición divulgada. Además, el régimen de dosificación con las composiciones de esta divulgación se puede basar en una variedad de factores, que incluyen el tipo de enfermedad, la edad, peso, sexo, afección médica del paciente, la gravedad de la afección, la vía de administración, y el anticuerpo particular empleado. Por lo tanto, el régimen de dosificación puede variar ampliamente, pero se puede determinar rutinariamente usando procedimientos estándares. Por ejemplo, las dosis se pueden ajustar en función de parámetros farmacocinéticos o farmacodinámicos, que pueden incluir efectos clínicos tales como efectos tóxicos y/o valores de laboratorio. Por lo tanto, la presente divulgación abarca el escalado de dosis intrapaciente según sea determinado por el profesional experto. La determinación de las dosis y los regímenes apropiados son bien conocidos en la técnica relevante y se entenderá que están abarcados por el experto en la materia una vez que se hayan proporcionado las enseñanzas descritas en la presente memoria.

Para la administración a sujetos humanos, la dosis mensual total de un conjugado de polipéptido manipulado descrito en la presente memoria está típicamente en el intervalo de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 1200 mg por paciente, de acuerdo, obviamente, del modo de administración. Por ejemplo, una dosis mensual intravenosa puede requerir aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 mg/paciente. La dosis mensual total se puede administrar en dosis únicas o divididas y, a criterio del médico, puede estar fuera del intervalo típico indicado en la presente memoria.

Un ejemplo de intervalo no limitante, para una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un conjugado de polipéptido manipulado, por ejemplo, un conjugado de polipéptido que contiene Fc, conjugado de polipéptido que contiene Fab, conjugado de anticuerpo o conjugado de polipéptido de toxina, descrito en la presente memoria es aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1000 mg/paciente/mes. En ciertas divulgaciones, el conjugado de polipéptido que contiene Fc manipulado se puede administrar a aproximadamente 1 a aproximadamente 200 o de aproximadamente 1 a aproximadamente 150 mg/paciente/mes. En ciertas divulgaciones, el paciente es humano.

### **Kits**

La presente divulgación también proporciona kits (o artículos de fabricación) para uso en el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. Los kits de la presente divulgación incluyen uno o más empaques que comprenden un conjugado de polipéptido manipulado purificado e instrucciones para uso del conjugado para tratar una enfermedad. Por ejemplo, las instrucciones comprenden una descripción de la administración del polipéptido manipulado para tratar

una enfermedad, tal como cáncer (por ejemplo, cáncer de colon, esofágico, gástrico, de cabeza y cuello, pulmón, ovario o pancreático). El kit puede comprender además una descripción de seleccionar un individuo adecuado para el tratamiento basado en identificar si ese individuo tiene la enfermedad y la etapa de la enfermedad.

- 5 Las instrucciones relacionadas con el uso del conjugado de polipéptido manipulado generalmente incluyen información en cuanto a la dosis, esquema de dosificación y vía de administración para el tratamiento deseado. Los empaques pueden ser dosis unitarias, paquetes a granel (por ejemplo, paquetes multidosis) o dosis subunitarias. Las instrucciones suministradas en los kits de la presente divulgación son típicamente instrucciones escritas en una etiqueta o prospecto (por ejemplo, una hoja de papel incluida en el kit), pero las instrucciones legibles por máquina (por ejemplo, instrucciones llevadas en un disco de almacenamiento magnético u óptico) también son aceptables.
- 10 Los kits de esta divulgación están en un envase adecuado. El envase adecuado incluye, incluye, pero sin limitación, viales, botellas, frascos, envase flexible (por ejemplo, bolsas Mylar o plástico selladas) y similares. También se contemplan paquetes para usar en combinación con un dispositivo específico, tal como un inhalador, dispositivo de administración nasal (por ejemplo, un atomizador) o un dispositivo de infusión tal como una minibomba. Un kit puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). El envase también puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un polipéptido manipulado como se describe en la presente memoria. El empaque también puede comprender un segundo agente farmacéuticamente activo.
- 15
- 20 Los kits pueden proporcionar opcionalmente componentes adicionales tal como tampón e información interpretativa. Normalmente, el kit comprende un empaque y una etiqueta o prospecto en o asociado con el empaque.

### Ejemplos

#### **Ejemplo 1: Proteólisis de la etiqueta TG6 de cadena pesada de extremo terminal C durante la expresión de CHO**

- 25 El recorte de los últimos dos aminoácidos (-GA) de una etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina (por ejemplo, etiqueta TG6 (LLQGA (SEQ ID NÚM.: 1)) se observó cuando la etiqueta TG6 se colocó en el extremo terminal C de una cadena pesada del anticuerpo (por ejemplo, mAb1, que es un anticuerpo anti-Trop2 como se usa en todos los ejemplos descritos en la presente memoria). En condiciones de expresión analizadas, se encontró que 10-90% de la etiqueta TG6 estaba proteolizada. Este recorte C-terminal parece específico para células CHO, ya que no se observó durante la expresión de Ab-TG6 en células HEK293. Cuando se perdió el -GA de la etiqueta, no se observó conjugación de una carga útil deseada (por ejemplo, fármaco o resto de agente) al anticuerpo en la etiqueta TG6 recortada (es decir, LLQ) en el extremo terminal C del anticuerpo.
- 30

- Es creado un nuevo conjunto de etiquetas que contienen glutamina donante de acilo al final del extremo terminal C de un anticuerpo (por ejemplo, mAb1) para evitar el recorte observado. Las etiquetas TG (transglutaminasa) TG7-TG17 (SEQ ID NOS: 2-11; Tabla 1) se diseñaron para contener prolina para minimizar la proteólisis. Las etiquetas de nuevo diseño se expresaron por primera vez en células HEK293 y se analizaron para determinar homogeneidad y conjugabilidad por HIC (cromatografía de interacción hidrófoba) y espectrometría de masas como se describe por Strop *et al.* Chem Biol., 20 (2): 161-7 (2013). A diferencia de TG6, las etiquetas TG (por ejemplo, TG11 y TG12) que contenían prolina en el extremo terminal C a la glutamina reactiva no mostraron conjugación con el conector y la carga útil deseada (por ejemplo, AcLys-VC-PABC-0101 (AcLys-VC-PABC es acetil-lisina-valina-citulina-p-aminobenziloxicarbonilo, y 0101 es 2-metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[[[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino]propil]piperidina-1-il]-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida)). Las etiquetas TG restantes se conjugaron con alta eficiencia. Se observó cierta heterogeneidad C-terminal para TG7, TG8 y TG12-15.
- 35
- 40

- 45 Las etiquetas TG TG9, TG10 y TG17, que parecían homogéneas en HEK293, se expresaron en células CHO para probar si se puede producir un recorte C-terminal. La expresión de TG10 (terminada en -LLQGP (SEQ ID NÚM.: 5)) en células CHO mostró un recorte de 11% de -GP. Las dos etiquetas restantes (TG9 y TG17) no mostraron ningún recorte C-terminal en la misma condición en la que se observó un recorte de alrededor de ~ 33,6% en la etiqueta TG6. Figuras 1A-1D. En consecuencia, estos resultados demuestran que las etiquetas TG9 y TG17 evitan la proteólisis en el extremo terminal C de la cadena pesada de un anticuerpo cuando se expresa en células CHO.
- 50

Tabla 1

Nombre	Secuencia
TG6	LLQGA (SEQ ID NÚM.:1)
TG7	LLQGPGK (SEQ ID NÚM.:2)
TG8	LLQGPG (SEQ ID NÚM.:3)
TG9	LLQGP A (SEQ ID NÚM.:4)
TG10	LLQGP (SEQ ID NÚM.:5)
TG11	LLQP (SEQ ID NÚM.:6)
TG12	LLQPGK (SEQ ID NÚM.:7)
TG14	LLQGAPGK (SEQ ID NÚM.:8)
TG15	LLQGAPG (SEQ ID NÚM.:9)
TG16	LLQGAP (SEQ ID NÚM.:10)
TG17	LLQGPP (SEQ ID NÚM.:11)

### Ejemplo 2: Proteólisis de la etiqueta LCQ04 de la cadena ligera de extremo terminal C durante la expresión de CHO

5 También se observó el recorte de los últimos dos aminoácidos (-GA) de la etiqueta LCQ04 (GLLQGA (SEQ ID NÚM.: 12)) cuando la etiqueta LCQ04 se colocó en el extremo terminal C de la cadena ligera de un anticuerpo que tiene la mutación K222R (esquema de numeración EU), aunque en un grado mucho menor que en la cadena pesada del anticuerpo. Este recorte C-terminal parece específico de las células CHO, ya que no se observó durante la expresión de HEK293. En las condiciones de expresión analizadas, se encontró que aproximadamente el 5% de la etiqueta LCQ04 estaba proteolizada.

10 La etiqueta LCQ05 (GLLQGPP (SEQ ID NÚM.: 13)) se creó con dos prolina similares a la etiqueta TG17 descrita anteriormente. La etiqueta TG LCQ05 parecía homogénea cuando se expresó tanto en células CHO como en HEK293 y se pudo conjugarse con la carga útil del conector deseada (por ejemplo, AcLys-VC-PABC-0101) a niveles comparables como LCQ04. Figuras 2A-2B. En consecuencia, estos resultados demuestran que la etiqueta LCQ05 previene la proteólisis en el extremo terminal C de la cadena ligera de un anticuerpo cuando es expresado en células CHO.

### Ejemplo 3: Comparación biofísica y de eficacia de las etiquetas TG6 y TG17

15 Las nuevas etiquetas que contienen glutamina donante de acilo se validaron mediante la comparación de las características biofísicas de la etiqueta TG6 y la etiqueta TG17 no conjugadas y conjugadas. Más específicamente, la cromatografía analítica de exclusión por tamaño (SEC) mostró un nivel bajo de agregados similar, y la eficiencia de conjugación fue comparable en las mismas condiciones. Figuras 3A-3B. En SEC, se inyectaron aproximadamente 15 µg de muestras (anticuerpo-TG6 y anticuerpo-TG17, o anticuerpo-TG6-AcLys-VC-PABC-0101 y anticuerpo-TG6-AcLys-VC-PABC-0101) en un TSKGEL® G3000SW (Columna de cromatografía de exclusión por tamaño Tosoh Bioscience LLC, King of Prussia, PA) en un HPLC Agilent HP 1100 (Santa Clara, CA) y se corrió a 0,5 ml/min con la fase móvil (KPi 170 mM; KCl; isopropanol 15%). Las muestras también se aplicaron a la columna HIC (Cromatografía de Interacción Hidrofóbica) y mostraron una DAR (relación de anticuerpo y fármaco) similar para las etiquetas TG6 y TG17, así como en espectrometría de masas. Figuras 4A-4B y 5A-5B. Para HIC, se cargaron 20 µg de conjugado de fármaco y anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo que lleva etiqueta TG6 o TG17 y conjugado con AcLys-VC-PABC-0101) en sulfato de amonio 0,75 M en una columna TSKGEL® Butyl-NPR (Tosoh Bioscience, King of Prussia, PA) en un HPLC Agilent HP 1100 (Santa Clara, CA). El tampón de fase móvil A fue sulfato de amonio 1,5 M y fosfato de potasio 50 mM a pH = 7,0; el tampón B fue fosfato de potasio 50 mM e isopropanol 20% a pH = 7,0. La corrida se realizó a 0,8 ml/min con un gradiente lineal de 35 minutos 0-100% B. Para la espectrometría de masas (MS), antes del análisis de cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC/MS), los conjugados de anticuerpo-fármaco se desglucosilaron con PNGasa F (NEB, cat# P0704L) en condiciones no desnaturalizantes a 37 °C durante la noche. Los ADC (500 ng) se cargaron en una columna de fase inversa (Michrom-Bruker, Auburn, CA). El análisis LS/MS se realizó usando el sistema HPLC Agilent serie 1100 acoplado a un espectrómetro de masas Orbitrap Velos Pro (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Los espectros de masas resultantes se deconvolucionaron usando el software ProMass (Thermo Fisher Scientific). Estos resultados demuestran que las nuevas etiquetas de glutamina (por ejemplo, TG17) tienen características biofísicas similares a las de la etiqueta TG6.



Eficacia *In vitro* en líneas celulares BxPC3 y OVCAR3

5 Ambos conjugados de anticuerpos (Anticuerpo-TG6-AcLys-VC-PABC-0101 o Anticuerpo-TG17-AcLys-VC-PABC-0101) también se analizaron para determinar la eficacia *in vitro* en las líneas celulares BxPC3 y OVCAR3 para determinar la citotoxicidad, y los valores de IC50 obtenidos fueron comparables. Ver Tabla 2 y Figuras 6A-6B. Más específicamente, las células BxPC3 y OVCAR3 a 2000 y 3000 células/pocillo, respectivamente, se diluyeron en 100 µl de medio de crecimiento (DMEM sin suero, Cellgro Mediatech, Manassas, VA). Al día siguiente, se añadieron 25 µl de cinco veces de ADC (en DMEM libre de suero). Los ensayos CelltiterGlo (Promega, Madison, WI) se realizaron 4 días después del tratamiento. Las células se añadieron con reactivo diluido 1: 1 después de la eliminación del medio. Las placas se leyeron en el lector de placas MSpectraMax M5 (Molecular Devices, Downingtown, PA).

Tabla 2

Conjugado	DAR	BxPC3		OVCAR3	
		Ab-IC50 (ug/ml)	Ab-IC50 (nM)	Ab-IC50 (ug/ml)	Ab-IC50 (nM)
Ab-TG6-AcLys-VC-PABC-0101	2,00	0,164	1,093	0,010	0,068
Ab-TG17-AcLys-VC-PABC- 0101	2,00	0,257	1,715	0,008	0,051
Log (inhibidor) versus respuesta normalizada – varias pendientes					

Estos resultados demuestran que el anticuerpo-TG6-AcLys-VC-PABC-0101 y anticuerpo-TG17-AcLys-VC-PABC-0101 tienen una eficacia *in vitro* similar en las líneas celulares BxPC3 y OVCAR3 para la citotoxicidad.

Eficacia *in vivo* en modelo de xenoinjerto Pan0123

15 Los estudios de eficacia *in vivo* de los conjugados de anticuerpos se realizaron con tumores de xenoinjerto Pancreatic Pan0123 PDX que expresan anticuerpos. Se implantaron fragmentos tumorales de 2x2x2 mm<sup>3</sup> por vía subcutánea en ratones SCID (inmunodeficiencia combinada severa) de 5-8 semanas hasta que el tamaño del tumor alcanzó al menos 300 mm<sup>3</sup>. El conjugado de anticuerpos de control y los conjugados de anticuerpos dirigidos a Trop-2 (Ab-TG6-AcLys-VC-PABC-0101 y Ab-TG17-AcLys-VC-PABC-0101) se administraron a los ratones SCID en a razón de 1,5 mg/kg como inyección en bolo de dosis única inyección a través de la vena de la cola. Todos los animales experimentales fueron controlados por cambios de peso corporal semanalmente. El volumen del tumor se midió una vez por semana mediante un dispositivo Caliper y se calculó con la siguiente fórmula: Volumen del tumor = (largo x ancho<sup>2</sup>)/2. El volumen del tumor y el peso corporal se controlaron hasta 80 días después de la implantación del tumor. Estos resultados demuestran que el conjugado de anticuerpos que tiene la etiqueta TG17 tuvo una actividad similar en comparación con el conjugado de anticuerpos que tiene la etiqueta TG6. Figuras 7A-7B.

Farmacocinética

La PK (farmacocinética) se probó adicionalmente mediante la inyección de ratas hembra con una dosis única de AB-TG6-AcLys-VC-PABC-0101 o AB-TG17-AcLys-VC-PABC-0101 (174-2) a 5 mg/kg.

30 Los animales eran 12 ratas hembra Sprague Dawley adultas aproximadamente a los 3 meses de edad. (Harlan, Livermore, CA). Para los experimentos de PK y estabilidad plasmática, los compuestos se administraron por vía intravenosa a través de la vena lateral de la cola, y se extrajeron muestras de la vena de la cola contralateral en los puntos de tiempo apropiados, excepto para un sangrado terminal que se obtuvo mediante punción cardíaca en ratas adultas anestesiadas. Las muestras de un grupo de ratas se procesaron para suero mientras que las muestras de un grupo separado de ratas se procesaron para plasma. Ambos tipos de muestra se almacenaron congelados a -80 °C hasta el análisis.

35 Se recogió suero en 8 puntos de tiempo hasta 14 días con 3 ratas por grupo. El ELISA (Ensayo de inmunosorbancia ligado a enzimas) se realizó para medir el anticuerpo total y el conjugado de anticuerpos en plasma según lo descrito por Strop *et al.* Chem Biol. 20 (2): 161-167 (2013). Los resultados fueron similares para TG6 y TG17. Figura 8.

**Ejemplo 4: la mutante Q295N en la cadena pesada del mAb elimina la conjugación no deseada debido a oligoelementos de anticuerpos aglicosilados expresados durante la expresión del mAb**

45 Además de la conjugación del anticuerpo y la carga útil deseada en un sitio manipulado, una pequeña cantidad de anticuerpo aglicosilado presente en el material de partida llevó a la conjugación anticuerpo-fármaco en la posición Q295, lo que da como resultado aproximadamente 1.3% de conjugación fuera del objetivo. Tal conjugación fuera del objetivo se puede eliminar mediante la mutante Q295N (Esquema de numeración EU), que a su vez da como resultado conjugados de anticuerpo-fármaco altamente homogéneos que son mejores que 99.8% específicos del sitio.

Más específicamente, la transglutaminasa puede reconocer Q295 en IgG aglicosiladas, y la conjugación se puede lograr en este sitio. Ver confirmación MS/MS de conjugación de AmPEG6-MMAD con péptido tríptico EEQ\*YNSTYR (SEQ ID NÚM.: 15) en la Figura 9A. Cuando los anticuerpos se expresan en el sistema de expresión CHO o HEK293, la mayoría de las proteínas producidas se glicosilan en la posición N297. La presencia de glucanos en la posición N297 impide la conjugación con Q295. Sin embargo, normalmente hay una pequeña fracción de anticuerpos aglicosilados que también se producen. Esta fracción de anticuerpo aglicosilado contaminante, es la adecuada para la conjugación en la posición Q295.

Para estimar la cantidad de esta conjugación fuera del objetivo en el sitio Q295, el péptido estándar EEQ\*RYNSTYR conjugado (SEQ ID NÚM.: 15) se enriqueció en una cantidad fija (2,5 mg) de digestos trípticos no conjugados de mAb1 HC (cadena pesada), y se generó una curva estándar para la cuantificación. Usando el cromatograma de extracción de iones precursores, se estimó que el 1.3% del péptido Q295 inyectado total se conjugó con AmPEG6-MMAD (amino-polietilenglicol-6 propionil monometil auristatina D) en la molécula de mAb1 HC asumiendo una eficiencia de digestión de 100%. Figura 9B. Se creó una mutante puntual única Q295N para anular la conjugación no deseada. La huella digital de la masa peptídica de la mutante Q295N reveló solo conjugación en el sitio de la etiqueta de glutamina diseñado para las moléculas de cadena ligera y pesada de mAb1 sin sitios identificados adicionales

**Listado de secuencias**

<110> Rinat Neuroscience Corp. STROP, Pavel

GALINDO CASAS, Meritxell FARIAS, Santiago Esteban

<120> CONJUGADOS DE POLIPÉPTIDOS MANIPULADOS

5 <130> PC72025A

<150>US6/860757

<151> 2013-07-31

<160> 35

<170> PatentIn version 3.5

10 <210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Construcción sintética

<400> 1

Leu Leu Gln Gly Ala  
1 5

<210> 2

20 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

25 <400> 2

Leu Leu Gln Gly Pro Gly Lys  
1 5

<210> 3

<211> 6

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 3

35

ES 2 804 614 T3

Leu Leu Gln Gly Pro Gly  
1 5

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 4

Leu Leu Gln Gly Pro Ala  
1 5

<210> 5

10 <211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

15 <400> 5

Leu Leu Gln Gly Pro  
1 5

<210> 6

<211> 4

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 6

25

Leu Leu Gln Pro  
1

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 7

Leu Leu Gln Pro Gly Lys  
1 5

<210> 8  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 8

**Leu Leu Gln Gly Ala Pro Gly Lys**  
**1 5**

<210> 9  
 10 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 15 <400> 9

**Leu Leu Gln Gly Ala Pro Gly**  
**1 5**

<210> 10  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 20 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 10

**Leu Leu Gln Gly Ala Pro**  
**1 5**

25 <210> 11  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 11

ES 2 804 614 T3

Leu Leu Gln Gly Pro Pro  
1 5

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 12

Gly Gly Leu Leu Gln Gly Ala  
1 5

10 <210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Construcción sintética

<400> 13

<210> 14

Gly Gly Leu Leu Gln Gly Pro Pro  
1 5

<211> 6

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<220>

<221> MISC\_FEATURE

25 <222> (6).. (6)

<223> A o P

<400> 14

Leu Leu Gln Gly Pro Xaa  
1 5

30

<210> 15

<211> 9

<212> PRT



ES 2 804 614 T3

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Construcción sintética

<400> 19

Gly Gly Gly Leu Leu Gln Gly Gly  
1 5

<210> 20

<211> 5

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 20

15

Gly Leu Leu Gln Gly  
1 5

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 21

25

Gly Ser Pro Leu Ala Gln Ser His Gly Gly

1

5

10

30 <210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>



ES 2 804 614 T3

<223> Construcción sintética

<400> 22

5

Gly Leu Leu Gln Gly Gly Gly  
1 5

<210> 23

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 23

15

Gly Leu Leu Gln Gly Gly  
1 5

<210> 24

<211> 4

<212> PRT

20

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 24

25

Gly Leu Leu Gln  
1

<210> 25

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 25

Leu Leu Gln Leu Leu Gln Gly Ala  
1 5



ES 2 804 614 T3

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Construcción sintética

<400> 30

10

Leu Leu Gln Leu Leu Gln Gly

<210> 31

1

5

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Construcción sintética

<400> 31

20

Ser Leu Leu Gln Gly  
1 5

<210> 32

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

5 <400> 32

Leu Leu Gln Leu Gln  
1 5

<210> 33

<211> 6

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 33

Leu Leu Gln Leu Leu Gln  
1 5

15 <210> 34

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Construcción sintética

<400> 34

Leu Leu Gln Gly Arg  
1 5

<210> 35

<211> 4

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<220>

30 <221> misc\_feature

<222> (1)..(2)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

<221> misc\_feature

<222> (4)..(4)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 35

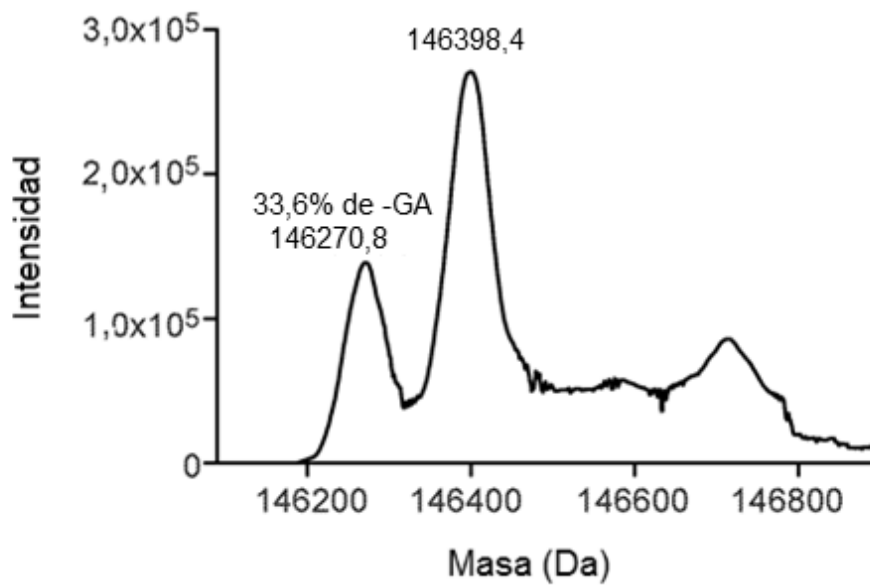
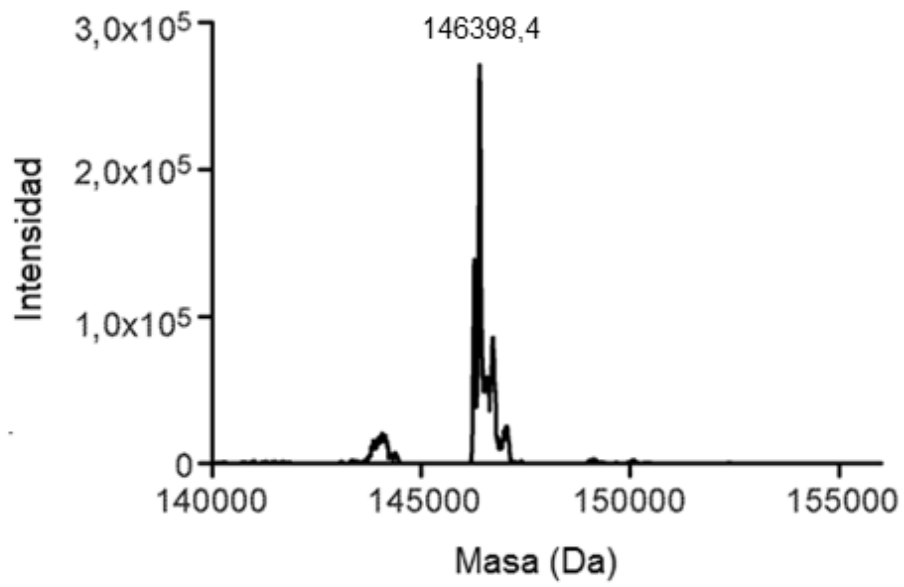
Xaa Xaa Gln Xaa  
1

## REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de polipéptido manipulado que comprende la fórmula: polipéptido-T-A, en la que T es una etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina manipulado en un sitio específico, en la que A es un agente donante de amina, en el que el agente donante de amina está conjugado de manera específica de sitio con la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina en un extremo terminal carboxilo en el polipéptido, en el que el polipéptido es un polipéptido que contiene Fc, un polipéptido que contiene Fab, o un anticuerpo y en el que la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina comprende una secuencia de aminoácidos GLLQGPP (SEQ ID NÚM.:13).
2. El conjugado de polipéptido manipulado de la reivindicación 1, en el que la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina no es espacialmente adyacente a una Lys reactiva en el polipéptido.
3. El conjugado de polipéptido manipulado de la reivindicación 1 o 2, en el que el polipéptido comprende una modificación de aminoácido en la última posición de aminoácidos en el extremo terminal carboxilo.
4. El conjugado de polipéptido manipulado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el conjugado de polipéptido comprende una cadena pesada y cadena ligera de anticuerpos de longitud completa en el que la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina está ubicada en el extremo terminal carboxilo de una cadena pesada, una cadena ligera, o tanto de la cadena pesada como de la cadena ligera.
5. El conjugado de polipéptido manipulado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el polipéptido comprende un anticuerpo, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo biespecífico, un minicuerpo, un diacuerpo o un fragmento de anticuerpo, y en el que el anticuerpo puede ser una IgG.
6. El conjugado de polipéptido manipulado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el agente donante de amina comprende la fórmula: X-Y-Z, en la que X es una unidad donante de amina; Y es un conector; y Z es un resto de agente y en el que el conector de la unidad donante de amina (X-Y) está seleccionado del grupo que consiste en Ac-Lys-Gly, ácido aminocaproico, Ac-Lys-β-Ala, amino-PEG2-C2, amino-PEG3-C2, amino-PEG6-C2, Ac-Lys-Val-Cit-PABC, aminocaproil-Val-Cit-PABC, [(3R,5R)-1-{3-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]propanoil}piperidin-3,5-diil]bis-Val-Cit-PABC, [(3S,5S)-1-{3-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]propanoil}piperidin-3,5-diil]bis-Val-Cit-PABC, putrescina, 2-aminoetoxi-PEG6, y Ac-Lys-putrescina.
7. El conjugado de polipéptido manipulado de la reivindicación 6, en el que el resto de agente es un agente citotóxico, y el agente citotóxico puede estar seleccionado del grupo que consiste en antraciclina, una auristatina, una camptotecina, una combretastatina, una dolastatina, una duocarmicina, un enediyne, una geldanamicina, un dímero de indolino-benzodiazepina, una maitansina, una puromicina, un dímero de pirrolobenzodiazepina, un taxano, un alcaloide de vinca, una tubulisina, una hemiasterlina, una espliceostatina, una pladienolida, MMAD (Monometil Auristatina D) y 0101 (2-metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]piperidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida).
8. El conjugado de polipéptido manipulado de una cualquiera de las reivindicaciones 6-7, en el que el agente donante de amina está seleccionado del grupo que consiste en Alexa 488 cadaverina, 5-FITC cadaverina, Alexa 647 cadaverina, Alexa 350 cadaverina, 5- TAMRA cadaverina, 5-FAM cadaverina, SR101 cadaverina, 5,6-TAMRA cadaverina, 5-FAM lisina, Ac-LysGly- MMAD, amino-PEG3-C2-MMAD, amino-PEG6-C2-MMAD, amino-PEG3-C2-amino-nonanoil-MMAD, aminocaproil-Val-Cit-PABC-MMAD, amino-PEG-C2-Val-Cit-PABC-MMAD, Ac-Lys-Val-Cit-PABC-MMAD, aminocaproil-MMAD, Ac-Lys-β-Ala-MMAD, amino-PEG2-C2-MMAE, aminocaproil-MMAE, amino-PEG3-C2-MMAE, aminocaproil-MMAF, aminocaproil-Val-Cit-PABC-MMAE, amino-PEG-6-C2-Val-Cit-PABC-MMAE, Ac-Lys-Val-Cit-PABC-MMAE, aminocaproil-Val-Cit-PABC-MMAF, amino-PEG-6-C2-Val-Cit-PABC-MMAF, Ac-Lys-Val-Cit-PABC-MMAF, Ac-Lys-Val-Cit-PABC-0101, putrescinil-geldanamicina, Ac-Lys-putrescinil-geldanamicina, aminocaproil-3377, aminocaproil-0131, aminocaproil-0121, [(3R,5R)-1-{3-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]propanoil}piperidine-3,5-diil]bis-Val-Cit-PABC-MMAD, [(3R,5R)-1-{3-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]propanoil}piperidine-3,5-diil]bis-Val-Cit-PABC-MMAE, y 2-aminoetoxi-PEG6-NODAGA.
9. El conjugado de polipéptido manipulado de la reivindicación 6, en el que el conector de la unidad donante de amina (X-Y) es una unidad ramificada y el resto de agente comprende al menos aproximadamente 2 restos de agente.
10. El conjugado de polipéptido manipulado de una cualquiera de las reivindicaciones 4-9, que comprende una sustitución de aminoácidos de glutamina a asparagina en la posición 295 (Q295N; esquema de numeración EU) del anticuerpo.
11. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de polipéptido manipulado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

12. Un conjugado de polipéptido manipulado según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, o una composición farmacéutica según la reivindicación 11, para su uso en el tratamiento del cáncer o inhibición del crecimiento tumoral en un individuo necesitado de dicho tratamiento.
- 5 13. Un procedimiento de preparación de un conjugado de polipéptido manipulado según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende las etapas de:
- a) proporcionar una molécula de polipéptido-T manipulada que comprende el polipéptido y la etiqueta de donante de acilo que contiene glutamina;
  - b) poner en contacto el agente donante de amina con la molécula de polipéptido-T manipulada en presencia de una trans-glutaminasa; y
  - 10 c) dejar que la molécula de polipéptido T manipulada se una de manera covalente al agente donante de amina para formar el conjugado de polipéptido manipulado; y en el que la molécula de polipéptido-T manipulada o polipéptido-T que contiene Fc es expresado en células CHO.
14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que
- 15 i. el conjugado de polipéptido manipulado tiene una eficiencia de conjugación de al menos aproximadamente 51%; y/o
  - ii. la transglutaminasa es una transglutaminasa microbiana, purificada o manipulada; y/o
  - iii. el polipéptido es polipéptido que contiene Fc o que contiene Fab.
15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 13-14, que además comprende una etapa de purificación, en el que el conjugado de polipéptido manipulado es purificado mediante una etapa de cromatografía.
- 20

FIG. 1A





**FIG. 1B**

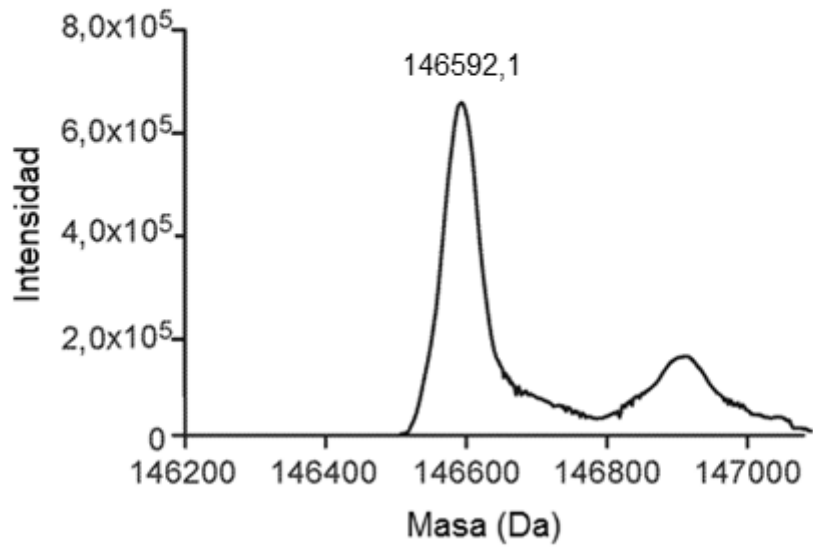
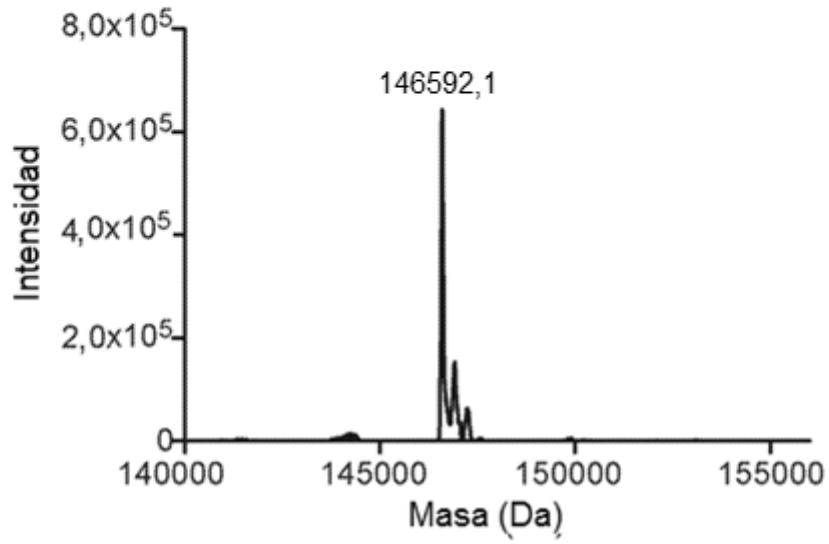
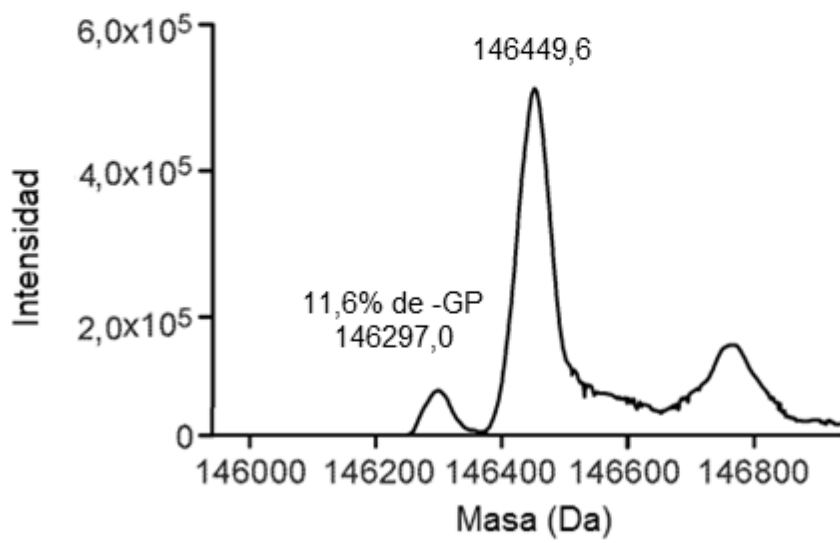
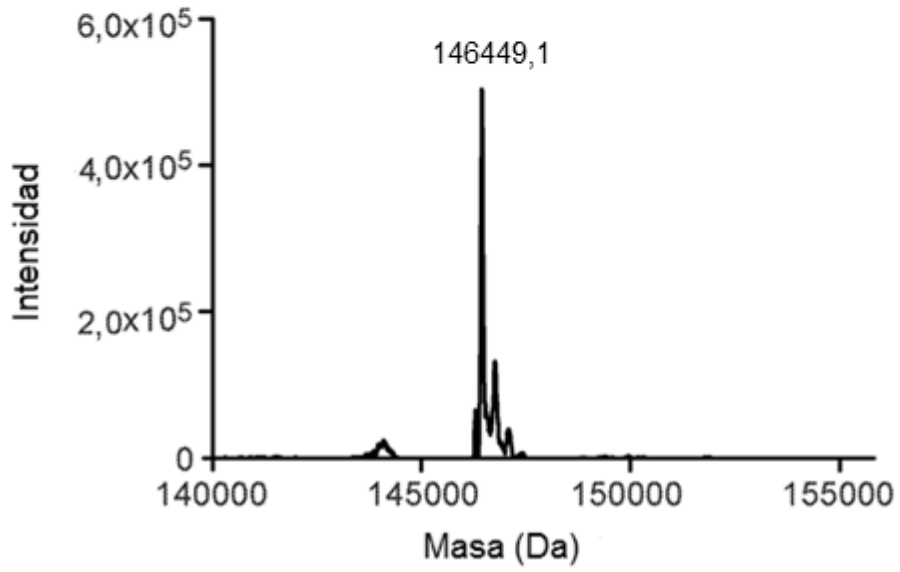
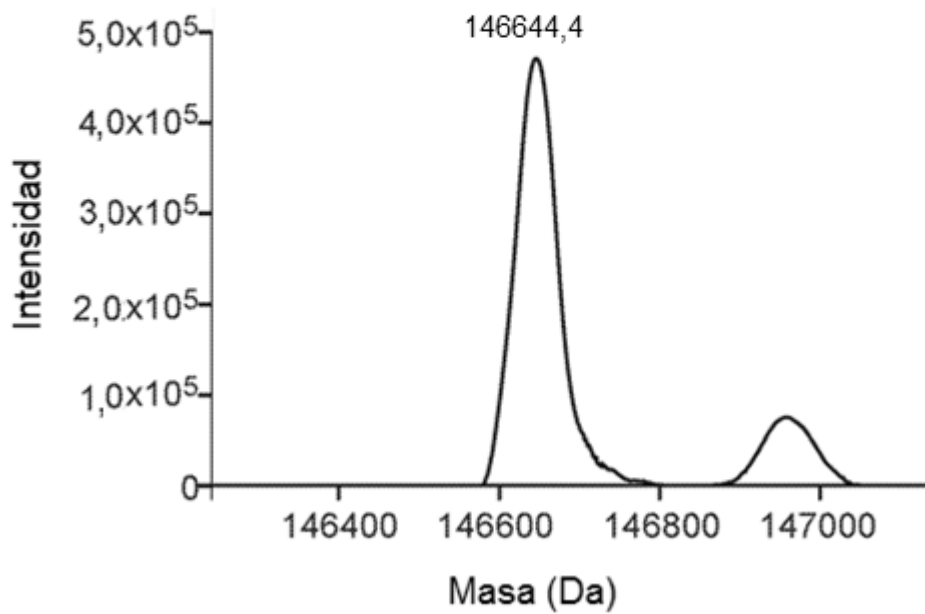
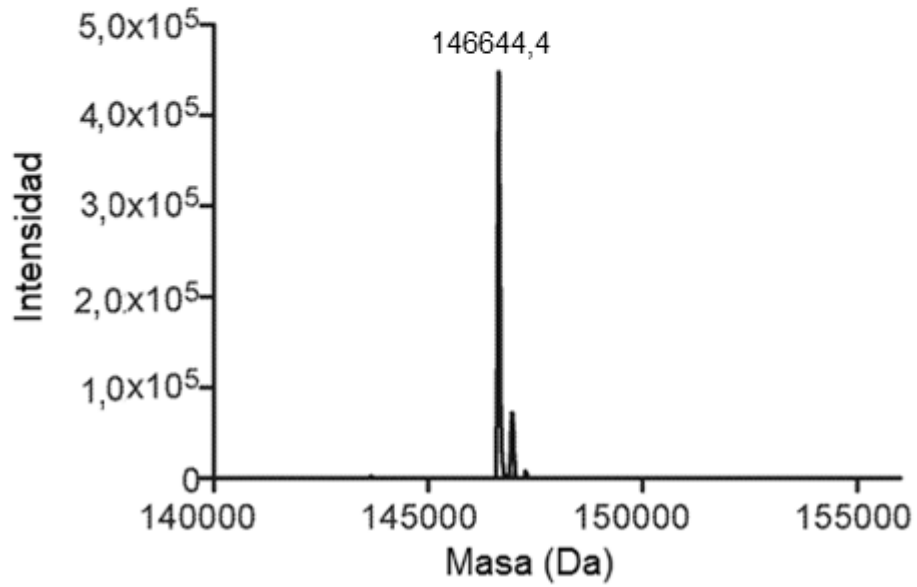


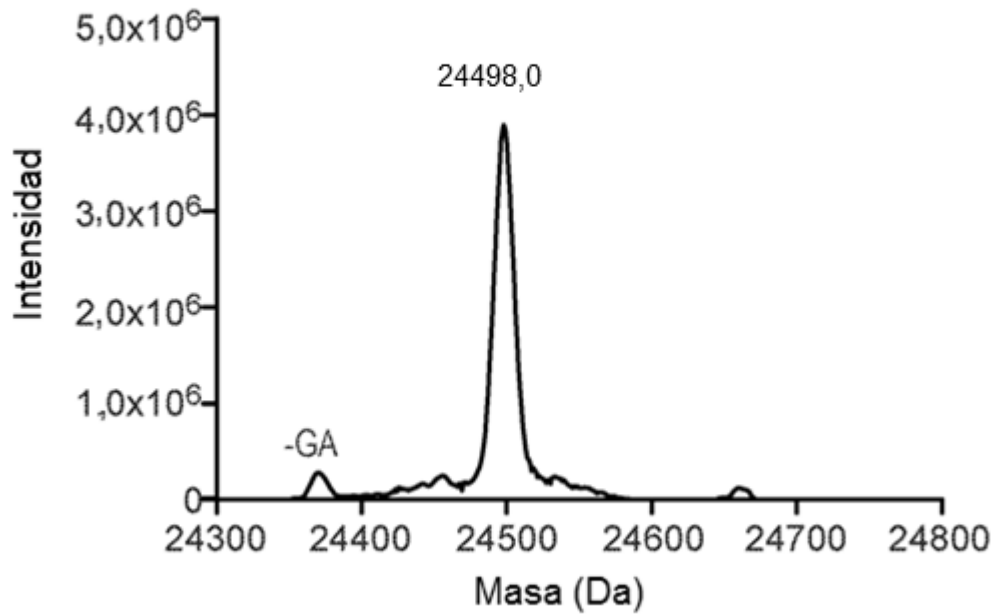
FIG. 1C



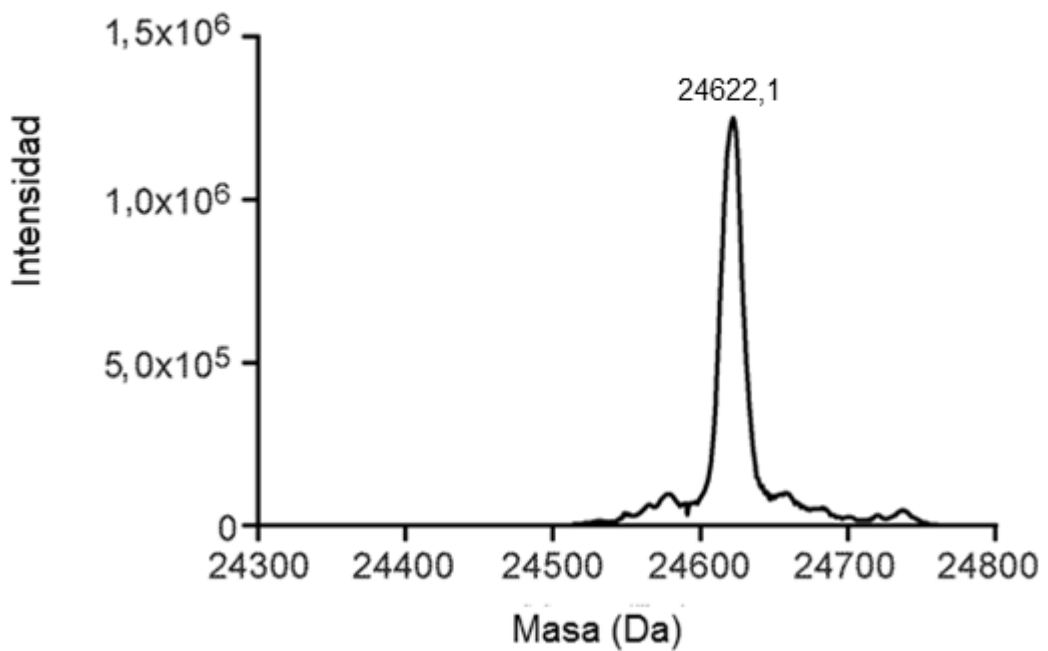
**FIG. 1D**



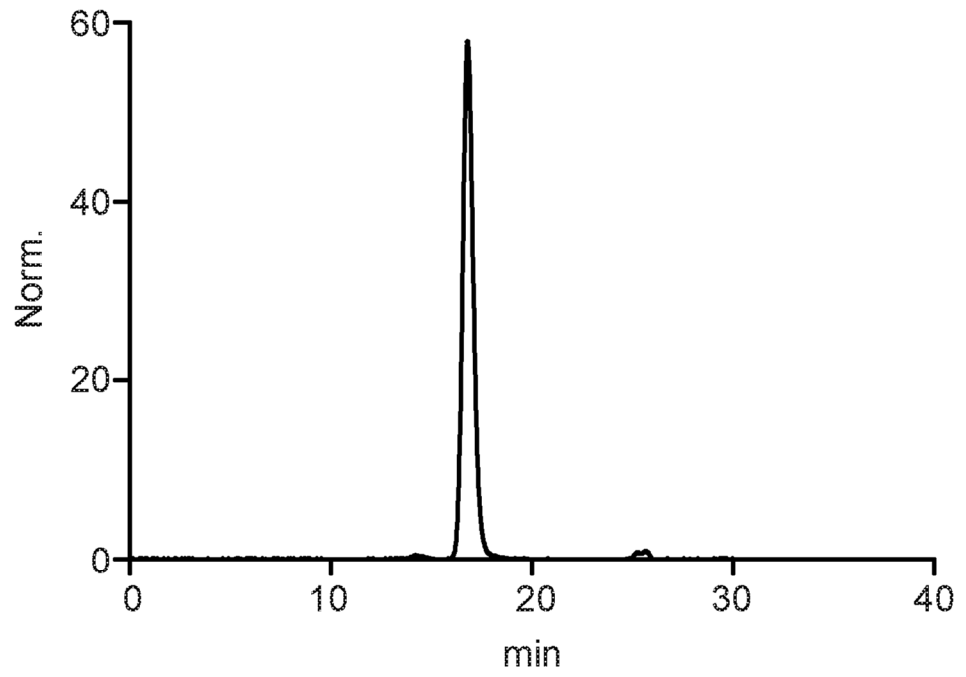
**FIG. 2A**



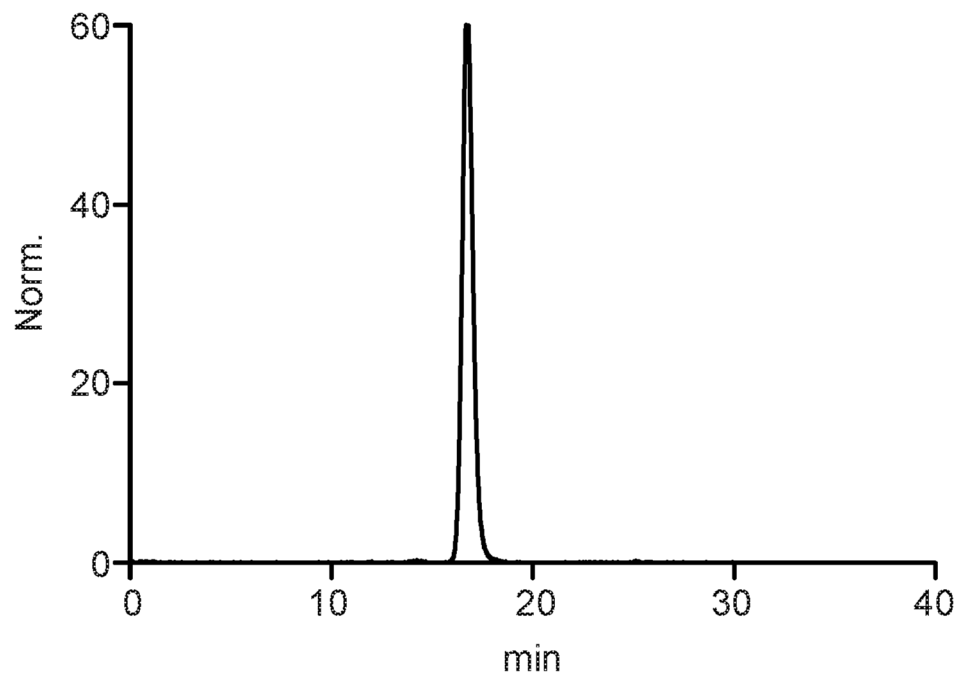
**FIG. 2B**



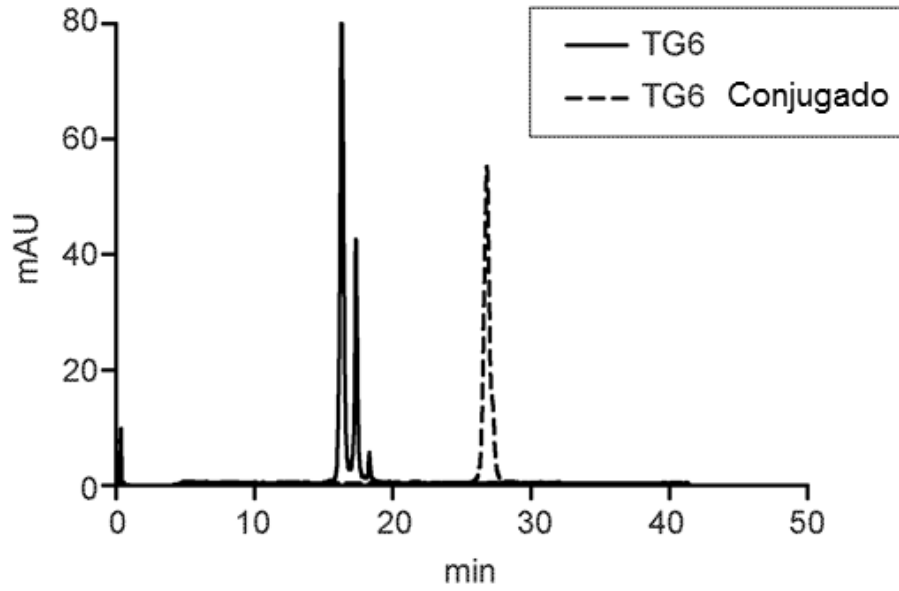
**FIG. 3A**



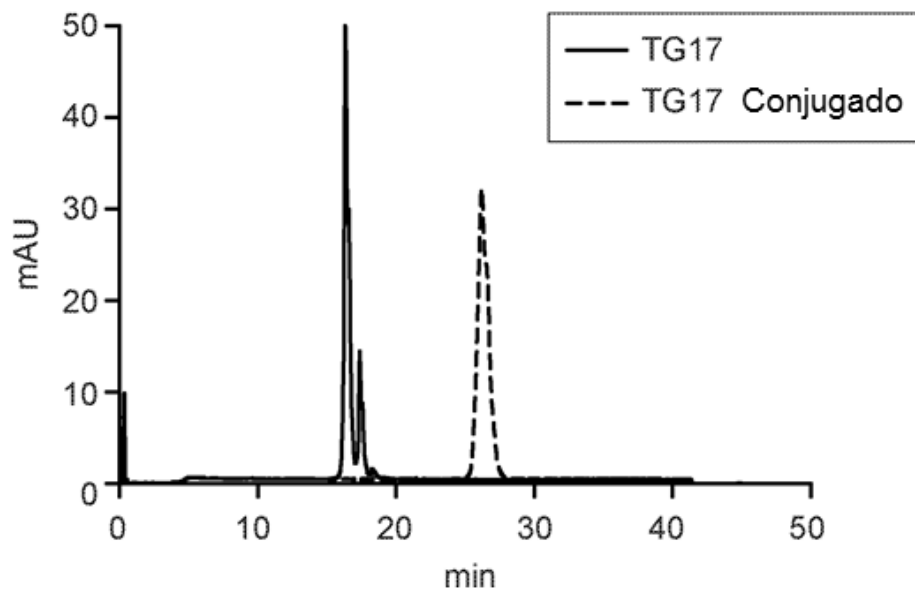
**FIG. 3B**



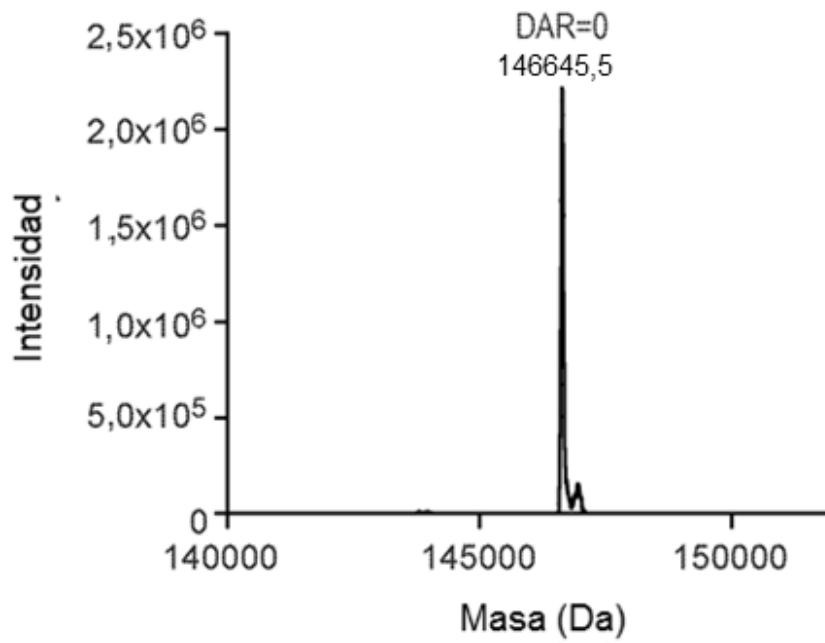
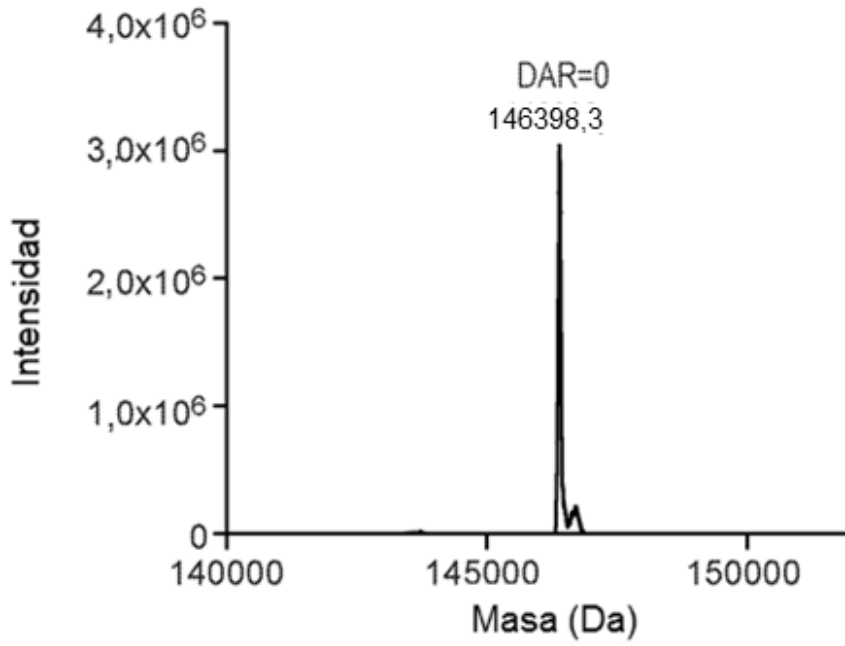
**FIG. 4A**



**FIG. 4B**



**FIG. 5A**



**FIG. 5B**

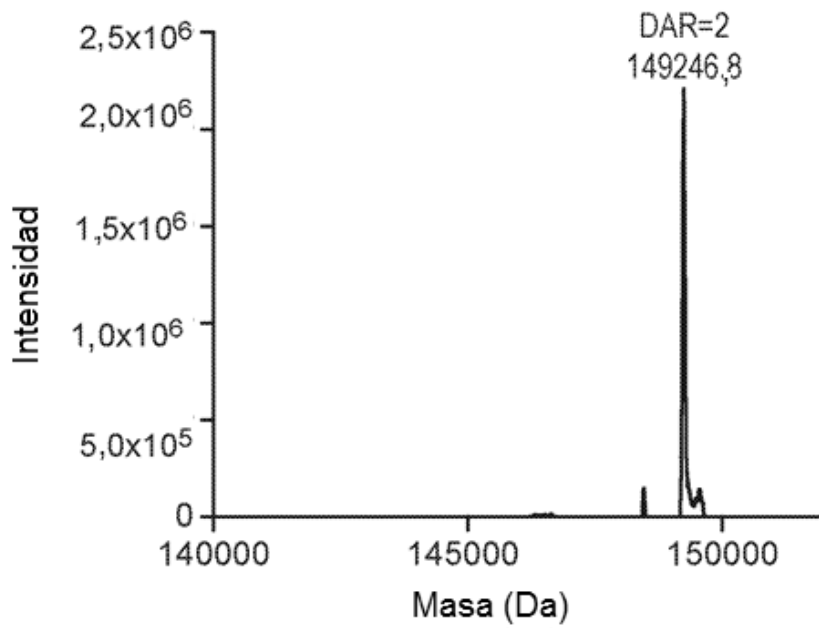
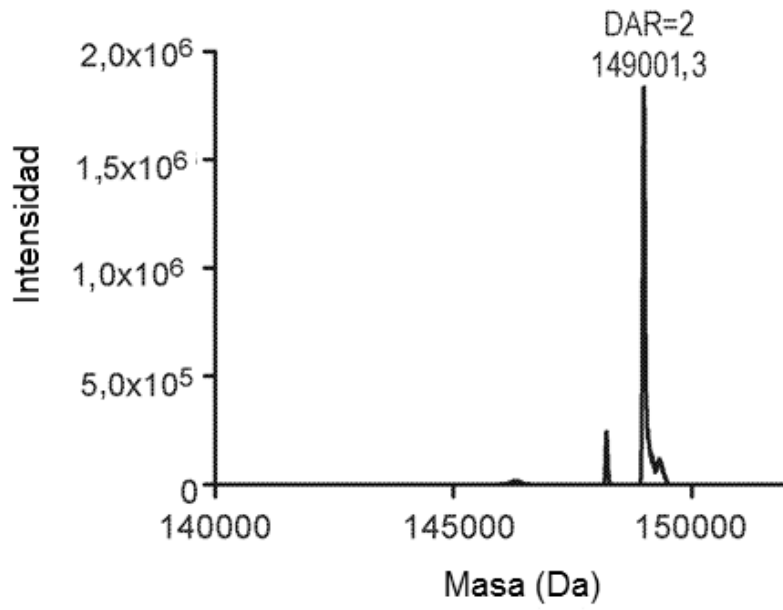




FIG. 6A

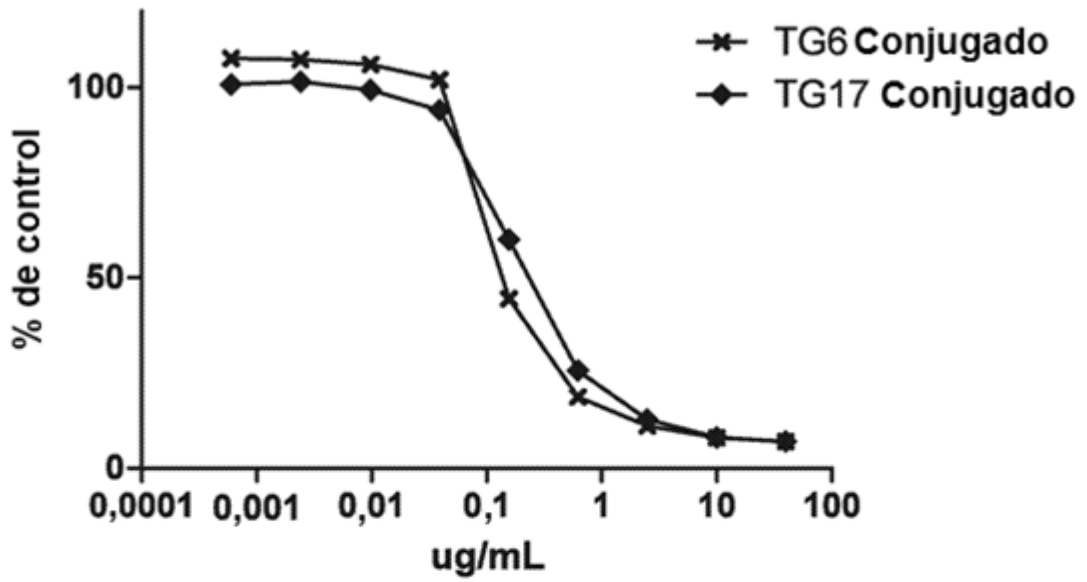
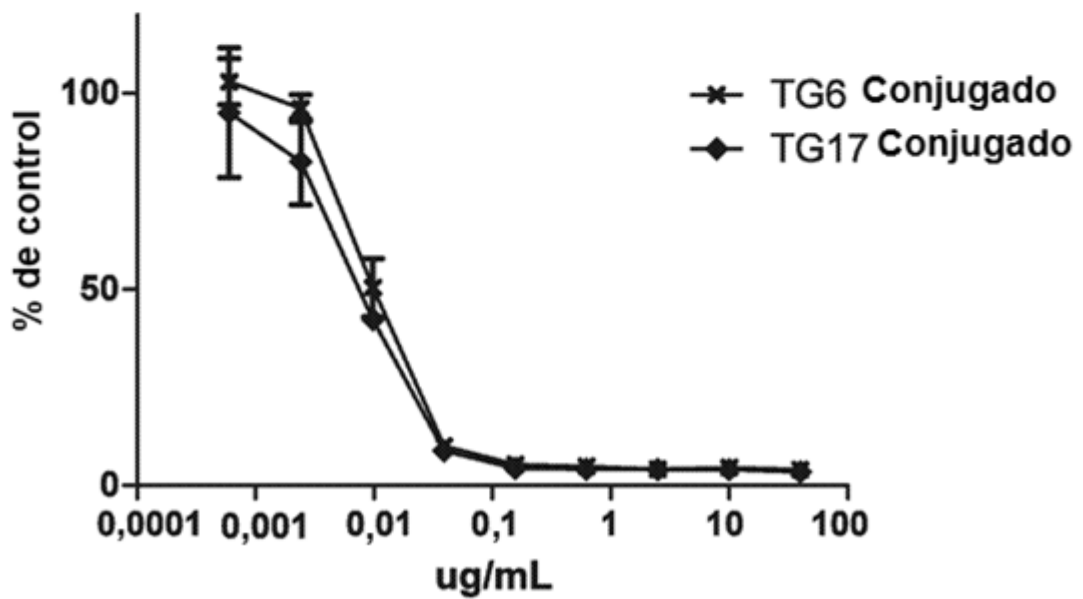
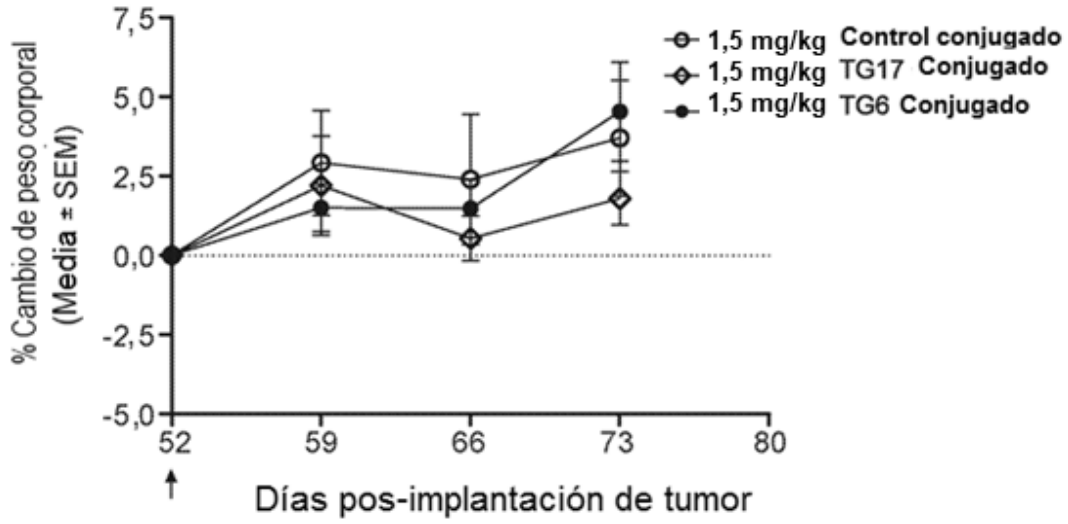


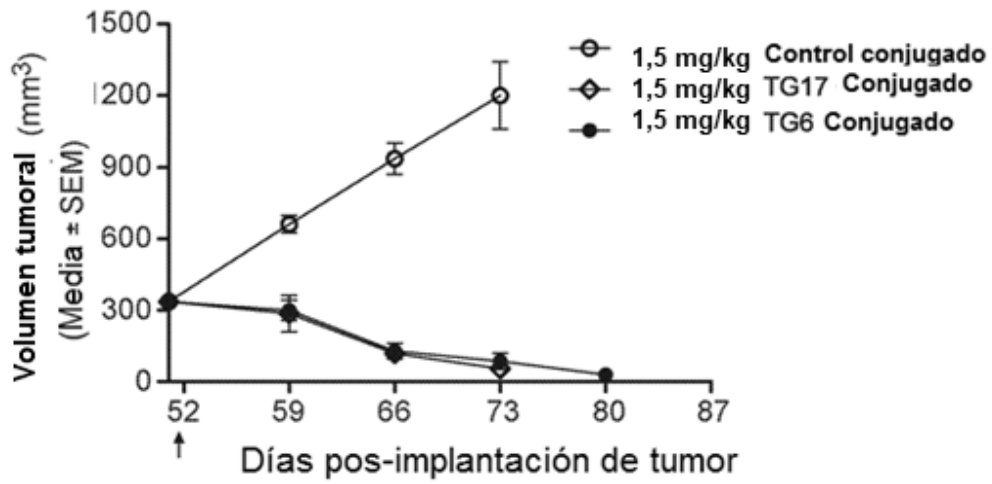
FIG. 6B



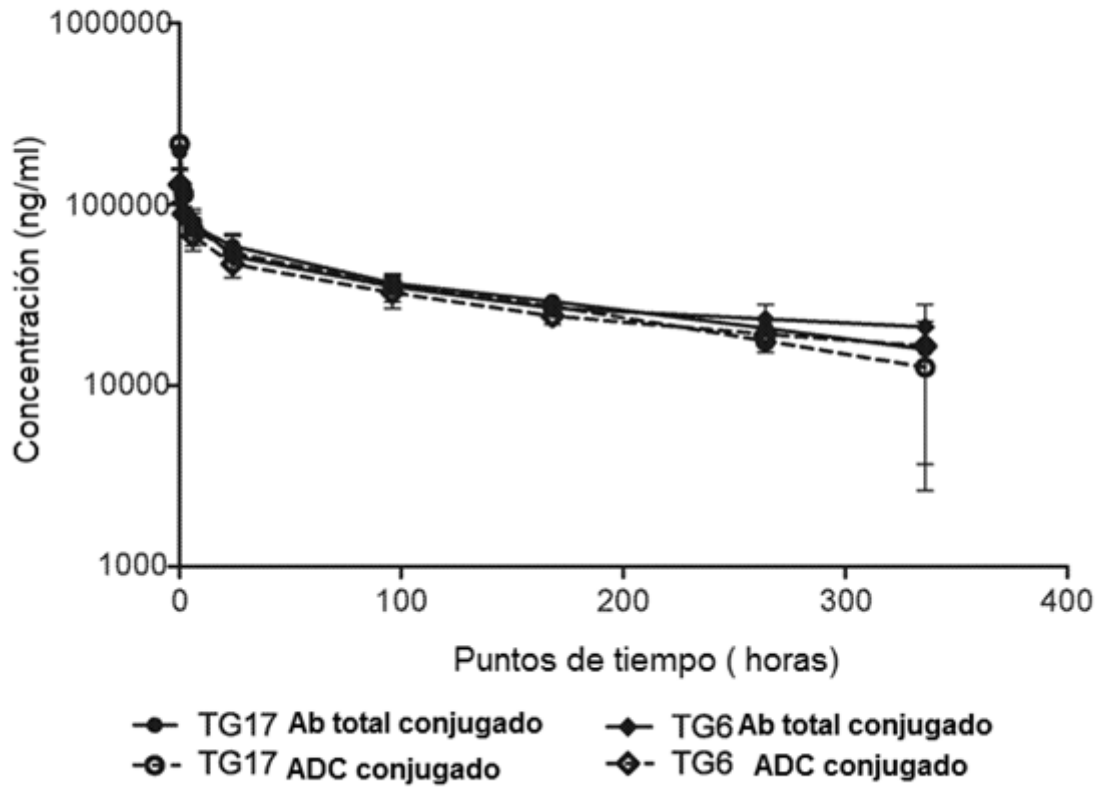
**FIG. 7A**

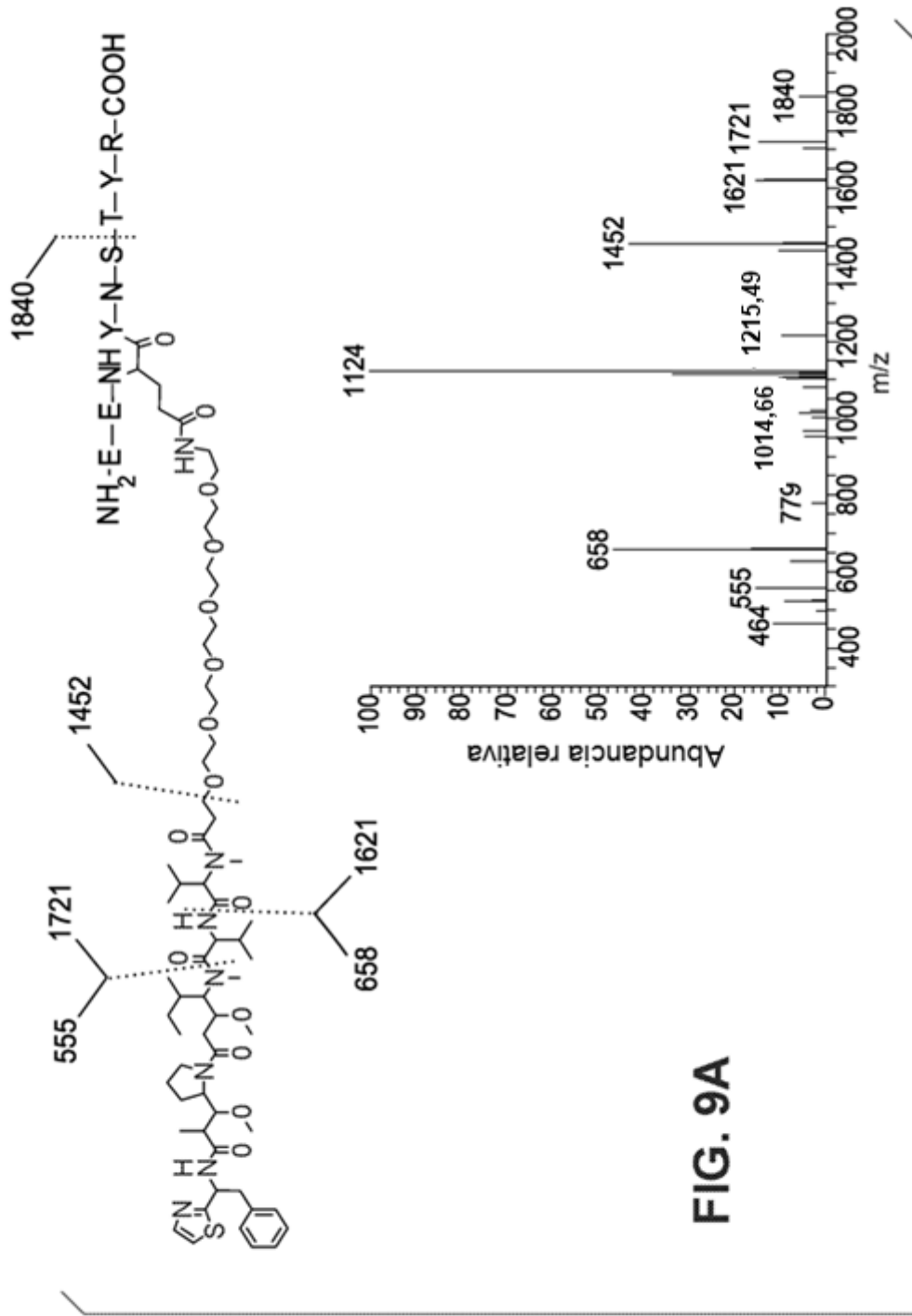


**FIG. 7B**



**FIG. 8**





**FIG. 9A**

**FIG. 9B**

