

COMPOSICIONES DE ANTICUERPO OPTIMIZADAS PARA EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS OCULARES

LISTADO DE SECUENCIAS

5

La presente solicitud contiene un listado de secuencias que se presentó de forma electrónica en formato ASCII y se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia. Dicha copia en ASCII, creada el 22 de marzo de 2018, tiene el título 50474-160WO3_Sequence_Listing_3.22.18_ST25 y un tamaño de 57 671 bytes.

10

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La invención hace referencia, en líneas generales, a conjugados de anticuerpo, anticuerpos modificados con cisteína, composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) de estos y métodos para su uso.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La angiogénesis es un proceso altamente regulado a través del cual se forman los vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos preexistentes. Aunque la angiogénesis es importante durante el desarrollo para asegurar la circulación sanguínea adecuada, muchos trastornos se encuentran relacionados con la angiogénesis patológica, tales como trastornos oculares (por ejemplo, la degeneración macular relacionada con la edad, AMD, por sus siglas en inglés) y los trastornos proliferativos celulares (por ejemplo, cáncer). El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) es un impulsor clínicamente validado de la angiogénesis y neutralización de VEGF (por ejemplo, mediante el uso de un anticuerpo de bloqueo anti-VEGF), se puede utilizar para tratar trastornos relacionados con la angiogénesis patológica.

20

25

Enfoques actuales para el tratamiento de trastornos oculares asociados a la angiogénesis patológica (por ejemplo, AMD (por ejemplo, AMD húmeda), edema macular diabético (DME), retinopatía diabética (DR) y oclusión venosa retiniana (RVO)) normalmente implican la inyección intravítrea de antagonistas de VEGF (por ejemplo, el ranibizumab de Fab anti-VEGF). Debido a que el sitio de acción de los Fabs anti-VEGF se encuentra en la parte de atrás del ojo en la retina, y también debido a que los Fabs pueden tener un tiempo de residencia relativamente corto en el ojo, normalmente se obtiene el máximo beneficio del paciente a partir de los Fabs anti-VEGF con dosificaciones relativamente frecuentes (por ejemplo, cada cuatro semanas, Q4W) mediante

35

inyección intravítrea. La administración de acción prolongada de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fabs) anti-VEGF para trastornos oculares puede ser deseable, al menos en parte, para reducir la frecuencia de dosificación, lo que puede mejorar la conveniencia y el cumplimiento del paciente.

- 5 Persiste una necesidad de composiciones de anticuerpo para la administración de acción prolongada para el tratamiento de trastornos oculares (por ejemplo, AMD (por ejemplo, AMD húmeda), edema macular diabético (DME), retinopatía diabética (DR) y oclusión venosa retiniana (RVO)).

10

COMPENDIO DE LA INVENCION

15

La invención provee conjugados de anticuerpo que incluyen polímeros monodispersos (por ejemplo, polímeros de ácido hialurónico (HA) monodispersos) unidos de forma covalente a anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos anti-VEGF), anticuerpos modificados con cisteína que se pueden utilizar, por ejemplo, en la preparación de conjugados de anticuerpo, composiciones que incluyen conjugados de anticuerpo (por ejemplo, composiciones farmacéuticas), así como también métodos para su producción y su uso, por ejemplo, para usos terapéuticos.

20

En un aspecto, la invención presenta un conjugado de anticuerpo que comprende (i) un anticuerpo y (ii) un polímero de ácido hialurónico (HA) unido de forma covalente al anticuerpo, en donde el polímero de HA tiene un índice de polidispersión (PDI) de 1.1 o menos. En algunas modalidades, el polímero de HA tiene un PDI de entre 1.0 y 1.1. En algunas modalidades, el polímero de HA tiene un PDI de entre 1.0 y alrededor de 1.05. En algunas modalidades, el polímero de HA tiene un PDI de entre alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.05. En algunas modalidades, el polímero de HA tiene un PDI de alrededor de 1.001. En algunas modalidades, el polímero de HA tiene un peso molecular de alrededor de 1 megadalton (MDa) o menos. En algunas modalidades, el polímero de HA tiene un peso molecular de entre alrededor de 25 kDa y alrededor de 500 kDa. En algunas modalidades, el polímero de HA tiene un peso molecular de entre alrededor de 100 kDa y alrededor de 250 kDa. En algunas modalidades, el polímero de HA tiene un peso molecular de entre alrededor de 150 kDa y alrededor de 200 kDa. En algunas modalidades, el polímero de HA es un polímero de HA lineal. En algunas modalidades, el conjugado de anticuerpo tiene un radio hidrodinámico de entre alrededor de 10 nm y alrededor de 60 nm. En algunas modalidades, el conjugado de anticuerpo tiene un radio hidrodinámico de entre alrededor de 25 nm y alrededor de 35 nm. En algunas modalidades, el radio hidrodinámico es de alrededor de 20 nm a alrededor de 30 nm.

35

En algunas modalidades del aspecto que antecede, el conjugado de anticuerpo tiene una semivida

ocular que aumenta respecto a un anticuerpo de referencia que no se une de forma covalente al polímero de HA. En algunas modalidades, la semivida ocular aumenta al menos alrededor de 2 veces respecto al anticuerpo de referencia. En algunas modalidades, la semivida ocular aumenta al menos alrededor de 4 veces respecto al anticuerpo de referencia. En algunas modalidades, la semivida ocular es una semivida vítrea. En algunas modalidades, el anticuerpo de referencia es idéntico al anticuerpo del conjugado de anticuerpo.

En algunas modalidades del aspecto que antecede, el anticuerpo se une específicamente a una molécula biológica seleccionada del grupo que consiste en el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); IL-1 β ; IL-6; IL-6R; IL-13; IL-13R; PDGF; angiopoyetina; angiopoyetina 2; Tie2; S1P; integrinas $\alpha\beta$ 3, $\alpha\beta$ 5 y α 5 β 1; betacelulina; apelina/APJ; eritropoyetina; factor de complemento D; TNF α ; HtrA1; un receptor de VEGF; receptor de ST-2 y una proteína genéticamente vinculada al riesgo de AMD. En algunas modalidades, el receptor de VEGF es VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, mbVEGFR o sVEGFR. En algunas modalidades, la proteína genéticamente vinculada al riesgo de AMD se selecciona del grupo que consiste en componentes de la vía de complemento C2, factor B, factor H, CFHR3, C3b, C5, C5a y C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; IL-8; CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC, COL10A1 y TNFRSF10A.

En algunas modalidades del aspecto que antecede, el anticuerpo se une específicamente a VEGF. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende las siguientes seis regiones hipervariables (HVR): (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GX₁TPX₂GGX₃X₄X₅YX₆DSVX₇X₈ (SEQ ID NO: 2), en donde X₁ es Ile o His, X₂ es Ala o Arg, X₃ es Tyr o Lys, X₄ es Thr o Glu, X₅ es Arg, Tyr, Gln o Glu, X₆ es Ala o Glu, X₇ es Lys o Glu, y X₈ es Gly o Glu; (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQX₁VSTAVA (SEQ ID NO: 4), en donde X₁ es Asp o Arg; (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de X₁ASFLYS (SEQ ID NO: 5), en donde X₁ es Ser o Met, y

(f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de X₁QGYGX₂PFT (SEQ ID NO: 6), en donde X₁ es Gln, Asn o Thr, y X₂ es Ala, Asn, Gln o Arg. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende las seis HVR que siguen: (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GITPAGGYTRYADSVKG (SEQ ID NO: 7), GITPAGGYEYYADSVKG (SEQ ID NO: 21) o GITPAGGYEYYADSVKG (SEQ ID NO: 22); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SASFLYS (SEQ ID NO: 9); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de

aminoácidos de QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10) o QQGYGNPFT (SEQ ID NO: 23).

En algunas modalidades del aspecto anterior, el anticuerpo comprende las seis HVR que siguen:

(a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GITPAGGYTRYADSVKG (SEQ ID NO: 7); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SASFLYS (SEQ ID NO: 9); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10).

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende adicionalmente las regiones marco (FR) del

dominio variable de cadena pesada (VH) que siguen: (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTIS (SEQ ID NO: 13); (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQAPGKGGLEWVA (SEQ ID NO: 14); (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RFTISADTSKNTAYLQMRSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 15); y (d) una FR-H4 que comprende

la secuencia de aminoácidos de WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 16). En algunas modalidades, el anticuerpo además comprende las siguientes FR del dominio variable de cadena ligera (VL): (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 17), (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19); y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20).

En algunas modalidades del aspecto anterior, el anticuerpo comprende las seis HVR que siguen:

(a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GITPAGGYEYYADSVEG (SEQ ID NO: 22); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SASFLYS (SEQ ID NO: 9); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQGYGNPFT (SEQ ID NO: 23).

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende además las siguientes FR del dominio VL:

(a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 17), (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 24); y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20).

En algunas modalidades del aspecto anterior, el anticuerpo comprende las seis HVR que siguen:

(a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GITPAGGYEYYADSVEG (SEQ ID NO: 22); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SASFLYS (SEQ ID NO: 9); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10). En algunas modalidades, el anticuerpo comprende además las siguientes FR del dominio VL: (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 17), DIQMTQSPESLSASVGDEVTITC (SEQ ID NO: 25) o DIQMTQSPSSLSASVGDEVTITC (SEQ ID NO: 26), (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18) o WYQQKPGEAPKLLIY (SEQ ID NO: 27); (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19) o GVPSRFSGSGSGTDFTLTIESLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 28); y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20). En algunas modalidades, el anticuerpo comprende además las siguientes las FR del dominio VH: (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EEQLVEEGGGLVQPGESLELSAASGFEIS (SEQ ID NO: 29) o EEQLVEEGGGLVQPGESLRLSCAASGFEIS (SEQ ID NO: 52); (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQEPGEGLEWVA (SEQ ID NO: 30); (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 31); y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGELVTVSS (SEQ ID NO: 32).

En algunas modalidades del aspecto que antecede, el anticuerpo comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, 40 o 42; (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, 41 o 46; o (c) un dominio VH como en (a) y un dominio VL como en (b). En algunas modalidades, el dominio VH comprende adicionalmente los siguiente FR: (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTIS (SEQ ID NO: 13); (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 14) o WVRQEPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 39); (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RFTISADTSKNTAYLQMRSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 15); y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 16). En algunas modalidades, el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11. En algunas

modalidades, el dominio VL comprende adicionalmente los siguiente FR: (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 17) o DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIDC (SEQ ID NO: 45), (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19), GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDSATYYC (SEQ ID NO: 44) o GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYC (SEQ ID NO: 54); y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20) o FGQGTKVEVK (SEQ ID NO: 55). En algunas modalidades, el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12.

En algunas modalidades del aspecto que antecede, el anticuerpo comprende (a) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 y (b) un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

En algunas modalidades del aspecto que antecede, el anticuerpo comprende (a) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40 y (b) un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

En algunas modalidades del aspecto que antecede, el anticuerpo comprende (a) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42 y (b) un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

En algunas modalidades del aspecto que antecede, el anticuerpo comprende (a) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42 y (b) un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41.

En algunas modalidades del aspecto que antecede, el anticuerpo comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33 o 51; (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, 34, 35, 36, 37 o 38; o (c) un dominio VH como en (a) y un dominio VL como en (b). En algunas modalidades, el anticuerpo comprende

adicionalmente los siguiente FR: (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EEQLVEEGGGLVQPGESLELSAASGFEIS (SEQ ID NO: 29) o EEQLVEEGGGLVQPGESLRLSAASGFEIS (SEQ ID NO: 52); (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQEPGEGLEWVA (SEQ ID NO: 30); (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 31); y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGELVTVSS (SEQ ID NO: 32). En algunas modalidades, el dominio VH comprende la secuencia de

aminoácidos de la SEQ ID NO: 33. En algunas modalidades, el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende adicionalmente los siguiente FR: (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC (SEQ ID NO: 17),
 5 DIQMTQSPESLSASVGDEVTITC (SEQ ID NO: 25) o DIQMTQSPSSLSASVGDEVTITC (SEQ ID NO: 26), (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18) o WYQQKPGEAPKLLIY (SEQ ID NO: 27); (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19), GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 24) o
 10 GVPSRFSGSGSGTDFTLTIESLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 28); y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20). En algunas modalidades, el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34. En algunas modalidades, el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35. En algunas modalidades, el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36. En
 15 algunas modalidades, el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37. En algunas modalidades, el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12. En algunas modalidades, el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38.

En algunas modalidades del aspecto que antecede, el anticuerpo comprende (a) un dominio VH
 20 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33 y (b) un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38.

En algunas modalidades del aspecto que antecede, el anticuerpo comprende (a) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33 y (b) un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34.

25 En algunas modalidades del aspecto que antecede, el anticuerpo comprende (a) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33 y (b) un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35.

En algunas modalidades del aspecto que antecede, el anticuerpo comprende (a) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33 y (b) un dominio VL que
 30 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36.

En algunas modalidades del aspecto que antecede, el anticuerpo comprende (a) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33 y (b) un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37.

En algunas modalidades del aspecto que antecede, el anticuerpo comprende (a) un dominio VH
 35 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33 y (b) un dominio VL que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

En algunas modalidades del aspecto que antecede, el anticuerpo comprende (a) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51 y (b) un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38.

- 5 En algunas modalidades del aspecto que antecede, el anticuerpo comprende (a) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51 y (b) un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35.

En algunas modalidades del aspecto que antecede, el anticuerpo comprende (a) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51 y (b) un dominio VL que
10 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37.

En algunas modalidades del aspecto que antecede, el anticuerpo comprende (a) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51 y (b) un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

- En algunas modalidades del aspecto que antecede, el anticuerpo comprende (a) una cadena
15 pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 48 y (b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 50.

En algunas modalidades del aspecto que antecede, el anticuerpo comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49 y (b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 50.

- 20 En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos anteriores, el anticuerpo es capaz de inhibir la unión de VEGF a un receptor de VEGF. En algunas modalidades, el receptor de VEGF es el receptor 1 de VEGF (Flt-1). En algunas modalidades, el receptor de VEGF es el receptor 2 de VEGF (KDR).

- En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos anteriores, el anticuerpo se une a un VEGF
25 humano (hVEGF) con una Kd de alrededor de 2 nM o menor. En algunas modalidades, el anticuerpo une hVEGF con una Kd entre alrededor de 75 pM y alrededor de 2 nM. En algunas modalidades, el anticuerpo une hVEGF con una Kd entre alrededor de 75 pM y alrededor de 600 pM. En algunas modalidades, el anticuerpo une hVEGF con una Kd entre alrededor de 75 pM y alrededor de 500 pM. En algunas modalidades, el anticuerpo une hVEGF con una Kd de alrededor
30 de 80 pM. En algunas modalidades, el anticuerpo une hVEGF con una Kd de alrededor de 60 pM.

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos anteriores, el anticuerpo tiene una temperatura de fusión (Tm) de más de alrededor de 83.5 °C. En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una Tm de alrededor de 85 °C a alrededor de 91 °C. En algunas modalidades, el anticuerpo tiene un Tm de alrededor de 89 °C.

- 35 En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos anteriores, el anticuerpo tiene un punto

isoeléctrico (pI) de menos de 8. En algunas modalidades, el anticuerpo tiene un pI de alrededor de 5 a alrededor de 7. En algunas modalidades, el anticuerpo tiene un pI de alrededor de 5 a alrededor de 6.

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos anteriores, el anticuerpo es monoclonal,
5 humano, humanizado o quimérico.

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos anteriores, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo que une VEGF. En algunas modalidades, el fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en fragmentos Fab, Fab-C, Fab'-SH, Fv, scFv y (Fab')₂. En algunas modalidades, el fragmento de anticuerpo es un Fab.

10 En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos precedentes, el anticuerpo es un anticuerpo monoespecífico. En otras modalidades de cualquiera de los aspectos precedentes, el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico. En algunas modalidades, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico se une a VEGF y una segunda molécula biológica seleccionada del grupo que consiste en interleucina 1 β (IL-1 β);
15 interleucina 6 (IL-6); receptor de interleucina 6 (IL-6R); interleucina 13 (IL-13); receptor de IL-13 (IL-13R); PDGF; angiopoyetina; angiopoyetina 2; Tie2; S1P; integrinas α v β 3, α v β 5 y α 5 β 1; betacelulina; apelina/APJ; eritropoyetina; factor de complemento D; TNF α ; HtrA1; un receptor de VEGF; receptor de ST-2; y una proteína genéticamente vinculada al riesgo de degeneración macular asociada a la edad (AMD). En algunas modalidades, el receptor de VEGF es VEGFR1,
20 VEGFR2, VEGFR3, receptor de VEGF unido a la membrana (mbVEGFR) o receptor de VEGF soluble (sVEGFR). En algunas modalidades, la proteína genéticamente vinculada al riesgo de AMD se selecciona del grupo que consiste en componentes de la vía de complemento C2, factor B, factor H, CFHR3, C3b, C5, C5a y C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; interleucina 8 (IL-8); CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC, COL10A1 y TNFRSF10A.

25 En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos precedentes, el anticuerpo es un anticuerpo modificado con cisteína. En algunas modalidades, el anticuerpo modificado con cisteína comprende una mutación de cisteína en la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en HC-A118C, HC-A140C y HC-L174C (numeración de EU), o una mutación de cisteína en la cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en LC-K149C y LC-V205C (numeración de Kabat). En
30 algunas modalidades, la mutación de cisteína en la cadena pesada es HC-A118C (numeración de EU). En algunas modalidades, la mutación de cisteína en la cadena pesada es HC-A140C (numeración de EU). En algunas modalidades, la mutación de cisteína en la cadena pesada es HC-L174C (numeración de EU). En algunas modalidades, la mutación de cisteína en la cadena ligera es LC-K149C (numeración de Kabat). En algunas modalidades, la mutación de cisteína en la
35 cadena ligera es LC-V205C (numeración de Kabat). En algunas modalidades, el polímero de HA

se une de forma covalente al anticuerpo en la mutación de cisteína.

En otro aspecto, cualquiera de los conjugados de anticuerpo precedentes se pueden utilizar como un medicamento.

En otro aspecto, cualquiera de los conjugados de anticuerpo precedentes se pueden utilizar en la
5 fabricación de un medicamento para tratar un trastorno ocular en un sujeto.

En otro aspecto, cualquiera de los conjugados de anticuerpo precedentes se pueden utilizar en la reducción o inhibición de angiogénesis en un sujeto con un trastorno ocular.

En otro aspecto, cualquiera de los conjugados de anticuerpo precedentes se pueden utilizar en el tratamiento de un trastorno ocular en un sujeto.

- 10 En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos precedentes, el trastorno ocular se selecciona del grupo que consiste en degeneración macular asociada a la edad (AMD), degeneración macular, edema macular, edema macular diabético (DME) (que incluye DME focal distinto al centro y DME difuso implicado en el centro), retinopatía, retinopatía diabética (DR) (que incluye DR proliferativa (PDR), DR no proliferativa (NPDR) y DR de altitud elevada), otras
15 retinopatías asociadas a la isquemia, retinopatía de la prematuridad (ROP), oclusión de vena retiniana (RVO) (que incluye formas centrales (CRVO) y ramificadas (BRVO)), CNV (que incluye CNV miopica), neovascularización corneal, una enfermedad asociada a la neovascularización corneal, neovascularización retinal, una enfermedad asociada a la neovascularización retinal/coroidal, miopía patológica, enfermedad de von Hippel-Lindau, histoplasmosis del ojo,
20 vitreorretinopatía exudativa familiar (FEVR), enfermedad de Coats, enfermedad de Norrie, síndrome de osteoporosis-pseudoglioma (OPPG), hemorragia subconjuntival, rubeosis, enfermedad neovascular ocular, glaucoma neovascular, retinitis pigmentosa (RP), retinopatía hipertensiva, proliferación angiomas retiniana, telangiectasia macular, neovascularización del iris, neovascularización intraocular, degeneración retiniana, edema macular cistoide (CME),
25 vasculitis, papiloedema, retinitis, conjuntivitis (que incluye conjuntivitis infecciosa y conjuntivitis no infecciosa (por ejemplo, alérgica)), amaurosis congénita de Leber, uveitis (que incluye uveitis infecciosa y no infecciosa), coroiditis, histoplasmosis ocular, blefaritis, ojo seco, herida de ojo por traumatismo y enfermedad de Sjögren. En algunas modalidades, el trastorno ocular es AMD, DME, DR o RVO. En algunas modalidades, el trastorno ocular es AMD. En algunas modalidades, la AMD
30 es AMD húmeda. En algunas modalidades, el trastorno ocular es DME.

En otro aspecto, la invención presenta una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los conjugados de anticuerpo descritos en la presente, un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende además un segundo agente, en donde el segundo agente se selecciona del grupo que consiste en
35 un anticuerpo, un agente antiangiogénico, una citocina, un antagonista de citocina, un

corticosteroide, un analgésico y un compuesto que se une a una segunda molécula biológica. En algunas modalidades, el agente antiangiogénico es un antagonista de VEGF. En algunas modalidades, el antagonista de VEGF es un anticuerpo anti-VEGF, un anticuerpo del receptor anti-VEGF, una proteína de fusión del receptor de VEGF soluble, un aptámero, un DARPIn® anti-VEGF o un inhibidor de la tirosina cinasa de VEGFR. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-VEGF es ranibizumab (LUCENTIS®), RTH-258, o un anticuerpo anti-VEGF biespecífico. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-VEGF biespecífico es un anticuerpo anti-VEGF/anti-Ang2. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-VEGF/anti-Ang2 es RG-7716. En algunas modalidades, la proteína de fusión del receptor de VEGF es aflibercept (EYLEA®). En algunas modalidades, el aptámero es pegaptanib (MACUGEN®). En algunas modalidades, el DARPIn® anti-VEGF es abicipar pegol. En algunas modalidades, el inhibidor de tirosina cinasa de VEGFR se selecciona del grupo que consiste en 4-(4-bromo-2-fluoroanilino)-6-metoxi-7-(1-metilpiperidin-4-ilmetoxi)quinazolina (ZD6474), 4-(4-fluoro-2-metilindol-5-iloxi)-6-metoxi-7-(3-pirrolidin-1-ilpropoxi)quinazolina (AZD2171), vatalanib (PTK787), semaxaminib (SU5416) y SUTENT® (sunitinib). En algunas modalidades, la segunda molécula biológica se selecciona del grupo que consiste en IL-1 β ; IL-6; IL-6R; IL-13; IL-13R; PDGF; angiopoyetina; angiopoyetina 2; Tie2; S1P; integrinas $\alpha\beta$ 3, $\alpha\beta$ 5 y α 5 β 1; betacelulina; apelina/APJ; eritropoyetina; factor de complemento D; TNF α ; HtrA1; un receptor de VEGF; receptor de ST-2 y una proteína genéticamente vinculada al riesgo de AMD. En algunas modalidades, el receptor de VEGF es VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, mbVEGFR o sVEGFR. En algunas modalidades, la proteína genéticamente vinculada al riesgo de AMD se selecciona del grupo que consiste en componentes de la vía de complemento C2, factor B, factor H, CFHR3, C3b, C5, C5a y C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; IL-8; CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC, COL10A1 y TNFRSF10A. En algunas modalidades, el compuesto que se une a una segunda molécula biológica es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este. En algunas modalidades, el fragmento de anticuerpo de unión al antígeno se selecciona del grupo que consiste en fragmentos Fab, Fab-C, Fab'-SH, Fv, scFv y (Fab')₂. En algunas modalidades, el fragmento de anticuerpo de unión al antígeno es un Fab.

En otro aspecto, cualquiera de las composiciones farmacéuticas precedentes se pueden utilizar como un medicamento.

En otro aspecto, cualquiera de las composiciones farmacéuticas precedentes se pueden utilizar en la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno ocular en un sujeto.

En otro aspecto, cualquiera de las composiciones farmacéuticas precedentes se pueden utilizar en la reducción o inhibición de angiogénesis en un sujeto con un trastorno ocular.

En otro aspecto, cualquiera de las composiciones farmacéuticas precedentes se pueden utilizar en el tratamiento de un trastorno ocular en un sujeto.

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos precedentes, el trastorno ocular se selecciona del grupo que consiste en degeneración macular asociada a la edad (AMD), degeneración macular, edema macular, edema macular diabético (DME) (que incluye DME focal distinto al centro y DME difuso implicado en el centro), retinopatía, retinopatía diabética (DR) (que incluye DR proliferativa (PDR), DR no proliferativa (NPDR) y DR de altitud elevada), otras retinopatías asociadas a la isquemia, retinopatía de la prematuridad (ROP), oclusión de vena retiniana (RVO) (que incluye formas centrales (CRVO) y ramificadas (BRVO)), CNV (que incluye CNV miopica), neovascularización corneal, una enfermedad asociada a la neovascularización corneal, neovascularización retinal, una enfermedad asociada a la neovascularización retinal/coroidal, miopía patológica, enfermedad de von Hippel-Lindau, histoplasmosis del ojo, vitreoretinopatía exudativa familiar (FEVR), enfermedad de Coats, enfermedad de Norrie, síndrome de osteoporosis-pseudoglioma (OPPG), hemorragia subconjuntival, rubeosis, enfermedad neovascular ocular, glaucoma neovascular, retinitis pigmentosa (RP), retinopatía hipertensiva, proliferación angiomasosa retiniana, telangiectasia macular, neovascularización del iris, neovascularización intraocular, degeneración retiniana, edema macular cistoide (CME), vasculitis, papiloedema, retinitis, conjuntivitis (que incluye conjuntivitis infecciosa y conjuntivitis no infecciosa (por ejemplo, alérgica)), amaurosis congénita de Leber, uveitis (que incluye uveitis infecciosa y no infecciosa), coroiditis, histoplasmosis ocular, blefaritis, ojo seco, herida de ojo por traumatismo y enfermedad de Sjögren. En algunas modalidades, el trastorno ocular es AMD, DME, DR o RVO. En algunas modalidades, el trastorno ocular es AMD. En algunas modalidades, la AMD es AMD húmeda. En algunas modalidades, el trastorno ocular es DME.

En otro aspecto, la invención presenta un método para la reducción o inhibición de la angiogénesis en un sujeto con un trastorno ocular que comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de cualquiera de los conjugados de anticuerpo descritos en la presente o cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente, de forma de reducir o inhibir la angiogénesis en el sujeto.

En otro aspecto, la invención presenta un método para tratar un trastorno ocular que comprende la administración de una cantidad eficaz de cualquiera de los conjugados de anticuerpo descritos en la presente o cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente a un sujeto que necesita dicho tratamiento.

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos precedentes, el trastorno ocular se selecciona del grupo que consiste en degeneración macular asociada a la edad (AMD), degeneración macular, edema macular, edema macular diabético (DME) (que incluye DME focal distinto al centro y DME difuso implicado en el centro), retinopatía, retinopatía diabética (DR) (que incluye DR proliferativa (PDR), DR no proliferativa (NPDR) y DR de altitud elevada), otras

retinopatías asociadas a la isquemia, retinopatía de la prematuridad (ROP), oclusión de vena retiniana (RVO) (que incluye formas centrales (CRVO) y ramificadas (BRVO)), CNV (que incluye CNV miopica), neovascularización corneal, una enfermedad asociada a la neovascularización corneal, neovascularización retinal, una enfermedad asociada a la neovascularización retinal/coroidal, miopía patológica, enfermedad de von Hippel-Lindau, histoplasmosis del ojo, vitreorretinopatía exudativa familiar (FEVR), enfermedad de Coats, enfermedad de Norrie, síndrome de osteoporosis-pseudoglioma (OPPG), hemorragia subconjuntival, rubeosis, enfermedad neovascular ocular, glaucoma neovascular, retinitis pigmentosa (RP), retinopatía hipertensiva, proliferación angiomasosa retiniana, telangiectasia macular, neovascularización del iris, neovascularización intraocular, degeneración retiniana, edema macular cistoide (CME), vasculitis, papiloedema, retinitis, conjuntivitis (que incluye conjuntivitis infecciosa y conjuntivitis no infecciosa (por ejemplo, alérgica)), amaurosis congénita de Leber, uveitis (que incluye uveitis infecciosa y no infecciosa), coroiditis, histoplasmosis ocular, blefaritis, ojo seco, herida de ojo por traumatismo y enfermedad de Sjögren. En algunas modalidades, el trastorno ocular es AMD, DME, DR o RVO. En algunas modalidades, el trastorno ocular es AMD. En algunas modalidades, la AMD es AMD húmeda. En algunas modalidades, el trastorno ocular es DME.

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos precedentes, el método comprende además la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un segundo agente, en donde el segundo agente se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, un agente antiangiogénico, una citocina, un antagonista de citocina, un corticosteroide, un analgésico y un compuesto que se une a una segunda molécula biológica. En algunas modalidades, el agente antiangiogénico es un antagonista de VEGF. En algunas modalidades, el antagonista de VEGF es un anticuerpo anti-VEGF, un anticuerpo del receptor anti-VEGF, una proteína de fusión del receptor de VEGF soluble, un aptámero, un DARPIn® anti-VEGF o un inhibidor de la tirosina cinasa de VEGFR. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-VEGF es ranibizumab (LUCENTIS®), RTH-258, o un anticuerpo anti-VEGF biespecífico. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-VEGF biespecífico es un anticuerpo anti-VEGF/anti-Ang2. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-VEGF/anti-Ang2 es RG-7716. En algunas modalidades, la proteína de fusión del receptor de VEGF es aflibercept (EYLEA®). En algunas modalidades, el aptámero es pegaptanib (MACUGEN®). En algunas modalidades, el DARPIn® anti-VEGF es abicipar pegol. En algunas modalidades, el inhibidor de tirosina cinasa de VEGFR se selecciona del grupo que consiste en 4-(4-bromo-2-fluoroanilino)-6-metoxi-7-(1-metilpiperidin-4-ilmetoxi)quinazolina (ZD6474), 4-(4-fluoro-2-metilindol-5-iloxi)-6-metoxi-7-(3-pirrolidin-1-ilpropoxi)quinazolina (AZD2171), vatalanib (PTK787), semaxaminib (SU5416) y SUTENT® (sunitinib). En algunas modalidades, la segunda molécula biológica se selecciona del grupo que consiste en IL-1β; IL-6;

IL-6R; IL-13; IL-13R; PDGF; angiopoyetina; angiopoyetina 2; Tie2; S1P; integrinas $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ y $\alpha 5\beta 1$; betacelulina; apelina/APJ; eritropoyetina; factor de complemento D; TNF α ; HtrA1; un receptor de VEGF; receptor de ST-2 y una proteína genéticamente vinculada al riesgo de AMD. En algunas modalidades, el receptor de VEGF es VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, mbVEGFR o sVEGFR. En algunas modalidades, la proteína genéticamente vinculada al riesgo de AMD se selecciona del grupo que consiste en componentes de la vía de complemento C2, factor B, factor H, CFHR3, C3b, C5, C5a y C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; IL-8; CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LPC, COL10A1 y TNFRSF10A. En algunas modalidades, el compuesto que se une a una segunda molécula biológica es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este. En algunas modalidades, el fragmento de anticuerpo de unión al antígeno se selecciona del grupo que consiste en fragmentos Fab, Fab-C, Fab'-SH, Fv, scFv y (Fab')₂.

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos precedentes, el conjugado de anticuerpo o la composición farmacéutica se administra por vía intravítrea, ocular, intraocular, yuxtaescleral, subtenoniana, supercoroidea, tópica, intravenosa, intramuscular, intradérmica, percutánea, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intrapleural, intratraqueal, intratecal, intranasal, intravaginal, intrarrectal, tópica, intratumoral, intraperitoneal, peritoneal, intraventricular, subcutánea, subconjuntival, intravesicular, mucosa, intrapericárdica, intraumbilical, intraorbital, oral, transdérmica, mediante inhalación, mediante inyección, mediante gotas para ojos, mediante implante, mediante infusión, mediante infusión continua, mediante perfusión localizada afectando las células objetivo directamente, mediante catéter, mediante lavado, en cremas o en composiciones lipídicas. En algunas modalidades, el conjugado de anticuerpo o la composición farmacéutica se administran por vía intravítrea, ocular, intraocular, yuxtaescleral, subtenoniana, supercoroidea o tópica. En algunas modalidades, el conjugado de anticuerpo o la composición farmacéutica se administran por vía intravítrea mediante inyección. En algunas modalidades, el conjugado de anticuerpo o la composición farmacéutica se administran por vía tópica mediante ungüento o gotas para ojos. En algunas modalidades, el conjugado de anticuerpo o la composición farmacéutica se administran mediante un dispositivo de administración en puertos.

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos precedentes, el sujeto es un ser humano.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1A** es una gráfica que ilustra una distribución de población de pesos moleculares (en términos de masa molar) en una muestra representativa de HA de 200 kDa.

La **Figura 1B** es una gráfica que ilustra una distribución de población de la cantidad de maleimidias

en una cadena de HA de 200 kDa que resulta de una simulación de Monte Carlo de la modificación estocástica con cada grupo ácido con un 5% de posibilidad de modificación.

La **Figura 1C** es una gráfica que ilustra la polidispersión de polímeros de HA de 40 kDa, 200 kDa y 600 kDa. La tabla a continuación de la gráfica muestra el peso molecular promedio en cantidad (Mn), el peso molecular promedio en peso (Mw), el índice de polidispersión (PDI) y el rango (en términos de Mw) de peso molecular (MW) para las muestras indicadas.

La **Figura 2** es una serie de gráficas que ilustran que los conjugados de HA-G6.31.AARR tienen diferencias en la estabilidad física en condiciones de tensión fisiológicamente relevantes, tal como se analizó mediante la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) en línea con el índice de refracción (RI) y los detectores de dispersión de luz de múltiples ángulos (MALS) (SEC-RI-MALS). La etiquetas de la serie hacen referencia al peso molecular de la estructura principal de HA (40 kDa (40K); 200 kDa (200K) y 600 kDa (600K), y el nivel de carga del Fab.

La **Figura 3** es una serie de gráficas que ilustran cambios en los perfiles de retención de SEC conforme al transcurso del tiempo para HA40K-G6.31.AARR-4.7% (panel izquierdo), HA200K-G6.31.AARR-4.7% (panel central) y HA600K-G6.31.AARR-2.1% (panel derecho), lo que demuestra que los tiempos de retención de SEC se desplazan a tiempos posteriores (tamaño hidrodinámico más pequeño) y el alcance de este desplazamiento depende del peso molecular de la estructura principal del HA.

La **Figura 4** es una serie de gráficas que ilustran los datos de SEC-RI-MALS graficados como fracción de peso acumulado para HA40K-G6.31.AARR-4.7% (panel izquierdo), HA200K-G6.31.AARR-4.7% (panel central) y HA600K-G6.31.AARR-2.1% (panel derecho).

La **Figura 5** es una gráfica que ilustra los resultados de la caracterización de SEC-RI-MALS de HA polidisperso comercial (negro) y HA monodisperso (gris), lo que demuestra la diferencia en distribuciones de masa entre las dos técnicas de producción. La tabla en el panel derecho muestra los valores de Mn, Mw y PDI determinados mediante este análisis.

La **Figura 6** es una gráfica que ilustra los resultados de la caracterización de SEC-RI-MALS de HA200K-G6.31.AARR polidisperso (negro) y HA150K-G6.31.AARR monodisperso (gris), lo que demuestra la diferencia en distribuciones de masa. La tabla en el panel derecho muestra los valores de Mn, Mw y PDI determinados mediante este análisis.

La **Figura 7** es un diagrama esquemático que ilustra que las moléculas de formato Fab-C estándar están diseñadas para contener un residuo de cisteína libre útil para la conjugación mediante la extensión de la secuencia de péptido bisagra de Fab estándar al primer o segundo disulfuro de cisteína bisagra. A efectos de minimizar o prevenir el apareamiento entre el disulfuro intercatenario y este residuo de cisteína libre, en su lugar, la cisteína se puede mutar en la superficie del Fab en una ubicación espacialmente más distanciada del disulfuro intercatenario (al que se hace

referencia en la presente como «TioFabs»).

Las **Figuras 8A-8C** son una serie de diagramas esquemáticos que muestran que la flexibilidad y la proximidad espacial de la secuencia bisagra pueden llevar al reordenamiento en tres estados de disulfuro posibles que dejan tres residuos de cisteína diferentes disponibles para la conjugación.

- 5 La Figura 8A ilustra la configuración pretendida en la que la cisteína de la secuencia bisagra se reduce y se encuentra disponible para la conjugación. La Figura 8B ilustra una variante de cadena pesada (HC) ciclada, en la que la cisteína bisagra forma un enlace disulfuro con el residuo de cisteína de HC que normalmente es parte del enlace disulfuro intercatenario, lo que deja a la cisteína de disulfuro intercatenario de cadena ligera (LC) disponible para la conjugación. La Figura 10 8C ilustra una variante de LC en la que la cisteína bisagra forma un enlace disulfuro con la cisteína de LC que normalmente forma parte del enlace disulfuro intercatenario, lo que deja a la cisteína de disulfuro intercatenario de HC disponible para la conjugación.

- La **Figura 9** ilustra una serie de gráficas que muestran los resultados de una serie de experimentos de formación de casquetes de maleimida y digestión de Lys-C limitada realizados en 15 G6.31.AARR.Fab-C y analizados mediante espectrometría de masas en analizador de tiempo de vuelo de cromatografía líquida de ultra rendimiento de fase inversa (RP-UPLC-TOF). Las cifras superiores a los picos son conteos de iones totales para ese pico y son una medida del área pico.

- Las **Figuras 10A y 10B** son una serie de gráficas que ilustran los resultados de digestiones enzimáticas de Lys-C limitada (Figura 10A) e hialuronidasa (HAasa) (Figura 10B) de conjugados 20 de HA-G6.31.AARR, lo que confirma la presencia de variantes de conjugación asociadas a la conjugación mediante las dos cisteínas normalmente ocupadas por el disulfuro intercatenario.

La **Figura 11** es una serie de gráficas que ilustran que la conjugación de TioFabs de G6.31.AARR con HA200K-maleimida procedió normalmente en comparación con G6.31.AARR.Fab-C, aunque la conversión de Fab a conjugado fue menor para las muestras de TioFab.

- 25 La **Figura 12** es una gráfica que ilustra la desconjugación de un polímero modelo de polietilenglicol (PEG)-maleimida de G6.31.AARR de diferentes formatos en PBS + glutatona oxidada (GSSG) 2 mM a 37 °C, tal como se analizó mediante RP-UPLC-TOF.

La **Figura 13A** muestra el esquema de numeración de Kabat para la cadena ligera 4D5.

- La **Figura 13B** muestra un esquema de numeración secuencial (columna izquierda) que empieza 30 en el extremo N en comparación con el esquema de numeración de Kabat (columna media) y el esquema de numeración de EU (columna derecha) para el anticuerpo 4D5.

- La **Figura 14** es una gráfica que ilustra que los conjugados de HA-G6.31.AARR producidos a partir de HA monodisperso muestran estabilidad física mejorada bajo tensión fisiológica a las cuatro semanas, en comparación con los conjugados de HA-G6.31.AARR de tamaño similar producidos a 35 partir de HA polidisperso. La tabla en el panel derecho muestra Mw (kDa) en las semanas 0, 2 y 4.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. DEFINICIONES

El término «aproximadamente», tal como se utiliza en la presente, hace referencia al intervalo de error usual para el respectivo valor que conoce fácilmente el experto en la técnica de este campo. La referencia a «alrededor de» un valor o parámetro en la presente incluye (y describe) modalidades que están dirigidas a ese valor o parámetro en sí.

Un «marco humano aceptor» a los efectos de la presente es un marco que comprende la secuencia de aminoácidos de un marco de dominio variable de cadena ligera (VL) o de un marco de dominio variable de cadena pesada (VH) derivado de un marco de inmunoglobulina humana o de un marco de consenso humano, tal como se definen a continuación. Un marco humano aceptor «derivado de» un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de este, o puede contener cambios en secuencias de aminoácidos. En algunas modalidades, la cantidad de cambios de aminoácidos es 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos. En algunas modalidades, el marco aceptor humano VL tiene una secuencia idéntica a la secuencia del marco de consenso humano o la secuencia del marco de inmunoglobulina humana VL.

La «afinidad» hace referencia a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, tal como se usa en la presente, «afinidad de unión» se refiere a afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X respecto a su compañera Y puede estar representada generalmente por la constante de disociación (Kd). La afinidad puede calcularse usando métodos comunes conocidos en la técnica, que incluyen los descritos en la presente. A continuación se describen modalidades específicas ilustrativas y de ejemplo para medir la afinidad de unión.

Un anticuerpo «madurado por afinidad» se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables (HVR) y/o regiones marco (FR), en comparación con un anticuerpo original que no posee tales alteraciones, donde tales alteraciones provocan una mejora de la afinidad del anticuerpo para antígeno.

La expresión «factor de crecimiento edotelial vascular» o «VEGF» hace referencia a la proteína A del factor de crecimiento edotelial vascular, tal como lo ejemplifica la SEQ ID NO: 47 (ver también el número de acceso Swiss Prot P15692, id. del gen (NCBI): 7422). El término «VEGF» comprende la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47, así como

también homólogos e isoformas de esta. El término «VEGF» también comprende las isoformas conocidas, por ejemplo, isoformas de empalme, de VEGF, por ejemplo, VEGF₁₁₁, VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆, junto con las formas procesadas y alélicas de origen natural de estas, las que incluyen el factor de crecimiento de célula endotelial vascular humana de 110 aminoácidos generado mediante la escisión de plasmina de VEGF₁₆₅, tal como se describió en Ferrara *Mol. Biol. Cell.* 21:687 (2010), Leung et ál., *Science*, 246:1306 (1989) y Houck et ál., *Mol. Endocrin.*, 5:1806 (1991). El término «VEGF» también se refiere a VEGF de especies no humanas tales como ratón, rata o primate. En ocasiones, el VEGF de una especie específica se indica con expresiones tales como hVEGF para el VEGF humano o mVEGF para VEGF murino y similares. El término «VEGF» también se usa para hacer referencia a formas truncadas del polipéptido que comprenden los aminoácidos 8 a 109 o 1 a 109 del factor de crecimiento de células endoteliales vasculares humano de 165 aminoácidos. La referencia a estas formas de VEGF se pueden identificar en la presente solicitud, por ejemplo, como VEGF₁₀₉, VEGF (8-109), VEGF (1-109) o VEGF₁₆₅. Las posiciones de aminoácidos para un VEGF natural «truncado» se enumeran tal como se indica en la secuencia de VEGF natural. Por ejemplo, la posición de aminoácido 17 (metionina) en el VEGF natural truncado es también la posición 17 (metionina) en el VEGF natural. El VEGF natural truncado tiene una afinidad de unión con los receptores KDR y Flt-1 comparable con la del VEGF natural. La expresión «variante de VEGF», tal como se utiliza en la presente, hace referencia a un polipéptido de VEGF que incluye una o más mutaciones de aminoácidos en la secuencia de VEGF natural. De manera opcional, la una o más mutaciones de aminoácidos incluyen sustituciones de aminoácidos. A efectos de designar de forma abreviada las variantes de VEGF descritas en la presente, se observa que los números hacen referencia a la posición del residuo aminoácido a lo largo de la secuencia de aminoácidos del VEGF natural putativo (provisto en Leung et ál., *supra* y Houck et ál., *supra*). Salvo que se especifique de otra manera, el término «VEGF» tal como se utiliza en la presente indica VEGF-A.

Los términos «anticuerpo anti-VEGF», «un anticuerpo que se une a VEGF» y «anticuerpo que se une específicamente a VEGF» se refieren a un anticuerpo que puede unirse a VEGF con suficiente afinidad de modo que el anticuerpo sea útil como agente terapéutico y/o de diagnóstico al dirigirse a VEGF. En una modalidad, el alcance de la unión de un anticuerpo anti-VEGF a una proteína que no es VEGF no relacionada es menor que alrededor de 10 % de la unión del anticuerpo a VEGF tal como se midió, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA). En determinadas modalidades, un anticuerpo que se une a VEGF tiene una constante de disociación (Kd) de $\geq 1\mu\text{M}$, $\geq 100\text{ nM}$, $\geq 10\text{ nM}$, $\geq 1\text{ nM}$, $\geq 0.1\text{ nM}$, $\geq 0.01\text{ nM}$, o $\geq 0.001\text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, desde 10^{-9} M a 10^{-13} M). En determinadas modalidades, un anticuerpo anti-VEGF se une a un epítipo de VEGF que se conserva entre VEGF de diferentes

especies.

El término «anticuerpo» se utiliza en la presente en el sentido más amplio y comprende varias estructuras de anticuerpo, que incluyen, de modo no taxativo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo, siempre que exhiban la actividad deseada de unión al antígeno.

Un «fragmento de anticuerpo» hace referencia a una molécula distinta a un anticuerpo intacto que comprende una parte de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al cual se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, de modo no taxativo, Fv, Fab, Fab', Fab-C, Fab'-SH, F(ab')₂; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos de cadena simple (por ejemplo, scFv); y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. En algunos casos, los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, de modo no taxativo, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos de cadena simple (por ejemplo, scFv); y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos, denominados fragmentos «Fab», y un fragmento «Fc» residual, cuya designación refleja la capacidad de cristalizarse fácilmente. El fragmento Fab consiste en una cadena ligera (L) completa junto con el dominio de región variable de la cadena pesada (H)(VH) y el primer dominio constante de una cadena pesada (CH1). El tratamiento de un anticuerpo con pepsina produce un único fragmento F(ab')₂ grande que corresponde aproximadamente a dos fragmentos Fab enlazados por disulfuro con actividad de unión al antígeno divalente y que mantiene la capacidad de reticular antígenos. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab porque tienen pocos residuos adicionales en el carboxilo terminal del dominio CH1 que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Las moléculas Fab-C son moléculas de Fab que se expresan de manera que la secuencia se encuentre trunca en la primera cisteína bisagra, lo que resulta en un Fab con una cisteína libre directamente tras la expresión (ver, por ejemplo, Shatz et ál. *Mol. Pharmaceutics* 2016; identificador PubMed (PMID) 27244474). Por ejemplo, una molécula Fab-C puede tener una cisteína libre en la posición Cys227 de la cadena pesada. En otros casos, una molécula Fab-C puede tener una cisteína libre en la posición Cys229 de la cadena pesada. Fab'-SH es la designación que se utiliza en la presente para Fab', en el cual el o los residuos de cisteína de los dominios constantes contienen un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' con cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

La expresión «región Fc» se usa en la presente para definir una región de extremo C de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una parte de la región constante. El

término incluye regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. En una modalidad, una región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, al extremo carboxilo de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina en el extremo C (Lys447) de la región Fc puede estar presente o no. A menos que se especifique de otro modo en la presente, la numeración de los residuos de aminoácidos en la región Fc o región constante se realiza de acuerdo con el sistema de numeración EU, también denominado «índice de EU», tal como se describe en Kabat et ál., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

«Fv» consiste en un dímero de un dominio de región variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación estrecha no covalente. Del plegamiento de estos dos dominios emanan seis bucles hipervariables (3 bucles cada uno de la cadena H y L) que contribuyen los residuos de aminoácido para la unión a antígeno y le confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. No obstante, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque a menudo a una afinidad menor que el sitio de unión completo.

Los «Fv de cadena simple», abreviados también como «sFv» o «scFv», son fragmentos de anticuerpos que comprenden los dominios de anticuerpos VH y VL conectados a una única cadena de polipéptidos. Preferentemente, el polipéptido sFv comprende también un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para un resumen de sFv, ver Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, tomo 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994).

El término «diacuerpos» hace referencia a pequeños fragmentos de anticuerpo preparados mediante la construcción de fragmentos sFv (ver párrafo anterior) con enlazadores cortos (alrededor de 5-10 residuos) entre los dominios VH y VL, de manera que se logre el emparejamiento entre cadenas pero no dentro de las cadenas de los dominios V, lo que produce un fragmento bivalente, es decir, un fragmento que posee dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos sFv «de entrecruzamiento» en los que los dominios VH y VL de los dos anticuerpos están presentes en diferentes cadenas de polipéptidos. Se describen diacuerpos con más detalle en, por ejemplo, EP 404,097; WO 93/11161; y Hollinger et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 90:6444-6448 (1993)).

Un anticuerpo «de bloqueo» o un anticuerpo «antagonista» es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. Determinados anticuerpos bloqueadores o antagonistas inhiben de forma sustancial o completa la actividad biológica del antígeno.

Un «anticuerpo que se une al mismo epítopo» como un anticuerpo de referencia se refiere a un

anticuerpo que bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en un ensayo de competición en 50% o más, y en cambio, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo a su antígeno en un ensayo de competición en 50% o más. En la presente se proporciona un ejemplo de ensayo de competencia.

- 5 El término anticuerpo «quimérico» se refiere a un anticuerpo en el que una parte de la cadena pesada y/o ligera deriva de una fuente o especie particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera deriva de una fuente o especie diferente.

La «clase» de un anticuerpo hace referencia al tipo de dominio constante o región constante que posee su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e
10 IgM, y varios de estos pueden dividirse de manera adicional 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 α , δ , ϵ , γ e μ , respectivamente.

Un «anticuerpo modificado con cisteína» o «variante de anticuerpo modificado con cisteína» es un anticuerpo en el que uno o más residuos de un anticuerpo se sustituyen con residuos de cisteína.

- 15 En determinados casos, se puede hacer referencia a los anticuerpos modificados con cisteína como anticuerpos THIOMAB™ o anticuerpos TioFab. El o los grupos tiol de los anticuerpos modificados con cisteína se pueden conjugar con otros restos, por ejemplo, polímeros (por ejemplo, polímeros de HA, los que incluyen polímeros de HA monodispersos). En modalidades particulares, los residuos sustituidos se producen en sitios accesibles del anticuerpo. Al sustituir
20 esos residuos con cisteína, se ubican grupos tiol reactivos en sitios accesibles del anticuerpo y se pueden utilizar para conjugar el anticuerpo con otros restos, tal como polímeros (por ejemplo, polímeros de HA). Por ejemplo, un anticuerpo modificado con cisteína puede ser un anticuerpo con una mutación simple de un residuo natural no cisteína en una cisteína en la cadena ligera (por ejemplo, LC-G64C, LC-I106C, LC-R108C, LC-R142C o LC-K149C de acuerdo con la numeración de Kabat) o en la cadena pesada (por ejemplo, HC-D101C, HC-V184C, o HC-T205C de acuerdo con la numeración de Kabat, o HC-T114C, HC-A140C, HC-L174C, HC-L179C, HC-T187C, HC-T209C, HC-V262C, HC-G371C, HC-Y373C, HC-E382C, HC-S424C, HC-N434C, y HC-Q438C de acuerdo con la numeración EU (es decir, HC-A136C de acuerdo con la numeración de Kabat es HC-A140C de acuerdo con la numeración EU)) (ver las Figuras 13A y 13B). En casos particulares,
25 un anticuerpo modificado con cisteína puede incluir una mutación de cisteína en la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en HC-A118C, HC-A140C y HC-L174C (numeración de EU), o una mutación de cisteína en la cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en LC-V205C y LC-K149C (numeración de Kabat). En algunos casos, un anticuerpo modificado con cisteína tiene una única mutación de cisteína ya sea en la cadena pesada o ligera, de manera que cada
30 anticuerpo de longitud completa (es decir, un anticuerpo con dos cadenas pesadas y dos cadenas
35

ligeras) tiene dos residuos de cisteína modificados, y cada fragmento de Fab tiene un residuo de cisteína modificado. En otros casos, un anticuerpo modificado con cisteína tiene más de una mutación de cisteína (por ejemplo, 2, 3, 4 o 5 mutaciones de cisteína).

Un «aminoácido libre de cisteína» hace referencia a un residuo aminoácido cisteína modificada como anticuerpo original, con un grupo funcional tiol (-SH) y que no se encuentra apareado como un puente disulfuro intermolecular o intramolecular.

La expresión «valor de reactividad de tiol» es una caracterización cuantitativa de la reactividad de aminoácidos de cisteína libre. El valor de reactividad de tiol es el porcentaje de un aminoácido libre de cisteína en un anticuerpo modificado con cisteína que reacciona con un reactivo que reacciona con tiol y convertido a un valor máximo de 1. Por ejemplo, un aminoácido libre de cisteína en un anticuerpo modificado con cisteína que reacciona en 100 % de rendimiento con un reactivo que reacciona con tiol, tal como un reactivo de biotina-maleimida, para formar un anticuerpo etiquetado con biotina tiene un valor de reactividad de tiol de 1.0. Otro aminoácido de cisteína modificado en el mismo u otro anticuerpo original que reacciona en 90 % de rendimiento con un reactivo que reacciona con tiol tiene un valor de reactividad de tiol de alrededor de 0.9. Otro aminoácido de cisteína modificado en el mismo u otro anticuerpo original que reacciona en 80% de rendimiento con un reactivo que reacciona con tiol tiene un valor de reactividad de tiol de alrededor de 0.8. Otro aminoácido de cisteína modificado en el mismo u otro anticuerpo original que reacciona en 70% de rendimiento con un reactivo que reacciona con tiol tiene un valor de reactividad de tiol de alrededor de 0.7. Otro aminoácido de cisteína modificado en el mismo u otro anticuerpo original que reacciona en 60% de rendimiento con un reactivo que reacciona con tiol tiene un valor de reactividad de tiol de alrededor de 0.6. Otro aminoácido de cisteína modificado en el mismo u otro anticuerpo original que reacciona en 50% de rendimiento con un reactivo que reacciona con tiol tiene un valor de reactividad de tiol de alrededor de 0.5. Otro aminoácido de cisteína modificado en el mismo u otro anticuerpo original que reacciona en 40% de rendimiento con un reactivo que reacciona con tiol tiene un valor de reactividad de tiol de alrededor de 0.4. Otro aminoácido de cisteína modificado en el mismo u otro anticuerpo original que reacciona en 30% de rendimiento con un reactivo que reacciona con tiol tiene un valor de reactividad de tiol de alrededor de 0.3. Otro aminoácido de cisteína modificado en el mismo u otro anticuerpo original que reacciona en 20% de rendimiento con un reactivo que reacciona con tiol tiene un valor de reactividad de tiol de alrededor de 0.2. Otro aminoácido de cisteína modificado en el mismo u otro anticuerpo original que reacciona en 10% de rendimiento con un reactivo que reacciona con tiol tiene un valor de reactividad de tiol de alrededor de 0.1. Otro aminoácido de cisteína modificado en el mismo u otro anticuerpo original que no logra reaccionar completamente con un reactivo que reacciona con tiol tiene un valor de reactividad de tiol de 0. La determinación del valor de reactividad de tiol de una

cisteína particular se puede llevar a cabo mediante el ensayo ELISA (por ejemplo, un ensayo PHESELECTOR tal como se describe en la presente), espectrometría de masas, cromatografía líquida, autoradiografía, u otras pruebas analíticas cuantitativas.

5 Un «anticuerpo original» es un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la que uno o más residuos aminoácidos se reemplazan con uno o más residuos de cisteína. El anticuerpo original puede comprender una secuencia natural o de tipo salvaje. El anticuerpo original puede presentar modificaciones preexistentes en la secuencia de aminoácidos (tal como adiciones, eliminaciones y/o sustituciones) respecto a otras formas naturales, de tipo salvaje o modificadas de un anticuerpo. Un anticuerpo original se puede dirigir contra un antígeno diana de
10 interés, por ejemplo, un polipéptido biológicamente importante, tal como VEGF. Cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente (por ejemplo, anticuerpos anti-VEGF) puede ser un anticuerpo original.

«Funciones efectoras» hace referencia a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, las que varían con el isotipo de anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de
15 anticuerpos incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente de complementos (CDC, por sus siglas en inglés); unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de las células B); y activación de las células B.

«Marco» o «región marco» o «FR» hacen referencia a residuos de dominio variable distintos a los
20 residuos de la región hipervariable (HVR). Por lo general, el FR de un dominio variable consiste en cuatro dominios FR: FR1, FR2, FR3 y FR4.

Las expresiones «anticuerpo de longitud completa», «anticuerpo intacto» y «anticuerpo completo» se utilizan en la presente de manera indistinta para hacer referencia a un anticuerpo que posee una estructura sustancialmente similar a la estructura de un anticuerpo natural o que posee
25 cadenas pesadas que contienen una región Fc tal como se define en la presente.

Un «anticuerpo humano» es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana o derivado de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias que codifican anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un
30 anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión al antígeno no humanos.

Un «marco de consenso humano» es un marco que representa los residuos de aminoácidos más comunes en una selección de secuencias de marco VL o VH de inmunoglobulina humana. Por lo general, la selección de secuencias VL o VH de inmunoglobulina humana se realiza a partir de un subgrupo de secuencias de dominio variable. Generalmente, el subgrupo de secuencias es un
35 subgrupo como en Kabat et ál., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición,

publicación de NIH 91-3242, Bethesda MD (1991), tomos 1-3. En una modalidad, para el VL, el subgrupo es un subgrupo kappa I como en Kabat et ál., *supra*. En una modalidad, para el VH, el subgrupo es un subgrupo III como en Kabat et ál., *supra*.

Las formas «humanizadas» de anticuerpos no humanos (por ejemplo, roedores) son anticuerpos quiméricos que contienen una mínima cantidad de secuencia derivada del anticuerpo no humano. Mayormente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor se remplazan con residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), como ratón, rata, conejo o primate no humano, con la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de FR de inmunoglobulina humana se remplazan con los residuos no humanos correspondientes. Asimismo, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se hallan en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para perfeccionar adicionalmente el desempeño de los anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprende sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, donde 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 parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Por más detalles, ver Jones et ál., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et ál., *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

El término «variable» se refiere al hecho de que determinados segmentos de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre los anticuerpos. El dominio variable o «V» media la unión a antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular con respecto a su antígeno particular. No obstante, la variabilidad no se distribuye de forma uniforme en una extensión de los dominios variables. Por el contrario, las regiones V consisten en extensiones relativamente invariables denominadas regiones marco (FR) de 15-30 aminoácidos separadas por regiones más cortas de variabilidad extrema denominadas «regiones hipervariables», cada una con 9-12 aminoácidos de longitud. Cuando se utiliza en la presente, la expresión «región hipervariable» o «HVR» hace referencia a residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende generalmente residuos de aminoácidos, por ejemplo, de alrededor de aproximadamente los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en la VL, y de alrededor de aproximadamente los residuos 26-35 (H1), 49-65 (H2) y 95-102 (H3) en la VH (en una modalidad, H1 se encuentra alrededor de aproximadamente los residuos 31-35); Kabat et ál., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o esos residuos de un «bucle

hipervariable» (por ejemplo, residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en la VL y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en la VH; Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987). Cada uno de los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras naturales comprende cuatro FR, que adoptan principalmente una configuración de lámina beta, conectadas mediante tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos integran, la estructura de lámina beta. Las regiones hipervariables de cada cadena se mantienen juntas en proximidad la una de la otra mediante las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígenos de los anticuerpos (véase Kabat et ál., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ta edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Por consiguiente, las secuencias de HVR y FR aparecen por lo general en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4. Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

Las expresiones «numeración de residuo de dominio variable según Kabat» o «numeración de posición de aminoácido según Kabat» y las variaciones de estas, hacen referencia al sistema de numeración usado para los dominios variables de cadena pesada o los dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat et ál., *supra*. Al utilizar este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener una cantidad menor o adicional de aminoácidos que corresponden a un acortamiento, o una inserción, en una FR o una HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir la inserción de un solo aminoácido (residuo 52a de acuerdo con Kabat) luego del residuo 52 de H2 y los residuos insertados (por ejemplo, residuos 82a, 82b y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) luego del residuo 82 de FR de cadena pesada. La numeración de residuos de Kabat se puede determinar para un anticuerpo determinado mediante la alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia «estándar» numerada conforme a Kabat.

El sistema de numeración de Kabat se usa generalmente cuando se hace referencia a un residuo en el dominio variable (aproximadamente los residuos 1-107 de la cadena ligera y residuos 1-113 de la cadena pesada) (ver, por ejemplo, Kabat et ál., *Sequences of Immunological Interest*. 5.^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. 1991, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia. Generalmente se utiliza el «sistema de numeración EU» o «índice EU» cuando se hace referencia a un residuo en una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, el índice EU indicado en Kabat et ál., *supra*). El «índice EU de acuerdo con Kabat» hace referencia a la enumeración de residuos del anticuerpo EU de IgG1 humana. A menos que se indique lo contrario en la presente, las referencias a los

números de residuos en el dominio variable de los anticuerpos significan la numeración del residuo según el sistema de numeración Kabat. Salvo que se establezca de otro modo en la presente, las referencias a los números de residuos en el dominio constante de los anticuerpos significa la numeración de residuos mediante el sistema de numeración EU, también denominado índice EU, tal como se describe en Kabat et ál., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

A menos que se indique de otro modo, los residuos de HVR y otros residuos en el dominio variable (por ejemplo, residuos de FR) se enumeran en la presente de acuerdo con Kabat et ál., *supra*.

El término «aislado» cuando se usa para describir los diversos anticuerpos descritos en la presente, significa un anticuerpo identificado y separado y/o recuperado de una célula o un cultivo celular del cual se expresó. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que típicamente interferirían con los usos de diagnóstico o terapéuticos del polipéptido y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En algunas modalidades, un anticuerpo se purifica hasta más del 95 % o el 99 % de pureza como se determina, por ejemplo, mediante electroforesis (por ejemplo, SDS-PAGE, isoelectroenfoque (IEF, por sus siglas en inglés), electroforesis capilar) o cromatografía (por ejemplo, HPLC de intercambio iónico o de fase inversa). Por una revisión de métodos para la evaluación de pureza del anticuerpo, ver, por ejemplo, Flatman et ál., *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007). En modalidades preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta un grado suficiente que permita obtener al menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos interna o de extremo N mediante el uso de un secuenciador de vaso giratorio o (2) hasta lograr homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones de reducción o no, utilizando tinción con azul de Coomassie o, preferentemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye anticuerpos *in situ* dentro de células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural del polipéptido o está presente. No obstante, generalmente el polipéptido aislado se prepara mediante al menos una etapa de purificación.

La expresión «anticuerpo monoclonal», tal como se utiliza en la presente, hace referencia a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítopo, excepto por los anticuerpos variantes posibles, por ejemplo, que contienen mutaciones de origen natural o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, en la cual dichas variantes generalmente están presentes en cantidades mínimas. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un único determinante en un antígeno. Por lo tanto, el modificador «monoclonal» indica el carácter del

anticuerpo como obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea y no se debe interpretar que requiere la producción del anticuerpo mediante ningún método específico. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a utilizarse de acuerdo con la presente invención se pueden elaborar mediante diversas técnicas que incluyen, de modo no taxativo, el método del hibridoma, métodos de ADN recombinante, métodos de expresión en fagos y métodos que utilizan animales transgénicos que contienen la totalidad o parte de los locus de la inmunoglobulina humana, en la presente se describen dichos métodos y otros ejemplos de métodos para elaborar anticuerpos monoclonales.

El término «anticuerpo multiespecífico» se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) y un dominio variable de cadena ligera (VL), donde la unidad VH-VL tiene especificidad poliepitópica (es decir, puede unirse a dos epítomos diferentes en una molécula biológica o cada epítomo en una molécula biológica diferente). Estos anticuerpos multiespecíficos incluyen, de modo no taxativo, anticuerpos de longitud completa, anticuerpos que poseen dos o más dominios de VL y VH, fragmentos de anticuerpo tales como Fab, Fab', Fab-C, Fv, dsFv, scFv, diacuerpos, diacuerpos y triacuerpos biespecíficos, fragmentos de anticuerpo enlazados de forma covalente o no covalente. «Especificidad poliepitópica» hace referencia a la capacidad de unirse de forma específica a dos o más epítomos diferentes en uno o más objetivos iguales o distintos. «Especificidad doble» o «biespecificidad» hace referencia a la capacidad de unirse de forma específica a dos epítomos diferentes en uno o más objetivos iguales o diferentes. Sin embargo, a diferencia de los anticuerpos biespecíficos, los anticuerpos específicos dobles tienen dos grupos de unión al antígeno que son idénticos en la secuencia de aminoácidos y cada grupo Fab puede reconocer dos antígenos. La especificidad doble permite que los anticuerpos interactúen con gran afinidad con dos antígenos diferentes como una sola molécula de Fab o IgG. De acuerdo con una modalidad, el anticuerpo multiespecífico en una forma IgG1 se une a cada epítomo con una afinidad de 5 μ M a 0.001 pM, 3 μ M a 0.001 pM, 1 μ M a 0.001 pM, 0.5 μ M a 0.001 pM o 0.1 μ M a 0.001 pM. «Monoespecífico» hace referencia a la capacidad de unirse a un solo epítomo.

«Anticuerpos naturales» se refieren a moléculas de inmunoglobulina de origen natural con estructuras variables. Por ejemplo, los anticuerpos IgG naturales son glicoproteínas heterotetraméricas de alrededor de 150 000 daltons, compuestos por dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que están unidas por enlace disulfuro. Del extremo N al extremo C, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), a la que también se hace referencia como dominio variable pesado o dominio variable de cadena pesada, seguida de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). De manera similar, del extremo N al C, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también denominada «dominio variable ligero» o «dominio

variable de cadena ligera», seguida por un dominio ligero constante (CL). La cadena ligera de un anticuerpo puede asignarse a uno o dos tipos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), en función de la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

Con respecto a la unión de un anticuerpo a una molécula objetivo, el término «unión específica» o

5 «se une de forma específica a» o «específico de» un polipéptido o epítipo particular o un objetivo polipeptídico particular indican una unión perceptiblemente diferente a una interacción no específica. La unión específica se puede medir, por ejemplo, determinando la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula de control. Por ejemplo, la unión específica puede determinarse mediante competencia con una molécula de control similar al
10 objetivo, por ejemplo, un exceso de objetivo sin etiquetar. En este caso, la unión específica se indica si la unión de la diana marcada a una sonda se inhibe de forma competitiva por exceso de diana no marcada. Las expresiones «unión específica» o «se une específicamente a» o es «específico para» un polipéptido particular o un epítipo en un polipéptido diana particular, tal como se usa en la presente, se puede exhibir, por ejemplo, mediante una moléculas que tiene una Kd
15 para la diana de 10^{-4} M o menos, de manera alternativa 10^{-5} M o menos, de manera alternativa 10^{-6} M o menos, de manera alternativa 10^{-7} M o menos, de manera alternativa 10^{-8} M o menos, de manera alternativa 10^{-9} M o menos, de manera alternativa 10^{-10} M o menos, de manera alternativa 10^{-11} M o menos, de manera alternativa 10^{-12} M o menos o una Kd en el rango de 10^{-4} M a 10^{-6} M o 10^{-6} M a 10^{-10} M o 10^{-7} M a 10^{-9} M. Tal como lo entenderá un experto en la técnica, los valores de
20 afinidad y Kd están inversamente relacionados. Una gran afinidad con respecto a un antígeno se mide mediante un valor de Kd bajo. En una modalidad, el término «unión específica» se refiere a la unión en la que una molécula se une a un polipéptido particular o epítipo en un polipéptido particular sin unirse sustancialmente a ningún otro polipéptido o epítipo del polipéptido.

Un «ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-VEGF» hace referencia a una o más moléculas
25 de ácido nucleico que codifican cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo (o fragmentos de estas), que incluyen dichas moléculas de ácido nucleico en un único vector o vectores separados y dichas moléculas de ácido nucleico presentes en una o más ubicaciones en una célula hospedadora.

El término «vector», tal como se usa en la presente, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de propagar otro ácido nucleico al cual está unido. El término incluye el vector como una
30 estructura de ácido nucleico auto-replicante así como el vector incorporado en el genoma de una célula hospedadora en la cual se ha introducido. Determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de ácidos nucleicos a los cuales se encuentran enlazados de forma operativa. En la presente se hace referencia a dichos vectores como «vectores de expresión».

Los términos «célula hospedadora», «línea de células hospedadoras» y «cultivo de células
35 hospedadoras» se usan de manera intercambiable y se refieren a células en las que se introdujo

ácido nucleico exógeno, que incluye la progenie de dichas células. Las células hospedadoras incluyen «transformantes» y «células transformadas», que incluyen la célula primaria transformada y progenie derivada de esta sin importar la cantidad de pasajes. Es posible que la progenie no sea completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula progenitora, pero puede
5 contener mutaciones. En la presente se incluye la progenie mutante con la misma función o actividad biológica examinada o seleccionada en la célula transformada originalmente.

«Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos» con respecto a una secuencia de polipéptidos de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de
10 polipéptidos de referencia, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si fuera necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación a efectos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de diversas maneras conocidas dentro de la técnica, por ejemplo, mediante el uso de software informático
15 disponible para el público, tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros adecuados para alinear las secuencias, los que incluyen cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima de la longitud completa de las secuencias que se comparan. Sin embargo, a los efectos de la presente, los valores del % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan mediante el programa
20 informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue creado por Genentech, Inc. y el código fuente se presentó con la documentación del usuario en la Oficina de Derechos de Autor de Estados Unidos, Washington D.C., 20559, donde se encuentra registrada con el n.º de Registro de Derechos de Autor de Estados Unidos TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible al público a través de
25 Genentech, Inc., South San Francisco, California o puede compilarse a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, lo que incluye UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias están establecidos por el programa ALIGN-2 y no varían.

En las situaciones en las que se utiliza ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de
30 aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada para, con o contra una secuencia de aminoácidos B dada (que se puede expresar de manera alternativa como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de aminoácidos para, con o contra una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula como se indica a continuación: 100 veces la fracción X/Y , donde X es la cantidad de
35 residuos de aminoácido calificados como correspondencias idénticas mediante el programa de

alineamiento de secuencias ALIGN-2 en el alineamiento del programa de A y B, y donde Y es la cantidad total de residuos de aminoácido en B. Se observará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. Salvo que se indique específicamente lo contrario, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos que se utilizan en la presente se obtienen como se describió en el párrafo inmediatamente anterior con el programa informático ALIGN-2.

Tal como se utiliza en la presente, «administrar» hace referencia a un método para administrar una dosificación de un compuesto (por ejemplo, un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína) o un conjugado de anticuerpo (por ejemplo, un conjugado de HA monodisperso) de la invención) o una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica, por ejemplo, una composición farmacéutica que incluye un anticuerpo o un conjugado de anticuerpo de la invención) a un sujeto. Las composiciones utilizadas en los métodos descritos en la presente se pueden administrar, por ejemplo, por vía intravítrea (por ejemplo, mediante inyección intravítrea), por gotas para los ojos, intravenosa, intramuscular, intradérmica, percutánea, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intrapleural, intratraqueal, intratecal, intranasal, intravaginal, intrarrectal, tópica, intratumoral, peritoneal, subcutánea, subconjuntival, intravascular, mucosa, intrapericárdica, infraumbilical, intraocular, intraorbital, oral, tópica, transdérmica, por inhalación, por inyección, por implante, por infusión, por infusión continua, por infusión localizada que baña las células diana directamente, mediante un catéter, mediante lavado, en cremas, o en composiciones lipídicas. Las composiciones utilizadas en los métodos descritos en la presente también pueden administrarse de forma sistémica o local. El método de administración puede variar dependiendo de diversos factores (por ejemplo, el compuesto o composición administrada y la gravedad de la afección, enfermedad o trastorno que se trata).

La «angiogénesis» hace referencia al proceso a través del cual se forman los vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos preexistentes. La angiogénesis difiere de la vasculogénesis, que es la formación *de novo* de células endoteliales de precursores de células del mesodermo. Los trastornos asociados a angiogénesis patológica se pueden tratar mediante composiciones y métodos de la invención. Ejemplos de trastornos asociados a angiogénesis patológica incluyen, de modo no taxativo, afecciones oculares (afecciones oculares no taxativas incluyen, por ejemplo, retinopatía que incluye retinopatía diabética proliferativa, neovascularización coroidal (CNV), degeneración macular asociada a la edad (AMD), retinopatía diabética y otras retinopatías asociadas a la isquemia, edema macular diabético (DME), miopía patológica, enfermedad de von

Hippel-Lindau, histoplasmosis del ojo, oclusión de la vena retiniana (que incluye formas centrales (CRVO) y ramificadas (BRVO)), neovascularización corneal, neovascularización retiniana, retinopatía de prematuridad (ROP), vitreoretinopatía exudativa familiar (FEVR), enfermedad de Coats, enfermedad de Norrie, síndrome de osteoporosis-pseudoglioma (OPPG), hemorragia subconjuntival, rubeosis, enfermedad neovascular ocular, glaucoma neovascular, y retinopatía hipertensiva). Más adelante se describen trastornos oculares adicionales.

La expresión «trastorno ocular», tal como se utiliza en la presente, incluye cualquier trastorno ocular (al que también se hace referencia en la presente, de forma indistinta, como «afección ocular») asociado a la angiogénesis patológica. Un trastorno ocular se puede caracterizar por la proliferación alterada o no regulada y/o la invasión de nuevos vasos sanguíneos en las estructuras de tejidos oculares, tales como la retina o la córnea. Los trastornos oculares no taxativos incluyen, por ejemplo, AMD (por ejemplo, AMD húmeda, AMD seca, AMD intermedia, AMD avanzada y atrofia geográfica (GA)), degeneración macular, edema macular, DME (por ejemplo, DME focal distinto al centro y DME difuso implicado en el centro), retinopatía, retinopatía diabética (DR) (por ejemplo, DR proliferativa DR (PDR), DR no proliferativa (NPDR) y DR de altitud elevada), otras retinopatías asociadas a la isquemia, ROP, oclusión de la vena retiniana (RVO) (por ejemplo, formas centrales (CRVO) y ramificadas (BRVO)), CNV (por ejemplo, CNV miopica), neovascularización corneal, enfermedades asociadas a la neovascularización corneal, neovascularización retiniana, enfermedades asociadas a la neovascularización retiniana/coroidal, miopía patológica, enfermedad de von Hippel-Lindau, histoplasmosis del ojo, FEVR, enfermedad de Coats, enfermedad de Norrie, OPPG, hemorragia subconjuntival, rubeosis, enfermedad neovascular ocular, glaucoma neovascular, retinitis pigmentosa (RP), retinopatía hipertensiva, proliferación angiomas retiniana, telangiectasia macular, neovascularización del iris, neovascularización intraocular, degeneración retiniana, edema macular cistoide (CME), vasculitis, papiloedema, retinitis, conjuntivitis (por ejemplo, conjuntivitis infecciosa y conjuntivitis no infecciosa (por ejemplo, alérgica)), amaurosis congénita Leber (también conocida como amaurosis congénita de Leber o LCA), uveitis (que incluye uveitis infecciosa y no infecciosa), coroiditis (por ejemplo, coroiditis multifocal), histoplasmosis ocular, blefaritis, ojo seco, herida de ojo por traumatismo, enfermedad de Sjögren y otras enfermedades oftálmicas, en donde la enfermedad o el trastorno se asocia a neovascularización ocular, filtración vascular y/o edema retiniano. Ejemplos de trastornos oculares adicionales incluyen enfermedades asociadas a la rubeosis (neovascularización del ángulo) y enfermedades provocadas por la proliferación anómala de tejido fibrovascular o fibroso, las que incluyen todas las formas de vitreoretinopatía proliferativa.

Ejemplos de enfermedades asociadas a la neovascularización corneal incluye, de modo no taxativo, queratoconjuntivitis epidémica, deficiencia de vitamina A, uso excesivo de lentes de

contacto, queratitis atópica, queratitis límbica superior, queratitis seca de pterigión, síndrome de Sjögren, acné rosácea, filectenulosis, sífilis, infecciones por *Mycobacteria*, degeneración lipídica, quemaduras químicas, úlceras bacterianas, úlceras fúngicas, infecciones por herpes simple, infecciones por herpes zóster, infecciones por protozoarios, sarcoma de Kaposi, úlcera de Mooren, degeneración marginal de Terrien, queratólisis marginal, artritis reumatoide, lupus sistémica, poliarteritis, traumatismo, sarcoidosis de Wegener, escleritis, síndrome de Stevens-Johnson, queratotomía radial perifigóide y rechazo de injerto de córnea.

Los ejemplos de enfermedades asociadas a la neovascularización retiniana/coroidal incluyen, de modo no taxativo, retinopatía diabética, degeneración macular, anemia de células falciformes, sarcoide, sífilis, pseudoxantoma elástico, enfermedad de Paget, oclusión venosa, oclusión de las arterias, enfermedad obstructiva de la carótida, uveitis/vitritis crónica, infecciones micobacterianas, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso sistémico, retinopatía de la prematuridad, retinitis pigmentosa, edema de retina (que incluye edema macular), enfermedad de Eales, enfermedad de Behcet, infecciones que causan retinitis o coroiditis (por ejemplo, coroiditis multifocal), presunta histoplasmosis ocular, enfermedad de Best (degeneración macular viteliforme), miopía, foveas papilares, enfermedad de Stargardt, pars planitis, desprendimiento de retina retinal (por ejemplo, desprendimiento de retina crónico), síndromes de hiperviscosidad, toxoplasmosis, traumatismo y complicaciones posteriores al uso de láser.

Un «factor o agente angiogénico» hace referencia a un factor de crecimiento que estimula el desarrollo de vasos sanguíneos, por ejemplo, fomenta la angiogénesis, crecimiento de células endoteliales, estabilidad de vasos sanguíneos, y/o vasculogénesis, etc. Por ejemplo, los factores angiogénicos incluyen, de modo no taxativo, por ejemplo, VEGF y miembros de la familia VEGF, PlGF, familia PDGF, familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), ligandos TIE (Angiopoyetinas), efrinas, Del-1, factores del crecimiento de fibroblastos: ácidos (aFGF) y básicos (bFGF), follistatina, factor estimulador de la colonia de granulocitos (G-CSF), factor del crecimiento de hepatocitos (HGF) /factor de dispersión (SF), interleucina-8 (IL-8), leptina, midcina, neuropilinas, factor del crecimiento de placenta, factor del crecimiento de células endoteliales derivadas de plaquetas (PD-ECGF), factor del crecimiento derivado de plaquetas, especialmente PDGF-BB o PDGFR-beta, pleiotrofina (PTN), progranulina, proliferina, crecimiento transformante de factor-alfa (TGF-alfa), crecimiento transformante de factor-beta (TGF-beta), factor de necrosis tumoral alfa, (TNF-alfa), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)/factor de permeabilidad vascular (VPF), etc. También incluyen factores que aceleran la cicatrización de heridas, tales como hormona de crecimiento, factor de crecimiento tipo insulina-I (IGF-I), VIGF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), CTGF y miembros de su familia, y TGF-alfa y TGF-beta. Ver, por ejemplo, Klagsbrun y D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53:217-39 (1991); Streit y Detmar, *Oncogene*, 22:3172-

3179 (2003); Ferrara y Alitalo, *Nature Medicine* 5(12):1359-1364 (1999); Tonini et ál., *Oncogene*, 22:6549-6556 (2003) (por ejemplo, Tabla 1 que enumera factores angiogénicos conocidos); y Sato, *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003).

Un «agente antiangiogénico» o «inhibidor de angiogénesis» hace referencia a una sustancia de poco peso molecular, un polinucleótido, un polipéptido, una proteína aislada, una proteína recombinante, un anticuerpo o conjugados o proteínas de fusión de estos, que inhibe la angiogénesis, la vasculogénesis o la permeabilidad vascular no deseada, ya sea de forma directa o indirecta. Se entenderá que el agente antiangiogénico incluye los agentes que se unen y bloquean la actividad angiogénica del factor angiogénico o su receptor. Por ejemplo, un agente antiangiogénico es un anticuerpo u otro antagonista de un agente angiogénico tal como se define anteriormente, por ejemplo, antagonistas de VEGF (por ejemplo, anticuerpos para VEGF-A o para el receptor del VEGF-A (por ejemplo, el receptor de KDR o el receptor de Flt-1)), antagonistas de PDGF (por ejemplo, inhibidores anti-PDGFR tales como GLEEVEC™ (mesilato de imatinib)). Los agentes antiangiogénicos también incluyen inhibidores de angiogénesis naturales, por ejemplo, angiostatina, endostatina, etc. Véase, por ejemplo, Klagsbrun y D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53:217-39 (1991); Streit y Detmar, *Oncogene*, 22:3172-3179 (2003) (por ejemplo, la Tabla 3 que indica la terapia antiangiogénica en el melanoma maligno); Ferrara y Alitalo, *Nature Medicine* 5(12):1359-1364 (1999); Tonini et ál., *Oncogene*, 22:6549-6556 (2003) (por ejemplo, la Tabla 2 que indica los factores antiangiogénicos conocidos); y, Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003) (por ejemplo, la Tabla 1 que indica agentes antiangiogénicos usados en ensayos clínicos).

El término «antagonista de VEGF», tal como se usa en la presente, se refiere a una molécula que puede unirse a VEGF, reducir los niveles de expresión de VEGF, o neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir con las actividades biológicas de VEGF, que incluyen, de modo no taxativo, la unión de VEGF a uno o más receptores de VEGF, señalización de VEGF y angiogénesis mediada por VEGF y supervivencia o proliferación de células endoteliales. Por ejemplo, una molécula que puede neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir con las actividades biológicas del VEGF puede ejercer sus efectos mediante la unión a uno o más receptores del VEGF (VEGFR, por sus siglas en inglés) (por ejemplo, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, receptor del VEGF unido a la membrana (mbVEGFR, por sus siglas en inglés) o receptor del VEGF soluble (sVEGFR, por sus siglas en inglés)). En los métodos de la invención se incluyen como antagonistas útiles del VEGF los polipéptidos que se unen de manera específica al VEGF, anticuerpos anti-VEGF y los fragmentos de unión al antígeno de estos, las moléculas receptoras y derivados que se unen de manera específica al VEGF y de ese modo evitan su unión a uno o más receptores, proteínas de fusión (por ejemplo, VEGF-Trap (Regeneron)) y VEGF₁₂₁-gelonina (Peregrine). Los antagonistas de VEGF también incluyen variantes antagonistas de polipéptidos

VEGF, oligómeros de nucleobase antisentido complementarios a al menos un fragmento de una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido VEGF; ARN pequeños complementarios a al menos un fragmento de una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido VEGF; ribozimas que se dirigen a VEGF; peptidocuerpos con respecto a VEGF; y aptámeros de VEGF. Los antagonistas del VEGF también incluyen polipéptidos que se unen al VEGFR, anticuerpos anti-VEGFR y fragmentos de unión al antígeno de estos, así como derivados que se unen al VEGFR y de ese modo bloquean, inhiben, anulan, reducen o interfieren con las actividades biológicas del VEGF (por ejemplo, señalización del VEGF) o proteínas de fusión. Los antagonistas de VEGF también incluyen moléculas pequeñas no peptídicas que se unen a VEGF o VEGFR y pueden bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir con las actividades biológicas de VEGF. Por lo tanto, el término «actividades de VEGF» incluye específicamente actividades biológicas de VEGF mediadas por VEGF. En determinadas modalidades, el antagonista del VEGF reduce o inhibe, en al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50%, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más, el nivel de expresión o la actividad biológica del VEGF. En algunas modalidades, el VEGF inhibido mediante el antagonista específico del VEGF es VEGF (8-109), VEGF (1-109) o VEGF₁₆₅.

Tal como se usa en la presente, los antagonistas de VEGF pueden incluir, de modo no taxativo, anticuerpos anti-VEGFR2 y moléculas relacionadas (por ejemplo, ramucirumab, tanibirumab, aflibercept), anticuerpos anti-VEGFR1 y moléculas relacionadas (por ejemplo, icrucumab, aflibercept (VEGF Trap-Eye; EYLEA®), y ziv-aflibercept (VEGF Trap; ZALTRAP®)), anticuerpos de VEGF biespecíficos (por ejemplo, MP-0250, vanucizumab (VEGF-ANG2), y anticuerpos biespecíficos descritos en US 2001/0236388), anticuerpos biespecíficos que incluyen combinaciones de dos grupos de los grupos anti-VEGF, anti-VEGFR1 y anti-VEGFR2, anticuerpos anti-VEGF (por ejemplo, bevacizumab, sevacizumab y ranibizumab) y antagonistas de VEGF de moléculas pequeñas no peptídicas (por ejemplo, pazopanib, axitinib, vandetanib, stivarga, cabozantinib, lenvatinib, nintedanib, orantinib, telatinib, dovitinig, cediranib, motesanib, sulfatinib, apatinib, foretinib, famitinib y tivozanib). A continuación se describen otros antagonistas de VEGF. Una «cantidad eficaz» de un agente, por ejemplo, una formulación farmacéutica, hace referencia a una cantidad eficaz, en dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

Un «individuo» o «sujeto» es un mamífero. Los mamíferos incluyen, de modo no taxativo, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, humanos y primates no humanos, tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En determinadas modalidades, el individuo o sujeto es un humano. Un «sujeto» puede ser un «paciente».

Un «trastorno» es cualquier afección que se vería beneficiada por el tratamiento con el anticuerpo.

Por ejemplo, los mamíferos que padecen angiogénesis anómala o necesitan profilaxis contra esta (angiogénesis excesiva, inapropiada o incontrolada). Esto incluye trastornos crónicos y agudos incluyendo aquellos estados patológicos que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión.

Ejemplos no taxativos de trastornos a ser tratados en la presente incluyen trastornos asociados a la angiogénesis patológica (por ejemplo, trastornos oculares).

La expresión «prospecto del envase» se utiliza para hacer referencia a las instrucciones que suelen incluirse en envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información acerca de las indicaciones, uso, dosificación, administración, terapia de combinación, contraindicaciones y/o advertencias concernientes al uso de dichos productos terapéuticos.

Un «portador farmacéuticamente aceptable» se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, diferente de un ingrediente activo, que no es tóxico para un sujeto. Un portador farmacéuticamente aceptable incluye, de modo no taxativo, un amortiguador, excipiente, estabilizante o conservante.

La expresión «formulación farmacéutica» hace referencia a una preparación que es de forma tal que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo (por ejemplo, un conjugado de anticuerpo) contenido allí sea eficaz, y que no contiene ningún componente adicional que sea inaceptablemente tóxico para un sujeto al cual se le administraría la formulación.

Tal como se usa en la presente, «tratamiento» (y sus variaciones gramaticales como «tratar» o «se trata») se refiere a una intervención clínica en un intento por alterar el curso natural del individuo que se está tratando y se puede realizar ya sea para la profilaxis o durante el curso de la patología clínica. Los efectos deseados del tratamiento incluyen, de modo no taxativo, evitar la aparición o la reaparición de una enfermedad, aliviar los síntomas, disminuir cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, disminuir la velocidad de avance de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad y remisión o mejora en el pronóstico. En algunas modalidades, los conjugados de anticuerpo de la invención u otras composiciones que incluyen un conjugado de anticuerpo de la invención (por ejemplo, una formulación farmacéutica) se utilizan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o enlentecer la evolución de una enfermedad.

Una molécula de ácido nucleico «aislada» es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que es asociada comúnmente en el origen natural del ácido nucleico. Una molécula de ácido nucleico aislada se encuentra en una forma o configuración diferente a la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas aisladas de ácido nucleico se distinguen de la molécula de ácido nucleico tal como existe en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico comprendida en células que normalmente expresan el anticuerpo, donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una ubicación cromosómica diferente a

la de las células naturales.

El término «secuencias de control» se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida de manera operativa en un organismo hospedador particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora y un sitio de unión al ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

El ácido nucleico está «unido de forma operativa» cuando está en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una secuencia previa o un líder secretor está enlazado de forma operativa al ADN de un polipéptido si se expresa como una proteína previa que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está enlazado de forma operativa a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está enlazado de forma operativa a una secuencia codificante si se coloca de modo de facilitar la traducción. En general, «unido de manera operativa» significa que las secuencias de ADN que están unidas son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, no es necesario que los potenciadores sean contiguos. El enlace se logra mediante unión en puntos de restricción convenientes. En caso de que no existan estos sitios, se utilizan adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

Tal como se usa en la presente, las expresiones «célula», «línea celular» y «cultivo celular» se utilizan de manera intercambiable y todas dichas designaciones incluyen la progenie. Por lo tanto, las palabras «transformantes» y «células transformadas» incluyen la célula primaria de la presente y los cultivos derivados de esta sin importar la cantidad de transferencias. Se entiende también que toda la progenie puede no ser precisamente idéntica en cuanto al contenido de ADN, debido a mutaciones involuntarias o deliberadas. Se incluye la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica como se analizó en la célula originalmente transformada. En los casos donde se pretenden realizar las designaciones, esto se comprenderá a partir del contexto.

Una «variante» o «mutante» de un polipéptido inicial o de referencia (por ejemplo, un anticuerpo de referencia o su dominio variable/HVR), es un polipéptido que (1) tiene una secuencia de aminoácidos diferente a la del polipéptido inicial o de referencia y (2) derivó del polipéptido inicial o de referencia a través de mutagénesis natural o artificial (realizada por el hombre). Tales variantes incluyen, por ejemplo, eliminaciones de, y/o inserciones en, y/o sustituciones de, residuos dentro de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de interés, denominado en la presente «alteraciones de residuos de aminoácidos». Por lo tanto, una HVR variante hace referencia a una HVR que comprende una secuencia variante con respecto a una secuencia de polipéptidos inicial o de referencia (tal como la de un anticuerpo fuente o fragmento de unión al antígeno). Una

alteración de residuos de aminoácidos, en este contexto, se refiere a un aminoácido diferente al aminoácido en la posición correspondiente en una secuencia de polipéptidos inicial o de referencia (tal como la de un anticuerpo de referencia o fragmento de este). Es posible llevar a cabo cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución para llegar a la construcción variante o mutante final, siempre que la construcción final posea las características funcionales deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos postraduccionales del polipéptido, tal como por medio del cambio del número o posición de los sitios de glicosilación.

Una secuencia «de tipo salvaje (WT)» o «de referencia» o la secuencia de una proteína/polipéptido «de tipo salvaje» o «de referencia», tal como una HVR o un dominio variable de un anticuerpo de referencia, puede ser la secuencia de referencia de la cual derivan polipéptidos variantes mediante la introducción de mutaciones. En general, la secuencia «de tipo salvaje» para una proteína dada es la secuencia más común en la naturaleza. De manera similar, una secuencia génica «de tipo salvaje» es la secuencia para ese gen que se encuentra más comúnmente en la naturaleza. Se pueden introducir mutaciones en un gen «de tipo salvaje» (y por lo tanto la proteína que codifica) ya sea mediante procesos naturales o por medios inducidos por el hombre. Los productos de dichos procesos son formas «variantes» o «mutante» del gen o proteína «de tipo salvaje» original. «Punto isoeléctrico (pI)» significa el pH en el que una molécula (por ejemplo, una proteína, tal como un anticuerpo) no posee carga eléctrica neta, también denominado en la técnica «pH(I)» o «IEP».

Tal como se utiliza en la presente, un «conjugado de anticuerpo» es un anticuerpo unido de forma covalente a uno o más polímeros. Cualquier polímero adecuado se puede conjugar con un anticuerpo, por ejemplo, un polímero hidrofílico (por ejemplo, ácido hialurónico (HA) o polietilenglicol (PEG)) o un polímero hidrofóbico (por ejemplo, ácido poli(lactic-co-glicólico) (PLGA)). En modalidades particulares, el polímero es HA (al que también se hace referencia en la presente como «conjugados de HA»).

Tal como se utiliza en la presente, el término «polímero» significa una molécula que incluye la repetición de unidades estructurales (es decir, monómeros) conectadas mediante enlaces químicos de forma lineal, circular, ramificada, reticulada o dendrímica, o una combinación de estas. Un polímero puede ser de origen sintético o natural, o una combinación de estos. Se entiende que el término «polímero» comprende copolímeros, los cuales son polímeros que incluyen dos o más monómeros diferentes. Un polímero también puede ser un homopolímero, el cual es un polímero que incluye solamente un único tipo de monómero.

La expresión «índice de polidispersión (PDI)» hace referencia a una medida de amplitud de la distribución de peso molecular de un polímero. En la técnica también se hace referencia al PDI como «índice de dispersión», «índice de heterogeneidad» o «dispersión ($\bar{D}$)». El PDI de una

muestra de polímero se puede calcular mediante la ecuación (I): $\bar{D}_M = M_w/M_n$, en donde M_w es la masa molar promedio en peso y M_n es la masa molar promedio en cantidad. Salvo que se indique de otra manera, el PDI se calcula de acuerdo con la ecuación (I):

Una muestra de polímero se puede considerar «monodispersa» (también conocida en la técnica como uniforme) o «polidispersa» (también conocida en la técnica como no uniforme). Tal como se utiliza en la presente, el término «monodisperso» con respecto a un polímero de HA o una muestra de conjugado de HA significa que el polímero de HA o la muestra de conjugado de HA tiene un PDI menor o igual a alrededor de 1.1, por ejemplo, alrededor de 1.001, alrededor de 1.02, alrededor de 1.03, alrededor de 1.04, alrededor de 1.05, alrededor de 1.06, alrededor de 1.07, alrededor de 1.08, alrededor de 1.09 o alrededor de 1.1. Por ejemplo, una muestra de conjugado de HA o polímero de HA monodisperso puede tener un PDI de entre 1.0 y alrededor de 1.1 (por ejemplo, entre 1 y alrededor de 1.1, entre 1 y alrededor de 1.09, entre 1 y alrededor de 1.08, entre 1 y alrededor de 1.07, entre 1 y alrededor de 1.06, entre 1 y alrededor de 1.05, entre 1 y alrededor de 1.04, entre 1 y alrededor de 1.03, entre 1 y alrededor de 1.02, entre 1 y alrededor de 1.01, entre 1 y alrededor de 1.005, entre alrededor de 1.001 y alrededor de 1.1, entre alrededor de 1.001 y alrededor de 1.1, entre alrededor de 1.001 y alrededor de 1.09, entre alrededor de 1.001 y alrededor de 1.08, entre alrededor de 1.001 y alrededor de 1.07, entre alrededor de 1.001 y alrededor de 1.06, entre alrededor de 1.001 y alrededor de 1.05, entre alrededor de 1.001 y alrededor de 1.04, entre alrededor de 1.001 y alrededor de 1.03, entre alrededor de 1.001 y alrededor de 1.02, entre alrededor de 1.001 y alrededor de 1.01, entre alrededor de 1.001 y alrededor de 1.005, entre alrededor de 1.001 y alrededor de 1.004, entre alrededor de 1.001 y alrededor de 1.003, entre alrededor de 1.001 y alrededor de 1.002, entre alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.1, entre alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.09, entre alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.08, entre alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.07, entre alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.06, entre alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.05, entre alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.04, entre alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.03, entre alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.02, entre alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.01, entre alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.005, entre alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.004, entre alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.003, entre alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.002 o entre alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.005).

Por el contrario, el término «polidisperso» significa que el polímero de HA o la muestra de conjugado de HA tiene un PDI de más de 1.1, por ejemplo, alrededor de 1.3, alrededor de 1.4, alrededor de 1.5, alrededor de 1.6, alrededor de 1.7, alrededor de 1.8 o más. Por ejemplo, en algunas modalidades, un polímero de HA polidisperso o una muestra de conjugado de HA tiene un PDI de entre alrededor de 1.3 a alrededor de 2, alrededor de 1.4 a alrededor de 2, alrededor de 1.5

a alrededor de 2, alrededor de 1.6 a alrededor de 2, alrededor de 1.7 a alrededor de 2, alrededor de 1.8 a alrededor de 2 o alrededor de 1.9 a alrededor de 2.

Las expresiones «ácido hialurónico», «hialuronano» y «HA» que se utilizan indistintamente en la presente, hacen referencia a un glicosaminoglicano (GAG) polimérico, el que contiene unidades de disacáridos que se repiten de *N*-acetil glucosamina y ácido glucurónico. El HA es un GAG aniónico, no sulfatado, el que se puede encontrar, por ejemplo, en la matriz extracelular (por ejemplo, en el humor vítreo del ojo), tejido conjuntivo, epitelial y tejido neural.

Las expresiones «polietilenglicol» o «PEG», tal como se utilizan en la presente, hacen referencia a un compuesto de poliéter que también se conoce como óxido de polietileno (PEO) o polioxietileno (POE), según su peso molecular. El PEG puede tener una estructura de $H-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$, en donde *n* es cualquier número entero adecuado. El PEG puede ser un PEG ramificado, un PEG estrellado o un PEG dentado. El PEG puede ser, por ejemplo, un PEG tetrámero, un PEG hexámero o un PEG octámero.

El término «eliminación» tal como se utiliza en la presente, hace referencia al volumen de una sustancia (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF, un conjugado de anticuerpo, una proteína de fusión (por ejemplo, una proteína de fusión de Fab) o una formulación polimérica) eliminada de un compartimento (por ejemplo, el ojo (por ejemplo, el humor vítreo)) por unidad de tiempo.

El término «semivida» hace referencia al tiempo requerido para que la concentración de una sustancia (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF, un conjugado de anticuerpo, una proteína de fusión (por ejemplo, una proteína de fusión de Fab) o una formulación polimérica) se reduzca a la mitad in vivo (por ejemplo, en el ojo (por ejemplo, el humor vítreo)) o in vitro.

II. COMPOSICIONES Y MÉTODOS

La invención provee conjugados de anticuerpo que incluyen polímeros (por ejemplo, polímeros monodispersos, que incluyen polímeros de HA monodispersos) unidos a anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos anti-VEGF, incluido cualquier anticuerpo anti-VEGF descrito en la presente), anticuerpos modificados con cisteína que se pueden utilizar, por ejemplo, en la preparación de conjugados de anticuerpo, composiciones que incluyen conjugados de anticuerpo (por ejemplo, composiciones farmacéuticas), así como también métodos para su producción y su uso, por ejemplo, para usos terapéuticos (por ejemplo, tratamiento de trastornos oculares).

A. Ejemplos de anticuerpos para su uso en conjugados de la invención

La invención provee conjugados de anticuerpo que incluyen anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos anti-VEGF) unidos de forma covalente a polímeros (por ejemplo, polímeros monodispersos). Se puede utilizar cualquier anticuerpo adecuado (por ejemplo, anticuerpo anti-VEGF). Por ejemplo, el anticuerpo se puede unir de forma específica a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en VEGF; interleucina 1 beta (IL-1 β); interleucina 6 (IL-6); receptor de interleucina 6 (IL-6R);

interleucina 13 (IL-13); receptor de IL-13 (IL-13R); PDGF (por ejemplo, PDGF-BB); angiopoyetina; angiopoyetina 2 (Ang2); Tie2; S1P; integrinas $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$ y $\alpha 5\beta 1$; betacelulina; apelina/APJ; eritropoyetina; factor de complemento D; TNF α ; HtrA1; un receptor de VEGF (por ejemplo, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, receptor de VEGF unido a la membrana (mbVEGFR) o receptor de VEGF soluble (sVEGFR)); receptor de ST-2 y una proteína genéticamente vinculada al riesgo de degeneración macular asociada a la edad (AMD) (por ejemplo, componentes de la vía de complemento C2, factor B, factor H, CFHR3, C3b, C5, C5a y C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; interleucina 8 (IL-8); CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC; COL10A1 y TNFRSF10A). Dichos anticuerpos pueden ser útiles, por ejemplo, para reducir la angiogénesis y/o para tratar o retrasar la evolución de un trastorno asociado a la angiogénesis patológica (por ejemplo, trastornos oculares). Más adelante se describen ejemplos no taxativos de anticuerpos anti-VEGF que se pueden utilizar en los conjugados de anticuerpo de la invención.

En algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF puede incluir al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR que se seleccionan de: (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GX₁TPX₂GGX₃X₄X₅YX₆DSVX₇X₈ (SEQ ID NO: 2), en donde X₁ es Ile o His, X₂ es Ala o Arg, X₃ es Tyr o Lys, X₄ es Thr o Glu, X₅ es Arg, Tyr, Gln o Glu, X₆ es Ala o Glu, X₇ es Lys o Glu, y X₈ es Gly o Glu; (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQX₁VSTAVA (SEQ ID NO: 4), en donde X₁ es Asp o Arg; (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de X₁ASFLYS (SEQ ID NO: 5), en donde X₁ es Ser o Met; y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de X₁QGYGX₂PFT (SEQ ID NO: 6), donde X₁ es Gln, Asn o Thr y X₂ es Ala, Asn, Gln o Arg, o una combinación de una o más de las HVR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 80 % de identidad de secuencia (por ejemplo, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6.

Por ejemplo, el anticuerpo anti-VEGF puede incluir al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR que se seleccionan de: (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GITPAGGYTRYADSVKG (SEQ ID NO: 7), GITPAGGYEYYADSVKG (SEQ ID NO: 21) o GITPAGGYEYYADSVEG (SEQ ID NO: 22); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SASFLYS (SEQ ID NO: 9); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10) o QQGYGNPFT (SEQ ID NO: 23) o una

combinación de una o más de las HVR anteriores y una o más variantes de estas con una identidad de secuencia de al menos alrededor de 80 % (por ejemplo, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con respecto a cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 7-10 o 21-23.

- 5 Por ejemplo, en algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF puede incluir al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR que se seleccionan de: (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GITPAGGYTRYADSVKG (SEQ ID NO: 7); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) una HVR-L1 que comprende la
- 10 secuencia de aminoácidos de RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SASFLYS (SEQ ID NO: 9); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10) o una combinación de una o más de las HVR anteriores y una o más variantes de estas con una identidad de secuencia de al menos
- 15 alrededor de 80 % (por ejemplo, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con respecto a cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3 o 7-10. En un ejemplo particular, en algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF incluye las seis HVR que siguen: (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GITPAGGYTRYADSVKG (SEQ ID NO: 7); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de
- 20 aminoácidos de FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SASFLYS (SEQ ID NO: 9); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10).

- En algunos casos, cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF puede incluir una, dos, tres o cuatro de
- 25 las siguientes regiones marco (FR) de dominio variable de cadena pesada: (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTIS (SEQ ID NO: 13); (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 14); (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RFTISADTSKNTAYLQMRSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 15); y (d) una FR-H4 que comprende
- 30 la secuencia de aminoácidos WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 16).

- En algunos casos, cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF puede incluir una, dos, tres o cuatro de las siguientes FR de dominio variable de cadena ligera: (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 17), (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) una FR-L3
- 35 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC

(SEQ ID NO: 19); y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20).

Por ejemplo, en algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF incluye las seis HVR que siguen: (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) una HVR-H2
5 que comprende la secuencia de aminoácidos de GITPAGGYTRYADSVKG (SEQ ID NO: 7); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SASFLYS (SEQ ID NO: 9); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10). En

10 algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF incluye las siguientes cuatro FR de dominio variable de cadena pesada: (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTIS (SEQ ID NO: 13); (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 14); (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RFTISADTSKNTAYLQMRSRAEDTAVYYCAR (SEQ
15 ID NO: 15); y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos WGQGLTLTVSS (SEQ ID NO: 16). En casos adicionales, el anticuerpo anti-VEGF incluye las siguientes cuatro FR de dominio variable de cadena ligera: (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 17), (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) una FR-L3 que comprende la secuencia
20 de aminoácidos de GVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19); y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20). En algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF incluye (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

25 Por ejemplo, en algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF puede incluir al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR que se seleccionan de: (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GITPAGGYEYYADSVEG (SEQ ID NO: 22); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) una HVR-L1 que comprende la
30 secuencia de aminoácidos de RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SASFLYS (SEQ ID NO: 9); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQGYGNPFT (SEQ ID NO: 23) o una combinación de una o más de las HVR anteriores y una o más variantes de estas con una identidad de secuencia de al menos
35 alrededor de 80 % (por ejemplo, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con respecto a cualquiera de

las SEQ ID NO: 1, 3, 8, 9, 22 o 23. En un ejemplo particular, en algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF incluye las seis HVR que siguen: (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GITPAGGYEYYADSVEG (SEQ ID NO: 22); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SASFLYS (SEQ ID NO: 9); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQGYGNPFT (SEQ ID NO: 23).

En algunos casos, cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF puede incluir una, dos, tres o cuatro de las siguientes regiones marco (FR) de dominio variable de cadena pesada: (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EEQLVEEGGGLVQPGESLELSAASGFEIS (SEQ ID NO: 29) o EEQLVEEGGGLVQPGESLRLSCAASGFEIS (SEQ ID NO: 52); (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQEPGEGLEWVA (SEQ ID NO: 30); (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 31); y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGELVTVSS (SEQ ID NO: 32).

En algunos casos, cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF puede incluir una, dos, tres o cuatro de las siguientes FR de dominio variable de cadena ligera: (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 17), (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 24); y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20).

Por ejemplo, en algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF incluye las seis HVR que siguen: (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GITPAGGYEYYADSVEG (SEQ ID NO: 22); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SASFLYS (SEQ ID NO: 9); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQGYGNPFT (SEQ ID NO: 23). En algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF incluye las siguientes cuatro FR de dominio variable de cadena pesada: (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EEQLVEEGGGLVQPGESLELSAASGFEIS (SEQ ID NO: 29); (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQEPGEGLEWVA (SEQ ID NO: 30); (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (SEQ

ID NO: 31); y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGELTVSS (SEQ ID NO: 32). En casos adicionales, el anticuerpo anti-VEGF incluye las siguientes cuatro FR de dominio variable de cadena ligera: (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 17), (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 24); y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20). En algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF incluye (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38.

En algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF incluye las seis HVR que siguen: (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GITPAGGYEYYADSVES (SEQ ID NO: 22); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SASFLYS (SEQ ID NO: 9); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQGYGNPFT (SEQ ID NO: 23). En algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF incluye las siguientes cuatro FR de dominio variable de cadena pesada: (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EEQLVEEGGLVQPGESLRLSCAASGFEIS (SEQ ID NO: 52); (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQEPGEGLEWVA (SEQ ID NO: 30); (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 31); y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGELTVSS (SEQ ID NO: 32). En casos adicionales, el anticuerpo anti-VEGF incluye las siguientes cuatro FR de dominio variable de cadena ligera: (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 17), (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 24); y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20). En algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF incluye (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38.

Por ejemplo, en algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF puede incluir al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR que se seleccionan de: (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de

aminoácidos de GITPAGGYEYYADSVEG (SEQ ID NO: 22); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SASFLYS (SEQ ID NO: 9); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10) o una combinación de una o más de las HVR anteriores y una o más variantes de estas con una identidad de secuencia de al menos alrededor de 80 % (por ejemplo, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con respecto a cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 8-10 o 22. En un ejemplo particular, en algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF incluye las seis HVR que siguen: (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GITPAGGYEYYADSVEG (SEQ ID NO: 22); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SASFLYS (SEQ ID NO: 9); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10).

En algunos casos, cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF puede incluir una, dos, tres o cuatro de las siguientes regiones marco (FR) de dominio variable de cadena pesada: (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EEQLVEEGGGLVQPGESLELSAASGFEIS (SEQ ID NO: 29) o EEQLVEEGGGLVQPGESLRLSCAASGFEIS (SEQ ID NO: 52); (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQEPGEGLEWVA (SEQ ID NO: 30); (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 31); y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGELVTVSS (SEQ ID NO: 32).

En algunos casos, cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF puede incluir una, dos, tres o cuatro de las siguientes FR de dominio variable de cadena ligera: (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC (SEQ ID NO: 17), DIQMTQSPESLSASVGDEVTITC (SEQ ID NO: 25) o DIQMTQSPSSLSASVGDEVTITC (SEQ ID NO: 26), (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18) o WYQQKPGEAPKLLIY (SEQ ID NO: 27); (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19) o GVPSRFSGSGSGTDFLTIESLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 28); y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20).

Por ejemplo, en algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF incluye las seis HVR que siguen: (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) una HVR-H2

que comprende la secuencia de aminoácidos de GITPAGGYEYYADSVEG (SEQ ID NO: 22); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SASFLYS (SEQ ID NO: 9); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10). En algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF incluye las siguientes cuatro FR de dominio variable de cadena pesada: (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EEQLVEEGGGLVQPGESLELSCAASGFEIS (SEQ ID NO: 29); (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQEPGEGLEWVA (SEQ ID NO: 30); (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 31); y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGELVTVSS (SEQ ID NO: 32). En casos adicionales, el anticuerpo anti-VEGF incluye las siguientes cuatro FR de dominio variable de cadena ligera: (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DIQMTQSPESLSASVGDEVTITC (SEQ ID NO: 25), (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19); y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20). En algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF incluye (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34.

Por ejemplo, en otros casos, el anticuerpo anti-VEGF incluye las seis HVR que siguen: (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GITPAGGYEYYADSVEG (SEQ ID NO: 22); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SASFLYS (SEQ ID NO: 9); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10). En algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF incluye las siguientes cuatro FR de dominio variable de cadena pesada: (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EEQLVEEGGGLVQPGESLELSCAASGFEIS (SEQ ID NO: 29); (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQEPGEGLEWVA (SEQ ID NO: 30); (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 31); y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGELVTVSS (SEQ ID NO: 32). En casos adicionales, el anticuerpo anti-VEGF incluye las siguientes cuatro FR de dominio variable de cadena ligera: (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos

de DIQMTQSPSSLSASVGDEVTITC (SEQ ID NO: 26); (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WYQQKPGEAPKLLIY (SEQ ID NO: 27); (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVPSRFSGSGSGTDFTLTIESLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 28); y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20). En algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF incluye (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35.

Por ejemplo, en otros casos, el anticuerpo anti-VEGF incluye las seis HVR que siguen: (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GITPAGGYEYYADSVEG (SEQ ID NO: 22); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SASFLYS (SEQ ID NO: 9); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10). En

algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF incluye las siguientes cuatro FR de dominio variable de cadena pesada: (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EEQLVEEGGGLVQPGESLRLSCAASGFEIS (SEQ ID NO: 52); (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQEPGEGLEWVA (SEQ ID NO: 30); (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 31); y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGELTVTVSS (SEQ ID NO: 32). En casos adicionales, el anticuerpo anti-VEGF incluye las siguientes cuatro FR

de dominio variable de cadena ligera: (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DIQMTQSPSSLSASVGDEVTITC (SEQ ID NO: 26); (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WYQQKPGEAPKLLIY (SEQ ID NO: 27); (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVPSRFSGSGSGTDFTLTIESLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 28); y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20). En algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF incluye (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35.

Por ejemplo, en aun otros casos, el anticuerpo anti-VEGF incluye las seis HVR que siguen: (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GITPAGGYEYYADSVEG (SEQ ID NO: 22); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SASFLYS (SEQ ID NO: 9); y (f) una

HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10). En algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF incluye las siguientes cuatro FR de dominio variable de cadena pesada: (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EEQLVEEGGGLVQPGESLELSCAASGFEIS (SEQ ID NO: 29); (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQEPGEGLEWVA (SEQ ID NO: 30); (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 31); y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGELTVSS (SEQ ID NO: 32). En casos adicionales, el anticuerpo anti-VEGF incluye las siguientes cuatro FR de dominio variable de cadena ligera: (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DIQMTQSPESLSASVGDEVTITC (SEQ ID NO: 25); (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 27); (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19); y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20). En algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF incluye (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36.

Por ejemplo, en aun otros casos, el anticuerpo anti-VEGF incluye las seis HVR que siguen: (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GITPAGGYEYYADSVEG (SEQ ID NO: 22); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SASFLYS (SEQ ID NO: 9); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10). En algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF incluye las siguientes cuatro FR de dominio variable de cadena pesada: (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EEQLVEEGGGLVQPGESLELSCAASGFEIS (SEQ ID NO: 29); (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQEPGEGLEWVA (SEQ ID NO: 30); (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 31); y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGELTVSS (SEQ ID NO: 32). En casos adicionales, el anticuerpo anti-VEGF incluye las siguientes cuatro FR de dominio variable de cadena ligera: (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DIQMTQSPSSLSASVGDEVTITC (SEQ ID NO: 26), (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19); y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20). En

algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF incluye (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37.

En otros casos, el anticuerpo anti-VEGF incluye las seis HVR que siguen: (a) una HVR-H1 que
 5 comprende la secuencia de aminoácidos de DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) una HVR-H2 que
 comprende la secuencia de aminoácidos de GITPAGGYEYYADSVEG (SEQ ID NO: 22); (c) una
 HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) una
 HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) una
 HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SASFLYS (SEQ ID NO: 9); y (f) una
 10 HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10). En
 algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF incluye las siguientes cuatro FR de dominio variable de
 cadena pesada: (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de
 EEQLVEEGGGLVQPGESLRLSCAASGFEIS (SEQ ID NO: 52); (b) una FR-H2 que comprende la
 secuencia de aminoácidos de WVRQEPGEGLEWVA (SEQ ID NO: 30); (c) una FR-H3 que
 15 comprende la secuencia de aminoácidos de RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (SEQ
 ID NO: 31); y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGELTVSS
 (SEQ ID NO: 32). En casos adicionales, el anticuerpo anti-VEGF incluye las siguientes cuatro FR
 de dominio variable de cadena ligera: (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos
 de DIQMTQSPSSLSASVGDEVTITC (SEQ ID NO: 26), (b) una FR-L2 que comprende la secuencia
 20 de aminoácidos WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) una FR-L3 que comprende la
 secuencia de aminoácidos de GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19); y
 (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20). En
 algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF incluye (a) un dominio VH que comprende una secuencia
 de aminoácidos de SEQ ID NO: 51 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de
 25 aminoácidos de SEQ ID NO: 37.

Por ejemplo, en otros casos, el anticuerpo anti-VEGF incluye las seis HVR que siguen: (a) una
 HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) una HVR-H2
 que comprende la secuencia de aminoácidos de GITPAGGYEYYADSVEG (SEQ ID NO: 22); (c)
 una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d)
 30 una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e)
 una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SASFLYS (SEQ ID NO: 9); y (f) una
 HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10). En
 algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF incluye las siguientes cuatro FR de dominio variable de
 cadena pesada: (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de
 35 EEQLVEEGGGLVQPGESLELSCAASGFEIS (SEQ ID NO: 29); (b) una FR-H2 que comprende la

secuencia de aminoácidos de WVRQEPGEGLEWVA (SEQ ID NO: 30); (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 31); y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGELTVSS (SEQ ID NO: 32). En casos adicionales, el anticuerpo anti-VEGF incluye las siguientes cuatro FR de dominio variable de cadena ligera: (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 17), (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19); y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20). En algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF incluye (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

En otros casos, el anticuerpo anti-VEGF incluye las seis HVR que siguen: (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GITPAGGYEYYADSVES (SEQ ID NO: 22); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SASFLYS (SEQ ID NO: 9); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10). En algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF incluye las siguientes cuatro FR de dominio variable de

cadena pesada: (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EEQLVEEGGGLVQPGESLRLSCAASGFEIS (SEQ ID NO: 52); (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQEPGEGLEWVA (SEQ ID NO: 30); (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 31); y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGELTVSS (SEQ ID NO: 32). En casos adicionales, el anticuerpo anti-VEGF incluye las siguientes cuatro FR de dominio variable de cadena ligera: (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 17), (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19); y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20). En algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF incluye (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

En algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF comprende (a) un dominio variable de cadena pesada

(VH) que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia) con, o la secuencia de, cualquiera de las SEQ ID NO: 11, 40 o 42; (b) un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia) con, o la secuencia de, cualquiera de las SEQ ID NO: 12, 41 o 46; o (c) un dominio VH como en (a) y un dominio VL como en (b). Por ejemplo, en algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12. En algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12. En algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12. En algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41. En algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46.

En algunos casos, cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF puede incluir una, dos, tres o cuatro de las siguientes regiones marco (FR) de dominio variable de cadena pesada: (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTIS (SEQ ID NO: 13); (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 14) o WVRQEPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 39); (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RFTISADTSKNTAYLQMRSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 15); y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 16).

En algunos casos, cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF puede incluir una, dos, tres o cuatro de las siguientes FR de dominio variable de cadena ligera: (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 17) o DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIDC (SEQ ID NO: 45), (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19), GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDSATYYC (SEQ ID NO: 44) o GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYC (SEQ ID NO: 54); y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20) o FGQGTKVEVK (SEQ ID NO: 55).

En algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de

aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSG
SGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGYGNPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 59).

- 5 En algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSG
SGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGYGNPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 59).

- 10 En algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSG
SGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGYGNPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 59).

- 15 En algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSG
SGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGYGNPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 59).

- 20 En algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSG
SGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGYGNPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 59).

- 25 En algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSG
SGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGYGAPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 60).

- 30 En algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSG
SGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGYGAPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 60).

- 35 En algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de

aminoácidos de la SEQ ID NO: 40 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGYGAPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 60).

- 5 En algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGYGAPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 60).

- 10 En algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGYGAPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 60). Por ejemplo, en

- 15 algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia) con, o la secuencia de, la SEQ ID NO: 11; (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de secuencia (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94

- 20 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia) con, o la secuencia de, la SEQ ID NO: 11; o (c) un dominio VH como en (a) y un dominio VL como en (b). En algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF puede incluir (a) un HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GITPAGGYTRYADSVKG (SEQ ID NO: 7); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de

- 25 aminoácidos de FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SASFLYS (SEQ ID NO: 9); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10). En algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF incluye las siguientes regiones marco de cadena pesada: (a) una FR-H1 que comprende la

- 30 secuencia de aminoácidos de EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTIS (SEQ ID NO: 13); (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 14); (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RFTISADTSKNTAYLQMRSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 15); y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos WGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 16). En algunos casos, el anticuerpo

- 35 anti-VEGF incluye las siguientes regiones marco de cadena ligera: (a) una FR-L1 que comprende

la secuencia de aminoácidos DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 17), (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19); y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20). En algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF incluye un dominio de unión que comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En algunos casos, el ejemplo de anti-VEGF es N94A.F83A.N82aR.Y58R (al que también se hace referencia como G6.31 AARR o G6.31.AARR).

En algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF comprende (a) el dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia) con, o la secuencia de, la SEQ ID NO: 33 o 51; (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia) con, o la secuencia de, cualquiera de las SEQ ID NO: 12, 34, 35, 36, 37 o 38; o (c) un dominio VH como en (a) y un dominio VL como en (b). Por ejemplo, en algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12. En algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34. En algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35. En algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36. En algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37. En algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38. En algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38. En algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35. En algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de

aminoácidos de la SEQ ID NO: 51 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37. En algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12.

- 5 En algunos casos, cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF puede incluir una, dos, tres o cuatro de las siguientes regiones marco (FR) de dominio variable de cadena pesada: una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EEQLVEEGGGLVQPGESLELSAASGFEIS (SEQ ID NO: 29) o EEQLVEEGGGLVQPGESLRLSCAASGFEIS (SEQ ID NO: 52); (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQEPGEGLEWVA (SEQ ID NO: 30) o
- 10 WVRQEPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 39); (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 31); y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGELVTVSS (SEQ ID NO: 32).

- En algunos casos, cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF puede incluir una, dos, tres o cuatro de las siguientes FR de dominio variable de cadena ligera: (a) una FR-L1 que comprende la
- 15 secuencia de aminoácidos DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC (SEQ ID NO: 17), DIQMTQSPESLSASVGDEVITC (SEQ ID NO: 25) o DIQMTQSPSSLSASVGDEVITC (SEQ ID NO: 26), (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18) o WYQQKPGEAPKLLIY (SEQ ID NO: 27); (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19),
- 20 GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 24) o GVPSRFSGSGSGTDFLTIESLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 28); y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20).

- En algunos casos, la invención provee un anticuerpo que comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 48 y/o (b) una cadena ligera que
- 25 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 50. En determinadas modalidades, el anticuerpo es G6.31 AARR expresado en formato Fab.

- En algunos casos, la invención provee un anticuerpo que comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49 y/o (b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 50. En determinadas modalidades, el
- 30 anticuerpo es una versión variante de G6.31 AARR que carece de reactividad respecto a IgG anti-humana.

En un aspecto adicional, un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF) de acuerdo con cualquiera de las modalidades que anteceden puede incorporar cualquiera de las características, de forma individual o combinada, descritas en los apartados 1-8 que figuran a continuación.

- 35 1. *Afinidad de anticuerpos*

En determinadas modalidades, un anticuerpo que se proporciona en la presente tiene una constante de disociación (K_d) de $\geq 1 \mu\text{M}$, $\geq 100 \text{ nM}$, $\geq 10 \text{ nM}$, $\geq 1 \text{ nM}$, $\geq 0.1 \text{ nM}$, $\geq 0.01 \text{ nM}$, o $\geq 0.001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M). Por ejemplo, en algunos casos, un anticuerpo provisto en la presente se une a un

5 antígeno (por ejemplo, VEGF humano (hVEGF)) con una K_d de alrededor de 10 nM o menor. En algunos casos, un anticuerpo provisto en la presente se une a un antígeno (por ejemplo, hVEGF) con una K_d de alrededor de 5 nM o menor. En algunos casos, un anticuerpo provisto en la presente se une a hVEGF con una K_d de alrededor de 2 nM o menor. Por ejemplo, en algunos casos, el anticuerpo se une a un antígeno (por ejemplo, hVEGF) con una K_d de entre alrededor de

10 25 pM y alrededor de 2 nM (por ejemplo, alrededor de 25 pM , alrededor de 50 pM , alrededor de 75 pM , alrededor de 100 pM , alrededor de 125 pM , alrededor de 150 pM , alrededor de 175 pM , alrededor de 200 pM , alrededor de 225 pM , alrededor de 250 pM , alrededor de 275 pM , alrededor de 300 pM , alrededor de 325 pM , alrededor de 350 pM , alrededor de 375 pM , alrededor de 400 pM , alrededor de 425 pM , alrededor de 450 pM , alrededor de 475 pM , alrededor de 500 pM ,

15 alrededor de 525 pM , alrededor de 550 pM , alrededor de 575 pM , alrededor de 600 pM , alrededor de 625 pM , alrededor de 650 pM , alrededor de 675 pM , alrededor de 700 pM , alrededor de 725 pM , alrededor de 750 pM , alrededor de 775 pM , alrededor de 800 pM , alrededor de 825 pM , alrededor de 850 pM , alrededor de 875 pM , alrededor de 900 pM , alrededor de 925 pM , alrededor de 950 pM , alrededor de 975 pM , alrededor de 1 nM , alrededor de 1.1 nM , alrededor de 1.2 nM ,

20 alrededor de 1.3 nM , alrededor de 1.4 nM , alrededor de 1.5 nM , alrededor de 1.6 nM , alrededor de 1.7 nM , alrededor de 1.8 nM , alrededor de 1.9 nM o alrededor de 2 nM). En algunos casos, el anticuerpo se une a un antígeno (por ejemplo, hVEGF) con una K_d de entre alrededor de 75 pM y alrededor de 600 pM (por ejemplo, alrededor de 75 pM , alrededor de 100 pM , alrededor de 125 pM , alrededor de 150 pM , alrededor de 175 pM , alrededor de 200 pM , alrededor de 225 pM ,

25 alrededor de 250 pM , alrededor de 275 pM , alrededor de 300 pM , alrededor de 325 pM , alrededor de 350 pM , alrededor de 375 pM , alrededor de 400 pM , alrededor de 425 pM , alrededor de 450 pM , alrededor de 475 pM , alrededor de 500 pM , alrededor de 525 pM , alrededor de 550 pM , alrededor de 575 pM , alrededor de 600 pM). En algunos casos, el anticuerpo une un antígeno (por ejemplo, hVEGF) con una K_d entre alrededor de 75 pM y alrededor de 500 pM . En algunos casos,

30 el anticuerpo une un antígeno (por ejemplo, hVEGF) con una K_d entre alrededor de 75 pM y alrededor de 400 pM . En algunos casos, el anticuerpo une un antígeno (por ejemplo, hVEGF) con una K_d entre alrededor de 75 pM y alrededor de 300 pM . En algunos casos, el anticuerpo une un antígeno (por ejemplo, hVEGF) con una K_d entre alrededor de 75 pM y alrededor de 200 pM . En algunos casos, el anticuerpo une un antígeno (por ejemplo, hVEGF) con una K_d entre alrededor de

35 75 pM y alrededor de 150 pM . En algunos casos, el anticuerpo une un antígeno (por ejemplo,

hVEGF) con una K_d entre alrededor de 75 pM y alrededor de 125 pM. En algunos casos, el anticuerpo une un antígeno (por ejemplo, hVEGF) con una K_d entre alrededor de 75 pM y alrededor de 100 pM. En algunos casos, el anticuerpo une un antígeno (por ejemplo, hVEGF) con una K_d de alrededor de 80 pM. En algunos casos, el anticuerpo une un antígeno (por ejemplo, hVEGF) con una K_d de alrededor de 60 pM. En algunos casos, el anticuerpo une un antígeno (por ejemplo, hVEGF) con una K_d de alrededor de 40 pM.

En una modalidad, la K_d se mide mediante un ensayo de unión a antígenos con radioetiquetado (RIA). En una modalidad, se realiza un RIA con la versión de Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno. Por ejemplo, la afinidad de unión en solución de Fabs con respecto al antígeno se mide al equilibrar el Fab con una concentración mínima de un antígeno etiquetado con (^{125} I) en presencia de una serie de titulación de un antígeno no etiquetado y posteriormente capturar el antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpos anti-Fab (véase, por ejemplo, Chen et ál., *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999)). Para establecer las condiciones del ensayo, se recubren placas de múltiples pocillos MICROTITER® (Thermo Scientific) durante la noche con 5 µg/ml de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato de sodio 50 mM (pH 9.6), y luego se bloquean con albúmina de suero bovino (BSA) al 2 % (p/v) en solución salina amortiguada con fosfato (PBS) durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no adsorbente (Nunc n.º 269620) se mezclan 100 pM o 26 pM de antígeno [^{125} I] con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, coherentes con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta et ál., *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)). El Fab de interés se incuba luego durante la noche; sin embargo, la incubación puede continuar por un período de tiempo más prolongado (por ejemplo, alrededor de 65 horas) para asegurar que se alcance el equilibrio. A partir de allí, las mezclas se transfieren a la placa de captura para incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). Luego se retira la solución y se lava la placa ocho veces con polisorbato 20 al 0.1 % (TWEEN-20®) en PBS. Cuando se hayan secado las placas, se agregan 150 µl/pocillo de centelleador (MICROSCINT-20™; Packard) y se cuentan las placas en un contador gamma TOPCOUNT™ (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que producen menos o el equivalente de 20% de la unión máxima se eligen para su uso en ensayos de unión competitiva.

De acuerdo con otra modalidad, la K_d se mide usando un ensayo de resonancia de plasmones superficiales BIACORE®. Por ejemplo, un ensayo que utiliza un BIACORE®-2000 o un BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) se lleva a cabo a 25 °C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (RU). En una modalidad, se activan chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con clorhidrato con *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las

instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4.8, hasta 5 µg/ml (~ 0.2 µM) antes de la inyección a una velocidad de flujo de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de la proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos que no reaccionaron.

5 Se inyectaron diluciones seriales al doble de Fab (0.78 nM a 500 nM) en PBS con tensioactivo polisorbato 20 (TWEEN-20™) (PBST) al 0.05 % a 25 °C a una velocidad de flujo de aproximadamente 25 µl/minutos para realizar medidas de cinética. Se calculan velocidades de asociación (k_{on}) y velocidades de disociación (k_{off}) con un modelo de unión Langmuir uno a uno simple (software de evaluación BIACORE® versión 3.2) mediante el ajuste simultáneo de los
10 sensogramas de asociación y disociación. Se calcula la constante de disociación (K_d) como la relación k_{off}/k_{on} . Véase, por ejemplo, Chen et ál., *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999). Si la velocidad de asociación supera $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ en el ensayo de resonancia de plasmones superficiales antemencionado, la velocidad de asociación puede determinarse mediante el uso de una técnica de inactivación fluorescente que mide el aumento o la disminución de la intensidad de emisión de
15 fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, 16 nm de paso banda) a 25 °C de un anticuerpo contra antígenos 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7.2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno según la medición en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con detención de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO™ serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

20 2. *Estabilidad de los anticuerpos*

En algunos casos, el anticuerpo utilizado en los conjugados de anticuerpo de la invención o las composiciones de estos presenta estabilidad mejorada, por ejemplo, en comparación con un anticuerpo anti-VEGF, por ejemplo, G6.31 (ver, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 7 758 859 y la publicación de solicitud internacional n.º WO 2005/012359, las que se incorporan a la
25 presente en su totalidad mediante esta referencia. La estabilidad de un anticuerpo puede determinarse usando cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, fluorimetría diferencial de barrido (DSF), dicroísmo circular (DC), fluorescencia de proteína intrínseca, calorimetría diferencial de barrido, espectroscopía, dispersión de luz (por ejemplo, dispersión de luz dinámica (DLS) y dispersión de luz estática (SLS), cromatografía de autointeracción (SIC). El anticuerpo
30 anti-VEGF puede tener, por ejemplo, una temperatura de fusión (T_m) mejorada, una temperatura de agregación (T_{agg}) u otras métricas de estabilidad en comparación con un anticuerpo anti-VEGF, por ejemplo, G6.31.

En determinadas modalidades, un anticuerpo provisto en la presente tiene una T_m que es mayor o igual a alrededor de 80°C (por ejemplo, alrededor de 81°C, alrededor de 82°C, alrededor de 83°C,
35 alrededor de 84°C, alrededor de 85°C, alrededor de 86°C, alrededor de 87°C, alrededor de 88°C,

alrededor de 89°C, alrededor de 90°C, alrededor de 91°C, alrededor de 92°C o alrededor de 93°C). Por ejemplo, en algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF tiene una T_m que es mayor o igual a alrededor de 83.5°C (por ejemplo, alrededor de 83.5°C, alrededor de 84°C, alrededor de 85°C, alrededor de 86°C, alrededor de 87°C, alrededor de 88°C, alrededor de 89°C, alrededor de 90°C, alrededor de 91°C, alrededor de 92°C o alrededor de 93°C). En algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF tiene una T_m de alrededor de 82°C a alrededor de 92°C (por ejemplo, alrededor de 82°C, alrededor de 83°C, alrededor de 84°C, alrededor de 85°C, alrededor de 86°C, alrededor de 87°C, alrededor de 88°C, alrededor de 89°C, alrededor de 90°C, alrededor de 91°C o alrededor de 92°C). En algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF tiene una T_m de alrededor de 82°C. En algunos casos, cualquiera de los valores T_m precedentes de un anticuerpo anti-VEGF se determinan mediante DSF. En algunas modalidades, el valor T_m de un anticuerpo anti-VEGF se determina tal como se describe, por ejemplo, en el Ejemplo 1 de la solicitud de patente internacional n.ºPCT/US2016/053454, la que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia.

3. Fragmentos de anticuerpo

En determinadas modalidades, un anticuerpo que se proporciona en la presente es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpos incluyen, de modo no taxativo, fragmentos Fab, Fab', Fab-C, Fab'-SH, F(ab')₂, Fv y scFv y otros fragmentos que se describirán a continuación. Para ver una reseña sobre determinados fragmentos de anticuerpos, ver Hudson et ál., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003). Para acceder a una reseña sobre fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Pluckthün, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, tomo 113, Rosenberg y Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York), págs. 269-315, (1994); véase también WO 93/16185; y las patentes estadounidenses n.º 5 571 894 y 5 587 458. Para acceder a una descripción sobre fragmentos Fab y F(ab')₂ que comprenden residuos de epítomos de unión al receptor de rescate y que tienen una mayor semivida in vivo, véase la patente estadounidense n.º 5 869 046.

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véase, por ejemplo, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et ál., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); y Hollinger et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993). Los triacuerpos y tetracuerpos se describen también en Hudson et ál., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

Los anticuerpos de un solo dominio son fragmentos de anticuerpos que comprenden la totalidad o una parte del dominio variable de cadena pesada o la totalidad o una parte del dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo. En determinadas modalidades, un anticuerpo de dominio sencillo es un anticuerpo de dominio sencillo humano (Domantis, Inc., Waltham, MA, EUA, vea, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6 248 516 B1).

Los fragmentos de anticuerpos pueden elaborarse mediante diversas técnicas, que incluyen, de

modo no taxativo, digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como producción mediante células hospedadoras recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), como se describe en la presente.

4. Anticuerpos quiméricos y humanizados

5 En determinadas modalidades, un anticuerpo que se proporciona en la presente es un anticuerpo quimérico. Se describen determinados anticuerpos quiméricos, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 4 816 567; y Morrison et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 81:6851-6855 (1984)). En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (por ejemplo, un dominio variable derivado de un ratón, una rata, un hámster, un conejo o un primate no humano, como un mono) y un dominio variable humano. En un ejemplo adicional, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo «con conmutación de clase» donde se ha cambiado la clase o subclase con respecto a la del anticuerpo original. Los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de unión al antígeno de este.

En determinadas modalidades, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Normalmente, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenicidad en humanos, mientras que mantiene la especificidad y la afinidad del anticuerpo no humano original. Generalmente, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR, por ejemplo, las CDR (o partes de estas) derivan de un anticuerpo no humano y las FR (o partes de estas) derivan de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante humana. En algunas modalidades, algunos residuos de las FR en un anticuerpo humanizado se sustituyen con residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del cual derivan los residuos de las HVR), por ejemplo, para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad de un anticuerpo.

25 Los anticuerpos humanizados y los métodos para elaborarlos se resumen en, por ejemplo, Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008), y se describen más detalladamente en, por ejemplo, Riechmann et ál., *Nature* 332:323-329 (1988); Queen et ál., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); patentes estadounidenses n.º 5 821 337, 7 527 791, 6 982 321, y 7 087 409; Kashmiri et ál., *Methods* 36:25-34 (2005) (que describe el injerto de región determinante de especificidad (SDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (que describe el «revestimiento»); Dall'Acqua et ál., *Methods* 36:43-60 (2005) (que describe la «trasposición de FR»); y Osbourn et ál., *Methods* 36:61-68 (2005) y Klimka et ál., *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (que describen la estrategia de «selección orientada» para trasponer FR).

Las regiones marco humanas que pueden ser utilizadas para humanización incluyen, de modo no taxativo: regiones marco seleccionadas con el método de mejor ajuste (vea, por ejemplo, Sims et

ál., *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); regiones marco derivadas de la secuencia de consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de cadena ligera o pesada (véase, por ejemplo, Carter et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); y Presta et ál., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); regiones marco humanas maduras (mutadas de forma somática) o regiones marco de línea germinal humanas (véase, por ejemplo, Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); y regiones marco derivadas de la examinación de bibliotecas de FR (véase, por ejemplo, Baca et ál., *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) y Rosok et ál., *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

5. Anticuerpos humanos

En determinadas modalidades, un anticuerpo provisto en la presente es un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos se pueden producir usando varias técnicas conocidas en la técnica. En términos generales, se describen los anticuerpos humanos en van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) y Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008).

Los anticuerpos humanos se pueden preparar administrando un inmunógeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir anticuerpos intactos humanos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a una exposición de antígenos. Estos animales contienen normalmente la totalidad o parte de los locus de inmunoglobulina humana, los cuales reemplazan los locus de inmunoglobulina endógena o están presentes de forma extracromosómica o integrados de forma aleatoria en los cromosomas del animal. En tales ratones transgénicos, los locus de inmunoglobulina endógena se encuentran generalmente inactivados. Se pueden encontrar una reseña de los métodos para obtener anticuerpos humanos a partir de animales transgénicos en Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005). Véanse también, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 6 075 181 y 6 150 584 que describen la tecnología XENOMOUSE™; la patente estadounidense n.º 5 770 429 que describe la tecnología HUMAB®; la patente estadounidense n.º 7 041 870 que describe la tecnología K-M MOUSE®, y la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º US 2007/0061900, que describe la tecnología VELOCIMOUSE®). Las regiones variables humanas de anticuerpos intactos generados por estos animales se pueden modificar de forma adicional mediante, por ejemplo, la combinación con una región constante humana diferente.

Los anticuerpos humanos también se pueden producir mediante métodos basados en hibridoma. Se han descrito las líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma humano-ratón para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Véase, por ejemplo, Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984), Brodeur et ál., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987) y Boerner et ál., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).

También se describen anticuerpos humanos generados mediante tecnología de hibridoma de

linfocitos B humanos en Li et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 103:3557-3562 (2006)). Los métodos adicionales incluyen aquellos descritos, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 7 189 826 (que describe la producción de anticuerpos de IgM humanos monoclonales a partir de líneas celulares de hibridoma) y Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) (que describen hibridomas humano-humano). También se describe la tecnología de hibridoma humano (tecnología de trioma) en Vollmers y Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) y Vollmers y Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005). Los anticuerpos humanos pueden generarse también mediante el aislamiento de las secuencias de dominio variable del clon de Fv que se seleccionan de bibliotecas de expresión en fagos derivados de humanos. Estas secuencias de dominio variable se pueden combinar luego con un dominio constante humano deseado. A continuación se describen las técnicas para seleccionar anticuerpos humanos de bibliotecas de anticuerpos.

6. Anticuerpos derivados de genotecas

Los anticuerpos de la invención se pueden aislar mediante análisis de genotecas de combinación para determinar los anticuerpos con la o las actividades deseadas. Por ejemplo, en la técnica se conocen diversos métodos para generar genotecas de expresión en fagos y analizar dichas genotecas para determinar anticuerpos con las características de unión deseadas. Dichos métodos se analizan, por ejemplo, en Hoogenboom et ál. en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et ál., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y se describen adicionalmente, por ejemplo, en McCafferty et ál., *Nature* 348:552-554; Clackson et ál., *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks et ál., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks y Bradbury, en *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et ál., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et ál., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee et ál., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004).

En determinados métodos de expresión en fagos, se clonan repertorios de genes de VH y VL por separado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y se recombinan de forma aleatoria en bibliotecas de fagos que luego pueden analizarse para determinar fagos de unión a antígenos, como se describe en Winter et ál., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Típicamente los fagos presentan fragmentos de anticuerpos, ya sea como fragmentos Fv de cadena simple (scFv) o como fragmentos Fab. Las bibliotecas de fuentes inmunizadas proporcionan al inmunógeno anticuerpos de alta afinidad sin que sea necesaria la construcción de hibridomas. De manera alternativa, el repertorio sin inmunización puede clonarse (por ejemplo, a partir de un humano) para proporcionar una única fuente de anticuerpos para un amplio espectro de xenoantígenos y autoantígenos sin ningún tipo de inmunización, tal como se describe en Griffiths et ál., *EMBO J*, 12: 725-734 (1993). Finalmente, las bibliotecas sin

inmunización también pueden elaborarse de forma sintética al clonar segmentos génicos V sin reorganización a partir de células madre, y mediante el uso de cebadores de PCR que contienen secuencias aleatorias para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para lograr la reorganización *in vitro*, tal como se describe en Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Las publicaciones de patente que describen bibliotecas de fagos de anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo: la patente estadounidense n.º 5 750 373 y las publicaciones de patentes estadounidenses n.º 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 y 2009/0002360.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos pueden derivar de bibliotecas de fagos, tal como se describe en la solicitud de patente internacional n.º PCT/US2016/053454.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo aislados de bibliotecas de anticuerpos humanos se consideran anticuerpos humano o fragmentos de anticuerpo humano en la presente.

7. *Anticuerpos multiespecíficos*

En determinadas modalidades, un anticuerpo proporcionado en la presente es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión con respecto a al menos dos sitios diferentes. En determinadas modalidades, una de las especificidades de unión es para VEGF y la otra es para cualquier otro antígeno (por ejemplo, una segunda molécula biológica, por ejemplo, interleucina 1 beta (IL-1 β); interleucina 6 (IL-6); receptor de interleucina 6 (IL-6R); interleucina 13 (IL-13); receptor de IL-13 (IL-13R); PDGF (por ejemplo, PDGF-BB); angiopoyetina; angiopoyetina 2 (Ang2); Tie2; S1P; integrinas $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$ y $\alpha5\beta1$; betacelulina; apelina/APJ; eritropoyetina; factor de complemento D; TNF α ; HtrA1; un receptor de VEGF (por ejemplo, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, receptor de VEGF unido a la membrana (mbVEGFR) o receptor de VEGF soluble (sVEGFR)); receptor de ST-2 y proteínas genéticamente vinculadas al riesgo de degeneración macular asociada a la edad (AMD) (tal como, componentes C2 de la vía de complemento, factor B, factor H, CFHR3, C3b, C5, C5a y C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; interleucina 8 (IL-8); CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC; COL10A1 y TNFRSF10A). Por consiguiente, el anticuerpo biespecífico puede tener una especificidad de unión para VEGF e IL-1 β ; VEGF e IL-6; VEGF e IL-6R; VEGF e IL-13; VEGF e IL-13R; VEGF y PDGF (por ejemplo, PDGF-BB); VEGF y angiopoyetina; VEGF y Ang2; VEGF y Tie2; VEGF y S1P; VEGF e integrina $\alpha\beta3$; VEGF e integrina $\alpha\beta5$; VEGF e integrina $\alpha5\beta1$; VEGF y betacelulina; VEGF y apelina/APJ; VEGF y eritropoyetina; VEGF y factor de complemento D; VEGF y TNF α ; VEGF y HtrA1; VEGF y un receptor de VEGF (por ejemplo, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, mbVEGFR o sVEGFR); VEGF y receptor de ST-2; VEGF y C2; VEGF y factor B; VEGF y factor H; VEGF y CFHR3; VEGF y C3b; VEGF y C5; VEGF y C5a; VEGF y C3a; VEGF y ARMS2; VEGF y TIMP3; VEGF y HLA; VEGF e IL-8; VEGF y CX3CR1; VEGF y

TLR3; VEGF y TLR4; VEGF y CETP; VEGF y LIPC; VEGF y COL10A1 o VEGF y TNFRSF10A. En determinadas modalidades, los anticuerpos biespecíficos se pueden unir a dos epítopos diferentes de VEGF. Los anticuerpos biespecíficos también pueden utilizarse para localizar agentes citotóxicos de células que expresan el VEGF. Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos Fab, Fab' o Fab-C).

En algunos casos, el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-angiopoyetina 2 (Ang2) descrito en la solicitud de patente estadounidense n.º US 2014/0017244, la que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia. Por ejemplo, el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-Ang2 puede incluir un primer dominio de unión que se une a VEGF (tal como cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF descritos en la presente) y un segundo dominio de unión que se une a Ang2 que incluye (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GYYMH (SEQ ID NO: 62); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WINPNSGGTNYAQKFQG (SEQ ID NO: 63); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SPNPYYYDSSGYYPGAFDI (SEQ ID NO: 64); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GGNNIGSKSVH (SEQ ID NO: 65); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de DDSDRPS (SEQ ID NO: 66); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QWWDSSSDHWV (SEQ ID NO: 67) o una combinación de una o más de las HVR anteriores y una o más variantes de estas con una identidad de secuencia de al menos alrededor de 80 % (por ejemplo, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con respecto a cualquiera de las SEQ ID NO: 62-67.

En algunos casos, el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-Ang2 puede incluir un primer dominio de unión que se une a VEGF (tal como cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF descritos en la presente) y un segundo dominio de unión que se une a Ang2 e incluye (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos 80 % (por ejemplo, una identidad de secuencia de 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %), o de la secuencia de la SEQ ID NO: 68; (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos 80 % (por ejemplo, una identidad de secuencia de 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %), o la secuencia de la SEQ ID NO: 69; o (c) un dominio VH como en (a) y un dominio VL como en (b). En algunos casos, el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-Ang2 puede incluir un primer dominio de unión que se une a VEGF (tal como cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF descritos en la presente) y un segundo dominio de unión que se une

específicamente a Ang2, en donde el segundo dominio de unión es cualquier dominio de unión de anticuerpo descrito en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2010/069532, la que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia, o una variante de este.

En otros casos, el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-Ang2 es cualquier anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-Ang2 descrito en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2016/073157.

En algunos casos, el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-IL-6. En algunos casos, un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-IL-6 puede incluir un primer dominio de unión que se une a VEGF (tal como cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF descritos en la presente) y un segundo dominio de unión que se une a IL-6. El segundo dominio de unión puede ser un dominio de unión de cualquier anticuerpo anti-IL-6 conocido en la técnica, por ejemplo, EBI-031 (Eleven Biotherapeutics; ver, por ejemplo, WO 2016/073890, el que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia), siltuximab (SYLVANT®), olokizumab, clazakizumab, sirukumab, elsilimomab, gerilimzumab, OPR-003, MEDI-5117, PF-04236921 o una variante de este.

En algunos casos, el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-IL-6R. En algunos casos, un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-IL-6R puede incluir un primer dominio de unión que se une a VEGF (tal como cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF descritos en la presente) y un segundo dominio de unión que se une a IL-6R. El segundo dominio de unión puede ser un dominio de unión de cualquier anticuerpo anti-IL-6R conocido en la técnica, por ejemplo, tocilizumab (ACTEMRA®) (ver, por ejemplo, WO 1992/019579, el que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia), sarilumab, vobarilizumab (ALX-0061), SA-237 o una variante de este.

Las técnicas para realizar anticuerpos multiespecíficos incluyen, de modo no taxativo, expresión conjunta recombinante de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina con diferentes especificidades (ver Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)), WO 93/08829, y Traunecker et ál., *EMBO J.* 10: 3655 (1991)), y modificación de «botón en ojal» (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5 731 168). También es posible producir anticuerpos multiespecíficos mediante la modificación de efectos de direccionamiento electrostático para crear moléculas heterodiméricas de Fc de anticuerpos (WO 2009/089004A1); la reticulación de dos o más anticuerpos o fragmentos (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4 676 980 y Brennan et ál., *Science*, 229: 81 (1985)); el uso de cremalleras de leucina para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kostelny et ál., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)); el uso de tecnología de «diacuerpos» para elaborar fragmentos de anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Hollinger et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448

(1993)); y el uso de dímeros Fv de cadena simple (sFv) (ver, por ejemplo, Gruber et ál., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); y la preparación de anticuerpos triespecíficos, tal como se describió, por ejemplo, en Tutt et ál., *J. Immunol.* 147:60 (1991).

En la presente también se incluyen anticuerpos modificados genéticamente con tres o más sitios de unión a antígenos funcionales, que incluyen «anticuerpos Octopus» (véase, por ejemplo, US 2006/0025576A1).

El anticuerpo o fragmento descrito en la presente incluye también un «FAB de doble acción» o «DAF» que comprende un sitio de unión al antígeno que se une a VEGF así como otro antígeno diferente (véase, por ejemplo, US 2008/0069820).

8. Variantes de anticuerpos

En determinadas modalidades, se contemplan las variantes de secuencias de aminoácidos (por ejemplo, variantes de anticuerpo que incluyen una o más alteraciones de residuos de aminoácidos) de los anticuerpos proporcionados en la presente. Por ejemplo, puede ser conveniente mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencias de aminoácidos de un anticuerpo se pueden preparar mediante la introducción de modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica al anticuerpo o mediante síntesis de péptidos. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, eliminaciones de residuos y/o inserciones en estos y/o sustituciones de estos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución puede realizarse para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, la unión a antígenos.

a) Variantes de sustitución, inserción y eliminación

En determinadas modalidades, se proporcionan variantes de anticuerpos que presentan una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para la mutagénesis sustitucional incluyen las HVR y las FR. Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 1 con el título «sustituciones preferidas». Se proporcionan cambios más considerables en la Tabla 1 con el título «ejemplos de sustituciones» y tal como se describe más adelante con respecto a las clases de cadenas laterales de aminoácidos. Se pueden introducir sustituciones de aminoácidos en un anticuerpo de interés y analizar los productos para determinar una actividad deseada, por ejemplo, mantenimiento/mejora de unión a antígenos, inmunogenicidad disminuida o ADCC o CDC mejorados.

Tabla 1

	Original Residuo	Ejemplos de sustituciones	Sustituciones preferidas
5	Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
	Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
	Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
	Asp (D)	Glu; Asn	Glu
10	Cys (C)	Ser; Ala	Ser
	Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
	Glu (E)	Asp; Gln	Asp
	Gly (G)	Ala	Ala
	His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
15	Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
	Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
	Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
	Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
20	Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
	Pro (P)	Ala	Ala
	Ser (S)	Thr	Thr
	Thr (T)	Val; Ser	Ser
	Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
25	Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
	Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Se pueden agrupar los aminoácidos de acuerdo con propiedades comunes de la cadena lateral:

- 30 (1) hidrofóbicos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
 (2) hidrofílicos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
 (3) ácidos: Asp, Glu;
 (4) básicos: His, Lys, Arg;
 (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
 35 (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

Un tipo de variante de sustitución implica la sustitución de uno o más residuos de regiones hipervariables y/o residuos de FR de un anticuerpo original (por ejemplo, un anticuerpo humano o humanizado). En general, la o las variantes resultantes seleccionadas para estudios adicionales tendrán modificaciones (por ejemplo, mejoras) en determinadas propiedades biológicas (por ejemplo, aumento de la afinidad, mayor estabilidad, mayor expresión, pl alterado y/o menor inmunogenicidad) en comparación con el anticuerpo original y/o mantendrán sustancialmente determinadas propiedades biológicas del anticuerpo original. Un ejemplo de variante sustitutiva es un anticuerpo con afinidad madurada, que puede generarse de manera conveniente, por ejemplo, utilizando técnicas de maduración de afinidad en base a la expresión en fagos, como las que se describen en la presente. En resumen, se mutan uno o más residuos de HVR y se expresan los anticuerpos variantes en fagos y se realiza un análisis en busca de una actividad biológica particular (por ejemplo, afinidad de unión).

Se pueden producir alteraciones (por ejemplo, sustituciones) en las HVR, por ejemplo, para mejorar la afinidad de los anticuerpos. Tales alteraciones pueden realizarse en «puntos de interés» de HVR es decir, residuos codificados por codones que experimentan una mutación a una frecuencia alta durante el proceso de maduración somática (véase, por ejemplo, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)) y/o residuos que entran en contacto con el antígeno, donde se evalúa el VH o VL variante resultante para determinar la afinidad de unión. Se describe la maduración por afinidad mediante la construcción y reelección de bibliotecas secundarias en, por ejemplo, Hoogenboom et ál., en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et ál., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)). En algunas modalidades de la maduración de afinidad, se introduce diversidad en los genes variables escogidos para su maduración mediante cualquiera de una variedad de métodos (por ejemplo, PCR propensa a errores, trasposición de cadenas o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos). Luego se crea una segunda biblioteca. La biblioteca luego se analiza para identificar cualquier variante de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro método para introducir diversidad implica estrategias dirigidas a HVR, en las que se distribuyen de manera aleatoria varios residuos de HVR (por ejemplo, 4-6 residuos a la vez). Es posible identificar en forma específica los residuos HVR involucrados en la unión a antígenos, por ejemplo, con modelado o mutagénesis de determinación de alanina. En particular, se suelen seleccionar CDR-H3 y CDR-L3 como diana.

En determinadas modalidades, pueden ocurrir sustituciones, inserciones o eliminaciones dentro de una o más HVR siempre que tales alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo de unirse a un antígeno. Por ejemplo, las alteraciones conservadoras (por ejemplo,

sustituciones conservadoras que se proporcionan en la presente) que no reducen sustancialmente la afinidad de unión pueden generarse en las HVR. Estas alteraciones pueden, por ejemplo, estar fuera de los residuos que entran en contacto con el antígeno en las HVR. En determinadas modalidades de las secuencias de VH y VL variantes que se proporcionaron anteriormente, cada HVR se encuentra inalterada o contiene no más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

En determinadas modalidades, se pueden producir sustituciones, inserciones o eliminaciones en una o más FR, siempre que tales alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo para unirse a un antígeno. Dichas alteraciones pueden, por ejemplo, mejorar la afinidad y/o estabilidad del anticuerpo (por ejemplo, tal como se evalúa mediante una mayor temperatura de fundición).

Un método útil para identificar residuos o regiones de un anticuerpo que pueden elegirse como objetivos para la mutagénesis se denomina «mutagénesis de barrido de alanina» tal como se describe en Cunningham y Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. En este método, un residuo o grupo de residuos objetivo (por ejemplo, residuos cargados tales como Arg, Asp, His, Lys y Glu) son identificados y reemplazados por un aminoácido neutro o con carga negativa (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si se ve afectada la interacción del anticuerpo con el antígeno. Se pueden introducir sustituciones adicionales en las ubicaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. De manera alternativa o adicional, una estructura cristalina de un complejo antígeno-anticuerpo identifica los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Tales residuos de contacto y residuos limitantes pueden elegirse como objetivo o eliminarse como candidatos para sustitución. Se pueden analizar las variantes para determinar si contienen las propiedades deseadas o no.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones de extremos amino y/o carboxilo que varían en cuanto a longitud de un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como también inserciones intrasecuencia de un único o de múltiples residuos de aminoácidos. Los ejemplos de inserciones en extremos incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo de extremo N. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión a los extremos N o C del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida del anticuerpo en suero.

b) Variantes de glicosilación

En determinadas modalidades, se provee un anticuerpo en la presente para aumentar o disminuir la medida en la que se glicosila el anticuerpo. Es posible lograr la adición o eliminación de sitios de glicosilación a un anticuerpo en forma conveniente mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos, de modo que se creen o se eliminen uno o más sitios de glicosilación.

En los casos en que el anticuerpo comprende una región Fc, el carbohidrato unido a este puede

modificarse. Los anticuerpos naturales producidos por células de mamíferos suelen comprender un oligosacárido ramificado y de dos antenas que se une generalmente mediante un enlace N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Ver, por ejemplo, Wright et ál., *TIBTECH* 15:26-32 (1997). El oligosacárido puede incluir varios carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como también una fucosa unida a una

5 GlcNAc en el «tallo» de la estructura del oligosacárido de dos antenas. En algunas modalidades, las modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención pueden realizarse para crear variantes de anticuerpos con determinadas propiedades mejoradas.

En una modalidad, se proporcionan variantes de anticuerpos que tienen una estructura de

10 carbohidrato que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en ese anticuerpo puede ser de 1 % a 80 %, de 1 % a 65 %, de 5 % a 65 % o de 20 % a 40 %. La cantidad de fucosa se determina mediante el cálculo de la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297, con respecto a la suma de todas las glicoestructuras unidas a Asn 297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y con alto

15 contenido de manosa) según se mide mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, tal como se describe en WO 2008/077546, por ejemplo. Asn297 hace referencia al residuo asparagina ubicado alrededor de la posición 297 en la región Fc (numeración EU de residuos de la región Fc). Sin embargo, Asn297 también se puede ubicar alrededor de ± 3 aminoácidos anterior o posteriormente a la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a menores variaciones de

20 secuencia en los anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación pueden haber mejorado la función de ADCC. Véase, por ejemplo, las publicaciones de patente estadounidense n.º US 2003/0157108; US 2004/0093621. Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpos «defucosilados» o «con deficiencia de fucosa» incluyen: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US

25 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et ál., *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et ál., *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Los ejemplos de líneas celulares que pueden producir anticuerpos defucosilados incluyen células CHO Lec13 con deficiencia en fucosilación proteica (Ripka et ál., *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); solicitud de patente estadounidense n.º US 2003/0157108 A1, Presta, L; y WO 2004/056312 A1, Adams et ál., especialmente en el Ejemplo 11) y líneas celulares desactivadas, tales como el gen de alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8*, células CHO desactivadas (véase, por ejemplo, Yamane-Ohnuki et ál., *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda et ál., *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); y WO2003/085107).

35 Además se proporcionan variantes de anticuerpos con oligosacáridos bisectados, por ejemplo,

donde un oligosacárido con dos antenas unido a la región Fc del anticuerpo se bisecta por GlcNAc. Esas variantes de anticuerpos pueden tener una fucosilación reducida y/o una función de ADCC mejorada. Los ejemplos de dichas variantes de anticuerpos se describen, por ejemplo, en WO 2003/011878; patente estadounidense n.º 6 602 684 y US 2005/0123546 (Umana et ál.). También se proporcionan variantes de anticuerpos con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Esas variantes de anticuerpos pueden tener una función de CDC mejorada. Dichas variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, WO 1997/30087; WO 1998/58964; y WO 1999/22764 (Raju, S.).

c) *Variantes de la región Fc*

En determinadas modalidades, se pueden introducir una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en la presente, generando así una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una alteración de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos.

En determinadas modalidades, la invención contempla una variante de anticuerpo con algunas pero no todas las funciones efectoras, lo cual la convierte en una opción conveniente para aplicaciones en las que es importante la semivida del anticuerpo *in vivo*, pero determinadas funciones efectoras (tales como el complemento y la ADCC) son innecesarias o perjudiciales. Se pueden realizar ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción o eliminación de las actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, es posible llevar a cabo ensayos de unión al receptor de Fc (FcR) para garantizar que el anticuerpo carezca de unión a Fc γ R (y, de esa manera, carezca probablemente de actividad de ADCC), pero conserve la capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para la mediación de la ADCC, los linfocitos NK, solamente expresan Fc(RIII, mientras que los monocitos expresan Fc(RI, Fc(RII y Fc(RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991).

Se describen los ejemplos no taxativos de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés en la patente estadounidense n.º 5 500 362 (véase, por ejemplo, Hellstrom et ál., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986) y Hellstrom, I et ál., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); patente estadounidense n.º 5 821 337; y Bruggemann et ál., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). De manera alternativa, pueden emplearse métodos de ensayos no radiactivos (ver, por ejemplo, ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACTI™ para la citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y ensayo de citotoxicidad CYTOTOX 96® no radiactivo (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos (NK). De manera alternativa o

adicional, es posible evaluar la actividad de ADCC de la molécula de interés *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el descrito en Clynes et ál., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). También se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo no pueda unirse a C1q y, por lo tanto, carezca de actividad de CDC. Véase, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación de complementos, se puede realizar un ensayo con CDC (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro et ál., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg et ál., *Blood* 101:1045-1052 (2003); y Cragg et ál., *Blood* 103:2738-2743 (2004)). También se puede realizar la unión a FcRn y las determinaciones *in vivo* de eliminación/semivida utilizando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova et ál., *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)).

Los anticuerpos con función efectora reducida incluyen los que tienen sustitución de uno o más residuos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (patente estadounidense n.º 6 737 056). Esos mutantes Fc incluyen los mutantes Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, lo cual incluye el mutante Fc también denominado «DANA» con sustitución de los residuos 265 y 297 por alanina (patente estadounidense n.º 7 332 581).

Se describen determinadas variantes de anticuerpos con unión a FcR mejorada o disminuida. (Ver, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6 737 056; WO 2004/056312, y Shields et ál., *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001)).

En determinadas modalidades, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU de residuos).

En algunas modalidades, se realizan alteraciones en la región Fc que producen unión a C1q alterada (es decir, mejorada o disminuida) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo, como se describe en la patente estadounidense n.º 6 194 551, WO 99/51642, e Idusogie et ál., *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Los anticuerpos con aumento de semividas y mejora de unión al receptor Fc neonatal (FcRn), la que es responsable de la transferencia de IgG materna al feto (Guyer et ál., *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim et ál., *J. Immunol.* 24:249 (1994)), se describen en US2005/0014934A1 (Hinton et ál.). Esos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en ella que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Dichas variantes de Fc incluyen las que tienen sustituciones en uno o más de los residuos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, sustitución del residuo de la región Fc 434 (patente estadounidense n.º 7 371 826). Véase también Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); la patente estadounidense n.º 5 648 260; la patente estadounidense n.º 5 624

821; y WO 94/29351 con respecto a otros ejemplos de variantes de la región Fc.

d) *Variantes de anticuerpos modificados con cisteína*

La invención provee anticuerpos modificados con cisteína donde uno o más aminoácidos de un anticuerpo de tipo salvaje u original (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF, el que incluye cualquier anticuerpo anti-VEGF descrito en la presente) se reemplazan (es decir, «se sustituyen» o «se mutan») con un aminoácido de cisteína (es decir, una «cisteína modificada»). Cualquier forma de anticuerpo se puede modificar genéticamente, es decir mutar, de esta manera. Por ejemplo, es posible modificar un anticuerpo monoclonal original para formar un «anticuerpo THIOMAB™». Un ejemplo de un anticuerpo THIOMAB™ es un fragmento de anticuerpo (es decir, un Fab) que tiene una cisteína modificada. Se puede hacer referencia a este anticuerpo THIOMAB™ Fab como «ThioFab». Debe observarse que una mutación de sitio único produce un único residuo cisteína modificada en un ThioFab, mientras que una mutación de sitio único produce dos residuos cisteína modificada en un anticuerpo THIOMAB™ debido a la naturaleza dimérica del anticuerpo de IgG.

Es posible evaluar las mutaciones con residuos cisteína (Cys) modificados para determinar la reactividad de los grupos tiol de cisteína modificada recientemente introducidos. El valor de reactividad de tiol es un término numérico relativo en el intervalo de 0 a 1.0 y se puede medir para cualquier anticuerpo modificado con cisteína. Los valores de reactividad de tiol de los anticuerpos modificados genéticamente con cisteína de la invención se encuentran en el intervalo de 0.0 a 1.0. Específicamente, los valores de reactividad de tiol de los anticuerpos modificados genéticamente con cisteína de la invención se encuentran en el intervalo de 0.1 a 1.0. En determinadas modalidades, los valores de reactividad de tiol de anticuerpos modificados genéticamente con cisteína de la invención se encuentran en los intervalos de 0.0 a 0.1, 0.1 a 0.5, 0.1 a 0.6, 0.1 a 0.7, 0.1 a 0.8, 0.1 a 0.9, o 0.1 a 1.0. En determinadas modalidades, los valores de reactividad de tiol de anticuerpos modificados genéticamente con cisteína de la invención se encuentran en los intervalos de 0.2 a 1.0, 0.3 a 1.0, 0.4 a 1.0, 0.5 a 1.0, 0.6 a 1.0, 0.7 a 1.0 o 0.8 a 1.0. En determinadas modalidades, los valores de reactividad de tiol de los anticuerpos modificados genéticamente con cisteína de la invención se encuentran en el intervalo de 0.6 a 1.0. En determinadas modalidades, los valores de reactividad de tiol de los anticuerpos modificados genéticamente con cisteína de la invención se encuentran en los intervalos de 0.7 a 1.0. En determinadas modalidades, los valores de reactividad de tiol de los anticuerpos modificados genéticamente con cisteína de la invención se encuentran en los intervalos de 0.8 a 1.0. En determinadas modalidades, los valores de reactividad de tiol de los anticuerpos modificados genéticamente con cisteína de la invención se encuentran en los intervalos de 0.5 a 0.8. En determinadas modalidades, los valores de reactividad de tiol de los anticuerpos modificados genéticamente con cisteína de la invención se encuentran en los intervalos de 0.5 a 0.9. En

determinadas modalidades, los valores de reactividad de tiol de los anticuerpos modificados genéticamente con cisteína de la invención se encuentran en los intervalos de 0.5 a 0.7. En determinadas modalidades, los valores de reactividad de tiol de los anticuerpos modificados genéticamente con cisteína de la invención se encuentran en los intervalos de 0.5 a 1.0.

- 5 La invención provee métodos de diseño, selección y preparación para producir anticuerpos modificados con cisteína que son reactivos con funcionalidad electrofílica. Estos métodos hacen posible además compuestos de conjugado de anticuerpo tales como, por ejemplo, conjugados de anticuerpo y polímero con restos de polímero conjugados en sitios selectivos diseñados y designados. Los residuos de cisteína reactivos en una superficie de anticuerpo permiten la
- 10 conjugación específica con un polímero a través de un grupo reactivo tiol, tal como maleimida o haloacetilo. La reactividad nucleofílica de la funcionalidad de tiol de un residuo Cys a un grupo maleimida es de aproximadamente 1000 veces más en comparación con cualquier otra funcionalidad de aminoácido en una proteína, tal como un grupo amino de residuos de lisina del grupo amino de terminal N. La funcionalidad específica de tiol en reactivos de yodoacetilo y
- 15 maleimida pueden reaccionar con grupos amina, pero se requiere un pH mayor (>9.0) y tiempos de reacción más prolongados (Garman, 1997, *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, Londres).

Preferentemente, los anticuerpos modificados con cisteína de la invención conservan la capacidad de unión al antígeno de su anticuerpo original equivalente de tipo salvaje. Por lo tanto, los

20 anticuerpos modificados con cisteína son capaces de unirse, preferentemente de manera específica, a antígenos. Ejemplos no taxativos de antígenos incluyen VEGF; IL-1 β ; IL-6; IL-6R; IL-13; IL-13R; PDGF (por ejemplo, PDGF-BB); angiopoyetina; angiopoyetina 2 (Ang2); Tie2; S1P; integrinas $\alpha\beta$ 3, $\alpha\beta$ 5 y α 5 β 1; betacelulina; apelina/APJ; eritropoyetina; factor de complemento D; TNF α ; HtrA1; un receptor de VEGF (por ejemplo, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, mbVEGFR o

25 sVEGFR); receptor de ST-2 y una proteína genéticamente vinculada al riesgo de AMD (por ejemplo, vía de complemento de componentes C2, factor B, factor H, CFHR3, C3b, C5, C5a y C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; IL-8; CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC; COL10A1 y TNFRSF10A). Cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente (por ejemplo, cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF descritos anteriormente) puede ser un anticuerpo original utilizado para generar un

30 anticuerpo modificado con cisteína. Los ejemplos de métodos descritos en la presente se pueden aplicar, en líneas generales, a la identificación y producción de anticuerpos mediante la aplicación de las etapas de diseño y análisis descritas en la presente.

Los anticuerpos diseñados con cisteína de la invención pueden acoplarse específica y eficazmente al sitio con un reactivo que reacciona con tiol. El reactivo que reacciona con tiol puede ser, por

35 ejemplo, un agente modificador de la eliminación tal como un polímero (por ejemplo, un polímero

de HA o varios isómeros de polietilenglicol), un péptido que se une a un tercer componente, u otro carbohidrato o agente lipofílico, un reactivo enlazador multifuncional, un reactivo de etiqueta de captura, es decir, afinidad (por ejemplo, un reactivo de enlazador de biotina), una etiqueta de detección (por ejemplo, un reactivo fluoróforo), un reactivo de inmovilización de fase sólida (por ejemplo, SEPHAROSE™, poliestireno o vidrio), o un intermedio de fármaco y enlazador. Un ejemplo de un reactivo que reacciona con tiol es N-etil maleimida (NEM). En un ejemplo de modalidad, la reacción de un anticuerpo THIOMAB™ con un reactivo enlazador de biotina provee un anticuerpo THIOMAB™ biotinilado mediante el cual se puede detectar y medir la presencia y reactividad del residuo de cisteína modificada. La reacción de un anticuerpo THIOMAB™ con un reactivo enlazador multifuncional provee un anticuerpo THIOMAB™ con un enlazador funcionalizado que se puede hacer reaccionar adicionalmente con un polímero, un reactivo de resto de fármaco u otra etiqueta. La reacción de un anticuerpo THIOMAB™ con un intermedio de fármaco y enlazador provee un conjugado de fármaco y anticuerpo THIOMAB™. En determinadas modalidades, el anticuerpo THIOMAB™ es un ThioFab.

Los anticuerpos modificados con cisteína se pueden conjugar con agentes que reaccionan con tiol, en los que el grupo reactivo es, por ejemplo, una maleimida, una yodoacetamida, un disulfuro de piridilo u otro compañero de conjugación que reacciona con tiol (ver, por ejemplo, Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2; Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, Londres; Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2; Hermanson, G. in Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, págs. 40-55, 643-671). El componente puede ser un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina tal como doxorrubicina o toxina de pertussis), un fluoróforo tal como una tinta fluorescente como fluoresceína o rodamina, un agente quelante para un metal de imagen o radioterapéutico, una marca o etiqueta de detección peptídico o no peptídico, o un agente modificador de eliminación, tal como un polímero (por ejemplo, un polímero de HA o varios isómeros de polietilenglicol), un péptido que se une a un tercer componente u otro carbohidrato o agente lipofílico.

El ensayo PHESELECTOR (ELISA de fagos para la selección de tioles reactivos) hace posible la detección de grupos cisteína reactivos en anticuerpos en un formato de fago de ELISA. Ver la patente estadounidense n.º 7 521 541 y la publicación de patente estadounidense n.º 20110301334, las que se incorporan a la presente en su totalidad mediante esta referencia. Específicamente, el ensayo PHESELECTOR incluye el proceso de revestimiento de la proteína (por ejemplo, anticuerpo) de interés en superficies de placas, seguido de incubación con partículas de fagos y luego el anticuerpo secundario etiquetado con peroxidasa de rábano picante (HRP) con detección de absorbancia. Las proteínas mutantes expresadas en fagos se pueden analizar de

manera rápida, fuerte y con alto rendimiento. Las bibliotecas de anticuerpos modificados con cisteína se pueden producir y someter a selección de unión mediante el mismo enfoque que para identificar sitios apropiadamente reactivos de incorporación de Cys libre a partir de bibliotecas de fagos de proteína aleatorias de anticuerpos u otras proteínas. Esta técnica incluye hacer reaccionar las proteínas con mutación de cisteína expresadas en fagos con un reactivo de afinidad o grupo indicador que también reacciona con tiol.

En determinadas modalidades, el ensayo PHESELECTOR incluye las siguientes etapas: (1) se recubrieron por separado albúmina de suero bovino (BSA), una parte o la totalidad de una proteína diana (por ejemplo, VEGF) y estreptavidina (100 μ l de 2 μ g/ml) en placas de 96 pocillos MAXISORB®; (2) luego del bloqueo con TWEEN®-20 0.5% (en PBS), se incubaron fago y anticuerpo THIOMAB™ biotinilado y no biotinilado (2×10^{10} partículas de fago) durante 1 hora a temperatura ambiente; (3) la incubación con el fago se siguió con la incubación con el anticuerpo secundario etiquetado con HRP (proteína de revestimiento de fago anti-M13, anticuerpo de proteína pVIII); (4) se llevaron a cabo las reacciones de HRP estándares y se mide la absorbancia a 450 nm; (5) se midió la reactividad de tiol mediante el cálculo de la relación entre OD₄₅₀ para estreptavidina y OD₄₅₀ para la proteína diana (por ejemplo, VEGF) de manera que un valor de reactividad de tiol de 1 indica la biotinilación completa del tiol cisteína.

El ADN que codifica los anticuerpos modificados con cisteína se aísla fácilmente y se secuencía mediante el uso de procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos de murino). Las células de hibridoma sirven como una fuente de dicho ADN. Una vez que se aislaron, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que se transfectan luego a células hospedadoras, tal como células *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), células HEK293T u otras células hospedadoras, tales como células de mieloma (patente estadounidense n.º 5 807 715; US 2005/0048572; US 2004/0229310) que de otra manera no producen la proteína de anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. En la mayoría de los casos, los rendimientos de los anticuerpos modificados con cisteína son similares a los anticuerpos de tipo salvaje.

Luego del diseño y la selección, es posible producir los anticuerpos modificados con cisteína, por ejemplo, anticuerpos THIOMAB™, con residuos Cys no apareados altamente reactivos, mediante: (i) la expresión en un sistema bacteriano, por ejemplo, *E. coli*, o un sistema de cultivo de células de mamífero (WO 01/00245), por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO) o células HEK293 (por ejemplo, células HEK293T); y (ii) la purificación mediante técnicas de purificación de proteínas comunes (por ejemplo, Lowman et ál (1991) J. Biol. Chem. 266(17):10982-10988). En

modalidades específicas, los anticuerpos THIOMAB™ se expresan en un sistema de expresión de células de mamífero. En modalidades específicas, el sistema de expresión de células de mamífero son las células HEK293T.

Las posiciones de la estructura de los residuos Cys modificados de las cadenas pesada y ligera se pueden numerar de acuerdo con un sistema de numeración secuencial. Este sistema de numeración secuencial se correlaciona con el sistema de numeración de Kabat (Kabat et ál., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.) para el anticuerpo 4D5 en las Figuras 13A y 13B. El uso de este sistema de numeración de Kabat, la secuencia de aminoácido lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales que corresponden a un acortamiento o inserción de una FR o una CDR del dominio variable. Los sitios variantes de cadena pesada y los sitios variantes de cadena ligera modificados con cisteína se identifican mediante la numeración secuencial y la numeración de Kabat en las Figuras 13A y 13B.

La reactividad de tiol también se puede generalizar a ciertos dominios de un anticuerpo, tales como el dominio constante de cadena ligera (CL) y los dominios constantes de cadena pesada CH1, CH2 y CH3. Los remplazos de cisteína que resultan en valores de reactividad de tiol de alrededor de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, y 0.95 y más elevados, se pueden realizar en los dominios constantes de cadena pesada α , δ , ϵ , γ y μ de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente, los que incluyen las subclases de IgG: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2.

Los anticuerpos modificados con cisteína se pueden generar tal como se describe en, por ejemplo, la patente estadounidense 7 521 541 o la publicación de patente internacional n.º WO 2006/034488, las que se incorporan a la presente en su totalidad mediante esta referencia. En algunas modalidades, la variante de anticuerpo modificado con cisteína es una variante de anticuerpo modificado con cisteína descrita en la patente estadounidense n.º 7 521 541 o la publicación de patente internacional n.º WO 2006/034488. En algunos casos, la variante de anticuerpo modificado con cisteína es una variante de anticuerpo modificado con cisteína descrita en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2011/156328 o la patente estadounidense n.º 9 000 130, las que se incorporan a la presente en su totalidad mediante esta referencia. En algunas modalidades, la variante de anticuerpo modificado con cisteína es una variante de anticuerpo modificado con cisteína descrita en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2016/040856, la que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia, por ejemplo, en las Tablas 1-4 de WO 2016/040856.

Por ejemplo, en determinadas modalidades, la mutación de cisteína se selecciona del grupo que consiste en HC-I195C, HC-S420C, HC-Y432C, y LC-G64C (de acuerdo con la numeración de

Kabat). En determinadas modalidades, la mutación de cisteína se selecciona del grupo que consiste en HC-Y432C y LC-G64C (de acuerdo con la numeración de Kabat). En determinadas modalidades, la mutación de cisteína es una mutación de cadena pesada y se selecciona del grupo que consiste en Y33C, G162C, V184C, I195C, S420C, Y432C y Q434C (de acuerdo con la numeración de Kabat). En determinadas modalidades, la mutación de cisteína es una mutación de cadena pesada y se selecciona del grupo que consiste en R19C, E46C, T57C, Y59C, A60C, M100cC, W103C, G162C, I195C, V258C, S420C, H425C y N430C (de acuerdo con la numeración de Kabat). En determinadas modalidades, la mutación de cisteína es una mutación de cadena pesada y se selecciona del grupo que consiste en Y33C, G162C, V184C e I195C (de acuerdo con la numeración de Kabat). En determinadas modalidades, la mutación de cisteína es una mutación de cadena pesada y se selecciona del grupo que consiste en R19C, E46C, Y59C, A60C, M100cC, W103C, V258C, H425C, y N430C (de acuerdo con la numeración de Kabat).

En determinadas modalidades, la mutación de cisteína es una mutación de cadena ligera y se selecciona del grupo que consiste en Y55C, G64C, T85C, T180C y N430C (de acuerdo con la numeración de Kabat). En determinadas modalidades, la mutación de cisteína es una mutación de cadena ligera y se selecciona del grupo que consiste en T31C, S52C, G64C, R66C, A193C y N430C (de acuerdo con la numeración de Kabat). En determinadas modalidades, la mutación de cisteína es una mutación de cadena ligera y se selecciona del grupo que consiste en G64C, T85C, T180C y N430C (de acuerdo con la numeración de Kabat). En determinadas modalidades, la mutación de cisteína es una mutación de cadena ligera y se selecciona del grupo que consiste en S52C, G64C, R66C, A193C y N430C (de acuerdo con la numeración de Kabat). En modalidades específicas, la mutación de cisteína en la cadena ligera se selecciona del grupo de mutaciones de cisteína que comprende LC-I106C, LC-R108C, LC-R142C y LC-K149C (de acuerdo con la numeración de Kabat) (ver la Figura 13A; Tabla 2). En una modalidad particular, la mutación de cisteína en la cadena ligera es LC-K149C (de acuerdo con la numeración de Kabat) (ver la Figura 13A). En una modalidad particular, la mutación de cisteína en la cadena ligera es LC-V205C (de acuerdo con la numeración de Kabat).

Tabla 2: Ejemplos de mutaciones de cisteína de cadena ligera

Residuo	Secuencia (+/- 5 residuos)	SEQ ID NO.	Numeración de EU	Numeración de Kabat
I	GTKVE <u>C</u> KRTVA	70	106	106
R	KVEIK <u>C</u> TVAAP	71	108	108
R	NNFY <u>P</u> CEAKVQ	72	142	142
K	AKVQW <u>C</u> VDNAL	73	149	149

En modalidades particulares, la mutación de cisteína en la cadena pesada se selecciona del grupo de mutaciones de cisteína que consisten en HC-T114C, HC-A140C, HC-L174C, HC-L179C, HC-T187C, HC-T209C, HC-V262C, HC-G371C, HC-Y373C, HC-E382C, HC-S424C, HC-N434C y HC-Q438C (de acuerdo con la numeración de EU) (ver la Figura 13B; Tabla 3). En una modalidad particular, la mutación de cisteína en la cadena pesada es HC-A143C de acuerdo con la numeración de Kabat (es decir, HC-A140C de acuerdo con la numeración de EU) (ver la Figura 13B; Tabla 3). En una modalidad particular, la mutación de cisteína en la cadena pesada es HC-A174C, de acuerdo con la numeración de EU (ver la Figura 13B; Tabla 3). En una modalidad particular, la mutación de cisteína en la cadena pesada es HC-A118C, de acuerdo con la numeración de EU (es decir, HC-A114C de acuerdo con la numeración de Kabat).

En una modalidad particular, cualquier anticuerpo modificado con cisteína tal como se describe en la presente tiene una de las siguientes mutaciones de cisteína: LC-K149C de acuerdo con la numeración de Kabat y HC-A140C de acuerdo con la numeración de EU (ver las Tablas 2 y 3, y las Figuras 13A y 13B).

Tabla 3: Ejemplos de mutaciones de cisteína de cadena pesada

Residuo	Secuencia (+/- 5 residuos)	SEQ ID NO.	Numeración EU	Numeración de Kabat
T	QGTLV <u>C</u> VSSAS	74	114	110
A	TSGGT <u>C</u> ALGCL	75	140	136
L	TFPAV <u>C</u> QSSGL	76	174	170
L	LQSSG <u>C</u> YSLSS	77	179	175
T	LSSV <u>C</u> VPSSS	78	187	183
T	HKPSN <u>C</u> KVDKK	79	209	205
V	PEVTC <u>C</u> VVDVS	80	262	258
G	TCLVK <u>C</u> FYPSPD	81	371	367
Y	LVKGF <u>C</u> PSDIA	82	373	369
E	IAVEW <u>C</u> SNGQP	83	382	378
S	QGNVF <u>C</u> CSVMH	84	424	420
N	HEALH <u>C</u> HYTQK	85	434	430
Q	HNHYT <u>C</u> KSLSL	86	438	434

En determinadas modalidades, uno cualquiera o más de los siguientes residuos se puede sustituir con cisteína: V205 (numeración Kabat) de la cadena ligera, A118 (numeración EU) de la cadena

pesada y S400 (numeración EU) de la región Fc de cadena pesada.

En determinadas modalidades, el anticuerpo modificado con cisteína puede incluir una o más mutaciones de cisteína de cadena pesada seleccionadas del grupo que consiste en V2C, L4C, V5C, L11C, R19C, F27C, I29C, T32C, Y33C, Q39C, A40C, K43C, L45C, E46C, T53C, G55C, T57C, R58C, Y59C, A60C, T68C, N76C, Y79C, Q81C, W95C, G96C, D101C, W103C, T116C, K117C, T135C, N155C, A158C, G162C, G174C, L175C, T183C, V184C, I195C, N199C, S203C, F239C, M248C, E254C, V258C, N272C, V278C, L305C, T331C, S333C, R340C, Q343C, K356C, E384C, S399C, K410C, Q414C, G416C, N417C, Y432C, T433C, K435C, S438C, L439C, M100cC y N82aC (de acuerdo con la numeración de Kabat). Ver también la Tabla 3 de la solicitud de patente internacional n.º WO 2016/040856.

En determinadas modalidades, el anticuerpo modificado con cisteína puede incluir una o más mutaciones de cisteína de cadena ligera seleccionadas del grupo que consiste en S12C, S14C, G16C, R18C, T22C, R24C, Q27C, T31C, A32C, Q38C, K39C, G41C, K42C, P44C, Y49C, S50C, S52C, F53C, L54C, Y55C, S63C, G64C, R66C, D70C, T72C, T74C, S76C, Q79C, T85C, H91C, Y92C, P95C, T97C, F98C, K103C, E105C, K107C, P119C, K126C, T129C, S131C, Q147C, W148C, A153C, Q155C, S156C, S159C, Q160C, S162C, Q166C, T172C, T180C, V191C, A193C, E195C, V205C, T206C y N210C (de acuerdo con la numeración de Kabat). Ver también la Tabla 4 de la solicitud de patente internacional n.º WO 2016/040856.

En determinadas modalidades, el anticuerpo modificado con cisteína puede incluir una o más mutaciones de cisteína seleccionadas del grupo que consiste en HC-I195C, HC-S420C, HC-Y432C y LC-G64C (de acuerdo con la numeración de Kabat). Ver también la Tabla 5 de la solicitud de patente internacional n.º WO 2016/040856.

En determinadas modalidades, el anticuerpo modificado con cisteína incluye una mutación de cisteína de cadena ligera seleccionada del grupo de sitios que consiste en LC-T22C, LC-K39C, LC-Y49C, LC-Y55C, LC-T85C, LC-T97C, LC-I106C, LC-R108C, LC-R142C, LC-K149C y LC-V205C (de acuerdo con la numeración de Kabat).

El anticuerpo modificado con cisteína puede incluir cualquier cantidad adecuada de residuos de cisteína modificados, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más residuos de cisteína modificados. En algunas modalidades, el anticuerpo modificado con cisteína puede incluir de 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9 o 1-10 residuos de cisteína modificados. En algunas modalidades, el anticuerpo modificado con cisteína puede incluir 1 residuo de cisteína modificado. En algunas modalidades, el anticuerpo modificado con cisteína puede incluir 2 residuos de cisteína modificados. En algunas modalidades, el anticuerpo modificado con cisteína puede incluir 3 residuos de cisteína modificados.

En cualquiera de las modalidades precedentes, el anticuerpo modificado con cisteína puede incluir

una cisteína modificada en la posición equivalente como cualquiera de las mutaciones de cisteína descritas anteriormente. Por ejemplo, si un anticuerpo incluye una serina natural en la posición 118 (numeración de EU), la serina se puede mutar en una cisteína para formar una mutación de S118C.

- 5 Por ejemplo, la invención provee un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína que comprende una mutación de cisteína en la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en HC-A118C, HC-A140C y HC-L174C (numeración de EU), o una mutación de cisteína en la cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en LC-V205C y LC-K149C (numeración de Kabat), en donde el anticuerpo anti-VEGF es cualquier anticuerpo anti-VEGF descrito en la presente, por ejemplo,
- 10 cualquier anticuerpo anti-VEGF descrito en las Tablas 8-10. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-VEGF es N94A.F83A.N82aR.Y58R (G6.31 AARR). En algunas modalidades, el anticuerpo anti-VEGF es G6.31 WT. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-VEGF es LC-N94A. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-VEGF es LC-N94A.LC-F83A. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-VEGF es LC-N94A.LC-F83A. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-VEGF es
- 15 HC-A40E.HC-T57E (G6.31 AAEE). En algunas modalidades, el anticuerpo anti-VEGF es HCcombo. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-VEGF es HCLC2. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-VEGF es HCLC4. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-VEGF es HCLC5. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-VEGF es HCLC3. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-VEGF es HCLC1. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-VEGF es
- 20 R19HCcombo. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-VEGF es R19HCLC2. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-VEGF es R19HCLC4. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-VEGF es R19HCLC5.

En un ejemplo particular, la invención provee un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína que comprende una mutación de cisteína en la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en

25 HC-A118C, HC-A140C y HC-L174C (numeración de EU), o una mutación de cisteína en la cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en LC-V205C y LC-K149C (numeración de Kabat), en donde el anticuerpo comprende las siguientes seis HVR: (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DYWIH (SEQ ID NO: 1); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GITPAGGYTRYADSVKG (SEQ ID NO: 7); (c) una HVR-H3 que

30 comprende la secuencia de aminoácidos de FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO: 3); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SASFLYS (SEQ ID NO: 9); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10). En algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína incluye las siguientes cuatro FR de dominio variable

35 de cadena pesada: (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTIS (SEQ ID NO: 13); (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 14); (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RFTISADTSKNTAYLQMRSRLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 15); y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos WGQGTLTVTVSS (SEQ ID NO: 16). En otros casos, el anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína incluye las siguientes cuatro FR de dominio variable de cadena ligera: (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC (SEQ ID NO: 17), (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18); (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (SEQ ID NO: 19); y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20). En algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína incluye (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En algunos casos, el anticuerpo original es G6.31 AARR. En algunas modalidades, la mutación de cisteína es HC-A118C. En otras modalidades, la mutación de cisteína es HC-A140C. En aun otras modalidades, la mutación de cisteína es HC-L174C (numeración de EU). En otras modalidades, la mutación de cisteína es LC-V205C (numeración de Kabat). En otras modalidades, la mutación de cisteína es LC-K149C (numeración de Kabat).

En algunos casos, la invención provee un anticuerpo que comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 90 y/o (b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 89.

En algunos casos, la invención provee un anticuerpo que comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 92 y/o (b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 91.

En algunos casos, la invención provee un anticuerpo que comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 94 y/o (b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 93.

e) *Derivados de anticuerpos*

En determinadas modalidades, se puede modificar adicionalmente un anticuerpo proporcionado en la presente para contener restos no proteínicos adicionales que se conocen en la técnica y se encuentran fácilmente disponibles. Los restos adecuados para la derivación del anticuerpo incluyen, de modo no taxativo, polímeros solubles en agua. Ejemplos no taxativos de polímeros solubles en agua incluyen, de modo no taxativo, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxane, copolímero de anhídrido maleico y etileno, poliaminoácidos (ya sean

homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propopilenglicol, copolímeros de óxido de prolipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de estos. El polietilenglicol propionaldehído puede tener ventajas de fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede tener cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no ramificado. La cantidad de polímeros unidos al anticuerpo puede variar y, en caso de unión de más de un polímero, estos pueden ser la misma molécula o moléculas diferentes. En general, la cantidad y/o tipo de polímeros utilizados para la derivación pueden determinarse en función de consideraciones que incluyen, de modo no taxativo, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo a mejorar, si el derivado de anticuerpo se utiliza en un tratamiento en condiciones definidas y similares. En la presente se describen conjugados de anticuerpo adicionales, por ejemplo, en la sección G a continuación y en los Ejemplos 1 y 2.

En otra modalidad, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y resto no proteínico que se pueden calentar selectivamente por exposición a radiación. En una modalidad, el resto no proteínico es un nanotubo de carbono (Kam et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda e incluye, de modo no taxativo, longitudes de onda que no dañan las células comunes, pero que calientan el resto no proteínico a una temperatura en la cual las células próximas al resto no proteínico del anticuerpo mueren.

f) Variantes del punto isoeléctrico

La invención proporciona variantes de anticuerpos con puntos isoeléctricos alterados. Por ejemplo, la invención proporciona variantes de anticuerpos con un punto isoeléctrico (pI) reducido, por ejemplo, en comparación con un anticuerpo anti-VEGF, por ejemplo, G6.31. En algunos casos, la carga de superficie se reduce a pH fisiológico. En algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF tiene un pI igual o menor que alrededor de 8 (por ejemplo, alrededor de 8, alrededor de 7, alrededor de 6, alrededor de 5 o alrededor de 4). En algunos casos, el anticuerpo tiene un pI de alrededor de 4 a alrededor de 8 (por ejemplo, alrededor de 4, alrededor de 5, alrededor de 6, alrededor de 7 o alrededor de 8). En algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF tiene un pI de alrededor de 5 a alrededor de 7 (por ejemplo, alrededor de 5, alrededor de 6 o alrededor de 7). En algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF tiene un pI de alrededor de 5 a alrededor de 6 (por ejemplo, alrededor de 5.1, alrededor de 5.2, alrededor de 5.3, alrededor de 5.4, alrededor de 5.5, alrededor de 5.6, alrededor de 5.7, alrededor de 5.8, alrededor de 5.9, o alrededor de 6).

Los anticuerpos de la invención pueden modificarse genéticamente para que tengan un pI reducido, por ejemplo, mediante la sustitución de residuos de aminoácidos de tipo salvaje en una posición dada con un aminoácido que tiene un pI menor. El pI de un aminoácido puede determinarse en función de los valores de pKa de la amina (-NH₂), ácido carboxílico (-COOH) y

cadena lateral del aminoácido, que se conocen en la técnica. En algunas modalidades, los residuos de aminoácidos expuestos a la superficie pueden sustituirse para reducir el pI de un anticuerpo. En una modalidad, los residuos de aminoácidos expuestos a la superficie pueden sustituirse con glutamato (E). En una modalidad, los residuos de aminoácidos expuestos a la superficie pueden sustituirse con aspartato (D).

B. Composiciones y métodos recombinantes

Cualquiera de los anticuerpos (por ejemplo, los anticuerpos anti-VEGF, incluidos los anticuerpos anti-VEGF modificados con cisteína) descritos en la presente pueden producirse usando composiciones y métodos recombinantes, por ejemplo, como se describe en la patente estadounidense n.º 4 816 567. En una modalidad, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-VEGF descrito en la presente. Dicho ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende la VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo (por ejemplo, las cadenas ligera y/o pesada del anticuerpo). En una modalidad adicional, se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En una modalidad adicional, se proporciona una célula hospedadora que comprende dicho ácido nucleico. En dicha modalidad, una célula hospedadora comprende (por ejemplo, se ha transformado con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo. En una modalidad, la célula hospedadora es eucariota, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula linfóide (por ejemplo, célula Y0, NS0, Sp20). En una modalidad, se proporciona un método para elaborar un anticuerpo anti-VEGF, donde el método comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, como se describió anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo y, opcionalmente, recuperar el anticuerpo de la célula hospedadora (o medio de cultivo de células hospedadoras).

Para la producción recombinante de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF que incluye los anticuerpos anti-VEGF modificados con cisteína), se aísla un ácido nucleico que codifica un anticuerpo, por ejemplo, como se describió anteriormente, y se inserta en uno o más vectores para la clonación y/o expresión adicional en una célula hospedadora. Tal ácido nucleico puede aislarse y secuenciarse fácilmente mediante procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo).

Las células hospedadoras adecuadas para la clonación o la expresión de vectores que codifican anticuerpos incluyen las células procariotas o eucariotas que se describen en la presente. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden producir en bacterias, en particular cuando no son necesarias la glicosilación y la función efectora de Fc. Para la expresión de fragmentos y polipéptidos de anticuerpos en bacterias, véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 5 648 237, 5 789 199 y 5 840 523. Ver también Charlton, *Methods in Molecular Biology*, tomo 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpos en *E. coli*. Después de la expresión, el anticuerpo puede aislarse de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y puede purificarse adicionalmente.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas tales como los hongos filamentosos o la levadura son huéspedes de clonación o de expresión adecuados para los vectores que codifican anticuerpos, inclusive cepas de hongos y levadura cuyas vías de glicosilación se han «humanizado», dando lugar a la producción de un anticuerpo con un patrón de glicosilación parcial o completamente humano. Ver Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004), y Li et ál., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión del anticuerpo glicosilado también derivan de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrados incluyen las células de plantas e insectos. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus que pueden usarse junto con células de insectos, en particular, para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

También se pueden utilizar como hospedadores los cultivos celulares vegetales. Ver, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 5 959 177, 6 040 498, 6 420 548, 7 125 978 y 6 417 429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

También se pueden utilizar como hospedadoras las células de vertebrados. Por ejemplo, las líneas celulares de mamíferos que se adaptan para crecer en suspensión pueden ser útiles. Otros ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamíferos útiles son las líneas de células CV1 de riñón de mono transformadas mediante SV40 (COS-7); la línea embrionaria renal humana (293 o células 293, tal como se describe, por ejemplo, en Graham et ál., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK); células de sertoli de ratón (células TM4 como se describe, por ejemplo, en Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1), células de riñón de mono verde africano (VERO-76), células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, por sus siglas en inglés), células de riñón caninas (MDCK; células de hígado de rata y búfalo (BRL 3A), células de pulmón humano (W138), células de hígado humano (Hep G2), tumor de mama de ratón (MMT 060562), células TRI, tal como se describe, por ejemplo, en Mather et ál., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); células MRC 5; y células FS4. Otras líneas

celulares hospedadoras de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluidas células CHO DHFR- (Urlaub et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); y líneas de células de mieloma tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una reseña de determinadas líneas celulares de mamífero hospedadoras adecuadas para la producción de anticuerpos, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, tomo 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), págs. 255-268 (2003).

C. Ensayos

Los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos anti-VEGF descritos en la presente, los que incluyen anticuerpos anti-VEGF modificados con cisteína), así como también conjugados de anticuerpo (por ejemplo, conjugados de anticuerpo que incluyen anticuerpos anti-VEGF (por ejemplo, cualquier anticuerpo anti-VEGF provisto en la presente)), se puede identificar, analizar o caracterizar por sus propiedades físicas y químicas y/o actividades biológicas mediante diversos ensayos conocidos en la técnica.

1. Ensayos de unión y otros ensayos

En un aspecto, se evalúa la actividad de unión a antígenos de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF, lo que incluye un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína), o un conjugado de anticuerpo de este, por ejemplo, mediante métodos conocidos como ELISA, transferencia Western, etc.

En otro aspecto, se pueden utilizar ensayos de competición para identificar un anticuerpo que compite con un anticuerpo descrito en la presente o un conjugado de anticuerpo de este, para unirse a un antígeno (por ejemplo, VEGF). En determinadas modalidades, tal anticuerpo competidor se une al mismo epítipo (por ejemplo, un epítipo lineal o conformacional) que está unido por un anticuerpo descrito en la presente. Los ejemplos de métodos detallados para mapear un epítipo al cual se une un anticuerpo se proporcionan en Morris (1996) «Epitope Mapping Protocols», en *Methods in Molecular Biology*, tomo 66 (Humana Press, Totowa, NJ).

En un ejemplo de ensayo de competición, se incubaba VEGF inmovilizado en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une al VEGF y un segundo anticuerpo sin marcar que se evalúa para determinar su capacidad de competir con el primer anticuerpo para la unión al VEGF. El segundo anticuerpo puede encontrarse presente en un sobrenadante de hibridomas. Como control, se incubaba VEGF inmovilizado en una solución que comprende el primer anticuerpo etiquetado pero no el segundo anticuerpo sin etiquetar. Después de la incubación en condiciones que permitan la unión del primer anticuerpo a VEGF, se elimina el exceso de anticuerpo no unido y se mide la cantidad de etiqueta asociada al VEGF inmovilizado. Si la cantidad de etiqueta asociada al VEGF inmovilizado se ve sustancialmente reducida en la muestra de prueba en comparación con la muestra de control, entonces eso indica que el segundo

anticuerpo compite con el primer anticuerpo para la unión a VEGF. Se pueden llevar a cabo ensayos similares para otros antígenos. Ver Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* c.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

2. *Ensayos de actividad*

5 En un aspecto, se proveen ensayos para identificar anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos anti-VEGF, los que incluyen anticuerpos anti-VEGF modificados con cisteína) o conjugados de anticuerpo de estos que presentan actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, unión a un antígeno (por ejemplo, VEGF (por ejemplo, VEGF en el flujo sanguíneo)), o un fragmento péptido de este, ya sea *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*. En determinadas modalidades, la actividad biológica puede incluir el bloqueo o neutralización de un antígeno. Por ejemplo, en determinadas modalidades, la actividad biológica puede incluir bloquear o neutralizar VEGF o prevenir que VEGF se una a un ligando, por ejemplo, un receptor tal como KDR o Flt-1. También se proporcionan anticuerpos o conjugados de anticuerpo con esa actividad biológica *in vivo* y/o *in vitro*. En determinadas modalidades, se analiza un anticuerpo de la invención o un conjugado de anticuerpo de este para determinar dicha actividad biológica.

3. *Ensayos de estabilidad*

En un aspecto, se proveen ensayos para determinar la estabilidad (por ejemplo, termoestabilidad) de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF, lo que incluye anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína) o un conjugado de anticuerpo de este. Por ejemplo, la estabilidad de un anticuerpo o un conjugado de anticuerpo se puede determinar mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, fluorimetría diferencial de barrido (DSF), dicroísmo circular (DC), fluorescencia de proteína intrínseca, calorimetría diferencial de barrido, espectroscopía, dispersión de luz (por ejemplo, dispersión de luz dinámica (DLS) y dispersión de luz estática (SLS), cromatografía de autointeracción (SIC). La estabilidad de un anticuerpo, o un conjugado de anticuerpo de este, se puede determinar tal como se describe en la presente, por ejemplo, con DSF, tal como se describe, por ejemplo, en los Ejemplos 1 y 2 de la solicitud de patente internacional n.ºPCT/US2016/053454. En algunos casos, la estabilidad de un conjugado de anticuerpo se puede determinar mediante cromatografía de exclusión por tamaño en línea con el índice de refracción y los detectores de dispersión de luz de múltiples ángulos (SEC-RI-MALS), por ejemplo, tal como se describe en el Ejemplo 1.

D. **Formulaciones farmacéuticas**

Las formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF, que incluye un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteínas) o un conjugado de anticuerpo de este provistos en la presente se preparan mediante la mezcla de dicho anticuerpo o conjugado de anticuerpo con el grado de pureza deseado con uno o más portadores farmacéuticamente

aceptables opcionales (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16.^a edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. En general, los portadores farmacéuticamente aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen, de modo no taxativo: amortiguadores tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; alcohol fenólico, butílico o bencílico; alquilparabenos, tales como metil o propil-parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de alrededor de 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de proteína Zn) y/o tensioactivos no-iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables de la presente incluyen adicionalmente agentes de dispersión de fármacos intersticiales tales como glicoproteínas hialuronidasa activa neutral soluble (sHASEGP), por ejemplo, glicoproteínas hialuronidasa PH-20 humanas solubles, tales como rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Determinados ejemplos de sHASEGP y métodos de uso, que incluyen rHuPH20, se describen en las patentes estadounidenses n.º 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, se combina sHASEGP con una o más glicosaminoglicanasas adicionales tales como condroitinasas.

Se describen ejemplos de formulaciones liofilizadas de anticuerpos en la patente estadounidense n.º 6 267 958. Las formulaciones acuosas de anticuerpos incluyen aquellas que se describen en la patente estadounidense n.º 6 171 586 y WO2006/044908, donde las formulaciones de esta última incluyen una solución amortiguadora de histidina-acetato.

La formulación de la presente también puede contener más de un compuesto activo, según sea necesario para la indicación particular que se trata, preferentemente de aquellos con actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. Por ejemplo, puede desearse proporcionar además un agente inmunodepresor. Esas moléculas se encuentran presentes de manera adecuada en combinación en cantidades eficaces a los efectos previstos.

Los ingredientes activos pueden estar incluidos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas coloidales de suministro de fármaco (por ejemplo, liposomas,

microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16.^a edición, Osol, A. Ed. (1980).

Las formulaciones que se han de usar para la administración *in vivo* por lo general son estériles.

- 5 La esterilización se logra fácilmente, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

En determinadas modalidades, la formulación farmacéutica incluye uno o más compuestos adicionales. En determinadas modalidades, el compuesto adicional se une a una segunda molécula biológica seleccionada del grupo que consiste en IL-1 β ; IL-6; IL-6R; IL-13; IL-13R; PDGF; angiopoyetina; angiopoyetina 2; Tie2; S1P; integrinas $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ y $\alpha 5\beta 1$; betacelulina; apelina/APJ; eritropoyetina; factor de complemento D; TNF α ; HtrA1; un receptor de VEGF; receptor de ST-2 y proteínas genéticamente vinculadas al riesgo de degeneración macular asociada a la edad (AMD), tal como componentes de la vía de complemento C2, factor B, factor H, CFHR3, C3b, C5, C5a y C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; IL-8; CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC; COL10A1 y TNFRSF10A. En determinadas modalidades, el compuesto adicional es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este.

Por ejemplo, en algunos casos, el compuesto adicional es un anticuerpo biespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-Ang2, tal como RG-7716 o cualquier anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-Ang2 descrito en WO 2010/069532 o WO 2016/073157.

- 20 En otro ejemplo, en algunos casos, el compuesto adicional es un anticuerpo anti-IL-6, por ejemplo, EBI-031 (Eleven Biotherapeutics; ver, por ejemplo, WO 2016/073890), siltuximab (SYLVANT®), olokizumab, clazakizumab, sirukumab, elsilimomab, gerilimzumab, OPR-003, MEDI-5117, PF-04236921 o una variante de estos.

- 25 En aun otro ejemplo, en algunos casos, el compuesto adicional es un anticuerpo anti-IL-6R, por ejemplo, tocilizumab (ACTEMRA®) (ver, por ejemplo, WO 1992/019579), sarilumab, vobarilizumab (ALX-0061), SA-237, o una variante de estos.

E. Composiciones y métodos terapéuticos

- Se puede utilizar cualquiera de los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos anti-VEGF, los que incluyen anticuerpos anti-VEGF modificados con cisteína) o conjugados de anticuerpo de estos (por ejemplo, conjugados de HA monodispersos) provistos en la presente en métodos terapéuticos.

- 30 En un aspecto, se provee un anticuerpo anti-VEGF (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína) para su uso como un medicamento. En otro aspecto, se provee un conjugado de anticuerpo (por ejemplo, un conjugado de HA monodisperso) para su uso como un medicamento. En aspectos adicionales, la invención provee un anticuerpo anti-VEGF (por ejemplo

un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína) para su uso en el tratamiento de un trastorno asociado a la angiogénesis patológica. En otro aspecto, la invención provee un conjugado de anticuerpo (por ejemplo, un conjugado de HA monodisperso) para su uso en el tratamiento de un trastorno asociado a la angiogénesis patológica. En algunas modalidades, el trastorno asociado con una angiogénesis patológica es un trastorno ocular. En algunos casos, el trastorno ocular es AMD (por ejemplo, AMD húmedo, AMD seco, AMD intermedio, AMD avanzado o atrofia geográfica (GA)), degeneración macular, edema macular, DME (por ejemplo, DME focal distinto al centro o DME difuso implicado en el centro), retinopatía, retinopatía diabética (DR) (por ejemplo, DR proliferativa DR (PDR), DR no proliferativa (NPDR) o DR de altitud elevada), otras retinopatías asociadas a la isquemia, ROP, oclusión de la vena retiniana (RVO) (por ejemplo, formas centrales (CRVO) y ramificadas (BRVO)), CNV (por ejemplo, CNV miopica), neovascularización corneal, enfermedades asociadas a la neovascularización corneal, neovascularización retiniana, enfermedades asociadas a la neovascularización retiniana/coroidal, miopía patológica, enfermedad de von Hippel-Lindau, histoplasmosis del ojo, FEVR, enfermedad de Coats, enfermedad de Norrie, OPPG, hemorragia subconjuntival, rubeosis, enfermedad neovascular ocular, glaucoma neovascular, retinitis pigmentosa (RP), retinopatía hipertensiva, proliferación angiomasosa retiniana, telangiectasia macular, neovascularización del iris, neovascularización intraocular, degeneración retiniana, edema macular cistoide (CME), vasculitis, papiloedema, retinitis, conjuntivitis (por ejemplo, conjuntivitis infecciosa y conjuntivitis no infecciosa (por ejemplo, alérgica)), amaurosis congénita Leber, uveitis (que incluye uveitis infecciosa y no infecciosa), coroiditis (por ejemplo, coroiditis multifocal), histoplasmosis ocular, blefaritis, ojo seco, herida de ojo por traumatismo o enfermedad de Sjögren.

En otro aspecto, se provee un anticuerpo anti-VEGF (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína) para su uso en un método de tratamiento. En otro aspecto, se provee un conjugado de anticuerpo (por ejemplo, un conjugado de HA monodisperso) para su uso en un método de tratamiento. En determinados casos, la invención provee un anticuerpo anti-VEGF (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína) para su uso en un método para tratar un sujeto que padece un trastorno asociado a la angiogénesis patológica que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz del anticuerpo anti-VEGF. La invención también provee un conjugado de anticuerpo (por ejemplo, un conjugado de HA monodisperso) para su uso en un método para tratar un sujeto que padece un trastorno asociado a la angiogénesis patológica que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz del conjugado de anticuerpo. En algunos casos, el trastorno asociado con una angiogénesis patológica es un trastorno ocular. En algunos casos, el trastorno ocular es AMD (por ejemplo, AMD húmedo, AMD seco, AMD intermedio, AMD avanzado o atrofia geográfica (GA)), degeneración macular, edema macular,

DME (por ejemplo, DME focal distinto al centro o DME difuso implicado en el centro), retinopatía, retinopatía diabética (DR) (por ejemplo, DR proliferativa DR (PDR), DR no proliferativa (NPDR) o DR de altitud elevada), otras retinopatías asociadas a la isquemia, ROP, oclusión de la vena retiniana (RVO) (por ejemplo, formas centrales (CRVO) y ramificadas (BRVO)), CNV (por ejemplo, CNV miopica), neovascularización corneal, enfermedades asociadas a la neovascularización corneal, neovascularización retiniana, enfermedades asociadas a la neovascularización retiniana/coroidal, miopía patológica, enfermedad de von Hippel-Lindau, histoplasmosis del ojo, FEVR, enfermedad de Coats, enfermedad de Norrie, OPPG, hemorragia subconjuntival, rubeosis, enfermedad neovascular ocular, glaucoma neovascular, , retinitis pigmentosa (RP), retinopatía hipertensiva, proliferación angiomasosa retiniana, telangiectasia macular, neovascularización del iris, neovascularización intraocular, degeneración retiniana, edema macular cistoide (CME), vasculitis, papiloedema, retinitis, conjuntivitis (por ejemplo, conjuntivitis infecciosa y conjuntivitis no infecciosa (por ejemplo, alérgica)), amaurosis congénita Leber, uveitis (que incluye uveitis infecciosa y no infecciosa), coroiditis (por ejemplo, coroiditis multifocal), histoplasmosis ocular, blefaritis, ojo seco, herida de ojo por traumatismo o enfermedad de Sjögren.

En algunos casos, la invención provee un anticuerpo anti-VEGF (por ejemplo un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína) para su uso en la reducción o inhibición de la angiogénesis en un sujeto. En otro aspecto, se provee un conjugado de anticuerpo (por ejemplo, un conjugado de HA monodisperso) para su uso en la reducción o inhibición de la angiogénesis en un sujeto. En determinadas modalidades, la invención provee un anticuerpo anti-VEGF (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína) para su uso en un método para reducir o inhibir la angiogénesis en un sujeto que comprende la administración a un individuo de una cantidad eficaz del anticuerpo anti-VEGF para reducir o inhibir la angiogénesis. La invención también provee un conjugado de anticuerpo (por ejemplo, un conjugado de HA monodisperso) para su uso en un método para reducir o inhibir la angiogénesis en un sujeto que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz del conjugado de anticuerpo. Un «sujeto» de acuerdo con cualquiera de los usos anteriores puede ser un ser humano.

La invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-VEGF (por ejemplo, anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína) en la fabricación o preparación de un medicamento. La invención también proporciona el uso de un conjugado de anticuerpo (por ejemplo, un conjugado de HA monodisperso) en la fabricación o preparación de un medicamento. Por ejemplo, en un caso, el medicamento es para el tratamiento de un trastorno asociado a la angiogénesis patológica. En un caso adicional, el medicamento es para su uso en un método para tratar un trastorno asociado a la angiogénesis patológica que comprende administrarle a un sujeto que padece un trastorno asociado a la angiogénesis patológica una cantidad eficaz del medicamento. En algunos casos, el

trastorno asociado con una angiogénesis patológica es un trastorno ocular. En algunos casos, el trastorno ocular es AMD (por ejemplo, AMD húmedo, AMD seco, AMD intermedio, AMD avanzado o atrofia geográfica (GA)), degeneración macular, edema macular, DME (por ejemplo, DME focal distinto al centro o DME difuso implicado en el centro), retinopatía, retinopatía diabética (DR) (por ejemplo, DR proliferativa DR (PDR), DR no proliferativa (NPDR) o DR de altitud elevada), otras retinopatías asociadas a la isquemia, ROP, oclusión de la vena retiniana (RVO) (por ejemplo, formas centrales (CRVO) y ramificadas (BRVO)), CNV (por ejemplo, CNV miopica), neovascularización corneal, enfermedades asociadas a la neovascularización corneal, neovascularización retiniana, enfermedades asociadas a la neovascularización retiniana/coroidal, miopía patológica, enfermedad de von Hippel-Lindau, histoplasmosis del ojo, FEVR, enfermedad de Coats, enfermedad de Norrie, OPPG, hemorragia subconjuntival, rubeosis, enfermedad neovascular ocular, glaucoma neovascular, , retinitis pigmentosa (RP), retinopatía hipertensiva, proliferación angiomas retiniana, telangiectasia macular, neovascularización del iris, neovascularización intraocular, degeneración retiniana, edema macular cistoide (CME), vasculitis, papiloedema, retinitis, conjuntivitis (por ejemplo, conjuntivitis infecciosa y conjuntivitis no infecciosa (por ejemplo, alérgica)), amaurosis congénita Leber, uveitis (que incluye uveitis infecciosa y no infecciosa), coroiditis (por ejemplo, coroiditis multifocal), histoplasmosis ocular, blefaritis, ojo seco, herida de ojo por traumatismo o enfermedad de Sjögren. En otro caso, el medicamento es para reducir o inhibir la angiogénesis en un sujeto. En una modalidad adicional, el medicamento es para usar en un método para inhibir la producción de A o la formación de placas en un individuo que comprende administrarle al individuo una cantidad eficaz del medicamento para inhibir la producción de A o la formación de placas. En cualquiera de los usos precedentes de medicamentos, el método puede incluir administrarle al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe más adelante.

La invención provee un método para tratar un trastorno asociado a la angiogénesis patológica. En una modalidad, el método comprende la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-VEGF (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína) a un individuo que padece un trastorno asociado a la angiogénesis patológica. En otro ejemplo, el método comprende la administración de una cantidad eficaz de un conjugado de anticuerpo (por ejemplo, un conjugado de HA monodisperso) a un individuo que padece un trastorno asociado a la angiogénesis patológica. En algunos casos, el trastorno asociado con una angiogénesis patológica es un trastorno ocular. En algunos casos, el trastorno ocular es AMD (por ejemplo, AMD húmedo, AMD seco, AMD intermedio, AMD avanzado o atrofia geográfica (GA)), degeneración macular, edema macular, DME (por ejemplo, DME focal distinto al centro o DME difuso implicado en el centro), retinopatía, retinopatía diabética (DR) (por ejemplo, DR proliferativa DR (PDR), DR no

proliferativa (NPDR) o DR de altitud elevada), otras retinopatías asociadas a la isquemia, ROP, oclusión de la vena retiniana (RVO) (por ejemplo, formas centrales (CRVO) y ramificadas (BRVO)), CNV (por ejemplo, CNV miopica), neovascularización corneal, enfermedades asociadas a la neovascularización corneal, neovascularización retiniana, enfermedades asociadas a la neovascularización retiniana/coroidal, miopía patológica, enfermedad de von Hippel-Lindau, histoplasmosis del ojo, FEVR, enfermedad de Coats, enfermedad de Norrie, OPPG, hemorragia subconjuntival, rubeosis, enfermedad neovascular ocular, glaucoma neovascular, , retinitis pigmentosa (RP), retinopatía hipertensiva, proliferación angiomasosa retiniana, telangiectasia macular, neovascularización del iris, neovascularización intraocular, degeneración retiniana, edema macular cistoide (CME), vasculitis, papiloedema, retinitis, conjuntivitis (por ejemplo, conjuntivitis infecciosa y conjuntivitis no infecciosa (por ejemplo, alérgica)), amaurosis congénita Leber, uveitis (que incluye uveitis infecciosa y no infecciosa), coroiditis (por ejemplo, coroiditis multifocal), histoplasmosis ocular, blefaritis, ojo seco, herida de ojo por traumatismo o enfermedad de Sjögren. En casos adicionales, el método comprende además administrarle al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, como se describe más adelante. Un «sujeto» de acuerdo con cualquiera de los métodos anteriores puede ser un ser humano.

Se contempla que el anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína) o conjugado de anticuerpo (por ejemplo, conjugado de HA monodisperso) de la presente invención se puede utilizar para tratar un mamífero. En una modalidad, el anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína) o conjugado de anticuerpo (por ejemplo, conjugado de HA monodisperso) se administra a un mamífero no humano con el fin de, por ejemplo, obtener datos preclínicos. Los mamíferos no humanos de ejemplo a tratar incluyen primates no humanos, perros, gatos, roedores (por ejemplo, ratones y ratas) y otros mamíferos en los que se realizan estudios preclínicos. Dichos mamíferos pueden ser modelos animales establecidos para una enfermedad a tratar con el anticuerpo o se pueden utilizar para estudiar la toxicidad del anticuerpo de interés. En cada una de estas modalidades, se pueden realizar estudios con incremento de dosis en el mamífero. El anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína) o conjugado de anticuerpo (por ejemplo, conjugado de HA monodisperso) se puede administrar, por ejemplo, a un roedor hospedador en un modelo de tumor sólido. El anticuerpo o conjugado de anticuerpo se puede administrar a un hospedador (por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un conejo) para los estudios farmacocinéticos oculares, por ejemplo, mediante la administración intravítrea (por ejemplo, inyección intravítrea) o el uso de un dispositivo de administración en puertos.

En un aspecto adicional, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos anti-VEGF modificados con cisteína) o conjugados de anticuerpo (por ejemplo, conjugados de HA monodisperso) que se proporcionan en

la presente, por ejemplo, para usar en cualquiera de los métodos terapéuticos mencionados anteriormente. En una modalidad, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos anti-VEGF modificados con cisteína) o conjugados de anticuerpo (por ejemplo, conjugados de HA monodispersos) provistos en la presente y un portador farmacéuticamente aceptable. En otra modalidad, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos anti-VEGF modificados con cisteína) o conjugados de anticuerpo (por ejemplo, conjugados de HA monodispersos) provistos en la presente y al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, tal como se describe más adelante. En determinadas modalidades, la formulación farmacéutica comprende uno o más compuestos adicionales. En determinadas modalidades, el compuesto adicional se une a una segunda molécula biológica seleccionada del grupo que consiste en IL-1 β ; IL-6; IL-6R; IL-13; IL-13R; PDGF; angiopoyetina; Ang2; Tie2; S1P; integrinas $\alpha\beta$ 3, $\alpha\beta$ 5 y α 5 β 1; betacelulina; apelina/APJ; eritropoyetina; factor de complemento D; TNF α ; HtrA1; un receptor de VEGF; receptor de ST-2 y proteínas genéticamente vinculadas al riesgo de degeneración macular asociada a la edad (AMD), tal como componentes de la vía de complemento C2, factor B, factor H, CFHR3, C3b, C5, C5a y C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; interleucina 8 (IL-8); CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC; COL10A1 y TNFRSF10A. En determinadas modalidades, el compuesto adicional es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este. Por ejemplo, en algunos casos, el compuesto adicional es un anticuerpo biespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-Ang2, tal como RG-7716 o cualquier anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-Ang2 descrito en WO 2010/069532 o WO 2016/073157 o una variante de estos. En otro ejemplo, en algunos casos, el compuesto adicional es un anticuerpo anti-IL-6, por ejemplo, EBI-031 (Eleven Biotherapeutics; ver, por ejemplo, WO 2016/073890), siltuximab (SYLVANT®), olokizumab, clazakizumab, sirukumab, elsilimomab, gerilimzumab, OPR-003, MEDI-5117, PF-04236921 o una variante de estos. En aun otro ejemplo, en algunos casos, el compuesto adicional es un anticuerpo anti-IL-6R, por ejemplo, tocilizumab (ACTEMRA®) (ver, por ejemplo, WO 1992/019579), sarilumab, vobarilizumab (ALX-0061), SA-237, o una variante de estos.

Los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos anti-VEGF modificados con cisteína) o conjugados de anticuerpos (por ejemplo, conjugados de HA monodisperso) se pueden utilizar ya sea solos o en combinación con otros agentes en una terapia. Por ejemplo, un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína) o conjugado de anticuerpo (por ejemplo, un conjugado de HA monodisperso) se puede administrar junto con al menos un agente terapéutico adicional. En determinadas modalidades, un agente terapéutico adicional es otro anticuerpo, un agente anti-angiogénico, un agente inmunosupresor, una citocina, un antagonista de citocina, un corticosteroide, un anti-emético, una vacuna contra el cáncer, un analgésico o combinaciones de

estos.

Por ejemplo, en determinadas modalidades, cualquiera de los métodos precedentes comprende además la administración de uno o más compuestos adicionales. En determinadas modalidades, el anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína) o conjugado de anticuerpo (por ejemplo, un conjugado de HA monodisperso) se administra de forma simultánea con los compuestos adicionales. En determinadas modalidades, el anticuerpo o conjugado de anticuerpo se administra antes o después de los compuestos adicionales. En determinadas modalidades, el compuesto adicional se une a una segunda molécula biológica seleccionada del grupo que consiste en IL-1 β ; IL-6; IL-6R; IL-13; IL-13R; PDGF; angiopoyetina; Ang2; Tie2; S1P; integrinas $\alpha\beta$ 3, $\alpha\beta$ 5 y α 5 β 1; betacelulina; apelina/APJ; eritropoyetina; factor de complemento D; TNF α ; HtrA1; un receptor de VEGF; receptor de ST-2 y proteínas genéticamente vinculadas al riesgo de AMD, tal como componentes de la vía de complemento C2, factor B, factor H, CFHR3, C3b, C5, C5a y C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; interleucina 8 (IL-8); CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC; COL10A1 y TNFRSF10A. En determinadas modalidades, el compuesto adicional es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este.

En determinadas modalidades de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes (o según se aplican), el trastorno ocular es una enfermedad neovascular intraocular seleccionada del grupo que consiste en retinopatías proliferativas, neovascularización coroidal (CNV), degeneración macular asociada a la edad (AMD), retinopatía diabética y otras retinopatías asociadas a la isquemia, edema macular diabético, miopía patológica, enfermedad de von Hippel-Lindau, histoplasmosis del ojo, oclusión de la vena retiniana (RVO), la que incluye CRVO y BRVO, neovascularización corneal, neovascularización retiniana y retinopatía de la prematuridad (ROP). Por ejemplo, en algunos casos, el compuesto adicional es un anticuerpo biespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-Ang2, tal como RG-7716 o cualquier anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-Ang2 descrito en WO 2010/069532 o WO 2016/073157 o una variante de estos. En otro ejemplo, en algunos casos, el compuesto adicional es un anticuerpo anti-IL-6, por ejemplo, EBI-031 (Eleven Biotherapeutics; ver, por ejemplo, WO 2016/073890), siltuximab (SYLVANT®), olokizumab, clazakizumab, sirukumab, elsilimomab, gerilimzumab, OPR-003, MEDI-5117, PF-04236921 o una variante de estos. En aun otro ejemplo, en algunos casos, el compuesto adicional es un anticuerpo anti-IL-6R, por ejemplo, tocilizumab (ACTEMRA®) (ver, por ejemplo, WO 1992/019579), sarilumab, vobarilizumab (ALX-0061), SA-237, o una variante de estos.

En algunos casos, un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína) o un conjugado de anticuerpo (por ejemplo, un conjugado de HA monodisperso) de la invención se puede administrar en combinación con al menos un agente terapéutico adicional para el tratamiento de un trastorno ocular, por ejemplo, un trastorno ocular descrito en la presente (por

ejemplo, AMD (por ejemplo, AMD húmeda), DME, DR o RVO). Ejemplos de agentes terapéuticos adicionales para la terapia de combinación para el tratamiento de trastornos oculares incluyen, de modo no taxativo, agentes anti-angiogénicos, tales como antagonistas de VEGF, los que incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-VEGF (por ejemplo, el Fab anti-VEGF LUCENTIS® (ranibizumab)),

5 las proteínas de fusión del receptor soluble (por ejemplo, la proteína de fusión del receptor soluble recombinante EYLEA® (aflibercept, también conocido como VEGF Trap Eye; Regeneron/Aventis)), aptámeros (por ejemplo, el aptámero pegilado anti-VEGF MACUGEN® (pegaptanib sódico; NeXstar Pharmaceuticals/OSI Pharmaceuticals)) y inhibidores de tirosina cinasa de VEGFR (por ejemplo, 4-(4-bromo-2-fluoroanilino)-6-metoxi-7-(1-metilpiperidin-4-ilmetoxi)quinazolina (ZD6474),

10 4-(4-fluoro-2-metilindol-5-iloxi)-6-metoxi-7-(3-pirrolidin-1-ilpropoxi)quinazolina (AZD2171), vatalanib (PTK787), semaxaminib (SU5416; SUGEN) y SUTENT® (sunitinib)); triptofanil-ARNt sintetasa (TrpRS); escualamina; RETAANE® (acetato de anecortave para la suspensión de depósito; Alcon, Inc.); profármaco combretastatina A4 (CA4P); MIFEPREX® (mifepristona-ru486); acetónido de triamcinolona subtenoniano; acetónido de triamcinolona cristalino intravítreo; inhibidores de

15 metaloproteínasa de matriz (por ejemplo, Prinomastat (AG3340; Pfizer)); acetónido de fluocinolona (lo que incluye implante intraocular de fluocinolona; Bausch & Lomb/Control Delivery Systems); linomida; inhibidores de función de la integrina $\beta 3$; angiostatina y combinaciones de estos. Estos y otros agentes terapéuticos que se pueden administrar en combinación con un conjugado de anticuerpo de la invención se describen en, por ejemplo, la solicitud de patente estadounidense n.º

20 US 2014/0017244, la que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia. Otros ejemplos de agentes terapéuticos adicionales que se pueden utilizar en combinación con un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína) o un conjugado de anticuerpo (por ejemplo, un conjugado de HA monodisperso) de la invención para el tratamiento de un trastorno ocular (por ejemplo, AMD, DME, DR o RVO), incluyen, de modo no taxativo,

25 VISUDYNE® (verteporfina; un fármaco activado con luz que normalmente se utiliza junto con tratamiento fotodinámico con un láser no térmico), PKC412, Endovion (NS 3728; NeuroSearch A/S), factores neurotróficos (por ejemplo, factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) y factor neurotrófico del cuerpo ciliar (CNTF)), diltiazem, dorzolamida, PHOTOTROP®, 9-cis-retinal, medicación para los ojos (por ejemplo, yoduro de fosfolina, ecotiofato o inhibidores de anhidrasa

30 carbónica), veovastat (AE-941; AEterna Laboratories, Inc.), Sirna-027 (AGF-745; Sima Therapeutics, Inc.), neurotrofinas (que incluyen, únicamente a modo de ejemplo, NT-4/5, Genentech), Cand5 (Acuity Pharmaceuticals), INS-37217 (Inspire Pharmaceuticals), antagonistas de integrina (que incluye aquellas de Jerini AG y Abbott Laboratories), EG-3306 (Ark Therapeutics Ltd.), BDM-E (BioDiem Ltd.), talidomida (tal como la utilizó, por ejemplo, EntreMed, Inc.),

35 cardiotrofina 1 (Genentech), 2-metoxiestradiol (Allergan/Oculex), DL-8234 (Toray Industries), NTC-

200 (Neurotech), tetratiomolibdato (Universidad de Michigan), LYN-002 (Lynkeus Biotech), compuesto microalgal (Aquasearch/Albany, Mera Pharmaceuticals), D-9120 (Celltech Group plc), ATX-S10 (Hamamatsu Photonics), TGF-beta 2 (Genzyme/Celtrix), inhibidores de tirosina cinasa (por ejemplo, aquellos de Allergan, SUGEN o Pfizer), NX-278-L (NeXstar Pharmaceuticals/Gilead Sciences), Opt-24 (OPTIS France SA), neuroprotectores de células ganglionares de la retina (Cogent Neurosciences), derivados de N-nitropirazol (Texas A&M University System), KP-102 (Krenitsky Pharmaceuticals), ciclosporina A, agentes terapéuticos utilizados en el tratamiento fotodinámico (por ejemplo, VISUDYNE®; PDT dirigido al receptor, Bristol-Myers Squibb, Co.; porfímero sódico para la inyección con PDT; verteporfina, QLT Inc.; rostoporfina con PDT, Miravent Medical Technologies; talaporfina sódica con PDT, Nippon Petroleum; y motexafin lutetium, Pharmacyclics, Inc.), oligonucleótidos antisentido (que incluye, a modo de ejemplo, productos evaluados por Novagali Pharma SA e ISIS-13650, Isis Pharmaceuticals) y combinaciones de estos.

Un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína) o conjugado de anticuerpo (por ejemplo, un conjugado de HA monodisperso) de la invención se puede administrar en combinación con una terapia o un procedimiento quirúrgico para el tratamiento de un trastorno ocular (por ejemplo, AMD, DME, DR o RVO), los que incluyen, por ejemplo, fotocoagulación con láser (por ejemplo, fotocoagulación panretiniana (PRP)), tratamiento con láser de las drusas, cirugía de agujero macular, cirugía de translocación macular, telescopios miniatura implantables, angiografía en movimiento de PHI (también conocida como terapia con microláser y tratamiento de vasos nutrientes), terapia con haz de protones, terapia de microestimulación, cirugía vítrea y por desprendimiento de retina, cerclaje escleral, cirugía submacular, termoterapia transpupilar, terapia de fotosistema I, uso de interferencia de ARN (ARNi), reoforesis extracorpórea (también conocida como filtración diferencial de membrana y reoterapia), implante de microchip, terapia de células madre, terapia de reemplazo génico, terapia génica de ribozimas (que incluye la terapia génica para el elemento que responde a la hipoxia, Oxford Biomedica; Lentipak, Genetix; y terapia génica de PDEF, GenVec), trasplante de fotorreceptor/células retinianas (las que incluyen células epiteliales de la retina trasplantables, Diacrin, Inc.; trasplante de células de la retina, Cell Genesys, Inc.), acupuntura y combinaciones de estos.

En algunos casos, un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína) o conjugado de anticuerpo (por ejemplo, un conjugado de HA monodisperso) de la invención se puede administrar en combinación con un agente antiangiogénico para el tratamiento de un trastorno ocular (por ejemplo, AMD, DME, DR o RVO). Se puede utilizar cualquier agente antiangiogénico en combinación con un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína) o un conjugado de anticuerpo de la invención, el que incluye, de modo no

taxativo, los enumerados por Carmeliet et ál. *Nature* 407:249-257, 2000. En algunas modalidades, el agente antiangiogénico es un antagonista de VEGF, lo que incluye, de modo no taxativo, un anticuerpo anti-VEGF (por ejemplo, el Fab anti-VEGF LUCENTIS® (ranibizumab), RTH-258 (anteriormente, ESBA-1008, un fragmento de anticuerpo de cadena simple anti-VEGF; Novartis) o un anticuerpo biespecífico anti-VEGF (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-angiopoyetina 2, tal como RG-7716; Roche)), una proteína de fusión de receptor recombinante soluble (por ejemplo, EYLEA® (aflibercept)), una variante de VEGF, un fragmento de VEGFR soluble, un aptámero capaz de bloquear VEGF (por ejemplo, pegaptanib) o VEGFR, un anticuerpo anti-VEGFR neutralizante, un inhibidor de molécula pequeña de tirosinas cinasas de VEGFR, un DARPin® anti-VEGF (por ejemplo, abicipar pegol), un ARN interferente pequeño que inhibe la expresión de VEGF o VEGFR, un inhibidor de tirosina cinasa de VEGFR (por ejemplo, 4-(4-bromo-2-fluoroanilino)-6-metoxi-7-(1-metilpiperidin-4-ilmetoxi)quinazolina (ZD6474), 4-(4-fluoro-2-metilindol-5-ilo)-6-metoxi-7-(3-pirrolidin-1-ilpropoxi)quinazolina (AZD2171), vatalanib (PTK787), semaxaminib (SU5416; SUGEN) y SUTENT® (sunitinib)), y combinaciones de estos. En algunos casos, el anticuerpo biespecífico anti-VEGF se une a una segunda molécula biológica, el que incluye, de modo no taxativo, IL-1 β ; IL-6; IL-6R; PDGF (por ejemplo, PDGF-BB); angiopoyetina; angiopoyetina 2; Tie2; S1P; integrinas $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$ y $\alpha 5\beta 1$; betacelulina; apelina/APJ; eritropoyetina; factor de complemento D; TNF α ; HtrA1; un receptor de VEGF (por ejemplo, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, mbVEGFR o sVEGFR); receptor de ST-2 y proteínas genéticamente vinculadas al riesgo de degeneración macular asociada a la edad (AMD), tal como componentes de la vía de complemento C2, factor B, factor H, CFHR3, C3b, C5, C5a y C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; IL-8; CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC; COL10A1 y TNFRSF10A. Por ejemplo, en algunos casos, el compuesto adicional es un anticuerpo biespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-Ang2, tal como RG-7716 o cualquier anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-Ang2 descrito en WO 2010/069532 o WO 2016/073157 o una variante de estos.

Otros genes antiangiogénicos adecuados que se pueden administrar en combinación con un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína) o un conjugado de anticuerpo (por ejemplo, un conjugado de HA monodisperso) de la invención para el tratamiento de un trastorno ocular (por ejemplo, AMD, DME, DR o RVO) incluyen corticosteroides, esteroides angiostáticos, acetato de anecortave, angiostatina, endostatina, inhibidores de tirosina cinasa, inhibidores de metaloproteínasa de la matriz (MMP), proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina 3 (IGFBP3), antagonistas del factor derivado de células estromales (SDF-1) (por ejemplo, anticuerpos anti-SDF-1), factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF), gamma-secretasa, ligando tipo Delta 4, antagonistas de integrina, antagonistas del factor inducible por hipoxia (HIF)-1 α , antagonistas de proteína cinasa CK2, agentes que inhiben el anidamiento de la célula madre

(por ejemplo, célula progenitora endotelial) en el sitio de neovascularización (por ejemplo, un anticuerpo de cadherina endotelial anti-vascular (CD-144) y/o un anticuerpo anti-SDF-1), y combinaciones de estos.

En otro ejemplo, en algunos casos, un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína) o un conjugado de anticuerpo (por ejemplo, un conjugado de HA monodisperso) de la invención se puede administrar en combinación con un agente que presenta actividad contra neovascularización para el tratamiento de un trastorno ocular (por ejemplo, AMD, DME, DR, o RVO), tal como un fármaco antiinflamatorio, un inhibidor de diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR) (por ejemplo, rapamicina, AFINITOR® (everolimus) y TORISEL® (temsirolimus)), ciclosporina, un antagonista de factor de necrosis tumoral (TNF) (por ejemplo, un anticuerpo anti-TNF α o fragmento de unión al antígeno de este (por ejemplo, infliximab, adalimumab, certolizumab pegol, y golimumab) o una proteína de fusión del receptor soluble (por ejemplo, etanercept)), un agente anticomplemento, un agente antiinflamatorio no esteroides (NSAID) o combinaciones de estos.

En aun otro ejemplo, en algunos casos, un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína) o un conjugado de anticuerpo (por ejemplo, un conjugado de HA monodisperso) de la invención se puede administrar en combinación con un agente que es neuroprotector y puede reducir potencialmente la evolución de AMD seca a AMD húmeda, tal como la clase de fármacos denominada «neuroesteroides», los que incluyen fármacos tales como dehidroepiandrosterona (DHEA) (nombres comerciales: PRASTERA™ y FIDELIN®), sulfato de dehidroepiandrosterona y sulfato de pregnenolona.

Cualquier agente terapéutico de AMD adecuado se puede administrar como un agente terapéutico adicional en combinación con un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína) o un conjugado de anticuerpo (por ejemplo, un conjugado de HA monodisperso) de la invención para el tratamiento de un trastorno ocular (por ejemplo, AMD, DME, DR o RVO), lo que incluye, de modo no taxativo, un antagonista de VEGF, por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF (por ejemplo, LUCENTIS® (ranibizumab), RTH-258 (anteriormente, ESBA-1008, un fragmento de anticuerpo anti-VEGF de cadena simple; Novartis) o un anticuerpo biespecífico anti-VEGF (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-angiopoyetina 2, tal como RG-7716; Roche)), una proteína de fusión del receptor de VEGF soluble (por ejemplo, EYLEA® (aflibercept)), un DARPIn® anti-VEGF (por ejemplo, abicipar pegol; Molecular Partners AG/Allergan) o un aptámero anti-VEGF (por ejemplo, MACUGEN® (pegaptanib sódico)); un antagonista de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), por ejemplo, un anticuerpo anti-PDGF, un anticuerpo anti-PDGFR (por ejemplo, REGN2176-3), un aptámero pegilado anti-PDGF-BB (por ejemplo, FOVISTA®; Ophthotech/Novartis), una proteína de fusión del receptor de PDGFR soluble o un

antagonista PDGF/VEGF dual (por ejemplo, un inhibidor de molécula pequeña (por ejemplo, DE-120 (Santen) o X-82 (TyrogeneX)) o un anticuerpo biespecífico anti-PDGF/anti-VEGF)); VISUDYNE® (verteporfina) en combinación con terapia fotodinámica; un antioxidante; un antagonista del sistema de complemento, por ejemplo, un antagonista C5 del factor de complemento (por ejemplo, un inhibidor de molécula pequeña (por ejemplo, ARC-1905; Opthotech) o un anticuerpo anti-C5 (por ejemplo, LFG-316; Novartis), un antagonista de properdina (por ejemplo, un anticuerpo anti-properdina, por ejemplo, CLG-561; Alcon) o un antagonista D del factor de complemento (por ejemplo, un anticuerpo de factor D anticomplemento, por ejemplo, lampalizumab; Roche)); un modificador de ciclo visual (por ejemplo, clorhidrato emixustat); escualamina (por ejemplo, OHR-102; Ohr Pharmaceutical); complementos de minerales y vitaminas (por ejemplo, aquellos descritos en el estudio 1 de enfermedad de ojos asociadas a la edad (AREDS1; cinc y/o antioxidantes) y el estudio 2 (AREDS2; cinc, antioxidantes, luteína, zeaxantina y/o ácidos grasos de omega 3)); una terapia a base de células, por ejemplo, NT-501 (Renexus); PH-05206388 (Pfizer), trasplante de células huCNS-SC (StemCells), CNTO-2476 (Janssen), OpRegen (Cell Cure Neurosciences) o trasplante de células MA09-hRPE (Ocata Therapeutics); un antagonista de factor tisular (por ejemplo, hl-con1; Iconic Therapeutics); un agonista del receptor adrenérgico alfa (por ejemplo, tartrato de brimonidina); una vacuna de péptido (por ejemplo, S-646240; Shionogi); un antagonista de beta amiloide (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal amiloide anti-beta, por ejemplo, GSK-933776); un antagonista de S1P (por ejemplo, un anticuerpo anti-S1P, por ejemplo, iSONEP™; Lpath Inc); un antagonista de ROBO4 (por ejemplo, un anticuerpo anti-ROBO4, por ejemplo, DS-7080a; Daiichi Sankyo); un vector lentiviral que expresa angioestatina y endoestatina (por ejemplo, RetinoStat); y cualquier combinación de estos. En algunos casos, los agentes terapéuticos de AMD (que incluyen cualquiera de los agentes terapéuticos de AMD precedentes) se pueden formular conjuntamente. Por ejemplo, el anticuerpo anti-PDGFR, REGN2176-3, se puede formular junto con aflibercept (EYLEA®). En algunos casos, dicha formulación en conjunto se puede administrar en combinación con un anticuerpo de la invención. En algunos casos, el trastorno ocular es AMD (por ejemplo, AMD húmeda).

Un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína) o un conjugado de anticuerpo (por ejemplo, un conjugado de HA monodisperso) de la invención se puede administrar en combinación con LUCENTIS® (ranibizumab) para el tratamiento de un trastorno ocular (por ejemplo, AMD, DME, DR o RVO). LUCENTIS® (ranibizumab) se puede administrar, por ejemplo, a 0.3 mg/ojo o 0.5 mg/ojo mediante inyección intravítrea, por ejemplo, cada mes. En algunos casos, el trastorno ocular es AMD (por ejemplo, AMD húmeda).

Un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína) o un conjugado de

anticuerpo (por ejemplo, un conjugado de HA monodisperso) de la invención se puede administrar en combinación con EYLEA® (aflibercept) para el tratamiento de un trastorno ocular (por ejemplo, AMD, DME, DR o RVO). EYLEA® (aflibercept) se puede administrar, por ejemplo, a 2 mg/ojo mediante inyección intravítrea, por ejemplo, cada cuatro semanas (Q4W) o Q4W durante los primeros tres meses, seguido de inyecciones de mantenimiento una vez cada dos meses. En algunos casos, el trastorno ocular es AMD (por ejemplo, AMD húmeda).

Un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína) o un conjugado de anticuerpo (por ejemplo, un conjugado de HA monodisperso) de la invención se puede administrar en combinación con MACUGEN® (pegaptanib sódico) para el tratamiento de un trastorno ocular (por ejemplo, AMD, DME, DR o RVO). MACUGEN® (pegaptanib sódico) se puede administrar, por ejemplo, a 0.3 mg/ojo mediante inyección intravítrea cada seis semanas. En algunos casos, el trastorno ocular es AMD (por ejemplo, AMD húmeda).

Un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína) o un conjugado de anticuerpo (por ejemplo, un conjugado de HA monodisperso) de la invención se puede administrar en combinación con VISUDYNE® (verteporfina) en combinación con terapia fotodinámica para el tratamiento de un trastorno ocular (por ejemplo, AMD, DME, DR o RVO). VISUDYNE® se puede administrar, por ejemplo, mediante infusión intravenosa a cualquier dosis adecuada (por ejemplo, 6 mg/m² de área de superficie corporal) y se administra cada tres meses (por ejemplo, en 10 minutos de infusión). En algunos casos, el trastorno ocular es AMD (por ejemplo, AMD húmeda).

Un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína) o un conjugado de anticuerpo (por ejemplo, un conjugado de HA monodisperso) de la invención se puede administrar en combinación con un antagonista de PDGF para el tratamiento de un trastorno ocular (por ejemplo, AMD, DME, DR o RVO). Los ejemplos de antagonistas de PDGF que se pueden utilizar en combinación con un anticuerpo de la invención incluyen un anticuerpo anti-PDGF, un anticuerpo anti-PDGFR, un inhibidor de molécula pequeña (por ejemplo, escualamina), un aptámero pegilado anti-PDGF-B tal como FOVISTA® (E10030; Ophthotech/Novartis) o un antagonista de PDGF/VEGF dual (por ejemplo, un inhibidor de moléculas pequeña (por ejemplo, DE-120 (Santen) o X-82 (TyrogeneX)) o un anticuerpo biespecífico anti-PDGF/anti-VEGF). Por ejemplo, FOVISTA® se puede administrar como una terapia adjunta a un anticuerpo de la invención. FOVISTA® se puede administrar a cualquier dosis adecuada, por ejemplo, de 0.1 mg/ojo a 2.5 mg/ojo, por ejemplo, a 0.3 mg/ojo o 1.5 mg/ojo, por ejemplo, mediante inyección intravítrea, por ejemplo, cada cuatro semanas (Q4W). Se puede administrar OHR-102 (solución oftálmica de lactato de escualamina, 0.2%) mediante gotas para ojos, por ejemplo, dos veces diarias. Se puede administrar OHR-102 en combinación con antagonistas de VEGF, tal como LUCENTIS® o EYLEA®. En algunas modalidades, un conjugado de anticuerpo de la invención se

puede administrar en combinación con OHR-102, LUCENTIS® y/o EYLEA®. En algunos casos, el trastorno ocular es AMD (por ejemplo, AMD húmeda).

Un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína) o un conjugado de anticuerpo (por ejemplo, un conjugado de HA monodisperso) de la invención se puede administrar en combinación con RTH-258 para el tratamiento de un trastorno ocular (por ejemplo, AMD, DME, DR o RVO). RTH-258 se puede administrar, por ejemplo, mediante inyección intravítrea o infusión ocular. En el caso de la inyección intravítrea, se puede administrar RTH-258 en cualquier dosis adecuada (por ejemplo, 3 mg/ojo o 6 mg/ojo), por ejemplo, una vez cada cuatro semanas (Q4W) durante los primeros tres meses como carga, seguida de inyección de mantenimiento cada 12 semanas (Q12W) o cada ocho semanas (Q8W). En algunos casos, el trastorno ocular es AMD (por ejemplo, AMD húmeda).

Un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína) o un conjugado de anticuerpo (por ejemplo, un conjugado de HA monodisperso) de la invención se puede administrar en combinación con abicipar pegol para el tratamiento de un trastorno ocular (por ejemplo, AMD, DME, DR o RVO). Se puede administrar abicipar pegol, por ejemplo, mediante inyección intravítrea. Se puede administrar abicipar pegol en cualquier dosis adecuada (por ejemplo, 1 mg/ojo, 2 mg/ojo, 3 mg/ojo, 4 mg/ojo o 4.2 mg/ojo), por ejemplo, una vez cada cuatro semanas (Q4W) durante los primeros tres meses como carga, seguida de inyección de mantenimiento cada 12 semanas (Q12W) o cada ocho semanas (Q8W). En algunos casos, el trastorno ocular es AMD (por ejemplo, AMD húmeda).

Se puede administrar cualquier agente terapéutico de DME y/o DR adecuado en combinación con un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína), un conjugado de anticuerpo (por ejemplo, un conjugado de HA monodisperso) de la invención para el tratamiento de un trastorno ocular (por ejemplo, AMD, DME, DR o RVO), el que incluye, de modo no taxativo, un antagonista de VEGF (por ejemplo, LUCENTIS® o EYLEA®), un corticosteroide (por ejemplo, un implante de corticosteroide (por ejemplo, OZURDEX® (implante intravítreo de dexametasona) o ILUVIEN® (implante intravítreo de acetónido de fluocinolona)) o un corticosteroide formulado para la administración mediante inyección intravítrea (por ejemplo, acetónido de triamcinolona)) o combinaciones de estos. En algunos casos, el trastorno ocular es DME y/o DR.

Un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína) o un conjugado de anticuerpo (por ejemplo, un conjugado de HA monodisperso) de la invención se puede administrar en combinación con LUCENTIS® (ranibizumab) para el tratamiento de DME y/o DR (por ejemplo, NPDR o PDR). LUCENTIS® (ranibizumab) se puede administrar, por ejemplo, a 0.3 mg/ojo o 0.5 mg/ojo mediante inyección intravítrea, por ejemplo, cada cuatro semanas (Q4W).

Un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína) o un conjugado de

anticuerpo (por ejemplo, un conjugado de HA monodisperso) de la invención se puede administrar en combinación con EYLEA® (aflibercept) para el tratamiento de DME y/o DR (por ejemplo, NPDR o PDR). EYLEA® (aflibercept) se puede administrar, por ejemplo, a 2 mg/ojo mediante inyección intravítrea, por ejemplo, cada cuatro semanas (Q4W) o Q4W durante los primeros cinco meses, seguido de inyecciones de mantenimiento una vez cada ocho semanas (Q8W).

Un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína) o un conjugado de anticuerpo (por ejemplo, un conjugado de HA monodisperso) de la invención se puede administrar en combinación con OZURDEX® (implante intravítreo de dexametasona) para el tratamiento de DME y/o DR. Se puede administrar OZURDEX® como un implante intravítreo de dexametasona a 0.7 mg, el que se puede administrar hasta cada seis meses.

Un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína) o un conjugado de anticuerpo (por ejemplo, un conjugado de HA monodisperso) de la invención se puede administrar en combinación con ILUVIEN® (implante intravítreo de dexametasona) para el tratamiento de DME y/o DR. Se puede administrar OZURDEX® como un implante intravítreo de acetónido de fluocinolone a 0.19 mg, el que se puede eluir a una tasa de 0.25 µg/día, y puede durar hasta alrededor de 36 meses.

En algunos casos, el régimen de tratamiento de TAO/PRN o el régimen de tratamiento de TAE se puede utilizar para administrar un agente terapéutico de AMD (por ejemplo, ranibizumab o aflibercept) en combinación con un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína) o un conjugado de anticuerpo (por ejemplo, un conjugado de HA monodisperso) de la invención. En el caso del régimen de TAO/PRN, luego de las inyecciones intravítreas iniciales cada cuatro semanas (Q4W) (normalmente durante alrededor de 3 meses), se monitorea el sujeto todos los meses o mes por medio (o incluso en intervalos más extensos), con inyecciones administradas en el caso de evidencia de actividad de la enfermedad (por ejemplo, un descenso en la agudeza visual o fluido en la tomografía de coherencia óptica (OCT)). En el caso del régimen de TAE, un sujeto se puede tratar cada cuatro semanas (Q4W), seguido de la extensión del intervalo de tratamiento en una cantidad fija de semanas (por ejemplo, +2 semanas) para cada visita posterior hasta un intervalo máximo (por ejemplo, cada 6 semanas, cada 8 semanas, cada 10 semanas o cada 12 semanas). Se pueden observar y tratar los ojos en cada visita, incluso si no hay evidencia de actividad de la enfermedad. Si la mácula aparece húmeda (por ejemplo, mediante OCT), se puede acortar el intervalo para las inyecciones (por ejemplo, -2 semanas) hasta que la mácula aparezca seca nuevamente. En algunos casos, el trastorno ocular es AMD (por ejemplo, AMD húmeda).

Esas terapias de combinación indicadas anteriormente comprenden la administración combinada (donde se incluyen dos o más agentes terapéuticos en la misma formulación o en formulaciones

separadas) y la administración separada, en cuyo caso la administración del anticuerpo o conjugado de anticuerpo de la invención puede producirse antes, al mismo tiempo y/o después de la administración del o de los agentes terapéuticos adicionales. En una modalidad, la administración del anticuerpo o conjugado de anticuerpo y la administración de un agente terapéutico adicional ocurren dentro de alrededor de uno, dos, tres, cuatro o cinco meses, o dentro de alrededor de una, dos o tres semanas, o dentro de alrededor de uno, dos, tres, cuatro, cinco, o seis días, de cada uno.

Un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína) o un conjugado de anticuerpo (por ejemplo, un conjugado de HA monodisperso) de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) para la prevención o tratamiento de una afección o enfermedad ocular puede administrarse mediante cualquier medio adecuado que incluye, de modo no taxativo, por ejemplo, una incluyen ocular, intraocular y/o intravítrea, y/o inyección yuxtaescleral, y/o inyección subtenoniana, y/o inyección supercoroidea, y/o administración tópica en forma de gotas para ojos y/o ungüento. Dichos anticuerpos o conjugados de anticuerpos se pueden administrar mediante diversos métodos, por ejemplo, por vía intravítrea como un dispositivo y/o depósito que permite la liberación lenta del compuesto dentro del vítreo, que incluye los descritos en referencias tales como Intraocular Drug Delivery, Jaffe, Jaffe, Ashton y Pearson, editores, Taylor & Francis (marzo 2006). En un ejemplo, un dispositivo puede encontrarse en forma de una minibomba y/o matriz y/o sistema de difusión pasiva y/o células encapsuladas que liberan el compuesto durante un período de tiempo prolongado (Intraocular Drug Delivery, Jaffe, Jaffe, Ashton y Pearson, editores, Taylor & Francis (marzo 2006). A continuación, en la sección G, se describen enfoques adicionales que se pueden utilizar.

Las formulaciones para la administración ocular, intraocular o intravítrea se pueden preparar a través de métodos y usando excipientes conocidos en la técnica. Una característica importante para el tratamiento eficaz es la penetración adecuada del ojo. A diferencia de las enfermedades de la parte frontal del ojo, donde los fármacos pueden administrarse tópicamente, las enfermedades retinianas comúnmente se benefician de un enfoque más específico del sitio. Las gotas para ojos y los ungüentos rara vez penetran la parte trasera del ojo, y la barrera hemato-ocular dificulta la penetración de fármacos administrados de forma sistémica en el tejido ocular. Por consiguiente, un método elegido para la administración del fármaco para tratar una enfermedad retiniana, tal como DMAE o NVC, típicamente es la inyección intravítrea directa. Las inyecciones intravítreas a menudo se repiten en intervalos que dependen de la condición del paciente y las propiedades y semivida del fármaco administrado. A continuación, en la sección G, se describen enfoques adicionales que se pueden utilizar.

La cantidad de un anticuerpo o conjugado de anticuerpo que será eficaz en el tratamiento de un

trastorno o afección ocular particular dependerá de la naturaleza del trastorno o afección y se puede determinar mediante técnicas clínicas estándares. Cuando sea posible, es conveniente determinar la curva de respuesta a la dosis y las composiciones farmacéuticas de la invención primero in vitro y luego en modelos animales útiles antes de la evaluación en seres humanos.

- 5 Los medios de administración adicionales adecuados, incluyen la administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal y, en caso de desearse para el tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede ser mediante cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tal como por vía intravenosa
- 10 o subcutánea, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. En la presente se contemplan varias pautas de dosificación, que incluyen, de modo no taxativo, administraciones simples o múltiples durante varios momentos, administración por bolo e infusión por pulso. En algunos casos, el conjugado de anticuerpo de la invención se puede administrar por vía intravenosa, intramuscular, intradérmica, percutánea, intraarterial, intraperitoneal, intralesional,
- 15 intracraneal, intraarticular, intraprostática, intrapleural, intratraqueal, intratecal, intranasal, intravaginal, intrarrectal, tópica, intratumoral, intraperitoneal, peritoneal, intraventricular, subcutánea, subconjuntival, intravesicular, mucosa, intrapericárdica, intraumbilical, intraorbital, oral, tópica, transdérmica, mediante inhalación, mediante inyección, mediante implante, mediante infusión, mediante infusión continua, mediante perfusión localizada afectando las células objetivo
- 20 directamente, mediante catéter, mediante lavado, en cremas o en composiciones lipídicas.

- La dosis adecuada de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína) o un conjugado de anticuerpo (por ejemplo, un conjugado de HA monodisperso) de la invención (cuando se usa solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales)
- 25 para la prevención o el tratamiento de enfermedades dependerá del tipo de enfermedad a tratar, el tipo de anticuerpo, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, la terapia anterior, la historia clínica y la respuesta al anticuerpo del paciente, y el criterio del médico tratante. El anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína) o conjugado de anticuerpo (por ejemplo conjugado de HA monodisperso)
- 30 se administra de forma adecuada al paciente una vez o en una serie de tratamientos. Según el tipo y la gravedad de la enfermedad, una dosis de alrededor de 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0.1 mg/kg, 0.2 mg/kg, 0.4 mg/kg, 0.6 mg/kg, 0.8 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg o 10 mg/kg) de anticuerpo o conjugado de anticuerpo puede ser una dosis inicial candidata para administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una
- 35 o más administraciones independientes o mediante infusión continua. En algunas modalidades, el

anticuerpo o conjugado de anticuerpo utilizado es alrededor de 0.01 mg/kg a alrededor de 45 mg/kg, alrededor de 0.01 mg/kg a alrededor de 40 mg/kg, alrededor de 0.01 mg/kg a alrededor de 35 mg/kg, alrededor de 0.01 mg/kg a alrededor de 30 mg/kg, alrededor de 0.01 mg/kg a alrededor de 25 mg/kg, alrededor de 0.01 mg/kg a alrededor de 20 mg/kg, alrededor de 0.01 mg/kg a
5 alrededor de 15 mg/kg, alrededor de 0.01 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg, alrededor de 0.01 mg/kg a alrededor de 5 mg/kg o alrededor de 0.01 mg/kg a alrededor de 1 mg/kg. En el caso de los conjugados de anticuerpo, la dosificación se puede basar en el peso del componente anticuerpo del conjugado. Una dosis diaria normal puede oscilar entre alrededor de 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, según los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante
10 varios días o más, según la afección, por lo general el tratamiento se mantendrá hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad.

En algunas modalidades, los métodos pueden comprender además una terapia adicional. La terapia adicional puede ser una terapia de radiación, cirugía, quimioterapia, terapia génica, terapia de ADN, terapia viral, terapia de ARN, inmunoterapia, trasplante de médula ósea, nanoterapia,
15 terapia de anticuerpo monoclonal o una combinación de los anteriores. La terapia adicional puede ser en forma de terapia adyuvante o neoadyuvante. En algunas modalidades, la terapia adicional es la administración de un inhibidor enzimático de molécula pequeña o agente antimetastático. En algunas modalidades, la terapia adicional es la administración de agentes que limitan los efectos secundarios (por ejemplo, agentes destinados a aminorar la aparición y/o gravedad de efectos
20 secundarios del tratamiento, como agentes antieméticos, etc.). En algunas modalidades, la terapia adicional es terapia de radiación. En algunas modalidades, la terapia adicional es cirugía. En algunas modalidades, la terapia adicional es una combinación de radioterapia y cirugía. En algunas modalidades, la terapia adicional es radiación gamma. En algunas modalidades, la terapia adicional puede ser una administración separada de uno o más de los agentes terapéuticos
25 descritos anteriormente.

Se entiende que cualquiera de las formulaciones o métodos terapéuticos anteriores pueden llevarse a cabo mediante el uso de un inmunoconjugado de la invención en lugar de un anticuerpo anti-VEGF o además de este.

Se entiende que cualquiera de las formulaciones o métodos terapéuticos anteriores se pueden
30 llevar a cabo con un conjugado de anticuerpo de la invención (por ejemplo cualquiera descrito en la presente, por ejemplo, en la sección G más adelante).

F. Artículos de fabricación

En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento y/o prevención de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de
35 fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociado con el recipiente.

Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, bolsas de solución IV, etc. Los recipientes pueden estar compuestos por una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que, por sí misma o combinada con otra composición, es eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o vial que tenga un tapón que pueda perforarse mediante una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es una composición de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína) o conjugado de anticuerpo de este) de la invención. La etiqueta o el prospecto indican que la composición se utiliza en el tratamiento de la afección seleccionada. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición incluida en este, donde la composición comprende un anticuerpo o una composición de anticuerpo de este de la invención y, opcionalmente, (b) un segundo recipiente con una composición incluida en este, donde la composición comprende un agente terapéutico adicional. El artículo de fabricación en esta modalidad de la invención puede comprender además un prospecto que indique que las composiciones pueden usarse para tratar una afección particular. De manera alternativa o adicional, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprenda un amortiguador farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI, por sus siglas en inglés), solución salina amortiguada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Adicionalmente, puede comprender otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, lo que incluye otras soluciones amortiguadoras, diluyentes, filtros, agujas y jeringas. Se entiende que cualquiera de los artículos de fabricación anteriores pueden incluir cualquiera de los anticuerpos o conjugados de anticuerpo de estos descritos en la presente y/o cualquier agente terapéutico adicional.

G. Enfoques de administración ocular de acción prolongada

La invención provee composiciones para el tratamiento de trastornos oculares, las que se pueden utilizar para la administración de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos anti-VEGF (que incluyen cualquier anticuerpo anti-VEGF descrito en la presente, tal como G6.31 AARR)) de acción prolongada en el ojo. Por ejemplo, la invención provee conjugados de anticuerpo (por ejemplo, conjugados de HA monodispersos) que incluyen un anticuerpo anti-VEGF descrito en la presente (por ejemplo, conjugados de Fab, Fab-C o anticuerpo modificado con cisteína (por ejemplo, TioFab)). La invención también provee dispositivos que se pueden utilizar para la administración ocular de un anticuerpo o conjugado de anticuerpo descrito en la presente. La invención también provee composiciones farmacéuticas que incluyen anticuerpos o conjugados de anticuerpo descritos en la presente. Estas composiciones se pueden utilizar en cualquiera de los métodos

terapéuticos descritos en la presente, por ejemplo, métodos para el tratamiento de un trastorno ocular (por ejemplo, AMD (por ejemplo, AMD húmeda), DME, DR (por ejemplo, NPDR o PDR) o RVO (por ejemplo, CRVO o BRVO)).

1. Conjugados de anticuerpo

5 La invención provee conjugados de anticuerpo que incluyen un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF) y un polímero monodisperso unido de forma covalente al anticuerpo. El anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo anti-VEGF) se puede unir de forma covalente al polímero monodisperso de forma irreversible o reversible. Se puede utilizar cualquier polímero monodisperso adecuado, lo que incluye aquellos descritos en la presente u otros conocidos en la
10 técnica.

La invención provee un conjugado de anticuerpo que incluye un anticuerpo y un polímero monodisperso (por ejemplo, un polímero de HA monodisperso) unido de forma covalente al anticuerpo. El polímero puede tener un índice de polidispersión (PDI) de alrededor de 1.1 o menos. Se entiende que el valor del PDI puede hacer referencia al valor del PDI del polímero utilizado para
15 preparar el conjugado de anticuerpo. Por ejemplo, en algunas modalidades, el polímero tiene un PDI de entre 1.0 y alrededor de 1.1 (por ejemplo, entre 1 y alrededor de 1.1, entre 1 y alrededor de 1.09, entre 1 y alrededor de 1.08, entre 1 y alrededor de 1.07, entre 1 y alrededor de 1.06, entre 1 y alrededor de 1.05, entre 1 y alrededor de 1.04, entre 1 y alrededor de 1.03, entre 1 y alrededor de 1.02, entre 1 y alrededor de 1.01, entre 1 y alrededor de 1.005, entre alrededor de 1.001 y
20 alrededor de 1.1, entre alrededor de 1.001 y alrededor de 1.1, entre alrededor de 1.001 y alrededor de 1.09, entre alrededor de 1.001 y alrededor de 1.08, entre alrededor de 1.001 y alrededor de 1.07, entre alrededor de 1.001 y alrededor de 1.06, entre alrededor de 1.001 y alrededor de 1.05, entre alrededor de 1.001 y alrededor de 1.04, entre alrededor de 1.001 y alrededor de 1.03, entre alrededor de 1.001 y alrededor de 1.02, entre alrededor de 1.001 y alrededor de 1.01, entre
25 alrededor de 1.001 y alrededor de 1.005, entre alrededor de 1.001 y alrededor de 1.004, entre alrededor de 1.001 y alrededor de 1.003, entre alrededor de 1.001 y alrededor de 1.002, entre alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.1, entre alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.09, entre alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.08, entre alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.07, entre alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.06, entre alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.05, entre
30 alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.04, entre alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.03, entre alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.02, entre alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.01, entre alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.005, entre alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.004, entre alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.003, entre alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.002 o entre alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.005).

35 Por ejemplo, en algunas modalidades, el polímero monodisperso (por ejemplo, polímero de HA

monodisperso) tiene un PDI de 1.001, alrededor de 1.0001, alrededor de 1.00001, alrededor de 1.000001, alrededor de 1.0000001, o menos. En algunas modalidades, el polímero monodisperso (por ejemplo, polímero de HA monodisperso) tiene un PDI de 1.0, alrededor de 1.001, alrededor de 1.002, alrededor de 1.003, alrededor de 1.004, alrededor de 1.005, alrededor de 1.006, alrededor de 1.007, alrededor de 1.008, alrededor de 1.009, alrededor de 1.01, alrededor de 1.011, alrededor de 1.012, alrededor de 1.013, alrededor de 1.014, alrededor de 1.015, alrededor de 1.016, alrededor de 1.017, alrededor de 1.018, alrededor de 1.019, alrededor de 1.02, alrededor de 1.021, alrededor de 1.022, alrededor de 1.023, alrededor de 1.024, alrededor de 1.025, alrededor de 1.026, alrededor de 1.027, alrededor de 1.028, alrededor de 1.029, alrededor de 1.03, alrededor de 1.031, alrededor de 1.032, alrededor de 1.033, alrededor de 1.034, alrededor de 1.035, alrededor de 1.036, alrededor de 1.037, alrededor de 1.038, alrededor de 1.039, alrededor de 1.04, alrededor de 1.041, alrededor de 1.042, alrededor de 1.043, alrededor de 1.044, alrededor de 1.045, alrededor de 1.046, alrededor de 1.047, alrededor de 1.048, alrededor de 1.049, alrededor de 1.05, alrededor de 1.051, alrededor de 1.052, alrededor de 1.053, alrededor de 1.054, alrededor de 1.055, alrededor de 1.056, alrededor de 1.057, alrededor de 1.058, alrededor de 1.059, alrededor de 1.06, alrededor de 1.061, alrededor de 1.062, alrededor de 1.063, alrededor de 1.064, alrededor de 1.065, alrededor de 1.066, alrededor de 1.067, alrededor de 1.068, alrededor de 1.069, alrededor de 1.07, alrededor de 1.071, alrededor de 1.072, alrededor de 1.073, alrededor de 1.074, alrededor de 1.075, alrededor de 1.076, alrededor de 1.077, alrededor de 1.078, alrededor de 1.079, alrededor de 1.08, alrededor de 1.081, alrededor de 1.082, alrededor de 1.083, alrededor de 1.084, alrededor de 1.085, alrededor de 1.086, alrededor de 1.087, alrededor de 1.088, alrededor de 1.089, alrededor de 1.09, alrededor de 1.091, alrededor de 1.092, alrededor de 1.093, alrededor de 1.094, alrededor de 1.095, alrededor de 1.096, alrededor de 1.097, alrededor de 1.098, alrededor de 1.099 o alrededor de 1.1. En algunas modalidades, el polímero (por ejemplo, polímero de HA) tiene un PDI de alrededor de 1.001.

El polímero monodisperso puede ser un polímero hidrofílico o un polímero hidrofóbico. Se entiende que un polímero hidrofílico puede ser un polímero soluble en agua. Se puede usar cualquier polímero hidrofílico adecuado, por ejemplo, un polímero hidrofílico descrito en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2011/066417 y/o Pelegri-O'Day et ál. *J. Am. Chem. Soc.* 136:14323-14332, 2014, los que se incorporan a la presente en su totalidad mediante esta referencia. Ejemplos no taxativos de polímeros hidrofílicos que se pueden usar incluyen ácido hialurónico (HA), polietilenglicol (PEG; también conocido como poli(etilenglicol)) (por ejemplo, PEG de cadena lineal, PEG ramificado, PEG dentado y PEG dendrítico), óxido de poli(etileno)-co-(óxido de metileno etileno), poli(poli(etilenglicol)metiléter metacrilato) (pPEGMA), agarosa, alginato, carragenanos, carboximetilcelulosa, celulosa, derivados de celulosa, quitosano, sulfato de

condroitina, colágeno, dermatán sulfato, dextrano, sulfato de dextrano, fibrina, fibrinógeno, fibronectina, fucoidan, gelatina, glicosaminoglicanos (GAG), un glicopolímero, heparina, sulfato de heparina, un polisacárido muy ramificado (por ejemplo, un dendrímero de galactosa), queratán sulfato, metil celulosa, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), poli(*N*-(2-hidroxipropil)metacrilamida) (pHPMA), pectinas, derivados de pectina, polisulfato de pentosán, almidón, almidón de hidroxietilo (HES), estireno, vitronectina, ácido poli(acrílico), ácido poli(metacrílico), poli(acrilamida), ácido poli(acrílico), poli(aminas), poli(aminoácidos), poli(carboxibetaína) (PCB), polielectrolitos, ácido poli(glutámico) (PGA), poli(glicerol) (PG) (por ejemplo, PG lineal, medio funcional, hiperramificado o lineal hiperramificado), ácido poli(maleico), poli(2-oxazolina) (POZ), poli(2-etil-2-oxazolina, ácido polisiálico (PSA), poliestireno, derivados de poliestireno (por ejemplo, derivados de poliestireno cargado), poli(estirenosulfonato-co-PEGMA), polivinilpirrolidona (PVP), poli(*N*-acrililmorfolina) (pNacM) y copolímeros de estos. En algunos casos, el polímero es un polímero hidrofóbico, por ejemplo, ácido poli(lactic-co-glicólico) (PLGA), polilactida (PLA) y poliglicolida (PGA). El polímero puede ser biodegradable y/o biocompatible. En modalidades particulares, el polímero es HA.

A modo de ejemplo, el polímero monodisperso (por ejemplo, polímero de HA) puede incluir cualquier cantidad adecuada de monómeros, por ejemplo, entre 2 y alrededor de 1×10^4 monómeros (por ejemplo, alrededor de 10, alrededor de 50, alrededor de 100, alrededor de 200, alrededor de 300, alrededor de 400, alrededor de 500, alrededor de 600, alrededor de 700, alrededor de 800, alrededor de 900, alrededor de 1000, alrededor de 2000, alrededor de 3000, alrededor de 4000, alrededor de 5000, alrededor de 6000, alrededor de 7000, alrededor de 8000, alrededor de 9000 o alrededor de 1×10^4 monómeros) o más. Por ejemplo, el polímero (por ejemplo, polímero de HA) puede incluir entre alrededor de 50 y alrededor de 250 monómeros, alrededor de 50 y alrededor de 500 monómeros, entre alrededor de 50 y alrededor de 1000 monómeros, entre alrededor de 50 y alrededor de 2000 monómeros, entre alrededor de 50 y alrededor de 3000 monómeros, entre alrededor de 50 y alrededor de 4000 monómeros, entre alrededor de 50 y alrededor de 5000 monómeros, entre alrededor de 50 y alrededor de 6000 monómeros, entre alrededor de 50 y alrededor de 7000 monómeros, entre alrededor de 50 y alrededor de 8000 monómeros, entre alrededor de 50 y alrededor de 9000 monómeros, entre alrededor de 50 y alrededor de 10000 monómeros, entre alrededor de 100 y alrededor de 250 monómeros, alrededor de 100 y alrededor de 500 monómeros, entre alrededor de 100 y alrededor de 1000 monómeros, entre alrededor de 100 y alrededor de 2000 monómeros, entre alrededor de 100 y alrededor de 3000 monómeros, entre alrededor de 100 y alrededor de 4000 monómeros, entre alrededor de 100 y alrededor de 5000 monómeros, entre alrededor de 100 y alrededor de 6000 monómeros, entre alrededor de 100 y alrededor de 7000 monómeros, entre alrededor de 100 y alrededor de 8000 monómeros, entre alrededor de 100 y alrededor de 9000 monómeros, entre alrededor de 100 y

alrededor de 10000 monómeros, entre alrededor de 250 y alrededor de 500 monómeros, entre
 alrededor de 250 y alrededor de 1000 monómeros, entre alrededor de 250 y alrededor de 2000
 monómeros, entre alrededor de 250 y alrededor de 3000 monómeros, entre alrededor de 250 y
 alrededor de 4000 monómeros, entre alrededor de 250 y alrededor de 5000 monómeros, entre
 5 alrededor de 250 y alrededor de 6000 monómeros, entre alrededor de 250 y alrededor de 7000
 monómeros, entre alrededor de 250 y alrededor de 8000 monómeros, entre alrededor de 250 y
 alrededor de 9000 monómeros, entre alrededor de 250 y alrededor de 10000 monómeros. entre
 alrededor de 500 y alrededor de 1000 monómeros, entre alrededor de 500 y alrededor de 2000
 monómeros, entre alrededor de 500 y alrededor de 3000 monómeros, entre alrededor de 500 y
 10 alrededor de 4000 monómeros, entre alrededor de 500 y alrededor de 5000 monómeros, entre
 alrededor de 500 y alrededor de 6000 monómeros, entre alrededor de 500 y alrededor de 7000
 monómeros, entre alrededor de 500 y alrededor de 8000 monómeros, entre alrededor de 500 y
 alrededor de 9000 monómeros o entre alrededor de 500 y alrededor de 10000 monómeros. En
 algunos casos, el polímero (por ejemplo, polímero de HA) puede incluir alrededor de 500
 15 monómeros.

La invención provee un conjugado de anticuerpo que incluye un anticuerpo (por ejemplo, un
 anticuerpo anti-VEGF tal como G6.31 AARR) unido de forma covalente a un polímero de HA
 monodisperso. Algunas veces se hace referencia en la presente a dichos conjugados de
 anticuerpo como «conjugados de HA monodispersos». El polímero de HA monodisperso puede
 20 tener un índice de polidispersión (PDI) de alrededor de 1.1 o menos. Por ejemplo, en algunas
 modalidades, el polímero de HA monodisperso tiene un PDI de entre 1.0 y alrededor de 1.1 (por
 ejemplo, entre 1 y alrededor de 1.1, entre 1 y alrededor de 1.09, entre 1 y alrededor de 1.08, entre
 1 y alrededor de 1.07, entre 1 y alrededor de 1.06, entre 1 y alrededor de 1.05, entre 1 y alrededor
 de 1.04, entre 1 y alrededor de 1.03, entre 1 y alrededor de 1.02, entre 1 y alrededor de 1.01, entre
 25 1 y alrededor de 1.005, entre alrededor de 1.001 y alrededor de 1.1, entre alrededor de 1.001 y
 alrededor de 1.1, entre alrededor de 1.001 y alrededor de 1.09, entre alrededor de 1.001 y
 alrededor de 1.08, entre alrededor de 1.001 y alrededor de 1.07, entre alrededor de 1.001 y
 alrededor de 1.06, entre alrededor de 1.001 y alrededor de 1.05, entre alrededor de 1.001 y
 alrededor de 1.04, entre alrededor de 1.001 y alrededor de 1.03, entre alrededor de 1.001 y
 30 alrededor de 1.02, entre alrededor de 1.001 y alrededor de 1.01, entre alrededor de 1.001 y
 alrededor de 1.005, entre alrededor de 1.001 y alrededor de 1.004, entre alrededor de 1.001 y
 alrededor de 1.003, entre alrededor de 1.001 y alrededor de 1.002, entre alrededor de 1.0001 y
 alrededor de 1.1, entre alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.09, entre alrededor de 1.0001 y
 alrededor de 1.08, entre alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.07, entre alrededor de 1.0001 y
 35 alrededor de 1.06, entre alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.05, entre alrededor de 1.0001 y

alrededor de 1.04, entre alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.03, entre alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.02, entre alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.01, entre alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.005, entre alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.004, entre alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.003, entre alrededor de 1.0001 y alrededor de 1.002 o entre alrededor de 1.0001 y
5 alrededor de 1.005).

Por ejemplo, en algunas modalidades, el polímero de HA monodisperso tiene un PDI de 1.001, alrededor de 1.0001, alrededor de 1.00001, alrededor de 1.000001, alrededor de 1.0000001, o menos. En algunas modalidades, el polímero de HA monodisperso tiene un PDI de 1.0, alrededor de 1.001, alrededor de 1.002, alrededor de 1.003, alrededor de 1.004, alrededor de 1.005,
10 alrededor de 1.006, alrededor de 1.007, alrededor de 1.008, alrededor de 1.009, alrededor de 1.01, alrededor de 1.011, alrededor de 1.012, alrededor de 1.013, alrededor de 1.014, alrededor de 1.015, alrededor de 1.016, alrededor de 1.017, alrededor de 1.018, alrededor de 1.019, alrededor de 1.02, alrededor de 1.021, alrededor de 1.022, alrededor de 1.023, alrededor de 1.024, alrededor de 1.025, alrededor de 1.026, alrededor de 1.027, alrededor de 1.028, alrededor de 1.029,
15 alrededor de 1.03, alrededor de 1.031, alrededor de 1.032, alrededor de 1.033, alrededor de 1.034, alrededor de 1.035, alrededor de 1.036, alrededor de 1.037, alrededor de 1.038, alrededor de 1.039, alrededor de 1.04, alrededor de 1.041, alrededor de 1.042, alrededor de 1.043, alrededor de 1.044, alrededor de 1.045, alrededor de 1.046, alrededor de 1.047, alrededor de 1.048, alrededor de 1.049, alrededor de 1.05, alrededor de 1.051, alrededor de 1.052, alrededor de 1.053, alrededor de 1.054, alrededor de 1.055, alrededor de 1.056, alrededor de 1.057, alrededor de 1.058, alrededor de 1.059, alrededor de 1.06, alrededor de 1.061, alrededor de 1.062, alrededor de 1.063, alrededor de 1.064, alrededor de 1.065, alrededor de 1.066, alrededor de 1.067, alrededor de 1.068, alrededor de 1.069, alrededor de 1.07, alrededor de 1.071, alrededor de 1.072, alrededor de 1.073, alrededor de 1.074, alrededor de 1.075, alrededor de 1.076, alrededor de 1.077, alrededor de 1.078, alrededor de 1.079, alrededor de 1.08, alrededor de 1.081, alrededor de 1.082, alrededor de 1.083, alrededor de 1.084, alrededor de 1.085, alrededor de 1.086, alrededor de 1.087, alrededor de 1.088, alrededor de 1.089, alrededor de 1.09, alrededor de 1.091, alrededor de 1.092, alrededor de 1.093, alrededor de 1.094, alrededor de 1.095, alrededor de 1.096, alrededor de 1.097, alrededor de 1.098, alrededor de 1.099 o alrededor de 1.1. En algunas modalidades, el
30 polímero de HA monodisperso tiene un PDI de alrededor de 1.001.

En algunos casos, el polímero de HA monodisperso tiene un peso molecular de alrededor de 2.5 megadalton (MDa) o menos (por ejemplo, alrededor de 2.5 MDa o menos, alrededor de 2.4 MDa o menos, alrededor de 2.3 MDa o menos, alrededor de 2.2 MDa o menos, alrededor de 2.1 MDa o menos, alrededor de 2.0 MDa o menos, alrededor de 1.9 MDa o menos, alrededor de 1.8 MDa o
35 menos, alrededor de 1.7 MDa o menos, alrededor de 1.6 MDa o menos, alrededor de 1.5 MDa o

menos, alrededor de 1.4 MDa o menos, alrededor de 1.3 MDa o menos, alrededor de 1.2 MDa o
 menos, alrededor de 1.1 MDa o menos, alrededor de 1.0 MDa o menos, alrededor de 900 kDa o
 menos, alrededor de 800 kDa o menos, alrededor de 700 kDa o menos, alrededor de 600 kDa o
 menos, alrededor de 500 kDa o menos, alrededor de 400 kDa o menos, alrededor de 300 kDa o
 5 menos, alrededor de 200 kDa o menos o alrededor de 100 kDa o menos). En algunos casos, el
 polímero de HA tiene un peso molecular de alrededor de 1 MDa o menos (por ejemplo, alrededor
 de 1.0 MDa o menos, alrededor de 900 kDa o menos, alrededor de 800 kDa o menos, alrededor de
 700 kDa o menos, alrededor de 600 kDa o menos, alrededor de 500 kDa o menos, alrededor de
 400 kDa o menos, alrededor de 300 kDa o menos, alrededor de 200 kDa o menos, o alrededor de
 10 100 kDa o menos). En algunos casos, el polímero de HA tiene un peso molecular de entre
 alrededor de 25 kDa y alrededor de 2.5 MDa (por ejemplo, entre alrededor de 25 kDa y alrededor
 de 2.5 mDa, entre alrededor de 25 kDa y alrededor de 2 MDa, entre alrededor de 25 kDa y
 alrededor de 1.5 MDa, entre alrededor de 25 kDa y alrededor de 1 MDa, entre alrededor de 25 kDa
 y alrededor de 900 kDa, entre alrededor de 25 kDa y alrededor de 800 kDa, entre alrededor de 25
 15 kDa y alrededor de 700 kDa, entre alrededor de 25 kDa y alrededor de 600 kDa, entre alrededor de
 25 kDa y alrededor de 500 kDa, entre alrededor de 100 kDa y alrededor de 2.5 mDa, entre
 alrededor de 100 kDa y alrededor de 2 MDa, entre alrededor de 100 kDa y alrededor de 1.5 MDa,
 entre alrededor de 100 kDa y alrededor de 1 MDa, entre alrededor de 100 kDa y alrededor de 900
 kDa, entre alrededor de 100 kDa y alrededor de 800 kDa, entre alrededor de 100 kDa y alrededor
 20 de 700 kDa, entre alrededor de 100 kDa y alrededor de 600 kDa, entre alrededor de 100 kDa y
 alrededor de 500 kDa, entre alrededor de 250 kDa y alrededor de 2.5 MDa, entre alrededor de 250
 kDa y alrededor de 2 MDa, entre alrededor de 250 kDa y alrededor de 1.5 MDa, entre alrededor de
 250 kDa y alrededor de 1 MDa, entre alrededor de 250 kDa y alrededor de 900 kDa, entre
 25 alrededor de 250 kDa y alrededor de 800 kDa, entre alrededor de 250 kDa y alrededor de 700 kDa,
 entre alrededor de 250 kDa y alrededor de 600 kDa, entre alrededor de 250 kDa y alrededor de
 500 kDa, entre alrededor de 500 kDa y alrededor de 2.5 MDa, entre alrededor de 500 kDa y
 alrededor de 2 MDa, entre alrededor de 500 kDa y alrededor de 1.5 MDa, entre alrededor de 500
 kDa y alrededor de 1 MDa, entre alrededor de 500 kDa y alrededor de 900 kDa, entre alrededor de
 500 kDa y alrededor de 800 kDa, entre alrededor de 500 kDa y alrededor de 700 kDa, entre
 30 alrededor de 500 kDa y alrededor de 600 kDa, entre alrededor de 1 MDa y alrededor de 2.5 MDa,
 entre alrededor de 1 MDa y alrededor de 2 MDa, entre alrededor de 1 MDa y alrededor de 1.5
 MDa, entre alrededor de 1 MDa y alrededor de 1.25 MDa, entre alrededor de 1.25 MDa y alrededor
 de 2.5 MDa, entre alrededor de 1.25 MDa y alrededor de 2 MDa, entre alrededor de 1.25 MDa y
 alrededor de 1.5 MDa, entre alrededor de 1.5 MDa y alrededor de 2.5 MDa, entre alrededor de 1.5
 35 MDa y alrededor de 2 MDa, entre alrededor de 1.5 MDa y alrededor de 1.75 MDa, o entre 1.75

MDa y alrededor de 2.5 MDa).

En algunos casos, el polímero de HA monodisperso tiene un peso molecular de entre alrededor de 25 kDa y alrededor de 500 kDa (por ejemplo, entre alrededor de 25 kDa y alrededor de 500 kDa, entre alrededor de 25 kDa y alrededor de 450 kDa, entre alrededor de 25 kDa y alrededor de 400 kDa, entre alrededor de 25 kDa y alrededor de 350 kDa, entre alrededor de 25 kDa y alrededor de 300 kDa, entre alrededor de 25 kDa y alrededor de 300 kDa, entre alrededor de 25 kDa y alrededor de 250 kDa, entre alrededor de 25 kDa y alrededor de 200 kDa, entre alrededor de 25 kDa y alrededor de 150 kDa, entre alrededor de 25 kDa y alrededor de 100 kDa, entre alrededor de 25 kDa y alrededor de 50 kDa, entre alrededor de 40 kDa y alrededor de 500 kDa, entre alrededor de 40 kDa y alrededor de 450 kDa, entre alrededor de 40 kDa y alrededor de 400 kDa, entre alrededor de 40 kDa y alrededor de 350 kDa, entre alrededor de 40 kDa y alrededor de 300 kDa, entre alrededor de 40 kDa y alrededor de 300 kDa, entre alrededor de 40 kDa y alrededor de 250 kDa, entre alrededor de 40 kDa y alrededor de 200 kDa, entre alrededor de 40 kDa y alrededor de 150 kDa, entre alrededor de 40 kDa y alrededor de 100 kDa, entre alrededor de 40 kDa y alrededor de 50 kDa, entre alrededor de 50 kDa y alrededor de 500 kDa, entre alrededor de 50 kDa y alrededor de 450 kDa, entre alrededor de 50 kDa y alrededor de 400 kDa, entre alrededor de 50 kDa y alrededor de 350 kDa, entre alrededor de 50 kDa y alrededor de 300 kDa, entre alrededor de 50 kDa y alrededor de 250 kDa, entre alrededor de 50 kDa y alrededor de 200 kDa, entre alrededor de 50 kDa y alrededor de 150 kDa, entre alrededor de 50 kDa y alrededor de 100 kDa, entre alrededor de 50 kDa y alrededor de 75 kDa, entre alrededor de 100 kDa y alrededor de 500 kDa, entre alrededor de 100 kDa y alrededor de 450 kDa, entre alrededor de 100 kDa y alrededor de 400 kDa, entre alrededor de 100 kDa y alrededor de 350 kDa, entre alrededor de 100 kDa y alrededor de 300 kDa, entre alrededor de 100 kDa y alrededor de 250 kDa, entre alrededor de 100 kDa y alrededor de 200 kDa, entre alrededor de 100 kDa y alrededor de 150 kDa, entre alrededor de 150 kDa y alrededor de 500 kDa, entre alrededor de 150 kDa y alrededor de 450 kDa, entre alrededor de 150 kDa y alrededor de 400 kDa, entre alrededor de 150 kDa y alrededor de 350 kDa, entre alrededor de 150 kDa y alrededor de 300 kDa, entre alrededor de 150 kDa y alrededor de 250 kDa, entre alrededor de 150 kDa y alrededor de 200 kDa, entre alrededor de 175 kDa y alrededor de 500 kDa, entre alrededor de 175 kDa y alrededor de 450 kDa, entre alrededor de 175 kDa y alrededor de 400 kDa, entre alrededor de 175 kDa y alrededor de 350 kDa, entre alrededor de 175 kDa y alrededor de 300 kDa, entre alrededor de 175 kDa y alrededor de 300 kDa, entre 175 200 kDa y alrededor de 250 kDa, entre alrededor de 175 kDa y alrededor de 225 kDa, entre alrededor de 200 kDa y alrededor de 500 kDa, entre alrededor de 200 kDa y alrededor de 450 kDa, entre alrededor de 200 kDa y alrededor de

400 kDa, entre alrededor de 200 kDa y alrededor de 350 kDa, entre alrededor de 200 kDa y alrededor de 300 kDa, entre alrededor de 200 kDa y alrededor de 300 kDa, entre alrededor de 200 kDa y alrededor de 250 kDa o entre alrededor de 200 kDa y alrededor de 225 kDa).

En algunos casos, el polímero de HA monodisperso tiene un peso molecular entre alrededor de 100 kDa y alrededor de 250 kDa (por ejemplo, alrededor de 100 kDa, alrededor de 110 kDa, alrededor de 120 kDa, alrededor de 130 kDa, alrededor de 140 kDa, alrededor de 150 kDa, alrededor de 160 kDa, alrededor de 170 kDa, alrededor de 180 kDa, alrededor de 190 kDa, alrededor de 200 kDa, alrededor de 210 kDa, alrededor de 220 kDa, alrededor de 230 kDa, alrededor de 240 kDa o alrededor de 250 kDa). En casos particulares, el polímero de HA tiene un peso molecular de alrededor de 200 kDa.

Cualquiera de los pesos moleculares precedentes puede ser un peso molecular promedio en peso (también conocido como masa molar promedio en peso).

En algunos casos, cualquiera de los polímeros de HA monodispersos precedentes son lineales, es decir, no reticulados.

En otros casos, la invención provee un conjugado de anticuerpo que incluye un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF tal como G6.31 AARR) unido de forma covalente a un polímero de PEG monodisperso. Algunas veces se hace referencia en la presente a dichos conjugados de anticuerpo como «conjugados de PEG». Se puede utilizar cualquier polímero de PEG monodisperso adecuado. Se entiende que los polímeros de PEG monodispersos pueden tener valores de PDI diferentes en comparación con los polímeros de HA monodispersos. Por ejemplo, los polímeros de PEG comercialmente disponibles pueden tener un PDI inferior a 1.1; por lo tanto, un polímero de PEG monodisperso se definiría mediante un rango diferente de valores de PDI en comparación con un polímero de HA monodisperso. Por ejemplo, un polímero de PEG monodisperso puede tener un PDI de alrededor de 1 a alrededor de 1.02 (por ejemplo, un PDI de 1, alrededor de 1.001, alrededor de 1.002, alrededor de 1.003, alrededor de 1.004, alrededor de 1.005, alrededor de 1.006, alrededor de 1.007, alrededor de 1.008, alrededor de 1.009, alrededor de 1.01, alrededor de 1.011, alrededor de 1.012, alrededor de 1.013, alrededor de 1.014, alrededor de 1.015, alrededor de 1.016, alrededor de 1.017, alrededor de 1.018, alrededor de 1.019 o alrededor de 1.02). El PEG puede ser un PEG ramificado, un PEG estrellado o un PEG dentado. El polímero de PEG puede ser, por ejemplo, un PEG tetrámero, un PEG hexámero o un PEG octámero. En algunos casos, el conjugado de anticuerpo incluye un anticuerpo anti-VEGF (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF descrito en la presente, tal como G6.31 AARR) unido de forma covalente a un dendrímero de PEG. Los polímeros de PEG se encuentran comercialmente disponibles, por ejemplo, en JenKem Technology, Quanta BioDesign, NOF America Corporation y otros proveedores.

En algunos casos, el polímero de PEG monodisperso tiene un peso molecular de entre alrededor de 1 kDa y alrededor de 500 kDa (por ejemplo, entre alrededor de 1 kDa y alrededor de 500 kDa, entre alrededor de 1 kDa y alrededor de 450 kDa, entre alrededor de 1 kDa y alrededor de 400 kDa, entre alrededor de 1 kDa y alrededor de 350 kDa, entre alrededor de 1 kDa y alrededor de 300 kDa, entre alrededor de 1 kDa y alrededor de 250 kDa, entre alrededor de 1 kDa y alrededor de 200 kDa, entre alrededor de 1 kDa y alrededor de 150 kDa, entre alrededor de 1 kDa y alrededor de 100 kDa, entre alrededor de 1 kDa y alrededor de 50 kDa, entre alrededor de 10 kDa y alrededor de 500 kDa, entre alrededor de 10 kDa y alrededor de 450 kDa, entre alrededor de 10 kDa y alrededor de 400 kDa, entre alrededor de 10 kDa y alrededor de 350 kDa, entre alrededor de 10 kDa y alrededor de 300 kDa, entre alrededor de 10 kDa y alrededor de 250 kDa, entre alrededor de 10 kDa y alrededor de 200 kDa, entre alrededor de 10 kDa y alrededor de 150 kDa, entre alrededor de 10 kDa y alrededor de 100 kDa, entre alrededor de 10 kDa y alrededor de 50 kDa, entre alrededor de 20 kDa y alrededor de 500 kDa, entre alrededor de 20 kDa y alrededor de 450 kDa, entre alrededor de 20 kDa y alrededor de 400 kDa, entre alrededor de 20 kDa y alrededor de 350 kDa, entre alrededor de 20 kDa y alrededor de 300 kDa, entre alrededor de 20 kDa y alrededor de 250 kDa, entre alrededor de 20 kDa y alrededor de 200 kDa, entre alrededor de 20 kDa y alrededor de 150 kDa, entre alrededor de 20 kDa y alrededor de 100 kDa, entre alrededor de 20 kDa y alrededor de 75 kDa, entre alrededor de 30 kDa y alrededor de 500 kDa, entre alrededor de 30 kDa y alrededor de 450 kDa, entre alrededor de 30 kDa y alrededor de 400 kDa, entre alrededor de 30 kDa y alrededor de 350 kDa, entre alrededor de 30 kDa y alrededor de 300 kDa, entre alrededor de 30 kDa y alrededor de 250 kDa, entre alrededor de 30 kDa y alrededor de 200 kDa, entre alrededor de 30 kDa y alrededor de 150 kDa, entre alrededor de 40 kDa y alrededor de 500 kDa, entre alrededor de 40 kDa y alrededor de 450 kDa, entre alrededor de 40 kDa y alrededor de 400 kDa, entre alrededor de 40 kDa y alrededor de 350 kDa, entre alrededor de 40 kDa y alrededor de 300 kDa, entre alrededor de 40 kDa y alrededor de 250 kDa, entre alrededor de 40 kDa y alrededor de 200 kDa, entre alrededor de 50 kDa y alrededor de 500 kDa, entre alrededor de 50 kDa y alrededor de 450 kDa, entre alrededor de 50 kDa y alrededor de 400 kDa, entre alrededor de 50 kDa y alrededor de 350 kDa, entre alrededor de 50 kDa y alrededor de 300 kDa, entre 50 200 kDa y alrededor de 250 kDa o entre alrededor de 50 kDa y alrededor de 225 kDa).

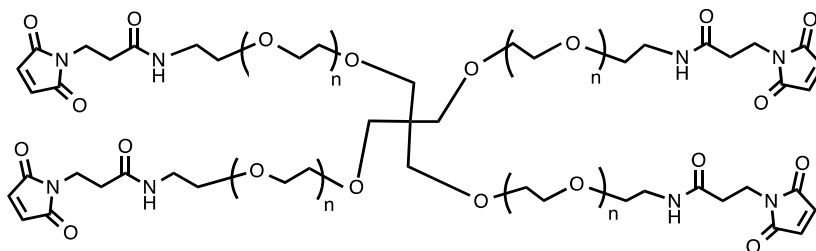
En algunos casos, el polímero PEG monodisperso tiene un peso molecular entre alrededor de 5 kDa y alrededor de 250 kDa (por ejemplo, alrededor de 1 kDa, alrededor de 5 kDa, alrededor de 10

kDa, alrededor de 15 kDa, alrededor de 20 kDa, alrededor de 25 kDa, alrededor de 30 kDa, alrededor de 35 kDa, alrededor de 40 kDa, alrededor de 50 kDa, alrededor de 60 kDa, alrededor de 70 kDa, alrededor de 80 kDa, alrededor de 90 kDa, 100 kDa, alrededor de 110 kDa, alrededor de 120 kDa, alrededor de 130 kDa, alrededor de 140 kDa, alrededor de 150 kDa, alrededor de 160 kDa, alrededor de 170 kDa, alrededor de 180 kDa, alrededor de 190 kDa, alrededor de 200 kDa, alrededor de 210 kDa, alrededor de 220 kDa, alrededor de 230 kDa, alrededor de 240 kDa o alrededor de 250 kDa). En casos particulares, el polímero de PEG tiene un peso molecular de alrededor de 20 kDa. En otros casos, el polímero de PEG tiene un peso molecular de alrededor de 40 kDa.

- 10 Cualquiera de los pesos moleculares precedentes puede ser un peso molecular promedio en peso (también conocido como masa molar promedio en peso).

En algunos casos, el polímero de PEG monodisperso es un tetrámero de PEG. Los tetrámeros de PEG se encuentran comercialmente disponibles, por ejemplo, en NOF America SUNBRIGHT® PTE-400MA, PTE-200MA, PTE-100MA y JenKem Technology EUA, maleimida de PEG de 4
15 brazos (Cat. n.º 4ARM-MAL). En algunos casos, el tetrámero de PEG tiene un núcleo de pentaeritritol. Por ejemplo, en algunos casos, el tetrámero de PEG incluye una estructura de fórmula (I), en la que n es de forma independiente cualquier número entero adecuado:

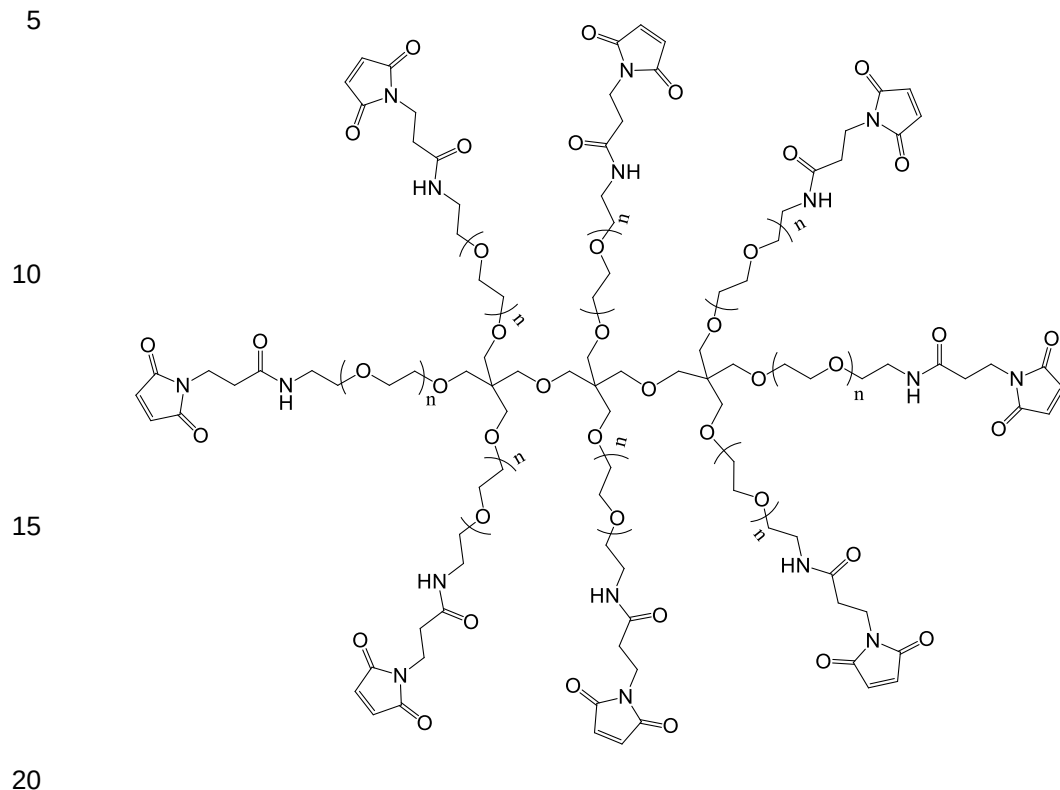
Fórmula I:



En otro ejemplo, en algunos casos, el polímero de PEG monodisperso es un hexámero de PEG. Los hexámeros de PEG se encuentran comercialmente disponibles, por ejemplo, en JenKem
30 Technology EUA, amina de PEG de 6 brazos (Cat. n.º 6ARM(DP)-NH₂HCl) o hexámeros de PEG de Quanta BioDesign. En algunos casos, el hexámero de PEG incluye un núcleo de dipentileritritol. En algunos casos, el polímero de PEG monodisperso es un octámero de PEG. Los octámeros de PEG se encuentran comercialmente disponibles, por ejemplo, en NOF America SUNBRIGHT® serie HGEO o JenKem Technology EUA, maleimida de PEG de 8 brazos (Cat. n.º 8ARM(TP)-
35 MAL). En algunos casos, el octámero de PEG puede incluir un núcleo de tripentaeritritol. Por

ejemplo, en algunos casos, el octámero de PEG incluye una estructura de fórmula (II), en la que n es de forma independiente cualquier número entero adecuado:

Fórmula II:



En aun otro ejemplo, en algunos casos, el octámero de PEG incluye un núcleo de tripentaeritritol.

Se entiende que se puede utilizar cualquier enfoque de conjugación adecuado, el que incluye aquellos descritos en la presente y otros conocidos en la técnica, para conjugar un anticuerpo anti-VEGF de la invención con un polímero monodisperso. Por ejemplo, el polímero monodisperso se puede conjugar con cualquier grupo funcional de proteína adecuado, lo que incluye un grupo amina primario, un grupo carboxilo, un grupo sulfhidrilo o un grupo carbonilo. Se puede utilizar cualquier grupo reactivo químico adecuado para seleccionar como diana el grupo funcional de proteína, por ejemplo, carbodiimida (por ejemplo, EDC), éster NHS, imidoéster, pentafluorofenil éster, hidroximetil fosfina, maleimida, haloacetilo (por ejemplo, bromoacetilo o yodoacetilo), piridildisulfuro, tiosulfonato, vinilsulfona, hidrazina, alcóxiamina, diazirina, aril azida, isocianato u otros conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 3.^a edición, 2013. En modalidades particulares, el HA (por ejemplo, HA monodisperso) se modifica con grupos maleimida (HA-maleimida) y, en segundo lugar, un anticuerpo que incluye un tiol libre en una

cisteína (por ejemplo, Fab-C o una variante de cisteína (por ejemplo, un THIOMAB™ o TioFab)) se hace reaccionar con HA-maleimida para formar los conjugados HA-Fab covalentes, por ejemplo, tal como se describe en el Ejemplo 1.

Cualquiera de los conjugados de anticuerpo precedentes puede tener un radio hidrodinámico de entre alrededor de 5 nm y alrededor de 200 nm (por ejemplo, alrededor de 5 nm, alrededor de 10 nm, alrededor de 20 nm, alrededor de 30 nm, alrededor de 40 nm, alrededor de 50 nm, alrededor de 60 nm, alrededor de 70 nm, alrededor de 80 nm, alrededor de 90 nm, alrededor de 100 nm, alrededor de 110 nm, alrededor de 120 nm, alrededor de 130 nm, alrededor de 140 nm, alrededor de 150 nm, alrededor de 160 nm, alrededor de 170 nm, alrededor de 180 nm, alrededor de 190 nm o alrededor de 200 nm). En algunos casos, el conjugado de anticuerpo tiene un radio hidrodinámico de entre alrededor de 5 nm y alrededor de 150 nm (por ejemplo, alrededor de 5 nm, alrededor de 10 nm, alrededor de 20 nm, alrededor de 30 nm, alrededor de 40 nm, alrededor de 50 nm, alrededor de 60 nm, alrededor de 70 nm, alrededor de 80 nm, alrededor de 90 nm, alrededor de 100 nm, alrededor de 110 nm, alrededor de 120 nm, alrededor de 130 nm, alrededor de 140 nm o alrededor de 150 nm). En algunos casos, el conjugado de anticuerpo tiene un radio hidrodinámico de entre alrededor de 5 nm y alrededor de 100 nm (por ejemplo, alrededor de 5 nm, alrededor de 10 nm, alrededor de 20 nm, alrededor de 30 nm, alrededor de 40 nm, alrededor de 50 nm, alrededor de 60 nm, alrededor de 70 nm, alrededor de 80 nm, alrededor de 90 nm, alrededor de 100 nm). En algunos casos, el conjugado de anticuerpo tiene un radio hidrodinámico de entre alrededor de 5 nm y alrededor de 60 nm (por ejemplo, alrededor de 5 nm, alrededor de 10 nm, alrededor de 20 nm, alrededor de 30 nm, alrededor de 40 nm, alrededor de 50 nm, alrededor de 60 nm). En algunos casos, el conjugado de anticuerpo tiene un radio hidrodinámico de entre alrededor de 25 nm y alrededor de 35 nm (por ejemplo, alrededor de 25 nm, alrededor de 26 nm, alrededor de 27 nm, alrededor de 28 nm, alrededor de 29 nm, alrededor de 30 nm, alrededor de 31 nm, alrededor de 32 nm, alrededor de 33 nm, alrededor de 34 nm, alrededor de 35 nm). En algunos casos, el radio hidrodinámico es de alrededor de 28.

En algunos casos, el conjugado de anticuerpo tiene un radio hidrodinámico de entre alrededor de 10 nm y alrededor de 200 nm, entre alrededor de 10 nm y alrededor de 180 nm, entre alrededor de 10 nm y alrededor de 160 nm, entre alrededor de 10 nm y alrededor de 140 nm, entre alrededor de 10 nm y alrededor de 120 nm, entre alrededor de 10 nm y alrededor de 100 nm, entre alrededor de 10 nm y alrededor de 80 nm, entre alrededor de 10 nm y alrededor de 60 nm, entre alrededor de 10 nm y alrededor de 50 nm, entre alrededor de 10 nm y alrededor de 40 nm, entre alrededor de 10 nm y alrededor de 30 nm, entre alrededor de 20 nm y alrededor de 200 nm, entre alrededor de 20 nm y alrededor de 180 nm, entre alrededor de 20 nm y alrededor de 160 nm, entre alrededor de 20 nm y alrededor de 140 nm, entre alrededor de 20 nm y alrededor de 120 nm, entre alrededor de

20 nm y alrededor de 100 nm, entre alrededor de 20 nm y alrededor de 80 nm, entre alrededor de 20 nm y alrededor de 60 nm, entre alrededor de 20 nm y alrededor de 50 nm, entre alrededor de 20 nm y alrededor de 40 nm, entre alrededor de 20 nm y alrededor de 30 nm, entre alrededor de 30 nm y alrededor de 200 nm, entre alrededor de 30 nm y alrededor de 180 nm, entre alrededor de 30 nm y alrededor de 160 nm, entre alrededor de 30 nm y alrededor de 140 nm, entre alrededor de 30 nm y alrededor de 120 nm, entre alrededor de 30 nm y alrededor de 100 nm, entre alrededor de 30 nm y alrededor de 80 nm, entre alrededor de 30 nm y alrededor de 60 nm, entre alrededor de 30 nm y alrededor de 50 nm, entre alrededor de 30 nm y alrededor de 40 nm, entre alrededor de 40 nm y alrededor de 200 nm, entre alrededor de 40 nm y alrededor de 180 nm, entre alrededor de 40 nm y alrededor de 160 nm, entre alrededor de 40 nm y alrededor de 140 nm, entre alrededor de 40 nm y alrededor de 120 nm, entre alrededor de 40 nm y alrededor de 100 nm, entre alrededor de 40 nm y alrededor de 80 nm, entre alrededor de 40 nm y alrededor de 60 nm, entre alrededor de 40 nm y alrededor de 50 nm, entre alrededor de 50 nm y alrededor de 200 nm, entre alrededor de 50 nm y alrededor de 180 nm, entre alrededor de 50 nm y alrededor de 160 nm, entre alrededor de 50 nm y alrededor de 140 nm, entre alrededor de 50 nm y alrededor de 120 nm, entre alrededor de 50 nm y alrededor de 100 nm, entre alrededor de 50 nm y alrededor de 80 nm, entre alrededor de 50 nm y alrededor de 60 nm, entre alrededor de 60 nm y alrededor de 200 nm, entre alrededor de 60 nm y alrededor de 180 nm, entre alrededor de 60 nm y alrededor de 160 nm, entre alrededor de 60 nm y alrededor de 140 nm, entre alrededor de 60 nm y alrededor de 120 nm, entre alrededor de 60 nm y alrededor de 100 nm o entre alrededor de 60 nm y alrededor de 80 nm.

En cualquiera de los conjugados de anticuerpo precedentes, el anticuerpo puede ser un fragmento de anticuerpo que se une a VEGF, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo de un anticuerpo anti-VEGF descrito en la presente que se une a VEGF. En algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF es un anticuerpo anti-VEGF modificado con cisteína, tal como se describe en la presente (ver, por ejemplo, la sección 1(8)(d) anterior). En algunos casos, el fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en fragmentos Fab, Fab', Fab-C, Fab'-SH, Fv, scFv y (Fab')₂. En casos particulares, el fragmento de anticuerpo es un Fab, un Fab' o un Fab-C. En algunos casos, el fragmento de anticuerpo es un Fab-C.

Cualquiera de los conjugados de anticuerpo precedentes puede tener una semivida ocular que aumenta respecto a un anticuerpo de referencia que no se une de forma covalente al polímero (por ejemplo, el polímero hidrofílico). En algunos casos, la semivida ocular aumenta al menos alrededor de 2 veces (por ejemplo, alrededor de 2 veces, alrededor de 3 veces, alrededor de 4 veces, alrededor de 5 veces, alrededor de 6 veces, alrededor de 7 veces, alrededor de 8 veces, alrededor de 9 veces, alrededor de 10 veces, alrededor de 12 veces, alrededor de 14 veces, alrededor de 16 veces, alrededor de 18 veces, alrededor de 20 veces, o más) respecto al anticuerpo de referencia.

En algunos casos, la semivida ocular aumenta al menos alrededor de 4 veces respecto al anticuerpo de referencia. En algunos casos, la semivida ocular es una semivida vítrea. En algunos casos, el anticuerpo de referencia es idéntico al anticuerpo del conjugado de anticuerpo. En otros casos, el anticuerpo de referencia no es idéntico al anticuerpo del conjugado de anticuerpo.

- 5 Cualquiera de los conjugados de anticuerpo precedentes puede presentar una eliminación ocular que se reduce respecto a un anticuerpo de referencia que no se une de forma covalente al polímero (por ejemplo, el polímero hidrofílico). En algunos casos, la eliminación ocular se reduce al menos alrededor de 2 veces (por ejemplo, alrededor de 2 veces, alrededor de 3 veces, alrededor de 4 veces, alrededor de 5 veces, alrededor de 6 veces, alrededor de 7 veces, alrededor de 8
- 10 veces, alrededor de 9 veces, alrededor de 10 veces, alrededor de 12 veces, alrededor de 14 veces, alrededor de 16 veces, alrededor de 18 veces, alrededor de 20 veces, o más) respecto al anticuerpo de referencia. En algunos casos, la eliminación ocular se reduce al menos alrededor de 4 veces respecto al anticuerpo de referencia. En algunos casos, la eliminación es eliminación del humor vítreo. En algunos casos, el anticuerpo de referencia es idéntico al anticuerpo del conjugado
- 15 de anticuerpo. En otros casos, el anticuerpo de referencia no es idéntico al anticuerpo del conjugado de anticuerpo.

En algunos casos, el período de tiempo entre dos administraciones intraoculares (por ejemplo, mediante inyección intravítrea) de cualquiera de los conjugados de anticuerpo (por ejemplo, conjugados de HA) precedentes es de al menos 1 mes, por ejemplo, al menos 1 mes, al menos 5

20 semanas, al menos 6 semanas, al menos 7 semanas, al menos 8 semanas, al menos 9 semanas, al menos 10 semanas, al menos 11 semanas, al menos 12 semanas, al menos 13 semanas, al menos 14 semanas, al menos 15 semanas, al menos 16 semanas, al menos 20 semanas, al menos 24 semanas, al menos 28 semanas, al menos 32 semanas, al menos 36 semanas, al menos 40 semanas, al menos 44 semanas, al menos 48 semanas, al menos 52 semanas o más.

25 En algunos casos, el período máximo entre dos administraciones intraoculares es de no más de cuatro años, por ejemplo, no más de tres años, no más de dos años o no más de un año. El conjugado de anticuerpo se puede administrar, por ejemplo, cada dos a doce meses, por ejemplo, cada cuatro a diez meses. En algunos casos, el conjugado de anticuerpo se administra cada seis meses.

- 30 La invención también provee composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) que incluyen cualquiera de los conjugados de anticuerpos descritos anteriormente. En determinadas modalidades, la composición comprende uno o más compuestos adicionales. En determinadas modalidades, el compuesto adicional se une a una segunda molécula biológica seleccionada del grupo que consiste en IL-1 β ; IL-6; IL-6R; PDGF; angiopoyetina; angiopoyetina 2; Tie2; S1P;
- 35 integrinas $\alpha\beta$ 3, $\alpha\beta$ 5 y α 5 β 1; betacelulina; apelina/APJ; eritropoyetina; factor de complemento D;

TNF α ; HtrA1; un receptor de VEGF; receptor de ST-2 y proteínas genéticamente vinculadas al riesgo de degeneración macular asociada a la edad (AMD), tal como componentes de la vía de complemento C2, factor B, factor H, CFHR3, C3b, C5, C5a y C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; interleucina 8 (IL-8); CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC; COL10A1 y TNFRSF10A. En determinadas modalidades, el compuesto adicional es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este. Por ejemplo, en algunos casos, el compuesto adicional es un anticuerpo biespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-Ang2, tal como RG-7716 o cualquier anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-Ang2 descrito en WO 2010/069532 o WO 2016/073157 o una variante de estos. En otro ejemplo, en algunos casos, el compuesto adicional es un anticuerpo anti-IL-6, por ejemplo, EBI-031 (Eleven Biotherapeutics; ver, por ejemplo, WO 2016/073890), siltuximab (SYLVANT®), olokizumab, clazakizumab, sirukumab, elsilimomab, gerilimzumab, OPR-003, MEDI-5117, PF-04236921 o una variante de estos. En aun otro ejemplo, en algunos casos, el compuesto adicional es un anticuerpo anti-IL-6R, por ejemplo, tocilizumab (ACTEMRA®) (ver, por ejemplo, WO 1992/019579), sarilumab, vobarilizumab (ALX-0061), SA-237, o una variante de estos.

La invención también provee composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) que incluyen cualquiera de los conjugados de anticuerpos descritos anteriormente y un antagonista de VEGF adicional.

2. Dispositivos

Cualquiera de los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos anti-VEGF modificados con cisteína) o conjugados de anticuerpo (por ejemplo, conjugados de HA monodisperso) descritos en la presente se pueden administrar al ojo con un dispositivo de administración en puertos. Un dispositivo de administración en puertos es un dispositivo implantable que se puede volver a rellenar y que libera un agente terapéutico (por ejemplo, un conjugado de anticuerpo anti-VEGF) en un período de meses (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más meses). Los ejemplos de dispositivos de administración en puertos que se pueden utilizar incluyen aquellos de ForSight Labs, LLC y/o ForSight VISION4, por ejemplo, tal como se describió en las publicaciones de solicitudes de patente internacionales n.º WO 2010/088548, WO2015/085234, WO 2013/116061, WO 2012/019176, WO 2013/040247 y WO 2012/019047, las que se incorporan a la presente en su totalidad mediante esta referencia.

Por ejemplo, la invención provee dispositivos de administración en puertos que incluyen depósitos que contienen cualesquiera de los anticuerpos o conjugados de anticuerpo descritos en la presente. El dispositivo de administración en puertos puede además incluir una región proximal, un cuerpo tubular acoplado a la región proximal en comunicación fluida con el depósito, y una o más

salidas en comunicación fluida con el depósito y configuradas para liberar la composición en el ojo. El cuerpo tubular puede tener un diámetro externo configurado para insertarse a través de una incisión o abertura en el ojo de alrededor de 0.5 mm o más pequeñas. El dispositivo puede ser de alrededor de 1 mm a alrededor de 15 mm de longitud (por ejemplo, alrededor de 1 mm, alrededor de 2 mm, alrededor de 4 mm, alrededor de 5 mm, alrededor de 6 mm, alrededor de 7 mm, alrededor de 9 mm, alrededor de 11 mm, alrededor de 13 mm o alrededor de 15 mm de longitud). El depósito puede tener cualquier volumen adecuado. En algunos casos, el depósito tiene un volumen de alrededor de 1 μ l a alrededor de 100 μ l (por ejemplo, alrededor de 1 μ l, alrededor de 5 μ l, alrededor de 10 μ l, alrededor de 20 μ l, alrededor de 50 μ l, alrededor de 75 μ l o alrededor de 100 μ l). El dispositivo o sus partes constituyentes pueden estar hechos de cualquier material adecuado, por ejemplo, poliimida.

En algunos casos, el dispositivo de administración en puertos incluye un depósito que contiene cualesquiera de los anticuerpos o conjugados de anticuerpo descritos en la presente y uno o más compuestos adicionales. En determinadas modalidades, el compuesto adicional se une a una segunda molécula biológica seleccionada del grupo que consiste en IL-1 β ; IL-6; IL-6R; PDGF; angiopoyetina; angiopoyetina 2; Tie2; S1P; integrinas α v β 3, α v β 5 y α 5 β 1; betacelulina; apelina/APJ; eritropoyetina; factor de complemento D; TNF α ; HtrA1; un receptor de VEGF; receptor de ST-2 y proteínas genéticamente vinculadas al riesgo de AMD, tal como componentes de la vía de complemento C2, factor B, factor H, CFHR3, C3b, C5, C5a y C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; IL-8; CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC; COL10A1 y TNFRSF10A. En determinadas modalidades, el compuesto adicional es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este. Por ejemplo, en algunos casos, el compuesto adicional es un anticuerpo biespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-Ang2, tal como RG-7716 o cualquier anticuerpo biespecífico anti-VEGF/anti-Ang2 descrito en WO 2010/069532 o WO 2016/073157 o una variante de estos. En otro ejemplo, en algunos casos, el compuesto adicional es un anticuerpo anti-IL-6, por ejemplo, EBI-031 (Eleven Biotherapeutics; ver, por ejemplo, WO 2016/073890), siltuximab (SYLVANT®), olokizumab, clazakizumab, sirukumab, elsilimomab, gerilimzumab, OPR-003, MEDI-5117, PF-04236921 o una variante de estos. En aun otro ejemplo, en algunos casos, el compuesto adicional es un anticuerpo anti-IL-6R, por ejemplo, tocilizumab (ACTEMRA®) (ver, por ejemplo, WO 1992/019579), sarilumab, vobarilizumab (ALX-0061), SA-237, o una variante de estos.

En algunos casos, el dispositivo de administración en puertos incluye cualesquiera de los anticuerpos o conjugados de anticuerpo descritos en la presente y un antagonista de VEGF adicional.

III. EJEMPLOS

A continuación se presentan ejemplos de métodos y composiciones de la invención. Debe entenderse que pueden llevarse a la práctica otras modalidades diferentes, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

Ejemplo 1: Conjugados de anticuerpo de ácido hialurónico (HA) lineal preparados a partir de

5 HA monodisperso para la estabilidad mejorada

La conjugación de los Fab con el ácido hialurónico (HA) del biopolímero puede mejorar significativamente el tiempo de retención del Fab en el ojo, por ejemplo, al enlentecer la difusión del Fab y, por lo tanto, la eliminación del humor vítreo. Se ha empleado el proceso de dos etapas para la producción del conjugado HA-Fab: en primer lugar, se modifica el HA comercial con grupos maleimida (HA-maleimida) y, en segundo lugar, se hace reaccionar Fab-C (Fab con un tiol libre en cisteína) con HA-maleimida para formar conjugados HA-Fab covalentes.

Cuando se produce mediante medios típicos, los conjugados HA-proteína pueden tener dos componentes de variabilidad ortogonales. La primera fuente de variabilidad es la polidispersión que aporta la polidispersión de la estructura principal de HA (Figura 1A). La segunda fuente es heterogeneidad, la que aportan las diferencias en cantidad de moléculas de Fab unidas a una cadena de HA dada. Esta segunda fuente de variabilidad es dictada por la naturaleza estocástica de la modificación de maleimida de las cadenas de HA en la primera etapa del proceso de conjugación de HA. La Figura 1B ilustra los resultados de una simulación de Monte Carlo en la que cada grupo ácido de una cadena de HA de 200 kDa tuvo 5% de posibilidad de hacerse reaccionar con un enlazador que contiene maleimida, repetido en 1000 cadenas de HA independientes. Los resultados sugieren que, aunque la cantidad promedio de maleimidias por cadena de HA en la simulación fue el valor esperado de 24.7, el rango absoluto fue de 11 a 42.

Puede ser deseable para mantener la estabilidad física y coloidal de los conjugados de anticuerpo (por ejemplo, conjugados de anticuerpo que incluyen HA lineal y el anticuerpo anti-VEGF, G6.31 AARR, a los que se hace referencia en la presente como conjugados de anticuerpo HA-G6.31.AARR) en fase acuosa y en humor vítreo. Con base en parte en las simulaciones descritas anteriormente, se considera que el peso molecular de la estructura principal de HA y el nivel de carga de Fab podrían ser parámetros importantes para la estabilidad física. El nivel de carga de Fab hace referencia a la cantidad promedio de moléculas de anticuerpo (por ejemplo, G6.31.AARR) unidas a cada cadena de HA y se expresa en términos del porcentaje de grupos ácidos en la estructura principal de HA que se modifican de forma covalente con un resto Fab (cada unidad de repetición de HA contiene un grupo ácido modificable en el sacárido de ácido glucurónico). Si bien otros parámetros pueden contribuir a la estabilidad del conjugado (por ejemplo, propiedades específicas del Fab que incluyen carga neta, distribución de carga

superficial, hidrofobicidad), en general no se pueden controlar en los confines de esta molécula específica.

A efectos de evaluar el impacto de HA MW y el nivel de carga de Fab en la estabilidad física de HA-G6.31.AARR, se prepararon los conjugados con tres MW de partida de HA diferentes (aproximadamente 40 kDa, 200 kDa y 600 kDa) y niveles de carga de Fab variables, se sometieron a tensión en condiciones fisiológicas y se monitorearon para determinar la estabilidad física en el transcurso de varios meses con el fin de imitar la exposición biológica.

(A) Materiales y métodos

(i) Materiales

En este estudio se utilizó hialuronato de sodio (HA, Lifecore Biomedical, Chaska, MN) de tres pesos moleculares diferentes- En la Tabla 4 se resumen sus propiedades, tal como se analizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño en línea con el índice de refracción y los detectores de dispersión de luz de múltiples ángulos (SEC-RI-MALS). Mn indica el peso molecular promedio en cantidad; Mw indica el peso molecular promedio en peso; PDI indica el índice de polidispersión y R_H indica el radio hidrodinámico. La Tabla 5 ilustra datos para Mn, Mw y PDI de varias muestras de HA polidisperso en comparación con una muestra monodispersa, tal como se determina mediante SEC-RI-MALS. Los datos de las Tablas 4 y 5 son de dos lotes diferentes de HA-200K que tenían polidispersión diferente.

Tabla 4: Propiedades de HA utilizado en este estudio

Nombre de etiqueta	Mn, kDa	Mw, kDa	PDI	R_H , nm
40K	28.8	45.5	1.581	8.7
200K	143.4	204.3	1.424	23.7
600K	481.6	619.8	1.287	35.6

Tabla 5: Propiedades de muestras de HA polidisperso en comparación con una muestra monodispersa

Muestra	Mn (kDa)	Mw (kDa)	PDI (Mw/Mn)
HA10K	13.7	19.6	1.43
HA20K	21.0	32.9	1.57
HA40K	28.7	44.7	1.56
HA100K	66.0	107	1.62

HA200K	116	204	1.76
HA350K	206	314	1.53
HA700K	473	657	1.39
HA150K monodisperso	137.2	137.3	1.001

(ii) *Síntesis de HA funcionalizado con maleimida (HA-mal)*

El HA se modificó con grupos maleimida mediante el uso de una reacción acuosa con el reactivo de acoplamiento, cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolino (DMTMM), y el enlazador, sal trifluoroacetato de N-(2-aminoetil)maleimida (AEM). El HA se disolvió en ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) 100 mM (pH 5.5) a 2.5 mg/mL y a esta solución se agregó DMTMM y AEM en agitación. Las cantidades de DMTMM y AEM agregadas variaron y se seleccionaron para dirigirse a niveles diferentes de funcionalización de maleimida que varía de 2 a 10 %. La reacción se calentó hasta 70 °C durante 2 horas.

Se removió AEM y DMTMM en exceso de la reacción mediante el procedimiento de desalinización. Se montó una columna de desalinización HIPREP™ 26/10 en un sistema de purificación ÄKTA™ (GE Life Sciences) y se equilibró con acetato de sodio 10 mM (pH 4.0) y NaCl 150 mM. La reacción se inyectó pura en la columna y se recogió el pico de HA-mal conforme a la absorbancia a 302 nm y se concentró a más de 5 mg/mL mediante el uso de dispositivos de ultrafiltración centrífuga. La concentración de maleimida en la solución madre de HA-mal se midió según la absorbancia a 302 nm con un espectrofotómetro visible por UV, y se evaluó la relación molar de grupos maleimida por cadena de HA a través de la cromatografía de exclusión por tamaño con dispersión de luz de múltiples ángulos (SEC-MALS).

(iii) *Conjugación de Fab-C con HA-mal*

El pH de una solución de Fab-C se ajustó hasta 6.5 con fosfato 1 M (pH 6.5) hasta una concentración de fosfato final de 50 mM y se agregó ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) a una concentración final de 2.5 mM. Se agitó la solución de Fab-C y se agregó HA-mal a esta diluida en una solución amortiguadora de reacción que consiste en fosfato 10 mM (pH 6.5), NaCl 150 mM y EDTA 2.5 mM. La estequiometría se fijó en 1.2 moles de Fab-C por mol de maleimida en la reacción final, y el volumen se fijó para obtener una concentración de proteínas final de 1 mg/mL. La reacción de conjugación se llevó a cabo a temperatura ambiente en agitación. A las tres horas se agregó mercaptoetanol a 2 moles por mol de maleimida para formar casquetes en grupos maleimida sin reaccionar. Luego de 30 minutos, la reacción se diluyó hasta menos de NaCl 50 mM

con fosfato 10 mM (pH 6.5).

La purificación se llevó a cabo con cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para separar Fab-C y dímero de Fab del conjugado. Se equilibró una columna HILOAD® 26/600 SUPERDEX® de 200 µg (GE Healthcare) con HisHCl 10 mM (pH 5.5), NaCl 150 mM y la reacción se inyectó pura. Se eluyeron los picos asociados al conjugado, dímero de Fab y monómero de Fab por separado y se recogió el pico del conjugado.

(iv) Análisis de conjugados HA-Fab mediante SEC-RI-MALS

Se analizó el contenido de Fab libre residual, la masa molar de conjugado total y la fracción de masa de proteínas mediante SEC-RI-MALS-QELS (una combinación de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), índice de refracción (RI) dispersión de luz de múltiples ángulos (MALS), y dispersión de luz cuasielástica (QELS)) en una HPLC Agilent 1200 con un detector de índice de refracción (RI) Wyatt OPTILAB® T-rEX™ y un detector en línea de dispersión de luz de múltiples ángulos (MALS) Wyatt HELEOS™-II. En el caso de SEC, se corrieron dos columnas en serie: ACCLAIM™ 7.8x150 mm tamaño de poro 1000 Å seguido de ACCLAIM™ 7.8x150 mm tamaño de poro 300 Å con solución salina amortiguadora por fosfato (PBS) (pH 7.4) como solución amortiguadora de corrida. Se utilizó un control de albúmina de suero bovino (BSA) para normalizar los detectores de MALS y corregir el ancho de banda entre detectores. Se midió el contenido de Fab libre mediante la integración de los picos UV A₂₈₀ correspondientes a Fab y el conjugado HA-Fab. Se tomó la masa molar del conjugado como el peso molecular promedio en peso (M_w) del pico del conjugado. Se calculó la fracción de masa de proteínas con un análisis de conjugado de proteínas mediante el índice de refracción diferencial (dRI) y señales UV A₂₈₀.

(v) Tensión fisiológica del conjugado HA-G6.31.AARR y análisis

Se intercambiaron los conjugados purificados mediante solución amortiguadora con PBS y se agregaron con azida de sodio 2 mM y polisorbato 20 (PBSTN) al 0.01 %. Las concentraciones finales fueron de aproximadamente 5 mg/mL sobre una base de Fab. Las muestras se sellaron y se incubaron a 37 °C. Esta condición sirve como sustituto del humor vítreo (imita el pH, temperatura y resistencia iónica del humor vítreo). La concentración de 5 mg/mL representa una concentración «estresante» para evaluar la propensión a precipitación en el humor vítreo (dosis de 2 mg en 4 mL de humor vítreo humano es equivalente a 0.5 mg/mL de Fab). En momentos temporales específicos, se retiraron las muestras, se diluyeron hasta 1 mg/mL en HisHCl 10 mM (pH 5.5) con polisorbato 20 al 0.01 % y trehalosa al 10 % (p/v), y se analizaron para determinar la concentración de proteína soluble (A₂₈₀), turbiedad (A₄₅₀), tiempo de retención de SEC y peso molecular (M_n y M_w mediante SEC-RI-MALS tal como anteriormente).

(B) Resultados

(i) Caracterización de materiales

La Tabla 6 enumera los resultados de caracterización de SEC-RI-MALS de los nueve conjugados utilizados en este estudio. Los conjugados difieren tanto en MW de la estructura principal de HA (40 kDa, 200 kDa o 600 kDa) y el nivel de carga de Fab. Se determinan los nombres de las muestras como MW de la estructura principal de HA (kDa) seguido del nivel de carga de Fab (%).

Tabla 6: Resultados de caracterización de SEC-RI-MALS de los materiales de partida de HA-G6.31.AARR

Nombre de la muestra	Mn, kDa	Mw, kDa	Carga de Fab %
40K 2.8 %	146	178.7	2.78
40K 2.9%	149.4	182.4	2.85
40K 4.7%	191.2	272.4	4.65
40K 6.3%	305.9	354.8	6.31
200K 1.3%	442.6	518.7	1.28
200K 2.5%	664.3	813.1	2.45
200K 4.7%	1106.2	1362.5	4.66
200K 6.2%	1297.4	1739.3	6.17
600K 2.1%	1730.6	2141.3	2.06

La polidispersión de los conjugados HA-G6.31.AARR se evaluó de forma experimental mediante SEC-RI-MALS (Figura 1C). El índice de polidispersión fue 1.58, 1.78 y 1.41 para los conjugados HA40K, HA200K y HA600K, respectivamente.

(ii) Estabilidad del conjugado bajo tensión fisiológica

En condiciones de tensión fisiológica, algunos conjugados HA-G6.31.AARR exhibieron cambios físicos significativos en incubación extendida en PBSTN. Este cambio se evidencia más claramente por cambios en el peso molecular promedio (Mw, peso molecular promedio en peso) en función del tiempo, tal como se ilustra en la Figura 2. Si bien algunas muestras no cambiaron en Mw durante el período de estudio de 12 semanas, aquellas que sí cambiaron exhibieron una reducción de Mw en función del tiempo. La medida en que se reduce el Mw dependió tanto del peso molecular de la estructura principal de HA como del nivel de carga de Fab. En general, se observó que la precipitación ocurrió en muestras donde el peso molecular de HA y la carga de Fab eran más elevados.

Con el fin de comprender este cambio en Mw, se llevó a cabo el análisis de los perfiles de retención de SEC del conjugado HA-G6.31.AARR incubado. Los tiempos de retención de SEC

cambiaron a tiempos posteriores tras la incubación extendida, lo que indica que la población de conjugado promedio se hizo más pequeña de forma progresiva en función del tiempo (Figura 3). Debido a que el tiempo de retención de SEC se define únicamente por el peso molecular de la estructura principal de HA (y no por la carga de Fab), esta observación indicó que: (a) la totalidad de la población de moléculas de conjugado se hacía más pequeña en función del tiempo o (b) una subpoblación de peso molecular más elevado se estaba precipitando fuera de la solución, lo que resultó en un cambio aparente a conjugados más pequeños. Estos datos también se resumen en la Tabla 7, en la que se ilustran las diferencias entre tiempo de retención al inicio del estudio (T0) y en la semana 12.

Tabla 7: Tiempos de retención de SEC de las muestras de estabilidad de HA-G6.31.AARR al inicio del estudio y en la semana 12, luego de su exposición a condiciones fisiológicas

Muestra	Tiempo de retención, T0, min	Tiempo de retención, semana 12, min	Diferencia, min
40K 2.8%	13.272	13.267	-0.005
40K 2.9%	13.364	13.272	-0.092
40K 4.7%	13.125	13.349	0.224
40K 6.3%	13.292	13.569	0.277
200K 1.3%	11.986	11.848	-0.138
200K 2.5%	12.052	12.787	0.735
200K 4.7%	12.31	12.448	0.138
200K 6.2%	11.986	12.502	0.516
600K 2.1%	10.692	13.627	2.935

Estos cambios medidos por SEC y MALS se complementaron con observaciones visuales de que las muestras con peso molecular de la estructura principal de HA más elevado y carga de Fab más elevada contenían precipitados visibles en momentos temporales posteriores. Esta observación respalda la última explicación para el cambio observado en los perfiles de retención de SEC, es decir, que las subpoblaciones de HA de peso molecular más elevado se precipitaban y llevaban a un cambio en la población promedio restante en la solución.

Esta hipótesis también es respaldada por un nuevo análisis de los datos de SEC-RI-MALS que examina la distribución de los conjugados HA-G6.31.AARR respecto al peso molecular, tal como se ilustra en la Figura 4. En el caso de la muestra de estructura principal de HA de 40K (panel izquierdo), la distribución global de las moléculas de conjugado respecto al peso molecular no

cambió de forma evidente tras prolongar la exposición a condiciones fisiológicas. En el caso de la muestra de estructura principal de HA de 600K (panel derecho), hubo un cambio continuo de todas las fracciones de la población a pesos moleculares más pequeños, lo que indica que una amplia población de moléculas de conjugado se precipitó fuera de la solución. En el caso de la muestra de estructura principal de HA de 200K (panel central), el cambio en las fracciones de población ocurrió principalmente en las moléculas de conjugado de peso molecular más elevado. Esto indica que en la muestra de estructura principal de HA de 200K hubo una población mixta de moléculas de conjugado relativamente estables e inestables. Conforme al transcurso del tiempo, las moléculas de conjugado con peso molecular más elevado (subpoblación relativamente inestable) se precipitaron fuera de la solución, de manera que en la solución solo queda la subpoblación relativamente estable.

(iii) Conjugados de HA monodisperso

Con base en el entendimiento de que en la población de HA200K-G6.31.AARR polidisperso, solo las subpoblaciones con MW más elevado conducen la inestabilidad física y la precipitación, se plantea la hipótesis de que el cambio de una estructura principal de HA polidisperso a una estructura principal de HA monodisperso podría resultar en un conjugado de anticuerpo más estable.

El HA comercialmente disponible estándar se produce mediante un proceso de múltiples etapas en el que: (a) HA se sintetiza mediante la fermentación bacteriana que resulta en HA de MW muy elevado (Mw 1-4 MDa), (b) el HA se purifica a partir del cultivo celular y (c) HA se degrada químicamente de forma controlada, lo que resulta en una escisión de moléculas de HA aleatoria. Esta etapa final del proceso es fundamental para la producción de HA de menor peso molecular que de otro modo no sería posible solo mediante fermentación. Sin embargo, el proceso de degradación por escisión aleatoria también resulta en una distribución amplia (es decir, polidispersa) de pesos moleculares de HA.

El HA también se puede sintetizar a escala comercial a través de un proceso quimioenzimático sincronizado (ver Jing et ál. *J. Biol. Chem.* 279:42345-42349, 2004; Jing et ál. *Anal. Biochem.* 355:183-188, 2006; y la patente estadounidense n.º 8 088 604, los que se incorporan a la presente en su totalidad mediante esta referencia). En este proceso, se agrega una enzima hialuronano sintasa purificada a una mezcla de oligosacáridos de HA pequeños (normalmente, el tetrámero de HA, HA₄) y los sacáridos de uridina difosfato (UDP), UDP-ácido glucurónico y UDP-N-acetilglucosamina. La enzima de hialuronano sintasa extiende los fragmentos de oligosacáridos mediante el uso de azúcares disponibles de forma alternante, lo que resulta en la polimerización sincronizada de HA. El peso molecular del polímero de HA resultante se puede controlar con la relación de sustrato de HA (por ejemplo, HA₄) respecto a azúcares en la reacción de partida. El

resultado de este proceso son los polímeros de HA muy monodisperso.

Con fines comparativos, las caracterizaciones de SEC-RI-MALS de HA comercial polidisperso y monodisperso de tamaños similares se compararon en la Figura 5. Cabe destacar la diferencia en el índice de polidispersión, el que fue de 1.779 para HA200K polidisperso y 1.001 para HA150K monodisperso. Se considera que este nivel de polidispersión más bajo para HA monodisperso provee varias ventajas claves desde el punto de vista de los conjugados HA-proteína: (a) caracterización analítica más sencilla debido a que la eliminación de la polidispersión de HA deja diferencias en los niveles de carga de proteína como la única fuente de heterogeneidad en la muestra; (b) eliminación de estructuras principales de HA con peso molecular más bajo y más elevado en la población general, lo que puede eliminar la inestabilidad y precipitación observadas en las subpoblaciones de estructura principal de HA de peso molecular más elevado en conjugados HA-G6.31.AARR; y (c) posible reducción de la viscosidad del conjugado HA-anticuerpo formulado.

En el contexto del uso de materiales de partida de HA polidisperso y monodisperso para preparar los conjugados G6.31.AARR, se observó la misma diferencia en polidispersión: HA200K-G6.31.AARR polidisperso tenía un índice de polidispersión de 1.228, mientras que HA150K-G6.31.AARR monodisperso tenía un índice de polidispersión de 1.003 (Figura 6). Se espera que esta monodispersión mejore la estabilidad del conjugado HA-G6.31.AARR debido a la ausencia de subpoblación de peso molecular de la estructura principal de HA más elevado, lo que se supuso era la causa de la inestabilidad y precipitación observadas bajo tensión fisiológica de los conjugados HA-G6.31.AARR polidispersos.

Ejemplo 2: Sitios modificados con cisteína y carga de Fab optimizados para conjugados de HA y anticuerpo lineales

La conjugación covalente de anticuerpos monoclonales (mAb) o fragmentos de anticuerpo (Fab) con una estructura de polímero se puede llevar a cabo mediante una amplia variedad de ensayos químicos, que abarcan de química de amina (amidación directa mediante residuos lisina accesibles por solvente) a conjugaciones quimioenzimáticas mediante el uso de enzimas que reconocen el sustrato, tales como transglutaminasa. Recientemente, la composición química de la conjugación tiol-maleimida ha captado gran interés debido a que provee varias ventajas claves ante otros enfoques: (a) es selectiva del sitio, solo reacciona a residuos de cisteína accesibles al solvente reducidos, (b) es una reacción muy rápida, (c) los enlazadores que contienen maleimida se encuentran fácilmente disponibles y normalmente son fáciles de acceder de forma sintética, (d) normalmente, los residuos de cisteína se pueden incorporar fácilmente a una estructura de proteína, y (e) la conjugación tiol-maleimida se puede llevar a cabo cerca del pH neutro en condiciones acuosas.

Con el fin de producir un Fab que sea apto para la conjugación de maleimida, una estrategia es producir un Fab-C, en el que la secuencia de cadena pesada se extiende a través del péptido bisagra hasta la primera o segunda posición de disulfuro de cisteína bisagra y se trunca en dicho residuo de cisteína (Figura 7). En la práctica, este enfoque puede posiblemente introducir una

5 cantidad de complicaciones que afectan la conjugación con una estructura de polímero. La principal consecuencia de la proximidad espacial de este residuo de cisteína libre con el enlace disulfuro intercatenario es el apareamiento de tiol, en el que estos tres residuos de cisteína cercanos pueden formar tres configuraciones de disulfuro posibles. Las tres configuraciones de disulfuro posibles se ilustran gráficamente en las Figuras 8A-8C. En cada configuración, se reduce

10 un residuo de cisteína diferente, lo que hace de este el sitio de conjugación potencial con la estructura principal de polímero que contiene maleimida. La consecuencia de esto es la heterogeneidad en el sitio de unión entre el Fab y la estructura principal de HA, lo que puede tener consecuencias desde el punto de vista de la calidad del producto, la estabilidad de Fab o la seguridad del material conjugado.

15 Se plantea la hipótesis de que la relocalización del residuo de cisteína libre de la secuencia bisagra espacialmente proximal y flexible a una locación de superficie más lejana en el Fab podría reducir o eliminar estas variables de conjugación. Este enfoque es de naturaleza similar al utilizado por los anticuerpos monoclonales modificados con cisteína THIOMAB™, en los que los residuos superficiales se mutan a cisteínas para su conjugación posterior. En el formato Fab, los Fab que

20 contienen cisteínas con mutación superficial se denominan «TioFabs».

Los conjugados de proteína y polímero producidos con la química de tiol-maleimida también pueden padecer la desconjugación de la proteína de la estructura principal del polímero mediante una reacción de adición de Michael inversa. Esto puede resultar en la liberación lenta de proteína libre de la estructura principal del polímero de forma dependiente del pH y la temperatura. Este

25 comportamiento también es influenciado por el entorno químico local alrededor del residuo de cisteína y la estructura del enlazador que contiene maleimida (por ejemplo, la presencia de aminos o grupos aceptores de electrones). Con base en los descubrimientos sobre la susceptibilidad a la reacción de Michael inversa de diferentes ubicaciones de cisteína en el desarrollo de THIOMAB™ (ver Shen et ál. *Nat. Biotechnol.* 30:184-189, 2012), también se predice que desplazar la cisteína

30 libre del péptido bisagra a una ubicación superficial reduciría la tasa de liberación de Fab libre de una estructura principal de polímero por la reacción de Michael inversa. Asimismo se investigó la tasa de desconjugación de la reacción de Michael inversa de un modelo de polímero polietilenglicol (PEG)-maleimida en moléculas de formato Fab-C y ThioFab en condiciones fisiológicas.

(A) Materiales y métodos

(i) Materiales

Se adquirió la enzima Lys-C de Promega (n.º de catálogo V1671, Madison, WI), la enzima hialuronidasa (PH20 humana recombinante, a la que también se hace referencia como HAasa) se adquirió de Halozyme (San Diego, CA), *N*-etilmaleimida (NEM) se adquirió de Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Se adquirió metoxi polietilenglicol maleimida definido (d-mPEG4-Mal, Parte n.º 10 745) de Quanta Biodesign (Plain City, OH).

(ii) Digestión de Lys-C limitada de G6.31.AARR.Fab-C

Se llevó a cabo una digestión de Lys-C limitada en muestras de G6.31.AARR.Fab-C. En comparación con una digestión más tradicional de una proteína de Lys-C, la digestión de Lys-C «limitada» se lleva a cabo con una cantidad reducida de enzima Lys-C y en condiciones no desnaturalizantes. Esto resulta en una digestión selectiva de la parte de péptido bisagra de la molécula de G6.31.AARR.Fab-C (KTHTC (SEQ ID NO: 61)), la que se escinde luego del residuo de lisina. Se analizaron cuatro muestras de G6.31.AARR.Fab-C con diferentes condiciones: (a) +NEM, digestión, (b) +NEM +digestión, (c) -NEM, +digestión y (d) -NEM, -digestión.

Para cada muestra, a 500 µg de Fab-C en 500 µL de histidina-acetato 10 mM + cloruro de sodio 150 mM (pH 5.5) se agregaron 50 µl de Tris 1M + NEM 10 mM (pH 7.5); se omitió NEM para las muestras -NEM. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 37 °C para la formación de casquetes de cualquier tiol libre. Luego, se agregó la enzima Lys-C a las muestras +Lys-C a una relación de masa de 1:500 Lys-C:Fab-C. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. Luego de la digestión, las muestras se congelaron para inactivar la reacción y se analizaron mediante RP-UPLC-TOF.

(iii) Digestión de Lys-C limitada de HA200K-G6.31.AARR

Se agregaron 50 µL de Tris 1M (pH 7.5) a 500 µg (con base en proteínas) de HA200K-G6.31.AARR en 500 µL de histidina-acetato 10 mM + solución amortiguadora de cloruro de sodio 150 mM (pH 5.5). Se agregó la enzima Lys-C a una relación de masa de 1:500 Lys-C:Fab-C. Las muestras se incubaron durante la noche a 37 °C. Luego de la digestión, las muestras se congelaron para inactivar la reacción y se analizaron mediante RP-UPLC-TOF.

(iv) Digestión de hialuronidasa de HA200K-G6.31.AARR

Se diluyeron 500 µg (con base en proteínas) de HA200K-G6.31.AARR en 500 µL de histidina-acetato 10 mM + cloruro de sodio 150 mM (pH 5.5). Se agregó HAasa a 10 unidades (U) por 1 µg de HA en el conjugado. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 4 horas. Luego de la digestión, las muestras se congelaron para inactivar la reacción y se analizaron mediante RP-UPLC-TOF.

(v) Desconjugación mediada por la reacción de Michael inversa de conjugados G6.31.AARR-PEG de modelo

Se intercambiaron G6.31.AARR.Fab-C, G6.31.AARR.A140C, G6.31.AARR.L174C y

G6.31.AARR.K149C mediante solución amortiguadora en fosfato 10 mM (pH 6.5), NaCl 150 mM, EDTA 2.5 mM a entre 0.2 y 0.5 mg/mL y se agregó d-mPEG4-Mal en un exceso molar de 20 veces. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas seguida de purificación mediante desalinización sobre columnas PD-10 (GE Healthcare, Pittsburgh, PA) en PBS (pH 7.4).

- 5 Luego, los conjugados se concentraron en 1 mg/mL mediante ultrafiltración centrífuga y se agregó glutatona oxidada (GSSG) a una concentración final de 2 mM. Las construcciones se incubaron a 37 °C y las muestras se retiraron regularmente para su análisis mediante RP-UPLC-TOF.

(vi) Espectrometría de masas (MS) en analizador de tiempo de vuelo de cromatografía líquida de ultra rendimiento de fase inversa (RP-UPLC-TOF)

- 10 Se obtuvieron masas intactas de muestras mediante análisis de cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC/MS) con un espectrómetro de masas en analizador de tiempo de vuelo (TOF) e ionización por electrospray (ESI) Agilent 6230 en línea con un sistema de cromatografía líquida de ultrarrendimiento (UPLC) Agilent 1290. Se inyectaron aproximadamente 2.5 µg de proteína por muestra y se desalinizaron mediante cromatografía líquida de
15 ultrarrendimiento de fase inversa (RP-UPLC) para el análisis de MS online directo. Los espectros resultantes se desconvolucionaron hasta el estado de carga cero mediante el software MassHunter workstation/Qualitative Analysis (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA).

(B) Resultados

(i) Estado de disulfuro en G6.31.AARR.Fab-C

- 20 A efectos de confirmar si los tres estados de disulfuro ilustrados en las Figuras 8A-8C existen en G6.31.AARR.Fab-C y se mantienen en un equilibrio termodinámico dinámico, se llevaron a cabo una serie de experimentos con formación de casquetes de maleimida con NEM y digestiones de Lys-C limitadas para sondear tanto el estado instantáneo de los tres residuos de cisteína como su capacidad para reordenarse de forma dinámica.
- 25 En el primer experimento, G6.31.AARR.Fab-C se cerró con NEM (se congela el estado de disulfuro debido a la eliminación de cualquiera de los tioles libres) y luego se sometió a una digestión de Lys-C limitada, de forma de escindir la secuencia de péptido bisagra de cadena pesada antes que el residuo de cisteína libre pretendido (Figura 9, segundo cromatograma). Tras el análisis desnaturalizante de RP-UPLC-TOF, se observaron las especies asociadas a los tres
30 estados de disulfuro presentados en las Figuras 8A-8C: (a) Fab intacto menos péptido bisagra (asociado a la Figura 8A); (b) cadena ligera más NEM y cadena pesada ciclada (asociada a la Figura 8B); y (c) cadena ligera más péptido bisagra y cadena pesada menos péptido bisagra más NEM (asociado a la Figura 8C). Este experimento demuestra concretamente que G6.31.AARR.Fab-C no existe en un estado homogéneo pero contiene tres especies distintas con
35 diferentes configuraciones de disulfuro y, en consecuencia, residuos de cisteína reactivos.

En el segundo experimento, se sometió G6.31.AARR.Fab-C a una digestión de Lys-C limitada sin formación de casquetes de NEM, de forma de dejar a las cisteínas la posibilidad de reordenarse dinámicamente (Figura 9, tercer cromatograma). En este experimento, casi toda la proteína analizada mediante RP-UPLC-TOF se encontró en el mismo estado: Fab menos péptido bisagra.

5 Dados los descubrimientos del primer experimento, este segundo conjunto de datos indica que las tres cisteínas libres se reordenaron de forma dinámica y en una escala de tiempo relativamente rápida (duración del experimento, 30 minutos). Luego de la escisión del péptido bisagra por Lys-C, los tres estados de disulfuro posibles «se aparearon» con los tres residuos de cisteína de forma dinámica. En algún punto en el tiempo, se forma el disulfuro intercatenario correcto, se deja que la
10 secuencia de péptido bisagra se libere en la solución dado que previamente lo escindió Lys-C. El resultado es que la muestra se conduce al disulfuro intercatenario completo formado correctamente mediante este proceso de reordenamiento.

Estos dos experimentos confirmaron que G6.31.AARR.Fab-C puede existir en tres estados distintos respecto a tres residuos de cisteína proximales y que sus abundancias relativas se
15 definen mediante un equilibrio termodinámico dinámico. Este último descubrimiento es importante porque indica que ninguna etapa de reprocesamiento podría eliminar completamente las dos configuraciones de disulfuro incorrectas, ya que dado cualquier período de tiempo corto, las tres cisteínas se volverían a aparear para formar las tres variantes observadas en el primer experimento.

20 (ii) Variables de conjugación en conjugados de HA-G6.31.AARR.Fab-C

Si bien estas tres variantes de disulfuro existen en G6.31.AARR.Fab-C, faltaba demostrar que también existen como variantes en conjugados de HA-G6.31.AARR. Para elucidar la ubicación exacta de la conjugación de moléculas de G6.31.AARR.Fab-C individuales con HA-maleimida, se
25 utilizaron dos procedimientos de digestión enzimáticos. El primero, una digestión de Lys-C limitada, escindió G6.31.AARR en el péptido bisagra antes que el pretendido residuo de cisteína libre de cadena pesada. En moléculas de G6.31.AARR conjugadas de forma correcta, este tratamiento debería liberar G6.31.AARR libre intacta en la solución. Sin embargo, el análisis de muestras digeridas mediante la desnaturalización de RP-UPLC-TOF identificó una especie
30 adicional en la solución: cadena ligera libre más péptido bisagra escindido (Figura 10A). La presencia de esta especie confirmó que una población de G6.31.AARR.Fab-C se conjugó con HA mediante la cisteína de cadena pesada normalmente ocupada con el disulfuro intercatenario, presuntamente originada de la variante de disulfuro ilustrada en la Figura 8C.

El segundo procedimiento de digestión enzimática mantuvo todas las conjugaciones intactas, pero
35 digirió exhaustivamente la estructura principal de HA con hialuronidasa (HAasa). Esto permitió no

solo el análisis de moléculas libres en solución, sino también proteínas conjugadas con oligosacáridos de HA pequeños unidos de forma covalente. Este método permitió la observación directa de las especies conjugadas a un nivel individual. En este experimento, se observaron las moléculas de G6.31.AARR conjugadas de forma correcta con HA mediante la cisteína terminal de cadena pesada pretendida. Sin embargo, también se descubrió evidencia directa de la conjugación a través de la variante de disulfuro ilustrada en la Figura 8B. Esto se sostuvo con dos observaciones: (a) la presencia de moléculas de cadena pesada ciclada libres en solución; y (b) la presencia de oligosacáridos de HA con enlazador de maleimida unido de forma covalente además de cadena ligera (Figura 10B). La presencia de estas especies confirmó que una población de G6.31.AARR.Fab-C se conjugó con HA mediante la cisteína de cadena ligera normalmente ocupada con el disulfuro intercatenario, presuntamente originada de la variante de disulfuro ilustrada en la Figura 8B.

Estos dos experimentos de digestión confirmaron que el reordenamiento de disulfuro lleva a variaciones en el sitio de unión entre G6.31.AARR.Fab-C y HA-maleimida. Se espera que esta observación aplique a cualquier estructura principal de polímero que contiene maleimida utilizada para la conjugación y cualquier Fab-C que contiene esta configuración de tres residuos de cisteína cercanos.

(iii) Diseño de un Fab que contiene cisteína libre para más conjugación homogénea

Los datos descritos anteriormente muestran que existen tres variantes de conjugación cuando se une una molécula de Fab-C a una estructura principal de polímero que contiene maleimida. Esta heterogeneidad de la conjugación es provocada por la existencia de tres configuraciones de disulfuro distintas en equilibrio termodinámico, de forma que cada configuración deja un residuo de cisteína diferente disponible para afectar la conjugación. El hecho de que estas tres configuraciones de disulfuro sean posibles puede deberse a varios factores que incluyen la proximidad del residuo de cisteína bisagra libre pretendido con el disulfuro intercatenario y la flexibilidad de la secuencia de péptido bisagra a la que se une la cisteína libre.

A efectos de evitar que la cisteína libre se aparee con el disulfuro intercatenario, se concibió mover la cisteína libre más allá del disulfuro intercatenario. Por lo tanto, se truncó la secuencia bisagra como típica para una molécula de formato Fab estándar y residuos de superficie de mutación del Fab a los residuos de cisteína. Se eligieron estos sitios de manera que estuvieran lo suficientemente lejos de las HVR como para no afectar negativamente la unión al antígeno y lo suficientemente lejos del disulfuro intercatenario para evitar el apareamiento.

Para un estudio de análisis inicial, se eligieron tres ubicaciones con base en informes previos del desarrollo de THIOMAB™ para cumplir con estos criterios: LC-K149 (numeración de EU), HC-A140 (numeración de EU) y HC-L174 (numeración de EU). Cada sitio se mutó en un residuo de

cisteína y el péptido bisagra se interrumpió inmediatamente antes del primer disulfuro de cisteína bisagra (es decir, KTHT; SEQ ID NO: 87).

Para confirmar que estos sitios de cisteína seguían siendo reactivos a HA-maleimida, se llevaron a cabo conjugaciones piloto en condiciones típicas (fosfato 10 mM (pH 6.5), NaCl 150 mM y EDTA 2.5 mM) y se evaluaron los productos mediante SEC-RI-MALS luego de la incubación durante la noche. La conjugación procedió normalmente con generación de conjugados HA-G6.31.AARR en el tiempo de retención correcto en comparación con una reacción de conjugación G6.31.AARR.Fab-C de control (Figura 11). La única gran diferencia observada en las muestras de TioFab fue la conversión más baja de Fab en conjugado. Esto se deba posiblemente al pH relativamente bajo de la reacción de conjugación (pH 6.5), la que puede ser más adecuada para el pKa de la cisteína bisagra en comparación con la de los residuos TioFab de cisteína modificada. Se espera que aumentar el pH de la reacción de conjugación mejorará los rendimientos para las conjugaciones de TioFab.

(iv) Susceptibilidad a reacción de adición de Michael inversa de los formatos Fab-C y TioFab

Se conjugaron G6.31.AARR en formatos Fab-C y TioFab con construcciones de PEG-maleimida modelo y se incubaron en PBS a 37 °C con GSSG para actuar como una trampa de tiol libre (es decir, prevenir la reacción de adición de Michael inversa de tiol libre liberado con PEG-maleimida) seguido de análisis regulares mediante RP-UPLC-TOF. En las construcciones de Fab-C-PEG, se observó la desconjugación por reacción de Michael inversa significativa en los primeros siete días, lo que resultó en una pérdida de 9.8 % de conjugado intacto (Figura 12). Los conjugados de TioFab mostraron niveles variables de mejora en Fab-C con la variante A140C que muestra casi nada de desconjugación en 14 días, la variante L174C que muestra 5.9 % de desconjugación y la variante K149C que muestra 7.1 % de desconjugación en el mismo período de tiempo. Estos datos sugieren que las variantes de mutación de cisteína pueden ser protectoras contra la desconjugación de proteína mediada por la reacción de Michael inversa y pueden proveer una ventaja significativa ante el formato Fab-C en la retención de conjugados de proteína y polímero intactos.

Ejemplo 3: Ejemplos de anticuerpos anti-VEGF para su uso en los conjugados de anticuerpo de la invención

Cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF descritos en la presente se pueden usar para preparar conjugados de anticuerpo tal como se describe en los Ejemplos 1 y 2. Por ejemplo, se puede usar cualquier anticuerpo anti-VEGF descrito en la solicitud de patente internacional n.º PCT/US2016/053454. La Tabla 8 describe ejemplos de anticuerpos anti-VEGF que se pueden usar, así como también las secuencias de aminoácidos de los dominios VH y VL para cada anticuerpo. La Tabla 9 describe las secuencias de aminoácidos VL HVR para los anticuerpos anti-

VEGF descritos en la Tabla 8. La Tabla 10 describe las secuencias de aminoácidos VH HVR para los anticuerpos anti-VEGF descritos en la Tabla 8. En modalidades particulares, se usa el anticuerpo anti-VEGF G6.31 AARR (al que también se hace referencia en la presente como «G6.31.AARR»).

5 **Tabla 8: Secuencias de aminoácidos VH y VL para los ejemplos de anticuerpos anti-VEGF**

	Nombre del anticuerpo	Variante VH (SEQ ID NO)	Variante VL (SEQ ID NO)
	G6.31 WT	G6.31 WT (SEQ ID NO: 42)	G6.31 WT (SEQ ID NO: 38)
	LC-N94A	G6.31 WT (SEQ ID NO: 42)	N94A (SEQ ID NO: 41)
10	LC-N94A.LC-F83A	G6.31 WT (SEQ ID NO: 42)	N94A.F83A (SEQ ID NO: 12)
	LC-N94A.LC-F83A. HC-A40E.HC-T57E (G6.31 AAEE)	A40E.T57E (SEQ ID NO: 40)	N94A.F83A (SEQ ID NO: 12)
15	N94A.F83A.N82aR.Y58R (G6.31 AARR)	N82aR.Y58R (SEQ ID NO:11)	N94A.F83A (SEQ ID NO: 12)
	HCcombo	HCcombo (SEQ ID NO: 33)	G6.31 WT (SEQ ID NO: 38)
	HCLC2	HCcombo (SEQ ID NO: 33)	LCcombo2 (SEQ ID NO: 35)
	HCLC4	HCcombo (SEQ ID NO: 33)	LCcombo4 (SEQ ID NO: 37)
20	HCLC5	HCcombo (SEQ ID NO: 33)	N94A.F83A (SEQ ID NO: 12)
	HCLC3	HCcombo (SEQ ID NO: 33)	LCcombo3 (SEQ ID NO: 36)
	HCLC1	HCcombo (SEQ ID NO: 33)	LCcombo1 (SEQ ID NO: 34)
25	R19HCcombo	R19HCcombo (SEQ ID NO: 51)	G6.31 WT (SEQ ID NO: 38)
	R19HCLC2	R19HCcombo (SEQ ID NO: 51)	LCcombo2 (SEQ ID NO: 35)
	R19HCLC4	R19HCcombo (SEQ ID NO: 51)	LCcombo4 (SEQ ID NO: 37)
30	R19HCLC5	R19HCcombo (SEQ ID NO: 51)	N94A.F83A (SEQ ID NO: 12)

Tabla 9: VL HVR Secuencias para anticuerpos de la Tabla 8

	Nombre del anticuerpo	HVR-L1	HVR-L2	HVR-L3
5	G6.31 WT	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO:9)	QQGYGNPFT (SEQ ID NO: 23)
	LC-N94A	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO:9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
10	LC-N94A.LC-F83A	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO:9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
	LC-N94A.LC-F83A. HC-A40E.HC-T57E (G6.31 AAEE)	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO:9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
15	N94A.F83A.N82aR.Y58 R (G6.31 AARR)	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO:9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
	HCcombo	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO:9)	QQGYGNPFT (SEQ ID NO: 23)
20	HCLC2	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO:9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
	HCLC4	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO:9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
	HCLC5	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO:9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
25	HCLC3	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO:9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
	HCLC1	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO:9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
30	R19HCcombo	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO:9)	QQGYGNPFT (SEQ ID NO: 23)
	R19HCLC2	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO:9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
	R19HCLC4	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO:9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
35	R19HCLC5	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO:9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)

Tabla 10: VH HVR Secuencias para anticuerpos de la Tabla 8

Nombre del anticuerpo	HVR-H1	HVR-H2	HVR-H3
5 G6.31 WT	DYWIH (SEQ ID NO:1)	GITPAGGYTTYADSVK G (SEQ ID NO: 53)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO:3)
10 LC-N94A	DYWIH (SEQ ID NO:1)	GITPAGGYTTYADSVK G (SEQ ID NO: 53)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO:3)
LC-N94A.LC-F83A	DYWIH (SEQ ID NO:1)	GITPAGGYTTYADSVK G (SEQ ID NO: 53)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO:3)
15 LC-N94A.LC-F83A. HC-A40E.HC-T57E (G6.31 AAEE)	DYWIH (SEQ ID NO:1)	GITPAGGYEYYADSVK G (SEQ ID NO: 21)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO:3)
N94A.F83A.N82aR.Y58 R (G6.31 AARR)	DYWIH (SEQ ID NO:1)	GITPAGGYTRYADSVK G (SEQ ID NO: 7)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO:3)
20 HCcombo	DYWIH (SEQ ID NO:1)	GITPAGGYEYYADSVE G (SEQ ID NO: 22)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO:3)
25 HCLC2	DYWIH (SEQ ID NO:1)	GITPAGGYEYYADSVE G (SEQ ID NO: 22)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO:3)
HCLC4	DYWIH (SEQ ID NO:1)	GITPAGGYEYYADSVE G (SEQ ID NO: 22)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO:3)
30 HCLC5	DYWIH (SEQ ID NO:1)	GITPAGGYEYYADSVE G (SEQ ID NO: 22)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO:3)
HCLC3	DYWIH (SEQ ID NO:1)	GITPAGGYEYYADSVE G (SEQ ID NO: 22)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO:3)

5	HCLC1	DYWIH (SEQ ID NO:1)	G (SEQ ID NO: 22)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO:3)
	R19HCcombo	DYWIH (SEQ ID NO:1)	G (SEQ ID NO: 22)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO:3)
10	R19HCLC2	DYWIH (SEQ ID NO:1)	G (SEQ ID NO: 22)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO:3)
	R19HCLC4	DYWIH (SEQ ID NO:1)	G (SEQ ID NO: 22)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO:3)
15	R19HCLC5	DYWIH (SEQ ID NO:1)	G (SEQ ID NO: 22)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO:3)

La región bisagra superior de la cadena pesada de Fab de cualquiera de los anticuerpos
 20 enumerados anteriormente, por ejemplo, G6.31 AARR, se puede mutar para eliminar reactividad a
 autoanticuerpos bisagra anti-IgG1 que se ha indicado en la bibliografía. Ver, por ejemplo, Brezski
 et ál., *J. Immunol.* 181:3183-3192, 2008 y Brezski et ál., *mAbs* 2:3, 212-220, 2010. Por lo tanto, el
 aminoácido del extremo C de G6.31 AARR de cadena pesada puede ser, ya sea una T (versión
 tipo salvaje (WT)) o L (versión variante que carece de reactividad a Fab IgG anti-humana). La
 25 secuencia de aminoácidos de cadena pesada de longitud completa de G6.31 AARR de tipo salvaje
 es la SEQ ID NO: 48. La secuencia de aminoácidos de cadena pesada de longitud completa de la
 versión variante que carece de reactividad a Fab IgG antihumano es la SEQ ID NO: 49. La
 secuencia de aminoácidos de cadena ligera de longitud completa tanto para G6.31 AARR como la
 versión variante que carece de reactividad a Fab IgG antihumano es la SEQ ID NO: 50.

30 Las secuencias de aminoácidos de cadena ligera y cadena pesada de la variante del anticuerpo
 modificado con cisteína, G6.31.AARR.LC-K149C, se muestran a continuación (LC-C149 se
 encuentra en **negrita y subrayado**).

Cadena ligera (LC):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSG
 35 SGTDFTLTISLQPEDAATYYCQQGYGAPFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV

CLLNNFYPPREAKVQWCVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 89).

Cadena pesada (HC):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTRYADSV
5 KGRFTISADTSKNTAYLQMRLRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 90).

Las secuencias de aminoácidos de cadena ligera y cadena pesada de la variante del anticuerpo
modificado con cisteína, G6.31AARR.HC-A140C, se muestran a continuación (HC-C140 en negrita
10 y subrayado).

LC:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSG
SGTDFTLTISLQPEDAATYYCQQGYGAPFTFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV
CLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
15 QGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 91).

HC:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTRYADSV
KGRFTISADTSKNTAYLQMRLRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTCALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS
20 SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 92).

Las secuencias de aminoácidos de cadena ligera y cadena pesada de la variante del anticuerpo
modificado con cisteína, G6.31AARR.HC-L174C, se muestran a continuación (HC-C174 en negrita
y subrayado).

LC:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSG
SGTDFTLTISLQPEDAATYYCQQGYGAPFTFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV
CLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
25 QGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 93).

HC:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTRYADSV
KGRFTISADTSKNTAYLQMRLRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVCQSSGLYSLSSVVTVPSS
30 SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 94).

**Ejemplo 4: Conjugados de HA-G6.31.AARR producidos a partir de HA monodisperso
35 muestran estabilidad física mejorada bajo tensión fisiológica respecto a los conjugados de**

HA-G6.31.AARR producidos a partir de HA polidisperso.*(A) Materiales y métodos*

Se sintetizó HA monodisperso por medios quimioenzimáticos con la hialuronano sintasa *Pasteurella multocida* (PmHAS) de Hyalose (Oklahoma City, OK). Todo los demás compuestos químicos y reactivos son de Sigma Aldrich (St. Louis, MO).

Se modificó HA monodisperso (monoHA, Mw 137 kDa, R_H 21.2 nm) con *N*-(2-aminoetilmaleimida) tal como se describió previamente para contener grupos maleimida al 4.0 %. Luego, se conjugó G6.31.AARR.Fab-C con la estructura principal monoHA-maleimida, tal como se describió previamente, y se purificó mediante SEC en una columna HILOAD® SUPERDEX® de 200 pg con solución amortiguadora PBS, pH 7.4. Se agruparon las fracciones de conjugado y se confirmaron mediante SEC-RI-MALS.

Se concentró monoHA-G6.31.AARR purificada mediante ultrafiltración hasta 5 mg/mL (en una base Fab) en PBS, se agregó azida de sodio y polisorbato 20 (PS20) a concentraciones finales de 2 mM y 0.01 %, respectivamente, y se incubó a 37°C. En puntos temporales de muestreo, se retiraron muestras y se diluyeron hasta 1 mg/mL en una solución amortiguadora que contenía His-HCl 10 mM (pH 5.5), NaCl 150 mM, trehalosa 10% (p/v) y polisorbato 20 al 0.01 %, y luego se sometieron a ensayo para determinar concentración de proteína soluble (A_{280}), turbiedad (A_{450}), tiempo de retención de SEC y peso molecular (M_n y M_w mediante SEC-RI-MALS).

(B) Resultados

Los conjugados HA-G6.31.AARR producidos con HA monodisperso mostraron estabilidad física ampliamente mejorada en cuatro semanas en comparación con conjugados HA-G6.31.AARR producidos con HA polidisperso de similar tamaño en el mismo nivel de carga de Fab (Figura 14). El peso molecular (M_w) de monoHA-G6.31.AARR se reduce levemente de la semana 0 a la semana 2 y la semana 4, pero esta pérdida podría justificarse por completo con pérdidas en Fab libre debido a la desconjugación por reacción de Michael a la inversa, tal como se observa comúnmente para las proteínas conjugadas tiol-maleimida. Tampoco hubo cambio discernible en el tiempo de retención de SEC para monoHA-G6.31.AARR, lo que indica que el tamaño físico del conjugado no cambiaba en función del tiempo.

Estos resultados apoyan claramente la hipótesis de que, en una población de conjugados HA-G6.31.AARR producida a partir del material de partida de HA polidisperso, la subpoblación con base en HA de peso molecular elevado es responsable de la inestabilidad física observada luego de la tensión fisiológica. Retirar esta subpoblación mediante la homogenización del material de partida de HA (es decir, a partir de un HA monodisperso) resulta en una molécula de conjugado más estable que es menos propenso a precipitación en condiciones de tensión fisiológica. Estos datos también sostienen el uso de los conjugados HA-G6.31.AARR producidos a partir de un

material de HA monodisperso como agentes terapéuticos para el uso in vivo.

Si bien la invención que antecede se describió de forma detallada a modo ilustrativo y de ejemplo con fines de claridad de comprensión, las descripciones y los ejemplos no deberían interpretarse como taxativos del alcance de la invención. Estas descripciones de toda la patente y la bibliografía

5 científica citada en la presente se incorporan expresamente en su totalidad mediante esta referencia.