

CONJUGADOS DE FÁRMACO-ANTICUERPO ACTIVABLE ANTI-CD71 Y MÉTODOS DE USO DE ESTOS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense N.º 62/572.467, presentada el 14 de octubre de 2017, cuyos contenidos se incorporan en la presente por referencia en su totalidad.

REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS

[0002] El “Listado de secuencias” presentado electrónicamente de manera concurrente con la presente conforme a 37 CFR § 1.821 en formato legible por computadora (CFR) a través de EFS-Web como nombre de archivo “CYTM056001US_12OCT2018_FINAL_ST25.txt” se incorpora en la presente por referencia. La copia electrónica del Listado de secuencias se creó el 12 de octubre de 2018 y el tamaño del disco es de 96 kilobytes.

CAMPO

[0003] La invención se refiere en general a conjugados de fármaco-anticuerpo activable (AADC) que se fijan a CD71 en un estado activado, y a métodos para elaborar y usar estos anticuerpos activables conjugados anti-CD71 en una variedad de indicaciones terapéuticas, de diagnóstico y profilácticas.

ANTECEDENTES

[0004] Los tratamientos a base de anticuerpos han demostrado ser tratamientos eficaces para varias enfermedades, pero, en algunos casos, las toxicidades que se deben a una amplia expresión diana han limitado su eficacia terapéutica. Además, los tratamientos a base de anticuerpos han exhibido otras limitaciones, tales como una rápida depuración de la circulación después de la administración.

[0005] En el ámbito de los tratamientos de moléculas pequeñas, se han desarrollado estrategias para proporcionar profármacos de una entidad química activa. Tales profármacos se administran en una forma relativamente inactiva (o significativamente menos activa). Una vez administrado, el profármaco se metaboliza *in vivo* en el compuesto activo. Tales estrategias de profármacos pueden proporcionar una mayor selectividad del fármaco para su diana prevista y una reducción de los efectos adversos.

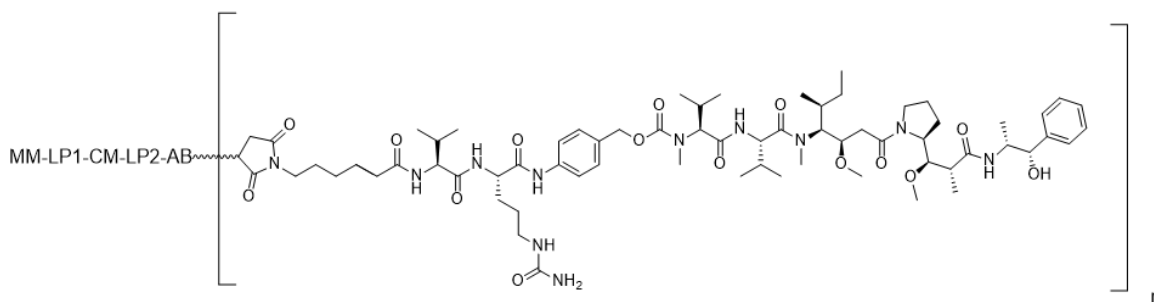
[0006] Por consiguiente, en el campo de los tratamientos a base de anticuerpos existe una necesidad continua de anticuerpos que imitan las características deseables del

profármaco de molécula pequeña.

SÍNTESIS

[0007] La divulgación proporciona anticuerpos activables conjugados que se fijan específicamente a CD71, que se conoce también como proteína receptora de transferrina 1 (TfR1).

[0008] En un aspecto de la invención, se proporciona en la presente un anticuerpo activable conjugado que comprende la estructura de la Fórmula (I) o una sal de esta:



Formula (I)

en donde (i) AB es un anticuerpo que se fija específicamente a CD71 humano y que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de CDRH1 que comprende SEQ ID NO: 9, una secuencia de CDRH2 que comprende SEQ ID NO: 10 y una secuencia de CDRH3 que comprende SEQ ID NO: 11; y una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de CDRL1 que comprende SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13, una secuencia de CDRL2 que comprende SEQ ID NO: 14 y una secuencia de CDRL3 que comprende SEQ ID NO: 15; (ii) MM es una porción de enmascaramiento que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, en donde la MM inhibe la fijación del AB a CD71 humano cuando el anticuerpo activable conjugado está en un estado no escindido; (iii) LP1 es una primera porción de enlace que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 207; (iv) CM es una porción escindible que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 156, en donde la CM es un polipéptido que funciona como un sustrato para una proteasa; y (v) LP2 es una segunda porción de enlace que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38; y (b) en donde “n” es 2. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I) en donde el AB comprende un isotipo IgG1. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I) en donde el AB es un anticuerpo que tiene una región constante de la cadena pesada, y en donde el residuo del terminal C de la región constante de la cadena pesada no es una lisina. En algunas formas de

realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I), en donde el glutamato del terminal N en la cadena pesada y/o la cadena liviana opcionalmente es piroglutamato o está modificado a piroglutamato después de la traducción.

[0009] En un aspecto relacionado de la invención, se proporciona en la presente un anticuerpo activable conjugado que comprende la estructura de la Fórmula (I) o una sal de esta en donde (i) AB es un anticuerpo que se fija específicamente a CD71 humano y que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 5 y una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 7; (ii) MM es una porción de enmascaramiento que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, en donde la MM inhibe la fijación del AB a CD71 humano cuando el anticuerpo activable conjugado está en un estado no escindido; (iii) LP1 es una primera porción de enlace que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 207; (iv) CM es una porción escindible que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 156, en donde la CM es un polipéptido que funciona como un sustrato para una proteasa; y (v) LP2 es una segunda porción de enlace que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38; y (b) en donde “n” es 2. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I) en donde el AB comprende un isotipo IgG1. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I) en donde el AB es un anticuerpo que tiene una región constante de la cadena pesada, y en donde el residuo del terminal C de la región constante de la cadena pesada no es una lisina. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I), en donde el glutamato del terminal N en la cadena pesada y/o la cadena liviana opcionalmente es piroglutamato o está modificado a piroglutamato después de la traducción.

[0010] En un aspecto relacionado de la invención, se proporciona en la presente un anticuerpo activable conjugado que comprende la estructura de la Fórmula (I) o una sal de esta en donde (i) AB es un anticuerpo que se fija específicamente a CD71 humano y que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 167 y una cadena liviana que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 19; (ii) MM es una porción de enmascaramiento que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, en donde la MM inhibe la fijación del AB a CD71 humano cuando el anticuerpo activable conjugado está en un estado no escindido; (iii) LP1 es una primera porción de enlace que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 207; (iv) CM es una porción escindible que comprende la secuencia de SEQ ID

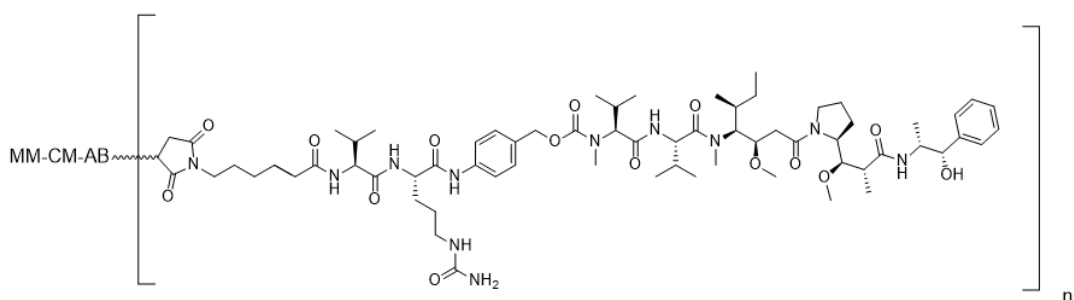
NO: 156, en donde la CM es un polipéptido que funciona como un sustrato para una proteasa; y (v) LP2 es una segunda porción de enlace que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38; y (b) en donde “n” es 2. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I) en donde el AB comprende un isotipo IgG1. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I) en donde el AB es un anticuerpo que tiene una región constante de la cadena pesada, y en donde el residuo del terminal C de la región constante de la cadena pesada no es una lisina. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I), en donde el glutamato del terminal N en la cadena pesada y/o la cadena liviana opcionalmente es piroglutamato o está modificado a piroglutamato después de la traducción.

[0011] En un aspecto relacionado de la invención, se proporciona en la presente un anticuerpo activable conjugado que comprende la estructura de la Fórmula (I) o una sal de esta en donde MM-LP1-CM-LP2-AB es un anticuerpo activable, en donde el AB es un anticuerpo que se fija específicamente a CD71 humano, en donde el anticuerpo activable comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 167 y una cadena liviana que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 169, y en donde “n” es 2. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I) en donde el AB comprende un isotipo IgG1. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I) en donde el AB es un anticuerpo que tiene una región constante de la cadena pesada, y en donde el residuo del terminal C de la región constante de la cadena pesada no es una lisina. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I), en donde el glutamato del terminal N en la cadena pesada y/o la cadena liviana opcionalmente es piroglutamato o está modificado a piroglutamato después de la traducción.

[0012] En un aspecto relacionado de la invención, se proporciona en la presente un anticuerpo activable conjugado que comprende la estructura de la Fórmula (I) o una sal de esta en donde MM-LP1-CM-LP2-AB es un anticuerpo activable, en donde el AB es un anticuerpo que se fija específicamente a CD71 humano, en donde el anticuerpo activable comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 167 y una cadena liviana que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 170 en donde “n” es 2. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I) en donde el AB comprende un isotipo IgG1. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I) en donde el AB es un anticuerpo que tiene una región constante de la cadena pesada, y en donde el residuo

del terminal C de la región constante de la cadena pesada no es una lisina. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I), en donde el glutamato del terminal N en la cadena pesada y/o la cadena liviana opcionalmente es piroglutamato o está modificado a piroglutamato después de la traducción.

[0013] En un aspecto relacionado de la invención, se proporciona en la presente un anticuerpo activable conjugado que comprende la estructura de la Fórmula (II) o una sal de esta:



Formula (II)

en donde (i) AB es un anticuerpo que se fija específicamente a CD71 humano y que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de CDRH1 que comprende SEQ ID NO: 9, una secuencia de CDRH2 que comprende SEQ ID NO: 10 y una secuencia de CDRH3 que comprende SEQ ID NO: 11; y una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de CDRL1 que comprende SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13, una secuencia de CDRL2 que comprende SEQ ID NO: 14 y una secuencia de CDRL3 que comprende SEQ ID NO: 15; (ii) MM es una porción de enmascaramiento que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, en donde la MM inhibe la fijación del AB a CD71 humano cuando el anticuerpo activable conjugado está en un estado no escindido; y (iii) CM es una porción escindible que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 156, en donde la CM es un polipéptido que funciona como un sustrato para una proteasa; y (b) en donde “n” es 2. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (II) en donde el AB comprende un isotipo IgG1. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (II) en donde el AB es un anticuerpo que tiene una región constante de la cadena pesada, y en donde el residuo del terminal C de la región constante de la cadena pesada no es una lisina. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (II), en donde el glutamato del terminal N en la cadena pesada y/o la cadena liviana opcionalmente es piroglutamato o está modificado a piroglutamato después de la traducción.

[0014] En un aspecto relacionado de la invención, se proporciona en la presente un anticuerpo activable conjugado que comprende la estructura de la Fórmula (II) o una sal de esta en donde (i) AB es un anticuerpo que se fija específicamente a CD71 humano y que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 5 y una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 7; (ii) MM es una porción de enmascaramiento que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, en donde la MM inhibe la fijación del AB a CD71 humano cuando el anticuerpo activable conjugado está en un estado no escindido; y (iii) CM es una porción escindible que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 156, en donde la CM es un polipéptido que funciona como un sustrato para una proteasa; y (b) en donde “n” es 2. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (II) en donde el AB comprende un isotipo IgG1. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (II) en donde el AB es un anticuerpo que tiene una región constante de la cadena pesada, y en donde el residuo del terminal C de la región constante de la cadena pesada no es una lisina. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (II), en donde el glutamato del terminal N en la cadena pesada y/o la cadena liviana opcionalmente es piroglutamato o está modificado a piroglutamato después de la traducción.

[0015] En un aspecto relacionado de la invención, se proporciona en la presente un anticuerpo activable conjugado que comprende la estructura de la Fórmula (II) o una sal de esta en donde (i) AB es un anticuerpo que se fija específicamente a CD71 humano y que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 167 y una cadena liviana que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 19; (ii) MM es una porción de enmascaramiento que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, en donde la MM inhibe la fijación del AB a CD71 humano cuando el anticuerpo activable conjugado está en un estado no escindido; y (iii) CM es una porción escindible que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 156, en donde la CM es un polipéptido que funciona como un sustrato para una proteasa; y (b) en donde “n” es 2. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (II) en donde el AB comprende un isotipo IgG1. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (II) en donde el AB es un anticuerpo que tiene una región constante de la cadena pesada, y en donde el residuo del terminal C de la región constante de la cadena pesada no es una lisina. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (II), en donde el

glutamato del terminal N en la cadena pesada y/o la cadena liviana opcionalmente es piroglutamato o está modificado a piroglutamato después de la traducción.

[0016] En un aspecto relacionado de la invención, se proporciona en la presente un anticuerpo activable conjugado que comprende la estructura de la Fórmula (II) o una sal de esta en donde MM-LP1-CM-LP2-AB es un anticuerpo activable, en donde el AB es un anticuerpo que se fija específicamente a CD71 humano, en donde el anticuerpo activable comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 167 y una cadena liviana que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 169, y en donde “n” es 2. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (II) en donde el AB comprende un isotipo IgG1. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (II) en donde el AB es un anticuerpo que tiene una región constante de la cadena pesada, y en donde el residuo del terminal C de la región constante de la cadena pesada no es una lisina. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (II), en donde el glutamato del terminal N en la cadena pesada y/o la cadena liviana opcionalmente es piroglutamato o está modificado a piroglutamato después de la traducción.

[0017] En un aspecto relacionado de la invención, se proporciona en la presente un anticuerpo activable conjugado que comprende la estructura de la Fórmula (II) o una sal de esta en donde MM-LP1-CM-LP2-AB es un anticuerpo activable, en donde el AB es un anticuerpo que se fija específicamente a CD71 humano, en donde el anticuerpo activable comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 167 y una cadena liviana que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 170, y en donde “n” es 2. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (II) en donde el AB comprende un isotipo IgG1. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (II) en donde el AB es un anticuerpo que tiene una región constante de la cadena pesada, y en donde el residuo del terminal C de la región constante de la cadena pesada no es una lisina. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (II), en donde el glutamato del terminal N en la cadena pesada y/o la cadena liviana opcionalmente es piroglutamato o está modificado a piroglutamato después de la traducción.

[0018] En otro aspecto de la invención, se proporcionan en la presente métodos para producir un anticuerpo activable conjugado que comprende la estructura de la Fórmula (I) o una sal de esta, en donde (i) AB es un anticuerpo que se fija específicamente a CD71 humano y que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de CDRH1 que comprende SEQ ID NO: 9, una secuencia

de CDRH2 que comprende SEQ ID NO: 10 y una secuencia de CDRH3 que comprende SEQ ID NO: 11; y una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de CDRL1 que comprende SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13, una secuencia de CDRL2 que comprende SEQ ID NO: 14 y una secuencia de CDRL3 que comprende SEQ ID NO: 15; (ii) MM es una porción de enmascaramiento que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, en donde la MM inhibe la fijación del AB a CD71 humano cuando el anticuerpo activable conjugado está en un estado no escindido; (iii) LP1 es una primera porción de enlace que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 207; (iv) CM es una porción escindible que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 156, en donde la CM es un polipéptido que funciona como un sustrato para una proteasa; y (v) LP2 es una segunda porción de enlace que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38; y (b) en donde “n” es 2; en donde el método comprende (i) reducir un anticuerpo activable que comprende MM-LP1-CM-LP2-AB con un agente reductor; y (ii) conjuguar uno o más vcMMAE con el anticuerpo activable reducido. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I) en donde el AB comprende un isotipo IgG1. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I) en donde el AB es un anticuerpo que tiene una región constante de la cadena pesada, y en donde el residuo del terminal C de la región constante de la cadena pesada no es una lisina. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I), en donde el glutamato del terminal N en la cadena pesada y/o la cadena liviana opcionalmente es piroglutamato o está modificado a piroglutamato después de la traducción.

[0019] En otro aspecto de la invención, se proporcionan en la presente métodos para producir un anticuerpo activable conjugado que comprende la estructura de la Fórmula (I) o una sal de esta, en donde (i) AB es un anticuerpo que se fija específicamente a CD71 humano y que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 5 y una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 7; (ii) MM es una porción de enmascaramiento que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, en donde la MM inhibe la fijación del AB a CD71 humano cuando el anticuerpo activable conjugado está en un estado no escindido; (iii) LP1 es una primera porción de enlace que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 207; (iv) CM es una porción escindible que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 156, en donde la CM es un polipéptido que funciona como un sustrato para una proteasa; y (v) LP2 es una

segunda porción de enlace que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38; y (b) en donde “n” es 2; en donde el método comprende (i) reducir un anticuerpo activable que comprende MM-LP1-CM-LP2-AB con un agente reductor; y (ii) conjugar uno o más vcMMAE con el anticuerpo activable reducido. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I) en donde el AB comprende un isotipo IgG1. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I) en donde el AB es un anticuerpo que tiene una región constante de la cadena pesada, y en donde el residuo del terminal C de la región constante de la cadena pesada no es una lisina. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I), en donde el glutamato del terminal N en la cadena pesada y/o la cadena liviana opcionalmente es piroglutamato o está modificado a piroglutamato después de la traducción.

[0020] En otro aspecto de la invención, se proporcionan en la presente métodos para producir un anticuerpo activable conjugado que comprende la estructura de la Fórmula (I) o una sal de esta, en donde (i) AB es un anticuerpo que se fija específicamente a CD71 humano y que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 167 y una cadena liviana que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 19; (ii) MM es una porción de enmascaramiento que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, en donde la MM inhibe la fijación del AB a CD71 humano cuando el anticuerpo activable conjugado está en un estado no escindido; (iii) LP1 es una primera porción de enlace que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 207; (iv) CM es una porción escindible que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 156, en donde la CM es un polipéptido que funciona como un sustrato para una proteasa; y (v) LP2 es una segunda porción de enlace que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38; y (b) en donde “n” es 2; en donde el método comprende (i) reducir un anticuerpo activable que comprende MM-LP1-CM-LP2-AB con un agente reductor; y (ii) conjugar uno o más vcMMAE con el anticuerpo activable reducido. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I) en donde el AB comprende un isotipo IgG1. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I) en donde el AB es un anticuerpo que tiene una región constante de la cadena pesada, y en donde el residuo del terminal C de la región constante de la cadena pesada no es una lisina. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I), en donde el glutamato del terminal N en la cadena pesada y/o la cadena liviana opcionalmente es piroglutamato o está modificado a piroglutamato después de la

traducción.

[0021] En otro aspecto de la invención, se proporcionan en la presente métodos para producir un anticuerpo activable conjugado que comprende la estructura de la Fórmula (I) o una sal de esta en donde MM-LP1-CM-LP2-AB es un anticuerpo activable, en donde el AB es un anticuerpo que se fija específicamente a CD71 humano, en donde el anticuerpo activable comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 167 y una cadena liviana que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 169; y (b) en donde “n” es 2; en donde el método comprende (i) reducir un anticuerpo activable que comprende MM-LP1-CM-LP2-AB con un agente reductor; y (ii) conjugar uno o más vcMMAE con el anticuerpo activable reducido. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I) en donde el AB comprende un isotipo IgG1. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I) en donde el AB es un anticuerpo que tiene una región constante de la cadena pesada, y en donde el residuo del terminal C de la región constante de la cadena pesada no es una lisina. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I), en donde el glutamato del terminal N en la cadena pesada y/o la cadena liviana opcionalmente es piroglutamato o está modificado a piroglutamato después de la traducción.

[0022] En otro aspecto de la invención, se proporcionan en la presente métodos para producir un anticuerpo activable conjugado que comprende la estructura de la Fórmula (I) o una sal de esta en donde MM-LP1-CM-LP2-AB es un anticuerpo activable, en donde el AB es un anticuerpo que se fija específicamente a CD71 humano, en donde el anticuerpo activable comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 167 y una cadena liviana que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 170; y (b) en donde “n” es 2; en donde el método comprende (i) reducir un anticuerpo activable que comprende MM-LP1-CM-LP2-AB con un agente reductor; y (ii) conjugar uno o más vcMMAE con el anticuerpo activable reducido. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I) en donde el AB comprende un isotipo IgG1. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I) en donde el AB es un anticuerpo que tiene una región constante de la cadena pesada, y en donde el residuo del terminal C de la región constante de la cadena pesada no es una lisina. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I), en donde el glutamato del terminal N en la cadena pesada y/o la cadena liviana opcionalmente es piroglutamato o está modificado a piroglutamato después de la traducción.

[0023] En otro aspecto de la invención, se proporcionan en la presente métodos para producir un anticuerpo activable conjugado que comprende la estructura de la Fórmula (II) o una sal de esta, en donde (i) AB es un anticuerpo que se fija específicamente a CD71 humano y que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de CDRH1 que comprende SEQ ID NO: 9, una secuencia de CDRH2 que comprende SEQ ID NO: 10 y una secuencia de CDRH3 que comprende SEQ ID NO: 11; y una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de CDRL1 que comprende SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13, una secuencia de CDRL2 que comprende SEQ ID NO: 14 y una secuencia de CDRL3 que comprende SEQ ID NO: 15; (ii) MM es una porción de enmascaramiento que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, en donde la MM inhibe la fijación del AB a CD71 humano cuando el anticuerpo activable conjugado está en un estado no escindido; (iii) CM es una porción escindible que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 156, en donde la CM es un polipéptido que funciona como un sustrato para una proteasa; y (b) en donde “n” es 2; en donde el método comprende (i) reducir un anticuerpo activable que comprende MM-LP1-CM-LP2-AB con un agente reductor; y (ii) conjugar uno o más vcMMAE con el anticuerpo activable reducido. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I) en donde el AB comprende un isotipo IgG1. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I) en donde el AB es un anticuerpo que tiene una región constante de la cadena pesada, y en donde el residuo del terminal C de la región constante de la cadena pesada no es una lisina. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I), en donde el glutamato del terminal N en la cadena pesada y/o la cadena liviana opcionalmente es piroglutamato o está modificado a piroglutamato después de la traducción.

[0024] En otro aspecto de la invención, se proporcionan en la presente métodos para producir un anticuerpo activable conjugado que comprende la estructura de la Fórmula (II) o una sal de esta, en donde (i) AB es un anticuerpo que se fija específicamente a CD71 humano y que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 5 y una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 7; (ii) MM es una porción de enmascaramiento que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, en donde la MM inhibe la fijación del AB a CD71 humano cuando el anticuerpo activable conjugado está en un estado no escindido; (iii) CM es una porción escindible que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 156, en donde la CM es un polipéptido que

funciona como un sustrato para una proteasa; y (b) en donde “n” es 2; en donde el método comprende (i) reducir un anticuerpo activable que comprende MM-LP1-CM-LP2-AB con un agente reductor; y (ii) conjugar uno o más vcMMAE con el anticuerpo activable reducido. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I) en donde el AB comprende un isotipo IgG1. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I) en donde el AB es un anticuerpo que tiene una región constante de la cadena pesada, y en donde el residuo del terminal C de la región constante de la cadena pesada no es una lisina. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I), en donde el glutamato del terminal N en la cadena pesada y/o la cadena liviana opcionalmente es piroglutamato o está modificado a piroglutamato después de la traducción.

[0025] En otro aspecto de la invención, se proporcionan en la presente métodos para producir un anticuerpo activable conjugado que comprende la estructura de la Fórmula (II) o una sal de esta, en donde (i) AB es un anticuerpo que se fija específicamente a CD71 humano y que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 167 y una cadena liviana que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 19; (ii) MM es una porción de enmascaramiento que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, en donde la MM inhibe la fijación del AB a CD71 humano cuando el anticuerpo activable conjugado está en un estado no escindido; (iii) CM es una porción escindible que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 156, en donde la CM es un polipéptido que funciona como un sustrato para una proteasa; y (b) en donde “n” es 2; en donde el método comprende (i) reducir un anticuerpo activable que comprende MM-LP1-CM-LP2-AB con un agente reductor; y (ii) conjugar uno o más vcMMAE con el anticuerpo activable reducido. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I) en donde el AB comprende un isotipo IgG1. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I) en donde el AB es un anticuerpo que tiene una región constante de la cadena pesada, y en donde el residuo del terminal C de la región constante de la cadena pesada no es una lisina. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I), en donde el glutamato del terminal N en la cadena pesada y/o la cadena liviana opcionalmente es piroglutamato o está modificado a piroglutamato después de la traducción.

[0026] En otro aspecto de la invención, se proporcionan en la presente métodos para producir un anticuerpo activable conjugado que comprende la estructura de la Fórmula

(II) o una sal de esta en donde MM-LP1-CM-LP2-AB es un anticuerpo activable, en donde el AB es un anticuerpo que se fija específicamente a CD71 humano, en donde el anticuerpo activable comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 167 y una cadena liviana que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 169; y (b) en donde “n” es 2; en donde el método comprende (i) reducir un anticuerpo activable que comprende MM-LP1-CM-LP2-AB con un agente reductor; y (ii) conjugar uno o más vcMMAE con el anticuerpo activable reducido. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I) en donde el AB comprende un isotipo IgG1. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I) en donde el AB es un anticuerpo que tiene una región constante de la cadena pesada, y en donde el residuo del terminal C de la región constante de la cadena pesada no es una lisina. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I), en donde el glutamato del terminal N en la cadena pesada y/o la cadena liviana opcionalmente es piroglutamato o está modificado a piroglutamato después de la traducción.

[0027] En otro aspecto de la invención, se proporcionan en la presente métodos para producir un anticuerpo activable conjugado que comprende la estructura de la Fórmula (II) o una sal de esta en donde MM-LP1-CM-LP2-AB es un anticuerpo activable, en donde el AB es un anticuerpo que se fija específicamente a CD71 humano, en donde el anticuerpo activable comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 167 y una cadena liviana que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 170; y (b) en donde “n” es 2; en donde el método comprende (i) reducir un anticuerpo activable que comprende MM-LP1-CM-LP2-AB con un agente reductor; y (ii) conjugar uno o más vcMMAE con el anticuerpo activable reducido. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I) en donde el AB comprende un isotipo IgG1. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I) en donde el AB es un anticuerpo que tiene una región constante de la cadena pesada, y en donde el residuo del terminal C de la región constante de la cadena pesada no es una lisina. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I), en donde el glutamato del terminal N en la cadena pesada y/o la cadena liviana opcionalmente es piroglutamato o está modificado a piroglutamato después de la traducción.

[0028] En otro aspecto de la invención, se proporcionan en la presente composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo activable conjugado de una repetición de la Fórmula (I) o la Fórmula (II). En algunas formas de realización, las

composiciones farmacéuticas pueden comprender un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

[0029] En otro aspecto de la invención, se proporcionan en la presente métodos para tratar, aliviar un síntoma de, o retrasar la progresión de un tipo de cáncer en un sujeto, en donde el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I) o la Fórmula (II), o la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo activable conjugado de una repetición de la Fórmula (I) o la Fórmula (II) y, opcionalmente, un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico, a un sujeto que lo necesite para un tipo de cáncer seleccionado del grupo que consiste en: cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama ER+, cáncer de mama triple negativo, cáncer colorrectal, melanoma, cáncer de próstata, mieloma múltiple, linfoma difuso de linfocitos B grandes, carcinoma de células pequeñas de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, mesotelioma, linfoma no Hodgkin, carcinoma hepatocelular y glioblastoma.

[0030] En otro aspecto de la invención, se proporciona en la presente un anticuerpo activable conjugado que comprende (a) un anticuerpo activable (AA) que comprende en un estado no escindido la disposición estructural desde el terminal N al terminal C de la siguiente manera: MM-CM-AB, en donde (i) AB es un anticuerpo que se fija específicamente a CD71 de mamífero y que comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 5 y la secuencia de la región variable de la cadena liviana de SEQ ID NO: 7; (ii) MM es una porción de enmascaramiento que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, en donde la MM acoplada al AB inhibe la fijación del AB a CD71 cuando el anticuerpo activable conjugado está en un estado no escindido; (iii) CM es una porción escindible que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 156 acoplada al AB en donde la CM es un polipéptido que funciona como un sustrato para una proteasa; y (b) monometil auristatina E (MMAE), en donde el anticuerpo activable se conjuga con dos equivalentes de MMAE. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado en donde el AB es un anticuerpo que tiene una región constante de la cadena pesada, y en donde el residuo del terminal C de la región constante de la cadena pesada no es una lisina. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado en donde el glutamato del terminal N en la cadena pesada y/o la cadena liviana opcionalmente es piroglutamato o está modificado a piroglutamato después de la traducción.

[0031] En otro aspecto de la invención, se proporciona en la presente un anticuerpo activable conjugado que tiene la fórmula AA-(AG)p en donde (a) AA es un anticuerpo activable que comprende en un estado no escindido la disposición estructural desde el terminal N al terminal C de la siguiente manera: MM-CM-AB, en donde (i) AB es un anticuerpo que se fija específicamente a CD71 de mamífero y que comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 5 y la secuencia de la región variable de la cadena liviana de SEQ ID NO: 7; (ii) MM es una porción de enmascaramiento que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, en donde la MM acoplada al AB inhibe la fijación del AB a CD71 cuando el anticuerpo activable conjugado está en un estado no escindido; (iii) CM es una porción escindible que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 156 acoplada al AB en donde la CM es un polipéptido que funciona como un sustrato para una proteasa; y (b) AG es un agente conjugado con el AA, en donde el agente es MMAE y en donde p es 2. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado en donde el AB es un anticuerpo que tiene una región constante de la cadena pesada, y en donde el residuo del terminal C de la región constante de la cadena pesada no es una lisina. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado en donde el glutamato del terminal N en la cadena pesada y/o la cadena liviana opcionalmente es piroglutamato o está modificado a piroglutamato después de la traducción.

[0032] En otro aspecto de la invención, se proporciona en la presente un método para producir un anticuerpo activable conjugado que comprende (a) conjugar al menos una MMAE con un anticuerpo activable (AA), lo que produce una composición que comprende AA-(MMAE)p, en donde p es de 1 a 8; y (b) enriquecer la composición para la especie de anticuerpo activable conjugado en la que p es 2, en donde AA comprende en un estado no escindido la disposición estructural desde el terminal N al terminal C de la siguiente manera: MM-CM-AB en donde AB es un anticuerpo que se fija específicamente a CD71 de mamífero y que comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 5 y la secuencia de la región variable de la cadena liviana de SEQ ID NO: 7; (ii) MM es una porción de enmascaramiento que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, en donde la MM acoplada al AB inhibe la fijación del AB a CD71 cuando el anticuerpo activable conjugado está en un estado no escindido; (iii) CM es una porción escindible que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 156 acoplada al AB en donde la CM es un polipéptido que funciona como un sustrato para una proteasa; y (b) AG es un agente conjugado con el AA, en donde el agente es MMAE y en donde p es 2. En algunas

formas de realización, el anticuerpo activable conjugado en donde el AB es un anticuerpo que tiene una región constante de la cadena pesada, y en donde el residuo del terminal C de la región constante de la cadena pesada no es una lisina. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado en donde el glutamato del terminal N en la cadena pesada y/o la cadena liviana opcionalmente es piroglutamato o está modificado a piroglutamato después de la traducción.

[0033] En otro aspecto de la invención, se proporciona en la presente cualquier anticuerpo activable conjugado, o una composición farmacéutica, como se divulga en la presente, para su uso como medicamento.

[0034] En otro aspecto de la invención, se proporciona en la presente cualquier anticuerpo activable conjugado, o una composición farmacéutica, como se divulga en la presente, para su uso en el tratamiento contra el cáncer, opcionalmente en donde el tipo de cáncer se selecciona del grupo que consiste en: cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama ER+, cáncer de mama triple negativo, cáncer colorrectal, melanoma, cáncer de próstata, mieloma múltiple, linfoma difuso de linfocitos B grandes, carcinoma de células pequeñas de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, mesotelioma, linfoma no Hodgkin, carcinoma hepatocelular y glioblastoma.

[0035] En otro aspecto de la invención, se proporciona en la presente un kit que comprende al menos un anticuerpo activable como se divulga en la presente. El kit puede comprender además uno o más vcMMAE, y/o un agente reductor.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0036] La Figura 1, como se analiza en el Ejemplo 5, representa ensayos inmunohistoquímicos (IHC) de ejemplo para determinar los niveles de expresión de CD71 en diversos tipos de tejido de cáncer primario y metastásico. Los resultados de ejemplo mostrados en esta figura y ejemplo mostraron que CD71 se expresa a altos niveles en tumores primarios de una variedad de tipos de cáncer humanos.

[0037] La Figura 2, como se analiza en el Ejemplo 5, representa estudios de ejemplo del nivel de expresión de CD71 en múltiples muestras de cáncer metastásico derivadas de pacientes. Los resultados de ejemplo mostrados en esta figura y ejemplo mostraron que CD71 se expresa a altos niveles en tumores metastásicos en una variedad de tipos de cáncer humanos.

[0038] Las Figuras 3A y 3B, como se analizan en el Ejemplo 4, representan un ensayo *in vitro* de ejemplo de la capacidad de fijación a CD71 recombinante humano o de *Macaca fascicularis* de los anticuerpos activables anti-CD71 conjugados y no

conjugados de la divulgación cuando el anticuerpo activable está intacto o activado proteolíticamente (denotado como “ACT”). Los resultados de ejemplo mostrados en estas figuras y ejemplo mostraron que el anticuerpo activable conjugado anti-CD71 se fijó a CD71 a niveles comparables a su contraparte de anticuerpo activable anti-CD71 no conjugado, y asimismo ambos se fijaron a CD71 con una afinidad aumentada equivalente tras la activación por proteasa.

[0039] Las Figuras 3C y 3D, como se analizan en el Ejemplo 4, representan un ensayo *in vitro* de ejemplo de la capacidad de fijación a CD71 humano o de *Macaca fascicularis* en una superficie celular de los anticuerpos activables anti-CD71 conjugados y no conjugados de la divulgación cuando el anticuerpo activable está intacto o activado proteolíticamente (denotado como “ACT”). Los resultados de ejemplo mostrados en estas figuras y ejemplo mostraron que el anticuerpo activable conjugado anti-CD71 se fijó a CD71 de la superficie celular a niveles comparables a su contraparte de anticuerpo activable anti-CD71 no conjugado, y asimismo ambos se fijaron a CD71 de la superficie celular con una afinidad aumentada equivalente tras la activación por proteasa.

[0040] Las Figuras 4A, 4B y 4C, como se analizan en el Ejemplo 6, representan estudios de eficacia de ejemplo de anticuerpos activables conjugados anti-CD71 (AADC) de la presente divulgación en un modelo de xenoinjerto de ratón (anti-CD71 TF01-3011-MMAE en comparación con anti-CD71 TF02.13-2011-MMAE). Estos resultados de ejemplo muestran en estas figuras y ejemplo que un AADC con la porción de enmascaramiento de menor afinidad (TF02.13) demostró una mayor eficacia que un AADC con una porción de enmascaramiento de mayor afinidad (TF01).

[0041] La Figura 5, como se analiza en el Ejemplo 7, representa un estudio de eficacia de ejemplo de anticuerpos activables conjugados anti-CD71 (AADC) de la presente divulgación en un modelo de xenoinjerto de ratón. Los resultados de ejemplo mostrados en esta figura y ejemplo demuestran que la eficacia del AADC indicado (anti-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE) con un sustrato menos escindible es sustancialmente la misma que la eficacia del AADC (anti-CD71 TF02.13-3011-vcMMAE) con un sustrato más escindible mostrado en las Figuras 4B y 4C.

[0042] Las Figuras 6A, 6B, 6C y 6D, como se analizan en el Ejemplo 8, representan estudios de eficacia de ejemplo de anticuerpos activables conjugados anti-CD71 (AADC) con diferentes DAR (anti-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE con una DAR ~3 en comparación con anti-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE E2 con una DAR ~2) de la presente divulgación en un modelo de xenoinjerto de ratón. Los resultados de ejemplo

mostrados en estas figuras y ejemplo demuestran que la eficacia de los AADC de dosis equiparadas (anti-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE) que tienen DAR diferentes resultó ser comparable.

[0043] Las Figuras 7A, 7B y 7C, como se analizan en el Ejemplo 9, muestran flujos de trabajo esquemáticos de ejemplo para analizar los productos metabólicos que resultan de la administración de anticuerpos activables conjugados anti-CD71 (AADC) de la presente divulgación.

[0044] Las Figuras 8A, 8B, 9A, 9B, 10 y 11, como se analizan en los Ejemplos 11-14, representan secuencias temporales de ejemplo de subproductos metabólicos después de la administración de anticuerpos activables conjugados anti-CD71 (AADC) de la presente divulgación en un modelo animal. Los resultados de ejemplo mostrados en estas figuras y ejemplo demuestran que la cantidad de AADC total e intacto de la presente divulgación (anti-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE E2) se mantiene en los animales durante la dosificación en una cantidad proporcional a la dosis, y la cantidad de MMAE que se conjuga con el anticuerpo activable es sustancialmente mayor que la cantidad de MMAE no conjugado en toda la dosificación y en todos los niveles de dosificación.

[0045] La Figura 12, como se analiza en el Ejemplo 17, representa una titulación de ejemplo de los artículos de prueba indicados para el fragmento de proteína iC3b, que representa su capacidad para activar la cascada del complemento. Los resultados de ejemplo mostrados en esta figura y ejemplo demuestran que el AADC de la presente divulgación (anti-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE E2) demostró una capacidad inferior para la activación del complemento en comparación con su anticuerpo activable no conjugado.

[0046] La Figura 13, como se analiza en el Ejemplo 19, representa una eficacia de ejemplo del AADC de la presente divulgación (anti-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE E2) en un modelo de xenoinjerto de ratón mediante el uso de líneas celulares colorrectales humanas. Los resultados de ejemplo mostrados en esta figura y ejemplo demuestran que el AADC de la presente divulgación mostró una inhibición significativa del crecimiento tumoral en todas las dosis, y se observó una regresión completa en las dosis más altas.

[0047] La Figura 14, como se analiza en el Ejemplo 20, representa una eficacia de ejemplo del AADC de la presente divulgación (anti-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE E2) en un modelo de xenoinjerto de ratón mediante el uso de tumores derivados de pacientes humanos (DLBCL). Los resultados de ejemplo mostrados en esta figura y

ejemplo demuestran que el AADC de la presente divulgación mostró una inhibición significativa del crecimiento tumoral después de una sola administración, y se observaron respuestas completas en algunos casos.

[0048] Las Figuras 15A, 15B y 15C, como se analizan en el Ejemplo 21, representan una eficacia de ejemplo del AADC de la presente divulgación (anti-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE E2) en modelos de xenoinjerto derivado de paciente (PDX) de ratón. Los resultados de ejemplo mostrados en estas figuras y ejemplo demuestran que el AADC de la presente divulgación demostró eficacia, incluso respuestas completas en algunos casos, en modelos de PDX derivados de una variedad de tipos de cáncer humanos.

[0049] La Figura 16, como se analiza en el Ejemplo 22, representa una eficacia de ejemplo del AADC de la presente divulgación (anti-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE E2) en un modelo de xenoinjerto derivado de paciente de ratón. Los resultados de ejemplo mostrados en esta figura y ejemplo demuestran que el AADC de la presente divulgación demostró eficacia, incluso respuestas completas en algunos casos, en modelo de cáncer de páncreas de PDX.

[0050] La Figura 17, como se analiza en el Ejemplo 10, resume los resultados que muestran que los anticuerpos activables anti-CD71 humano con toxinas conjugadas (AADC) de la presente divulgación (anti-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE E2) se toleran bien y son estables en *Macaca fascicularis*, incluso a dosis relativas más altas, en comparación con el correspondiente conjugado de fármaco-anticuerpo (ADC) anti-CD71 parental, AADC que tienen un sustrato con mayor capacidad de escisión y AADC que tienen una DAR más alta.

[0051] Las Figuras 18A, 18B y 18C, como se analizan en el Ejemplo 27, muestran el perfil separado por HIC de especies presentes en anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE no purificado y anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 purificado, así como su tasa de depuración en ratones. Estas figuras y ejemplo muestran que el anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 migra como una sola especie de conjugado y tiene una menor tasa de depuración.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0052] La presente divulgación proporciona anticuerpos activables conjugados anti-CD71 que se fijan específicamente a CD71 en un estado activado. CD71 también se conoce como proteína receptora de transferrina 1 (TfR1). En líneas generales, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo activable conjugado anti-CD71 que comprende una porción de enmascaramiento, una porción escindible, un ligador vc y

una toxina MMAE. La porción de enmascaramiento (MM) reduce la capacidad de fijación a su antígeno diana CD71 del sitio de fijación del anticuerpo cuando el anticuerpo activable está en un estado no escindido; la porción escindible (CM) es un sustrato activable por proteasa que está escindido en el microentorno tumoral, lo que da como resultado la eliminación de la porción de enmascaramiento y la activación concomitante de las CDR que se dirigen a anti-CD71. Específicamente, la presente divulgación describe la selección de un anticuerpo monoclonal activable conjugado anti-CD71 que tiene una eficacia y tolerabilidad superiores en comparación con otros anticuerpos monoclonales activables conjugados anti-CD71 conocidos en la técnica debido a que tiene la combinación única de una porción de enmascaramiento de menor afinidad, un sustrato de porción menos escindible y una baja carga de fármaco de 2, lo cual da colectivamente como resultado una eficacia y tolerabilidad significativamente mejoradas en modelos de tumor de ratón. Además, el anticuerpo monoclonal activable conjugado anti-CD71 también sorprendentemente carece de la capacidad de fijarse al receptor de FcγRIIb inhibitorio, a diferencia de otros anticuerpos que contienen un IgG1 Fc de tipo silvestre, lo cual es importante porque se sabe que la fijación a tales receptores inhibe los procesos dependientes de calcio tales como desgranulación, fagocitosis, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), liberación de citocinas y activación proinflamatoria, de los cuales se esperaría una disminución de la eficacia si se activase el receptor FcγRIIb.

[0053] CD71 es un receptor de la superficie celular que se expresa en células en división, incluso célula cancerosas. Se expresa a niveles altos en una amplia variedad de tipos de células cancerosas, y CD71 está internalizado, lo que lo convierte en una diana atractiva para el tratamiento dirigido contra el cáncer que utiliza toxinas conjugadas dirigidas por anticuerpos. Se identificaron porciones de enmascaramiento (MM) que tienen afinidades mayores y menores, así como porciones escindibles (CM) que tienen una capacidad de escisión menor o mayor, y se las utilizó para construir una variedad de anticuerpos activables y luego anticuerpos conjugados vcMMAE (es decir, conjugados de fármaco-anticuerpo activable o AADC). Los estudios de eficacia de ejemplo de estos anticuerpos activables conjugados en un modelo de xenoinjerto de ratón mostraron que los AADC con porciones de enmascaramiento de mayor afinidad (por ejemplo, CD71-TF01-3011-vcMMAE) demostraron una eficacia menor que aquellos con máscaras de menor afinidad (por ejemplo, CD71-TF02.13-3011-vcMMAE). Además, otros estudios de eficacia que usan AADC que tienen la misma máscara de menor afinidad pero con sustratos de diferente capacidad de escisión

mostraron que, si bien la eficacia era la misma, en los primates no humanos el AADC con el sustrato menos escindible (CD71-TF02.13-2011-vcMMAE) se toleró mejor y con niveles menores de AADC circulante en forma activada en comparación con el AADC con el sustrato más escindible (CD71-TF02.13-3011-vcMMAE), lo que proporciona un índice terapéutico más alto. Otros estudios mostraron que los AADC que tienen una menor relación de fármaco con respecto a anticuerpo activable (por ejemplo, CD71-TF02.13-3011-vcMMAE E2, donde DAR es 2) se toleraron mejor a dosis mayores en comparación con el mismo anticuerpo activable conjugado, con DAR más alta (es decir, DAR ~3). Además, CD71-TF02.13-3011-vcMMAE E2 mostró una eficacia equivalente con dosificaciones de dosis equiparadas al AADC de DAR más alta en una variedad de modelos de CDX y PDX de ratón de tipos de cáncer humanos. Finalmente, CD71-TF02.13-3011-vcMMAE E2 mostró una tolerabilidad significativa a su contraparte no enmascarada, que no fue tolerada incluso a dosis bajas.

[0054] En algunas formas de realización, las células que contienen CD71 internalizan los anticuerpos monoclonales activables conjugados. El uso del término “CD71” pretende cubrir cualquier variación de este, tal como, a modo de ejemplo no limitativo, CD-71 y/o CD 71, y todas las variaciones se usan de manera indistinta en la presente.

[0055] CD71 es una glicoproteína transmembrana que se fija principalmente a la transferrina. CD71 es esencial para la homeostasis celular. CD71 se recicla continuamente mediante endocitosis mediada por ligando, donde el ligando principal es la transferrina. También se sabe que CD71 se expresa de forma ubicua en las células en división.

[0056] La expresión y/o la actividad anormales de la señalización relacionada con CD71 y CD71 se han visto implicadas en la patogénesis de muchas enfermedades y trastornos, tales como el cáncer. CD71 se sobreexpresa en muchos tipos de cáncer, incluso los tipos de cáncer sólidos y hematológicos. CD71 tiene una amplia expresión de la superficie celular. CD71 en células malignas media una mayor absorción de hierro requerida para la división celular. CD71 también se asocia con un mal pronóstico en las leucemias. CD71 es una diana deseable porque es frecuente en múltiples indicaciones de cáncer.

[0057] La divulgación proporciona anticuerpos anti-CD71 activables conjugados que son útiles en métodos para tratar, prevenir, retrasar la progresión de, mejorar y/o aliviar un síntoma de una enfermedad o trastorno asociado con la expresión y/o la actividad anormales de CD71. Por ejemplo, se usan los anticuerpos anti-CD71 activables en métodos para tratar, prevenir, retrasar la progresión de, mejorar y/o

aliviar un síntoma de un cáncer u otra afección neoplásica.

[0058] La divulgación proporciona anticuerpos anti-CD71 activables conjugados que son útiles en métodos para tratar, prevenir, retrasar la progresión de, mejorar y/o aliviar un síntoma de una enfermedad o trastorno asociado con células que expresan CD71. En algunas formas de realización, las células están asociadas con la expresión y/o actividad anormales de CD71. En algunas formas de realización, las células están asociadas con la expresión y/o actividad normales de CD71. Por ejemplo, se usan los anticuerpos anti-CD71 activables en métodos para tratar, prevenir, retrasar la progresión de, mejorar y/o aliviar un síntoma de un cáncer u otra afección neoplásica.

[0059] La divulgación proporciona anticuerpos anti-CD71 activables conjugados que son útiles en métodos para tratar, prevenir, retrasar la progresión de, mejorar y/o aliviar un síntoma de una enfermedad o trastorno en el que las células enfermas expresan CD71. En algunas formas de realización, las células enfermas están asociadas con la expresión y/o actividad anormales de CD71. En algunas formas de realización, las células enfermas están asociadas con la expresión y/o actividad normales de CD71. Por ejemplo, se usan los anticuerpos anti-CD71 activables en métodos para tratar, prevenir, retrasar la progresión de, mejorar y/o aliviar un síntoma de un cáncer u otra afección neoplásica.

[0060] Los anticuerpos anti-CD71 activables conjugados incluyen un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este que se fija específicamente a CD71 acoplado a una porción de enmascaramiento (MM), de modo que el acoplamiento de la MM reduce la capacidad de fijación a CD71 del anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este. En algunas formas de realización, la MM está acoplada mediante una secuencia que incluye un sustrato para una proteasa, por ejemplo, una proteasa que se localiza conjuntamente con CD71 en un sitio de tratamiento en un sujeto.

[0061] Los anticuerpos anti-CD71 activables de ejemplo de la invención incluyen, por ejemplo, anticuerpos activables que incluyen una cadena pesada y una cadena liviana que son, o derivan de, las secuencias variable de la cadena pesada y variable de la cadena liviana que se muestran a continuación (las secuencias de CDR se muestran en negrita y subrayadas):

muM21 VH:

EVQLQESGTVLARPGASVKMSCKAS**GYTFTSYWMH**WVKQRPQGQGLEWIG**AIYPGN**
SETGYNQNFKGKAKLTAVTSASTAYMDLSSLTNEDSAVYYCTR**ENWDPGFAFWGQ**
TLITVSA (SEQ ID NO: 1)

muM21 VL:

DIVMTQTPAIMSASPGEKVTITCSASSSVYYMYWFQQKPGTSPKLWIYSTSNLASGV
VRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRNYPYTFGGGTKLEIKRA (SEQ ID
NO: 2)

Cadena pesada variable hu2vHa

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGAIYPG
NSETGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCAREENWDPGFAFWG
QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 3)

Cadena pesada variable hu2vHb

QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGAIYPGN
SETGYAQKFQGRATLTADTSTSTAYMESSLRSEDTAVYYCTRENWDPGFAFWGQ
TLVTVSS (SEQ ID NO: 4)

Cadena pesada variable hu2vHc

QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGAIYPGN
SETGYAQKFQGRATLTADTSTSTAYMESSLRSEDTAVYYCTRENWDPGFAFWGQ
TLITVSS (SEQ ID NO: 5)

Cadena liviana variable hu21vKa

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVYYMYWYQQKPGKAPKLLIYSTSNLASGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQRNYPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID
NO: 6)

Cadena liviana variable hu21vKb

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGV
PSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQQRNYPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID
NO: 7)

Cadena liviana variable hu21vKc

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCCRASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGV
PSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQQRNYPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID
NO: 8)

[0062] Los anticuerpos anti-CD71 activables de ejemplo de la invención incluyen, por ejemplo, anticuerpos activables que incluyen una combinación de una secuencia de región determinante de la complementariedad de la cadena pesada variable 1 (VH CDR1, también denominada en la presente CDRH1), una secuencia de región determinante de la complementariedad de la cadena pesada variable 2 (VH CDR2, también denominada en la presente CDRH2), una secuencia de región determinante de la complementariedad de la cadena pesada variable 3 (VH CDR3, también

denominada en la presente CDRH3), una secuencia de región determinante de la complementariedad de la cadena liviana variable 1 (VL CDR1, también denominada en la presente CDRL1), una secuencia de región determinante de la complementariedad de la cadena liviana variable 2 (VL CDR2, también denominada en la presente CDRL2), y una secuencia de región determinante de la complementariedad de la cadena liviana variable 3 (VL CDR3, también denominada en la presente CDRL3), en donde al menos una secuencia de CDR se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de VH CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSYWMH (SEQ ID NO: 9); una secuencia de VH CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos AIYPGNSETG (SEQ ID NO: 10); una secuencia de VH CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos ENWDPGFAF (SEQ ID NO: 11); una secuencia de VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos SASSSVYYMY (SEQ ID NO: 12) o CRASSSVYYMY (SEQ ID NO: 13); una secuencia de VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos STSNLAS (SEQ ID NO: 14); y una secuencia de VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQRRNYPYT (SEQ ID NO: 15).

[0063] En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este del anticuerpo activable conjugado de la presente divulgación comprende una combinación de una secuencia de VH CDR1, una secuencia de VH CDR2, una secuencia de VH CDR3, una secuencia de VL CDR1, una secuencia de VL CDR2, y una secuencia de VL CDR3, en donde al menos una secuencia de CDR se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de VH CDR1 que incluye una secuencia que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a una secuencia de VH CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSYWMH (SEQ ID NO: 9); una secuencia de VH CDR2 que incluye una secuencia que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a una secuencia de VH CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos AIYPGNSETG (SEQ ID NO: 10); una secuencia de VH CDR3 que incluye una secuencia que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a una secuencia de VH CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos ENWDPGFAF (SEQ ID NO: 11); una secuencia de VL CDR1 que incluye una secuencia que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a una secuencia de VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos ASSSVYYMY (SEQ ID NO: 12) o CRASSSVYYMY (SEQ ID NO: 13); una secuencia de VL CDR2 que incluye una secuencia que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a una secuencia de VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos STSNLAS (SEQ ID NO: 14); y una secuencia de VL CDR3 que incluye una secuencia que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a una secuencia de VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQRRNYPYT (SEQ ID NO: 15).

93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a una secuencia de VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos STSNLAS (SEQ ID NO: 14); y una secuencia de VL CDR3 que incluye una secuencia que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a una secuencia de VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQRRNYPYT (SEQ ID NO: 15).

[0064] En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este del anticuerpo activable conjugado de la presente divulgación comprende una combinación de una secuencia de VH CDR1, una secuencia de VH CDR2, una secuencia de VH CDR3, una secuencia de VL CDR1, una secuencia de VL CDR2, y una secuencia de VL CDR3, en donde la secuencia de VH CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSYWMH (SEQ ID NO: 9); la secuencia de VH CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos AIYPGNSETG (SEQ ID NO: 10); la secuencia de VH CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos ENWDPGFAF (SEQ ID NO: 11); la secuencia de VL CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos SASSSVYYMY (SEQ ID NO: 12) o CRASSSVYYMY (SEQ ID NO: 13); la secuencia de VL CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos STSNLAS (SEQ ID NO: 14); y la secuencia de VL CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos QQRRNYPYT (SEQ ID NO: 15).

[0065] En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este del anticuerpo activable conjugado de la presente divulgación comprende una combinación de una secuencia de VH CDR1, una secuencia de VH CDR2, una secuencia de VH CDR3, una secuencia de VL CDR1, una secuencia de VL CDR2, y una secuencia de VL CDR3, en donde la secuencia de VH CDR1 comprende una secuencia que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la secuencia de aminoácidos GYTFTSYWMH (SEQ ID NO: 9); la secuencia de VH CDR2 comprende una secuencia que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la secuencia de aminoácidos AIYPGNSETG (SEQ ID NO: 10); la secuencia de VH CDR3 comprende una secuencia que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la secuencia de aminoácidos ENWDPGFAF (SEQ ID NO: 11); la secuencia de VL CDR1 comprende una secuencia que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la secuencia de aminoácidos SASSSVYYMY (SEQ ID NO: 12) o CRASSSVYYMY (SEQ ID NO: 13); la secuencia de VL CDR2 comprende una secuencia que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la secuencia de aminoácidos STSNLAS (SEQ ID NO: 14); y la secuencia de VL CDR3 comprende una secuencia que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la secuencia de aminoácidos QQRRNYPYT (SEQ ID NO: 15).

93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la secuencia de aminoácidos STSNLAS (SEQ ID NO: 14); y la secuencia de VL CDR3 comprende una secuencia que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la secuencia de aminoácidos QQRNYPYT (SEQ ID NO: 15).

[0066] En algunas formas de realización, el anticuerpo del anticuerpo activable conjugado de la presente divulgación incluye un anticuerpo que se fija específicamente a CD71. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado incluye un anticuerpo monoclonal que se fija a CD71. En algunas formas de realización, tal anticuerpo monoclonal que se fija a CD71 es un anticuerpo monoclonal humanizado o completamente humano.

[0067] En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este del anticuerpo activable conjugado de la presente divulgación comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 5. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este del anticuerpo activable conjugado de la presente divulgación comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana que comprende SEQ ID NO: 7. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este del anticuerpo activable conjugado de la presente divulgación comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 5, y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana o fragmento de fijación al antígeno de esta que comprende SEQ ID NO: 7.

[0068] En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este del anticuerpo activable conjugado de la presente divulgación comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 5. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este del anticuerpo activable conjugado de la presente divulgación comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 7. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este del anticuerpo activable conjugado de la presente divulgación comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 5.

95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 1 y 3-5, y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 7.

[0069] En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este del anticuerpo activable conjugado de la presente divulgación está codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 5. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este del anticuerpo activable conjugado de la presente divulgación está codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 7. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este del anticuerpo activable conjugado de la presente divulgación está codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 5, y una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 7.

[0070] En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este del anticuerpo activable conjugado de la presente divulgación está codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 5. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este del anticuerpo activable conjugado de la presente divulgación está codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 7. En algunas formas de

realización, el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este del anticuerpo activable conjugado de la presente divulgación está codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 5, y una secuencia de ácido nucleico que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 7.

[0071] La divulgación también proporciona métodos para producir un anticuerpo activable de un anticuerpo activable conjugado de la divulgación al cultivar una célula en condiciones que conducen a la expresión del anticuerpo activable, en donde la célula comprende una molécula de ácido nucleico de la divulgación o un vector de la divulgación.

[0072] La divulgación también proporciona anticuerpos activables conjugados que incluyen un anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este que se fija específicamente a CD71 acoplado a una porción de enmascaramiento (MM), de modo que el acoplamiento de la MM reduce la capacidad de fijación a CD71 del anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno de este. En algunas formas de realización, la MM está acoplada mediante una secuencia que incluye un sustrato para una proteasa, por ejemplo, una proteasa que se encuentra activa en tejido enfermo y/o una proteasa que se localiza conjuntamente con CD71 en un sitio de tratamiento en un sujeto. Los anticuerpos anti-CD71 activables conjugados proporcionados en la presente, también denominados en la presente anticuerpos activables conjugados anti-CD71 o anticuerpos activables conjugados contra CD71 de manera indistinta, son estables en circulación, se activan en los sitios deseados de tratamiento y/o diagnóstico pero no en sitios normales, por ejemplo, tejido sano u otro tejido al que no se dirige el tratamiento y/o diagnóstico, y, cuando se activan, exhiben una fijación a CD71 que es al menos comparable al correspondiente anticuerpo no modificado, también denominado en la presente anticuerpo parental.

[0073] La invención también proporciona métodos para tratar, prevenir y/o retrasar el inicio o la progresión de, o aliviar un síntoma asociado con la expresión y/o actividad anormales de CD71 en un sujeto mediante el uso de anticuerpos activables conjugados que se fijan a CD71, particularmente anticuerpos activables conjugados

que se fijan a, y neutralizan o inhiben de otro modo, al menos una actividad biológica de CD71 y/o la señalización mediada por CD71.

[0074] La invención también proporciona métodos para tratar, prevenir y/o retrasar el inicio o la progresión de, o aliviar un síntoma asociado con la presencia, crecimiento, proliferación, metástasis y/o actividad de células que expresan CD71 o que expresan de manera anormal CD71 en un sujeto mediante el uso de anticuerpos activables conjugados que se fijan a CD71, particularmente anticuerpos activables que se fijan a, se dirigen a, neutralizan, matan o inhiben de otro modo al menos una actividad biológica de células que expresan o expresan de manera anormal CD71.

[0075] La invención también proporciona métodos para tratar, prevenir y/o retrasar el inicio o la progresión de, o aliviar un síntoma asociado con la presencia, crecimiento, proliferación, metástasis y/o actividad de células que expresan CD71 en un sujeto mediante el uso de anticuerpos activables conjugados que se fijan a CD71, particularmente anticuerpos activables que se fijan a, se dirigen a, neutralizan, matan o inhiben de otro modo al menos una actividad biológica de células que expresan CD71.

[0076] La invención también proporciona métodos para tratar, prevenir y/o retrasar el inicio o la progresión de, o aliviar un síntoma asociado con la presencia, crecimiento, proliferación, metástasis y/o actividad de células que expresan de manera anormal CD71 en un sujeto mediante el uso de anticuerpos activables conjugados que se fijan a CD71, particularmente anticuerpos activables conjugados que se fijan a, se dirigen a, neutralizan, matan o inhiben de otro modo al menos una actividad biológica de células que expresan de manera anormal CD71.

[0077] Los anticuerpos activables conjugados en un estado activado se fijan a CD71 e incluyen (i) un anticuerpo (AB) que se fija específicamente a CD71; (ii) una porción de enmascaramiento (MM) que, cuando el anticuerpo activable está en un estado no escindido, inhibe la fijación del AB a CD71; y (c) una porción escindible (CM) acoplada al AB, en donde la CM es un polipéptido que funciona como un sustrato para una proteasa.

[0078] En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado en el estado no escindido tiene la disposición estructural desde el terminal N al terminal C de la siguiente manera: MM-CM-AB o AB-CM-MM.

[0079] En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado comprende un péptido de enlace entre la MM y la CM.

[0080] En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado comprende un péptido de enlace entre la CM y el AB.

[0081] En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado comprende un primer péptido de enlace (LP1) y un segundo péptido de enlace (LP2), y en donde el anticuerpo activable conjugado en el estado no escindido tiene la disposición estructural desde el terminal N al terminal C de la siguiente manera: MM-LP1-CM-LP2-AB o AB-LP2-CM-LP1-MM. En algunas formas de realización, los dos péptidos de enlace no necesitan ser idénticos entre sí.

[0082] En algunas formas de realización, al menos una de LP1 o LP2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en (GS)_n, (GGS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 24) y (GGGS)_n (SEQ ID NO: 25), donde n es un número entero de al menos uno.

[0083] En algunas formas de realización, al menos una de LP1 o LP2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en GGSG (SEQ ID NO: 26), GGSGG (SEQ ID NO: 27), GSGSG (SEQ ID NO: 28), GSGGG (SEQ ID NO: 29), GGGSG (SEQ ID NO: 30), y GSSSG (SEQ ID NO: 31).

[0084] En algunas formas de realización, LP1 comprende la secuencia de aminoácidos GGGSSGGS (SEQ ID NO: 207), GSSGGSGGSGGSG (SEQ ID NO: 32), GSSGGSGGSGG (SEQ ID NO: 33), GSSGGSGGSGGS (SEQ ID NO: 34), GSSGGSGGSGGSGGGS (SEQ ID NO: 35), GSSGGSGGSG (SEQ ID NO: 36), GSSGGSGGSGS (SEQ ID NO: 37).

[0085] En algunas formas de realización, LP2 comprende la secuencia de aminoácidos GSS, GGS, GGGS (SEQ ID NO: 38), GSSGT (SEQ ID NO: 39) o GSSG (SEQ ID NO: 40).

[0086] En algunas formas de realización, el AB tiene una constante de disociación de alrededor de 100 nM o menos para fijarse a CD71 de mamífero. En algunas formas de realización, el AB tiene una constante de disociación de alrededor de 10 nM o menos para fijarse a CD71 de mamífero. En algunas formas de realización, el AB tiene una constante de disociación de alrededor de 5 nM o menos para fijarse a CD71. En algunas formas de realización, el AB tiene una constante de disociación de alrededor de 1 nM o menos para fijarse a CD71. En algunas formas de realización, el AB tiene una constante de disociación de alrededor de 0,5 nM o menos para fijarse a CD71. En algunas formas de realización, el AB tiene una constante de disociación de alrededor de 0,1 nM o menos para fijarse a CD71. En algunas formas de realización, el AB tiene una constante de disociación de 0,01 nM a 100 nM, 0,01 nM a 10 nM, 0,01 nM a 5 nM, 0,01 nM a 1 nM, 0,01 a 0,5 nM, 0,01 nm a 0,1 nM, 0,01 nm a 0,05 nM, 0,05 nM a 100 nM, 0,05 nM a 10 nM, 0,05 nM a 5 nM, 0,05 nM a 1 nM, 0,05 a 0,5 nM, 0,05 nm a 0,1

nM, 0,1 nM a 100 nM, 0,1 nM a 10 nM, 0,1 nM a 5 nM, 0,1 nM a 1 nM, 0,1 a 0,5 nM, 0,5 nM a 100 nM, 0,5 nM a 10 nM, 0,5 nM a 5 nM, 0,5 nM a 1 nM, 1 nM a 100 nM, 1 nM a 10 nM, 1 nM a 5 nM, 5 nM a 100 nM, 5 nM a 10 nM, o 10 nM a 100 nM, para fijarse a CD71 de mamífero.

[0087] En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado en un estado no escindido se fija específicamente a CD71 de mamífero con una constante de disociación menor o igual a 1 nM, menor o igual a 5 nM, menor o igual a 10 nM, menor o igual a 15 nM, menor o igual a 20 nM, menor o igual a 25 nM, menor o igual a 50 nM, menor o igual a 100 nM, menor o igual a 150 nM, menor o igual a 250 nM, menor o igual a 500 nM, menor o igual a 750 nM, menor o igual a 1000 nM, y/o menor o igual a 2000 nM.

[0088] En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado en un estado no escindido se fija específicamente a CD71 de mamífero con una constante de disociación en el rango de 1 nM a 2000 nM, 1 nM a 1000 nM, 1 nM a 750 nM, 1 nM a 500 nM, 1 nM a 250 nM, 1 nM a 150 nM, 1 nM a 100 nM, 1 nM a 50 nM, 1 nM a 25 nM, 1 nM a 15 nM, 1 nM a 10 nM, 1 nM a 5 nM, 5 nM a 2000 nM, 5 nM a 1000 nM, 5 nM a 750 nM, 5 nM a 500 nM, 5 nM a 250 nM, 5 nM a 150 nM, 5 nM a 100 nM, 5 nM a 50 nM, 5 nM a 25 nM, 5 nM a 15 nM, 5 nM a 10 nM, 10 nM a 2000 nM, 10 nM a 1000 nM, 10 nM a 750 nM, 10 nM a 500 nM, 10 nM a 250 nM, 10 nM a 150 nM, 10 nM a 100 nM, 10 nM a 50 nM, 10 nM a 25 nM, 10 nM a 15 nM, 15 nM a 2000 nM, 15 nM a 1000 nM, 15 nM a 750 nM, 15 nM a 500 nM, 15 nM a 250 nM, 15 nM a 150 nM, 15 nM a 100 nM, 15 nM a 50 nM, 15 nM a 25 nM, 25 nM a 2000 nM, 25 nM a 1000 nM, 25 nM a 750 nM, 25 nM a 500 nM, 25 nM a 250 nM, 25 nM a 150 nM, 25 nM a 100 nM, 25 nM a 50 nM, 50 nM a 2000 nM, 50 nM a 1000 nM, 50 nM a 750 nM, 50 nM a 500 nM, 50 nM a 250 nM, 50 nM a 150 nM, 50 nM a 100 nM, 100 nM a 2000 nM, 100 nM a 1000 nM, 100 nM a 750 nM, 100 nM a 500 nM, 100 nM a 250 nM, 100 nM a 150 nM, 150 nM a 2000 nM, 150 nM a 1000 nM, 150 nM a 750 nM, 150 nM a 500 nM, 150 nM a 250 nM, 250 nM a 2000 nM, 250 nM a 1000 nM, 250 nM a 750 nM, 250 nM a 500 nM, 500 nM a 2000 nM, 500 nM a 1000 nM, 500 nM a 750 nM, 500 nM a 500 nM, 500 nM a 250 nM, 500 nM a 150 nM, 500 nM a 100 nM, 500 nM a 50 nM, 750 nM a 2000 nM, 750 nM a 1000 nM o 1000 nM a 2000 nM.

[0089] En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado en un estado activado se fija específicamente a CD71 de mamífero con una constante de disociación menor o igual a 0,01 nM, 0,05 nM, 0,1 nM, 0,5 nM, 1 nM, 5 nM o 10 nM.

[0090] En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado en un

estado activado se fija específicamente a CD71 de mamífero con una constante de disociación en el rango de 0,01 nM a 100 nM, 0,01 nM a 10 nM, 0,01 nM a 5 nM, 0,01 nM a 1 nM, 0,01 a 0,5 nM, 0,01 nm a 0,1 nM, 0,01 nm a 0,05 nM, 0,05 nM a 100 nM, 0,05 nM a 10 nM, 0,05 nM a 5 nM, 0,05 nM a 1 nM, 0,05 a 0,5 nM, 0,05 nm a 0,1 nM, 0,1 nM a 100 nM, 0,1 nM a 10 nM, 0,1 nM a 5 nM, 0,1 nM a 1 nM, 0,1 a 0,5 nM, 0,5 nM a 100 nM, 0,5 nM a 10 nM, 0,5 nM a 5 nM, 0,5 nM a 1 nM, 1 nM a 100 nM, 1 nM a 10 nM, 1 nM a 5 nM, 5 nM a 100 nM, 5 nM a 10 nM o 10 nM a 100 nM.

[0091] En algunas formas de realización, el CD71 de mamífero se selecciona del grupo que consiste en un CD71 humano, un CD71 murino, un CD71 de rata y un CD71 de *Macaca fascicularis*. En algunas formas de realización, el AB se fija específicamente a CD71 humano, CD71 murino o CD71 de *Macaca fascicularis* con una constante de disociación de menos de 1 nM. En algunas formas de realización, el CD71 de mamífero es un CD71 humano.

[0092] En algunas formas de realización, el AB tiene una o más de las siguientes características: (a) el AB se fija específicamente a CD71 humano; y (b) el AB se fija específicamente a CD71 humano y a CD71 de *Macaca fascicularis*.

[0093] En algunas formas de realización, el AB tiene una o más de las siguientes características: (a) el AB se fija específicamente a CD71 humano y CD71 de *Macaca fascicularis*; (b) el AB inhibe la fijación de transferrina a CD71 de mamífero; (c) el AB inhibe la fijación de transferrina humana a CD71 humano; y (d) el AB inhibe la fijación de transferrina de *Macaca fascicularis* a CD71 de *Macaca fascicularis*.

[0094] En algunas formas de realización, el AB bloquea la capacidad de fijación a CD71 de mamífero de un ligando natural con una EC_{50} menor o igual a 5 nM, menor o igual a 10 nM, menor o igual a 50 nM, menor o igual a 100 nM, menor o igual a 500 nM, y/o menor o igual a 1000 nM. En algunas formas de realización, el AB bloquea la capacidad de fijación a CD71 de mamífero de una transferrina con una EC_{50} menor o igual a 5 nM, menor o igual a 10 nM, menor o igual a 50 nM, menor o igual a 100 nM, menor o igual a 500 nM, y/o menor o igual a 1000 nM. En algunas formas de realización, el ligando natural de CD71 es transferrina.

[0095] En algunas formas de realización, el AB bloquea la capacidad de fijación a CD71 de mamífero de un ligando natural con una EC_{50} de 5 nM a 1000 nM, 5 nM a 500 nM, 5 nM a 100 nM 5 nM a 50 nM, 5 nM a 10 nM, 10 nM a 1000 nM, 10 nM a 500 nM, 10 nM a 100 nM, 10 nM a 50 nM, 50 nM a 1000 nM, 50 nM a 500 nM, 50 nM a 100 nM, 100 nM a 1000 nM, 100 nM a 500 nM, 500 nM a 1000 nM. En algunas formas de realización, el AB bloquea la capacidad de fijación a CD71 de mamífero de una

transferrina con una EC_{50} de 5 nM a 1000 nM, 5 nM a 500 nM, 5 nM a 100 nM 5 nM a 50 nM, 5 nM a 10 nM, 10 nM a 1000 nM, 10 nM a 500 nM, 10 nM a 100 nM, 10 nM a 50 nM, 50 nM a 1000 nM, 50 nM a 500 nM, 50 nM a 100 nM, 100 nM a 1000 nM, 100 nM a 500 nM, 500 nM a 1000 nM. En algunas formas de realización, el ligando natural de CD71 es transferrina.

[0096] En algunas formas de realización, el AB de la presente divulgación inhibe o reduce el crecimiento, la proliferación y/o la metástasis de células que expresan CD71 de mamífero. Sin pretender limitarse a teoría alguna, el AB de la presente divulgación puede inhibir o reducir el crecimiento, la proliferación y/o la metástasis de células que expresan CD71 de mamífero al fijarse específicamente a CD71 e inhibir, bloquear y/o prevenir la fijación de un ligando natural a CD71 de mamífero. En algunas formas de realización, el ligando natural de CD71 de mamífero es transferrina.

[0097] En algunas formas de realización, la MM tiene una constante de disociación para fijarse al AB que es mayor que la constante de disociación del AB para CD71.

[0098] En algunas formas de realización, la MM tiene una constante de disociación para fijarse al AB que no es mayor que la constante de disociación del AB para CD71.

[0099] En algunas formas de realización, la MM tiene una constante de disociación para fijarse al AB que es menor que la constante de disociación del AB para CD71.

[00100] En algunas formas de realización, la constante de disociación (K_d) de la MM hacia el AB no es más de 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 50.000, 100.000, 500.000, 1.000.000, 5.000.000, 10.000.000, 50.000.000 veces o más, o entre 1-5, 5-10, 10-100, 10-1.000, 10-10.000, 10-100.000, 10-1.000.000, 10-10.000.000, 100-1.000, 100-10.000, 100-100.000, 100-1.000.000, 100-10.000.000, 1.000-10.000, 1.000-100.000, 1.000-1.000.000, 1000-10.000.000, 10.000-100.000, 10.000-1.000.000, 10.000-10.000.000, 100.000-1.000.000, o 100.000-10.000.000 veces o más la constante de disociación del AB hacia la diana.

[00101] En algunas formas de realización, la MM no interfiere ni compite con el AB por la fijación a CD71 cuando el anticuerpo activable está en un estado escindido.

[00102] En algunas formas de realización, la MM es un polipéptido de alrededor de 2 a 40 aminoácidos de longitud. En algunas formas de realización, la MM es un polipéptido de hasta alrededor de 40 aminoácidos de longitud.

[00103] En algunas formas de realización, la secuencia de polipéptidos MM es diferente de la de CD71. En algunas formas de realización, la secuencia de polipéptidos MM no es más de 50 % idéntica a cualquier componente de fijación natural del AB. En algunas formas de realización, la secuencia de polipéptidos MM es

diferente de la de CD71 y no es más de 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 % o 10 % idéntica a cualquier componente de fijación natural del AB.

[00104] En algunas formas de realización, el acoplamiento de la MM al AB reduce la capacidad de fijación a CD71 del AB, de modo que la constante de disociación (K_d) del AB cuando está acoplado a la MM hacia CD71 es al menos dos veces mayor que la K_d del AB cuando no está acoplado a la MM hacia CD71.

[00105] En algunas formas de realización, el acoplamiento de la MM al AB reduce la capacidad de fijación a CD71 del AB, de modo que la constante de disociación (K_d) del AB cuando está acoplado a la MM hacia CD71 es al menos cinco veces mayor que la K_d del AB cuando no está acoplado a la MM hacia CD71.

[00106] En algunas formas de realización, el acoplamiento de la MM al AB reduce la capacidad de fijación a CD71 del AB, de modo que la constante de disociación (K_d) del AB cuando está acoplado a la MM hacia CD71 es al menos 10 veces mayor que la K_d del AB cuando no está acoplado a la MM hacia CD71.

[00107] En algunas formas de realización, el acoplamiento de la MM al AB reduce la capacidad de fijación a CD71 del AB, de modo que la constante de disociación (K_d) del AB cuando está acoplado a la MM hacia CD71 es al menos 20 veces mayor que la K_d del AB cuando no está acoplado a la MM hacia CD71.

[00108] En algunas formas de realización, el acoplamiento de la MM al AB reduce la capacidad de fijación a CD71 del AB, de modo que la constante de disociación (K_d) del AB cuando está acoplado a la MM hacia CD71 es al menos 40 veces mayor que la K_d del AB cuando no está acoplado a la MM hacia CD71.

[00109] En algunas formas de realización, el acoplamiento de la MM al AB reduce la capacidad de fijación a CD71 del AB, de modo que la constante de disociación (K_d) del AB cuando está acoplado a la MM hacia CD71 es al menos 100 veces mayor que la K_d del AB cuando no está acoplado a la MM hacia CD71.

[00110] En algunas formas de realización, el acoplamiento de la MM al AB reduce la capacidad de fijación a CD71 del AB, de modo que la constante de disociación (K_d) del AB cuando está acoplado a la MM hacia CD71 es al menos 1000 veces mayor que la K_d del AB cuando no está acoplado a la MM hacia CD71.

[0100] En algunas formas de realización, el acoplamiento de la MM al AB reduce la capacidad de fijación a CD71 del AB, de modo que la constante de disociación (K_d) del AB cuando está acoplado a la MM hacia CD71 es al menos 10.000 veces mayor que la K_d del AB cuando no está acoplado a la MM hacia CD71.

[0101] En algunas formas de realización, en presencia de CD71, la MM reduce la

capacidad de fijación a CD71 del AB en al menos 90 % cuando la CM no está escindida, en comparación con cuando la CM está escindida cuando se analiza *in vitro* con un ensayo de desplazamiento de diana tal como, por ejemplo, el ensayo descrito en la publicación PCT N.º WO 2010/081173, cuyos contenidos se incorporan en la presente por referencia en su totalidad.

[0102] En algunas formas de realización, MM comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16 o 18.

[0103] En algunas formas de realización, la proteasa que escinde la CM está activa, por ejemplo, regulada de manera ascendente o de otro modo no regulada, en tejido enfermo, y la proteasa escinde la CM en el anticuerpo activable cuando el anticuerpo activable está expuesto a la proteasa.

[0104] En algunas formas de realización, la proteasa se localiza conjuntamente con CD71 en un tejido, y la proteasa escinde la CM en el anticuerpo activable conjugado cuando el anticuerpo activable está expuesto a la proteasa.

[0105] En algunas formas de realización, la CM se ubica en el anticuerpo activable conjugado de tal manera que, cuando el anticuerpo activable conjugado está en el estado no escindido, la fijación del anticuerpo activable conjugado a CD71 se reduce para producirse con una constante de disociación que es al menos dos veces mayor que la constante de disociación de una fijación de AB sin modificar a CD71, mientras que, en el estado escindido (es decir, cuando el anticuerpo activable conjugado está en el estado escindido), el AB se fija a CD71.

[0106] En algunas formas de realización, la CM se ubica en el anticuerpo activable conjugado de tal manera que, cuando el anticuerpo activable conjugado está en el estado no escindido, la fijación del anticuerpo activable a CD71 se reduce para producirse con una constante de disociación que es al menos cinco veces mayor que la constante de disociación de una fijación de AB sin modificar a CD71, mientras que, en el estado escindido (es decir, cuando el anticuerpo activable conjugado está en el estado escindido), el AB se fija a CD71.

[0107] En algunas formas de realización, la CM se ubica en el anticuerpo activable conjugado de tal manera que, cuando el anticuerpo activable conjugado está en el estado no escindido, la fijación del anticuerpo activable a CD71 se reduce para producirse con una constante de disociación que es al menos 10 veces mayor que la constante de disociación de una fijación de AB sin modificar a CD71, mientras que, en el estado escindido (es decir, cuando el anticuerpo activable conjugado está en el estado escindido), el AB se fija a CD71.

[0108] En algunas formas de realización, la CM se ubica en el anticuerpo activable conjugado de tal manera que, cuando el anticuerpo activable conjugado está en el estado no escindido, la fijación del anticuerpo activable conjugado a CD71 se reduce para producirse con una constante de disociación que es al menos 20 veces mayor que la constante de disociación de una fijación de AB sin modificar a CD71, mientras que, en el estado escindido (es decir, cuando el anticuerpo activable conjugado está en el estado escindido), el AB se fija a CD71.

[0109] En algunas formas de realización, la CM se ubica en el anticuerpo activable conjugado de tal manera que, cuando el anticuerpo activable conjugado está en el estado no escindido, la fijación del anticuerpo activable conjugado a CD71 se reduce para producirse con una constante de disociación que es al menos 40 veces mayor que la constante de disociación de una fijación de AB sin modificar a CD71, mientras que, en el estado escindido, el AB se fija a CD71.

[0110] En algunas formas de realización, la CM se ubica en el anticuerpo activable conjugado de tal manera que, cuando el anticuerpo activable conjugado está en el estado no escindido, la fijación del anticuerpo activable conjugado a CD71 se reduce para producirse con una constante de disociación que es al menos 50 veces mayor que la constante de disociación de una fijación de AB sin modificar a CD71, mientras que, en el estado escindido, el AB se fija a CD71.

[0111] En algunas formas de realización, la CM se ubica en el anticuerpo activable conjugado de tal manera que, cuando el anticuerpo activable conjugado está en el estado no escindido, la fijación del anticuerpo activable conjugado a CD71 se reduce para producirse con una constante de disociación que es al menos 100 veces mayor que la constante de disociación de una fijación de AB sin modificar a CD71, mientras que, en el estado escindido, el AB se fija a CD71.

[0112] En algunas formas de realización, la CM se ubica en el anticuerpo activable conjugado de tal manera que, cuando el anticuerpo activable conjugado está en el estado no escindido, la fijación del anticuerpo activable conjugado a CD71 se reduce para producirse con una constante de disociación que es al menos 200 veces mayor que la constante de disociación de una fijación de AB sin modificar a CD71, mientras que, en el estado escindido, el AB se fija a CD71.

[0113] En algunas formas de realización, la CM es un polipéptido de hasta 15 aminoácidos de longitud.

[0114] En algunas formas de realización, la CM es un polipéptido que incluye una primera porción escindible (CM1) que es un sustrato para al menos una

metaloproteasa de la matriz (MMP) y una segunda porción escindible (CM2) que es un sustrato para al menos una serina proteasa (SP). En algunas formas de realización, cada una de la secuencia de sustrato CM1 y la secuencia de sustrato CM2 del sustrato CM1-CM2 es independientemente un polipéptido de hasta 15 aminoácidos de longitud.

[0115] En algunas formas de realización, la CM es un sustrato para al menos una proteasa que está, o que se cree que está, regulada de manera ascendente o de otro modo no regulada en el cáncer.

[0116] En algunas formas de realización, la CM es un sustrato para al menos una proteasa seleccionada del grupo que consiste en una metaloproteasa de la matriz (MMP), trombina, una elastasa neutrófila, una cisteína proteasa, legumaina y una serina proteasa, tal como matriptasa (MT-SP1) y uroquinasa (uPA). Sin limitarse a la teoría, se cree que estas proteasas están reguladas de manera ascendente o de otro modo no reguladas en al menos uno de un tipo de cáncer.

[0117] En algunas formas de realización, la CM se selecciona para su uso con una proteasa específica, por ejemplo, una proteasa que se sabe que se localiza conjuntamente con la diana del anticuerpo activable.

[0118] En algunas formas de realización, la CM es un sustrato para al menos una MMP. En algunas formas de realización, la CM es un sustrato para una proteasa seleccionada del grupo que consiste en MMP 9, MMP14, MMP1, MMP3, MMP13, MMP17, MMP11 y MMP19. En algunas formas de realización, la CM es un sustrato para MMP9. En algunas formas de realización, la CM es un sustrato para MMP14.

[0119] En algunas formas de realización, la CM es un sustrato que incluye la secuencia TGRGPSWV (SEQ ID NO: 41); SARGPSRW (SEQ ID NO: 42); TARGPSFK (SEQ ID NO: 43); LSGRSDNH (SEQ ID NO: 44); GGWHTGRN (SEQ ID NO: 45); HTGRSGAL (SEQ ID NO: 46); PLTGRSGG (SEQ ID NO: 47); AARGPAIH (SEQ ID NO: 48); RGPAFNPM (SEQ ID NO: 49); SSRGPAYL (SEQ ID NO: 50); RGPATPIM (SEQ ID NO: 51); RGPA (SEQ ID NO: 52); GGQPSGMWGW (SEQ ID NO: 53); FPRPLGITGL (SEQ ID NO: 54); VHMLPLGFLGP (SEQ ID NO: 55); SPLTGRSG (SEQ ID NO: 56); SAGFSLPA (SEQ ID NO: 57); LAPLGLQRR (SEQ ID NO: 58); SGGPLGVR (SEQ ID NO: 59); PLGL (SEQ ID NO: 60); LSGRSGNH (SEQ ID NO: 175); SGRSANPRG (SEQ ID NO: 176); LSGRSDDH (SEQ ID NO: 177); LSGRSDIH (SEQ ID NO: 178); LSGRSDQH (SEQ ID NO: 179); LSGRSDTH (SEQ ID NO: 180); LSGRSDYH (SEQ ID NO: 181); LSGRSDNP (SEQ ID NO: 182); LSGRSANP (SEQ ID NO: 183); LSGRSANI (SEQ ID NO: 184); LSGRSDNI (SEQ ID NO: 185); MIAPVAYR (SEQ ID NO: 186); RPSPMWAY (SEQ ID NO: 187); WATPRPMR (SEQ ID NO: 188);

FRLLDWQW (SEQ ID NO: 189); ISSGL (SEQ ID NO: 190); ISSGLLS (SEQ ID NO: 191); y/o ISSGLL (SEQ ID NO: 192).

[0120] En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos LSGRSDNH (SEQ ID NO: 44). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos TGRGPSWV (SEQ ID NO: 41). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos PLTGRSGG (SEQ ID NO: 47). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos GGQPSGMWGW (SEQ ID NO: 53). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos FPRPLGITGL (SEQ ID NO: 54). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos VHMP LGFLGP (SEQ ID NO: 55). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos PLGL (SEQ ID NO: 60). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos SARGPSRW (SEQ ID NO: 42). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos TARGPSFK (SEQ ID NO: 43). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos GGWHTGRN (SEQ ID NO: 45). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos HTGRSGAL (SEQ ID NO: 46). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos AARGPAIH (SEQ ID NO: 48). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos RGP AFNPM (SEQ ID NO: 49). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos SSRGPAYL (SEQ ID NO: 50). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos RGPATPIM (SEQ ID NO: 51). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos RGPA (SEQ ID NO: 52). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos LSGRSGNH (SEQ ID NO: 175). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos SGRSANPRG (SEQ ID NO: 176). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos LSGRSDDH (SEQ ID NO: 177). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos LSGRSDIH (SEQ ID NO: 178). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos LSGRSDQH (SEQ ID NO: 179). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos LSGRSDTH (SEQ ID NO: 180). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos LSGRSDYH (SEQ ID NO: 181). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos LSGRSDNP (SEQ ID NO: 182). En algunas formas de realización, la

CM comprende la secuencia de aminoácidos LSGRSANP (SEQ ID NO: 183). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos LSGRSANI (SEQ ID NO: 184). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos LSGRSDNI (SEQ ID NO: 185). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos MIAPVAYR (SEQ ID NO: 186). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos RPSPMWAY (SEQ ID NO: 187). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos WATPRPMR (SEQ ID NO: 188). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos FRLLDWQW (SEQ ID NO: 189). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos ISSGL (SEQ ID NO: 190). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos ISSGLLS (SEQ ID NO: 191). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos y/o ISSGLL (SEQ ID NO: 192).

[0121] En algunas formas de realización, la CM es un sustrato para una MMP e incluye la secuencia ISSGLSS (SEQ ID NO: 61); QNQALRMA (SEQ ID NO: 62); AQNLLGMV (SEQ ID NO: 63); STFPFGMF (SEQ ID NO: 64); PVGYTSSL (SEQ ID NO: 65); DWLYWPGI (SEQ ID NO: 66), ISSGLLS (SEQ ID NO: 67), LKAAPRWA (SEQ ID NO: 68); GPSHLVLT (SEQ ID NO: 69); LPGGLSPW (SEQ ID NO: 70); MGLFSEAG (SEQ ID NO: 71); SPLPLRVP (SEQ ID NO: 72); RMHLRSLG (SEQ ID NO: 73); LAAPLGLL (SEQ ID NO: 74); AVGLLAPP (SEQ ID NO: 75); LLAPSHRA (SEQ ID NO: 76); y/o PAGLWLDP (SEQ ID NO: 77).

[0122] En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos ISSGLSS (SEQ ID NO: 61). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos QNQALRMA (SEQ ID NO: 62). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos AQNLLGMV (SEQ ID NO: 63). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos STFPFGMF (SEQ ID NO: 64). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos PVGYTSSL (SEQ ID NO: 65). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos DWLYWPGI (SEQ ID NO: 66). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos ISSGLLS (SEQ ID NO: 67). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos LKAAPRWA (SEQ ID NO: 68). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos GPSHLVLT (SEQ ID NO: 69). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de

aminoácidos LPGGLSPW (SEQ ID NO: 70). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos MGLFSEAG (SEQ ID NO: 71). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos SPLPLRVP (SEQ ID NO: 72). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos RMHLRSLG (SEQ ID NO: 73). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos LAAPLGLL (SEQ ID NO: 74). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos AVGLLAPP (SEQ ID NO: 75). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos LLAPSHRA (SEQ ID NO: 76). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos PAGLWLDP (SEQ ID NO: 77).

[0123] En algunas formas de realización, la CM es un sustrato para trombina. En algunas formas de realización, la CM es un sustrato para trombina e incluye la secuencia GPRSFG (SEQ ID NO: 78) o GPRSFG (SEQ ID NO: 79). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos GPRSFG (SEQ ID NO: 78). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos GPRSFG (SEQ ID NO: 79).

[0124] En algunas formas de realización, la CM comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en NTLGRSENHSG (SEQ ID NO: 80); NTLGRSGNHGS (SEQ ID NO: 81); TSTGRSANPRG (SEQ ID NO: 82); TSGRSANP (SEQ ID NO: 83); VAGRSMRP (SEQ ID NO: 84); VVPEGRRS (SEQ ID NO: 85); ILPRSPAF (SEQ ID NO: 86); MVLGRSLL (SEQ ID NO: 87); QGRAITFI (SEQ ID NO: 88); SPRSIMLA (SEQ ID NO: 89); y SMLRSMPL (SEQ ID NO: 90).

[0125] En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos NTLGRSENHSG (SEQ ID NO: 80). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos NTLGRSGNHGS (SEQ ID NO: 81). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos TSTGRSANPRG (SEQ ID NO: 82). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos TSGRSANP (SEQ ID NO: 83). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos VAGRSMRP (SEQ ID NO: 84). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos VVPEGRRS (SEQ ID NO: 85). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos ILPRSPAF (SEQ ID NO: 86). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos MVLGRSLL (SEQ ID NO: 87). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos QGRAITFI (SEQ ID NO: 88). En algunas formas de realización, la CM

comprende la secuencia de aminoácidos SPRSIMLA (SEQ ID NO: 89). En algunas formas de realización, la CM comprende la secuencia de aminoácidos SMLRSMPL (SEQ ID NO: 90).

[0126] En algunas formas de realización, la CM es un sustrato para una elastasa neutrófila. En algunas formas de realización, la CM es un sustrato para una serina proteasa. En algunas formas de realización, la CM es un sustrato para uPA. En algunas formas de realización, la CM es un sustrato para legumina. En algunas formas de realización, la CM es un sustrato para matriptasa. En algunas formas de realización, la CM es un sustrato para una cisteína proteasa. En algunas formas de realización, la CM es un sustrato para una cisteína proteasa, tal como una catepsina.

[0127] En algunas formas de realización, la CM es un sustrato CM1-CM2 e incluye la secuencia ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 91); ISSGLLSSGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO: 92); AVGLLAPPGGTSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 93); TSTSGRSANPRGGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 94); VHMP LGFLGPGGTSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 95); TSTSGRSANPRGGGVHMP LGFLGPG (SEQ ID NO: 96); AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 97); LSGRSDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 98); VHMP LGFLGPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 99); LSGRSDNHGGGVHMP LGFLGPG (SEQ ID NO: 100); LSGRSDNHGGSGGSISSGLLSS (SEQ ID NO: 101); LSGRSGNHGGSGGSISSGLLSS (SEQ ID NO: 102); ISSGLLSSGGSGGSLSGRSGNH (SEQ ID NO: 103); LSGRSDNHGGSGGSGQNQALRMA (SEQ ID NO: 104); QNQALRMAGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO: 105); LSGRSGNHGGSGGSGQNQALRMA (SEQ ID NO: 106); QNQALRMAGGSGGSLSGRSGNH (SEQ ID NO: 107); ISSGLLSGRSGNH (SEQ ID NO: 108); ISSGLLSGRSANPRG (SEQ ID NO: 148); AVGLLAPPTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 149); AVGLLAPPSGRSANPRG (SEQ ID NO: 150); ISSGLLSGRSDDH (SEQ ID NO: 151); ISSGLLSGRSDIH (SEQ ID NO: 152); ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 153); ISSGLLSGRSDTH (SEQ ID NO: 154); ISSGLLSGRSDYH (SEQ ID NO: 155); ISSGLLSGRSDNP (SEQ ID NO: 156); ISSGLLSGRSANP (SEQ ID NO: 157); ISSGLLSGRSANI (SEQ ID NO: 158); AVGLLAPPGGLSGRSDDH (SEQ ID NO: 159); AVGLLAPPGGLSGRSDIH (SEQ ID NO: 160); AVGLLAPPGGLSGRSDQH (SEQ ID NO: 161); AVGLLAPPGGLSGRSDTH (SEQ ID NO: 162); AVGLLAPPGGLSGRSDYH (SEQ ID NO: 163); AVGLLAPPGGLSGRSDNP (SEQ ID NO: 164); AVGLLAPPGGLSGRSANP (SEQ ID NO: 165); AVGLLAPPGGLSGRSANI (SEQ ID NO: 166);

NO: 166), ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 171); AVGLLAPPGGLSGRSDNI (SEQ ID NO: 172); GLSGRSDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 193); y/o GLSGRSDNHGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 194).

[0128] En algunas formas de realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 91), que también se denomina en la presente sustrato 2001. En algunas formas de realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia ISSGLSSGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO: 92), que también se denomina en la presente sustrato 1001/LP'/0001, donde LP' como se usa en este sustrato CM1-CM2 es la secuencia de aminoácidos GSGGS (SEQ ID NO: 205). En algunas formas de realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia AVGLLAPPGGTSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 93), que también se denomina en la presente sustrato 2015 y/o sustrato 1004/LP'/0003, donde LP' como se usa en este sustrato CM1-CM2 es la secuencia de aminoácidos GG. En algunas formas de realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia TSTSGRSANPRGGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 94), que también se denomina en la presente sustrato 0003/LP'/1004, donde LP' como se usa en este sustrato CM1-CM2 es la secuencia de aminoácidos GG. En algunas formas de realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia VHMPLGFLGPGGTSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 95), que también se denomina en la presente sustrato 1003/LP'/0003, donde LP' como se usa en este sustrato CM1-CM2 es la secuencia de aminoácidos GG. En algunas formas de realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia TSTSGRSANPRGGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 96), que también se denomina en la presente sustrato 0003/LP'/1003, donde LP' como se usa en este sustrato CM1-CM2 es la secuencia de aminoácidos GG. En algunas formas de realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 97), que también se denomina en la presente sustrato 3001 y/o sustrato 1004/LP'/0001, donde LP' como se usa en este sustrato CM1-CM2 es la secuencia de aminoácidos GG. En algunas formas de realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia LSGRSDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 98), que también se denomina en la presente sustrato 0001/LP'/1004, donde LP' como se usa en este sustrato CM1-CM2 es la secuencia de aminoácidos GG. En algunas formas de realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia VHMPLGFLGPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 99), que también se denomina en la presente sustrato 1003/LP'/0001, en donde LP' como se usa en este sustrato CM1-CM2 es la secuencia de aminoácidos GG. En algunas formas de realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia

LSGRSDNHGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 100), que también se denomina en la presente sustrato 0001/LP'/1003, donde LP' como se usa en este sustrato CM1-CM2 es la secuencia de aminoácidos GG. En algunas formas de realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia LSGRSDNHGGSGGSISSGLLSS (SEQ ID NO: 101), que también se denomina en la presente sustrato 0001/LP'/1001, donde LP' como se usa en este sustrato CM1-CM2 es la secuencia de aminoácidos GGSGGS (SEQ ID NO: 205). En algunas formas de realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia LSGRSGNHGGSGGSISSGLLSS (SEQ ID NO: 102), que también se denomina en la presente sustrato 0002/LP'/1001, donde LP' como se usa en este sustrato CM1-CM2 es la secuencia de aminoácidos GGSGGS (SEQ ID NO: 205). En algunas formas de realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia ISSGLLSSGGSGGSLSGRSGNH (SEQ ID NO: 103), que también se denomina en la presente sustrato 1001/LP'/0002, donde LP' como se usa en este sustrato CM1-CM2 es la secuencia de aminoácidos GGSGGS (SEQ ID NO: 205). En algunas formas de realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia LSGRSDNHGGSGGSQNQALRMA (SEQ ID NO: 104), que también se denomina en la presente sustrato 0001/LP'/1002, donde LP' como se usa en este sustrato CM1-CM2 es la secuencia de aminoácidos GGSGGS (SEQ ID NO: 205). En algunas formas de realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia QNQALRMAGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO: 105), que también se denomina en la presente sustrato 1002/LP'/0001, donde LP' como se usa en este sustrato CM1-CM2 es la secuencia de aminoácidos GGSGGS (SEQ ID NO: 205). En algunas formas de realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia LSGRSGNHGGSGGSQNQALRMA (SEQ ID NO: 106), que también se denomina en la presente sustrato 0002/LP'/1002, donde LP' como se usa en este sustrato CM1-CM2 es la secuencia de aminoácidos GGSGGS (SEQ ID NO: 205). En algunas formas de realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia QNQALRMAGGSGGSLSGRSGNH (SEQ ID NO: 107), que también se denomina en la presente sustrato 1002/LP'/0002, donde LP' como se usa en este sustrato CM1-CM2 es la secuencia de aminoácidos GGSGGS (SEQ ID NO: 205). En algunas formas de realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia ISSGLLSGRSGNH (SEQ ID NO: 108), que también se denomina en la presente sustrato 2002. En algunas formas de realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia ISSGLLSGRSANPRG (SEQ ID NO: 148), que también se denomina en la presente sustrato 2003. En algunas formas de realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia

AVGLLAPPTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 149), que también se denomina en la presente sustrato 2004. En algunas formas de realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia AVGLLAPPSGRSANPRG (SEQ ID NO: 150), que también se denomina en la presente sustrato 2005. En algunas formas de realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia ISSGLLSGRSDDH (SEQ ID NO: 151), que también se denomina en la presente sustrato 2006. En algunas formas de realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia ISSGLLSGRSDIH (SEQ ID NO: 152), que también se denomina en la presente sustrato 2007. En algunas formas de realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 153), que también se denomina en la presente sustrato 2008. En algunas formas de realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia ISSGLLSGRSDTH (SEQ ID NO: 154), que también se denomina en la presente sustrato 2009. En algunas formas de realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia ISSGLLSGRSDYH (SEQ ID NO: 155), que también se denomina en la presente sustrato 2010. En algunas formas de realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia ISSGLLSGRSDNP (SEQ ID NO: 156), que también se denomina en la presente sustrato 2011. En algunas formas de realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia ISSGLLSGRSANP (SEQ ID NO: 157), que también se denomina en la presente sustrato 2012. En algunas formas de realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia ISSGLLSGRSANI (SEQ ID NO: 158), que también se denomina en la presente sustrato 2013. En algunas formas de realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia AVGLLAPPGGLSGRSDDH (SEQ ID NO: 159), que también se denomina en la presente sustrato 3006. En algunas formas de realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia AVGLLAPPGGLSGRSDIH (SEQ ID NO: 160), que también se denomina en la presente sustrato 3007. En algunas formas de realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia AVGLLAPPGGLSGRSDQH (SEQ ID NO: 161), que también se denomina en la presente sustrato 3008. En algunas formas de realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia AVGLLAPPGGLSGRSDTH (SEQ ID NO: 162), que también se denomina en la presente sustrato 3009. En algunas formas de realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia AVGLLAPPGGLSGRSDYH (SEQ ID NO: 163), que también se denomina en la presente sustrato 3010. En algunas formas de realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia AVGLLAPPGGLSGRSDNP (SEQ ID NO: 164), que también se denomina en la presente sustrato 3011. En algunas formas de realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia AVGLLAPPGGLSGRSANP (SEQ ID NO: 165), que también se denomina en la presente sustrato 3012. En algunas formas de

realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia AVGLLAPPGGLSGRSANI (SEQ ID NO: 166), que también se denomina en la presente sustrato 3013. En algunas formas de realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 171), que también se denomina en la presente sustrato 2014. En algunas formas de realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia AVGLLAPPGGLSGRSDNI (SEQ ID NO: 172), que también se denomina en la presente sustrato 3014. En algunas formas de realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia GLSGRSDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 193), que también se denomina en la presente sustrato 0001/LP'/1004, donde LP' como se usa en este sustrato CM1-CM2 es la secuencia de aminoácidos GG. En algunas formas de realización, el sustrato CM1-CM2 incluye la secuencia GLSGRSDNHGGVHMPGLGFLGP (SEQ ID NO: 194), que también se denomina en la presente sustrato 0001/LP'/1003, donde LP' como se usa en este sustrato CM1-CM2 es la secuencia de aminoácidos GG.

[0129] En algunas formas de realización, la CM es un sustrato para al menos dos proteasas. En algunas formas de realización, la CM es un sustrato para al menos dos proteasas seleccionadas del grupo que consiste en una MMP, trombina, una elastasa neutrófila, una cisteína proteasa, uPA, legumaína y matriptasa.

[0130] En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado incluye al menos una primera CM y una segunda CM. En algunas formas de realización, cada una de la primera CM y la segunda CM es un polipéptido de no más de 15 aminoácidos de longitud. En algunas formas de realización, la primera CM y la segunda CM en el anticuerpo activable conjugado en el estado no escindido tienen la disposición estructural desde el terminal N al terminal C de la siguiente manera: MM-CM1-CM2-AB o AB-CM2-CM1-MM. En algunas formas de realización, al menos una de la primera CM y la segunda CM es un polipéptido que funciona como un sustrato para una proteasa seleccionada del grupo que consiste en una MMP, trombina, una elastasa neutrófila, una cisteína proteasa, uPA, legumaína y matriptasa. En algunas formas de realización, la primera CM se ve escindida por un primer agente de escisión seleccionado del grupo que consiste en una MMP, trombina, una elastasa neutrófila, una cisteína proteasa, uPA, legumaína y matriptasa en un tejido diana y la segunda CM se ve escindida por un segundo agente de escisión en un tejido diana. En algunas formas de realización, la otra proteasa se selecciona del grupo que consiste en las mostradas en la Tabla (I). En algunas formas de realización, el primer agente de escisión y el segundo agente de escisión son la misma proteasa seleccionada del

grupo que consiste en una MMP, trombina, una elastasa neutrófila, una cisteína proteasa, uPA, legumina y matriptasa, y la primera CM y la segunda CM son sustratos diferentes para la enzima. En algunas formas de realización, el primer agente de escisión y el segundo agente de escisión son la misma proteasa seleccionada del grupo que consiste en las mostradas en la Tabla (I). En algunas formas de realización, el primer agente de escisión y el segundo agente de escisión son proteasas diferentes. En algunas formas de realización, el primer agente de escisión y el segundo agente de escisión se localizan conjuntamente en el tejido diana. En algunas formas de realización, la primera CM y la segunda CM se ven escindidas por al menos un agente de escisión en el tejido diana.

[0131] En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado está expuesto a una proteasa y se ve escindido por esta, de modo que, en el estado activado o escindido, el anticuerpo activado conjugado incluye una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana que incluye al menos una porción de la secuencia de CM y/o LP2 después de que la proteasa haya escindido la CM.

[0132] En algunas formas de realización, el anticuerpo activable se conjuga con uno o más equivalentes de un agente. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable se conjuga con un equivalente del agente. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable se conjuga con dos, tres o cuatro equivalentes del agente. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable es parte de una mezcla de anticuerpos activables que tiene una cantidad homogénea de equivalentes de agentes conjugados. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable es parte de una mezcla de anticuerpos activables que tiene una cantidad heterogénea de equivalentes de agentes conjugados. En algunas formas de realización, la mezcla de anticuerpos activables es tal que la cantidad promedio de agentes conjugados con cada anticuerpo activable es de entre cero y uno, entre uno y dos, entre dos y tres, o entre tres y cuatro. En algunas formas de realización, la mezcla de anticuerpos activables es tal que la cantidad promedio de agentes conjugados con cada anticuerpo activable es de uno, dos, tres o cuatro.

[0133] En algunas formas de realización, el anticuerpo activable comprende una o más modificaciones de la secuencia de aminoácidos específicas del sitio, de modo que la cantidad de residuos de lisina y/o cisteína aumenta o disminuye con respecto a la secuencia de aminoácidos original del anticuerpo activable, lo cual, por consiguiente, aumenta o disminuye correspondientemente en algunas formas de realización la cantidad de agentes que pueden conjugarse con el anticuerpo activable, o lo cual

limita, en algunas formas de realización, la conjugación de los agentes con el anticuerpo activable de una manera específica del sitio. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable modificado está modificado con uno o más aminoácidos no naturales de una manera específica del sitio, por lo que en algunas formas de realización limita la conjugación de los agentes a solo los sitios de los aminoácidos no naturales.

[0134] Los anticuerpos activables conjugados divulgados en la presente pueden comprender moléculas de fármaco y porciones de anticuerpo en diversas relaciones molares estequiométricas en función de la configuración del anticuerpo y, al menos en parte, del método utilizado para efectuar la conjugación.

[0135] La expresión “carga de fármaco” se refiere a la relación molar de moléculas de fármaco por anticuerpo en un anticuerpo activable conjugado individual. En ciertas formas de realización, la carga de fármaco puede comprender 1-4 moléculas de fármaco, 2-4 moléculas de fármaco, 1-3 moléculas de fármaco, 2-3 moléculas de fármaco, o de 1 a 2 moléculas de fármaco. En ciertas formas de realización, la carga de fármaco puede comprender 1 molécula de fármaco, 2 moléculas de fármaco, 3 moléculas de fármaco o 4 moléculas de fármaco.

[0136] A los fines de la presente invención, una persona del oficio de nivel medio entenderá que “carga de fármaco” y “relación de fármaco con respecto a anticuerpo” (también denominada DAR) no son lo mismo. DAR se refiere a la relación molar promedio de moléculas de fármaco por anticuerpo en una población de al menos dos moléculas de anticuerpo activable conjugado, mientras que carga de fármaco se refiere a la relación molar de moléculas de fármaco por anticuerpo en una molécula de anticuerpo activable conjugado individual. La carga de fármaco tiene relevancia principalmente para la construcción y el diseño de un anticuerpo activable conjugado, mientras que la DAR tiene relevancia principalmente para la composición farmacéutica terapéutica de anticuerpo activable conjugado que se administrará a los pacientes.

[0137] En algunas formas de realización, los anticuerpos activables de la presente invención pueden conjugarse para generar preparaciones relativamente homogéneas de anticuerpos activables conjugados que tienen una distribución de DAR estrecha. En algunas formas de realización, una preparación de anticuerpo activable conjugado puede ser sustancialmente homogénea con respecto a su distribución de DAR, lo que significa que dentro de la preparación hay una especie predominante de ADC específico del sitio con una DAR particular (por ejemplo, una DAR de 2 y/o 4). En algunas formas de realización, la preparación de anticuerpo activable conjugado

sustancialmente homogénea también puede ser uniforme con respecto al sitio de carga (es decir, en las cisteínas libres).

[0138] En algunas formas de realización, la DAR de los anticuerpos activables conjugados de la divulgación será de alrededor de 2 y/o 4. En este contexto, se debe interpretar que la expresión “alrededor de” significa una preparación de anticuerpo activable conjugado que contiene más de 80 % de dos especies primarias que tienen en conjunto una DAR igual a 2 y 4 con una distribución aproximadamente igual (por ejemplo, más de 40 % cada una), y en donde el resto consiste en especies de otras DAR.

[0139] En algunas formas de realización, la DAR de los anticuerpos activables conjugados de la divulgación se enriquecerá hasta alrededor de 2. En este contexto, se debe interpretar que la expresión “alrededor de” significa una preparación de anticuerpo activable conjugado que contiene más de alrededor de 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % $\pm$ 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 %.

[0140] En algunas formas de realización, la DAR de los anticuerpos activables conjugados de la divulgación se enriquecerá hasta alrededor de 2, en donde se debe interpretar que la expresión “alrededor de” significa una preparación de anticuerpo activable conjugado que contiene más de alrededor de 94 % $\pm$ 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 %.

[0141] En algunas formas de realización, la DAR de los anticuerpos activables conjugados de la divulgación se enriquecerá hasta alrededor de 2, en donde se debe interpretar que la expresión “alrededor de” significa una preparación de anticuerpo activable conjugado que contiene más de alrededor de 95 % $\pm$ 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 %.

[0142] En algunas formas de realización, la DAR de los anticuerpos activables conjugados de la divulgación se enriquecerá hasta alrededor de 2, en donde se debe interpretar que la expresión “alrededor de” significa una preparación de anticuerpo activable conjugado que contiene más de alrededor de 96 % $\pm$ 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 %.

[0143] En algunas formas de realización, la DAR de los anticuerpos activables conjugados de la divulgación se enriquecerá hasta alrededor de 2, en donde se debe interpretar que la expresión “alrededor de” significa una preparación de anticuerpo activable conjugado que contiene más de alrededor de 97 % $\pm$ 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 %.

[0144] En algunas formas de realización, la DAR de los anticuerpos activables conjugados de la divulgación se enriquecerá hasta alrededor de 2, en donde se debe interpretar que la expresión “alrededor de” significa una preparación de anticuerpo activable conjugado que contiene más de alrededor de $98 \% \pm 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 \%$.

[0145] En algunas formas de realización, la DAR de los anticuerpos activables conjugados de la divulgación se enriquecerá hasta alrededor de 2, en donde se debe interpretar que la expresión “alrededor de” significa una preparación de anticuerpo activable conjugado que contiene más de alrededor de $99 \% \pm 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 \%$.

[0146] En algunas formas de realización, la DAR de los anticuerpos activables conjugados de la divulgación será de alrededor de 2 y/o 4. En este contexto, se debe interpretar que la expresión “alrededor de” significa una preparación de anticuerpo activable conjugado que contiene más de 80 % de dos especies primarias que tienen en conjunto una DAR igual a 2 y 4 con una distribución aproximadamente igual (por ejemplo, más de 40 % cada una), y en donde el resto consiste en especies de otras DAR.

[0147] En algunas formas de realización, es posible lograr la homogeneidad deseada mediante el uso de anticuerpos activables específicos del sitio y/o reducción selectiva y conjugación. En algunas formas de realización, la homogeneidad deseada puede lograrse mediante el uso de constructos específicos del sitio en combinación con reducción selectiva. En algunas formas de realización, las preparaciones pueden purificarse adicionalmente, tal como mediante técnicas de cromatografía analítica o preparativa. En estas formas de realización, la homogeneidad de la preparación de anticuerpo activable conjugado puede analizarse con diversas técnicas conocidas en la técnica, que incluyen, entre otras, espectrometría de masas, HPLC (por ejemplo, HPLC de exclusión por tamaño, RP-HPLC, HIC-HPLC, etc.) o electroforesis capilar.

[0148] Con respecto a la purificación de preparaciones de anticuerpos activables conjugados, se observará que se pueden emplear métodos preparativos farmacéuticos estándar para obtener la pureza deseada. Como se analiza en la presente, los métodos de cromatografía de líquidos tales como fase inversa (RP) y cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) pueden separar los compuestos en la mezcla según el valor de carga de fármaco. En algunos casos, también se puede usar cromatografía de intercambio iónico (IEC) o de modo mixto (MMC) para aislar especies con una carga de fármaco específica.

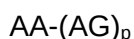
[0149] En algunas formas de realización, una preparación de anticuerpo activable conjugado de la divulgación que tiene una DAR dada con un nivel relativamente alto de homogeneidad de carga de fármaco puede comprender de hecho una mezcla de conjugados con un rango o distribución de cargas de fármaco, pero donde la distribución de cargas de fármaco en la mezcla se centra alrededor (o tiene un promedio ponderado de) el valor medio de DAR. Por lo tanto, en algunas formas de realización, las preparaciones de anticuerpos activables conjugados incluirán una mezcla de conjugados en la que la DAR promedio de la mezcla es de alrededor de 1, 2 o 3, en cada caso $\pm 0,5$. Se observará que el rango o desviación puede ser menor de 0,4 en ciertas formas de realización preferidas. Por lo tanto, en otras formas de realización, las composiciones comprenderán una DAR promedio de 1, 2 o 3, en cada caso $\pm 0,3$.

[0150] En algunas formas de realización, la distribución de fármacos por anticuerpo en preparaciones de anticuerpos activables conjugados a partir de reacciones de conjugación puede caracterizarse mediante medios convencionales tales como espectrofotometría UV-Vis, HPLC de fase inversa, HIC, espectroscopía de masas, ELISA y electroforesis.

[0151] En algunas formas de realización, una mezcla de anticuerpos activables conjugados de la divulgación que incluye una mezcla de conjugados que tienen diferentes cargas de fármaco puede estar purificada o enriquecida para una o más especies de conjugado que tienen una carga de fármaco específica. Por ejemplo, una mezcla de anticuerpos activables conjugados que incluye una mezcla de AADC con una carga de fármaco de 0, 2, 4, 6 y 8 puede estar enriquecida o purificada para los anticuerpos activables conjugados que tienen una carga de fármaco de 2. En algunas formas de realización, la mezcla puede estar purificada o enriquecida solo para las especies de anticuerpos activables conjugados que tienen una carga de fármaco de 4. En algunas formas de realización, la mezcla puede estar purificada o enriquecida solo para las especies de anticuerpos activables conjugados que tienen una carga de fármaco de 2 y 4. Como se usa en la presente, una preparación o purificación o anticuerpo activable conjugado que tiene una preparación relativamente homogénea de especies conjugadas que tienen una carga de fármaco de 2 se denomina "E2", que tiene una DAR de alrededor de 2. Como se usa en la presente, una preparación o purificación o anticuerpo activable conjugado que tiene una preparación relativamente homogénea de especies conjugadas que tienen una carga de fármaco de 4 se denomina "E4". Como se usa en la presente, una preparación o purificación o

anticuerpo activable conjugado que tiene una mezcla de especies conjugadas que tiene una carga de fármaco de 2 o 4 se denomina “DE” (enriquecida en DAR), que tiene una DAR de aproximadamente 3. En este contexto, se pretende que la expresión “alrededor de” signifique +/- 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1,0 de la cantidad indicada.

[0152] En algunas formas de realización, un anticuerpo activable conjugado de la divulgación puede representarse mediante la fórmula:



donde AA es un anticuerpo activable que tiene, en un estado no escindido, la disposición estructural desde el terminal N al terminal C de MM-CM-AB. AB es un anticuerpo que se fija específicamente a CD71 de mamífero e incluye la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 5 y la secuencia de la región variable de la cadena liviana de SEQ ID NO: 7. MM es una porción de enmascaramiento que incluye la secuencia de SEQ ID NO: 18, y la MM está acoplada al AB e inhibe la fijación del AB a CD71 cuando el AA está en un estado no escindido. CM es una porción escindible que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 156, la CM está acoplada al AB y la CM es un polipéptido que funciona como un sustrato para una proteasa. AG es un agente conjugado con el AA, donde $AA-(AG)_p$. En algunas formas de realización, p es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8. En algunas formas de realización, una composición de la divulgación incluye una mezcla de anticuerpos activables conjugados de la divulgación, donde cada anticuerpo activable conjugado está representado por la fórmula $AA-(AG)_p$, donde p es un número entero de 0 a 8. En algunas formas de realización, la composición incluye una mezcla de anticuerpos activables conjugados de la divulgación donde al menos 50 %, al menos 75 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 % de las especies es el anticuerpo activable conjugado donde p es 2.

[0153] En algunas formas de realización, una preparación de un anticuerpo activable conjugado que está purificada o enriquecida para una especie dada de conjugado con una carga de fármaco específica incluye al menos un cierto porcentaje de la especie de carga de fármaco dada. Por ejemplo, en algunas formas de realización, una preparación de anticuerpo activable conjugado E2 incluye al menos 50 % del anticuerpo activable conjugado que tiene una carga de fármaco de 2. En algunas formas de realización, una preparación de anticuerpo activable conjugado E2 incluye al menos 75 % del anticuerpo activable conjugado que tiene una carga de fármaco de 2. En algunas formas de realización, una preparación de anticuerpo activable

conjugado E2 incluye al menos 85 % del anticuerpo activable conjugado que tiene una carga de fármaco de 2. En algunas formas de realización, una preparación de anticuerpo activable conjugado E2 incluye al menos 90 % del anticuerpo activable conjugado que tiene una carga de fármaco de 2. En algunas formas de realización, una preparación de anticuerpo activable conjugado E2 incluye al menos 95 % del anticuerpo activable conjugado que tiene una carga de fármaco de 2. En algunas formas de realización, una preparación de anticuerpo activable conjugado E2 incluye al menos 98 % del anticuerpo activable conjugado que tiene una carga de fármaco de 2.

[0154] En algunas formas de realización, una preparación de anticuerpo activable conjugado que está purificada o enriquecida para una especie de carga de fármaco dada incluye más equivalentes molares de la especie de carga de fármaco dada que los equivalentes molares totales de todas las demás especies de carga de fármaco combinadas. Por ejemplo, en algunas formas de realización, una preparación de anticuerpo activable conjugado E2 es tal que los equivalentes combinados de cada una de las especies de anticuerpos activables conjugados de la composición en la que la carga de fármaco no es 2 es menor que los equivalentes del anticuerpo activable conjugado con una carga de fármaco de 2. En algunas formas de realización, una preparación de anticuerpo activable conjugado E4 es tal que los equivalentes combinados de cada una de las especies de anticuerpos activables conjugados de la composición en la que la carga de fármaco no es 4 es menor que los equivalentes del anticuerpo activable conjugado con una carga de fármaco de 4. En algunas formas de realización, una preparación de anticuerpo activable conjugado DE es tal que los equivalentes combinados de cada una de las especies de anticuerpos activables conjugados de la composición en la que la carga de fármaco no es 2 o 4 es menor que los equivalentes del anticuerpo activable conjugado que tienen una carga de fármaco de 2 o 4.

[0155] En algunas formas de realización, una preparación de anticuerpo activable conjugado que está purificada o enriquecida para especies de DAR dadas (por ejemplo, E2 o E4, como se analiza en la presente) incluye menos que un cierto porcentaje del anticuerpo activable conjugado que no es la especie de carga de fármaco dada. Por ejemplo, en algunas formas de realización, una preparación de anticuerpo activable conjugado E2 incluye menos de 50 % del anticuerpo activable conjugado que no es la especie de carga de fármaco de 2. Por ejemplo, en algunas formas de realización, una preparación de anticuerpo activable conjugado E2 incluye

menos de 25 % del anticuerpo activable conjugado que no es la especie de carga de fármaco de 2. Por ejemplo, en algunas formas de realización, una preparación de anticuerpo activable conjugado E2 incluye menos de 15 % del anticuerpo activable conjugado que no es la especie de carga de fármaco de 2. Por ejemplo, en algunas formas de realización, una preparación de anticuerpo activable conjugado E2 incluye menos de 10 % del anticuerpo activable conjugado que no es la especie de carga de fármaco de 2. Por ejemplo, en algunas formas de realización, una preparación de anticuerpo activable conjugado E2 incluye menos de 5 % del anticuerpo activable conjugado que no es la especie de carga de fármaco de 2. Por ejemplo, en algunas formas de realización, una preparación de anticuerpo activable conjugado E2 incluye menos de 2 % del anticuerpo activable conjugado que no es la especie de carga de fármaco de 2. En algunas otras formas de realización, las preparaciones enriquecidas o purificadas (por ejemplo, E4 o DE) pueden tener menos de 50 %, menos de 25 %, menos de 15 %, menos de 10 %, menos de 5 % o menos de 2 % que no es la especie de carga de fármaco correspondiente en la composición de anticuerpo activable conjugado enriquecida o purificada.

[0156] En algunas formas de realización, el agente es un agente antiinflamatorio.

[0157] En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado también incluye una porción detectable. En algunas formas de realización, la porción detectable es un agente de diagnóstico.

[0158] En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado también incluye un péptido de señal. En algunas formas de realización, el péptido de señal está conjugado con el anticuerpo activable mediante un espaciador. En algunas formas de realización, el espaciador está conjugado con el anticuerpo activable en ausencia de un péptido de señal. En algunas formas de realización, el espaciador se une directamente a la MM del anticuerpo activable. En algunas formas de realización, el espaciador se une directamente a la MM del anticuerpo activable en la disposición estructural desde el terminal N al terminal C de espaciador-MM-CM-AB. Un ejemplo de un espaciador unido directamente al terminal N de MM del anticuerpo activable es QGQSGQ (SEQ ID NO: 109). Otros ejemplos de un espaciador unido directamente al terminal N de MM del anticuerpo activable incluyen QGQSGQG (SEQ ID NO: 138), QGQSG (SEQ ID NO: 139), QGQS (SEQ ID NO: 140), QGQ, QG, y Q. Otros ejemplos de un espaciador unido directamente al terminal N de MM del anticuerpo activable incluyen GQSGQG (SEQ ID NO: 143), QSGQG (SEQ ID NO: 144), SGQG (SEQ ID NO: 145), GQG y G. En algunas formas de realización, no hay espaciador alguno

unido al terminal N de la MM. En algunas formas de realización, el espaciador incluye al menos la secuencia de aminoácidos QGQSGQ (SEQ ID NO: 109). En algunas formas de realización, el espaciador incluye al menos la secuencia de aminoácidos QGQSGQG (SEQ ID NO: 138). En algunas formas de realización, el espaciador incluye al menos la secuencia de aminoácidos QGQSG (SEQ ID NO: 139). En algunas formas de realización, el espaciador incluye al menos la secuencia de aminoácidos QGQS (SEQ ID NO: 140). En algunas formas de realización, el espaciador incluye al menos la secuencia de aminoácidos QGQ. En algunas formas de realización, el espaciador incluye al menos la secuencia de aminoácidos QG. En algunas formas de realización, el espaciador incluye al menos el residuo de aminoácido Q. En algunas formas de realización, el espaciador incluye al menos la secuencia de aminoácidos GQSGQG (SEQ ID NO: 143). En algunas formas de realización, el espaciador incluye al menos la secuencia de aminoácidos QSGQG (SEQ ID NO: 144). En algunas formas de realización, el espaciador incluye al menos la secuencia de aminoácidos SGQG (SEQ ID NO: 145). En algunas formas de realización, el espaciador incluye al menos la secuencia de aminoácidos GQG. En algunas formas de realización, el espaciador incluye al menos la secuencia de aminoácidos G. En algunas formas de realización, el espaciador está ausente.

[0159] En algunas formas de realización, el AB del anticuerpo activable conjugado contiene naturalmente uno o más puentes disulfuro. En algunas formas de realización, el AB puede diseñarse por ingeniería genética para incluir uno o más puentes disulfuro.

[0160] En algunas formas de realización, el anticuerpo activable del anticuerpo activable conjugado de la divulgación está codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable del anticuerpo activable conjugado de la divulgación está codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable del anticuerpo activable conjugado de la divulgación está codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, y una secuencia de ácido

nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7.

[0161] En algunas formas de realización, el anticuerpo activable del anticuerpo activable conjugado de la divulgación está codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable del anticuerpo activable conjugado de la divulgación está codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable del anticuerpo activable conjugado de la divulgación está codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, y una secuencia de ácido nucleico que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7.

[0162] La divulgación también proporciona métodos para producir un anticuerpo activable de la divulgación al cultivar una célula en condiciones que conducen a la expresión del anticuerpo activable, en donde la célula comprende una molécula de ácido nucleico de la divulgación o un vector de la divulgación.

[0163] La divulgación también proporciona métodos para producir un anticuerpo activable que, en un estado activado, se fija a CD71, en donde el método comprende: (a) cultivar una célula que comprende un constructo de ácido nucleico que codifica el anticuerpo activable en condiciones que conducen a la expresión del anticuerpo activable, en donde el anticuerpo activable comprende un anticuerpo activable de la divulgación; y (b) recuperar el anticuerpo activable.

[0164] En algunas formas de realización, la semivida en suero del anticuerpo activable conjugado es mayor que la del anticuerpo correspondiente; por ejemplo, la pK del

anticuerpo activable conjugado es mayor que la del anticuerpo correspondiente. En algunas formas de realización, la semivida en suero del anticuerpo activable conjugado es similar a la del anticuerpo correspondiente. En algunas formas de realización, la semivida en suero del anticuerpo activable conjugado es de al menos 15 días cuando se administra a un organismo. En algunas formas de realización, la semivida en suero del anticuerpo activable conjugado es de al menos 12 días cuando se administra a un organismo. En algunas formas de realización, la semivida en suero del anticuerpo activable conjugado es de al menos 11 días cuando se administra a un organismo. En algunas formas de realización, la semivida en suero del anticuerpo activable conjugado es de al menos 10 días cuando se administra a un organismo. En algunas formas de realización, la semivida en suero del anticuerpo activable conjugado es de al menos 9 días cuando se administra a un organismo. En algunas formas de realización, la semivida en suero del anticuerpo activable conjugado es de al menos 8 días cuando se administra a un organismo. En algunas formas de realización, la semivida en suero del anticuerpo activable conjugado es de al menos 7 días cuando se administra a un organismo. En algunas formas de realización, la semivida en suero del anticuerpo activable es de al menos 6 días cuando se administra a un organismo. En algunas formas de realización, la semivida en suero del anticuerpo activable es de al menos 5 días cuando se administra a un organismo. En algunas formas de realización, la semivida en suero del anticuerpo activable es de al menos 4 días cuando se administra a un organismo. En algunas formas de realización, la semivida en suero del anticuerpo activable es de al menos 3 días cuando se administra a un organismo. En algunas formas de realización, la semivida en suero del anticuerpo activable es de al menos 2 días cuando se administra a un organismo. En algunas formas de realización, la semivida en suero del anticuerpo activable es de al menos 24 horas cuando se administra a un organismo. En algunas formas de realización, la semivida en suero del anticuerpo activable es de al menos 20 horas cuando se administra a un organismo. En algunas formas de realización, la semivida en suero del anticuerpo activable es de al menos 18 horas cuando se administra a un organismo. En algunas formas de realización, la semivida en suero del anticuerpo activable es de al menos 16 horas cuando se administra a un organismo. En algunas formas de realización, la semivida en suero del anticuerpo activable es de al menos 14 horas cuando se administra a un organismo. En algunas formas de realización, la semivida en suero del anticuerpo activable es de al menos 12 horas cuando se administra a un organismo. En algunas formas de realización, la semivida en suero del

anticuerpo activable es de al menos 10 horas cuando se administra a un organismo. En algunas formas de realización, la semivida en suero del anticuerpo activable es de al menos 8 horas cuando se administra a un organismo. En algunas formas de realización, la semivida en suero del anticuerpo activable es de al menos 6 horas cuando se administra a un organismo. En algunas formas de realización, la semivida en suero del anticuerpo activable es de al menos 4 horas cuando se administra a un organismo. En algunas formas de realización, la semivida en suero del anticuerpo activable es de al menos 3 horas cuando se administra a un organismo.

[0165] La divulgación también proporciona métodos para producir un polipéptido de anticuerpo anti-CD71 y/o anticuerpo anti-CD71 activable mediante el cultivo de una célula en condiciones que conducen a la expresión del polipéptido, en donde la célula comprende una molécula de ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo y/o un anticuerpo activable descrito en la presente, y/o vectores que incluyen estas secuencias de ácido nucleico aislado. La divulgación proporciona métodos para producir un anticuerpo y/o anticuerpo activable mediante el cultivo de una célula en condiciones que conducen a la expresión del anticuerpo y/o anticuerpo activable, en donde la célula comprende una molécula de ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo y/o un anticuerpo activable descrito en la presente, y/o vectores que incluyen estas secuencias de ácido nucleico aislado.

[0166] La invención proporciona métodos para prevenir, retrasar la progresión de, tratar, aliviar un síntoma de, o mejorar de otro modo una enfermedad mediada por CD71 en un sujeto mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD71 activable conjugado descrito en la presente a un sujeto que lo necesite.

[0167] La invención también proporciona métodos para prevenir, retrasar la progresión de, tratar, aliviar un síntoma de, o mejorar de otro modo un cáncer en un sujeto mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD71 activable conjugado descrito en la presente a un sujeto que lo necesite. Se sabe que CD71 se expresa en una variedad de tipos de cáncer, tales como, a modo de ejemplo no limitativo, adenocarcinoma, cáncer de conducto biliar (biliar), cáncer de vejiga, cáncer de mama, por ejemplo, cáncer de mama triple negativo y cáncer de mama Her2 negativo; cáncer carcinoide; cáncer de cuello uterino; colangiocarcinoma; colorrectal; de endometrio; glioma; cáncer de cabeza y cuello, por ejemplo, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello; leucemia; cáncer de hígado; cáncer de pulmón, por ejemplo, NSCLC, SCLC; linfoma; melanoma; cáncer de esófago; cáncer de

ovario; cáncer de páncreas; cáncer de próstata, por ejemplo, carcinoma de próstata resistente a la castración metastásico; cáncer de riñón; cáncer de piel; cáncer de células escamosas; cáncer de estómago; cáncer de testículo; cáncer de tiroides; y cáncer urotelial.

[0168] En algunas formas de realización, el cáncer está asociado con un tumor que expresa CD71. En algunas formas de realización, el cáncer se debe a un tumor que expresa CD71.

[0169] Un anticuerpo anti-CD71 activable conjugado utilizado en cualquiera de las formas de realización de estos métodos y usos puede administrarse en cualquier etapa de la enfermedad. Por ejemplo, tal anticuerpo anti-CD71 activable conjugado puede administrarse a un paciente que padece cáncer en cualquier estadio, desde temprano hasta metastásico. Los términos sujeto y paciente se usan indistintamente en la presente.

[0170] En algunas formas de realización, el sujeto es un mamífero, tal como un ser humano o un primate no humano.

[0171] El anticuerpo anti-CD71 activable conjugado y las formulaciones terapéuticas de este se administran a un sujeto que padece o es susceptible a una enfermedad o trastorno asociado con la expresión y/o actividad anormales de CD71. Un sujeto que padece o es susceptible a una enfermedad o trastorno asociado con la expresión y/o actividad anormales de CD71 se identifica con cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los sujetos que padecen cáncer u otra afección neoplásica se identifican con cualquiera de una variedad de pruebas clínicas y/o de laboratorio, tales como un examen físico y análisis de sangre, orina y/o heces para evaluar el estado de salud. Por ejemplo, los sujetos que padecen inflamación y/o un trastorno inflamatorio se identifican con cualquiera de una variedad de pruebas clínicas y/o de laboratorio, tales como examen físico y/o análisis de fluidos corporales, por ejemplo, análisis de sangre, orina y/o heces, para evaluar el estado de salud.

[0172] La administración de un anticuerpo anti-CD71 activable conjugado a un paciente que padece una enfermedad o trastorno asociado con la expresión y/o actividad anormales de CD71 se considera exitosa si se logra cualquiera de una variedad de objetivos clínicos o de laboratorio. Por ejemplo, la administración de un anticuerpo anti-CD71 activable conjugado a un paciente que padece una enfermedad o trastorno asociado con la expresión y/o actividad anormales de CD71 se considera exitosa si uno o más de los síntomas asociados con la enfermedad o trastorno se alivian, reducen, inhiben o no progresan a un estado posterior, es decir, peor. La

administración de un anticuerpo anti-CD71 activable conjugado a un paciente que padece una enfermedad o trastorno asociado con la expresión y/o actividad anormales de CD71 se considera exitosa si la enfermedad o trastorno entra en remisión o no progresa a un estado posterior, es decir, peor.

[0173] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD71 activable conjugado y las formulaciones terapéuticas de este se administran a un sujeto que padece o es susceptible a una enfermedad o trastorno, tal como sujetos que padecen cáncer u otra afección neoplásica, en donde las células enfermas del sujeto expresan CD71. En algunas formas de realización, las células enfermas están asociadas con la expresión y/o actividad anormales de CD71. En algunas formas de realización, las células enfermas están asociadas con la expresión y/o actividad normales de CD71. Un sujeto que padece o es susceptible a una enfermedad o trastorno en donde las células enfermas del sujeto expresan CD71 se identifica con cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los sujetos que padecen cáncer u otra afección neoplásica se identifican con cualquiera de una variedad de pruebas clínicas y/o de laboratorio, tales como un examen físico y análisis de sangre, orina y/o heces para evaluar el estado de salud. Por ejemplo, los sujetos que padecen inflamación y/o un trastorno inflamatorio se identifican con cualquiera de una variedad de pruebas clínicas y/o de laboratorio, tales como examen físico y/o análisis de fluidos corporales, por ejemplo, análisis de sangre, orina y/o heces, para evaluar el estado de salud.

[0174] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD71 activable conjugado y las formulaciones terapéuticas de este se administran a un sujeto que padece o es susceptible a una enfermedad o trastorno asociado con células que expresan CD71 o la presencia, crecimiento, proliferación, metástasis y/o actividad de tales células, tal como sujetos que padecen cáncer u otras afecciones neoplásicas. En algunas formas de realización, las células están asociadas con la expresión y/o actividad anormales de CD71. En algunas formas de realización, las células están asociadas con la expresión y/o actividad normales de CD71. Un sujeto que padece o es susceptible a una enfermedad o trastorno asociado con células que expresan CD71 se identifica con cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los sujetos que padecen cáncer u otra afección neoplásica se identifican con cualquiera de una variedad de pruebas clínicas y/o de laboratorio, tales como un examen físico y análisis de sangre, orina y/o heces para evaluar el estado de salud. Por ejemplo, los sujetos que padecen inflamación y/o un trastorno inflamatorio se identifican con cualquiera de una variedad de pruebas clínicas y/o de laboratorio, tales como examen

físico y/o análisis de fluidos corporales, por ejemplo, análisis de sangre, orina y/o heces, para evaluar el estado de salud.

[0175] La administración de un anticuerpo anti-CD71 activable conjugado a un paciente que padece una enfermedad o trastorno asociado con células que expresan CD71 se considera exitosa si se logra cualquiera de una variedad de objetivos clínicos o de laboratorio. Por ejemplo, la administración de un anticuerpo anti-CD71 activable conjugado a un paciente que padece una enfermedad o trastorno asociado con células que expresan CD71 se considera exitosa si uno o más de los síntomas asociados con la enfermedad o trastorno se alivian, reducen, inhiben o no progresan a un estado posterior, es decir, peor. La administración de un anticuerpo anti-CD71 activable conjugado a un paciente que padece una enfermedad o trastorno asociado con células que expresan CD71 se considera exitosa si la enfermedad o trastorno entra en remisión o no progresa a un estado posterior, es decir, peor.

[0176] La divulgación también proporciona métodos para tratar, aliviar un síntoma de, o retrasar la progresión de un trastorno o enfermedad en el que las células enfermas expresan CD71, los cuales comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo conjugado de la divulgación o una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la divulgación o una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo conjugado de la divulgación a un sujeto que lo necesite. En algunas formas de realización, el trastorno o enfermedad es cáncer.

[0177] La divulgación también proporciona métodos para tratar, aliviar un síntoma de, o retrasar la progresión de un trastorno o enfermedad asociado con células que expresan CD71, los cuales comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo conjugado de la divulgación o una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo conjugado de la divulgación a un sujeto que lo necesite. En algunas formas de realización, el trastorno o enfermedad asociado con células que expresan CD71 es cáncer. En algunas formas de realización, el cáncer es un adenocarcinoma, un cáncer del conducto biliar (biliar), un cáncer de vejiga, un cáncer de hueso, un cáncer de mama, un cáncer de mama triple negativo, un cáncer de mama Her2 negativo, un cáncer carcinoide, un cáncer de cuello uterino, un colangiocarcinoma, un cáncer colorrectal, un cáncer de colon, un cáncer de endometrio, un glioma, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, una leucemia, un cáncer de hígado, un cáncer de pulmón, un cáncer de pulmón de células no pequeñas, un cáncer de pulmón de células pequeñas, un linfoma, un melanoma, un cáncer orofaríngeo, un cáncer de ovario, un cáncer de

páncreas, un cáncer de próstata, un carcinoma de próstata resistente a la castración metastásico, un cáncer de riñón, un sarcoma, un cáncer de piel, un cáncer de células escamosas, un cáncer de estómago, un cáncer de testículo, un cáncer de tiroides, un cáncer urogenital o un cáncer urotelial. En algunas formas de realización, el ligando natural es transferrina. En algunas formas de realización, la expresión y/o actividad del CD71 de mamífero son anormales. En algunas formas de realización, el método comprende administrar un agente adicional. En algunas formas de realización, el agente adicional es un agente terapéutico.

[0178] La divulgación también proporciona métodos para inhibir o reducir el crecimiento, la proliferación o la metástasis de células que expresan CD71 de mamífero, los cuales comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la divulgación o un anticuerpo conjugado de la divulgación o una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la divulgación o una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo conjugado de la divulgación a un sujeto que lo necesite. En algunas formas de realización, el ligando natural es transferrina. En algunas formas de realización, la expresión y/o actividad del CD71 de mamífero son anormales. En algunas formas de realización, el método comprende administrar un agente adicional. En algunas formas de realización, el agente adicional es un agente terapéutico.

[0179] La divulgación también proporciona métodos para inhibir, bloquear o prevenir la fijación de un ligando natural a CD71 de mamífero, los cuales comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la divulgación o un anticuerpo conjugado de la divulgación o una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la divulgación o una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo conjugado de la divulgación a un sujeto que lo necesite. En algunas formas de realización, el ligando natural es transferrina. En algunas formas de realización, la expresión y/o actividad del CD71 de mamífero son anormales. En algunas formas de realización, el método comprende administrar un agente adicional. En algunas formas de realización, el agente adicional es un agente terapéutico.

[0180] La divulgación también proporciona métodos para tratar, aliviar un síntoma de, o retrasar la progresión de un trastorno o enfermedad en el que las células enfermas expresan CD71, los cuales comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo activable de la divulgación o un anticuerpo activable conjugado de la divulgación o una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo activable de la divulgación o una composición farmacéutica que comprende un

anticuerpo activable conjugado de la divulgación a un sujeto que lo necesite. En algunas formas de realización, el trastorno o enfermedad es cáncer.

[0181] La divulgación también proporciona métodos para tratar, aliviar un síntoma de, o retrasar la progresión de un trastorno o enfermedad asociado con células que expresan CD71, los cuales comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo activable conjugado de la divulgación o una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo activable conjugado de la divulgación a un sujeto que lo necesite. En algunas formas de realización, el trastorno o enfermedad asociado con células que expresan CD71 es cáncer. En algunas formas de realización, el cáncer es un adenocarcinoma, un cáncer del conducto biliar (biliar), un cáncer de vejiga, un cáncer de hueso, un cáncer de mama, un cáncer de mama triple negativo, un cáncer de mama Her2 negativo, un cáncer carcinoide, un cáncer de cuello uterino, un colangiocarcinoma, un cáncer colorrectal, un cáncer de colon, un cáncer de endometrio, un glioma, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, una leucemia, un cáncer de hígado, un cáncer de pulmón, un cáncer de pulmón de células no pequeñas, un cáncer de pulmón de células pequeñas, un linfoma, un melanoma, un cáncer orofaríngeo, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas, un cáncer de próstata, un carcinoma de próstata resistente a la castración metastásico, un cáncer de riñón, un sarcoma, un cáncer de piel, un cáncer de células escamosas, un cáncer de estómago, un cáncer de testículo, un cáncer de tiroides, un cáncer urogenital o un cáncer urotelial. En algunas formas de realización, el ligando natural es transferrina. En algunas formas de realización, la expresión y/o actividad del CD71 de mamífero son anormales. En algunas formas de realización, el método comprende administrar un agente adicional. En algunas formas de realización, el agente adicional es un agente terapéutico.

[0182] La divulgación también proporciona métodos para inhibir o reducir el crecimiento, la proliferación o la metástasis de células que expresan CD71 de mamífero, los cuales comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo activable de la divulgación o un anticuerpo activable conjugado de la divulgación o una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo activable de la divulgación o una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo activable conjugado de la divulgación a un sujeto que lo necesite. En algunas formas de realización, el ligando natural es transferrina. En algunas formas de realización, la expresión y/o actividad del CD71 de mamífero son anormales. En algunas formas de realización, el método comprende administrar un agente adicional. En algunas formas

de realización, el agente adicional es un agente terapéutico.

[0183] La divulgación también proporciona métodos para inhibir, bloquear o prevenir la fijación de un ligando natural a CD71 de mamífero, los cuales comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo activable conjugado de la divulgación o una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo activable conjugado de la divulgación a un sujeto que lo necesite. En algunas formas de realización, el ligando natural es transferrina. En algunas formas de realización, la expresión y/o actividad del CD71 de mamífero son anormales. En algunas formas de realización, el método comprende administrar un agente adicional. En algunas formas de realización, el agente adicional es un agente terapéutico.

[0184] En algunas formas de realización de estos métodos y kits, el anticuerpo activable conjugado anti-CD71 incluye una etiqueta detectable. En algunas formas de realización de estos métodos y kits, la etiqueta detectable incluye un agente para diagnóstico por imágenes, un agente de contraste, una enzima, una etiqueta fluorescente, un cromóforo, un tinte, uno o más iones de metal, o una etiqueta a base de ligando. En algunas formas de realización de estos métodos y kits, el agente para diagnóstico por imágenes comprende un radioisótopo. En algunas formas de realización de estos métodos y kits, el radioisótopo es indio o tecnecio. En algunas formas de realización de estos métodos y kits, el agente de contraste comprende yodo, gadolinio u óxido de hierro. En algunas formas de realización de estos métodos y kits, la enzima comprende peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina o β -galactosidasa. En algunas formas de realización de estos métodos y kits, la etiqueta fluorescente comprende proteína fluorescente amarilla (YFP), proteína fluorescente cian (CFP), proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente roja modificada (mRFP), proteína fluorescente roja tdimer2 (tdimer RFP2), HCRED o un derivado de europio. En algunas formas de realización de estos métodos y kits, la etiqueta luminiscente comprende un derivado de N-metilacridio. En algunas formas de realización de estos métodos, la etiqueta comprende una etiqueta Alexa Fluor[®], tal como Alex Fluor[®] 680 o Alexa Fluor[®] 750. En algunas formas de realización de estos métodos y kits, la etiqueta a base de ligando comprende biotina, avidina, estreptavidina o uno o más haptenos.

[0185] En algunas formas de realización de estos métodos y kits, el sujeto es un mamífero. En algunas formas de realización de estos métodos, el sujeto es un ser humano. En algunas formas de realización, el sujeto es un mamífero no humano, tal como un primate no humano, un animal de compañía (por ejemplo, gato, perro,

caballo), un animal de granja, un animal de trabajo o un animal de zoológico. En algunas formas de realización, el sujeto es un roedor.

[0186] En algunas formas de realización de estos métodos y kits, el método es un método *in vivo*. En algunas formas de realización de estos métodos, el método es un método *in situ*. En algunas formas de realización de estos métodos, el método es un método *ex vivo*. En algunas formas de realización de estos métodos, el método es un método *in vitro*.

[0187] En algunas formas de realización de los métodos y kits, el método se usa para identificar o especificar de otro modo una población de pacientes adecuada para el tratamiento con un anticuerpo activable conjugado anti-CD71 de la divulgación, seguido del tratamiento con la administración de ese anticuerpo anti-CD71 activable conjugado a un sujeto que lo necesite. Por ejemplo, los pacientes que dan positivo al respecto tanto de la diana (por ejemplo, CD71) como de una proteasa que escinde el sustrato en la porción escindible (CM) del anticuerpo activable anti-CD71 que se evalúa en estos métodos se identifican como candidatos adecuados para el tratamiento con tal anticuerpo anti-CD71 activable que comprende tal CM, y luego se le administra al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-CD71 activable y/o anticuerpo anti-CD71 activable conjugado que se evaluó. Del mismo modo, los pacientes que dan negativo al respecto de cualquiera de la diana (por ejemplo, CD71) y la proteasa que escinde el sustrato en la CM en el anticuerpo activable que se evalúa con estos métodos, o al respecto de ambas, podrían identificarse como candidatos adecuados para otra forma de tratamiento. En algunas formas de realización, tales pacientes pueden evaluarse con otros anticuerpos activables anti-CD71 hasta identificar un anticuerpo activable anti-CD71 adecuado para el tratamiento (por ejemplo, un anticuerpo activable anti-CD71 que comprende una CM escindida por el paciente en el sitio de la enfermedad). En algunas formas de realización, al paciente se le administra luego una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-CD71 activable y/o conjugado al respecto de los cuales el paciente dio positivo. AB, MM y/o CM adecuados incluyen cualquiera de los AB, MM y/o CM divulgados en la presente.

[0188] Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden incluir un anticuerpo de la invención y opcionalmente un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Estas composiciones farmacéuticas pueden incluirse en kits, tales como, por ejemplo, kits de diagnóstico.

[0189] En algunas formas de realización, la composición farmacéutica comprende un

anticuerpo activable conjugado de la divulgación, y opcionalmente un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica comprende un agente adicional. En algunas formas de realización, el agente adicional es un agente terapéutico.

[0190] Los anticuerpos anti-CD71 y los AB en los anticuerpos activables de la divulgación se fijan específicamente a una diana de CD71, tal como, por ejemplo, CD71 de mamífero y/o CD71 humano. También se incluyen en la divulgación anticuerpos anti-CD71 y AB que se fijan al mismo epítipo de CD71 que un anticuerpo de la divulgación y/o un anticuerpo activable activado descritos en la presente. También se incluyen en la divulgación anticuerpos anti-CD71 y AB que compiten con un anticuerpo anti-CD71 y/o un anticuerpo activable anti-CD71 activado descritos en la presente por la fijación a una diana de CD71, por ejemplo, CD71 humano. También se incluyen en la divulgación anticuerpos anti-CD71 y AB que compiten de forma cruzada con un anticuerpo anti-CD71 y/o un anticuerpo activable anti-CD71 activado descritos en la presente por la fijación a una diana de CD71, por ejemplo, CD71 humano.

[0191] Los anticuerpos anti-CD71 activables proporcionados en la presente incluyen una porción de enmascaramiento. En algunas formas de realización, la porción de enmascaramiento es una secuencia de aminoácidos que está acoplada o unida de otro modo al anticuerpo anti-CD71 y ubicada dentro del constructo de anticuerpo anti-CD71 activable de tal manera que la porción de enmascaramiento reduce la capacidad del anticuerpo anti-CD71 para fijarse específicamente a CD71. Se identifican porciones de enmascaramiento adecuadas con cualquiera de una variedad de técnicas conocidas. Por ejemplo, se identifican porciones de enmascaramiento de péptidos con los métodos descritos en la publicación PCT N.º WO 2009/025846 de Daugherty *et al.*, cuyo contenido se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

[0192] Los anticuerpos anti-CD71 activables proporcionados en la presente incluyen una porción escindible. En algunas formas de realización, la porción escindible incluye una secuencia de aminoácidos que es un sustrato para una proteasa, por lo general una proteasa extracelular. Se identifican sustratos adecuados con cualquiera de una variedad de técnicas conocidas. Por ejemplo, se identifican sustratos peptídicos con los métodos descritos en la patente estadounidense N.º 7.666.817 de Daugherty *et al.*; en la patente estadounidense N.º 8.563.269 de Stagliano *et al.*; y en la publicación PCT N.º WO 2014/026136 de La Porte *et al.*, cuyos contenidos se incorporas en la presente por referencia en su totalidad. (Ver también Boulware *et al.* “Evolutionary

optimization of peptide substrates for proteases that exhibit rapid hydrolysis kinetics”.
Biotechnol. Bioeng. 106,3 (2010): 339-46).

[0193] Los sustratos de ejemplo incluyen, entre otros, sustratos escindibles por una o más de las siguientes enzimas o proteasas enumeradas en la Tabla (I).

Tabla (I): Proteasas y/o enzimas de ejemplo

ADAMS, ejemplo, ADAM8 ADAM9 ADAM10 ADAM12 ADAM15	ADAMTS, por	Cisteína proteinasas, por ejemplo, Cruzipaina Legumaina Otubaina-2	Serina proteasas, por ejemplo, proteína C activada Catepsina A Catepsina G
ADAM17/TACE		KLK, por ejemplo, KLK4	Quimasa proteasas del factor de coagulación (por ejemplo, FVIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa)
ADAMDEC1		KLK5	Elastasa
ADAMTS1		KLK6	Granzima B
ADAMTS4		KLK7	Guanidinobenzoatasa
ADAMTS5		KLK8	HtrA1
Aspartato proteasas, por ejemplo, BACE		KLK10	Elastasa neutrófila humana
Renina		KLK11	Lactoferrina
Catepsinas aspárticas, por ejemplo, Catepsina D Catepsina E		Metaloproteinasas, por ejemplo, Meprina Neprilisina PSMA BMP-1	Marapsina NS3/4A PACE4
Caspasas, por ejemplo, Caspasa 1 Caspasa 2 Caspasa 3 Caspasa 4 Caspasa 5		MMP, por ejemplo, MMP1 MMP2 MMP3	Plasmina PSA tPA Trombina Tryptasa uPA
Caspasa 6 Caspasa 7 Caspasa 8 Caspasa 9 Caspasa 10 Caspasa 14		MMP7 MMP8 MMP9 MMP10 MMP11 MMP12 MMP13 MMP14	Transmembrana tipo II Serina proteasas (TTSP), por ejemplo, DESC1 DPP-4 FAP Hepsina Matriptasa-2 MT-SP1/Matriptasa TMPRSS2 TMPRSS3
Cisteína catepsinas, por ejemplo, Catepsina B Catepsina C Catepsina K Catepsina L Catepsina S Catepsina V/L2 Catepsina X/Z/P		MMP15 MMP16 MMP17 MMP19 MMP20 MMP23 MMP24 MMP26 MMP27	TMPRSS4

[0194] Los anticuerpos anti-CD71 activables descritos en la presente superan una

limitación de los tratamientos con anticuerpos, particularmente los tratamientos con anticuerpos que se sabe que son tóxicos al menos en cierto grado *in vivo*. La toxicidad mediada por la diana constituye una limitación importante para el desarrollo de anticuerpos terapéuticos. Los anticuerpos anti-CD71 activables proporcionados en la presente están diseñados para abordar la toxicidad asociada con la inhibición de la diana en tejidos normales por anticuerpos terapéuticos tradicionales. Estos anticuerpos anti-CD71 activables permanecen enmascarados hasta que se activan proteolíticamente en el sitio de la enfermedad. Comenzando con un anticuerpo anti-CD71 como un anticuerpo terapéutico parental, los anticuerpos anti-CD71 activables de la invención se diseñaron por ingeniería genética al acoplar el anticuerpo a una máscara inhibidora a través de un ligador que incorpora un sustrato de proteasa.

[0195] Cuando el AB está modificado con una MM y en presencia de la diana, la fijación específica del AB a su diana se reduce o inhibe, en comparación con la fijación específica del AB no modificado con una MM o la fijación específica del AB parental a la diana.

[0196] La K_d del AB modificado con una MM hacia la diana es al menos 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 50.000, 100.000, 500.000, 1.000.000, 5.000.000, 10.000.000, 50.000.000 o más, o entre 5-10, 10-100, 10-1.000, 10-10.000, 10-100.000, 10-1.000.000, 10-10.000.000, 100-1.000, 100-10.000, 100-100.000, 100-1.000.000, 100-10.000.000, 1.000-10.000, 1.000-100.000, 1.000-1.000.000, 1000-10.000.000, 10.000-100.000, 10.000-1.000.000, 10.000-10.000.000, 100.000-1.000.000, o 100.000-10.000.000 veces mayor que la K_d del AB no modificado con una MM o del AB parental hacia la diana. Por el contrario, la afinidad de fijación del AB modificado con una MM hacia la diana es al menos 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 50.000, 100.000, 500.000, 1.000.000, 5.000.000, 10.000.000, 50.000.000 o más, o entre 5-10, 10-100, 10-1.000, 10-10.000, 10-100.000, 10-1.000.000, 10-10.000.000, 100-1.000, 100-10.000, 100-100.000, 100-1.000.000, 100-10.000.000, 1.000-10.000, 1.000-100.000, 1.000-1.000.000, 1000-10.000.000, 10.000-100.000, 10.000-1.000.000, 10.000-10.000.000, 100.000-1.000.000, o 100.000-10.000.000 veces menor que la afinidad de fijación del AB no modificado con una MM o del AB parental hacia la diana.

[0197] La constante de disociación (K_d) de la MM hacia el AB es generalmente mayor que la K_d del AB hacia la diana. La K_d de la MM hacia el AB puede ser al menos 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 100.000, 1.000.000 o incluso 10.000.000 veces mayor que la K_d del AB hacia la diana. Por el contrario, la afinidad

de fijación de la MM hacia el AB es generalmente menor que la afinidad de fijación del AB hacia la diana. La afinidad de fijación de MM hacia el AB puede ser al menos 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 100.000, 1.000.000 o incluso 10.000.000 veces menor que la afinidad de fijación del AB hacia la diana.

[0198] En algunas formas de realización, la constante de disociación (K_d) de la MM hacia el AB es aproximadamente igual a la K_d del AB hacia la diana. En algunas formas de realización, la constante de disociación (K_d) de la MM hacia el AB no es mayor que la constante de disociación del AB hacia la diana.

[0199] En algunas formas de realización, la constante de disociación (K_d) de la MM hacia el AB es menor que la constante de disociación del AB hacia la diana.

[0200] En algunas formas de realización, la constante de disociación (K_d) de la MM hacia el AB es mayor que la constante de disociación del AB hacia la diana.

[0201] En algunas formas de realización, la MM tiene una K_d para la fijación al AB que no es mayor que la K_d para la fijación del AB a la diana.

[0202] En algunas formas de realización, la MM tiene una K_d para la fijación al AB que no es menor que la K_d para la fijación del AB a la diana.

[0203] En algunas formas de realización, la MM tiene una K_d para la fijación al AB que es aproximadamente igual a la K_d para la fijación del AB a la diana.

[0204] En algunas formas de realización, la MM tiene una K_d para la fijación al AB que es menor que la K_d para la fijación del AB a la diana.

[0205] En algunas formas de realización, la MM tiene una K_d para la fijación al AB que es mayor que la K_d para la fijación del AB a la diana.

[0206] En algunas formas de realización, la MM tiene una K_d para la fijación al AB que no es más de 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 o 1.000 veces mayor que la K_d para la fijación del AB a la diana. En algunas formas de realización, la MM tiene una K_d para la fijación al AB que es 1-5, 2-5, 2-10, 5-10, 5-20, 5-50, 5-100, 10-100, 10-1.000, 20-100, 20-1000 o 100-1.000 veces mayor que la K_d para la fijación del AB a la diana.

[0207] En algunas formas de realización, la MM tiene una afinidad de fijación al AB que es menor que la afinidad de fijación del AB a la diana.

[0208] En algunas formas de realización, la MM tiene una afinidad de fijación al AB que no es mayor que la afinidad de fijación del AB a la diana.

[0209] En algunas formas de realización, la MM tiene una afinidad de fijación al AB que es aproximadamente igual que la afinidad de fijación del AB a la diana.

[0210] En algunas formas de realización, la MM tiene una afinidad de fijación al AB que no es menor que la afinidad de fijación del AB a la diana.

[0211] En algunas formas de realización, la MM tiene una afinidad de fijación al AB que es mayor que la afinidad de fijación del AB a la diana.

[0212] En algunas formas de realización, la MM tiene una afinidad de fijación al AB que es 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 o 1.000 menor que la afinidad de fijación del AB a la diana. En algunas formas de realización, la MM tiene una afinidad de fijación al AB que es 1-5, 2-5, 2-10, 5-10, 5-20, 5-50, 5-100, 10-100, 10-1.000, 20-100, 20-1000 o 100-1.000 veces menor que la afinidad de fijación del AB a la diana. En algunas formas de realización, la MM tiene una afinidad de fijación al AB que es de 2 a 20 veces menor que la afinidad de fijación del AB a la diana. En algunas formas de realización, una MM no ligada covalentemente al AB y a una concentración equimolar con respecto al AB no inhibe la fijación del AB a la diana.

[0213] Cuando el AB está modificado con una MM y en presencia de la diana, la fijación específica del AB a su diana se reduce o inhibe, en comparación con la fijación específica del AB no modificado con una MM o la fijación específica del AB parental a la diana. Cuando se compara con la fijación del AB no modificado con una MM o la fijación del AB parental a la diana, la capacidad del AB para fijarse a la diana cuando se modifica con una MM puede estar reducida a razón de al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % e incluso 100 % durante al menos 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84 o 96 horas, o 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, o 180 días, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses o más cuando se mide *in vivo* o en un ensayo *in vitro*.

[0214] La MM inhibe la fijación del AB a la diana. La MM se fija al dominio de fijación al antígeno del AB e inhibe la fijación del AB a la diana. La MM puede inhibir estéricamente la fijación del AB a la diana. La MM puede inhibir alostéricamente la fijación del AB a su diana. En estas formas de realización, cuando el AB está modificado o acoplado a una MM y en presencia de la diana, no hay fijación o no hay sustancialmente fijación del AB a la diana, o no hay una fijación de más de 0,001 %, 0,01 %, 0,1 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 % o 50 % del AB a la diana, en comparación con la fijación del AB no modificado con una MM, el AB parental o el AB no acoplado a una MM a la diana, durante al menos 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84 o 96 horas, o 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 o 180 días, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses o más cuando se mide *in vivo* o en un ensayo *in vitro*.

[0215] Cuando un AB está acoplado a o modificado por una MM, la MM “enmascara” o reduce o inhibe de otro modo la fijación específica del AB a la diana. Cuando un AB

está acoplado a o modificado por una MM, tal acoplamiento o modificación puede efectuar un cambio estructural que reduce o inhibe la capacidad del AB de fijarse específicamente a su diana.

[0216] Un AB acoplado a o modificado con una MM puede representarse mediante las siguientes fórmulas (en orden desde una región terminal amino (N) a una región terminal carboxilo (C)):

(MM)-(AB)

(AB)-(MM)

(MM)-L-(AB)

(AB)-L-(MM)

donde MM es una porción de enmascaramiento, el AB es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de este, y L es un ligador. En muchas formas de realización, puede ser deseable insertar uno o más ligadores, por ejemplo, ligadores flexibles, en la composición para proporcionar flexibilidad.

[0217] En ciertas formas de realización, la MM no es un componente de fijación natural del AB. En algunas formas de realización, la MM no contiene o no contiene sustancialmente homología con cualquier componente de fijación natural del AB. En algunas formas de realización, la MM no es más de 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 % u 80 % similar a cualquier componente de fijación natural del AB. En algunas formas de realización, la MM no es más de 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 % u 80 % idéntica a cualquier componente de fijación natural del AB. En algunas formas de realización, la MM no es más de 25 % idéntica a cualquier componente de fijación natural del AB. En algunas formas de realización, la MM no es más de 50 % idéntica a cualquier componente de fijación natural del AB. En algunas formas de realización, la MM no es más de 20 % idéntica a cualquier componente de fijación natural del AB. En algunas formas de realización, la MM no es más de 10 % idéntica a cualquier componente de fijación natural del AB.

[0218] En algunas formas de realización, los anticuerpos activables incluyen un AB que está modificado por una MM y también incluyen una o más porciones escindibles (CM). Tales anticuerpos activables exhiben fijación activable/conmutable a la diana del AB. Los anticuerpos activables generalmente incluyen un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (AB), modificado por o acoplado a una porción de enmascaramiento (MM) y una porción modificable o escindible (CM). En algunas formas de realización, la CM contiene una secuencia de aminoácidos que sirve como un sustrato para al menos una

proteasa.

[0219] Los elementos de los anticuerpos activables están dispuestos de modo que la MM y la CM estén ubicadas de tal manera que, en un estado escindido (o relativamente activo) y en presencia de una diana, el AB se fija a una diana mientras el anticuerpo activable está en un estado no escindido (o relativamente inactivo) en presencia de la diana, la fijación específica del AB a su diana está reducida o inhibida. La fijación específica del AB a su diana puede estar reducida debido a la inhibición o el enmascaramiento, por parte de la MM, de la capacidad del AB de fijarse específicamente a su diana.

[0220] La K_d del AB modificado con una MM y una CM hacia la diana es al menos 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 50.000, 100.000, 500.000, 1.000.000, 5.000.000, 10.000.000, 50.000.000 o más, o entre 5-10, 10-100, 10-1.000, 10-10.000, 10-100.000, 10-1.000.000, 10-10.000.000, 100-1.000, 100-10.000, 100-100.000, 100-1.000.000, 100-10.000.000, 1.000-10.000, 1.000-100.000, 1.000-1.000.000, 1.000-10.000.000, 10.000-100.000, 10.000-1.000.000, 10.000-10.000.000, 100.000-1.000.000, o 100.000-10.000.000 veces mayor que la K_d del AB no modificado con una MM y una CM o del AB parental hacia la diana. Por el contrario, la afinidad de fijación del AB modificado con una MM y una CM hacia la diana es al menos 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 50.000, 100.000, 500.000, 1.000.000, 5.000.000, 10.000.000, 50.000.000 o más, o entre 5-10, 10-100, 10-1.000, 10-10.000, 10-100.000, 10-1.000.000, 10-10.000.000, 100-1.000, 100-10.000, 100-100.000, 100-1.000.000, 100-10.000.000, 1.000-10.000, 1.000-100.000, 1.000-1.000.000, 1.000-10.000.000, 10.000-100.000, 10.000-1.000.000, 10.000-10.000.000, 100.000-1.000.000, o 100.000-10.000.000 veces menor que la afinidad de fijación del AB no modificado con una MM y una CM o del AB parental hacia la diana.

[0221] Cuando el AB está modificado con una MM y una CM y está en presencia de la diana pero no en presencia de un agente modificador (por ejemplo, al menos una proteasa), la fijación específica del AB a su diana está reducida o inhibida, en comparación con la fijación específica del AB no modificado con una MM y una CM o del AB parental a la diana. Cuando se compara con la fijación del AB parental o la fijación de un AB no modificado con una MM y una CM a su diana, la capacidad del AB para fijarse a la diana cuando se modifica con una MM y una CM puede estar reducida a razón de al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % e incluso 100 % durante al menos 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84 o 96 horas, o 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, o 180 días, o 1, 2, 3, 4, 5,

6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses o más cuando se mide *in vivo* o en un ensayo *in vitro*.

[0222] Como se usa en la presente, la expresión estado escindido se refiere a la condición de los anticuerpos activables después de la modificación de la CM por al menos una proteasa. La expresión estado no escindido, como se usa en la presente, se refiere a la condición de los anticuerpos activables en ausencia de escisión de la CM por una proteasa. Como se analizó anteriormente, la expresión “anticuerpos activables” se usa en la presente para referirse a un anticuerpo activable tanto en su estado no escindido (nativo) como en su estado escindido. Será evidente para la persona del oficio de nivel medio que, en algunas formas de realización, un anticuerpo activable escindido puede carecer de una MM debido a la escisión de la CM por la proteasa, lo que da como resultado la liberación de al menos la MM (por ejemplo, cuando la MM no está unida a los anticuerpos activables mediante un enlace covalente (por ejemplo, un puente disulfuro entre residuos de cisteína).

[0223] Por activable o conmutable se entiende que el anticuerpo activable exhibe un primer nivel de fijación a una diana cuando el anticuerpo activable está en un estado inhibido, enmascarado o no escindido (es decir, una primera conformación), y un segundo nivel de fijación a la diana en el estado no inhibido, no enmascarado y/o escindido (es decir, una segunda conformación), donde el segundo nivel de fijación a la diana es mayor que el primer nivel de fijación. En general, el acceso de la diana al AB del anticuerpo activable es mayor en presencia de un agente de escisión capaz de escindir la CM, es decir, una proteasa, que en ausencia de tal agente de escisión. Por lo tanto, cuando el anticuerpo activable está en el estado no escindido, el AB está inhibido al respecto de fijarse a la diana y puede estar enmascarado al respecto de fijarse a la diana (es decir, la primera conformación es tal que el AB no puede fijarse a la diana), y en el estado escindido el AB no está inhibido o enmascarado al respecto de fijarse a la diana.

[0224] La CM y el AB de los anticuerpos activables se seleccionan de modo que el AB represente una porción de fijación para una diana dada y la CM represente un sustrato para una proteasa. En algunas formas de realización, la proteasa se localiza conjuntamente con la diana en un sitio de tratamiento o sitio de diagnóstico en un sujeto. Como se usa en la presente, localizarse conjuntamente se refiere a estar en el mismo sitio o relativamente cerca. En algunas formas de realización, una proteasa escinde una CM, lo que produce un anticuerpo activado que se fija a una diana ubicada cerca del sitio de escisión. Los anticuerpos activables divulgados en la presente tienen un uso particular cuando, por ejemplo, una proteasa capaz de escindir

un sitio en la CM, es decir, una proteasa, está presente a niveles relativamente mayores en el tejido que contiene la diana de un sitio de tratamiento o sitio de diagnóstico que en el tejido de sitios que no son de tratamiento (por ejemplo, en tejido sano). En algunas formas de realización, una CM de la divulgación también se ve escindida por una o más proteasas. En algunas formas de realización, es la una o más proteasas las que se localizan conjuntamente con la diana y las que son responsables de la escisión de la CM *in vivo*.

[0225] En algunas formas de realización, los anticuerpos activables proporcionan una toxicidad reducida y/o efectos secundarios adversos que de otro modo podrían resultar de la fijación del AB en sitios que no son de tratamiento si el AB no estuviese enmascarado o inhibido de otro modo al respecto de fijarse a la diana.

[0226] En general, un anticuerpo activable puede diseñarse mediante la selección de un AB de interés y la construcción del resto del anticuerpo activable de modo que, cuando esté limitada en términos de conformación, la MM proporcione el enmascaramiento del AB o la reducción de la fijación del AB a su diana. Se deben tener en cuenta criterios de diseño estructural para proporcionar esta característica funcional.

[0227] Se proporcionan anticuerpos activables que exhiben un fenotipo conmutable de un rango dinámico deseado para la fijación a la diana en una conformación inhibida en comparación con una no inhibida. Rango dinámico se refiere en general a una relación de (a) un nivel detectado máximo de un parámetro en un primer conjunto de condiciones con respecto a (b) un valor detectado mínimo de ese parámetro en un segundo conjunto de condiciones. Por ejemplo, en el contexto de un anticuerpo activable, rango dinámico se refiere a la relación de (a) un nivel detectado máximo de fijación de la proteína diana a un anticuerpo activable en presencia de al menos una proteasa capaz de escindir la CM de los anticuerpos activables con respecto a (b) un nivel detectado mínimo de fijación de la proteína diana a un anticuerpo activable en ausencia de la proteasa. El rango dinámico de un anticuerpo activable puede calcularse como la relación de la constante de disociación de un tratamiento con agente de escisión de anticuerpo activable (por ejemplo, enzima) con respecto a la constante de disociación del tratamiento con agente de escisión de anticuerpos activables. Cuanto mayor sea el rango dinámico de un anticuerpo activable, mejor será el fenotipo conmutable del anticuerpo activable. Los anticuerpos activables que tienen valores de rango dinámico relativamente mayores (por ejemplo, mayores de 1) exhiben fenotipos conmutables más deseables, de modo que la fijación a la proteína

diana por parte de los anticuerpos activables se produce en mayor grado (por ejemplo, se produce de manera predominante) en presencia de un agente de escisión (por ejemplo, enzima) capaz de escindir la CM de los anticuerpos activables que en ausencia de un agente de escisión.

[0228] Se pueden proporcionar anticuerpos activables en una variedad de configuraciones estructurales. A continuación se proporcionan fórmulas de ejemplo para anticuerpos activables. Se contempla específicamente que el orden terminal N a terminal C del AB, la MM y la CM puede invertirse dentro de un anticuerpo activable. También se contempla específicamente que la CM y la MM pueden solaparse en la secuencia de aminoácidos, por ejemplo, de modo que la CM esté contenida dentro de la MM.

[0229] Por ejemplo, los anticuerpos activables pueden representarse mediante la siguiente fórmula (en orden desde una región terminal amino (N) a una región terminal carboxilo (C)):

(MM)-(CM)-(AB)

(AB)-(CM)-(MM)

donde MM es una porción de enmascaramiento, CM es una porción escindible, y AB es un anticuerpo o fragmento de este. Debe observarse que, aunque MM y CM están indicadas como componentes distintos en las fórmulas anteriores, en todas las formas de realización de ejemplo (incluso las fórmulas) divulgadas en la presente se contempla que las secuencias de aminoácidos de la MM y la CM podrían solaparse, por ejemplo, de modo que la CM esté contenida total o parcialmente dentro de la MM. Además, las fórmulas anteriores proporcionan secuencias de aminoácidos adicionales que pueden ubicarse en el terminal N o el terminal C hacia los elementos de anticuerpos activables.

[0230] En ciertas formas de realización, la MM no es un componente de fijación natural del AB. En algunas formas de realización, la MM no contiene o no contiene sustancialmente homología con cualquier componente de fijación natural del AB. En algunas formas de realización, la MM no es más de 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 % u 80 % similar a cualquier componente de fijación natural del AB. En algunas formas de realización, la MM no es más de 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 % u 80 % idéntica a cualquier componente de fijación natural del AB. En algunas formas de realización, la MM no es más de 50 % idéntica a cualquier componente de fijación natural del AB. En algunas formas de realización, la MM no es

más de 25 % idéntica a cualquier componente de fijación natural del AB. En algunas formas de realización, la MM no es más de 20 % idéntica a cualquier componente de fijación natural del AB. En algunas formas de realización, la MM no es más de 10 % idéntica a cualquier componente de fijación natural del AB.

[0231] En muchas formas de realización, puede ser deseable insertar uno o más ligadores, por ejemplo, ligadores flexibles, en el constructo de anticuerpo activable para proporcionar flexibilidad en una o más de la unión MM-CM, la unión CM-AB, o ambas. Por ejemplo, el AB, la MM y/o la CM pueden no contener una cantidad suficiente de residuos (por ejemplo, Gly, Ser, Asp, Asn, especialmente Gly y Ser, particularmente Gly) para proporcionar la flexibilidad deseada. Como tal, el fenotipo conmutable de tales constructos de anticuerpos activables puede beneficiarse de la introducción de uno o más aminoácidos para proporcionar un ligador flexible. Además, como se describe más adelante, donde el anticuerpo activable se proporciona como un constructo limitado en términos de conformación, se puede insertar operativamente un ligador flexible en el anticuerpo activable no escindido para facilitar la formación y el mantenimiento de una estructura cíclica.

[0232] Por ejemplo, en ciertas formas de realización, un anticuerpo activable comprende una de las siguientes fórmulas (donde la fórmula siguiente representa una secuencia de aminoácidos en dirección del terminal N al terminal C o en dirección del terminal C al terminal N):

(MM)-LP1-(CM)-(AB)

(MM)-(CM)-LP2-(AB)

(MM)-LP1-(CM)-LP2-(AB)

en donde MM, CM y AB son como se definieron anteriormente; en donde LP1 y LP2 están cada una independiente y opcionalmente presentes o ausentes, son los mismos ligadores flexibles o ligadores flexibles diferentes que incluyen al menos 1 aminoácido flexible (por ejemplo, Gly). Además, las fórmulas anteriores proporcionan secuencias de aminoácidos adicionales que pueden ubicarse en el terminal N o el terminal C hacia los elementos de anticuerpos activables. Los ejemplos incluyen, entre otros, porciones de direccionamiento (por ejemplo, un ligando para un receptor de una célula presente en un tejido diana) y porciones que extienden la semivida en suero (por ejemplo, polipéptidos que se fijan a proteínas séricas, tales como inmunoglobulina (por ejemplo, IgG) o albúmina sérica (por ejemplo, albúmina sérica humana (HAS))).

[0233] La CM se ve escindida específicamente por al menos una proteasa a una velocidad de alrededor de $0,001\text{-}1500 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ o al menos 0,001, 0,005, 0,01, 0,05,

0,1, 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 500, 750, 1000, 1250, o $1500 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$. En algunas formas de realización, la CM se escinde específicamente a una velocidad de alrededor de $100.000 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$. En algunas formas de realización, la CM se escinde específicamente a una velocidad de alrededor de 1×10^2 a alrededor de $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ (es decir, de alrededor de 1×10^2 a alrededor de $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$).

[0234] Para la escisión específica por parte de una enzima, se produce un contacto entre la enzima y la CM. Cuando el anticuerpo activable que comprende un AB acoplado a una MM y una CM está en presencia de una diana y actividad enzimática suficiente, la CM puede escindirse. Actividad enzimática suficiente puede referirse a la capacidad de la enzima para entrar en contacto con la CM y efectuar la escisión. Es posible concebir fácilmente que una enzima puede estar en las proximidades de la CM pero sin poder escindir debido a otros factores celulares o la modificación de la proteína de la enzima.

[0235] Ligadores adecuados para su uso en las composiciones descritas en la presente son generalmente los que proporcionan flexibilidad del AB modificado o los anticuerpos activables para facilitar la inhibición de la fijación del AB a la diana. Tales ligadores se denominan generalmente ligadores flexibles. Los ligadores adecuados pueden seleccionarse fácilmente y pueden tener cualquiera de diferentes longitudes adecuadas, tales como de 1 aminoácido (por ejemplo, Gly) a 20 aminoácidos, de 2 aminoácidos a 15 aminoácidos, de 3 aminoácidos a 12 aminoácidos, incluso de 4 aminoácidos a 10 aminoácidos, de 5 aminoácidos a 9 aminoácidos, de 6 aminoácidos a 8 aminoácidos, o de 7 aminoácidos a 8 aminoácidos, y pueden tener una longitud de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos.

[0236] Los ligadores flexibles de ejemplo incluyen polímeros de glicina (G)_n, polímeros de glicina-serina (que incluyen, por ejemplo, (GS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 24) y (GGGS)_n (SEQ ID NO: 25), donde n es un número entero de al menos uno), polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina y otros ligadores flexibles conocidos en la técnica. Los polímeros de glicina y glicina-serina carecen relativamente de estructura y, por lo tanto, pueden servir como un anclaje neutro entre los componentes. La glicina accede a significativamente más espacio phi-psi que incluso la alanina, y está mucho menos restringida que los residuos con cadenas laterales más largas (ver Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992)). Los ligadores flexibles de ejemplo incluyen, entre otros, Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 26), Gly-Gly-Ser-Gly-Gly (SEQ ID NO: 27), Gly-Ser-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 28), Gly-Ser-

Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 29), Gly-Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 30), Gly-Ser-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO: 31), y similares. La persona del oficio de nivel medio reconocerá que el diseño de anticuerpos activables puede incluir ligadores total o parcialmente flexibles, de modo que el ligador puede incluir un ligador flexible así como una o más porciones que confieren una estructura menos flexible para proporcionar una estructura deseada de anticuerpos activables.

[0237] La divulgación también proporciona composiciones y métodos que incluyen un anticuerpo anti-CD71 activable que incluye un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (AB) que se fija específicamente a CD71, donde el AB está acoplado a una porción de enmascaramiento (MM) que disminuye la capacidad de fijación del AB a su diana. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD71 activable incluye además una porción escindible (CM) que es un sustrato para una proteasa. Las composiciones y los métodos proporcionados en la presente permiten la unión de uno o más agentes a uno o más residuos de cisteína en el AB sin comprometer la actividad (por ejemplo, la actividad de enmascaramiento, activación o fijación) del anticuerpo anti-CD71 activable. En algunas formas de realización, las composiciones y los métodos proporcionados en la presente permiten la unión de uno o más agentes a uno o más residuos de cisteína en el AB sin reducir o alterar de otro modo uno o más puentes disulfuro dentro de la MM. Las composiciones y los métodos proporcionados en la presente producen un anticuerpo anti-CD71 activable que se conjuga con uno o más agentes, por ejemplo, cualquiera de una variedad de agentes terapéuticos, de diagnóstico y/o profilácticos, por ejemplo, en algunas formas de realización, sin que alguno de los agentes se conjugue con la MM del anticuerpo anti-CD71 activable. Las composiciones y los métodos proporcionados en la presente producen anticuerpos anti-CD71 activables conjugados en los que la MM retiene la capacidad de enmascarar eficaz y eficientemente el AB del anticuerpo activable en un estado no escindido. Las composiciones y los métodos proporcionados en la presente producen anticuerpos anti-CD71 activables conjugados en los que el anticuerpo activable todavía está activado, es decir, escindido, en presencia de una proteasa que puede escindir la CM.

[0238] Los anticuerpos anti-CD71 activables tienen al menos un punto de conjugación para un agente, pero en los métodos y composiciones proporcionados en la presente menos que todos los puntos posibles de conjugación están disponibles para la conjugación con un agente. En algunas formas de realización, el uno o más puntos de conjugación son átomos de azufre implicados en puentes disulfuro. En algunas formas

de realización, el uno o más puntos de conjugación son átomos de azufre implicados en puentes disulfuro intercatenarios. En algunas formas de realización, el uno o más puntos de conjugación son átomos de azufre implicados en puentes sulfuro intercatenarios, pero no átomos de azufre implicados en puentes disulfuro intracatenarios. En algunas formas de realización, el uno o más puntos de conjugación son átomos de azufre de cisteína u otros residuos de aminoácidos que contienen un átomo de azufre. Tales residuos pueden aparecer naturalmente en la estructura del anticuerpo o pueden incorporarse en el anticuerpo mediante mutagénesis dirigida al sitio, conversión química o mala incorporación de aminoácidos no naturales.

[0239] También se proporcionan métodos para preparar un conjugado de un anticuerpo anti-CD71 activable que tiene uno o más puentes disulfuro intercatenarios en el AB y uno o más puentes disulfuro intracatenarios en la MM, y se proporciona un fármaco reactivo con tioles libres. El método generalmente incluye reducir parcialmente puentes disulfuro intercatenarios en el anticuerpo activable con un agente reductor, tal como, por ejemplo, TCEP; y conjugar el fármaco reactivo con tioles libres con el anticuerpo activable parcialmente reducido. Como se usa en la presente, la expresión reducción parcial se refiere a situaciones en las que un anticuerpo anti-CD71 activable se pone en contacto con un agente reductor y menos que todos los puentes disulfuro, por ejemplo, menos que todos los sitios posibles de conjugación, se reducen. En algunas formas de realización, menos de 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 %, 65 %, 60 %, 55 %, 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o menos de 5 % de todos los posibles sitios de conjugación están reducidos.

[0240] En aun otras formas de realización, se proporciona un método para reducir y conjugar un agente, por ejemplo, un fármaco, con un anticuerpo anti-CD71 activable, que da como resultado selectividad en la ubicación del agente. El método generalmente incluye reducir parcialmente el anticuerpo anti-CD71 activable con un agente reductor de modo que cualquier sitio de conjugación en la porción de enmascaramiento u otra porción no-AB del anticuerpo activable no se reduzcan, y conjugar el agente con tioles intercatenarios en el AB. Los sitios de conjugación se seleccionan para permitir la ubicación deseada de un agente a fin de permitir que la conjugación ocurra en un sitio deseado. El agente reductor es, por ejemplo, TCEP. Las condiciones de reacción de reducción, tales como, por ejemplo, la relación de agente reductor con respecto a anticuerpo activable, la duración de la incubación, la temperatura durante la incubación, el pH de la solución de reacción reductora, etc., se

determinan mediante la identificación de las condiciones que producen un anticuerpo activable conjugado en el que la MM retiene la capacidad de enmascarar eficaz y eficientemente el AB del anticuerpo activable en un estado no escindido. La relación de agente de reducción con respecto a anticuerpo anti-CD71 activable variará en función del anticuerpo activable. En algunas formas de realización, la relación de agente reductor con respecto a anticuerpo anti-CD71 activable estará en un rango de alrededor de 20:1 a 1:1, de alrededor de 10:1 a 1:1, de alrededor de 9:1 a 1:1, de alrededor de 8:1 a 1:1, de alrededor de 7:1 a 1:1, de alrededor de 6:1 a 1:1, de alrededor de 5:1 a 1:1, de alrededor de 4:1 a 1:1, de alrededor de 3:1 a 1:1, de alrededor de 2:1 a 1:1, de alrededor de 20:1 a 1:1,5, de alrededor de 10:1 a 1:1,5, de alrededor de 9:1 a 1:1,5, de alrededor de 8:1 a 1:1,5, de alrededor de 7:1 a 1:1,5, de alrededor de 6:1 a 1:1,5, de alrededor de 5:1 a 1:1,5, de alrededor de 4:1 a 1:1,5, de alrededor de 3:1 a 1:1,5, de alrededor de 2:1 a 1:1,5, de alrededor de 1,5:1 a 1:1,5, o de alrededor de 1:1 a 1:1,5. En algunas formas de realización, la relación está en un rango de alrededor de 5:1 a 1:1. En algunas formas de realización, la relación está en un rango de alrededor de 5:1 a 1,5:1. En algunas formas de realización, la relación está en un rango de alrededor de 4:1 a 1:1. En algunas formas de realización, la relación está en un rango de alrededor de 4:1 a 1,5:1. En algunas formas de realización, la relación está en un rango de alrededor de 8:1 a alrededor de 1:1. En algunas formas de realización, la relación está en un rango de alrededor de 2,5:1 a 1:1.

[0241] En algunas formas de realización, se proporciona un método para reducir los puentes disulfuro intercatenarios en el AB de un anticuerpo anti-CD71 activable y conjugado un agente, por ejemplo, un agente que contiene tiol tal como un fármaco, con los tioles intercatenarios resultantes para localizar selectivamente agentes en el AB. El método generalmente incluye reducir parcialmente el AB con un agente reductor para formar al menos dos tioles intercatenarios sin formar todos los posibles tioles intercatenarios en el anticuerpo activable; y conjugado el agente con los tioles intercatenarios del AB parcialmente reducido. Por ejemplo, el AB del anticuerpo activable se reduce parcialmente durante alrededor de 1 hora a alrededor de 37 °C en una relación deseada de agente reductor:anticuerpo activable. En algunas formas de realización, la relación de agente reductor con respecto a anticuerpo activable estará en un rango de alrededor de 20:1 a 1:1, de alrededor de 10:1 a 1:1, de alrededor de 9:1 a 1:1, de alrededor de 8:1 a 1:1, de alrededor de 7:1 a 1:1, de alrededor de 6:1 a 1:1, de alrededor de 5:1 a 1:1, de alrededor de 4:1 a 1:1, de alrededor de 3:1 a 1:1, de

alrededor de 2:1 a 1:1, de alrededor de 20:1 a 1:1,5, de alrededor de 10:1 a 1:1,5, de alrededor de 9:1 a 1:1,5, de alrededor de 8:1 a 1:1,5, de alrededor de 7:1 a 1:1,5, de alrededor de 6:1 a 1:1,5, de alrededor de 5:1 a 1:1,5, de alrededor de 4:1 a 1:1,5, de alrededor de 3:1 a 1:1,5, de alrededor de 2:1 a 1:1,5, de alrededor de 1,5:1 a 1:1,5, o de alrededor de 1:1 a 1:1,5. En algunas formas de realización, la relación está en un rango de alrededor de 5:1 a 1:1. En algunas formas de realización, la relación está en un rango de alrededor de 5:1 a 1,5:1. En algunas formas de realización, la relación está en un rango de alrededor de 4:1 a 1:1. En algunas formas de realización, la relación está en un rango de alrededor de 4:1 a 1,5:1. En algunas formas de realización, la relación está en un rango de alrededor de 8:1 a alrededor de 1:1. En algunas formas de realización, la relación está en un rango de alrededor de 2,5:1 a 1:1.

[0242] El reactivo que contiene tiol puede ser, por ejemplo, cisteína o N-acetilcisteína. El agente reductor puede ser, por ejemplo, TCEP. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable reducido puede purificarse antes de la conjugación, mediante, por ejemplo, cromatografía en columna, diálisis o diafiltración. Alternativamente, el anticuerpo reducido no se purifica después de la reducción parcial y antes de la conjugación.

[0243] La invención también proporciona anticuerpos anti-CD71 activables parcialmente reducidos en los que al menos un puente disulfuro intercatenario en el anticuerpo activable se ha reducido con un agente reductor sin alterar puente disulfuro intracatenario alguno en el anticuerpo activable, en donde el anticuerpo activable incluye un anticuerpo o un fragmento de fijación al antígeno de este (AB) que se fija específicamente a CD71, una porción de enmascaramiento (MM) que inhibe la fijación del AB del anticuerpo activable en un estado no escindido a la diana de CD71, y una porción escindible (CM) acoplada al AB, en donde la CM es un polipéptido que funciona como un sustrato para una proteasa. En algunas formas de realización, la MM está acoplada al AB a través de la CM. En algunas formas de realización, el agente reductor no altera uno o más puentes disulfuro intracatenarios del anticuerpo activable. En algunas formas de realización, el agente reductor no altera uno o más puentes disulfuro intracatenarios de la MM dentro del anticuerpo activable. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable en el estado no escindido tiene la disposición estructural desde el terminal N al terminal C de la siguiente manera: MM-CM-AB o AB-CM-MM. En algunas formas de realización, el agente reductor es TCEP.

[0244] En aun otras formas de realización, un método para reducir y conjugar un

agente, por ejemplo, un fármaco, con un anticuerpo anti-CD71 activable que da como resultado la selectividad en la ubicación del agente al proporcionar un anticuerpo anti-CD71 activable con una cantidad y posiciones definidas de residuos de lisina y/o cisteína. En algunas formas de realización, la cantidad definida de residuos de lisina y/o cisteína es mayor o menor que la cantidad de residuos correspondientes en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo parental o anticuerpo activable. En algunas formas de realización, la cantidad definida de residuos de lisina y/o cisteína puede dar como resultado una cantidad definida de equivalentes de agente que pueden conjugarse con el anticuerpo anti-CD71 o el anticuerpo anti-CD71 activable. En algunas formas de realización, la cantidad definida de residuos de lisina y/o cisteína puede dar como resultado una cantidad definida de equivalentes de agente que pueden conjugarse con el anticuerpo anti-CD71 o el anticuerpo anti-CD71 activable de una manera específica del sitio. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable modificado está modificado con uno o más aminoácidos no naturales de una manera específica del sitio, por lo que en algunas formas de realización limita la conjugación de los agentes a solo los sitios de los aminoácidos no naturales. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD71 o el anticuerpo anti-CD71 activable con una cantidad y posiciones definidas de residuos de lisina y/o cisteína puede reducirse parcialmente con un agente reductor como se analiza en la presente, de modo que cualesquier sitios de conjugación en la porción de enmascaramiento u otra porción no AB del anticuerpo activable no se reduzcan, y la conjugación del agente con los tioles intercatenarios en el AB.

[0245] La divulgación también proporciona anticuerpos activables parcialmente reducidos en los que al menos un puente disulfuro intercatenario en el anticuerpo activable se ha reducido con un agente reductor sin alterar puente disulfuro intracatenario alguno en el anticuerpo activable, en donde el anticuerpo activable incluye un anticuerpo o un fragmento de fijación al antígeno de este (AB) que se fija específicamente a la diana, por ejemplo, CD71, una porción de enmascaramiento (MM) que inhibe la fijación del AB del anticuerpo activable en un estado no escindido a la diana, y una porción escindible (CM) acoplada al AB, en donde la CM es un polipéptido que funciona como un sustrato para al menos una proteasa. En algunas formas de realización, la MM está acoplada al AB a través de la CM. En algunas formas de realización, el agente reductor no altera uno o más puentes disulfuro intracatenarios del anticuerpo activable. En algunas formas de realización, el agente reductor no altera uno o más puentes disulfuro intracatenarios de la MM dentro del

anticuerpo activable. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable en el estado no escindido tiene la disposición estructural desde el terminal N al terminal C de la siguiente manera: MM-CM-AB o AB-CM-MM. En algunas formas de realización, el agente reductor es TCEP.

[0246] En algunas formas de realización, los anticuerpos activables descritos en la presente también incluyen un agente conjugado con el anticuerpo activable. En algunas formas de realización, el agente conjugado es un agente terapéutico, tal como un agente antiinflamatorio y/o antineoplásico. En tales formas de realización, el agente está conjugado con una porción carbohidrato del anticuerpo activable, por ejemplo, en algunas formas de realización, donde la porción carbohidrato se encuentra fuera de la región de fijación al antígeno del anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno en el anticuerpo activable. En algunas formas de realización, el agente está conjugado con un grupo sulfhidrilo del anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno en el anticuerpo activable.

[0247] En algunas formas de realización, el agente es un agente citotóxico tal como una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de esta), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

[0248] En algunas formas de realización, el agente es una porción detectable tal como, por ejemplo, una etiqueta u otro marcador. En algunas formas de realización, la porción detectable es un agente de diagnóstico. Por ejemplo, el agente es o incluye un aminoácido radioetiquetado, una o más porciones biotinilo que pueden ser detectadas por avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede detectarse mediante métodos ópticos o calorimétricos), uno o más radioisótopos o radionúclidos, una o más etiquetas fluorescentes, una o más etiquetas enzimáticas y/o uno o más agentes quimioluminiscentes. En algunas formas de realización, las porciones detectables están unidas mediante moléculas espaciadoras.

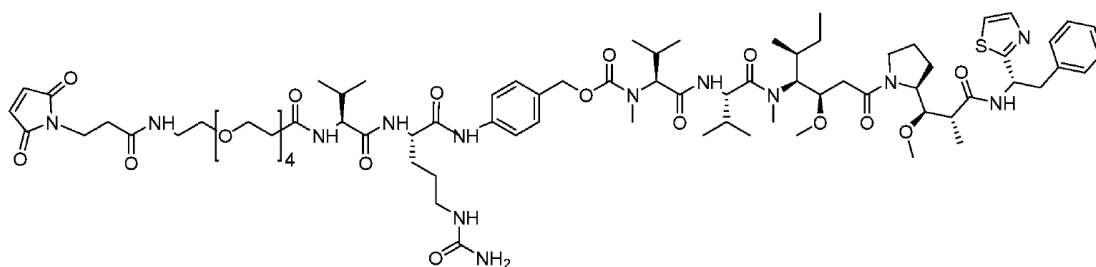
[0249] La divulgación también se refiere a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico tal como una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de esta), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado). Los agentes citotóxicos adecuados incluyen, por ejemplo, dolastatinas y derivados de estas (por ejemplo, auristatina E, AFP, MMAF, MMAE, MMAD, DMAF, DMAE). Por ejemplo, el agente es monometil auristatina E (MMAE) o monometil auristatina D

(MMAD). En algunas formas de realización, el agente es una dolastatina. En algunas formas de realización, el agente es una auristatina o un derivado de esta. En algunas formas de realización, el agente es auristatina E o un derivado de esta. En algunas formas de realización, el agente es monometil auristatina E (MMAE). En algunas formas de realización, el agente es monometil auristatina D (MMAD). En algunas formas de realización, el agente es un maitansinoide o derivado de maitansinoide.

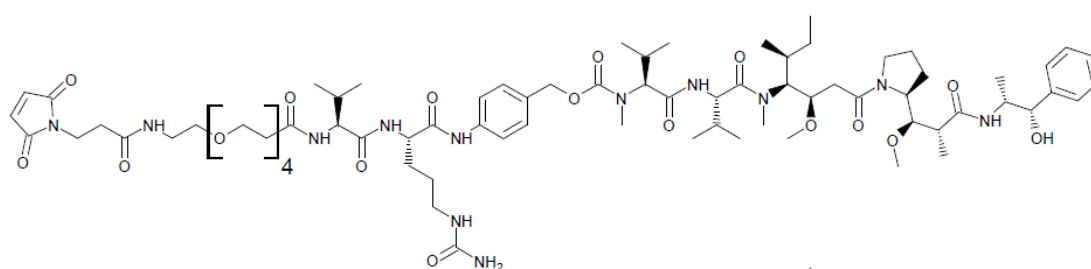
[0250] En algunas formas de realización, el ligador y la toxina en conjugación con el AB comprenden una porción SPDB-DM4, una porción vc-MMAD, una porción vc-MMAE, vc-duocarmicina o una porción PEG2-vc-MMAD. En algunas formas de realización, el ligador es un ligador escindible. En algunas formas de realización, el ligador es un ligador no escindible. En algunas formas de realización, el agente es una porción detectable.

[0251] En algunas formas de realización, el agente está ligado al AB mediante un ligador maleimida caproil-valina-citrulina o un ligador maleimida PEG-valina-citrulina. En algunas formas de realización, el agente está ligado al AB mediante un ligador maleimida caproil-valina-citrulina. En algunas formas de realización, el agente es monometil auristatina E (MMAE) ligada al AB mediante un ligador maleimida caproil-valina-citrulina, y este constructo de carga útil de ligador se denomina en la presente “vc-MMAE”. En algunas formas de realización, el agente está ligado al AB mediante un ligador maleimida PEG-valina-citrulina. En algunas formas de realización, el agente es monometil auristatina D (MMAD) ligada al AB mediante un ligador maleimida tetra-PEG-valina-citrulina-para-aminobenciloxicarbonilo, y este constructo de carga útil de ligador se denomina en la presente “PEG4-vc-MMAD”. En algunas formas de realización, el agente es monometil auristatina E (MMAE) ligada al AB mediante un ligador maleimida tetra-PEG-valina-citrulina-para-aminobenciloxicarbonilo, y este constructo de carga útil de ligador se denomina en la presente “PEG4-vc-MMAE”. En algunas formas de realización, el agente está ligado al AB mediante un ligador maleimida PEG-valina-citrulina. En algunas formas de realización, el agente es monometil auristatina D (MMAD) ligada al AB mediante un ligador maleimida bis-PEG-valina-citrulina-para-aminobenciloxicarbonilo, y este constructo de carga útil de ligador se denomina en la presente “PEG2-vc-MMAD”. A continuación se muestran las estructuras de PEG4-vc-MMAD, PEG4-vc-MMAE, PEG2-vc-MMAD y vc-MMAE:

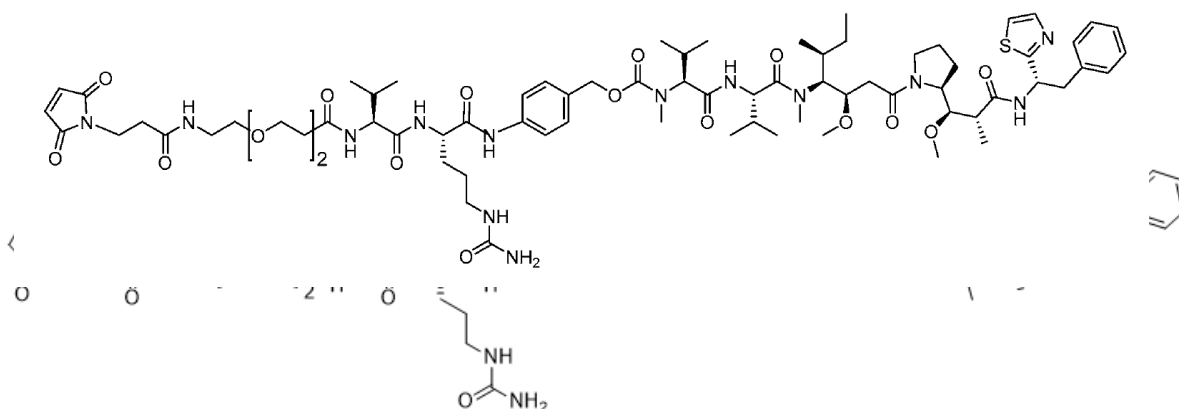
PEG4-vc-MMAD:



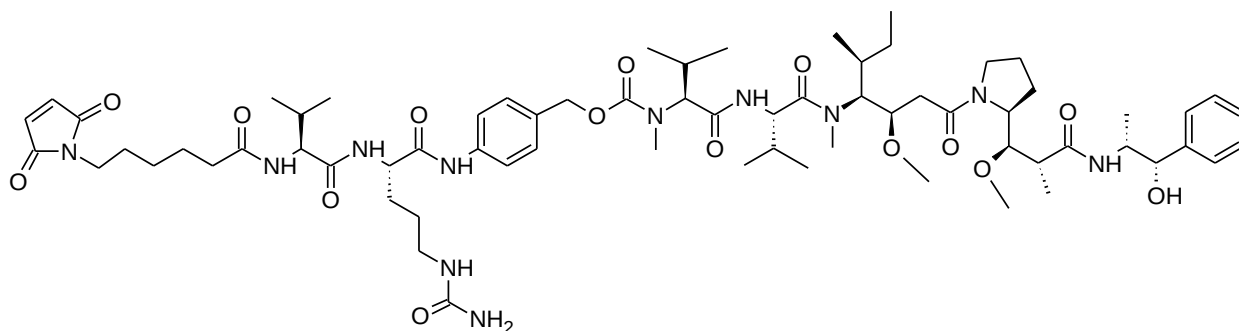
PEG4-vc-MMAE:



PEG2-vc-MMAD:



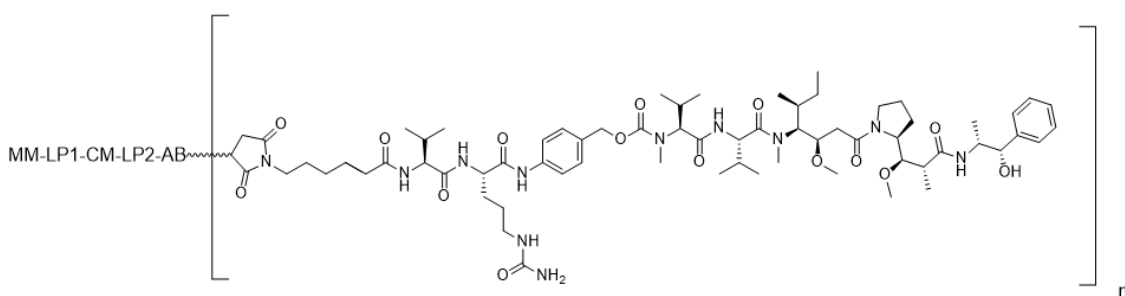
vc-MMAE



[0252] La divulgación también proporciona anticuerpos activables conjugados que incluyen un anticuerpo activable ligado a vcMMAE, que es una carga útil de monometil auristatina E (MMAE) con un ligador val-cit (vc), en donde el anticuerpo activable

incluye un anticuerpo (AB) que se fija específicamente a una diana, una porción de enmascaramiento (MM) acoplada al AB que inhibe la fijación del AB a la diana cuando el anticuerpo activable conjugado está en un estado no escindido, y una porción escindible (CM) acoplada al AB, y la CM es un polipéptido que funciona como un sustrato para una proteasa. En algunas formas de realización, los anticuerpos activables conjugados de la presente divulgación tienen la estructura de la Fórmula (I) o una sal de esta:

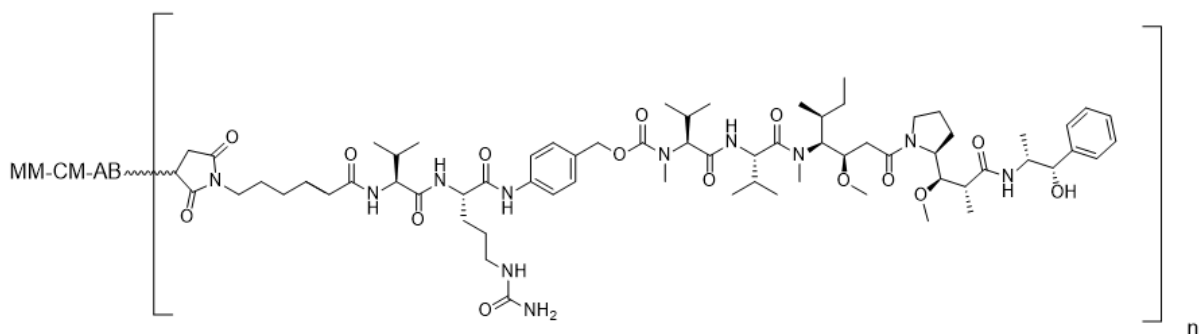
donde AB es un anticuerpo que se fija específicamente a una diana e incluye una



Formula (I)

región variable de la cadena pesada, una cadena pesada, y/o una o más regiones CDR de la cadena pesada (CDRH). El AB también incluye una región variable de la cadena liviana, una cadena liviana y/o una o más regiones CDR de la cadena liviana (CDRL). El anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I) también incluye una porción de enmascaramiento (MM) donde la MM inhibe la fijación del AB a su diana cuando el anticuerpo activable conjugado está en un estado no escindido, una primera porción de enlace (LP1), una porción escindible (CM) donde la CM, y una segunda porción de enlace (LP2). En una forma de realización particular de la Fórmula (I), “n” es 2. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I) en donde el AB comprende un isotipo IgG1. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I) en donde el AB es un anticuerpo que tiene una región constante de la cadena pesada, y en donde el residuo del terminal C de la región constante de la cadena pesada no es una lisina. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I), en donde el glutamato del terminal N en la cadena pesada y/o la cadena liviana opcionalmente es piroglutamato o está modificado a piroglutamato después de la traducción.

[0253] En algunas formas de realización, los anticuerpos activables conjugados de la presente divulgación tienen la estructura de la Fórmula (II) o una sal de esta:



Formula (II)

donde AB es un anticuerpo que se fija específicamente a una diana e incluye una región variable de la cadena pesada, una cadena pesada, y/o una o más regiones CDR de la cadena pesada (CDRH). El AB también incluye una región variable de la cadena liviana, una cadena liviana y/o una o más regiones CDR de la cadena liviana (CDRL). El anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I) también incluye una porción de enmascaramiento (MM) donde la MM inhibe la fijación del AB a su diana cuando el anticuerpo activable conjugado está en un estado no escindido, y una porción escindible (CM) donde la CM. En una forma de realización particular de la Fórmula (II), “n” es 2. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (II) en donde el AB comprende un isotipo IgG1. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (II) en donde el AB es un anticuerpo que tiene una región constante de la cadena pesada, y en donde el residuo del terminal C de la región constante de la cadena pesada no es una lisina. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (II), en donde el glutamato del terminal N en la cadena pesada y/o la cadena liviana opcionalmente es piroglutamato o está modificado a piroglutamato después de la traducción.

[0254] En algunas formas de realización de anticuerpos activables conjugados de la presente divulgación de la Fórmula (I) o (II), la diana es CD71 de mamífero. En algunas formas de realización de anticuerpos activables conjugados de la presente divulgación de la Fórmula (I) o (II), la diana es CD71 humano.

[0255] En algunas formas de realización de anticuerpos activables conjugados de la presente divulgación de la Fórmula (I) o (II), AB incluye una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de CDRH1 que comprende SEQ ID NO: 9, una secuencia de CDRH2 que comprende SEQ ID NO: 10, y una secuencia de CDRH3 que comprende SEQ ID NO: 11, y una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de CDRL1 que comprende SEQ ID NO: 12 o SEQ ID

NO: 13, una secuencia de CDRL2 que comprende SEQ ID NO: 14, y una secuencia de CDRL3 que comprende SEQ ID NO: 15, una MM que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, y una CM que incluye la secuencia de SEQ ID NO: 156, y “n” es 2. En algunas formas de realización de anticuerpos activables conjugados de la presente divulgación de la Fórmula (I), AB incluye una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de CDRH1 que comprende SEQ ID NO: 9, una secuencia de CDRH2 que comprende SEQ ID NO: 10, y una secuencia de CDRH3 que comprende SEQ ID NO: 11, y una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de CDRL1 que comprende SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13, una secuencia de CDRL2 que comprende SEQ ID NO: 14, y una secuencia de CDRL3 que comprende SEQ ID NO: 15, una MM que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, una LP1 que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 207, una CM que incluye la secuencia de SEQ ID NO: 156, y una LP2 que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38, y “n” es 2.

[0256] En algunas formas de realización de anticuerpos activables conjugados de la presente divulgación de la Fórmula (I) o (II), AB incluye una región variable de la cadena pesada que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 5 y una región variable de la cadena liviana que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 7, una MM que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, y una CM que incluye la secuencia de SEQ ID NO: 156, y “n” es 2. En algunas formas de realización de anticuerpos activables conjugados de la presente divulgación de la Fórmula (I), AB incluye una región variable de la cadena pesada que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 5 y una región variable de la cadena liviana que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 7, una MM que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, una LP1 que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 207, una CM que incluye la secuencia de SEQ ID NO: 156, y una LP2 que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38, y “n” es 2.

[0257] En algunas formas de realización de anticuerpos activables conjugados de la presente divulgación de la Fórmula (I) o (II), AB incluye una cadena pesada que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 167 y una cadena liviana que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 19, una MM que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, y una CM que incluye la secuencia de SEQ ID NO: 156, y “n” es 2. En algunas formas de realización de anticuerpos activables conjugados de la presente divulgación de la Fórmula (I), AB incluye una cadena pesada que incluye una

secuencia de SEQ ID NO: 167 y una cadena liviana que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 19, una MM que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, una LP1 que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 207, una CM que incluye la secuencia de SEQ ID NO: 156, y una LP2 que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38, y “n” es 2.

[0258] En algunas formas de realización de anticuerpos activables conjugados de la presente divulgación de la Fórmula (I) o (II), AB incluye una cadena pesada que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 167 y una cadena liviana que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 169, y “n” es 2. En algunas formas de realización de anticuerpos activables conjugados de la presente divulgación de la Fórmula (I), AB incluye una cadena pesada que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 167 y una cadena liviana que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 169, y “n” es 2. En algunas formas de realización de anticuerpos activables conjugados de la presente divulgación de la Fórmula (I) o (II), AB incluye una cadena pesada que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 167 y una cadena liviana que incluye una secuencia de SEQ ID NO: 201, y “n” es 2.

[0259] En algunas formas de realización de anticuerpos activables conjugados de la presente divulgación de la Fórmula (I) o (II), AB incluye una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 5 y una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 7. En algunas formas de realización de anticuerpos activables conjugados de la presente divulgación de la Fórmula (I) o (II), AB incluye una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 5 y una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 7.

[0260] La divulgación también proporciona anticuerpos activables conjugados que incluyen un anticuerpo activable ligado a la carga útil de monometil auristatina D (MMAD), en donde el anticuerpo activable incluye un anticuerpo o un fragmento de fijación al antígeno de este (AB) que se fija específicamente a una diana, una porción de enmascaramiento (MM) que inhibe la fijación del AB del anticuerpo activable en un estado no escindido a la diana, y una porción escindible (CM) acoplada al AB, y la CM es un polipéptido que funciona como un sustrato para al menos una proteasa de MMP.

[0261] En algunas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado con MMAD puede conjugarse con cualquiera de varios métodos para unir agentes a los AB: (a) unión a las porciones carbohidrato del AB, o (b) unión a los grupos sulfhidrilo del AB, o (c) unión a los grupos amino del AB, o (d) unión a los grupos carboxilato del

AB.

En algunas formas de realización, la carga útil de MMAD está conjugada con el AB mediante un ligador. En algunas formas de realización, la carga útil de MMAD está conjugada con una cisteína en el AB mediante un ligador. En algunas formas de realización, la carga útil de MMAD está conjugada con una lisina en el AB mediante un ligador. En algunas formas de realización, la carga útil de MMAD está conjugada con otro residuo del AB mediante un ligador, tal como los residuos divulgados en la presente. En algunas formas de realización, el ligador es un ligador que contiene tiol. En algunas formas de realización, el ligador es un ligador escindible. En algunas formas de realización, el ligador es un ligador no escindible. En algunas formas de realización, el ligador se selecciona del grupo que consiste en los ligadores mostrados en las Tablas (II) y (III). En algunas formas de realización, el anticuerpo activable y la carga útil de MMAD están ligados mediante un ligador maleimida caproil-valina-citrulina. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable y la carga útil de MMAD están ligados mediante un ligador maleimida PEG-valina-citrulina. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable y la carga útil de MMAD están ligados mediante un ligador maleimida caproil-valina-citrulina-para-aminobenciloxicarbonilo. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable y la carga útil de MMAD están ligados mediante un ligador maleimida PEG-valina-citrulina-para-aminobenciloxicarbonilo. En algunas formas de realización, la carga útil de MMAD se conjuga con el AB mediante la tecnología de conjugación y reducción parcial divulgada en la presente.

[0262] En algunas formas de realización, el componente de polietilenglicol (PEG) de un ligador de la presente divulgación está formado a partir de 2 monómeros de etilenglicol, 3 monómeros de etilenglicol, 4 monómeros de etilenglicol, 5 monómeros de etilenglicol, 6 monómeros de etilenglicol, 7 monómeros de etilenglicol, 8 monómeros de etilenglicol, 9 monómeros de etilenglicol, o al menos 10 monómeros de etilenglicol. En algunas formas de realización de la presente divulgación, el componente de PEG es un polímero ramificado. En algunas formas de realización de la presente divulgación, el componente de PEG es un polímero no ramificado. En algunas formas de realización, el componente de polímero PEG se funcionaliza con un grupo amino o derivado de este, un grupo carboxilo o derivado de este, o tanto un grupo amino o derivado de este como un grupo carboxilo o derivado de este.

[0263] En algunas formas de realización, el componente de PEG de un ligador de la presente divulgación es un grupo amino-tetra-etilenglicol-carboxilo o derivado de este.

En algunas formas de realización, el componente de PEG de un ligador de la presente divulgación es un grupo amino-tri-etilenglicol-carboxilo o derivado de este. En algunas formas de realización, el componente de PEG de un ligador de la presente divulgación es un grupo amino-di-etilenglicol-carboxilo o derivado de este. En algunas formas de realización, un derivado amino es la formación de un enlace amida entre el grupo amino y un grupo carboxilo con el que está conjugado. En algunas formas de realización, un derivado de carboxilo es la formación de un enlace amida entre el grupo carboxilo y un grupo amino con el que está conjugado. En algunas formas de realización, un derivado de carboxilo es la formación de un enlace éster entre el grupo carboxilo y un grupo hidroxilo con el que está conjugado.

[0264] Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de estas que pueden usarse incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos sin fijación de la toxina de la difteria, la cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de modeccina, la alfa-sarcina, las proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Una variedad de radionúclidos están disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y , y ^{186}Re .

[0265] Se elaboran conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico con una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCL de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexandiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bis-activo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al.*, Science 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen triaminpentaacético etiquetado con carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante de ejemplo para la conjugación de radionucleótido con el anticuerpo. (Ver WO94/11026).

[0266] Las personas del oficio de nivel medio reconocerán que se puede acoplar una gran variedad de porciones posibles a los anticuerpos resultantes de la divulgación. (Ver, por ejemplo, "Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and

Immunology, J. M. Cruse y R. E. Lewis, Jr (ed), Carger Press, Nueva York, (1989), cuyo contenido completo se incorpora en la presente por referencia).

[0267] Se puede lograr el acoplamiento mediante cualquier reacción química que fije las dos moléculas siempre que el anticuerpo y la otra porción retengan sus actividades respectivas. Este enlace puede incluir muchos mecanismos químicos, por ejemplo, fijación covalente, fijación por afinidad, intercalación, fijación de coordenadas y complejación. En algunas formas de realización, la fijación es, sin embargo, fijación covalente. La fijación covalente puede lograrse mediante la condensación directa de las cadenas laterales existentes o mediante la incorporación de moléculas puente externas. Muchos agentes de enlace bivalentes o polivalentes son útiles para acoplar moléculas de proteínas, tales como los anticuerpos de la presente divulgación, a otras moléculas. Por ejemplo, los agentes de acoplamiento representativos pueden incluir compuestos orgánicos tales como tioésteres, carbodiimidas, ésteres de succinimida, diisocianatos, glutaraldehído, diazobencenos y hexametilendiaminas. Este listado no pretende ser exhaustivo de las diversas clases de agentes de acoplamiento conocidas en la técnica, sino que es un ejemplo de los agentes de acoplamiento más comunes. (Ver Killen y Lindstrom, Jour. Immun. 133:1335-2549 (1984); Jansen *et al.*, Immunological Reviews 62:185-216 (1982); y Vitetta *et al.*, Science 238:1098 (1987).

[0268] En algunas formas de realización, además de las composiciones y los métodos proporcionados en la presente, el anticuerpo activable conjugado también puede modificarse para la conjugación específica del sitio mediante la inserción o inclusión de otro modo de secuencias de aminoácidos modificadas en la secuencia de anticuerpos activables. Estas secuencias de aminoácidos modificadas están diseñadas para permitir una dosificación y/o ubicación controladas del agente conjugado dentro de un anticuerpo activable conjugado. Por ejemplo, el anticuerpo activable puede estar diseñado por ingeniería genética para incluir sustituciones de cisteína en posiciones en cadenas livianas y pesadas que proporcionan grupos tiol reactivos y no tienen un impacto negativo sobre el plegamiento y ensamblaje de proteínas, ni alteran la fijación al antígeno. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable puede estar diseñado para incluir o introducir de otro modo uno o más residuos de aminoácidos no naturales dentro del anticuerpo activable para proporcionar sitios adecuados para la conjugación. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable puede estar diseñado por ingeniería genética para incluir o introducir de otro modo secuencias de péptidos activables enzimáticamente dentro de la secuencia de anticuerpo activable.

[0269] En la literatura se describen ligadores adecuados. (Ver, por ejemplo,

Ramakrishnan, S. *et al.*, Cancer Res. 44: 201-208 (1984) que describe el uso de MBS (éster de M-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida). Ver también la patente estadounidense N.º 5.030.719, que describe el uso del derivado de acetilhidrazida halogenado acoplado a un anticuerpo por medio de un ligador oligopeptídico. En algunas formas de realización, los ligadores adecuados incluyen: (i) clorhidrato de EDC (1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) carbodiimida); (ii) SMPT (4-succinimidiloxycarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridil-ditio)-tolueno) (Pierce Chem. Co., cat. (21558G); (iii) hexanoato de SPDP (succinimidil-6 [3-(2-piridilditio)propionamido]) (Pierce Chem. Co., N.º de cat. 21651G); (iv) hexanoato de Sulfo-LC-SPDP (sulfosuccinimidil 6 [3-(2-piridilditio)-propionamida]) (Pierce Chem. Co. N.º de cat. 2165-G); y (v) sulfo-NHS (N-hidroxisulfosuccinimida) (Pierce Chem. Co., N.º de cat. 24510) en conjugación con EDC. Los ligadores adicionales incluyen, entre otros, SMCC ((succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato), sulfo-SMCC (sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato), SPDB (N-succinimidil-4-(2-piridilditio) butanoato), o sulfo-SPDB (N-succinimidil-4-(2-piridilditio)-2-sulfo butanoato).

[0270] Los ligadores descritos anteriormente contienen componentes que tienen diferentes atributos, lo que conduce a conjugados con diferentes propiedades fisicoquímicas. Por ejemplo, los ésteres de sulfo-NHS de carboxilatos de alquilo son más estables que los ésteres de sulfo-NHS de carboxilatos aromáticos. Los ligadores que contienen éster de NHS son menos solubles que los ésteres de sulfo-NHS. Además, el ligador SMPT contiene un puente disulfuro estéricamente impedido y puede formar conjugados con mayor estabilidad. En líneas generales, los puentes disulfuro son menos estables que otros enlaces porque el puente disulfuro se escinde *in vitro*, lo que da como resultado una menor disponibilidad de conjugado. Sulfo-NHS, en particular, puede mejorar la estabilidad de los acoplamientos de carbodimida. Los acoplamientos de carbodimida (tales como EDC), cuando se usan junto con sulfo-NHS, forman ésteres que son más resistentes a la hidrólisis que la reacción de acoplamiento de carbodimida sola.

[0271] En algunas formas de realización, los ligadores son escindibles. En algunas formas de realización, los ligadores no son escindibles. En algunas formas de realización, están presentes dos o más ligadores. Los dos o más ligadores son todos iguales, es decir, escindibles o no escindibles, o los dos o más ligadores son diferentes, es decir, al menos uno escindible y al menos uno no escindible.

[0272] La presente divulgación utiliza varios métodos para unir agentes a los AB: (a)

unión a las porciones carbohidrato del AB, o (b) unión a los grupos sulfhidrilo del AB, o (c) unión a los grupos amino del AB, o (d) unión a los grupos carboxilato del AB. De acuerdo con la divulgación, los AB pueden estar unidos covalentemente a un agente mediante un ligador intermedio que tiene al menos dos grupos reactivos, uno para reaccionar con AB y otro para reaccionar con el agente. El ligador, que puede incluir cualquier compuesto orgánico compatible, puede elegirse de modo que la reacción con AB (o agente) no afecte negativamente la reactividad y selectividad de AB. Además, la unión del ligador al agente podría no destruir la actividad del agente. Los ligadores adecuados para la reacción con anticuerpos oxidados o fragmentos de anticuerpos oxidados incluyen aquellos que contienen una amina seleccionada del grupo que consiste en grupos de amina primaria, amina secundaria, hidrazina, hidrazida, hidroxilamina, fenilhidrazina, semicarbazida y tiosemicarbazida. Tales grupos funcionales reactivos pueden existir como parte de la estructura del ligador, o pueden introducirse mediante modificación química adecuada de los ligadores que no contienen tales grupos.

[0273] De acuerdo con la presente divulgación, los ligadores adecuados para la unión a AB reducidos incluyen aquellos que tienen ciertos grupos reactivos capaces de reaccionar con un grupo sulfhidrilo de un anticuerpo o fragmento reducido. Tales grupos reactivos incluyen, entre otros: grupos haloalquilo reactivos (que incluyen, por ejemplo, grupos haloacetilo), grupos p-mercuribenzoato y grupos capaces de reacciones de adición de tipo Michael (que incluyen, por ejemplo, maleimidas y grupos del tipo descrito por Mitra y Lawton, 1979, J. Amer. Chem. Soc. 101: 3097-3110).

[0274] De acuerdo con la presente divulgación, los ligadores adecuados para la unión a Ab ni oxidados ni reducidos incluyen aquellos que tienen ciertos grupos funcionales capaces de reaccionar con los grupos amino primarios presentes en residuos de lisina no modificados en el Ab. Tales grupos reactivos incluyen, entre otros, ésteres carboxílicos o carbónicos de NHS, ésteres carboxílicos o carbónicos de sulfo-NHS, ésteres carboxílicos o carbónicos de 4-nitrofenilo, ésteres carboxílicos o carbónicos de pentafluorofenilo, acil imidazoles, isocianatos e isotiocianatos.

[0275] De acuerdo con la presente divulgación, los ligadores adecuados para la unión a Ab ni oxidados ni reducidos incluyen aquellos que tienen ciertos grupos funcionales capaces de reaccionar con los grupos ácido carboxílico presentes en residuos de aspartato o glutamato en el Ab, que se han activado con reactivos adecuados. Los reactivos activadores adecuados incluyen EDC, con o sin NHS o sulfo-NHS agregada, y otros agentes deshidratantes utilizados para la formación de carboxamida. En estos

casos, los grupos funcionales presentes en los ligadores adecuados incluirían hidrazinas, hidroxilaminas, hidrazidas y aminas primarias y secundarias.

[0276] El agente puede unirse al ligador antes o después de la unión del ligador con el AB. En ciertas aplicaciones, puede ser deseable producir primero un intermediario AB-ligador en el que el ligador esté libre de un agente asociado. En función de la aplicación particular, un agente específico puede luego unirse covalentemente al ligador. En algunas formas de realización, el AB se une primero a la MM, CM y ligadores asociados y luego se une al ligador para fines de conjugación.

[0277] *Ligadores ramificados*: en formas de realización específicas, se utilizan ligadores ramificados que tienen múltiples sitios para la unión de agentes. En el caso de ligadores de sitios múltiples, una unión covalente única a un AB daría como resultado un intermediario AB-ligador capaz de fijar un agente en varios sitios. Los sitios pueden ser grupos aldehído o sulfhidrilo o cualquier sitio químico al que se puedan unir agentes.

[0278] En algunas formas de realización, se puede lograr una mayor actividad específica (o una mayor relación de agentes con respecto a AB) mediante la unión de un ligador de un solo sitio en una pluralidad de sitios en el AB. Esta pluralidad de sitios puede introducirse en el AB mediante cualquiera de dos métodos. Primero, uno puede generar múltiples grupos aldehído y/o grupos sulfhidrilo en el mismo AB. En segundo lugar, uno puede unir a un aldehído o sulfhidrilo del AB un “ligador ramificado” que tiene múltiples sitios funcionales para la posterior unión a ligadores. Los sitios funcionales del ligador ramificado o del ligador de sitios múltiples pueden ser grupos aldehído o sulfhidrilo, o pueden ser cualquier sitio químico al que se puedan unir los ligadores. Se pueden obtener actividades específicas aun mayores mediante la combinación de estos dos enfoques, es decir, mediante la unión de ligadores de sitios múltiples en varios sitios en el AB.

[0279] *Ligadores escindibles*: en una forma de realización de la presente divulgación se pueden usar ligadores peptídicos que son susceptibles a la escisión por parte de enzimas del sistema del complemento, tales como, entre otros, activador de u-plasminógeno, activador de plasminógeno tisular, tripsina, plasmina u otra enzima que tenga actividad proteolítica. De acuerdo con un método de la presente divulgación, un agente está unido mediante un ligador susceptible de escisión por parte del complemento. El anticuerpo se selecciona de una clase que puede activar el complemento. El conjugado de anticuerpo-agente, por lo tanto, activa la cascada del complemento y libera el agente en el sitio diana. De acuerdo con otro método de la

presente divulgación, un agente está unido mediante un ligador susceptible de escisión por parte de enzimas que tienen una actividad proteolítica, tal como un activador de u-plasminógeno, un activador de plasminógeno tisular, plasmina o tripsina.

[0280] En la Tabla (II) se proporcionan ejemplos no limitativos de secuencias ligadoras escindibles.

Tabla (II): Secuencias ligadoras de ejemplo para la conjugación

Tipos de secuencias escindibles	Secuencia de aminoácidos
<u>Secuencias escindibles de plasmina</u>	
Prouroquinasa	PRFKIIGG (SEQ ID NO: 110)
	PRFRIIGG (SEQ ID NO: 111)
TGF β	SSRHRRALD (SEQ ID NO: 112)
Plasminógeno	RKSSIIIRMRDVVL (SEQ ID NO: 113)
Estafiloquinasa	SSSFDKGKYKKGDDA (SEQ ID NO: 114)
	SSSFDKGKYKRGDDA (SEQ ID NO: 115)
<u>Secuencias escindibles del factor Xa</u>	
	IEGR (SEQ ID NO: 116)
	IDGR (SEQ ID NO: 117)
	GGSIDGR (SEQ ID NO: 118)
<u>Secuencias escindibles de MMP</u>	
Gelatinasa A	PLGLWA (SEQ ID NO: 119)
<u>Secuencias escindibles de collagenasa</u>	
Colágeno de piel de ternera (cadena $\alpha 1(I)$)	GPQGIAGQ (SEQ ID NO: 120)
Colágeno de piel de ternera (cadena $\alpha 2(I)$)	GPQGLLGA (SEQ ID NO: 121)
Colágeno de cartílago bovino (cadena $\alpha 1(II)$)	GIAGQ (SEQ ID NO: 122)
Colágeno de hígado humano (cadena $\alpha 1(III)$)	GPLGIAGI (SEQ ID NO: 123)
$\alpha 2M$ humana	GPEGLRVG (SEQ ID NO: 124)
PZP humana	YGAGLGVV (SEQ ID NO: 125)
	AGLGVER (SEQ ID NO: 126)
	AGLISST (SEQ ID NO: 127)
$\alpha 1M$ de rata	EPQALAMS (SEQ ID NO: 128)
	QALAMSAI (SEQ ID NO: 129)
$\alpha 2M$ de rata	AAYHLVSQ (SEQ ID NO: 130)
	MDAFLESS (SEQ ID NO: 131)
$\alpha 1I_3(2J)$ de rata	ESLPVVAV (SEQ ID NO: 132)
$\alpha 1I_3(27J)$ de rata	SAPAVESE (SEQ ID NO: 133)
Colagenasa de fibroblastos humanos	DVAQFVLT (SEQ ID NO: 134)
<u>(escisiones autolíticas)</u>	VAQFVLTE (SEQ ID NO: 135)
	AQFVLTEG (SEQ ID NO: 136)
	PVQPIGPQ (SEQ ID NO: 137)

[0281] Además, los agentes pueden unirse mediante puentes disulfuro (por ejemplo, los puentes disulfuro en una molécula de cisteína) al AB. Dado que muchos tumores liberan naturalmente altos niveles de glutatión (un agente reductor), esto puede reducir

los puentes disulfuro con la posterior liberación del agente en el sitio de la administración. En algunas formas de realización, el agente reductor que modificaría una CM también modificaría el ligador del anticuerpo activable conjugado.

[0282] *Espaciadores y elementos escindibles*: En algunas formas de realización, puede ser necesario construir el ligador de manera que se optimice el espacio entre el agente y el AB del anticuerpo activable. Esto se puede lograr mediante el uso de un ligador de la estructura general:



en donde

W es --NH--CH₂-- o --CH₂--;

Q es un aminoácido, péptido; y

n es un número entero de 0 a 20.

[0283] En algunas formas de realización, el ligador puede comprender un elemento espaciador y un elemento escindible. El elemento espaciador sirve para ubicar el elemento escindible lejos del núcleo del AB de manera que el elemento escindible sea más accesible para la enzima responsable de la escisión. Algunos de los ligadores ramificados descritos anteriormente pueden servir como elementos espaciadores.

[0284] A lo largo de este análisis, debe entenderse que la unión del ligador al agente (o del elemento espaciador al elemento escindible, o del elemento escindible al agente) no necesita ser un modo particular de unión o reacción. Cualquier reacción que proporcione un producto de estabilidad adecuada y compatibilidad biológica es aceptable.

[0285] *Complemento de suero y selección de ligadores*: De acuerdo con un método de la presente divulgación, cuando se desea la liberación de un agente, se usa un AB que es un anticuerpo de una clase que puede activar el complemento. El conjugado resultante conserva la capacidad para fijarse al antígeno y activar la cascada del complemento. Por lo tanto, de acuerdo con esta forma de realización de la presente divulgación, un agente está unido a un extremo del ligador escindible o elemento escindible y el otro extremo del grupo ligador está unido a un sitio específico en el AB. Por ejemplo, si el agente tiene un grupo hidroxilo o un grupo amino, puede estar unido al terminal carboxi de un péptido, aminoácido u otro ligador adecuadamente elegido a través de un enlace éster o amida, respectivamente. Por ejemplo, tales agentes pueden estar unidos al péptido ligador mediante una reacción de carbodimida. Si el agente contiene grupos funcionales que interferirían con la unión al ligador, estos grupos funcionales que interfieren pueden bloquearse antes de la unión y

desbloquearse una vez que se produce el producto conjugado o intermediario. El terminal opuesto o amino del ligador se usa luego directamente o después de una modificación adicional para fijarse a un AB que es capaz de activar el complemento.

[0286] Los ligadores (o los elementos espaciadores de ligadores) pueden tener cualquier longitud deseada, y uno de sus extremos puede estar unido covalentemente a sitios específicos en el AB del anticuerpo activable. El otro extremo del elemento ligador o espaciador puede estar unido a un ligador de aminoácidos o peptídico.

[0287] Por lo tanto, cuando estos conjugados se fijan al antígeno en presencia de complemento, el enlace amida o éster que une el agente al ligador se escindirán, lo que dará como resultado la liberación del agente en su forma activa. Estos conjugados, cuando se administran a un sujeto, lograrán la administración y liberación del agente en el sitio diana, y son particularmente eficaces para la administración *in vivo* de agentes farmacéuticos, antibióticos, antimetabolitos, agentes antiproliferativos y similares.

[0288] *Ligadores para la liberación sin activación del complemento:* En aun otra aplicación de administración dirigida, se desea la liberación del agente sin la activación del complemento ya que la activación de la cascada del complemento finalmente lisará la célula diana. Por lo tanto, este enfoque es útil cuando la administración y liberación del agente debe realizarse sin matar la célula diana. Tal es el objetivo cuando se desea la administración de mediadores celulares tales como hormonas, enzimas, corticosteroides, neurotransmisores, genes o enzimas a las células diana. Estos conjugados pueden prepararse al unir el agente a un AB que no es capaz de activar el complemento a través de un ligador que es ligeramente susceptible a la escisión por parte de proteasas séricas. Cuando este conjugado se administra a un individuo, se formarán rápidamente complejos antígeno-anticuerpo, mientras que la escisión del agente se producirá lentamente, lo que dará como resultado la liberación del compuesto en el sitio diana.

[0289] *Reticuladores bioquímicos:* En algunas formas de realización, el anticuerpo activable puede conjugarse con uno o más agentes terapéuticos mediante el uso de ciertos reticuladores bioquímicos. Los reactivos de reticulación forman puentes moleculares que unen grupos funcionales de dos moléculas diferentes. Para ligar dos proteínas diferentes de manera escalonada, se pueden usar reticuladores heterobifuncionales que eliminan la formación de homopolímeros no deseados.

[0290] Los ligadores de peptidilo escindibles por proteasas lisosomales también son útiles, por ejemplo, Val-Cit, Val-Ala u otros dipéptidos. Además, se pueden usar

ligadores lábiles al ácido escindibles en el entorno de pH bajo del lisosoma, por ejemplo: bis-sialil éter. Otros ligadores adecuados incluyen sustratos lábiles a catepsina, particularmente aquellos que muestran una función óptima a un pH ácido.

[0291] En la Tabla (III) se hace referencia a reticuladores heterobifuncionales de ejemplo.

Tabla (III): Reticuladores heterobifuncionales de ejemplo

<u>RETICULADORES HETEROBIFUNCIONALES</u>			
Ligador	Reactivo hacia	Ventajas y aplicaciones	Longitud del brazo espaciador después de la reticulación (Angstroms)
SMPT	Aminas primarias	Mayor estabilidad	11,2 Å
	Sulfhidrilos		
SPDP	Aminas primarias	Tiolación	6,8 Å
	Sulfhidrilos	Reticulación escindible	
LC-SPDP	Aminas primarias	Brazo espaciador extendido	15,6 Å
	Sulfhidrilos		
Sulfo-LC-SPDP	Aminas primarias	Brazo espaciador extensor	15,6 Å
	Sulfhidrilos	Soluble en agua	
SMCC	Aminas primarias	Grupo reactivo maleimida estable	11,6 Å
	Sulfhidrilos	Conjugación enzima-anticuerpo	
		Conjugación hapteno-proteína portadora	
Sulfo-SMCC	Aminas primarias	Grupo reactivo maleimida estable	11,6 Å
	Sulfhidrilos	Soluble en agua	
		Conjugación enzima-anticuerpo	
MBS	Aminas primarias	Conjugación enzima-anticuerpo	9,9 Å
	Sulfhidrilos	Conjugación hapteno-proteína portadora	
Sulfo-MBS	Aminas primarias	Soluble en agua	9,9 Å
	Sulfhidrilos		
SIAB	Aminas primarias	Conjugación enzima-anticuerpo	10,6 Å
	Sulfhidrilos		
Sulfo-SIAB	Aminas primarias	Soluble en agua	10,6 Å
	Sulfhidrilos		
SMPB	Aminas primarias	Brazo espaciador extendido	14,5 Å
	Sulfhidrilos	Conjugación enzima-anticuerpo	
Sulfo-SMPB	Aminas primarias	Brazo espaciador extendido	14,5 Å
	Sulfhidrilos	Soluble en agua	
EDE/Sulfo-NHS	Aminas primarias	Conjugación hapteno-portador	0
	Grupos carboxilo		
ABH	Carbohidratos	Reacciona con grupos de azúcar.	11,9 Å
	No selectivo		

[0292] *Ligadores no escindibles o unión directa:* En algunas formas de realización de la divulgación, el conjugado puede diseñarse de modo que el agente se administre a la diana, pero sin liberarse. Esto se puede lograr al unir un agente a un AB directamente

o mediante un ligador no escindible.

[0293] Estos ligadores no escindibles pueden incluir aminoácidos, péptidos, D-aminoácidos u otros compuestos orgánicos que pueden modificarse para incluir grupos funcionales que posteriormente pueden utilizarse en la unión a AB mediante los métodos descritos en la presente. Una fórmula general para un ligador orgánico de este tipo podría ser



en donde

W es --NH--CH₂-- o --CH₂--;

Q es un aminoácido, péptido; y

n es un número entero de 0 a 20.

[0294] *Conjugados no escindibles*: En algunas formas de realización, un compuesto se puede unir a AB que no activan el complemento. Cuando se usan AB que son incapaces de la activación del complemento, esta unión se puede lograr mediante ligadores que son susceptibles de escisión por complemento activado o mediante ligadores que no son susceptibles de escisión por complemento activado.

Definiciones:

[0295] A menos que se defina lo contrario, los términos científicos y técnicos utilizados en conexión con la presente divulgación tendrán los significados que habitualmente comprenden las personas del oficio de nivel medio. El término “una” entidad se refiere a una o más de esa entidad. Por ejemplo, un compuesto se refiere a uno o más compuestos. Como tal, las expresiones “un”, “una”, “uno o más”, “una o más”, “al menos una”, “al menos uno” y “al menos un” se pueden usar indistintamente. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular. En general, las nomenclaturas utilizadas en relación con, y las técnicas de, cultivo de células y tejidos, biología molecular y química e hibridación de proteínas y oligo o polinucleótidos descritas en la presente son las conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Se utilizan técnicas estándar para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos y cultivo y transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se logra comúnmente en la técnica o como se describe en la presente. Las técnicas y los procedimientos anteriores generalmente se realizan de acuerdo con métodos convencionales conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y analizan a

lo largo de la presente memoria descriptiva. Ver, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2.^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica sintética y química medicinal y farmacéutica descritas en la presente son las conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Se utilizan técnicas estándar para síntesis químicas, análisis químicos, preparación, formulación y administración farmacéuticas, y tratamiento de pacientes.

[0296] Como se utiliza de acuerdo con la presente divulgación, a menos que se indique lo contrario, los siguientes términos y expresiones tendrán los siguientes significados:

[0297] Como se usa en la presente, el término “anticuerpo” se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina (Ig), es decir, moléculas que contienen un sitio de fijación al antígeno que se fija específicamente a (inmunoreacciona con) un antígeno. Por “fijarse específicamente” o “inmunoreaccionar con” o “fijarse inmuno-específicamente a” se entiende que el anticuerpo reacciona con uno o más determinantes antigénicos del antígeno deseado y no reacciona con otros polipéptidos o se fija con una afinidad mucho menor ($K_d > 10^{-6}$)

[0298] Se sabe que la unidad estructural de anticuerpo básica comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos, en donde cada par tiene una cadena “liviana” (alrededor de 25 K_da) y una “pesada” (alrededor de 50-70 K_da). La porción del terminal amino de cada cadena incluye una región variable de alrededor de 100 a 110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento de antígenos. La porción del terminal carboxi de cada cadena define una región constante responsable principalmente de la función efectora. En general, las moléculas de anticuerpo obtenidas de seres humanos se relacionan con cualquiera de las clases IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, que difieren entre sí por la naturaleza de la cadena pesada presente en la molécula. Ciertas clases también tienen subclases, como IgG₁, IgG₂ y otras. Además, en seres humanos, la cadena liviana puede ser una cadena kappa o una cadena lambda.

[0299] La expresión “anticuerpo monoclonal” (mAb) o “composición de anticuerpo monoclonal”, como se usa en la presente, se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contienen solo una especie molecular de molécula de anticuerpo que consiste en un producto génico de cadena liviana único y un producto génico de

cadena pesada único. En particular, las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal son idénticas en todas las moléculas de la población. Los mAb contienen un sitio de fijación al antígeno capaz de inmunorreaccionar con un epítipo particular del antígeno caracterizado por una afinidad de fijación única al respecto de aquel.

[0300] La expresión “sitio de fijación al antígeno” o “porción de fijación” se refiere a la parte de la molécula de inmunoglobulina que participa en la fijación al antígeno. El sitio de fijación al antígeno está formado por residuos de aminoácidos de las regiones variables (“V”) del terminal N de las cadenas pesada (“H”) y liviana (“L”). Tres tramos altamente divergentes dentro de las regiones V de las cadenas pesada y liviana, denominados “regiones hipervariables”, se interponen entre tramos flanqueantes más conservados conocidos como “regiones marco” o “FR”. Por lo tanto, el término “FR” se refiere a secuencias de aminoácidos que se encuentran naturalmente entre, y adyacentes a, regiones hipervariables en inmunoglobulinas. En una molécula de anticuerpo, las tres regiones hipervariables de una cadena liviana y las tres regiones hipervariables de una cadena pesada están dispuestas entre sí en un espacio tridimensional para formar una superficie de fijación al antígeno. La superficie de fijación al antígeno es complementaria a la superficie tridimensional de un antígeno fijado, y las tres regiones hipervariables de cada una de las cadenas pesada y liviana se denominan “regiones determinantes de la complementariedad” o “CDR”. La asignación de aminoácidos a cada dominio es de acuerdo con las definiciones de Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991)), o Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), Chothia *et al.* Nature 342:878-883 (1989).

[0301] Como se usa en la presente, el término “epítipo” incluye cualquier determinante de proteína capaz de fijarse específicamente a una inmunoglobulina, un scFv o un receptor de linfocitos T. El término “epítipo” incluye cualquier determinante de proteína capaz de fijarse específicamente a una inmunoglobulina o un receptor de linfocitos T. A menudo, los determinantes de epítopos consisten en agrupamientos de superficie químicamente activos de moléculas, tales como cadenas laterales de azúcar o aminoácidos, y tienen generalmente características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Por ejemplo, se pueden generar anticuerpos contra péptidos del terminal N o del terminal C de un polipéptido. Se dice que un anticuerpo se fija específicamente a un antígeno cuando la constante de disociación es $\leq 1 \mu\text{M}$; en algunas formas de realización, $\leq 100 \text{ nM}$ y, en algunas

formas de realización, ≤ 10 nM.

[0302] Como se usa en la presente, las expresiones “fijación específica”, “fijación inmunológica” y “propiedades de fijación inmunológica” se refieren a las interacciones no covalentes del tipo que se produce entre una molécula de inmunoglobulina y un antígeno para el cual la inmunoglobulina es específica. La fuerza o afinidad de las interacciones de fijación inmunológica puede expresarse en términos de la constante de disociación (K_d) de la interacción, en donde una K_d más pequeña representa una afinidad mayor. Se pueden cuantificar las propiedades de fijación inmunológica de polipéptidos seleccionados mediante métodos conocidos en la técnica. Uno de estos métodos implica medir las tasas de formación y disociación del complejo de sitio de fijación al antígeno/antígeno, en donde esas tasas dependen de las concentraciones de los componentes del complejo, la afinidad de la interacción y los parámetros geométricos que influyen igualmente en la tasa en ambas direcciones. Por lo tanto, tanto la “constante de tasa de asociación” (K_{on}) como la “constante de tasa de disociación” (K_{off}) pueden determinarse mediante el cálculo de las concentraciones y las tasas reales de asociación y disociación. (Ver Nature 361:186-87 (1993)). La relación de K_{off}/K_{on} permite la cancelación de todos los parámetros no relacionados con la afinidad, y es igual a la constante de disociación K_d . (Ver, en general, Davies *et al.* (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473). Se dice que un anticuerpo de la presente divulgación se fija específicamente a la diana cuando la constante de fijación (K_d) es ≤ 1 μ M, en algunas formas de realización ≤ 100 nM, en algunas formas de realización ≤ 10 nM, y en algunas formas de realización ≤ 100 pM a alrededor de 1 pM, según se mide mediante ensayos tales como ensayos de fijación de radioligandos o ensayos similares conocidos por las personas del oficio de nivel medio.

[0303] La expresión “polinucleótido aislado”, como se usa en la presente, significará un polinucleótido de origen genómico, de cADN o sintético o alguna combinación de estos, en donde, en virtud de su origen, el “polinucleótido aislado” (1) no está asociado con la totalidad o una porción de un polinucleótido en el que el “polinucleótido aislado” se encuentra en la naturaleza, (2) está ligado operativamente a un polinucleótido al que no está ligado en la naturaleza, o (3) no ocurre en la naturaleza como parte de una secuencia más grande. Los polinucleótidos de acuerdo con la divulgación incluyen las moléculas de ácido nucleico que codifican las moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada mostradas en la presente, y las moléculas de ácido nucleico que codifican las moléculas de inmunoglobulina de cadena liviana mostradas en la presente.

[0304] La expresión “proteína aislada” a la que se hace referencia en la presente significa una proteína de origen de cADN, de ARN recombinante o sintético o alguna combinación de estos, en donde, en virtud de su origen o fuente de derivación, la “proteína aislada” (1) no está asociada con proteínas encontradas en la naturaleza, (2) está libre de otras proteínas de la misma fuente, por ejemplo, libre de proteínas murinas, (3) está expresada por una célula de una especie diferente, o (4) no ocurre en la naturaleza.

[0305] El término “polipéptido” se usa en la presente como un término genérico para referirse a proteínas nativas, fragmentos o análogos de una secuencia de polipéptidos. Por lo tanto, los fragmentos de proteínas nativas y los análogos son especies del género de polipéptidos. Los polipéptidos de acuerdo con la divulgación comprenden las moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada mostradas en la presente, y las moléculas de inmunoglobulina de cadena liviana mostradas en la presente, así como las moléculas de anticuerpo formadas por combinaciones que comprenden las moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada con moléculas de inmunoglobulina de cadena liviana, como la moléculas de inmunoglobulina de cadena liviana kappa, y viceversa, así como fragmentos y análogos de estas.

[0306] El término “natural”, como se usa en la presente cuando se aplica a un objeto, se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, es natural una secuencia de polipéptidos o polinucleótidos que está presente en un organismo (incluidos los virus) que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificada intencionalmente por el hombre en el laboratorio o de otra manera.

[0307] La expresión “ligado operativamente”, como se usa en la presente, se refiere a las posiciones de los componentes así descritos que están en una relación que les permite funcionar de la manera prevista. Una secuencia de control “ligada operativamente” a una secuencia codificante está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se logra en condiciones compatibles con las secuencias de control.

[0308] La expresión “secuencia de control”, como se usa en la presente, se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión y el procesamiento de las secuencias codificantes a las que están ligadas. La naturaleza de tales secuencias de control difiere según el organismo huésped en procariotas, tales secuencias de control generalmente incluyen el promotor, el sitio de fijación al ribosoma y la secuencia de terminación de la transcripción en eucariotas, en general,

tales secuencias de control incluyen los promotores y la secuencia de terminación de la transcripción. La expresión “secuencias de control” pretende incluir, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias de componentes de fusión. El término “polinucleótido”, como se menciona en la presente, significa nucleótidos de al menos 10 bases de longitud, ya sea ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye las formas monocatenaria y bicatenaria de ADN.

[0309] El término oligonucleótido al que se hace referencia en la presente incluye nucleótidos naturales y modificados ligados entre sí mediante enlaces oligonucleotídicos naturales y no naturales. Los oligonucleótidos son un subconjunto de polinucleótidos que comprende en general una longitud de 200 bases o menos. En algunas formas de realización, los oligonucleótidos tienen una longitud de 10 a 60 bases y, en algunas formas de realización, una longitud de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 a 40 bases. Los oligonucleótidos son generalmente monocatenarios, por ejemplo, para sondas, aunque los oligonucleótidos pueden ser bicatenarios, por ejemplo, para su uso en la construcción de un gen mutante. Los oligonucleótidos de la divulgación son oligonucleótidos sentido o antisentido.

[0310] La expresión “nucleótidos naturales” al que se hace referencia en la presente incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. La expresión “nucleótidos modificados” al que se hace referencia en la presente incluye nucleótidos con grupos de azúcar modificados o sustituidos y similares. La expresión “enlaces oligonucleotídicos” al que se hace referencia en la presente incluye enlaces oligonucleotídicos tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenioato, fosforodiselenioato, fosforoanilitioato, fosforaniladato, fosforonmidato y similares. Ver, por ejemplo, LaPlanche *et al.* Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec *et al.* J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984), Stein *et al.* Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988), Zon *et al.* Anti Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon *et al.* Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, páginas 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec *et al.* patente estadounidense N.º 5.151.510; Uhlmann y Peyman Chemical Reviews 90:543 (1990). Un oligonucleótido puede incluir una etiqueta para la detección, si se desea.

[0311] Como se usa en la presente, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Ver Immunology - A Synthesis (2.^a edición,

ES Golub and DR Green, Ed., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)). Los estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales como los aminoácidos α , α -disustituidos, N-alquil aminoácidos, ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para los polipéptidos de la presente divulgación. Los ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4 hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetilisina, ϵ -N-acetilisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, σ -N-metilarginina y otros aminoácidos e iminoácidos similares (por ejemplo, 4-hidroxiprolina). En la notación de polipéptidos usada en la presente, la dirección de la izquierda es la dirección del terminal amino y la dirección de la derecha es la dirección del terminal carboxi, de acuerdo con el uso y la convención estándar.

[0312] De manera similar, a menos que se especifique lo contrario, el extremo izquierdo de las secuencias de polinucleótidos monocatenarios es el extremo 5', la dirección izquierda de las secuencias de polinucleótidos bicatenarios se denomina dirección 5'. La dirección de la adición de 5' a 3' de transcritos de ARN nacientes se denomina dirección de transcripción, las regiones de secuencia en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que se encuentran 5' con respecto al extremo 5' del transcritos de ARN se denominan en la presente "secuencias corriente arriba", las regiones de secuencia en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que se encuentran 3' con respecto al extremo 3' del transcritos de ARN se denominan "secuencias corriente abajo".

[0313] Como se aplica a los polipéptidos, la expresión "identidad sustancial" significa que dos secuencias de péptidos, cuando están alineadas óptimamente, tales como mediante los programas GAP o BESTFIT mediante el uso de ponderaciones de espacios predeterminados, comparten al menos 80 por ciento de identidad de secuencia, en algunas formas de realización, al menos 90 por ciento de identidad de secuencia, en algunas formas de realización, al menos 95 por ciento de identidad de secuencia, y, en algunas formas de realización, al menos 99 por ciento de identidad de secuencia.

[0314] En algunas formas de realización, las posiciones de residuos que no son idénticas difieren en sustituciones de aminoácidos conservadoras.

[0315] Como se analiza en la presente, se contemplan como abarcadas por la presente divulgación variaciones menores en las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos o las moléculas de inmunoglobulina, siempre que las variaciones en la

secuencia de aminoácidos se mantengan en al menos 75 %, en algunas formas de realización, al menos 80 %, 90 %, 95 %, y, en algunas formas de realización, 99 %. En particular, se contemplan reemplazos de aminoácidos conservadores. Los reemplazos conservadores son aquellos que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Los aminoácidos codificados genéticamente se dividen generalmente en familias: (1) los aminoácidos ácidos son aspartato, glutamato; (2) los aminoácidos básicos son lisina, arginina, histidina; (3) los aminoácidos no polares son alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano, y (4) los aminoácidos polares sin carga son glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Los aminoácidos hidrófilos incluyen arginina, asparagina, aspartato, glutamina, glutamato, histidina, lisina, serina y treonina. Los aminoácidos hidrófobos incluyen alanina, cisteína, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptófano, tirosina y valina. Otras familias de aminoácidos incluyen (i) serina y treonina, que son la familia alifática-hidroxi; (ii) asparagina y glutamina, que son la familia que contiene amida; (iii) alanina, valina, leucina e isoleucina, que son la familia alifática; y (iv) fenilalanina, triptófano y tirosina, que son la familia aromática. Por ejemplo, es razonable esperar que un reemplazo aislado de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina o un reemplazo similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado no tenga un efecto importante sobre la fijación o las propiedades de la molécula resultante, especialmente si el reemplazo no involucra un aminoácido dentro de un sitio marco. Se puede determinar fácilmente si un cambio de aminoácido da como resultado un péptido funcional mediante el análisis de la actividad específica del derivado de polipéptido. En la presente se describen ensayos en detalle. Las personas del oficio de nivel medio pueden preparar fácilmente fragmentos o análogos de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina. Se producen terminales amino y carboxi adecuados de fragmentos o análogos cerca de los límites de los dominios funcionales. Se pueden identificar dominios estructurales y funcionales mediante la comparación de los datos de secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos con bases de datos de secuencias públicas o privadas. En algunas formas de realización, se usan métodos de comparación computarizados para identificar motivos de secuencia o dominios de conformación de proteínas previstos que ocurren en otras proteínas de estructura y/o función conocidas. Se conocen métodos para identificar secuencias de proteínas que se pliegan en una estructura tridimensional conocida. Bowie *et al.* Science 253:164 (1991). Por lo tanto, los ejemplos anteriores demuestran

que las personas del oficio de nivel medio pueden reconocer motivos de secuencia y conformaciones estructurales que pueden usarse para definir dominios estructurales y funcionales de acuerdo con la divulgación.

[0316] Las sustituciones de aminoácidos adecuadas son aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de fijación para formar complejos proteicos, (4) alteran las afinidades de fijación y (5) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales de tales análogos. Los análogos pueden incluir diversas muteínas de una secuencia que no sea la secuencia de péptidos natural. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones de aminoácidos simples o múltiples (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservadoras) en la secuencia natural (por ejemplo, en la porción del polipéptido fuera de los dominios que forman contactos intermoleculares). Una sustitución de aminoácidos conservadora no debería cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia parental (por ejemplo, un aminoácido de reemplazo no debería tender a romper una hélice que se produce en la secuencia parental ni alterar otros tipos de estructura secundaria que caracterizan la secuencia parental). Se describen ejemplos de estructuras secundarias y terciarias de polipéptidos reconocidas en la técnica en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, Nueva York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, ed., Garland Publishing, Nueva York, N.Y. (1991)); y Thornton *et al.* *Nature* 354:105 (1991).

[0317] La expresión “fragmento de polipéptido” como se usa en la presente se refiere a un polipéptido que tiene una eliminación del terminal amino y/o del terminal carboxi y/o una o más eliminaciones internas, pero donde la secuencia de aminoácidos restante es idéntica a las posiciones correspondientes en la secuencia natural deducida, por ejemplo, de una secuencia de cADN de longitud completa. Los fragmentos tienen por lo general al menos 5, 6, 8 o 10 aminoácidos de longitud, en algunas formas de realización, al menos 14 aminoácidos de longitud, en algunas formas de realización, al menos 20 aminoácidos de longitud, normalmente al menos 50 aminoácidos de longitud, y, en algunas formas de realización, al menos 70 aminoácidos de longitud. El término “análogo”, como se usa en la presente, se refiere a polipéptidos que están compuestos por un segmento de al menos 25 aminoácidos que tiene identidad sustancial con una porción de una secuencia de aminoácidos deducida y que tiene una fijación específica a la diana, en condiciones de fijación adecuadas. Normalmente, los análogos de polipéptidos comprenden una sustitución

de aminoácidos conservadora (o adición o eliminación) con respecto a la secuencia natural. Los análogos tienen por lo general al menos 20 aminoácidos de longitud, en algunas formas de realización, al menos 50 aminoácidos de longitud o más, y a menudo pueden ser tan largos como un polipéptido natural de longitud completa.

[0318] El término “agente” se usa en la presente para denotar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto hecho de materiales biológicos.

[0319] Como se usa en la presente, los términos “etiqueta” o “etiquetado” se refieren a la incorporación de un marcador detectable, por ejemplo, mediante la incorporación de un aminoácido radioetiquetado o la unión a un polipéptido de porciones biotínico que pueden detectarse mediante avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o una actividad enzimática que puede detectarse mediante métodos ópticos o calorimétricos). En ciertas situaciones, la etiqueta o marcador también puede ser terapéutico. Se pueden usar diversos métodos para etiquetar polipéptidos y glicoproteínas conocidos en la técnica. Los ejemplos de etiquetas para polipéptidos incluyen, entre otros, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), etiquetas fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforos de lantánido), etiquetas enzimáticas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, p-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), quimioluminiscentes, grupos biotínico, epítopos de polipéptidos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cierre de leucina, sitios de fijación para anticuerpos secundarios, dominios de fijación a metales, etiquetas de epítopo). En algunas formas de realización, las etiquetas están unidas mediante brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el posible impedimento estérico. La expresión “agente farmacéutico o fármaco” como se usa en la presente se refiere a un compuesto químico o composición capaz de inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administra adecuadamente a un paciente.

[0320] Otros términos químicos en la presente se usan de acuerdo con el uso convencional en la técnica, como se ejemplifica en *The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

[0321] Como se usa en la presente, “sustancialmente puro” significa que una especie objeto es la especie predominante presente (es decir, en una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición), y, en algunas formas de realización, una fracción sustancialmente purificada es una composición en

donde la especie objeto comprende al menos alrededor de 50 por ciento (en una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes.

[0322] Generalmente, una composición sustancialmente pura comprenderá más de alrededor de 80 por ciento de todas las especies macromoleculares presentes en la composición, en algunas formas de realización, más de alrededor de 85 %, 90 %, 95 % y 99 %. En algunas formas de realización, la especie objeto se purifica hasta una homogeneidad esencial (las especies contaminantes no pueden detectarse en la composición mediante métodos de detección convencionales) en donde la composición consiste esencialmente en una sola especie macromolecular.

[0323] El término paciente incluye sujetos humanos y veterinarios.

[0324] Los anticuerpos y/o anticuerpos activables de la divulgación se fijan específicamente a una diana dada, por ejemplo, una proteína diana humana tal como CD71 humano. También se incluyen en la divulgación anticuerpos y/o anticuerpos activables que se fijan al mismo epítipo que los anticuerpos y/o anticuerpos activables descritos en la presente. También se incluyen en la divulgación anticuerpos y/o anticuerpos activables que compiten con un anticuerpo anti-CD71 y/o un anticuerpo activable anti-CD71 descritos en la presente para fijarse a CD71, por ejemplo, CD71 humano. También se incluyen en la divulgación anticuerpos y/o anticuerpos activables que compiten de forma cruzada con un anticuerpo anti-CD71 y/o un anticuerpo activable anti-CD71 descritos en la presente para fijarse a CD71, por ejemplo, CD71 humano.

[0325] Las personas del oficio de nivel medio reconocerán que es posible determinar, sin experimentación indebida, si un anticuerpo monoclonal (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal o humanizado murino) tiene la misma especificidad que un anticuerpo monoclonal utilizado en los métodos descritos en la presente al determinar si el primero impide que el segundo se fije a la diana. Si el anticuerpo monoclonal que se evalúa compite con el anticuerpo monoclonal de la divulgación, como lo muestra una disminución de la fijación por parte del anticuerpo monoclonal de la divulgación, entonces los dos anticuerpos monoclonales se fijan al mismo epítipo, o a uno estrechamente relacionado. Un método alternativo para determinar si un anticuerpo monoclonal tiene la especificidad de un anticuerpo monoclonal de la divulgación es preincubar el anticuerpo monoclonal de la divulgación con la diana y luego agregar el anticuerpo monoclonal que se evalúa para determinar si el anticuerpo monoclonal que se evalúa tiene inhibida su capacidad de fijarse a la diana. Si el anticuerpo monoclonal que se evalúa está inhibido, entonces, con toda probabilidad, tiene la misma

especificidad epitópica, o una funcionalmente equivalente, que el anticuerpo monoclonal de la divulgación.

Uso de anticuerpos activables conjugados

[0326] Se observará que la administración de entidades terapéuticas de acuerdo con la divulgación se administrará con portadores, excipientes y otros agentes aceptables desde el punto de vista farmacéutico adecuados que se incorporan a las formulaciones para proporcionar una transferencia, administración, tolerancia y similares mejorados.

[0327] Se usan formulaciones terapéuticas de la divulgación, que incluyen a modo de ejemplo no limitativo un anticuerpo activable conjugado, para prevenir, tratar o mejorar de otro modo una enfermedad o trastorno asociado con la expresión y/o actividad anormal de la diana. Por ejemplo, se usan formulaciones terapéuticas de la divulgación, que incluyen un anticuerpo activable conjugado, para tratar o mejorar de otro modo un tipo de cáncer u otra afección neoplásica, inflamación, un trastorno inflamatorio y/o una enfermedad autoinmunitaria. En algunas formas de realización, el cáncer es un tumor sólido o una neoplasia hematológica donde se expresa la diana. En algunas formas de realización, el cáncer es un tumor sólido donde se expresa la diana. En algunas formas de realización, el cáncer es una neoplasia hematológica donde se expresa la diana. En algunas formas de realización, la diana se expresa en el parénquima (por ejemplo, en cáncer, la porción de un órgano o tejido que a menudo realiza funciones del órgano o tejido). En algunas formas de realización, la diana se expresa en una célula, un tejido o un órgano. En algunas formas de realización, la diana se expresa en el estroma (es decir, el marco de soporte conectivo de una célula, un tejido o un órgano). En algunas formas de realización, la diana se expresa en un osteoblasto. En algunas formas de realización, la diana se expresa en el endotelio (vasculatura). En algunas formas de realización, la diana se expresa en una célula madre cancerosa. En algunas formas de realización, el agente con el que se conjuga el anticuerpo y/o el anticuerpo activable es un inhibidor de microtúbulos. En algunas formas de realización, el agente con el que se conjuga el anticuerpo y/o el anticuerpo activable es un agente que daña el ácido nucleico.

[0328] La eficacia de la prevención, la mejora o el tratamiento se determina en asociación con cualquier método conocido para diagnosticar o tratar la enfermedad o trastorno asociado con la expresión y/o actividad de la diana, tal como, por ejemplo, la expresión y/o actividad anormal de la diana. Prolongar la supervivencia de un sujeto o retrasar de otro modo la progresión de la enfermedad o trastorno asociado con la expresión y/o actividad de la diana, por ejemplo, la expresión y/o actividad anormal de

la diana, en un sujeto indica que el anticuerpo, anticuerpo conjugado, anticuerpo activable y/o el anticuerpo activable conjugado confiere un beneficio clínico.

[0329] Se puede administrar un anticuerpo, un anticuerpo conjugado, un anticuerpo activable y/o un anticuerpo activable conjugado en forma de composiciones farmacéuticas. En algunas formas de realización donde se usan fragmentos de anticuerpos, se selecciona el fragmento más pequeño que se fija específicamente al dominio de fijación de la proteína diana. Por ejemplo, en función de las secuencias de la región variable de un anticuerpo, se pueden diseñar moléculas peptídicas que retengan la capacidad de fijarse a la secuencia de proteína diana. Tales péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse mediante tecnología de ADN recombinante. (Ver, por ejemplo, Marasco *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)).

[0330] Las formulaciones a usar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

[0331] En algunas formas de realización, el anticuerpo, el anticuerpo conjugado, el anticuerpo activable y/o el anticuerpo activable conjugado contiene una etiqueta detectable. Se usa un anticuerpo intacto, o un fragmento de este (por ejemplo, Fab, scFv o F(ab)₂). El término “etiquetado”, con respecto a la sonda o el anticuerpo, pretende abarcar el etiquetado directo de la sonda o el anticuerpo mediante el acoplamiento (es decir, el enlace físico) de una sustancia detectable a la sonda o el anticuerpo, así como el etiquetado indirecto de la sonda o el anticuerpo mediante reactividad con otro reactivo que está etiquetado directamente. Los ejemplos de etiquetado indirecto incluyen la detección de un anticuerpo primario mediante el uso de un anticuerpo secundario etiquetado con fluorescencia y el etiquetado final de una sonda de ADN con biotina de modo que pueda detectarse con estreptavidina etiquetada con fluorescencia. La expresión “muestra biológica” pretende incluir tejidos, células y fluidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes dentro de un sujeto. Por lo tanto, dentro del uso de la expresión “muestra biológica” se incluye la sangre y una fracción o un componente de la sangre, incluso suero sanguíneo, plasma sanguíneo o linfa. Es decir, el método de detección de la divulgación puede usarse para detectar un mRNA, una proteína o un ADN genómico de analito en una muestra biológica *in vitro* así como *in vivo*. Por ejemplo, las técnicas *in vitro* para la detección de un mRNA de analito incluyen hibridaciones Northern e hibridaciones *in situ*. Las técnicas *in vitro* para la detección de un analito de proteína

incluyen ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), transferencias Western, inmunoprecipitaciones, tinción inmunoquímica e inmunofluorescencia. Las técnicas *in vitro* para la detección de un ADN genómico de analito incluyen hibridaciones Southern. Los procedimientos para realizar inmunoensayos se describen, por ejemplo, en “ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology”, Vol. 42, J. R. Crowther (Ed.) Human Press, Totowa, NJ, 1995; “Immunoassay”, E. Diamandis y T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996; y “Practice and Theory of Enzyme Immunoassays”, P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Ámsterdam, 1985. Además, las técnicas *in vivo* para la detección de una proteína de analito incluyen la introducción en un sujeto de un anticuerpo anti-proteína de analito etiquetado. Por ejemplo, el anticuerpo puede etiquetarse con un marcador radiactivo cuya presencia y ubicación en un sujeto puede detectarse mediante técnicas de diagnóstico por imágenes estándar.

[0332] Los anticuerpos, anticuerpos conjugados, anticuerpos activables y/o anticuerpos activables conjugados de la divulgación también son útiles en una variedad de formulaciones de diagnóstico y profilácticas. En una forma de realización, un anticuerpo activable conjugado se administra a pacientes que corren el riesgo de desarrollar uno o más de los trastornos mencionados anteriormente. La predisposición de un paciente u órgano a uno o más de los trastornos mencionados anteriormente puede determinarse mediante el uso de marcadores genotípicos, serológicos o bioquímicos.

[0333] En algunas formas de realización de la divulgación, un anticuerpo activable conjugado se administra a individuos humanos diagnosticados con una indicación clínica asociada con uno o más de los trastornos mencionados anteriormente. Tras el diagnóstico, un anticuerpo activable conjugado se administra para mitigar o revertir los efectos de la indicación clínica.

[0334] Un anticuerpo, un anticuerpo conjugado, un anticuerpo activable y/o un anticuerpo activable conjugado de la divulgación también son útiles en la detección de una diana en muestras de pacientes y, en consecuencia, son útiles como diagnóstico. Por ejemplo, los anticuerpos y/o anticuerpos activables, y las versiones conjugadas de estos, de la divulgación se usan en ensayos *in vitro*, por ejemplo, ELISA, para detectar niveles diana en una muestra de paciente.

[0335] En una forma de realización, un anticuerpo, un anticuerpo conjugado, un anticuerpo activable y/o un anticuerpo activable conjugado de la divulgación se inmovilizan sobre un soporte sólido (por ejemplo, las cavidades de una placa de

microtitulación). El anticuerpo, el anticuerpo conjugado, el anticuerpo activable y/o el anticuerpo activable conjugado inmovilizados sirven como un anticuerpo de captura para cualquier diana que pueda estar presente en una muestra de prueba. Antes de poner en contacto el anticuerpo y/o el anticuerpo activable inmovilizado, y/o las versiones conjugadas de estos, con una muestra del paciente, el soporte sólido se enjuaga y se trata con un agente de bloqueo tal como proteína de leche o albúmina para impedir la adsorción no específica del analito.

[0336] Posteriormente, las cavidades se tratan con una muestra de prueba que se sospecha que contiene el antígeno, o con una solución que contiene una cantidad estándar del antígeno. Tal muestra es, por ejemplo, una muestra de suero de un sujeto que se sospecha que tiene niveles de antígeno circulante considerados diagnósticos de una patología. Después de enjuagar el estándar o la muestra de prueba, el soporte sólido se trata con un segundo anticuerpo que está etiquetado de manera detectable. El segundo anticuerpo etiquetado funciona como anticuerpo de detección. Se mide el nivel de etiqueta detectable y se determina la concentración de antígeno diana en la muestra de prueba en comparación con una curva estándar desarrollada a partir de las muestras estándar.

[0337] Se observará que, en función de los resultados obtenidos mediante el uso de los anticuerpos y los anticuerpos activables de la divulgación, y las versiones conjugadas de estos, en un ensayo de diagnóstico *in vitro*, es posible estadificar una enfermedad en un sujeto en función de los niveles de expresión del antígeno diana. Para una enfermedad dada, se toman muestras de sangre de sujetos diagnosticados en diversas etapas de la progresión de la enfermedad, y/o en diversos puntos del tratamiento terapéutico de la enfermedad. Mediante el uso de una población de muestras que proporciona resultados estadísticamente significativos para cada etapa de progresión o tratamiento, se designa un rango de concentraciones del antígeno que puede considerarse característico de cada etapa.

[0338] Un anticuerpo, un anticuerpo conjugado, un anticuerpo activable y/o un anticuerpo activable conjugado también pueden usarse en métodos de diagnóstico y/o diagnóstico por imágenes. En algunas formas de realización, tales métodos son métodos *in vitro*. En algunas formas de realización, tales métodos son métodos *in vivo*. En algunas formas de realización, tales métodos son métodos *in situ*. En algunas formas de realización, tales métodos son métodos *ex vivo*. Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos activables que tienen una CM escindible enzimáticamente para detectar la presencia o ausencia de una enzima que es capaz de escindir la CM. Tales

anticuerpos activables pueden usarse para el diagnóstico, que puede incluir la detección *in vivo* (por ejemplo, cualitativa o cuantitativa) de la actividad enzimática (o, en algunas formas de realización, un entorno de potencial de reducción incrementado tal como el que puede proporcionar la reducción de un puente disulfuro) a través de la acumulación medida de anticuerpos activados (es decir, anticuerpos resultantes de la escisión de un anticuerpo activable) en una célula o tejido dado de un organismo huésped dado. Tal acumulación de anticuerpos activados indica no solo que el tejido expresa actividad enzimática (o un potencial de reducción incrementado según la naturaleza de la CM) sino también que el tejido expresa la diana a la que se fija el anticuerpo activado.

[0339] Por ejemplo, la CM puede seleccionarse como sustrato para al menos una proteasa encontrada en el sitio de un tumor, en el sitio de una infección viral o bacteriana en un sitio biológicamente confinado (por ejemplo, en un absceso, en un órgano y similares) y similares. El AB puede ser uno que se fije a un antígeno diana. Con métodos divulgados en la presente, o, cuando sea apropiado, métodos familiares para una persona del oficio de nivel medio, una etiqueta detectable (por ejemplo, una etiqueta fluorescente o etiqueta radiactiva o radiotrazador) puede conjugarse con un AB u otra región de un anticuerpo y/o anticuerpo activable. Se analizan etiquetas detectables adecuadas en el contexto de los métodos de cribado anteriores y se proporcionan ejemplos específicos adicionales a continuación. Mediante el uso de un AB específico para una proteína o un péptido del estado patológico, junto con al menos una proteasa cuya actividad es elevada en el tejido de la enfermedad de interés, los anticuerpos activables exhibirán una mayor tasa de fijación al tejido de la enfermedad en relación con los tejidos donde la enzima específica de CM no está presente en un nivel detectable o está presente en un nivel más bajo que en el tejido de la enfermedad o está inactiva (por ejemplo, en forma de zimógeno o en complejo con un inhibidor). Dado que el sistema de filtración renal elimina rápidamente de la sangre las proteínas y los péptidos pequeños, y porque la enzima específica de CM no está presente en un nivel detectable (o está presente en niveles más bajos en los tejidos que no son de la enfermedad o está presente en conformación inactiva), la acumulación de anticuerpos activados en el tejido de la enfermedad aumenta en relación con los tejidos que no son de la enfermedad.

[0340] En otro ejemplo, se pueden usar anticuerpos activables para detectar la presencia o ausencia de un agente de escisión en una muestra. Por ejemplo, cuando los anticuerpos activables contienen una CM susceptible de escisión por una enzima,

los anticuerpos activables pueden usarse para detectar (ya sea cualitativa o cuantitativamente) la presencia de una enzima en la muestra. En otro ejemplo, cuando los anticuerpos activables contienen una CM susceptible de escisión por un agente reductor, los anticuerpos activables pueden usarse para detectar (ya sea cualitativa o cuantitativamente) la presencia de condiciones de reducción en una muestra. Para facilitar el análisis en estos métodos, los anticuerpos activables pueden etiquetarse de manera detectable y pueden fijarse a un soporte (por ejemplo, un soporte sólido, como un portaobjetos o una microesfera). La etiqueta detectable puede ubicarse en una porción del anticuerpo activable que no se libera después de la escisión, por ejemplo, la etiqueta detectable puede ser una etiqueta fluorescente inactivada u otra etiqueta que no es detectable hasta producirse la escisión. El ensayo puede realizarse, por ejemplo, al poner en contacto los anticuerpos activables inmovilizados y etiquetados de manera detectable con una muestra que se sospecha que contiene una enzima y/o un agente reductor durante un período de tiempo suficiente para que se produzca la escisión, y luego lavar para eliminar el exceso de muestra y contaminantes. La presencia o ausencia del agente de escisión (por ejemplo, enzima o agente reductor) en la muestra luego se evalúa mediante un cambio en la señal detectable de los anticuerpos activables antes de ponerlos en contacto con la muestra, por ejemplo, la presencia y/o un aumento en la señal detectable debido a la escisión del anticuerpo activable por el agente de escisión en la muestra.

[0341] Tales métodos de detección pueden adaptarse para proporcionar también la detección de la presencia o ausencia de una diana que sea capaz de fijar el AB de los anticuerpos activables cuando se escinden. Por lo tanto, los ensayos pueden adaptarse para evaluar la presencia o ausencia de un agente de escisión y la presencia o ausencia de una diana de interés. La presencia o ausencia del agente de escisión puede detectarse mediante la presencia y/o un aumento en la etiqueta detectable de los anticuerpos activables como se describió anteriormente, y la presencia o ausencia de la diana puede detectarse mediante la detección de un complejo diana-AB, por ejemplo, mediante el uso de un anticuerpo anti-diana etiquetado de manera detectable.

[0342] Los anticuerpos activables también son útiles en el diagnóstico por imágenes *in situ* para la validación de la activación de anticuerpos activables, por ejemplo, por escisión de proteasa, y la fijación a una diana particular. El diagnóstico por imágenes *in situ* es una técnica que permite la localización de la actividad proteolítica y la diana en muestras biológicas tales como cultivos celulares o secciones de tejido. Con esta

técnica, es posible confirmar tanto la fijación a una diana dada como la actividad proteolítica en función de la presencia de una etiqueta detectable (por ejemplo, una etiqueta fluorescente).

[0343] Estas técnicas son útiles con cualquier célula o tejido congelado derivado de un sitio de la enfermedad (por ejemplo, tejido tumoral) o tejidos sanos. Estas técnicas también son útiles con muestras de células o tejidos frescos.

[0344] En estas técnicas, un anticuerpo activable está etiquetado con una etiqueta detectable. La etiqueta detectable puede ser un tinte fluorescente, (por ejemplo, un fluoróforo, isotiocianato de fluoresceína (FITC), isotiocianato de rodamina (TRITC), una etiqueta Alexa Fluor®), un colorante infrarrojo cercano (NIR) (por ejemplo, nanocristales Qdot®), un metal coloidal, un hapteno, un marcador radiactivo, biotina y un reactivo de amplificación como estreptavidina o una enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina).

[0345] La detección de la etiqueta en una muestra que se ha incubado con el anticuerpo activable etiquetado indica que la muestra contiene la diana y contiene una proteasa que es específica para la CM del anticuerpo activable. En algunas formas de realización, la presencia de la proteasa puede confirmarse mediante el uso de inhibidores de la proteasa de amplio espectro tales como los descritos en la presente, y/o mediante el uso de un agente que es específico para la proteasa, por ejemplo, un anticuerpo como A11, que es específico para la proteasa matriptasa e inhibe la actividad proteolítica de la matriptasa; ver, por ejemplo, la publicación internacional N.º WO 2010/129609, publicada el 11 de noviembre de 2010. El mismo enfoque de usar inhibidores de la proteasa de amplio espectro como los descritos en la presente, y/o de usar un agente inhibidor más selectivo, puede usarse para identificar una proteasa que sea específica para la CM del anticuerpo activable. En algunas formas de realización, la presencia de la diana puede confirmarse mediante el uso de un agente que es específico para la diana, por ejemplo, otro anticuerpo, o la etiqueta detectable puede competir con la diana no etiquetada. En algunas formas de realización, podría usarse un anticuerpo activable no etiquetado, con detección mediante un anticuerpo secundario etiquetado o un sistema de detección más complejo.

[0346] Técnicas similares también son útiles para el diagnóstico por imágenes *in vivo* donde la detección de la señal fluorescente en un sujeto, por ejemplo, un mamífero, incluido un ser humano, indica que el sitio de la enfermedad contiene la diana y contiene una proteasa que es específica para la CM del anticuerpo activable.

[0347] Estas técnicas también son útiles en kits y/o como reactivos para la detección,

identificación o caracterización de la actividad de la proteasa en una variedad de células, tejidos y organismos en función de la CM específica de la proteasa en el anticuerpo activable.

[0348] La divulgación proporciona métodos para usar los anticuerpos y/o anticuerpos activables en una variedad de indicaciones de diagnóstico y/o profilácticas. Por ejemplo, la divulgación proporciona métodos para detectar la presencia o ausencia de un agente de escisión y una diana de interés en un sujeto o una muestra al (i) poner en contacto un sujeto o una muestra con un anticuerpo activable, en donde el anticuerpo activable comprende una porción de enmascaramiento (MM), una porción escindible (CM) que se ve escindida por el agente de escisión, por ejemplo, una proteasa, y un dominio de fijación al antígeno o fragmento de este (AB) que se fija específicamente a la diana de interés, en donde el anticuerpo activable en un estado no activado y no escindido comprende una disposición estructural desde el terminal N al terminal C de la siguiente manera: MM-CM-AB o AB-CM-MM; (a) en donde la MM es un péptido que inhibe la fijación del AB a la diana, y en donde la MM no tiene una secuencia de aminoácidos de un componente de fijación natural del AB y no es una forma modificada de un componente de fijación natural del AB; y (b) en donde, en un estado no activado y no escindido, la MM interfiere con la fijación específica del AB a la diana, y, en un estado activado y escindido, la MM no interfiere ni compite con la fijación específica del AB a la diana; y (ii) medir un nivel de anticuerpo activable activado en el sujeto o la muestra, en donde un nivel detectable de anticuerpo activable activado en el sujeto o la muestra indica que el agente de escisión y la diana están presentes en el sujeto o la muestra y en donde la falta de un nivel detectable de anticuerpo activable activado en el sujeto o la muestra indica que el agente de escisión, la diana o tanto el agente de escisión como la diana están ausentes y/o no suficientemente presentes en el sujeto o la muestra. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable es un anticuerpo activable con el que se conjuga un agente terapéutico. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable no se conjuga con un agente. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable comprende una etiqueta detectable. En algunas formas de realización, la etiqueta detectable se ubica en el AB. En algunas formas de realización, la medición del nivel de anticuerpo activable en el sujeto o la muestra se realiza mediante el uso de un reactivo secundario que se fija específicamente al anticuerpo activado, en donde el reactivo comprende una etiqueta detectable. En algunas formas de realización, el reactivo secundario es un anticuerpo que comprende una etiqueta detectable.

[0349] La divulgación también proporciona métodos para detectar la presencia o ausencia de un agente de escisión en un sujeto o una muestra al (i) poner en contacto un sujeto o una muestra con un anticuerpo activable en presencia de una diana de interés, por ejemplo, la diana, en donde el anticuerpo activable comprende una porción de enmascaramiento (MM), una porción escindible (CM) que se ve escindida por el agente de escisión, por ejemplo, una proteasa, y un dominio de fijación al antígeno o fragmento de este (AB) que se fija específicamente a la diana de interés, en donde el anticuerpo activable en un estado no activado y no escindido comprende una disposición estructural desde el terminal N al terminal C de la siguiente manera: MM-CM-AB o AB-CM-MM; (a) en donde la MM es un péptido que inhibe la fijación del AB a la diana, y en donde la MM no tiene una secuencia de aminoácidos de un componente de fijación natural del AB y no es una forma modificada de un componente de fijación natural del AB; y (b) en donde, en un estado no activado y no escindido, la MM interfiere con la fijación específica del AB a la diana, y, en un estado activado y escindido, la MM no interfiere ni compite con la fijación específica del AB a la diana; y (ii) medir un nivel de anticuerpo activable activado en el sujeto o la muestra, en donde un nivel detectable de anticuerpo activable activado en el sujeto o la muestra indica que el agente de escisión está presente en el sujeto o la muestra y en donde la falta de un nivel detectable de anticuerpo activable activado en el sujeto o la muestra indica que el agente de escisión está ausente y/o no está suficientemente presente en el sujeto o la muestra. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable es un anticuerpo activable con el que se conjuga un agente terapéutico. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable no se conjuga con un agente. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable comprende una etiqueta detectable. En algunas formas de realización, la etiqueta detectable se ubica en el AB. En algunas formas de realización, la medición del nivel de anticuerpo activable en el sujeto o la muestra se realiza mediante el uso de un reactivo secundario que se fija específicamente al anticuerpo activado, en donde el reactivo comprende una etiqueta detectable. En algunas formas de realización, el reactivo secundario es un anticuerpo que comprende una etiqueta detectable.

[0350] La divulgación también proporciona kits para su uso en métodos para detectar la presencia o ausencia de un agente de escisión y la diana en un sujeto o una muestra, donde los kits incluyen al menos un anticuerpo activable que comprende una porción de enmascaramiento (MM), una porción escindible (CM) que se ve escindida por el agente de escisión, por ejemplo, una proteasa, y un dominio de fijación al

antígeno o fragmento de este (AB) que se fija específicamente a la diana de interés, en donde el anticuerpo activable en un estado no activado y no escindido comprende una disposición estructural desde el terminal N al terminal C de la siguiente manera: MM-CM-AB o AB-CM-MM; (a) en donde la MM es un péptido que inhibe la fijación del AB a la diana, y en donde la MM no tiene una secuencia de aminoácidos de un componente de fijación natural del AB y no es una forma modificada de un componente de fijación natural del AB; y (b) en donde, en un estado no activado y no escindido, la MM interfiere con la fijación específica del AB a la diana, y, en un estado activado y escindido, la MM no interfiere ni compite con la fijación específica del AB a la diana; y (ii) medir un nivel de anticuerpo activable activado en el sujeto o la muestra, en donde un nivel detectable de anticuerpo activable activado en el sujeto o la muestra indica que el agente de escisión está presentes en el sujeto o la muestra y en donde la falta de un nivel detectable de anticuerpo activable activado en el sujeto o la muestra indica que el agente de escisión está ausentes y/o no está suficientemente presente en el sujeto o la muestra. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable es un anticuerpo activable con el que se conjuga un agente terapéutico. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable no se conjuga con un agente. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable comprende una etiqueta detectable. En algunas formas de realización, la etiqueta detectable se ubica en el AB. En algunas formas de realización, la medición del nivel de anticuerpo activable en el sujeto o la muestra se realiza mediante el uso de un reactivo secundario que se fija específicamente al anticuerpo activado, en donde el reactivo comprende una etiqueta detectable. En algunas formas de realización, el reactivo secundario es un anticuerpo que comprende una etiqueta detectable.

[0351] La divulgación también proporciona métodos para detectar la presencia o ausencia de un agente de escisión en un sujeto o una muestra al (i) poner en contacto un sujeto o una muestra con un anticuerpo activable, en donde el anticuerpo activable comprende una porción de enmascaramiento (MM), una porción escindible (CM) que se ve escindida por el agente de escisión, por ejemplo, una proteasa, un dominio de fijación al antígeno (AB) que se fija específicamente a la diana, y una etiqueta detectable, en donde el anticuerpo activable en un estado no activado y no escindido comprende una disposición estructural desde el terminal N al terminal C de la siguiente manera: MM-CM-AB o AB-CM-MM; en donde la MM es un péptido que inhibe la fijación del AB a la diana, y en donde la MM no tiene una secuencia de aminoácidos de un componente de fijación natural del AB y no es una forma modificada de un

componente de fijación natural del AB; en donde, en un estado no activado y no escindido, la MM interfiere con la fijación específica del AB a la diana, y, en un estado activado y escindido, la MM no interfiere ni compite con la fijación específica del AB a la diana; y en donde la etiqueta detectable se ubica en una porción del anticuerpo activable que se libera después de la escisión de la CM; y (ii) medir un nivel de etiqueta detectable en el sujeto o la muestra, en donde un nivel detectable de la etiqueta detectable en el sujeto o la muestra indica que el agente de escisión está ausente y/o no está suficientemente presente en el sujeto o la muestra y en donde la falta de un nivel detectable de la etiqueta detectable en el sujeto o la muestra indica que el agente de escisión está presente en el sujeto o la muestra. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable es un anticuerpo activable con el que se conjuga un agente terapéutico. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable no se conjuga con un agente. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable comprende una etiqueta detectable. En algunas formas de realización, la etiqueta detectable se ubica en el AB. En algunas formas de realización, la medición del nivel de anticuerpo activable en el sujeto o la muestra se realiza mediante el uso de un reactivo secundario que se fija específicamente al anticuerpo activado, en donde el reactivo comprende una etiqueta detectable. En algunas formas de realización, el reactivo secundario es un anticuerpo que comprende una etiqueta detectable.

[0352] La divulgación también proporciona kits para su uso en métodos para detectar la presencia o ausencia de un agente de escisión y la diana en un sujeto o una muestra, en donde los kits incluyen al menos un anticuerpo activable y/o un anticuerpo activable conjugado (por ejemplo, un anticuerpo activable con el que se conjuga un agente terapéutico) descrito en la presente para su uso en poner en contacto un sujeto o una muestra biológica y medios para detectar el nivel de anticuerpo activable activado y/o anticuerpo activable conjugado en el sujeto o la muestra biológica, en donde un nivel detectable de anticuerpo activable activado en el sujeto o la muestra biológica indica que el agente de escisión y la diana están presentes en el sujeto o la muestra biológica y en donde la falta de un nivel detectable de anticuerpo activable activado en el sujeto o la muestra biológica indica que el agente de escisión, la diana o tanto el agente de escisión como la diana están ausentes y/o no suficientemente presentes en el sujeto o la muestra biológica, de modo que la fijación a la diana y/o la escisión de la proteasa del anticuerpo activable no pueden detectarse en el sujeto o la muestra biológica.

[0353] La divulgación también proporciona métodos para detectar la presencia o

ausencia de un agente de escisión en un sujeto o una muestra al (i) poner en contacto un sujeto o una muestra biológica con un anticuerpo activable en presencia de la diana, y (ii) medir un nivel de anticuerpo activable activado en el sujeto o la muestra biológica, en donde un nivel detectable de anticuerpo activable activado en el sujeto o la muestra biológica indica que el agente de escisión está presente en el sujeto o la muestra biológica y en la falta de un nivel detectable de anticuerpo activable activado en el sujeto o la muestra biológica indica que el agente de escisión está ausente y/o no está suficientemente presente en el sujeto o la muestra biológica en un nivel detectable, de modo que la escisión de la proteasa del anticuerpo activable no puede detectarse en el sujeto o la muestra biológica. Tal anticuerpo activable incluye una porción de enmascaramiento (MM), una porción escindible (CM) que se ve escindida por el agente de escisión, por ejemplo, una proteasa, y un dominio de fijación al antígeno o fragmento de este (AB) que se fija específicamente a la diana, en donde el anticuerpo activable en un estado no escindido (es decir, no activado) comprende una disposición estructural desde el terminal N al terminal C de la siguiente manera: MM-CM-AB o AB-CM-MM; (a) en donde la MM es un péptido que inhibe la fijación del AB a la diana, y en donde la MM no tiene una secuencia de aminoácidos de un componente de fijación natural del AB; y (b) en donde la MM del anticuerpo activable en un estado no escindido interfiere con la fijación específica del AB a la diana, y en donde la MM de un anticuerpo activable en un estado escindido (es decir, activado) no interfiere ni compite con la fijación específica del AB a la diana. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable es un anticuerpo activable con el que se conjuga un agente terapéutico. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable no se conjuga con un agente. En algunas formas de realización, la etiqueta detectable está unida a la porción de enmascaramiento. En algunas formas de realización, la etiqueta detectable está unida al terminal N de la porción escindible al sitio de escisión de la proteasa. En algunas formas de realización, un solo sitio de fijación al antígeno del AB está enmascarado. En algunas formas de realización en donde un anticuerpo de la divulgación tiene al menos dos sitios de fijación al antígeno, al menos un sitio de fijación al antígeno está enmascarado y al menos un sitio de fijación al antígeno no está enmascarado. En algunas formas de realización, todos los sitios de fijación al antígeno están enmascarados. En algunas formas de realización, la etapa de medición incluye el uso de un reactivo secundario que comprende una etiqueta detectable.

[0354] La divulgación también proporciona kits para su uso en métodos para detectar la presencia o ausencia de un agente de escisión y la diana en un sujeto o una

muestra, donde los kits incluyen al menos un anticuerpo activable y/o un anticuerpo activable conjugado descritos en la presente para su uso en poner en contacto un sujeto o una muestra biológica con un anticuerpo activable en presencia de la diana, y medir un nivel de anticuerpo activable activado en el sujeto o la muestra biológica, en donde un nivel detectable de anticuerpo activable activado en el sujeto o la muestra biológica indica que el agente de escisión está presente en el sujeto o la muestra biológica y en la falta de un nivel detectable de anticuerpo activable activado en el sujeto o la muestra biológica indica que el agente de escisión está ausente y/o no está suficientemente presente en el sujeto o la muestra biológica en un nivel detectable, de modo que la escisión de la proteasa del anticuerpo activable no puede detectarse en el sujeto o la muestra biológica. Tal anticuerpo activable incluye una porción de enmascaramiento (MM), una porción escindible (CM) que se ve escindida por el agente de escisión, por ejemplo, una proteasa, y un dominio de fijación al antígeno o fragmento de este (AB) que se fija específicamente a la diana, en donde el anticuerpo activable en un estado no escindido (es decir, no activado) comprende una disposición estructural desde el terminal N al terminal C de la siguiente manera: MM-CM-AB o AB-CM-MM; (a) en donde la MM es un péptido que inhibe la fijación del AB a la diana, y en donde la MM no tiene una secuencia de aminoácidos de un componente de fijación natural del AB; y (b) en donde la MM del anticuerpo activable en un estado no escindido interfiere con la fijación específica del AB a la diana, y en donde la MM de un anticuerpo activable en un estado escindido (es decir, activado) no interfiere ni compite con la fijación específica del AB a la diana. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable es un anticuerpo activable con el que se conjuga un agente terapéutico. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable no se conjuga con un agente. En algunas formas de realización, la etiqueta detectable está unida a la porción de enmascaramiento. En algunas formas de realización, la etiqueta detectable está unida al terminal N de la porción escindible al sitio de escisión de la proteasa. En algunas formas de realización, un solo sitio de fijación al antígeno del AB está enmascarado. En algunas formas de realización en donde un anticuerpo de la divulgación tiene al menos dos sitios de fijación al antígeno, al menos un sitio de fijación al antígeno está enmascarado y al menos un sitio de fijación al antígeno no está enmascarado. En algunas formas de realización, todos los sitios de fijación al antígeno están enmascarados. En algunas formas de realización, la etapa de medición incluye el uso de un reactivo secundario que comprende una etiqueta detectable.

[0355] La divulgación también proporciona kits para su uso en métodos para detectar

la presencia o ausencia de un agente de escisión en un sujeto o una muestra, en donde los kits incluyen al menos un anticuerpo activable y/o un anticuerpo activable conjugado descritos en la presente para su uso en poner en contacto un sujeto o una muestra biológica y medios para detectar el nivel de anticuerpo activable activado y/o anticuerpo activable conjugado en el sujeto o la muestra biológica, en donde el anticuerpo activable incluye una etiqueta detectable que se ubica en una porción del anticuerpo activable que se libera después de la escisión de la CM, en donde un nivel detectable de anticuerpo activable activado en el sujeto o la muestra biológica indica que el agente de escisión está ausente y/o no suficientemente presente en el sujeto o la muestra biológica, de modo que la fijación a la diana y/o la escisión de la proteasa del anticuerpo activable no pueden detectarse en el sujeto o la muestra biológica, y en donde la falta de un nivel detectable de anticuerpo activable activado en el sujeto o la muestra biológica indica que el agente de escisión está presente en el sujeto o la muestra biológica en un nivel detectable.

[0356] La divulgación proporciona métodos para detectar la presencia o ausencia de un agente de escisión y la diana en un sujeto o una muestra al (i) poner en contacto un sujeto o una muestra biológica con un anticuerpo activable, en donde el anticuerpo activable incluye una etiqueta detectable que se ubica en una porción del anticuerpo activable que se libera después de la escisión de la CM, y (ii) medir un nivel de anticuerpo activable activado en el sujeto o la muestra biológica, en donde un nivel detectable de anticuerpo activable activado en el sujeto o la muestra biológica indica que el agente de escisión, la diana o tanto el agente de escisión como la diana están ausentes y/o no suficientemente presentes en el sujeto o la muestra biológica, de modo que la fijación a la diana y/o la escisión de la proteasa del anticuerpo activable no pueden detectarse en el sujeto o la muestra biológica, y en donde un nivel detectable reducido de anticuerpo activable activado en el sujeto o la muestra biológica indica que el agente de escisión y la diana están presentes en el sujeto o la muestra biológica. Un nivel reducido de etiqueta detectable es, por ejemplo, una reducción de alrededor de 5 %, alrededor de 10 %, alrededor de 15 %, alrededor de 20 %, alrededor de 25 %, alrededor de 30 %, alrededor de 35 %, alrededor de 40 %, alrededor de 45 %, alrededor de 50 %, alrededor de 55 %, alrededor de 60 %, alrededor de 65 %, alrededor de 70 %, alrededor de 75 %, alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 % y/o alrededor de 100 %. Tal anticuerpo activable incluye una porción de enmascaramiento (MM), una porción escindible (CM) que se ve escindida por el agente de escisión, y un dominio de fijación

al antígeno o fragmento de este (AB) que se fija específicamente a la diana, en donde el anticuerpo activable en un estado no escindido (es decir, no activado) comprende una disposición estructural desde el terminal N al terminal C de la siguiente manera: MM-CM-AB o AB-CM-MM; (a) en donde la MM es un péptido que inhibe la fijación del AB a la diana, y en donde la MM no tiene una secuencia de aminoácidos de un componente de fijación natural del AB; y (b) en donde la MM del anticuerpo activable en un estado no escindido interfiere con la fijación específica del AB a la diana, y en donde la MM de un anticuerpo activable en un estado escindido (es decir, activado) no interfiere ni compite con la fijación específica del AB a la diana. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable es un anticuerpo activable con el que se conjuga un agente terapéutico. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable no se conjuga con un agente. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable comprende una etiqueta detectable. En algunas formas de realización, la etiqueta detectable se ubica en el AB. En algunas formas de realización, la medición del nivel de anticuerpo activable en el sujeto o la muestra se realiza mediante el uso de un reactivo secundario que se fija específicamente al anticuerpo activado, en donde el reactivo comprende una etiqueta detectable. En algunas formas de realización, el reactivo secundario es un anticuerpo que comprende una etiqueta detectable.

[0357] La divulgación también proporciona kits para su uso en métodos para detectar la presencia o ausencia de un agente de escisión y la diana en un sujeto o una muestra, en donde los kits incluyen al menos un anticuerpo activable y/o un anticuerpo activable conjugado descritos en la presente para su uso en poner en contacto un sujeto o una muestra biológica y medios para detectar el nivel de anticuerpo activable activado y/o anticuerpo activable conjugado en el sujeto o la muestra biológica, en donde un nivel detectable de anticuerpo activable activado en el sujeto o la muestra biológica indica que el agente de escisión, la diana o tanto el agente de escisión como la diana están ausentes y/o no suficientemente presentes en el sujeto o la muestra biológica, de modo que la fijación a la diana y/o la escisión de la proteasa del anticuerpo activable no pueden detectarse en el sujeto o la muestra biológica, y en donde un nivel detectable reducido de anticuerpo activable activado en el sujeto o la muestra biológica indica que el agente de escisión y la diana están presentes en el sujeto o la muestra biológica. Un nivel reducido de etiqueta detectable es, por ejemplo, una reducción de alrededor de 5 %, alrededor de 10 %, alrededor de 15 %, alrededor de 20 %, alrededor de 25 %, alrededor de 30 %, alrededor de 35 %, alrededor de 40 %, alrededor de 45 %, alrededor de 50 %, alrededor de 55 %, alrededor de 60 %,

alrededor de 65 %, alrededor de 70 %, alrededor de 75 %, alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 % y/o alrededor de 100 %.

[0358] La divulgación también proporciona métodos para detectar la presencia o ausencia de un agente de escisión en un sujeto o una muestra al (i) poner en contacto un sujeto o una muestra biológica con un anticuerpo activable, en donde el anticuerpo activable incluye una etiqueta detectable que se ubica en una porción del anticuerpo activable que se libera después de la escisión de la CM; y (ii) medir un nivel de etiqueta detectable en el sujeto o la muestra biológica, en donde un nivel detectable de la etiqueta detectable en el sujeto o la muestra biológica indica que el agente de escisión está ausente y/o no suficientemente presente en el sujeto o la muestra biológica en un nivel detectable, de modo que la escisión de la proteasa del anticuerpo activable no puede detectarse en el sujeto o la muestra biológica, y en donde un nivel detectable reducido de la etiqueta detectable en el sujeto o la muestra biológica indica que el agente de escisión está presente en el sujeto o la muestra biológica. Un nivel reducido de etiqueta detectable es, por ejemplo, una reducción de alrededor de 5 %, alrededor de 10 %, alrededor de 15 %, alrededor de 20 %, alrededor de 25 %, alrededor de 30 %, alrededor de 35 %, alrededor de 40 %, alrededor de 45 %, alrededor de 50 %, alrededor de 55 %, alrededor de 60 %, alrededor de 65 %, alrededor de 70 %, alrededor de 75 %, alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 % y/o alrededor de 100 %. Tal anticuerpo activable incluye una porción de enmascaramiento (MM), una porción escindible (CM) que se ve escindida por el agente de escisión, y un dominio de fijación al antígeno o fragmento de este (AB) que se fija específicamente a la diana, en donde el anticuerpo activable en un estado no escindido (es decir, no activado) comprende una disposición estructural desde el terminal N al terminal C de la siguiente manera: MM-CM-AB o AB-CM-MM; (a) en donde la MM es un péptido que inhibe la fijación del AB a la diana, y en donde la MM no tiene una secuencia de aminoácidos de un componente de fijación natural del AB; y (b) en donde la MM del anticuerpo activable en un estado no escindido interfiere con la fijación específica del AB a la diana, y en donde la MM de un anticuerpo activable en un estado escindido (es decir, activado) no interfiere ni compite con la fijación específica del AB a la diana. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable es un anticuerpo activable con el que se conjuga un agente terapéutico. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable no se conjuga con un agente. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable comprende una etiqueta detectable. En algunas formas de realización, la etiqueta detectable se

ubica en el AB. En algunas formas de realización, la medición del nivel de anticuerpo activable en el sujeto o la muestra se realiza mediante el uso de un reactivo secundario que se fija específicamente al anticuerpo activado, en donde el reactivo comprende una etiqueta detectable. En algunas formas de realización, el reactivo secundario es un anticuerpo que comprende una etiqueta detectable.

[0359] La divulgación también proporciona kits para su uso en métodos para detectar la presencia o ausencia de un agente de escisión de interés en un sujeto o una muestra, donde los kits incluyen al menos un anticuerpo activable y/o un anticuerpo activable conjugado descritos en la presente para su uso en poner en contacto un sujeto o una muestra biológica y medios para detectar el nivel de anticuerpo activable activado y/o anticuerpo activable conjugado en el sujeto o la muestra biológica, en donde el anticuerpo activable incluye una etiqueta detectable que se ubica en una porción del anticuerpo activable que se libera después de la escisión de la CM, en donde un nivel detectable de la etiqueta detectable en el sujeto o la muestra biológica indica que el agente de escisión, la diana o tanto el agente de escisión como la diana están ausentes y/o no suficientemente presentes en el sujeto o la muestra biológica, de modo que la fijación a la diana y/o la escisión de la proteasa del anticuerpo activable no pueden detectarse en el sujeto o la muestra biológica, y en donde un nivel detectable reducido de la etiqueta detectable en el sujeto o la muestra biológica indica que el agente de escisión y la diana están presentes en el sujeto o la muestra biológica. Un nivel reducido de etiqueta detectable es, por ejemplo, una reducción de alrededor de 5 %, alrededor de 10 %, alrededor de 15 %, alrededor de 20 %, alrededor de 25 %, alrededor de 30 %, alrededor de 35 %, alrededor de 40 %, alrededor de 45 %, alrededor de 50 %, alrededor de 55 %, alrededor de 60 %, alrededor de 65 %, alrededor de 70 %, alrededor de 75 %, alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 % y/o alrededor de 100 %.

[0360] En algunas formas de realización de estos métodos y kits, el anticuerpo activable incluye una etiqueta detectable. En algunas formas de realización de estos métodos y kits, la etiqueta detectable incluye un agente para diagnóstico por imágenes, un agente de contraste, una enzima, una etiqueta fluorescente, un cromóforo, un tinte, uno o más iones de metal, o una etiqueta a base de ligando. En algunas formas de realización de estos métodos y kits, el agente para diagnóstico por imágenes comprende un radioisótopo. En algunas formas de realización de estos métodos y kits, el radioisótopo es indio o tecnecio. En algunas formas de realización de estos métodos y kits, el agente de contraste comprende yodo, gadolinio u óxido de

hierro. En algunas formas de realización de estos métodos y kits, la enzima comprende peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina o β -galactosidasa. En algunas formas de realización de estos métodos y kits, la etiqueta fluorescente comprende proteína fluorescente amarilla (YFP), proteína fluorescente cian (CFP), proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente roja modificada (mRFP), proteína fluorescente roja tdimer2 (tdimer RFP2), HCRED o un derivado de europio. En algunas formas de realización de estos métodos y kits, la etiqueta luminiscente comprende un derivado de N-metilacridio. En algunas formas de realización de estos métodos, la etiqueta comprende una etiqueta Alexa Fluor®, tal como Alex Fluor® 680 o Alexa Fluor® 750. En algunas formas de realización de estos métodos y kits, la etiqueta a base de ligando comprende biotina, avidina, estreptavidina o uno o más haptenos.

[0361] En algunas formas de realización de estos métodos y kits, el sujeto es un mamífero. En algunas formas de realización de estos métodos y kits, el sujeto es un ser humano. En algunas formas de realización, el sujeto es un mamífero no humano, tal como un primate no humano, un animal de compañía (por ejemplo, gato, perro, caballo), un animal de granja, un animal de trabajo o un animal de zoológico. En algunas formas de realización, el sujeto es un roedor.

[0362] En algunas formas de realización de estos métodos, el método es un método *in vivo*. En algunas formas de realización de estos métodos, el método es un método *in situ*. En algunas formas de realización de estos métodos, el método es un método *ex vivo*. En algunas formas de realización de estos métodos, el método es un método *in vitro*.

[0363] En algunas formas de realización, el diagnóstico por imágenes *in situ* y/o el diagnóstico por imágenes *in vivo* son útiles en métodos para identificar qué pacientes tratar. Por ejemplo, en el diagnóstico por imágenes *in situ*, se usan los anticuerpos activables para cribar muestras de pacientes a fin de identificar a aquellos pacientes que tienen las proteasas y dianas apropiadas en la ubicación apropiada, por ejemplo, en un sitio tumoral.

[0364] En algunas formas de realización, se usa el diagnóstico por imágenes *in situ* para identificar o especificar de otro modo una población de pacientes adecuada para el tratamiento con un anticuerpo activable de la divulgación. Por ejemplo, los pacientes que dan positivo al respecto tanto de la diana (por ejemplo, la diana) como de una proteasa que escinde el sustrato en la porción escindible (CM) del anticuerpo activable que se evalúa (por ejemplo, anticuerpos activados acumulados en el sitio de la

enfermedad) se identifican como candidatos adecuados para el tratamiento con tal anticuerpo activable que comprende tal CM. Del mismo modo, los pacientes que dan negativo al respecto de cualquiera de la diana (por ejemplo, la diana) y la proteasa que escinde el sustrato en la CM en el anticuerpo activable que se evalúa con estos métodos, o al respecto de ambas, podrían identificarse como candidatos adecuados para otra forma de tratamiento. En algunas formas de realización, tales pacientes que dan negativo al respecto de un primer anticuerpo activable pueden evaluarse con otros anticuerpos activables que comprenden diferentes CM hasta identificar un anticuerpo activable adecuado para el tratamiento (por ejemplo, un anticuerpo activable que comprende una CM escindida por el paciente en el sitio de la enfermedad). En algunas formas de realización, al paciente se le administra luego una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo activable al respecto del cual dio positivo el paciente.

[0365] En algunas formas de realización, se usa el diagnóstico por imágenes *in vivo* para identificar o especificar de otro modo una población de pacientes adecuada para el tratamiento con un anticuerpo activable de la divulgación. Por ejemplo, los pacientes que dan positivo al respecto tanto de la diana (por ejemplo, la diana) como de una proteasa que escinde el sustrato en la porción escindible (CM) del anticuerpo activable que se evalúa (por ejemplo, anticuerpos activados acumulados en el sitio de la enfermedad) se identifican como candidatos adecuados para el tratamiento con tal anticuerpo activable que comprende tal CM. Del mismo modo, los pacientes que dan negativo podrían identificarse como candidatos adecuados para otra forma de tratamiento. En algunas formas de realización, tales pacientes que dan negativo al respecto de un primer anticuerpo activable pueden evaluarse con otros anticuerpos activables que comprenden diferentes CM hasta identificar un anticuerpo activable adecuado para el tratamiento (por ejemplo, un anticuerpo activable que comprende una CM escindida por el paciente en el sitio de la enfermedad). En algunas formas de realización, al paciente se le administra luego una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo activable al respecto del cual dio positivo el paciente.

[0366] En algunas formas de realización de los métodos y kits, el método o el kit se usa para identificar o especificar de otro modo una población de pacientes adecuada para el tratamiento con un anticuerpo activable de la divulgación. Por ejemplo, los pacientes que dan positivo al respecto tanto de la diana (por ejemplo, la diana) como de una proteasa que escinde el sustrato en la porción escindible (CM) del anticuerpo activable que se evalúa en estos métodos se identifican como candidatos adecuados

para el tratamiento con tal anticuerpo activable que comprende tal CM. Del mismo modo, los pacientes que dan negativo al respecto tanto de las dianas (por ejemplo, la diana) y la proteasa que escinde el sustrato en la CM en el anticuerpo activable que se evalúa con estos métodos podrían identificarse como candidatos adecuados para otra forma de tratamiento. En algunas formas de realización, tales pacientes pueden evaluarse con otros anticuerpos activables hasta identificar un anticuerpo activable adecuado para el tratamiento (por ejemplo, un anticuerpo activable que comprende una CM escindida por el paciente en el sitio de la enfermedad). En algunas formas de realización, los pacientes que dan negativo al respecto de cualquiera de la diana (por ejemplo, la diana) se identifican como candidatos adecuados para el tratamiento con tal anticuerpo activable que comprende tal CM. En algunas formas de realización, los pacientes que dan negativo al respecto de cualquiera de la diana (por ejemplo, la diana) se identifican como candidatos no adecuados para el tratamiento con tal anticuerpo activable que comprende tal CM. En algunas formas de realización, tales pacientes pueden evaluarse con otros anticuerpos activables hasta identificar un anticuerpo activable adecuado para el tratamiento (por ejemplo, un anticuerpo activable que comprende una CM escindida por el paciente en el sitio de la enfermedad). En algunas formas de realización, el anticuerpo activable es un anticuerpo activable con el que se conjuga un agente terapéutico. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable no se conjuga con un agente. En algunas formas de realización, el anticuerpo activable comprende una etiqueta detectable. En algunas formas de realización, la etiqueta detectable se ubica en el AB. En algunas formas de realización, la medición del nivel de anticuerpo activable en el sujeto o la muestra se realiza mediante el uso de un reactivo secundario que se fija específicamente al anticuerpo activado, en donde el reactivo comprende una etiqueta detectable. En algunas formas de realización, el reactivo secundario es un anticuerpo que comprende una etiqueta detectable.

[0367] En algunas formas de realización, se usa un método o kit para identificar o especificar de otro modo una población de pacientes adecuada para el tratamiento con un anticuerpo activable y/o anticuerpo activable conjugado anti-la diana (por ejemplo, anticuerpo activable con el que se conjuga un agente terapéutico) de la divulgación, seguido del tratamiento con la administración de ese anticuerpo activable y/o anticuerpo activable conjugado a un sujeto que lo necesite. Por ejemplo, los pacientes que dan positivo al respecto tanto de las dianas (por ejemplo, la diana) como de una proteasa que escinde el sustrato en la porción escindible (CM) del anticuerpo activable

y/o anticuerpo activable conjugado que se evalúa en estos métodos se identifican como candidatos adecuados para el tratamiento con tal anticuerpo y/o tal anticuerpo activable conjugado que comprenden tal CM, y luego se le administra al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo activable y/o anticuerpo activable conjugado que se evaluaron. Del mismo modo, los pacientes que dan negativo al respecto de cualquiera de la diana (por ejemplo, la diana) y la proteasa que escinde el sustrato en la CM en el anticuerpo activable que se evalúa con estos métodos, o al respecto de ambas, podrían identificarse como candidatos adecuados para otra forma de tratamiento. En algunas formas de realización, tales pacientes pueden evaluarse con otros anticuerpos y/o anticuerpos activables conjugados hasta identificar un anticuerpo y/o un anticuerpo activable conjugado adecuado para el tratamiento (por ejemplo, un anticuerpo activable y/o un anticuerpo activable conjugado que comprende una CM escindida por el paciente en el sitio de la enfermedad). En algunas formas de realización, al paciente se le administra luego una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo activable y/o anticuerpo activable conjugado al respecto de los cuales dio positivo el paciente.

[0368] En algunas formas de realización de estos métodos y kits, la MM es un péptido que tiene una longitud de alrededor de 4 a 40 aminoácidos. En algunas formas de realización de estos métodos y kits, el anticuerpo activable comprende un péptido ligador, en donde el péptido ligador se ubica entre la MM y la CM. En algunas formas de realización de estos métodos y kits, el anticuerpo activable comprende un péptido ligador, donde el péptido ligador se ubica entre el AB y la CM. En algunas formas de realización de estos métodos y kits, el anticuerpo activable comprende un primer péptido ligador (LP1) y un segundo péptido ligador (LP2), en donde el primer péptido ligador se ubica entre la MM y la CM y el segundo péptido ligador se ubica entre el AB y la CM. En algunas formas de realización de estos métodos y kits, cada uno de LP1 y LP2 es un péptido de alrededor de 1 a 20 aminoácidos de longitud, y en donde cada uno de LP1 y LP2 no necesita ser el mismo ligador. En algunas formas de realización de estos métodos y kits, uno o ambos de LP1 y LP2 comprenden un polímero de glicina-serina. En algunas formas de realización de estos métodos y kits, al menos uno de LP1 y LP2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en $(GS)_n$, $(GSGGS)_n$ (SEQ ID NO: 24) y $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO: 25), donde n es un número entero de al menos uno. En algunas formas de realización de estos métodos y kits, al menos uno de LP1 y LP2 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene la fórmula $(GGS)_n$, donde n es un número entero de al menos uno. En

algunas formas de realización de estos métodos y kits, al menos uno de LP1 y LP2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 26), Gly-Gly-Ser-Gly-Gly (SEQ ID NO: 27), Gly-Ser-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 28), Gly-Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 29), Gly-Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 30), y Gly-Ser-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO: 31).

[0369] En algunas formas de realización de estos métodos y kits, el AB comprende una secuencia de anticuerpo o de fragmento de anticuerpo seleccionada de las secuencias de anticuerpos de reactividad cruzada presentadas en la presente. En algunas formas de realización de estos métodos y kits, el AB comprende un fragmento Fab, un scFv o un anticuerpo monocatenario (scAb).

[0370] En algunas formas de realización de estos métodos y kits, el agente de escisión es una proteasa que se localiza conjuntamente en el sujeto o la muestra con la diana y la CM es un polipéptido que funciona como un sustrato para la proteasa, en donde la proteasa escinde la CM en el anticuerpo activable cuando el anticuerpo activable está expuesto a la proteasa. En algunas formas de realización de estos métodos y kits, la CM es un polipéptido de hasta 15 aminoácidos de longitud. En algunas formas de realización de estos métodos y kits, la CM está acoplada al terminal N del AB. En algunas formas de realización de estos métodos y kits, la CM está acoplada al terminal C del AB. En algunas formas de realización de estos métodos y kits, la CM está acoplada al terminal N de una cadena VL del AB.

[0371] Los terminales N y C de las cadenas de polipéptidos de anticuerpos de la presente invención pueden diferir de las secuencias descritas en la presente debido a modificaciones posteriores a la traducción comúnmente observadas. Por ejemplo, los residuos de lisina del terminal C a menudo faltan en las cadenas pesadas de anticuerpos. Dick *et al.* (2008) *Biotechnol. Bioeng.* 100:1132. Los residuos de glutamina del terminal N, y en menor medida los residuos de glutamato, se convierten con frecuencia en residuos de piroglutamato en las cadenas livianas y pesadas de anticuerpos terapéuticos. Dick *et al.* (2007) *Biotechnol. Bioeng.* 97:544; Liu *et al.* (2011) *JBC* 286:11211; Liu *et al.* (2011) *J. Biol. Chem.* 286:11211. Por consiguiente, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I) y/o la Fórmula (II) puede tener un anticuerpo (AB) donde el residuo del terminal C de la región constante de la cadena pesada carece de uno o más aminoácidos en el terminal, carece de la lisina del terminal C, se le eliminó la lisina del terminal C debido al procesamiento posterior a la traducción, o la lisina del terminal C es un aminoácido distinto de la lisina. Si el residuo del terminal C de la región constante de la cadena pesada es un aminoácido distinto

de la lisina, en una forma de realización, es un aminoácido que generalmente no es susceptible de formar un puente disulfuro o de otro modo no es susceptible de conjugación con un agente citotóxico.

[0372] En ciertas formas de realización, el anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I) y/o la Fórmula (II), puede tener un anticuerpo (AB) en donde el glutamato del terminal N en la cadena pesada y/o la cadena liviana opcionalmente es piroglutamato o está modificado a piroglutamato después de la traducción.

[0373] En ciertas formas de realización, la región constante de la cadena pesada del anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I) y/o la Fórmula (II) comprende una lisina u otro aminoácido en el terminal C, por ejemplo, comprende los siguientes últimos aminoácidos: PGK para la cadena pesada. En ciertas formas de realización, la región constante de la cadena pesada carece de uno o más aminoácidos en el terminal C y tiene, por ejemplo, la secuencia PG o P del terminal C.

[0374] En ciertas formas de realización, las regiones variables de la cadena pesada y/o la cadena liviana del anticuerpo activable conjugado de la Fórmula (I) y/o la Fórmula (II) comprende un aminoácido glutamato o piroglutamato en el terminal N, por ejemplo, comprende los siguientes últimos aminoácidos: pQGQ para la cadena liviana, y/o pQVQ para la cadena pesada, donde “pQ” representa piroglutamato.

[0375] Los anticuerpos, anticuerpos conjugados, anticuerpos activables y/o anticuerpos activables conjugados de la divulgación se usan en formulaciones de diagnóstico y profilácticas. En una forma de realización, un anticuerpo activable se administra a pacientes que corren el riesgo de desarrollar uno o más de inflamación, trastornos inflamatorios, cáncer u otros trastornos mencionados anteriormente.

[0376] La predisposición de un paciente u órgano a uno o más de los trastornos mencionados anteriormente puede determinarse mediante el uso de marcadores genotípicos, serológicos o bioquímicos.

[0377] En algunas formas de realización de la divulgación, un anticuerpo, un anticuerpo conjugado, un anticuerpo activable y/o un anticuerpo activable conjugado se administran a individuos humanos diagnosticados con una indicación clínica asociada con uno o más de los trastornos mencionados anteriormente. Tras el diagnóstico, un anticuerpo, un anticuerpo conjugado, un anticuerpo activable y/o un anticuerpo activable conjugado se administran para mitigar o revertir los efectos de la indicación clínica.

[0378] Los anticuerpos, anticuerpos conjugados, anticuerpos activables y/o anticuerpos activables conjugados de la divulgación también son útiles en la detección

de la diana en muestras de pacientes y, en consecuencia, son útiles para el diagnóstico. Por ejemplo, los anticuerpos, anticuerpos conjugados, anticuerpos activables y/o anticuerpos activables conjugados de la divulgación se usan en ensayos *in vitro*, por ejemplo, ELISA, para detectar niveles diana en una muestra de paciente.

[0379] En una forma de realización, un anticuerpo y/o anticuerpo activable de la divulgación se inmovilizan sobre un soporte sólido (por ejemplo, las cavidades de una placa de microtitulación). El anticuerpo y/o anticuerpo activable inmovilizado sirve como un anticuerpo de captura para cualquier diana que pueda estar presente en una muestra de prueba. Antes de poner en contacto el anticuerpo y/o el anticuerpo activable inmovilizado con una muestra del paciente, el soporte sólido se enjuaga y se trata con un agente de bloqueo tal como proteína de leche o albúmina para impedir la adsorción no específica del analito.

[0380] Posteriormente, las cavidades se tratan con una muestra de prueba que se sospecha que contiene el antígeno, o con una solución que contiene una cantidad estándar del antígeno. Tal muestra es, por ejemplo, una muestra de suero de un sujeto que se sospecha que tiene niveles de antígeno circulante considerados diagnósticos de una patología. Después de enjuagar el estándar o la muestra de prueba, el soporte sólido se trata con un segundo anticuerpo que está etiquetado de manera detectable. El segundo anticuerpo etiquetado funciona como anticuerpo de detección. Se mide el nivel de etiqueta detectable y se determina la concentración de antígeno diana en la muestra de prueba en comparación con una curva estándar desarrollada a partir de las muestras estándar.

[0381] Se observará que, en función de los resultados obtenidos mediante el uso de los anticuerpos y/o los anticuerpos activables de la divulgación en un ensayo de diagnóstico *in vitro*, es posible estadificar una enfermedad en un sujeto en función de los niveles de expresión del antígeno diana. Para una enfermedad dada, se toman muestras de sangre de sujetos diagnosticados en diversas etapas de la progresión de la enfermedad, y/o en diversos puntos del tratamiento terapéutico de la enfermedad. Mediante el uso de una población de muestras que proporciona resultados estadísticamente significativos para cada etapa de progresión o tratamiento, se designa un rango de concentraciones del antígeno que puede considerarse característico de cada etapa.

[0382] Los anticuerpos, anticuerpos conjugados, anticuerpos activables y/o anticuerpos activables conjugados de la divulgación también pueden usarse en métodos de diagnóstico y/o diagnóstico por imágenes. En algunas formas de

realización, tales métodos son métodos *in vitro*. En algunas formas de realización, tales métodos son métodos *in vivo*. En algunas formas de realización, tales métodos son métodos *in situ*. En algunas formas de realización, tales métodos son métodos *ex vivo*. Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos activables que tienen una CM escindible enzimáticamente para detectar la presencia o ausencia de una enzima que es capaz de escindir la CM. Tales anticuerpos activables pueden usarse para el diagnóstico, que puede incluir la detección *in vivo* (por ejemplo, cualitativa o cuantitativa) de la actividad enzimática (o, en algunas formas de realización, un entorno de potencial de reducción incrementado tal como el que puede proporcionar la reducción de un puente disulfuro) a través de la acumulación medida de anticuerpos activados (es decir, anticuerpos resultantes de la escisión de un anticuerpo activable) en una célula o tejido dado de un organismo huésped dado. Tal acumulación de anticuerpos activados indica no solo que el tejido expresa actividad enzimática (o un potencial de reducción incrementado según la naturaleza de la CM) sino también que el tejido expresa la diana a la que se fija el anticuerpo activado.

[0383] Por ejemplo, la CM puede seleccionarse como sustrato de proteasa para una proteasa encontrada en el sitio de un tumor, en el sitio de una infección viral o bacteriana en un sitio biológicamente confinado (por ejemplo, en un absceso, en un órgano y similares) y similares. El AB puede ser uno que se fije a un antígeno diana. Mediante métodos familiares para una persona del oficio de nivel medio, una etiqueta detectable (por ejemplo, una etiqueta fluorescente o etiqueta radiactiva o radiotrazador) puede conjugarse con un AB u otra región de un anticuerpo activable. Se analizan etiquetas detectables adecuadas en el contexto de los métodos de cribado anteriores y se proporcionan ejemplos específicos adicionales a continuación. Mediante el uso de un AB específico para una proteína o un péptido del estado patológico, junto con una proteasa cuya actividad es elevada en el tejido de la enfermedad de interés, los anticuerpos activables exhibirán una mayor tasa de fijación al tejido de la enfermedad en relación con los tejidos donde la enzima específica de CM no está presente en un nivel detectable o está presente en un nivel más bajo que en el tejido de la enfermedad o está inactiva (por ejemplo, en forma de zimógeno o en complejo con un inhibidor). Dado que el sistema de filtración renal elimina rápidamente de la sangre las proteínas y los péptidos pequeños, y porque la enzima específica de CM no está presente en un nivel detectable (o está presente en niveles más bajos en los tejidos que no son de la enfermedad o está presente en conformación inactiva), la acumulación de anticuerpos activados en el tejido de la enfermedad aumenta en

relación con los tejidos que no son de la enfermedad.

[0384] En otro ejemplo, se pueden usar anticuerpos activables para detectar la presencia o ausencia de un agente de escisión en una muestra. Por ejemplo, cuando los anticuerpos activables contienen una CM susceptible de escisión por una enzima, los anticuerpos activables pueden usarse para detectar (ya sea cualitativa o cuantitativamente) la presencia de una enzima en la muestra. En otro ejemplo, cuando los anticuerpos activables contienen una CM susceptible de escisión por un agente reductor, los anticuerpos activables pueden usarse para detectar (ya sea cualitativa o cuantitativamente) la presencia de condiciones de reducción en una muestra. Para facilitar el análisis en estos métodos, los anticuerpos activables pueden etiquetarse de manera detectable y pueden fijarse a un soporte (por ejemplo, un soporte sólido, como un portaobjetos o una microesfera). La etiqueta detectable puede ubicarse en una porción del anticuerpo activable que no se libera después de la escisión, por ejemplo, la etiqueta detectable puede ser una etiqueta fluorescente inactivada u otra etiqueta que no es detectable hasta producirse la escisión. El ensayo puede realizarse, por ejemplo, al poner en contacto los anticuerpos activables inmovilizados y etiquetados de manera detectable con una muestra que se sospecha que contiene una enzima y/o un agente reductor durante un período de tiempo suficiente para que se produzca la escisión, y luego lavar para eliminar el exceso de muestra y contaminantes. La presencia o ausencia del agente de escisión (por ejemplo, enzima o agente reductor) en la muestra luego se evalúa mediante un cambio en la señal detectable de los anticuerpos activables antes de ponerlos en contacto con la muestra, por ejemplo, la presencia y/o un aumento en la señal detectable debido a la escisión del anticuerpo activable por el agente de escisión en la muestra.

[0385] Tales métodos de detección pueden adaptarse para proporcionar también la detección de la presencia o ausencia de una diana que sea capaz de fijar el AB de los anticuerpos activables cuando se escinden. Por lo tanto, los ensayos pueden adaptarse para evaluar la presencia o ausencia de un agente de escisión y la presencia o ausencia de una diana de interés. La presencia o ausencia del agente de escisión puede detectarse mediante la presencia y/o un aumento en la etiqueta detectable de los anticuerpos activables como se describió anteriormente, y la presencia o ausencia de la diana puede detectarse mediante la detección de un complejo diana-AB, por ejemplo, mediante el uso de un anticuerpo anti-diana etiquetado de manera detectable.

[0386] Los anticuerpos activables también son útiles en el diagnóstico por imágenes *in*

situ para la validación de la activación de anticuerpos activables, por ejemplo, por escisión de proteasa, y la fijación a una diana particular. El diagnóstico por imágenes *in situ* es una técnica que permite la localización de la actividad proteolítica y la diana en muestras biológicas tales como cultivos celulares o secciones de tejido. Con esta técnica, es posible confirmar tanto la fijación a una diana dada como la actividad proteolítica en función de la presencia de una etiqueta detectable (por ejemplo, una etiqueta fluorescente).

[0387] Estas técnicas son útiles con cualquier célula o tejido congelado derivado de un sitio de la enfermedad (por ejemplo, tejido tumoral) o tejidos sanos. Estas técnicas también son útiles con muestras de células o tejidos frescos.

[0388] En estas técnicas, un anticuerpo activable está etiquetado con una etiqueta detectable. La etiqueta detectable puede ser un tinte fluorescente, (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC), isotiocianato de rodamina (TRITC)), un colorante infrarrojo cercano (NIR) (por ejemplo, nanocristales Qdot®), un metal coloidal, un hapteno, un marcador radiactivo, biotina y un reactivo de amplificación como estreptavidina o una enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina).

[0389] La detección de la etiqueta en una muestra que se ha incubado con el anticuerpo activable etiquetado indica que la muestra contiene la diana y contiene una proteasa que es específica para la CM del anticuerpo activable. En algunas formas de realización, la presencia de la proteasa puede confirmarse mediante el uso de inhibidores de la proteasa de amplio espectro tales como los descritos en la presente, y/o mediante el uso de un agente que es específico para la proteasa, por ejemplo, un anticuerpo como A11, que es específico para la proteasa matriptasa e inhibe la actividad proteolítica de la matriptasa; ver, por ejemplo, la publicación internacional N.º WO 2010/129609, publicada el 11 de noviembre de 2010. El mismo enfoque de usar inhibidores de la proteasa de amplio espectro como los descritos en la presente, y/o de usar un agente inhibidor más selectivo, puede usarse para identificar una proteasa o clase de proteasas específica para la CM del anticuerpo activable. En algunas formas de realización, la presencia de la diana puede confirmarse mediante el uso de un agente que es específico para la diana, por ejemplo, otro anticuerpo, o la etiqueta detectable puede competir con la diana no etiquetada. En algunas formas de realización, podría usarse un anticuerpo activable no etiquetado, con detección mediante un anticuerpo secundario etiquetado o un sistema de detección más complejo.

[0390] Técnicas similares también son útiles para el diagnóstico por imágenes *in vivo* donde la detección de la señal fluorescente en un sujeto, por ejemplo, un mamífero, incluido un ser humano, indica que el sitio de la enfermedad contiene la diana y contiene una proteasa que es específica para la CM del anticuerpo activable.

[0391] Estas técnicas también son útiles en kits y/o como reactivos para la detección, identificación o caracterización de la actividad de la proteasa en una variedad de células, tejidos y organismos en función de la CM específica de la proteasa en el anticuerpo activable.

[0392] En algunas formas de realización, el diagnóstico por imágenes *in situ* y/o el diagnóstico por imágenes *in vivo* son útiles en métodos para identificar qué pacientes tratar. Por ejemplo, en el diagnóstico por imágenes *in situ*, se usan los anticuerpos activables para cribar muestras de pacientes a fin de identificar a aquellos pacientes que tienen las proteasas y dianas apropiadas en la ubicación apropiada, por ejemplo, en un sitio tumoral.

[0393] En algunas formas de realización, se usa el diagnóstico por imágenes *in situ* para identificar o especificar de otro modo una población de pacientes adecuada para el tratamiento con un anticuerpo activable de la divulgación. Por ejemplo, los pacientes que dan positivo al respecto tanto de la diana como de una proteasa que escinde el sustrato en la porción escindible (CM) del anticuerpo activable que se evalúa (por ejemplo, anticuerpos activados acumulados en el sitio de la enfermedad) se identifican como candidatos adecuados para el tratamiento con tal anticuerpo activable que comprende tal CM. Del mismo modo, los pacientes que dan negativo al respecto de cualquiera de la diana y la proteasa que escinde el sustrato en la CM en el anticuerpo activable que se evalúa con estos métodos, o al respecto de ambas, se identifican como candidatos adecuados para otra forma de tratamiento (es decir, no son adecuados para el tratamiento con el anticuerpo activable que se evalúa). En algunas formas de realización, tales pacientes que dan negativo al respecto de un primer anticuerpo activable pueden evaluarse con otros anticuerpos activables que comprenden diferentes CM hasta identificar un anticuerpo activable adecuado para el tratamiento (por ejemplo, un anticuerpo activable que comprende una CM escindida por el paciente en el sitio de la enfermedad).

[0394] En algunas formas de realización, se usa el diagnóstico por imágenes *in vivo* para identificar o especificar de otro modo una población de pacientes adecuada para el tratamiento con un anticuerpo activable de la divulgación. Por ejemplo, los pacientes que dan positivo al respecto tanto de la diana como de una proteasa que escinde el

sustrato en la porción escindible (CM) del anticuerpo activable que se evalúa (por ejemplo, anticuerpos activados acumulados en el sitio de la enfermedad) se identifican como candidatos adecuados para el tratamiento con tal anticuerpo activable que comprende tal CM. Del mismo modo, los pacientes que dan negativo se identifican como candidatos adecuados para otra forma de tratamiento (es decir, no son adecuados para el tratamiento con el anticuerpo activable que se evalúa). En algunas formas de realización, tales pacientes que dan negativo al respecto de un primer anticuerpo activable pueden evaluarse con otros anticuerpos activables que comprenden diferentes CM hasta identificar un anticuerpo activable adecuado para el tratamiento (por ejemplo, un anticuerpo activable que comprende una CM escindida por el paciente en el sitio de la enfermedad).

Composiciones farmacéuticas

[0395] Los anticuerpos, anticuerpos conjugados, anticuerpos activables y/o anticuerpos activables conjugados de la divulgación (también denominados en la presente “compuestos activos”), y derivados, fragmentos, análogos y homólogos de estos, pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración.

[0396] En especial, resulta conveniente formular composiciones orales o parenterales en forma de dosis unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis. Como se usa en la presente, forma de dosis unitaria se refiere a unidades físicamente separadas útiles como dosis unitarias para el sujeto a tratar; en donde cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado en combinación con el portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosis unitaria de la divulgación está dictada por, y depende directamente de, las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se desea lograr, y las limitaciones inherentes en la técnica de preparar compuestos con tal compuesto activo para el tratamiento de individuos.

[0397] Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un recipiente, envase o dispensador junto con instrucciones para la administración.

[0398] La invención se describirá adicionalmente en las siguientes formas de realización y ejemplos enumerados, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

FORMAS DE REALIZACIÓN ENUMERADAS

[0399] La invención puede definirse por referencia a las siguientes formas de

realización ilustrativas enumeradas.

Conjunto I

[0400] I-1. Un anticuerpo activable conjugado que comprende:

(a) un anticuerpo activable (AA) que comprende, en un estado no escindido, la disposición estructural desde el terminal N al terminal C de la siguiente manera: MM-CM-AB, en donde:

(i) AB es un anticuerpo que se fija específicamente a CD71 de mamífero y que comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 5 y la secuencia de la región variable de la cadena liviana de SEQ ID NO: 7;

(ii) MM es una porción de enmascaramiento que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, en donde la MM acoplada al AB inhibe la fijación del AB a CD71 cuando el anticuerpo activable conjugado está en un estado no escindido;

(iii) CM es una porción escindible que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 156 acoplada al AB en donde la CM es un polipéptido que funciona como un sustrato para una proteasa; y

(b) monometil auristatina E (MMAE), en donde el anticuerpo activable se conjuga con dos equivalentes de MMAE.

[0401] I-2. Una composición que comprende: un anticuerpo activable conjugado que tiene la fórmula AA-(AG)_p en donde

(a) AA es un anticuerpo activable que comprende, en un estado no escindido, la disposición estructural desde el terminal N al terminal C de la siguiente manera: MM-CM-AB, en donde:

(i) AB es un anticuerpo que se fija específicamente a CD71 de mamífero y que comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 5 y la secuencia de la región variable de la cadena liviana de SEQ ID NO: 7,

(ii) MM es una porción de enmascaramiento que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 18, en donde la MM acoplada al AB inhibe la fijación del AB a CD71 cuando el anticuerpo activable conjugado está en un estado no escindido, y

(iii) CM es una porción escindible que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 156 acoplada al AB en donde la CM es un polipéptido que funciona como un sustrato para una proteasa; y

(b) AG es un agente conjugado con el AA, en donde el agente es MMAE y en donde p es 2.

[0402] I-3. Un método para producir un anticuerpo activable conjugado que comprende: conjugar al menos una MMAE con un anticuerpo activable (AA), lo que produce una composición que comprende AA-(MMAE)_p, en donde p es de 1 a 8; y enriquecer la composición para la especie de anticuerpo activable conjugado en la que p es 2, en donde AA comprende en un estado no escindido la disposición estructural desde el terminal N al terminal C de la siguiente manera: MM-CM-AB en donde:

(i) AB es un anticuerpo que se fija específicamente a CD71 de mamífero y que comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 5 y la secuencia de la región variable de la cadena liviana de SEQ ID NO: 7,

(ii) MM es una porción de enmascaramiento que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, en donde la MM acoplada al AB inhibe la fijación del AB a CD71 cuando el anticuerpo activable conjugado está en un estado no escindido, y

(iii) CM es una porción escindible que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 156 acoplada al AB en donde la CM es un polipéptido que funciona como un sustrato para una proteasa.

[0403] I-4. El anticuerpo activable conjugado de acuerdo con la forma de realización I-1 o la composición de acuerdo con la forma de realización I-2 o el método de acuerdo con la forma de realización I-3, en donde el AB comprende la secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO: 20.

[0404] I-5. El anticuerpo activable conjugado de acuerdo con la forma de realización I-1 o la composición de acuerdo con la forma de realización I-2 o el método de acuerdo con la forma de realización I-3, en donde el AB comprende la secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO: 167.

[0405] I-6. El anticuerpo activable conjugado de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-1, I-4 e I-5 o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-2, I-4 e I-5 o el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-3 a I-5, en donde el AB comprende la secuencia de la cadena liviana de SEQ ID NO: 19.

[0406] I-7. El anticuerpo activable conjugado de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-1 e I-4 a I-6 o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-2 e I-4 a I-6 o el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-3 a 6, en donde el AA comprende un péptido de enlace LP1 entre el AB y

la MM.

[0407] I-8. El anticuerpo activable conjugado o la composición o el método de acuerdo con la forma de realización I-7, en donde el LP1 comprende la secuencia de aminoácidos de GGGSSGGS (SEQ ID NO: 207).

[0408] I-9. El anticuerpo activable conjugado de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-1 y 4 a 8 o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-2 e I-4 a I-8 o el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-3 a I-8, en donde el AA comprende un péptido de enlace LP2 entre el AB y la CM.

[0409] I-10. El anticuerpo activable conjugado o la composición o el método de acuerdo con la forma de realización I-9, en donde el LP2 comprende la secuencia de aminoácidos de GGGS (SEQ ID NO: 38).

[0410] I-11. El anticuerpo activable conjugado de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-1 e I-4 a I-10 o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-2 e I-4 a I-10 o el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-3 a I-10, en donde el AA comprende un primer péptido de enlace (LP1) y un segundo péptido de enlace (LP2), y en donde el AA en el estado no escindido tiene la disposición estructural desde el terminal N al terminal C de la siguiente manera: MM-LP1-CM-LP2-AB.

[0411] I-12. El anticuerpo activable conjugado de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-1 e I-4 a I-11 o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-2 e I-4 a I-11 o el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-3 a I-11, en donde el anticuerpo activable comprende una cadena liviana que comprende una secuencia espaciadora seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 138 y 143-145, y GQG.

[0412] I-13. El anticuerpo activable conjugado o la composición o el método de acuerdo con la forma de realización I-12, en donde la secuencia espaciadora es del terminal N a la MM.

[0413] I-14. El anticuerpo activable conjugado de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-1 e I-4 a I-13 o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-2 e I-4 a I-13 o el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-3 a I-13, en donde el anticuerpo activable comprende la secuencia de la región variable de la cadena liviana de SEQ ID NO: 201.

[0414] I-15. El anticuerpo activable conjugado de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-1 e I-4 a I-13 o la composición de acuerdo con cualquiera de

las formas de realización I-2 e I-4 a I-13 o el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-3 a I-13, en donde el anticuerpo activable comprende la secuencia de la región variable de la cadena liviana de SEQ ID NO: 202.

[0415] I-16. El anticuerpo activable conjugado de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-1 e I-4 a I-13 o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-2 e I-4 a I-13 o el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-3 a I-13, en donde el anticuerpo activable comprende la secuencia de la cadena liviana de SEQ ID NO: 169.

[0416] I-17. El anticuerpo activable conjugado de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-1 e I-4 a I-13 o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-2 e I-4 a I-13 o el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-3 a I-13, en donde el anticuerpo activable comprende la secuencia de la cadena liviana de SEQ ID NO: 170.

[0417] I-18. El anticuerpo activable conjugado de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-1 e I-4 a I-17 o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-2 e I-4 a I-17 o el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-3 a I-17, en donde el AB se fija específicamente a CD71 humano y CD71 de *Macaca fascicularis*.

[0418] I-19. El anticuerpo activable conjugado de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-1 e I-4 a I-18 o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-2 y 4 a 18 o el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-3 a I-18, en donde la MM tiene una constante de disociación para fijarse al AB que es mayor que la constante de disociación del AB a CD71.

[0419] I-20. El anticuerpo activable conjugado de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-1 e I-4 a I-19 o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-2 e I-4 a I-19 o el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-3 a I-19, en donde la MM no interfiere ni compite con el AB por la fijación a CD71 cuando el anticuerpo activable está en un estado escindido.

[0420] I-21. El anticuerpo activable conjugado de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-1 e I-4 a I-20 o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-2 e I-4 a I-20 o el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-3 a I-20, en donde la MM es un polipéptido de no más de 40 aminoácidos de longitud.

[0421] I-22. El anticuerpo activable conjugado de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-1 e I-4 a I-21 o la composición de acuerdo con cualquiera de

las formas de realización I-2 e I-4 a I-21 o el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-3 a I-21, en donde la CM es un sustrato para una proteasa que se encuentra activa en tejido enfermo.

[0422] I-23. El anticuerpo activable conjugado de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-1 e I-4 a I-22 o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-2 e I-4 a I-22 o el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-3 a I-22, en donde el agente se conjuga con el AB mediante un ligador.

[0423] I-24. El anticuerpo activable conjugado de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-1 e I-4 a I-23 o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-2 e I-4 a I-23 o el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-3 a I-23, en donde el ligador con el que se conjuga el agente al AB comprende una porción valina-citrulina.

[0424] I-25. El anticuerpo activable conjugado de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-1 e I-4 a I-24 o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-2 e I-4 a I-24 o el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-3 a I-24, en donde el ligador con el que se conjuga el agente al AB comprende una porción maleimida caproil-valina-citrulina.

[0425] I-26. El anticuerpo activable conjugado de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-1 e I-4 a I-25 o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-2 e I-4 a I-25 o el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-3 a I-25, en donde el ligador con el que se conjuga el agente al AB comprende una porción maleimida caproil-valina-citrulina-para-aminobenciloxycarbonilo.

[0426] I-27. La composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-2 e I-4 a I-26 o el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-3 a I-26, en donde al menos 50 % del anticuerpo activable conjugado de la composición es de la especie cuando p es 2.

[0427] I-28. La composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-2 e I-4 a I-26 o el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-3 a I-26, en donde al menos 75 % del anticuerpo activable conjugado de la composición es de la especie cuando p es 2.

[0428] I-29. La composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-2 e I-4 a I-26 o el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-3 a I-26, en donde al menos 90 % del anticuerpo activable conjugado de la composición

es de la especie cuando p es 2.

[0429] I-30. La composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-2 e I-4 a I-26 o el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-3 a I-26, en donde al menos 95 % del anticuerpo activable conjugado de la composición es de la especie cuando p es 2.

[0430] I-31. La composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-2 e I-4 a I-26 o el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-3 a I-26, en donde al menos 98 % del anticuerpo activable conjugado de la composición es de la especie cuando p es 2.

[0431] I-32. La composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-2 e I-4 a I-26 o el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-3 a I-26, en donde los equivalentes de cada una de las especies de anticuerpo activable conjugado de la composición en la que p es 1 o 3 a 8 son menores que los equivalentes de las especies de anticuerpo activable conjugado de la composición en la que p es 2.

[0432] I-33. La composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-2 e I-4 a I-26 o el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-3 a I-26, en donde las especies de anticuerpo activable conjugado de la composición en la que p es 1 o 3 a 8 son menores que los equivalentes de las especies de anticuerpo activable conjugado de la composición en la que p es 2.

[0433] I-34. La composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-2 e I-4 a I-26 o el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-3 a I-26, en donde menos de 50 % de las especies de anticuerpo activable conjugado de la composición es de la especie cuando p es 1 o 3 a 8.

[0434] I-35. La composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-2 e I-4 a I-26 o el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-3 a I-26, en donde menos de 25 % de las especies de anticuerpo activable conjugado de la composición es de la especie cuando p es 1 o 3 a 8.

[0435] I-36. La composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-2 e I-4 a I-26 o el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-3 a I-26, en donde menos de 10 % de las especies de anticuerpo activable conjugado de la composición es de la especie cuando p es 1 o 3 a 8.

[0436] I-37. La composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-2 e I-4 a I-26 o el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-3 a I-26, en donde menos de 5 % de las especies de anticuerpo activable conjugado de

la composición es de la especie cuando p es 1 o 3 a 8.

[0437] I-38. La composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-2 e I-4 a I-26 o el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-3 a I-26, en donde menos de 2 % de las especies de anticuerpo activable conjugado de la composición es de la especie cuando p es 1 o 3 a 8.

[0438] I-39. Una composición farmacéutica que comprende:

[0439] el anticuerpo activable conjugado de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-1 e I-4 a I-26 o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-2 e I-4 a I-38; y un portador.

[0440] I-40. Un método para tratar, aliviar un síntoma de o retrasar la progresión de un tipo de cáncer en un sujeto, en donde el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo activable conjugado de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-1 e I-4 a I-26 o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización I-2 e I-4 a I-38 o la composición farmacéutica de acuerdo con la forma de realización I-39 a un sujeto que lo necesite.

[0441] I-41. El método de acuerdo con la forma de realización I-40, en donde el cáncer es un cáncer gástrico.

[0442] I-42. El método de acuerdo con la forma de realización I-40, en donde el cáncer es un cáncer de ovario.

[0443] I-43. El método de acuerdo con la forma de realización I-40, en donde el cáncer es un cáncer de esófago.

[0444] I-44. El método de acuerdo con la forma de realización I-40, en donde el cáncer es un cáncer de pulmón de células no pequeñas.

[0445] I-45. El método de acuerdo con la forma de realización I-40, en donde el cáncer es un cáncer de mama.

[0446] I-46. El método de acuerdo con la forma de realización I-40, en donde el cáncer es un cáncer colorrectal.

[0447] I-47. El método de acuerdo con la forma de realización I-40, en donde el cáncer es un melanoma.

[0448] I-48. El método de acuerdo con la forma de realización I-40, en donde el cáncer es un cáncer de próstata.

[0449] I-49. El método de acuerdo con la forma de realización I-40, en donde el cáncer es un mesotelioma.

Conjunto II

[0450] II-1. Un anticuerpo activable conjugado que comprende la estructura de la

[illegible]

(a) en donde

i. una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de CDRH1 que comprende SEQ ID NO: 9, una secuencia de CDRH2 que comprende SEQ ID NO: 10 y una secuencia de CDRH3 que comprende SEQ ID NO: 11; y

(ii) MM es una porción de enmascaramiento que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, en donde la MM inhibe la fijación del AB a CD71 humano cuando el anticuerpo activable conjugado está en un estado no escindido;

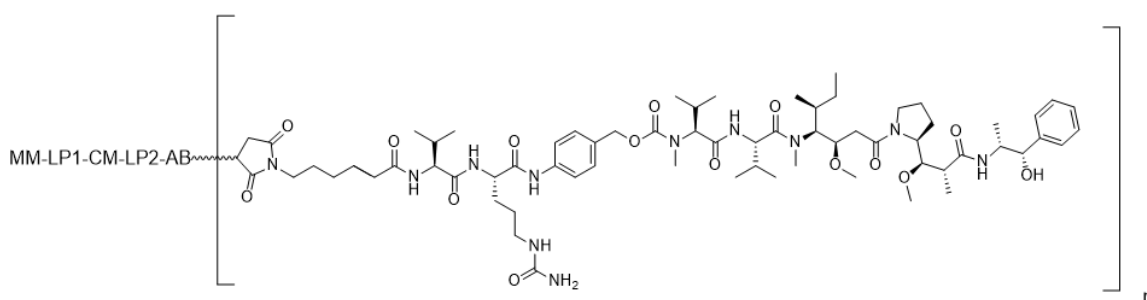
(iv) CM es una porción escindible que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 156, en donde la CM es un polipéptido que funciona como un sustrato para una proteasa; y

(b) en donde “n” es 2.

146

[0452] II-3. El anticuerpo activable conjugado de acuerdo con la forma de realización II-1 o II-2, en donde el AB es un anticuerpo que tiene una región constante de la cadena pesada, y en donde el residuo del terminal C de la región constante de la cadena pesada no es una lisina.

[0453] II-4. Un anticuerpo activable conjugado que comprende la estructura de la Fórmula (I) o una sal de esta:



Formula (I)

(a) en donde

(i) AB es un anticuerpo que se fija específicamente a CD71 humano y que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 5 y una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 7;

(ii) MM es una porción de enmascaramiento que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, en donde la MM inhibe la fijación del AB a CD71 humano cuando el anticuerpo activable conjugado está en un estado no escindido;

(iii) LP1 es una primera porción de enlace que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 207;

(iv) CM es una porción escindible que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 156, en donde la CM es un polipéptido que funciona como un sustrato para una proteasa; y

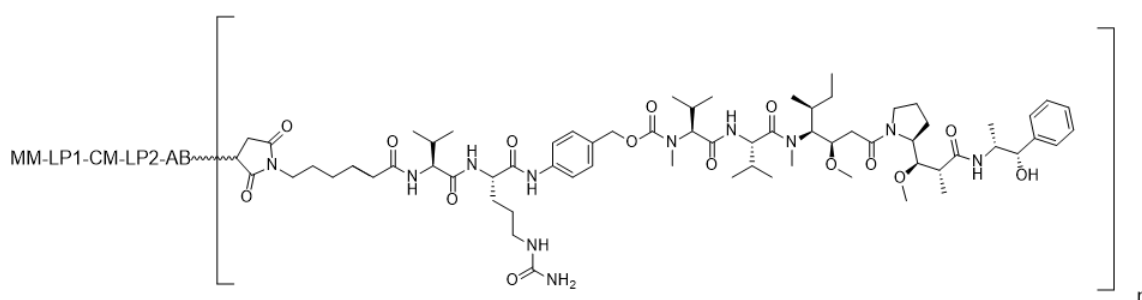
(v) LP2 es una segunda porción de enlace que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38; y

(b) en donde "n" es 2.

[0454] II-5. El anticuerpo activable conjugado de acuerdo con la forma de realización II-4, en donde el AB comprende un isotipo IgG1.

[0455] II-6. El anticuerpo activable conjugado de acuerdo con la forma de realización II-4 o II-5, en donde el AB es un anticuerpo que tiene una región constante de la cadena pesada, y en donde el residuo del terminal C de la región constante de la cadena pesada no es una lisina.

[0456] II-7. Un anticuerpo activable conjugado que comprende la estructura de la Fórmula (I) o una sal de esta:



Formula (I)

(a) en donde

(i) AB es un anticuerpo que se fija específicamente a CD71 humano y que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 167 y una cadena liviana que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 19;

(ii) MM es una porción de enmascaramiento que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, en donde la MM inhibe la fijación del AB a CD71 humano cuando el anticuerpo activable conjugado está en un estado no escindido;

(iii) LP1 es una primera porción de enlace que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 207;

(iv) CM es una porción escindible que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 156, en donde la CM es un polipéptido que funciona como un sustrato para una proteasa; y

(v) LP2 es una segunda porción de enlace que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38; y

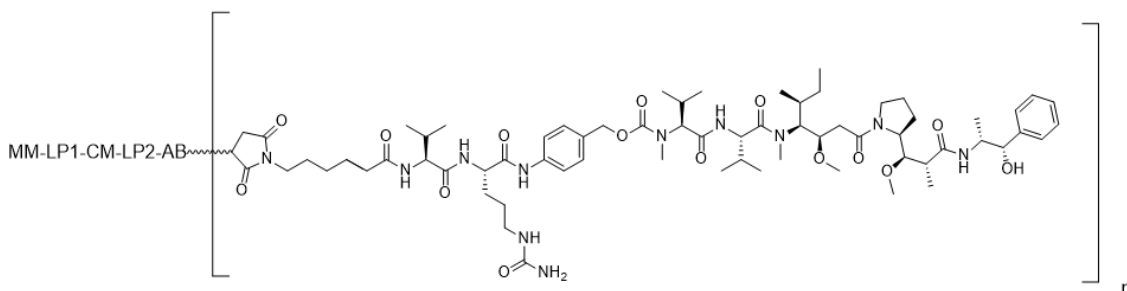
(b) en donde "n" es 2.

[0457] II-8. El anticuerpo activable conjugado de acuerdo con la forma de realización II-7, en donde el AB comprende un isotipo IgG1.

[0458] II-9. El anticuerpo activable conjugado de acuerdo con la forma de realización II-7 o II-8, en donde el AB es un anticuerpo que tiene una región constante de la cadena pesada, y en donde el residuo del terminal C de la región constante de la

cadena pesada no es una lisina.

[0459] II-10. Un anticuerpo activable conjugado que comprende la estructura de la Fórmula (I) o una sal de esta:



Formula (I)

en donde MM-LP1-CM-LP2-AB es un anticuerpo activable, en donde el AB es un anticuerpo que se fija específicamente a CD71 humano,

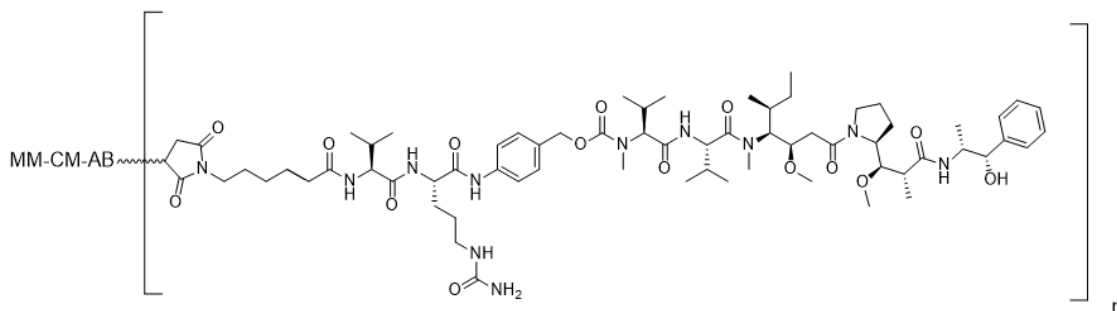
en donde el anticuerpo activable comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 167 y una cadena liviana que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 170, y

en donde “n” es 2.

[0460] II-11. El anticuerpo activable conjugado de acuerdo con la forma de realización II-10, en donde el AB comprende un isotipo IgG1.

[0461] II-12. El anticuerpo activable conjugado de acuerdo con la forma de realización II-10 o II-11, en donde el AB es un anticuerpo que tiene una región constante de la cadena pesada, y en donde el residuo del terminal C de la región constante de la cadena pesada no es una lisina.

[0462] II-13. Un anticuerpo activable conjugado que comprende la estructura de la Fórmula (II) o una sal de esta:



Formula (II)

(a) en donde

(i) AB es un anticuerpo que se fija específicamente a CD71 humano y que comprende

i. una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de CDRH1 que comprende SEQ ID NO: 9, una secuencia de CDRH2 que comprende SEQ ID NO: 10 y una secuencia de CDRH3 que comprende SEQ ID NO: 11; y

ii. una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de CDRL1 que comprende SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13, una secuencia de CDRL2 que comprende SEQ ID NO: 14 y una secuencia de CDRL3 que comprende SEQ ID NO: 15;

(ii) MM es una porción de enmascaramiento que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, en donde la MM inhibe la fijación del AB a CD71 humano cuando el anticuerpo activable conjugado está en un estado no escindido; y

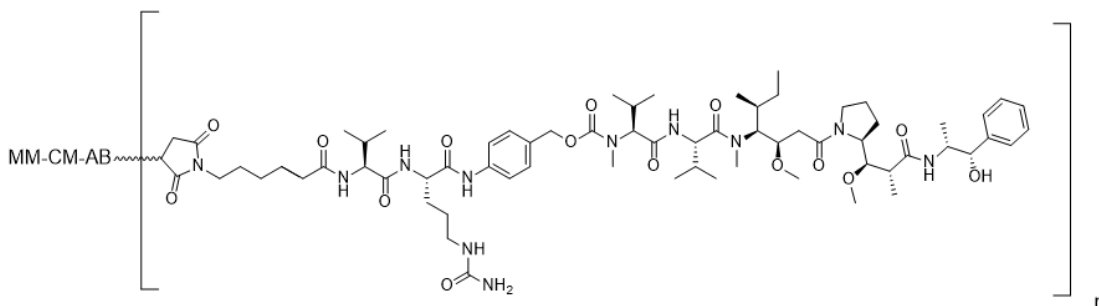
(iii) CM es una porción escindible que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 156, en donde la CM es un polipéptido que funciona como un sustrato para una proteasa; y

(b) en donde “n” es 2.

[0463] II-14. El anticuerpo activable conjugado de acuerdo con la forma de realización II-13, en donde el AB comprende un isotipo IgG1.

[0464] II-15. El anticuerpo activable conjugado de acuerdo con la forma de realización II-13 o II-14, en donde el AB es un anticuerpo que tiene una región constante de la cadena pesada, y en donde el residuo del terminal C de la región constante de la cadena pesada no es una lisina.

[0465] II-16. Un anticuerpo activable conjugado que comprende la estructura de la Fórmula (II) o una sal de esta:



Formula (II)

(a) en donde

(i) AB es un anticuerpo que se fija específicamente a CD71 humano y que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 5 y una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 7;

(ii) MM es una porción de enmascaramiento que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, en donde la MM inhibe la fijación del AB a CD71 humano cuando el anticuerpo activable conjugado está en un estado no escindido; y

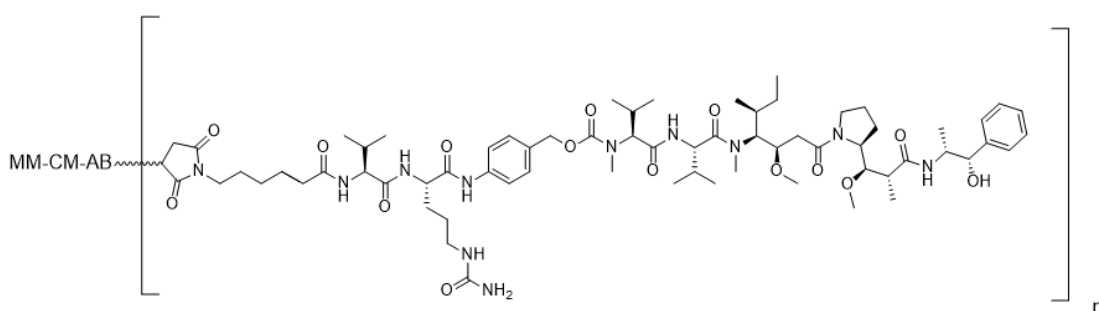
(iii) CM es una porción escindible que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 156, en donde la CM es un polipéptido que funciona como un sustrato para una proteasa; y

(b) en donde “n” es 2.

[0466] II-17. El anticuerpo activable conjugado de acuerdo con la forma de realización II-16, en donde el AB comprende un isotipo IgG1.

[0467] II-18. El anticuerpo activable conjugado de acuerdo con la forma de realización II-16 o II-17, en donde el AB es un anticuerpo que tiene una región constante de la cadena pesada, y en donde el residuo del terminal C de la región constante de la cadena pesada no es una lisina.

[0468] II-19. Un anticuerpo activable conjugado que comprende la estructura de la Fórmula (II) o una sal de esta:



Formula (II)

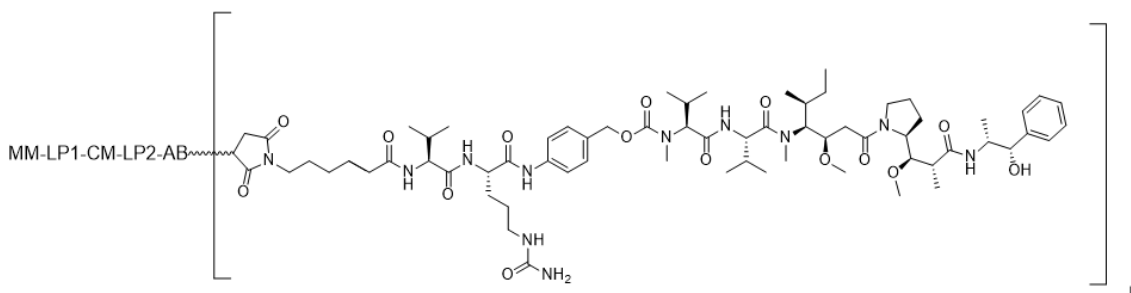
(a) en donde

(i) AB es un anticuerpo que se fija específicamente a CD71 humano y que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 167 y una cadena liviana que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 19;

(ii) MM es una porción de enmascaramiento que comprende la

constante de la cadena pesada no es una lisina.

[0474] II-25. Un método para producir un anticuerpo activable conjugado que comprende la estructura de la Fórmula (I) o una sal de esta:



Formula (I)

(a) en donde

(i) AB es un anticuerpo que se fija específicamente a CD71 humano y que comprende

i. una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de CDRH1 que comprende SEQ ID NO: 9, una secuencia de CDRH2 que comprende SEQ ID NO: 10 y una secuencia de CDRH3 que comprende SEQ ID NO: 11; y

ii. una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de CDRL1 que comprende SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13, una secuencia de CDRL2 que comprende SEQ ID NO: 14 y una secuencia de CDRL3 que comprende SEQ ID NO: 15;

(ii) MM es una porción de enmascaramiento que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, en donde la MM inhibe la fijación del AB a CD71 humano cuando el anticuerpo activable conjugado está en un estado no escindido;

(iii) LP1 es una primera porción de enlace que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 207;

(iv) CM es una porción escindible que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 156, en donde la CM es un polipéptido que funciona como un sustrato para una proteasa; y

(v) LP2 es una segunda porción de enlace que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38;

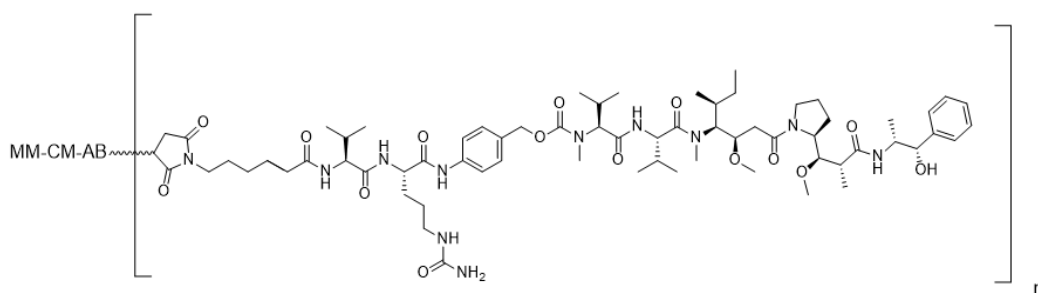
y en donde “n” es 2;

(b) en donde el método comprende

(i) reducir un anticuerpo activable que comprende MM-LP1-CM-LP2-AB con un agente reductor; y

(ii) conjugar uno o más vcMMAE con el anticuerpo activable reducido.

[0475] II-26. Un método para producir un anticuerpo activable conjugado que



Formula (II)

comprende la estructura de la Fórmula (II) o una sal de esta:

(a) en donde

(i) AB es un anticuerpo que se fija específicamente a CD71 humano y que comprende

i. una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de CDRH1 que comprende SEQ ID NO: 9, una secuencia de CDRH2 que comprende SEQ ID NO: 10 y una secuencia de CDRH3 que comprende SEQ ID NO: 11; y

ii. una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de CDRL1 que comprende SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13, una secuencia de CDRL2 que comprende SEQ ID NO: 14 y una secuencia de CDRL3 que comprende SEQ ID NO: 15;

(ii) MM es una porción de enmascaramiento que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, en donde la MM inhibe la fijación del AB a CD71 humano cuando el anticuerpo activable conjugado está en un estado no escindido;

(iii) CM es una porción escindible que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 156, en donde la CM es un polipéptido que funciona como un sustrato para una proteasa; y

y en donde “n” es 2;

(b) en donde el método comprende

(i) reducir un anticuerpo activable que comprende MM-CM-AB con un

agente reductor; y

(ii) conjugar uno o más vcMMAE con el anticuerpo activable reducido.

[0476] II-27. Una composición farmacéutica que comprende: el anticuerpo activable conjugado de acuerdo con cualquiera de las formas de realización II-1 a II-24; y opcionalmente un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

[0477] II-28. Un método para tratar, aliviar un síntoma de, o retrasar la progresión de un tipo de cáncer en un sujeto, en donde el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo activable conjugado de acuerdo con cualquiera de las formas de realización II-1 a II-24 o la composición farmacéutica de acuerdo con la forma de realización II-27 a un sujeto que lo necesite para un tipo de cáncer seleccionado del grupo que consiste en: cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama ER+, cáncer de mama triple negativo, cáncer colorrectal, melanoma, cáncer de próstata, mieloma múltiple, linfoma difuso de linfocitos B grandes, carcinoma de células pequeñas de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, mesotelioma, linfoma no Hodgkin, carcinoma hepatocelular y glioblastoma.

[0478] II-29. Un anticuerpo activable conjugado de acuerdo con cualquiera de las formas de realización II-1 a II-24 o una composición farmacéutica de acuerdo con la forma de realización II-27, para su uso como medicamento.

[0479] II-30. Un anticuerpo activable conjugado de acuerdo con cualquiera de las formas de realización II-1 a II-24 o una composición farmacéutica de acuerdo con la forma de realización II-27, para su uso en el tratamiento contra el cáncer, opcionalmente en donde el tipo de cáncer se selecciona del grupo que consiste en: cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama ER+, cáncer de mama triple negativo, cáncer colorrectal, melanoma, cáncer de próstata, mieloma múltiple, linfoma difuso de linfocitos B grandes, carcinoma de células pequeñas de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, mesotelioma, linfoma no Hodgkin, carcinoma hepatocelular y glioblastoma.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1. Anticuerpos activables conjugados anti-CD71 (AADC)

[0480] Los estudios proporcionados en la presente se diseñaron para producir algunos de los anticuerpos activables conjugados anti-CD71 de la divulgación.

[0481] Como se describe en la solicitud de patente estadounidense N.º US 2016/0355599 A1, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad, se obtuvo un anticuerpo monoclonal anti-CD71 M21 mediante el uso de tecnología de

hibridoma de ratón de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica. Los ratones se inmunizaron con dominio extracelular (ECD) de CD71 humano y los hibridomas posteriores se cribaron mediante un ensayo de citotoxicidad superpuesto, y se confirmó mediante ELISA que los clones con citotoxicidad positiva de este ensayo se fijan al polipéptido de ECD de CD71 humano y se confirmó mediante FACS que se fijan a las superficies celulares. El anticuerpo monoclonal anti-CD71 M21 incluye una región variable de la cadena pesada (VH) de SEQ ID NO: 1, y una región variable de la cadena liviana (VL) de SEQ ID NO: 2.

[0482] También se evaluaron los siguientes anticuerpos anti-CD71 humanizados, que se basaron en el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD71 M21: Ab21.10 LcB: HcA (VH de SEQ ID NO: 3 y VL de SEQ ID NO: 7), Ab21.11 LcB: HcB (VH de SEQ ID NO: 4 y VL de SEQ ID NO: 7), Ab21.12 LcB: HcC (VH de SEQ ID NO: 5 y VL de SEQ ID NO: 7), y M21 (VH de SEQ ID NO: 1 y VL de SEQ ID NO: 2). Se confirmó mediante FACS la capacidad de diversos anticuerpos anti-CD71 de la divulgación para fijarse a CD71 de superficie celular.

[0483] Todos los anticuerpos anti-CD71 humanizados mostraron una fijación a CD71 humano y de *Macaca fascicularis* que era comparable a la fijación demostrada por el anticuerpo de ratón CD71 M21. La fijación de los anticuerpos anti-CD71 humanizados se confirmó en la línea celular BxPC3 mediante FACS. Sucintamente, se etiquetaron células BxPC3 con anticuerpo Mab21 o huCD71 monoclonal de ratón (Ab21.10, Ab21.11 y Ab21.12) a las concentraciones indicadas y posteriormente se las detectó con un anti-IgG de ratón o anti-IgG humana en cabra etiquetado con Alexa Fluor 647, respectivamente.

[0484] En un estudio de ejemplo, se midió la actividad de fijación de Ab21.12 LcB:HcC anti-CD71 (VH de SEQ ID NO: 5 y VL de SEQ ID NO: 7) a CD71 recombinante (mediante ELISA) y células que expresan CD71 (mediante citometría de flujo) de fuentes de seres humanos, *Macaca fascicularis*, ratones y ratas. Como se muestra en los resultados de ejemplo de la Tabla 1, el anticuerpo anti-CD71 se fijó a CD71 recombinante humano y de mono con afinidad equivalente según la medición mediante ELISA, y que fue equivalente a la afinidad de la holotransferrina humana a CD71 humano. El anticuerpo se fijó a las líneas celulares que expresan CD71 humano y de mono (células de cáncer de páncreas BxPC3 humanas y células epiteliales de riñón primarias de *Macaca fascicularis*, respectivamente) con afinidad equivalente según la medición mediante citometría de flujo. No se midió fijación significativa por parte del anticuerpo anti-CD71 a CD71 de ratón recombinante o una línea celular que

expresa CD71 de rata (células de hepatoma de tasa H-4-11-E).

Tabla 1: Fijación de anti-CD71 a CD71 humano, de mono, de rata y de ratón mediante ELISA y citometría de flujo, y fijación de holotransferrina a CD71 humano mediante ELISA

Artículo de prueba	Especie de CD71	ELISA (ECD)	Citometría de flujo (líneas celulares)
		Kapp (nM)	Kapp (nM)
anticuerpo anti-CD71 Ab21.12	Humano	0,3	3,0
	Mono	0,4	3,0
	Rata	No evaluado	Sin fijación
	Ratón	Sin fijación	No evaluado
*Holotransferrina	Humano	0,5	No evaluado

EJEMPLO 2. Descubrimiento de enmascaramiento

[0485] Los estudios proporcionados en la presente se diseñaron para identificar y caracterizar porciones de enmascaramiento para su uso en anticuerpos anti-CD71 activables de la divulgación.

[0486] Como se describe en la solicitud de patente estadounidense N.º US 2016/0355599 A1, se usó el anticuerpo anti-CD71 21.12, que comprende una VH de SEQ ID NO: 5 y una VL de SEQ ID NO: 7, para cribar una colección de péptidos X_{15} aleatoria con una diversidad total de 6×10^{10} , donde X es cualquier aminoácido, mediante el uso de un método similar al descrito en la publicación internacional PCT número WO 2010/081173, publicada el 15 de julio de 2010. El cribado consistió en una ronda de clasificación de MACS y cinco rondas de clasificación de FACS. La clasificación de MACS inicial se realizó con Dynabeads de proteína A (Invitrogen) y el anticuerpo anti-CD71 21.12 a una concentración de 200 nM. Para MACS, se cribaron aproximadamente 1×10^{12} células para la fijación y se recolectaron 1×10^7 células. Anti-CD71 21.12 se conjugó con DyLight-488 (ThermoFisher), se confirmó la actividad de fijación a CD71 y se usó anti-CD71 21.12-488 como sonda fluorescente para todas las rondas de FACS. Las células bacterianas se tiñeron y los clones positivos se recolectaron de la siguiente manera: anti-CD71 21.12-488 20 nM con 1×10^6 células recolectadas en la ronda 1 de FACS, anti-CD71 21.12-488 5 nM con $6,2 \times 10^4$ células recolectadas en la ronda 2 de FACS y anti-CD71 21.12-488 5 nM con 5×10^3 células y anti-CD71 21.12-488 1 nM con 5×10^2 células recolectadas en la ronda 3 de FACS, anti-CD71 21.12-488 1 nM con $> 2 \times 10^2$ células recolectadas en las rondas 4 y 5 de FACS. Se verificó que la población positiva de la segunda ronda de FACS inhibía la fijación del anticuerpo anti-CD71 21.12-488 a la proteína CD71 recombinante. Los clones de péptidos individuales se identificaron mediante análisis de secuencia de

aglutinantes 5 nM de la ronda 3 de FACS y aglutinantes 1 nM de las rondas 3, 4 y 5 de FACS.

[0487] Las porciones de enmascaramiento identificadas incluyen TF01 (QFCPWSYYLIGDCDI; SEQ ID NO: 16) y TF02 (NLCTEHSFALDCRSY; SEQ ID NO: 17). Las máscaras TF01 y TF02 se truncaron y se cribaron con alanina para generar familias de anticuerpos activables con diferentes eficacias de enmascaramiento, incluso la porción de enmascaramiento TF02.13 (NLCTEHSAAALDCRSY; SEQ ID NO: 18).

[0488] Se usaron estos péptidos de enmascaramiento para generar anticuerpos activables anti-CD71 de la divulgación. Las secuencias para ciertos de estos anticuerpos activables anti-CD71 se muestran a continuación en la Tabla A. En algunas formas de realización, estos anticuerpos activables anti-CD71 incluyen la porción escindible 2001 (ISSGLLSGRSDNH; SEQ ID NO: 91), la porción escindible 3001 (AVGLLAPPGGLSGRSDNH; SEQ ID NO: 97), la porción escindible 2011 (ISSGLLSGRSDNP; SEQ ID NO: 156) o la porción escindible 3011 (AVGLLAPPGGLSGRSDNP; SEQ ID NO: 164) como se indica.

[0489] Si bien ciertas secuencias que se muestran a continuación incluyen la secuencia espaciadora de SEQ ID NO: 138, las personas del oficio de nivel medio observan que los anticuerpos anti-CD71 activables de la divulgación pueden incluir cualquier secuencia espaciadora adecuada, tal como, por ejemplo, una secuencia espaciadora seleccionada del grupo que consiste en QGQSGQG (SEQ ID NO: 138), QGQSGQ (SEQ ID NO: 109), QGQSG (SEQ ID NO: 139), QGQS (SEQ ID NO: 140), QGQ, QG, GQSGQG (SEQ ID NO: 143), QSGQG (SEQ ID NO: 144), SGQG (SEQ ID NO: 145), GQG, G o Q. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-CD71 activables de la divulgación no pueden tener una secuencia espaciadora unida a su terminal N.

Tabla A. Secuencias de anticuerpos activables anti-CD71

Región variable de la cadena pesada de HuCD71_HcC

Secuencia de aminoácidos

QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGAIYPGN
SETGYAQKFQGRATLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRENWDPGFAFWGQG
TLITVSS (SEQ ID NO: 5)

Secuencia de nucleótidos

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTG
AAGATGTCCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGG

TGCGACAGGCTCCAGGCCAGGGCCTCGAATGGATCGGCGCCATCTACCCCGGCA
ACTCCGAGACAGGCTACGCCCAGAAGTTCCAGGGCAGAGCCACCCTGACCGCCG
ACACCTCCACCTCCACCGCCTACATGGAAGTGTCCAGCCTGCGGAGCGAGGACA
CCGCCGTGTACTACTGCACCAGAGAGAACTGGGACCCCGGCTTCGCCTTCTGGG
GCCAGGGCACCTGATCACCGTGTCTCTCC (SEQ ID NO: 206)

Cadena pesada de HuCD71_HcC-des

Secuencia de aminoácidos

QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGAIYPGN
SETGYAQKFQGRATLTADTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTRENWDPGFAPFWGQG
TLITVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK_dYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPK_dTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:
167)

Secuencia de nucleótidos

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTG
AAGATGTCCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGG
TGCGACAGGCTCCAGGCCAGGGCCTCGAATGGATCGGCGCCATCTACCCCGGCA
ACTCCGAGACAGGCTACGCCCAGAAGTTCCAGGGCAGAGCCACCCTGACCGCCG
ACACCTCCACCTCCACCGCCTACATGGAAGTGTCCAGCCTGCGGAGCGAGGACA
CCGCCGTGTACTACTGCACCAGAGAGAACTGGGACCCCGGCTTCGCCTTCTGGG
GCCAGGGCACCTGATCACCGTGTCTCCGCCAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGT
TCCCTCTGGCCCCTTCAGCAAGTCCACCTCTGGCGGCACAGCTGCCCTGGGCT
GCCTGGTGAAAGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGGAAGTCTGGCG
CCCTGACCAGCGGAGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGT
ACTCCCTGTCCTCCGTGGTGACAGTGCCCTCCTCCAGCCTGGGACCCAGACCT
ACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGG
AACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCTCCCTGCCCTGCCCCTGAACT
GCTGGGCGGACCTTCCGTGTTTCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGAT
GATCTCCCGGACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGA
CCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACAACGCCAA
GACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCT

GACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTC
CAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCA
GCCCCGCGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCACCTAGCCGGGAAGAGATGACCAA
GAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCC
GTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCACCT
GTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGT
CCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGC
ACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCGGC (SEQ ID NO: 168)

Cadena pesada de HuCD71_HcC

Secuencia de aminoácidos

QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGAIYPGN
SETGYAQKFQGRATLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRENWDPGFAFWGQG
TLITVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK_dYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPK_dTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:
20)

Secuencia de nucleótidos

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTG
AAGATGTCCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGG
TGCGACAGGCTCCAGGCCAGGGCCTCGAATGGATCGGCGCCATCTACCCCGGCA
ACTCCGAGACAGGCTACGCCCAGAAGTTCCAGGGCAGAGCCACCCTGACCGCCG
ACACCTCCACCTCCACCGCCTACATGGAAGTGTCCAGCCTGCGGAGCGAGGACA
CCGCCGTGTACTACTGCACCAGAGAGAACTGGGACCCCGGCTTCGCCTTCTGGG
GCCAGGGCACCTGATCACCGTGTCTCCGCCAGCACCAAGGGCCCCCTCCGTGT
TCCCTCTGGCCCCTTCCAGCAAGTCCACCTCTGGCGGCACAGCTGCCCTGGGCT
GCCTGGTGAAAGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGGAAGTCTGGCG
CCCTGACCAGCGGAGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGT
ACTCCCTGTCCTCCGTGGTGACAGTGCCCTCCTCCAGCCTGGGCACCCAGACCT
ACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGG
AACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCTCCCTGCCCTGCCCTGAACT
GCTGGGCGGACCTTCCGTGTTTCTGTTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGAT
GATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGA

CCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAA
GACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCT
GACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTC
CAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCA
GCCCCGCGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCACCTAGCCGGGAAGAGATGACCAA
GAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCC
GTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCACCT
GTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGT
CCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGC
ACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAAG (SEQ ID NO:
21)

HuCD71_LcB

Secuencia de aminoácidos

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGV
PSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK₄ST
YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 19)

HuCD71_LcB

Secuencia de nucleótidos

GACATCCAGATGACCCAGTCCCCATCCAGCCTGTCCGCCTCCGTGGGCGACAGA
GTGACAATCACCTGTTCCGCCAGCTCCTCCGTGTACTACATGTACTGGTTCCAGC
AGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGTGGATCTACTCCACCTCCAACCTGGCCT
CCGGCGTGCCCTCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGACTACACCCTGA
CCATCTCCAGCATGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGCGGC
GGAATAACCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGGACCG
TGCGCGCTCCAGCGTGTTTCATCTTCCACCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCG
GCACCGCCAGCGTCGTGTGCCTGCTGAACAATTCTACCCCCGCGAGGCCAAGG
TGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCCGTCA
CCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACCCTGT
CCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGG
GCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGTCCTTCAACCGCGGCGAGTGC (SEQ ID NO:
208)

Cadena liviana de anticuerpo activable anti-CD71-TF01-2001

[espaciador (SEQ ID NO: 138)] [huCD71Lc_TF01_2001 (SEQ ID NO: 141)]

Secuencia de aminoácidos

[QQQSGQG][QFCPWSYYLIGDCDIGGGSSGGSISSGLLSGRSDNHGGGSDIQMTQS
PSSLSASVGDRVTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGS
GSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQQRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK_dSTYSLSSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 22)

Cadena liviana de anticuerpo activable anti-CD71-TF02.13-2001

[espaciador (SEQ ID NO: 138)] [huCD71Lc_TF02.13_2001 (SEQ ID NO: 142)]

Secuencia de aminoácidos

[QQQSGQG][NLCTEHSAAALDCRSYGGGSSGGSISSGLLSGRSDNHGGGSDIQMTQS
PSSLSASVGDRVTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGS
GSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQQRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK_dSTYSLSSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 23)

Cadena liviana de anticuerpo activable anti-CD71-TF02.13-3011

[espaciador (SEQ ID NO: 138)] [huCD71Lc_TF02.13_3011 (SEQ ID NO: 146)]

Secuencia de aminoácidos

[QQQSGQG][NLCTEHSAAALDCRSYGGGSSGGSAAVGLLAPPGGLSGRSDNPGGSDIQ
MTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSR
FSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQQRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK_dSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 147)

Cadena liviana de anticuerpo activable anti-CD71-TF02.13-2011

[espaciador (SEQ ID NO: 138)] [huCD71Lc_TF02.13_2011 (SEQ ID NO: 169)]

Secuencia de aminoácidos

[QQQSGQG][NLCTEHSAAALDCRSYGGGSSGGSISSGLLSGRSDNPGGGSDIQMTQS
PSSLSASVGDRVTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGS
GSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQQRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK_dSTYSLSSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 170)

Cadena liviana de anticuerpo activable anti-CD71-TF01-3011

[espaciador (SEQ ID NO: 138)] [huCD71Lc_TF01_3011 (SEQ ID NO: 173)]

Secuencia de aminoácidos

[QQQSGQG][QFCPWSYYLIGDCDIGGGSSGGSAAVGLLAPPGGLSGRSDNPGGSDIQ
MTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSR
FSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQQRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFP

PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK_dSTYSL
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 174)

Región variable de la cadena liviana de anticuerpo activable anti-CD71-TF02.13-2001
[espaciador (SEQ ID NO: 138)] [dominio VL de huCD71Lc_TF02.13_2001 (SEQ ID
NO: 197)]

Secuencia de aminoácidos

[QGQSGQG][NLCTEHSAAALDCRSYGGGSSGGSISSGLLSGRSDNHGGGSDIQMTQS
PSSLSASVGDRVTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGS
GSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 198)

Región variable de la cadena liviana de anticuerpo activable anti-CD71-TF02.13-3011
[espaciador (SEQ ID NO: 138)] [dominio VL de huCD71Lc_TF02.13_3011 (SEQ ID
NO: 199)]

Secuencia de aminoácidos

[QGQSGQG][NLCTEHSAAALDCRSYGGGSSGGSASVGLLAPPGGLSGRSDNPGGSDIQ
MTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSR
FSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO:
200)

Región variable de la cadena liviana de anticuerpo activable anti-CD71-TF02.13-2011
[espaciador (SEQ ID NO: 138)] [dominio VL de huCD71Lc_TF02.13_2011 (SEQ ID
NO: 201)]

Secuencia de aminoácidos

[QGQSGQG][NLCTEHSAAALDCRSYGGGSSGGSISSGLLSGRSDNPGGGSDIQMTQS
PSSLSASVGDRVTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGS
GSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 202)

Región variable de la cadena liviana de anticuerpo activable anti-CD71-TF01-2001
[espaciador (SEQ ID NO: 138)] [dominio VL de huCD71Lc_TF01_2001 (SEQ ID NO:
195)]

Secuencia de aminoácidos

[QGQSGQG][QFCPWSYYLIGDCDIGGGSSGGSISSGLLSGRSDNHGGGSDIQMTQS
PSSLSASVGDRVTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGS
GSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 196)

Región variable de la cadena liviana de anticuerpo activable anti-CD71-TF01-3011
[espaciador (SEQ ID NO: 138)] [dominio VL de huCD71Lc_TF01_3011 (SEQ ID NO:
203)]

Secuencia de aminoácidos

[QGQSGQG][QFCPWSYYLIGDCDIGGGSSGGSASVGLLAPPGGLSGRSDNPGGSDIQ
MTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSR
FSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO:
204)

EJEMPLO 3. Generación y caracterización de anticuerpos activables anti-CD71 y anticuerpos activables conjugados anti-CD71

[0490] Los estudios proporcionados en la presente se diseñaron para generar anticuerpos activables anti-CD71 de la divulgación.

[0491] Se generaron anticuerpos activables anti-CD71 con diferentes eficacias de enmascaramiento (es decir, una medición de la capacidad de la MM del anticuerpo activable para bloquear la fijación del AB del anticuerpo activable a su diana). Los péptidos TF01 y TF02 se mutaron mediante truncamiento y barrido de alanina como se describe en el Ejemplo 2, y se usaron estas variantes de péptidos de enmascaramiento para generar familias de anticuerpos activables anti-CD71 de la presente divulgación con un rango de eficacias de enmascaramiento.

[0492] La fijación de los anticuerpos activables anti-CD71 de la presente divulgación a la línea celular NCI H292 (también denominada en la presente H292) se evaluó mediante FACS. Sucintamente, se etiquetaron células con anticuerpo activable o anticuerpo huCD71 en un rango de concentraciones y posteriormente se las detectó con un anticuerpo secundario anti-IgG humana en cabra etiquetado con Alexa Fluor 647 para determinar una curva de fijación. Como se resume en los datos de fijación de ejemplo a continuación en la Tabla 2, los anticuerpos activables anti-CD71 de la presente divulgación muestran un rango de eficacias de enmascaramiento en comparación con el anticuerpo anti-CD71 parental (huCD71 21.12 Ab).

Tabla 2: Eficacias de enmascaramiento de porciones de enmascaramiento

Porción de enmascaramiento anticuerpo activable	de de	SEQ ID NO de VL de la cadena liviana	K _{app} (nM)	Eficacia de enmascaramiento
Ninguna (Ab 21.12)		7	2,288	1
TF01		809	809,5	352
TF02.13		813	127,4	55

[0493] Estos datos de ejemplo en la Tabla 2 muestran que ambas máscaras (TF01 y TF02.13) inhiben la fijación del anticuerpo anti-CD71 a CD71 cuando el anticuerpo activable está en un estado intacto o no escindido. Estos datos de ejemplo también demuestran que la porción de enmascaramiento TF01 demuestra una mayor eficacia de enmascaramiento que la porción de enmascaramiento TF02.13.

EJEMPLO 4: Caracterización de la actividad de fijación del anticuerpo activable contra CD71 y el anticuerpo activable conjugado contra CD71

[0494] Este ejemplo muestra que los anticuerpos activables anti-CD71 y los anticuerpos activables conjugados anti-CD71 de la presente divulgación demostraron una menor afinidad de fijación a la proteína CD71 humana y de *Macaca fascicularis* de la superficie celular y recombinante cuando están en su forma intacta y no escindida en comparación con sus formas escindidas con proteasa correspondientes.

[0495] Como se muestra en las Figuras 3A y 3B, se usó un ensayo de fijación en fase sólida (ELISA) para demostrar la afinidad de fijación de los anticuerpos activables anti-CD71 y los anticuerpos activables conjugados anti-CD71 de la presente divulgación a CD71 recombinante, tanto en sus formas intactas y no escindidas como en sus formas escindidas y activadas por proteasa. En estos ejemplos, la proteína CD71 de *Macaca fascicularis* (Figura 3B) o humana (Figura 3A) recombinante (R&D Systems) se recubrió en placas ELISA a una concentración de 1 µg/mL, y luego se incubó con la concentración indicada de anticuerpo activable anti-CD71 intacto y no escindido (“anti-CD71-TF02.13-2011”) de la presente divulgación o anticuerpo activable conjugado anti-CD71 intacto y no escindido E2 (es decir, que tiene una DAR de ~2) (“anti-CD71-TF02.13-2011-vc-MMAE E2”) de la presente divulgación. También se analizaron el anticuerpo activable anti-CD71 (“anti-CD71-TF02.13-2011 (Act)”) o anticuerpo activable conjugado anti-CD71 E2 (es decir, que tiene una DAR de ~2) (“anti-CD71-TF02.13-2011 (Act)”) de la presente divulgación después del tratamiento con una proteasa que escindió la porción escindible del componente de anticuerpo activable.

[0496] Como se analiza en la presente, “E2” se refiere a una composición de un anticuerpo activable conjugado anti-CD71 dado de la presente divulgación que incluye esencialmente solo la especie del anticuerpo activable conjugado donde la carga de fármaco es de 2 moléculas de fármaco para cada molécula de anticuerpo activable, y que esencialmente no incluye cantidad alguna o incluye cantidades mínimas de otras especies posibles (es decir, donde la carga de fármaco es de 0, 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, etc.). Como se analiza en la presente, “DAR” se refiere a la relación promedio entre el fármaco (en este caso, MMAE) y el anticuerpo activable (es decir, CD71-TF02.13-2011) en una población de tales anticuerpos activables conjugados. Por lo tanto, en este ejemplo, anti-CD71-TF02.13-2011-vc-MMAE E2 se refiere a una composición que incluye solo anticuerpo activable anti-CD71-TF02.13-2011 en la que cada anticuerpo activable tenía una carga de fármaco de 2 equivalentes de vc-MMAE y una DAR de alrededor de 2 como se describe en el Ejemplo 26.

[0497] La cantidad de anticuerpo fijado en cada muestra se detectó mediante incubación y detección mediante anticuerpo anti-humano en cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante y detección Ultra TMB (Thermo Fisher Scientific). A continuación se muestra un resumen de las afinidades de fijación:

Tabla 3A: Actividad de fijación a CD71 observada de ejemplo de anticuerpos activables anti-CD71 no escindidos y escindidos y anticuerpos activables conjugados anti-CD71

Artículo de prueba	CD71 humano $K_{d(app)}$ nM	CD71 de <i>Macaca fascicularis</i> $K_{d(app)}$ nM
anti-CD71-TF02.13-2011	0,42	1,24
anti-CD71-TF02.13-2011 (Activado)	0,04	0,06
anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	0,48	1,49
anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 (Activado)	0,05	0,07

[0498] Las Figuras 3C y 3D muestran en un ensayo de FACS los resultados de ejemplo de que los anticuerpos activables anti-CD71 de la presente divulgación y los anticuerpos activables conjugados anti-CD71 de la presente divulgación se fijan a las células que expresan CD71 humano (Figura 3C) y CD71 de *Macaca fascicularis* (Figura 3D) con una mayor constante de disociación y una menor afinidad que la del correspondiente anticuerpo activable anti-CD71 activado por proteasa o el anticuerpo activable conjugado anti-CD71 activado por proteasa de la presente divulgación. Estos resultados de ejemplo muestran que la afinidad de fijación de los anticuerpos activables anti-CD71 escindidos y activados por proteasa de la presente divulgación y los anticuerpos activables conjugados anti-CD71 escindidos y activados por proteasa de la presente divulgación se fijó a las células a razón de una afinidad similar a la del anticuerpo anti-CD71 parental, lo que demuestra el efecto de la porción de enmascaramiento en la inhibición de la fijación del anti-CD71 a su diana en el anticuerpo activable intacto o el anticuerpo activable conjugado intacto.

[0499] En el estudio de ejemplo mostrado en las Figuras 3C y 3D, la fijación de los anticuerpos de la presente divulgación a las líneas celulares indicadas se realizó mediante un método de etiquetado con FACS estándar. Sucintamente, se etiquetaron células con los anticuerpos o anticuerpos activables indicados de la presente divulgación: un anticuerpo de control (AB095), un anticuerpo anti-CD71 humano (Ab 21.12, que tiene una VH de SEQ ID NO: 5 y una VL de SEQ ID NO: 7), un anticuerpo activable anti-CD71 (anti-CD71 TF02.13-2011), o un anticuerpo activable conjugado anti-CD71 E2 (es decir, que tiene una DAR de ~2) (anti-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE

E2). Además, la afinidad de fijación del anticuerpo activable anti-CD71 (anti-CD71 TF02.13-2011 (Act)) y el anticuerpo activable conjugado anti-CD71 E2 (es decir, que tiene una DAR de ~2) (anti-CD71 TF02. 13-2011-vcMMAE E2 (Act)) también se analizó después de la activación por proteasa que escindió la porción escindible en estos. Cada artículo de prueba se aplicó a las concentraciones indicadas y posteriormente se detectó con un anticuerpo secundario anti-IgG humana en cabra etiquetado con Alexa Fluor 647.

[0500] La Tabla 3B a continuación muestra los valores de EC50 en función de las curvas de fijación representadas en las Figuras 3C a 3D. Estos resultados muestran que el anticuerpo activable intacto y el anticuerpo activable conjugado intacto se fijaron a su diana con menor afinidad que sus contrapartes activadas por proteasa, y que los anticuerpos activables activados por proteasa se fijaron con una afinidad similar a la del anticuerpo anti-CD71 parental.

Tabla 3B: Actividad de fijación a CD71 observada de ejemplo de aglutinantes anti-CD71

Artículo de prueba	Células H292 humanas EC50 de FACS	CHO con CD71 de <i>Macaca fascicularis</i> EC50 de FACS
Ab 21.12	1,021	-
Ab 21.12-vc-MMAE	-	0,2912
Anti-CD71-TF02.13-2011	46,06	27,83
Anti-CD71-TF02.13-2011 (Activado)	1,429	0,4639
Anti-CD71-TF02.13-2011- vcMMAE E2	50,97	35,30
Anti-CD71-TF02.13-2011- vcMMAE E2 (Activado)	1,854	0,7292

[0501] En un estudio de ejemplo similar, se usaron ensayos ELISA y de citometría de flujo para demostrar la afinidad de fijación de los anticuerpos anti-CD71, anticuerpos conjugados anti-CD71, anticuerpos activables anti-CD71 (forma intacta y no escindida y forma escindida y activada por proteasa) y anticuerpos activables conjugados anti-CD71 (forma intacta y no escindida y forma escindida y activada por proteasa) de la presente divulgación a CD71 recombinante a CD71 humano y de *Macaca fascicularis* recombinante y líneas celulares que expresan CD71 humano y de *Macaca fascicularis*. Los artículos de prueba fueron el anticuerpo anti-CD71 Ab21.12 (VH de SEQ ID NO: 5 y una VL de SEQ ID NO: 7), el anticuerpo conjugado anti-CD71 Ab21.12-vcMMAE E2 (es decir, que tiene una DAR de ~2), el anticuerpo activable anti-CD71-TF02.13-2011 y el anticuerpo activable conjugado DAR2 anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 (es decir, que tiene una DAR de ~2).

[0502] En los ejemplos de ELISA, las proteínas CD71 ECD humanas o de *Macaca fascicularis* recombinantes se recubrieron en placas ELISA, y luego se incubaron con una de un rango de concentraciones de los artículos de prueba de la presente divulgación, seguido de la medición de la cantidad de artículo de prueba fijado con un anticuerpo secundario. Los artículos de prueba que se activaron se incubaron con la enzima proteasa matriptasa. Los valores de K_d aparente de ejemplo para cada artículo de prueba se muestran en la Tabla 3C.

[0503] En el estudio de ejemplo mostrado también en las Tabla 3C, la fijación de los anticuerpos de la presente divulgación a las líneas celulares indicadas se realizó mediante un método de etiquetado con FACS estándar. Los resultados de citometría de flujo reflejan la Kapp medida promedio de cuatro líneas celulares humanas (cáncer de mama humano HCC1806, cáncer colorrectal humano HT-29, cáncer de pulmón humano NCI-H292 y cáncer de pulmón humano NCI-H520) y una línea celular CHO-K1 que expresa CD71 de *Macaca fascicularis*. Los valores de K_d aparente de ejemplo para cada artículo de prueba se muestran en la Tabla 3C.

Tabla 3C: Actividad de fijación a CD71 observada de ejemplo de anticuerpos anti-CD71, anticuerpos conjugados anti-CD71, anticuerpos activables anti-CD71 no escindidos y escindidos y anticuerpos activables conjugados anti-CD71

		ELISA rhCD71	ELISA rcCD71	Citometría de flujo Promedio de 4 líneas celulares humanas	Citometría de flujo CHO-K1 que expresa CD71 de <i>Macaca fascicularis</i>
	Artículo de prueba	Kapp (nM)	Kapp (nM)	Kapp (nM)	Kapp (nM)
1	Ab21.12	0,03	0,03	0,8	0,3
2	Ab21.12-vc-MMAE E2	0,04	0,03	No evaluado	No evaluado
3	anti-CD71-TF02.13-2011	1,94	1,11	105,5	28
4	anti-CD71-TF02.13-2011, activado por matriptasa	0,06	0,04	2,0	0,5
5	anti-CD71-TF02.13- 2011-vcMMAE E2	2,58	1,02	98,1	35
6	anti-CD71-TF02.13- 2011-vcMMAE E2, activado por matriptasa	0,05	0,04	2,0	0,7
Relación					
	anti-CD71-TF02.13-2011 / Ab21.12	65	37	127	93
	anti-CD71-TF02.13- 2011-vcMMAE E2 / Ab21.12	86	34	117	117
	anti-CD71-TF02.13-2011 / anti-CD71-TF02.13- 2011, activado por matriptasa	32	28	55	56
	anti-CD71-TF02.13- 2011-vcMMAE E2 / anti- CD71-TF02.13-2011- vcMMAE E2, activado por matriptasa	52	26	48	50

[0504] Estos resultados de ejemplo muestran que los anticuerpos activables intactos y los anticuerpos activables conjugados intactos mostraron una menor afinidad aparente a CD71 en comparación con sus contrapartes activadas o sus anticuerpos parentales.

EJEMPLO 5: Expresión de CD71 en múltiples tumores primarios y metastásicos derivados de pacientes

[0505] Este ejemplo muestra que CD71 se expresa en una gran variedad de tipos de tumores primarios y metastásicos con tinción inmunohistoquímica (IHC) mediante el uso de un anticuerpo anti-CD71.

[0506] Las Figuras 1 y 2 muestran que CD71 se expresa altamente en una gran cantidad de muestras de tumores primarios y metastásicos, mediante tinción IHC con un anticuerpo anti-CD71 adquirido comercialmente en múltiples tumores primarios derivados de pacientes y micromatrices de tejido metastásico (TMA) derivadas de pacientes. La Figura 1 muestra una tinción IHC de CD71 en cáncer de cabeza y cuello

(1), cáncer de cuello uterino (2), un cáncer de mama (3), linfoma no Hodgkin (NHL) en ganglios linfáticos (4), un cáncer de pulmón (5), un cáncer de vejiga (6), un cáncer de ovario (7) y un cáncer de esófago (8). La Figura 2 muestra una tinción IHC de CD71 en una micromatriz de tejido (TMA) que consiste en núcleos de tumores metastásicos que demostró un nivel de expresión de CD71 de moderado a alto en la mayoría de los núcleos. En la Tabla 4A se muestra un resumen de la expresión de CD71 en muestras de tumores humanos mediante inmunohistoquímica (IHC).

Tabla 4A: Resumen de la expresión de CD71 en muestras de tumores humanos mediante IHC

Indicación	Sitio	Total de casos	% fuerte/moderado (2+ o más IHC)
De esófago	primario	56	82,1
	metástasis	69	75,4
Gástrico	primario	209	63,6
	metástasis	74	83,7
De páncreas	primario	151	57
	metástasis	15	80
linfoma no Hodgkin	primario	132	66,7
	metástasis	59	88,1
carcinomas de pulmón de células no pequeñas	primario	127	74,8
	metástasis	87	70,1
De mama	primario	45	66,7
	metástasis	80	85
De endometrio	primario	147	98
	metástasis	9	88,9
Colorrectal	primario	146	77,4
	metástasis	98	74,5
carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello	primario	160	53,8
	metástasis	25	60

EJEMPLO 6: Eficacia de enmascaramiento y eficacia *in vivo* de AADC anti-CD71 activable en modelo de xenoinjerto de CRC

[0507] Este ejemplo muestra que la eficacia de enmascaramiento de anticuerpos activables anti-CD71 humano con toxinas conjugadas (AADC) de la presente divulgación es un factor en su eficacia en un modelo de xenoinjerto de ratón con cáncer colorrectal (CRC) HT29.

[0508] En estos estudios, se hicieron crecer tumores de xenoinjerto HT29 en ratones hasta un volumen promedio de 150 mm³. Luego, los ratones se aleatorizaron en grupos y recibieron dosis el día 1 con 3 mg/kg (o indicado de otro modo) de cada artículo de prueba indicado. Se representó la media de volumen tumoral ± SEM para cada punto temporal.

[0509] La Figura 4A muestra que un AADC anti-CD71 de ejemplo de la presente divulgación (TF01-3011-vc-MMAE anti-CD71) con una máscara de mayor afinidad mostró cierta inhibición del crecimiento tumoral en relación con un control de vehículo

después de una dosis única de 3 mg/kg. En comparación, la Figura 4B mostró que un AADC anti-CD71 de ejemplo de la presente divulgación (anti-CD71 TF02.13-3011-vc-MMAE) con una máscara de menor afinidad, pero con el mismo sustrato escindible, mostró una regresión esencialmente completa del xenoinjerto después de una dosis única de 3 mg/kg. La Figura 4C muestra que un AADC anti-CD71 de ejemplo de la presente divulgación (anti-CD71 TF02.13-3011-vc-MMAE) con la máscara de menor afinidad, pero con el mismo sustrato escindible, también mostró una regresión esencialmente completa del xenoinjerto HT29 a una dosis única de 2 mg/kg o 3 mg/kg. Estos resultados de ejemplo muestran que un AADC con la porción de enmascaramiento de menor afinidad demostró una mayor eficacia que un AADC con una porción de enmascaramiento de mayor afinidad.

EJEMPLO 7: Sustratos escindibles y eficacia *in vivo* de AADC anti-CD71 activable en modelos de xenoinjerto de CRC

[0510] Este ejemplo muestra el efecto del sustrato escindible sobre la eficacia de los anticuerpos activables conjugados (AADC) anti-CD71 humano de ejemplo de la presente divulgación en un modelo de xenoinjerto de ratón.

[0511] En estos estudios, se hicieron crecer tumores de xenoinjerto HT29 (derivados de cáncer colorrectal) en ratones hasta un volumen promedio de 150 mm³. Luego, los ratones se aleatorizaron en grupos y recibieron dosis el día 1 con la cantidad indicada del artículo de prueba indicado. Se representó la media de volumen tumoral ± SEM para cada punto temporal.

[0512] La Figura 5 muestra que un AADC anti-CD71 de ejemplo de la presente divulgación (CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE) muestra una regresión completa o casi completa en el modelo de xenoinjerto de ratón a dos dosis diferentes. Estos datos de ejemplo demuestran que la eficacia del AADC indicado (anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE) con un sustrato menos escindible es sustancialmente la misma que la eficacia del AADC (anti-CD71 TF02.13-3011-vc-MMAE) con un sustrato más escindible mostrado en las Figuras 4B y 4C.

EJEMPLO 8: Eficacia *in vivo* de AADC anti-CD71 activable en múltiples modelos de xenoinjerto

[0513] Este ejemplo muestra las eficacias del AADC anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE de la presente divulgación a dos relaciones diferentes de fármaco con respecto a anticuerpo (DAR) en diversos modelos de xenoinjerto de ratón.

[0514] En estos estudios, se hicieron crecer tumores de xenoinjerto de cáncer de ovario (OV-90; Figura 6B), cáncer de estómago (NCI-N87; Figura 6A), cáncer de

mama ER+ (BT474; Figura 6C) o cáncer de mama triple negativo (HCC-70; Figura 6D) en ratones hasta un volumen promedio de 150 mm³. Luego, los ratones se aleatorizaron en grupos y recibieron dosis el día 1 con el artículo de prueba indicado. La cantidad de cada AADC que se administró se equiparó a la dosis en función de la cantidad de toxina MMAE, de modo que el anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE (que tiene una DAR promedio de ~3) se administró a 3 mg/kg y el anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2 (que tiene una DAR promedio de ~2) se administró a 4,3 mg/kg. Se representó la media de volumen tumoral $\pm$ SEM para cada punto temporal.

[0515] Las Figuras 6A-6B muestran que un AADC anti-CD71 de ejemplo de la presente divulgación (anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE) muestra una regresión completa o casi completa en un modelo de xenoinjerto de ratón de cáncer de ovario y estómago. El anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2 (es decir, que tenía una DAR de ~2), que incluía AADC purificados, cada uno con dos equivalentes de toxina MMAE, también mostró regresiones completas en los mismos modelos. En todos los casos, tal como se muestra en las Figuras 6C y 6D, incluso cuando no se observó una regresión completa o casi completa, las actividades de los AADC E2 (es decir, que tienen una DAR de ~2) y los AADC de DAR mayor fueron equivalentes o casi equivalentes. Estos datos de ejemplo demuestran que la eficacia de dosis equiparadas del AADC A2 (es decir, que tiene una DAR de ~2) (anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2) es comparable al AADC de DAR mayor correspondiente.

[0516] Como se muestra en la Tabla 4B, la eficacia de AADC anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2 que tiene una DAR de ~2 se evaluó contra una variedad de líneas celulares derivadas de pacientes (PDX) o de cáncer (CDX) en un modelo de xenoinjerto de ratón, y se administraron dosis con menos de o igual a 6 mg/kg una o dos veces. Los resultados, que se resumen a continuación, muestran que el AADC demostró al menos cierta eficacia, desde una regresión hasta la estasis y la inhibición del crecimiento tumoral en casi todos los modelos evaluados.

Tabla 4B: Eficacia de anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2 en xenoinjertos derivados de líneas celulares

Tipos de tumor	CDX o PDC	Regresiones o estasis	Inhibición del crecimiento tumoral	Ninguna respuesta
Gástrico	CDX	1		
	PDX	4		1
De esófago	CDX	3	1	
	CDX	4		
De ovario	PDX	2	1	
Cáncer de pulmón de células no pequeñas	CDX	3	1	
	PDX	2	1	1
De mama	CDX	3	2	
	PDX	5		
Colorrectal	CDX	2		1
Mieloma múltiple			1	
De próstata	CDX	1		
Mesotelioma			1	
Linfoma difuso de linfocitos B grandes	PDX	4	1	
Carcinoma de células pequeñas de cabeza y cuello	PDX	5		
De páncreas	PDX	6		1

EJEMPLO 9: Ensayos bioanalíticos para determinar los niveles de toxina conjugada y libre, y AADC intacto y total en muestras de animales tratados

[0517] Este ejemplo muestra flujos de trabajo de ejemplo para ensayos para medir niveles de metabolitos en muestras de prueba, incluidos los niveles de toxina conjugada y libre, y los niveles de anticuerpos activables conjugados intactos y totales.

[0518] Las Figuras 7A, 7B y 7C muestran flujos de trabajo esquemáticos para los ensayos bioanalíticos de ejemplo para determinar la cantidad de anticuerpo activable intacto y total (es decir, combinación de intacto y escindido) en los monos tratados, así como la cantidad de AADC intacto (con toxina no escindida) y toxina escindida en los monos tratados. Mediante el uso del protocolo de ensayo de ejemplo representado en la Figura 7A, la cantidad total de anticuerpo activable intacto y escindido (por ejemplo, anti-CD71 TF02.13-3001) en la muestra puede capturarse mediante microesferas magnéticas de proteína A y posteriormente desnaturalizarse (RapiGest™), reducirse con ditiotreitól, alquilarse y digerirse con tripsina. Los fragmentos peptídicos resultantes pueden analizarse mediante LC-MS/MS de fase inversa para identificar y cuantificar fragmentos peptídicos característicos de las cadenas pesada y liviana del anticuerpo. En este ensayo particular, uno o más péptidos que son característicos de la porción de anticuerpo del anticuerpo activable o anticuerpo activable conjugado pueden identificarse y cuantificarse mediante LC-MS/MS de fase inversa para determinar la cantidad total de anticuerpo activable tanto intacto como escindido, lo

que mide la cantidad de anticuerpo activable intacto y escindido total en la muestra.

[0519] En el mismo ensayo, uno o más péptidos que son característicos de la porción escindible (CM) no escindida y de la porción de enmascaramiento (MM) del anticuerpo activable (por ejemplo, desde el terminal N de la cadena liviana de anti-CD71-TF02.13-2011) pueden identificarse y cuantificarse mediante LC-MS/MS de fase inversa para determinar la cantidad total de anticuerpo activable intacto, lo que mide la cantidad de anticuerpo activable intacto en la muestra.

[0520] Mediante el uso del protocolo de ensayo de ejemplo representado en la Figura 7B, se puede determinar la cantidad total de AADC (por ejemplo, anti-CD71 TF02.13-3001-vc-MMAE) que permanece conjugado con su toxina (MMAE) en la muestra. En este ensayo, la cantidad total de anticuerpo activable, tanto conjugado como no conjugado, se ve capturada por la proteína A de MabSelect®. Esta fracción se trata con una cisteína proteasa para escindir la toxina ligadora, lo que libera cualquier toxina que permanezca conjugada con su anticuerpo activable. Mediante LC-MS/MS de fase inversa para analizar la fracción escindida por cisteína proteasa, la toxina característica (por ejemplo, MMAE) que permaneció conjugada con el anticuerpo activable capturado puede identificarse y cuantificarse, lo que mide la cantidad de toxina conjugada en la muestra.

[0521] Mediante el uso del protocolo de ensayo de ejemplo representado en la Figura 7C, se puede determinar la cantidad total de toxina en la muestra, que incluye las toxinas escindidas del AADC en el animal. En este ensayo de ejemplo representado en la Figura 7C, la proteína total de la muestra se precipita, lo que deja la toxina libre, no conjugada (MMAE) en el sobrenadante. El sobrenadante puede analizarse mediante LC-MS/MS de fase inversa para identificar y cuantificar la toxina característica (por ejemplo, MMAE) que no se asoció con la proteína precipitada, lo que mide la cantidad de toxina no conjugada en la muestra. En estos ensayos, se incluyeron estándares internos (por ejemplo, SiLu™ Mab, Sigma-Aldrich) para permitir la cuantificación.

EJEMPLO 10: Tolerabilidad y estabilidad de AADC anti-CD71 y ADC anti-CD71 en *Macaca fascicularis*

[0522] Este ejemplo muestra que los anticuerpos activables anti-CD71 humano con toxinas conjugadas (AADC) de la presente divulgación se toleran bien en *Macaca fascicularis* en comparación con el correspondiente conjugado de fármaco-anticuerpo (ADC) anti-CD71 parental en función de una o más lecturas hematológicas y síntomas clínicos. Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 5 y se resumen en la

Figura 17.

[0523] En este estudio, los *Macaca fascicularis* se trataron por vía intravenosa con el AADC o ADC indicado con la dosis indicada en los días 1 y 21. Solo se toleró una dosis para el AADC anti-CD71 TF02.13-3011-vc-MMAE y solo se administró una dosis para el ADC anti-CD71-vc-MMAE E2 (es decir, que tiene una DAR de ~2). La estabilidad de los anticuerpos activables (es decir, el anticuerpo activable total en comparación con el anticuerpo activable intacto) en las muestras obtenidas de cada animal se realizó como se describe en el Ejemplo 9 mediante LC/MS/MS de fase inversa.

Tabla 5: Resumen de la tolerabilidad y estabilidad de AADC y ADC anti-CD71 en *Macaca fascicularis*

Artículo de prueba (relación fármaco-proteína (DAR))	Dosis (mg/kg)	Pérdida de peso corporal	Recuento de neutrófilos promedio $\pm$ SD (por μ L)	Estabilidad relativa del anticuerpo activable circulante	Signos clínicos / tolerabilidad
Anti-CD71 TF02.13-3011-vc-MMAE (~3)	6	~10 %	98 $\pm$ 60	Menor	Neutropenia grave, letargo, inapetencia. No tolerado
Anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE (~3)	6	~8 %	290 $\pm$ 290	Mayor	Ninguno. Tolerado
Anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2 (~2)	12	0 %	180 $\pm$ 210	Mayor	Ninguno. Tolerado
Ab21.12-vc-MMAE E2 (~2)	2	~8 %	70	N/A	Letal a ~ 1 semana después de la 1.ª dosis

[0524] La pérdida de peso corporal se determinó en el peso medido más bajo después de la 1.ª dosis administrada. El recuento de neutrófilos inicial fue de al menos 1000 por μ L.

[0525] Como se resume en la Tabla 5, el ADC E2 no enmascarado (es decir, que tiene una DAR de ~2) (Anti-CD71-vc-MMAE E2) demostró letalidad dentro de los 8 días posteriores a la primera dosis.

[0526] Los resultados de ejemplo resumidos en la Tabla 5 también muestran que los AADC con el sustrato menos escindible (es decir, anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE y anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2) se toleraron mejor y demostraron un mayor nivel de estabilidad circulatoria en un primate no humano que el AADC correspondiente con el sustrato más escindible (es decir, anti-CD71 TF02.13-3011-vc-MMAE). Finalmente, los resultados de ejemplo muestran que el AADC (anti-CD71

TF02.13-2011-vc-MMAE E2 (es decir, que tiene una DAR de ~2)) demostró una tolerabilidad notablemente mejorada en un primate no humano que el correspondiente AADC de DAR mayor (anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE).

EJEMPLO 11: Estabilidad y farmacocinética de AADC anti-CD71 en *Macaca fascicularis*

[0527] Este ejemplo muestra la estabilidad y la farmacocinética de anticuerpos activables anti-CD71 humano con toxinas conjugadas (AADC) de la presente divulgación en *Macaca fascicularis*. In this study,

[0528] En este estudio, cuyos resultados se describen con más detalle en los Ejemplos 12 a 14, cuatro grupos de *Macaca fascicularis* se trataron por vía intravenosa con el anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2 indicado (es decir, con una DAR de ~2) o un control de vehículo con la dosis indicada y el programa que se muestran en la Tabla 6. Se obtuvieron muestras de cada animal en los días indicados en la Tabla 6, que se analizaron para determinar el anticuerpo activable total e intacto y la toxina MMAE conjugada y no conjugada de la manera descrita en el Ejemplo 9.

Tabla 6: Diseño del estudio de toxicidad de AADC anti-CD71

Grupo	Artículo de prueba	Dosis (mg/kg)	Cantidad de dosis	Cantidad de animales	Puntos temporales de muestreo con relación a la dosis (días)
1	Vehículo	N/A	2 (Q3W)	3 (2 machos; 1 hembra)	Día 1: + 0,003, 0,17, 1, 2, 4, 7, 11, 14, 18, 21 Día 22: + 0,003, 0,17, 1, 2, 4, 7
2	anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2	6	2 (Q3W)	3 (2 machos; 1 hembra)	Día 1: + 0,003, 0,17, 1, 2, 4, 7, 11, 14, 18, 21 Día 22: + 0,003, 0,17, 1, 2, 4, 7
3	anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2	12	2 (Q3W)	3 (2 machos; 1 hembra)	Día 1: + 0,003, 0,17, 1, 2, 4, 7, 11, 14, 18, 21 Día 22: + 0,003, 0,17, 1, 2, 4, 7
4	anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2	18	1	3 (2 machos; 1 hembra)	Día 1: + 0,003, 0,17, 1, 2, 4, 7, 11, 14, 18, 21

[0529] Como se resume en la Tabla 6, los *Macaca fascicularis* recibieron dosis con vehículo o AADC anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2 mediante un bolo IV lento a los niveles de dosis y programas mostrados. Las muestras de sangre para el análisis toxicocinético se procesaron en plasma y se almacenaron a -80 °C antes del análisis. Se obtuvieron muestras de suero para el análisis antifármaco antes de la dosis y 7 días después de la segunda dosis para los Grupos 1-3 y 22 días después de la primera dosis para el Grupo 4. Todos los grupos contenían tres animales (2 machos y 1 hembra).

EJEMPLO 12: Estabilidad de AADC anti-CD71 en *Macaca fascicularis*

[0530] Este ejemplo muestra la estabilidad de anticuerpos activables anti-CD71

humano con toxinas conjugadas (AADC) de la presente divulgación en *Macaca fascicularis*.

[0531] Como se muestra en los resultados de ejemplo de las Figuras 8A y 8B, las concentraciones plasmáticas de anticuerpo activable total e intacto (anti-CD71 TF02.13-2011) del AADC administrado se determinaron de la manera descrita en los Ejemplos 9 y 11. Los límites inferiores de cuantificación (LLOQ) para el anticuerpo activable intacto y total fueron 0,633 nM como se indica. Estos resultados de ejemplo demuestran que la concentración plasmática de anticuerpos activables intactos generalmente se mantuvo durante el intervalo de dosis de 21 días, y a un nivel que fue proporcional a la dosis administrada originalmente. Incluso 7 días después de la dosis, aproximadamente 80 % del anticuerpo activable conjugado (anti-CD71-TF02.13-2011-vc-MMAE E2) en plasma estaba en forma de profármaco intacto.

[0532] Como se muestra en los resultados de ejemplo de las Figuras 9A y 9B, las concentraciones plasmáticas de toxina MMAE conjugada y no conjugada se determinaron de la manera descrita en los Ejemplos 9 y 11. El límite inferior de cuantificación (LLOQ) fue 1,77 nM para MMAE conjugada y 0,31 nM para MMAE no conjugada como se indica. Estos resultados de ejemplo demuestran que menos de 1 % del total de MMAE medida en la concentración plasmática estaba en una forma no conjugada.

EJEMPLO 13: Cambio de las relaciones de fármaco con respecto a anticuerpo activable después de la dosis de AADC anti-CD71 en *Macaca fascicularis*

[0533] Este ejemplo muestra la relación observada de fármaco (MMAE) con respecto a anticuerpo activable (anti-CD71 TF02.13-2011) en plasma después de la dosis de *Macaca fascicularis* con anticuerpos activables anti-CD71 con toxinas conjugadas (AADC) de la presente divulgación.

[0534] Las concentraciones plasmáticas de anticuerpo activable total e intacto (anti-CD71 TF02.13-2011) se determinaron de la manera descrita en los Ejemplos 9 y 11. Como se muestra en la Figura 10, la relación de fármaco con respecto a anticuerpo activable se calculó al dividir la concentración de MMAE conjugada (ver el Ejemplo 12 y la Figura 9A) por la concentración de anticuerpo activable total (ver el Ejemplo 11 y la Figura 8A) en cada punto temporal indicado. Las relaciones promedio y las desviaciones estándar para puntos temporales específicos se muestran en la Tabla 7. Estos resultados de ejemplo demuestran que la relación observada de fármaco MMAE con respecto a anticuerpo activable cambió con el tiempo de una manera que era consistente entre cada una de las tres (3) dosis. En cada dosis, la DAR calculada de

AADC intacto comenzó a ~2 inmediatamente después y dentro de las 4 horas posteriores a la administración, y esta relación cayó a alrededor de 1 a las aproximadamente 96 horas (es decir, alrededor de 4 días) posteriores a la dosis.

Tabla 7: Relación de fármaco con respecto a anticuerpo activable

Artículo de prueba	Dosis (mg/kg)	Relación (5 min)	Relación (4 h)	Relación (24 h)	Relación (4 días)	Relación (7 días)
anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2	6	1,98 ± 0,081	1,95 ± 0,008	1,65 ± 0,075	1,08 ± 0,029	0,874 ± 0,077
anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2	12	2,05 ± 0,080	2,00 ± 0,283	1,69 ± 0,030	1,06 ± 0,023	0,835 ± 0,100
anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2	18	2,34 ± 0,295	2,01 ± 0,072	1,63 ± 0,164	1,03 ± 0,030	0,835 ± 0,119

EJEMPLO 14: Parámetros farmacocinéticos de AADC anti-CD71 en *Macaca fascicularis*

[0535] Este ejemplo muestra los parámetros farmacocinéticos de anticuerpos activables anti-CD71 humano con toxinas conjugadas (AADC) de la presente divulgación en *Macaca fascicularis*.

[0536] Las concentraciones plasmáticas de anticuerpo activable total e intacto (anti-CD71 TF02.13-2011) se determinaron de la manera descrita en los Ejemplos 9 y 11. Como se muestra en la Tabla 8, la media de $C_{\text{máx}}$ para un analito dado se basó en la concentración plasmática observada máxima. La media de AUC_{0-7} se basó en el área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo de los días 0 a 7. Las estimaciones de semivida para el anticuerpo activable conjugado total, el anticuerpo activable conjugado intacto y la MMAE conjugada oscilaron entre 2,5 y 6,3 días. No se generaron estimaciones de semivida para MMAE no conjugada.

Tabla 8: Relación de fármaco con respecto a anticuerpo activable

Analito	Media de $C_{\text{máx}}$ (nM)			Media de AUC_{0-7} (día·nM)		
	18 mg/kg	12 mg/kg	6 mg/kg	18 mg/kg	12 mg/kg	6 mg/kg
Anticuerpo activable total	2610	1810	1060	5560	5490	2850
Anticuerpo activable intacto	2530	1190	1080	4804	4970	2520
MMAE conjugada	6090	3820	2090	12500	7850	4000
MMAE no conjugada	0,696	0,487	0,195	1680	1170	531

EJEMPLO 15: Ensayo de anticuerpos antifármaco

[0537] Este ejemplo describe el uso de un ensayo de puente para monitorear la formación de anticuerpos antifármaco (ADA) en los animales evaluados.

[0538] Se recolectaron muestras de plasma para el análisis de ADA antes del estudio y 7 días después de la segunda dosis. Se detectaron anticuerpos antifármaco en 3 de

los 9 animales que recibieron dosis en el estudio.

EJEMPLO 16: Citotoxicidad *in vitro* de anticuerpo activable conjugado anti-CD71

[0539] Este ejemplo describe ensayos de citotoxicidad *in vitro* en líneas celulares derivadas de tumores humanos de anticuerpos activables conjugados anti-CD71 intactos y activados de la presente divulgación en comparación con un ADC de control de isotipo.

[0540] Una actividad citotóxica *in vitro* de ejemplo del anticuerpo activable conjugado de la presente divulgación anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 (HC de SEQ ID NO: 167 y LC de SEQ ID NO: 169), con o sin pretratamiento con matriptasa, se evaluó y se comparó con un control de anticuerpo conjugado que no se fija a CD71 de isotipo (AB095-vcMMAE con DAR de 2, donde AB095 es específico para la toxina tetánica). La citotoxicidad de los artículos de prueba se evaluó en HT29 (línea celular de cáncer colorrectal humano), H292 (línea celular de cáncer de pulmón humano), H520 (línea celular de cáncer de pulmón humano) y HCC1806 (línea celular de cáncer de mama humano) al incubar cada artículo de prueba con cada línea celular durante 5 días y luego medir la viabilidad celular en un rango de concentraciones de cada artículo de prueba para determinar la EC50 para cada artículo de prueba. Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 9.

Tabla 9: Valores de EC50 para ensayos de citotoxicidad *in vitro* en células tumorales humanas

Artículo de prueba	HT29 EC ₅₀ (nM)	HCC1806 EC ₅₀ (nM)	H520 EC ₅₀ (nM)	H292 EC ₅₀ (nM)
anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2	≥50	≥50	≥50	≥50
anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2, activado por matriptasa	1,3	3,2	1,2	3,3
ADC de isotipo	Ninguna respuesta	>50	>50	>50

[0541] Estos resultados de ejemplo muestran que la citotoxicidad *in vitro* del anticuerpo activable conjugado anti-CD71 intacto fue similar a la del control de isotipo, pero se incrementó sustancialmente tras la activación por matriptasa.

EJEMPLO 17: Fijación de Fc y activación del complemento por anticuerpo activable conjugado anti-CD71

[0542] Este ejemplo demostró la capacidad de los anticuerpos activables conjugados anti-CD71 de la presente divulgación para mediar en mecanismos basados en la función efectora tales como la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

[0543] La porción de fragmento cristizable (Fc) de un anticuerpo IgG puede mediar una variedad de funciones, algunas de las cuales se producen mediante la fijación a los receptores Fc y C1q. Estas funciones incluyen la inducción de citocinas, la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) mediante la activación de la vía clásica del sistema del complemento, la fagocitosis y la homeostasis de anticuerpos a través del reciclaje de IgG. (Ravetch *et al.*, *Annu Rev Immunol.*, 2001;19:275-290; Roopenian *et al.*, *Nat Rev Immunol.* 2007;7:715-725).

[0544] La homeostasis de anticuerpos está regulada en parte por el receptor neonatal relacionado con Fc, FcRn, que está presente en las células epiteliales intestinales, las células endoteliales vasculares y las células presentadoras de antígenos profesionales. Intracelularmente, FcRn está presente en vesículas; en endosomas ácidos a pH bajo, puede fijarse a la porción Fc de una IgG que ha sido absorbida por pinocitosis. La IgG luego se libera cuando los endosomas se reciclan a la superficie celular como resultado de la exposición a pH neutro extracelular. Este proceso permite el control del tráfico de IgG a través de barreras epiteliales de una sola capa, y protege las moléculas de IgG del catabolismo, lo que extiende la semivida en suero de IgG. (Roopenian). De hecho, se ha demostrado que las mutaciones que mejoran la fijación de FcRn a pH bajo pero que mantienen una fijación baja a pH fisiológico tienen una semivida en suero más larga. (Hinton *et al.*, *J Biol Chem.* 2004;279:6213-6216; Hinton *et al.*, *J Immunol.* 2006;176:346-356).

[0545] El sistema FcγR humano está compuesto por receptores activadores (FcγRI, FcγRIIa y FcγRIIIa) e inhibidores (FcγRIIb). FcγRI, un receptor de IgG1 de alta afinidad, es expresado por células de linaje monocítico. (Li *et al.*, *J Immunol.* 2008;181:1012-1018) FcγRIIa es un receptor de IgG de baja afinidad más ampliamente expresado que se fija preferentemente a complejos inmunitarios. (Littaua *et al.*, *J Immunol.*, 1990;144:3183-3186) FcγRIIb se expresa principalmente en linaje monocítico y linfocitos B y es un receptor de IgG inhibidor de baja afinidad. Tras la fijación de FcγRIIb a los complejos de IgG, se bloquean todos los procesos dependientes de calcio, tales como desgranulación, fagocitosis, ADCC, liberación de citocinas y activación proinflamatoria. (Clynes *et al.*, *Nat. Med.*, 6:446-446 (2000); Minard-Colin *et al.*, *Blood*, 112:1205-1213 (2008); y Hamaguchi *et al.*, *J. Exp. Med.*, 203:743-753 (2006)). FcγRIIIa es un receptor de baja afinidad responsable de la actividad de ADCC de las células NK. (Ravetch) Para agregar a la diversidad de receptores Fcγ, existen variantes polimórficas de FcγRIIa (H131 vs. R131) y FcγRIIIa

(V158 vs. F158) que tienen diferencias en las afinidades para las moléculas de IgG. (Bruhns *et al.*, *Blood*, 2008;113:3716-3725).

[0546] La capacidad de los anticuerpos para mediar una variedad de funciones a través de FcγR o sistemas efectores del complemento permite la posibilidad de una farmacología exagerada no intencional en compuestos biológicos diseñados por ingeniería genética a base de IgG. La reactividad cruzada desconocida en los linfocitos de sangre periférica es capaz de desencadenar la reticulación de los receptores Fcγ. Debido a que las interacciones de reticulación de los receptores de Fcγ pueden mediar una variedad de funciones que incluyen la inducción de citocinas, ADCC y fagocitosis (Ravetch), es importante determinar la capacidad de los anticuerpos terapéuticos para fijarse a dianas no deseadas en sangre o tejidos.

Métodos: Ensayo de fijación a FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa y FcRn mediante resonancia de plasmones superficiales

[0547] Se capturaron FcγRII y FcγRIII humanos recombinantes mediante etiqueta 6xHis para evaluar su fijación a anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE, anti-CD71 Ab21.12 (IgG1/κ), AB095-MMAE-E2 y AB095 (IgG1/κ) mediante resonancia de plasmones superficiales (Biacore). Se inmovilizaron directamente anticuerpos anti-6xHis de ratón en un chip CM5 mediante acoplamiento de amina de acuerdo con el protocolo del fabricante a la densidad de 10000 RU. Se capturaron luego FcγR humanos en las células de flujo 2, 3 y 4 para alcanzar el nivel de captura de los FcγR de 250-500 RU. El flujo de célula 1 se utilizó como superficie de referencia. El amortiguador HBS-EP+ (GE, Healthcare) se usó como el amortiguador de corrida. Se inyectaron anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2, anti-CD71 Ab21.12 (IgG1/κ), AB095-MMAE-E2, AB095 (IgG1/κ), y trastuzumab (IgG1/κ) sobre todas las células de flujo a una velocidad de flujo de 50 μL/minuto durante uno o dos minutos (un minuto para FcγRIIb y FcγRIIa H131, y dos minutos para FcγRIIIa F158 y FcγRIIIa V158) a concentraciones que varían de 46,9 a 12000 nM para FcγRII y de 7,8 a 4000 nM para FcγRIII (dilución en serie de 2 veces para ambos), seguido de uno a cinco minutos de tiempo de disociación (un minuto para FcγRIIb, FcγRIIa H131 y cinco minutos para FcγRIIIa F158 y FcγRIIIa V158). Las superficies del chip se regeneraron con una inyección de HCl 100 mM a una velocidad de flujo de 100 μL/minuto durante dos segundos en las cuatro células de flujo. Se realizaron tres experimentos con el uso de tres chips CM5 diferentes para cada muestra (cada uno por duplicado) para tener en cuenta todos los tipos de error experimental (instrumento, superficie y operador). Se promediaron los resultados de estos tres experimentos.

[0548] Para el análisis de fijación a FcRn, anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2, anti-CD71 TF02.13-2011 (IgG1/k sin vc-MMAE), AB095-vcMMAE-E2 (un anticuerpo IgG1/k anti-toxoide tetánico humano monoclonal no específico que contenía MMAE con DAR enriquecida = 2), AB095 (un anticuerpo IgG1/k anti-toxoide tetánico humano monoclonal no específico) y trastuzumab (IgG1/k) se inmovilizaron directamente en un chip CM5 mediante acoplamiento de amina de acuerdo con el protocolo del fabricante a la densidad de 500 RU. Se inyectó Hu FcRn sobre todas las células de flujo a una velocidad de flujo de 50 µL/minuto durante un minuto a concentraciones que varían de 5,5 a 12000 nM (dilución en serie de 3 veces), seguido de un tiempo de disociación de dos minutos. Las superficies se regeneraron con una inyección de HCl 100 mM durante dos segundos seguido de HBS-EP+, pH 7,4. Se prepararon muestras y se las ejecutó en dos sistemas de amortiguador de corrida, MES-EP+ pH 6,0 y HBS-EP pH 7,4. Se realizaron tres experimentos con el uso de tres chips CM5 diferentes para cada muestra (cada uno por duplicado) para tener en cuenta los errores de instrumento, superficie y operador. Se promediaron los resultados de estos tres experimentos.

[0549] Todos los datos de FcγRIIIa V158 humano recombinante y los datos de FcγRIIIa F158 se ajustaron al modelo de ajuste de fijación 1:1 con R_{máx} local fija para tener en cuenta la variabilidad en los niveles de captura. Los datos de fijación a FcγRIIb, FcγRIIa H131 y FcRn humanos recombinantes se ajustaron a un modelo de afinidad en estado estacionario. Se usó el software de evaluación Biacore T200 versión 2,0 para ajustar todos los datos.

Resultados

[0550] Anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2 contiene un Fc de isotipo de IgG1/k humano. Se esperaba que se fijara a FcγRI, FcγIIa, FcγIIb, FcγIII, de manera consistente con otros anticuerpos IgG1/k de tipo silvestre. Se analizó la fijación de anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2 a FcγR mediante resonancia de plasmones superficiales, se analizaron un ELISA de fijación competitiva a FcγRI (resultados no mostrados) y ELISA de fijación competitiva a FcγRIII (resultados no mostrados), y la fijación de anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2 al complemento mediante ensayos de activación del complemento humano y de *Macaca fascicularis* funcionales (resultados no mostrados). Estos ensayos se compararon con anticuerpos humanos comerciales y generados internamente. Se usó material de trastuzumab, IgG1/k, anti-HER2 humano de grado clínico como control positivo para los ensayos de fijación a FcγR. Se sabe que los receptores Fc y el complemento se fijan a anticuerpos IgG1 de tipo silvestre. (Ravetch; Roopenian; Burton *et al.*, *Nature*. 1980;288:338-344; Hughes-

Jones *et al.*, *Mol Immunol.*, 1979;16:697-701; y Hezareh *et al.*, *J Virol.* 2001;75:12161-12168). La examinación de anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE reveló que se fijó a FcγRI, FcγIIa H131, FcγRIII y FcRn, aunque se observó una fijación modestamente reducida a FcγRIII (mediante SPR) en comparación con el control positivo, trastuzumab. La fijación de anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2 a FcγRIIb era demasiado débil para determinar porque caía por debajo del límite de detección del instrumento Biacore a $1,0 \times 10^{-5}$ K_d. (ver Tablas 10A y 10B).

Tabla 10A: Fijación de anticuerpo activable conjugado anti-CD71 a FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa mediante resonancia de plasmones superficiales

FcγR capturado	K _d (M)				
	Anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	Anti-CD71-TF02.13-2011 (IgG1/κ)	AB095-vcMMAE-E2	AB095 (IgG1/κ)	Trastuzumab
huFcγRIIb	Fijación demasiado débil para determinar	Fijación demasiado débil para determinar	Fijación demasiado débil para determinar	$7,2 \pm 1,2 \times 10^{-6}$	$8,6 \pm 1,4 \times 10^{-6}$
huFcγRIIIa H131	$6,2 \pm 2,3 \times 10^{-6}$	$4,7 \pm 0,5 \times 10^{-6}$	$2,9 \pm 0,3 \times 10^{-6}$	$2,1 \pm 0,1 \times 10^{-6}$	$3,8 \pm 0,2 \times 10^{-6}$
huFcγRIIIa F158	$2,1 \pm 0,3 \times 10^{-6}$	$1,8 \pm 0,1 \times 10^{-6}$	$8,9 \pm 0,6 \times 10^{-7}$	$1,5 \pm 0,1 \times 10^{-6}$	$7,5 \pm 0,9 \times 10^{-7}$
huFcγRIIIa V158	$2,0 \pm 0,4 \times 10^{-7}$	$1,8 \pm 0,2 \times 10^{-7}$	$1,2 \pm 0,2 \times 10^{-7}$	$1,6 \pm 0,8 \times 10^{-7}$	$8,5 \pm 1,3 \times 10^{-8}$

Tabla 10B: Resonancia de plasmones superficiales de FcRn humano

Artículo de prueba	K _d (M)	
	FcRn a pH 6,0	FcRn a pH 7,4
Anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	$5,3 \pm 0,3 \times 10^{-6}$	Sin fijación significativa
Anti-CD71-TF02.13-2011 (IgG1/κ)	$4,7 \pm 0,3 \times 10^{-6}$	Sin fijación significativa
AB095-vcMMAE-E2	$5,7 \pm 1,3 \times 10^{-6}$	Sin fijación significativa
AB095 (IgG1/κ)	$5,5 \pm 1,2 \times 10^{-6}$	Sin fijación significativa
Trastuzumab	$4,5 \pm 1,0 \times 10^{-6}$	Sin fijación significativa

[0551] Se evaluó la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) al evaluar la capacidad del anticuerpo activable conjugado anti-CD71 para activar el complemento de suero humano y de *Macaca fascicularis* a través de la captura de iC3b (humano) o C3 (*Macaca fascicularis*) mediante ELISA, para CDC.

[0552] Como se muestra en los resultados de ejemplo en la Figura 12, la fijación de los artículos de prueba indicados a las concentraciones indicadas a iC3b se muestra como un ensayo para la activación del complemento humano. Anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 se fijó a iC3b en un ensayo de activación del complemento tanto en suero humano como de *Macaca fascicularis*, pero en menor grado que el control positivo, el anticuerpo 7C6, que se utilizó en el ensayo de CDC. El anticuerpo 7C6,7

con las mutaciones indicadas se utilizó como control negativo. La fijación a iC3b de anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 también fue menor que su contraparte de anticuerpo activable no conjugado (anti-CD71-TF02.13-2011).

EJEMPLO 18: Liberación de citocinas en PBMC humanas

[0553] Este ejemplo mostró que aunque anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 no se fija a las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas o de *Macaca fascicularis*, los anticuerpos IgG1 son capaces de reticular receptores Fcγ en linfocitos de sangre periférica, lo que media una variedad de funciones que incluyen la inducción de citocinas.

[0554] Se evaluó la capacidad de anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 o anti-CD71-TF02.13-2011 para inducir la liberación de citocinas *in vitro* en PBMC humanas en un formato en fase soluble o sólida (fijada a placa) para las siguientes citocinas: interleucina (IL)-1β, IL 6, IL 2, interferón (IFN)γ y factor de necrosis tumoral alfa (TNFα). Para el experimento en fase sólida, se agregaron PBMC de 8 donantes humanos sanos a placas de polipropileno previamente recubiertas con 0,96 μg de artículo de prueba y se lavaron después de 1,5 horas. El sobrenadante se recolectó después de 48 horas para el análisis. Trastuzumab y un ADC de control de isotipo sin fijación, AB095-vcMMAE E2, se utilizaron como controles negativos. Se utilizaron tres controles positivos: anticuerpos estimulantes de linfocitos T, TGN1412 o visilizumab y linfocitos B, y lipopolisacárido (LPS) estimulante de células mieloides. En 1 de los 8 donantes evaluados, se observó una liberación sustancial de 3 de las 5 citocinas medidas, IL-1β, IL-6 y TNFα, en respuesta a tanto anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 como AB095-vcMMAE-E2. Se observó liberación de IL-6 y TNFα en 2 de 8 donantes adicionales en respuesta tanto a anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 como a AB095-vcMMAE E2. Se evaluaron tres donantes en el ensayo de presentación soluble, que fue un ensayo de presentación de alta densidad celular de 24 horas.

[0555] En este estudio, se midió la liberación de citocinas de PBMC de donantes humanos después de la estimulación con un prerecubrimiento de 0,96 μg/cavidad con anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 y anti-CD71-TF02.13-2011 (IgG1κ). Trastuzumab se usó como un anticuerpo de control negativo IgG1κ. AB095-vcMMAE-E2 y AB095 (IgG1κ) se usaron como anticuerpos de control de isotipo. Se agregaron TGN1412, visilizumab y lipopolisacárido (LPS) como controles positivos para la liberación de citocinas. Los valores en negrita y en recuadro resaltan el artículo de prueba que provocó una liberación de citocinas >2 veces la liberación mediante trastuzumab.

[0556] Como se muestra en los resultados de ejemplo en la Tabla 11, anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 no provocó liberación de citocinas por encima del nivel inducido por el control negativo trastuzumab. La liberación de citocinas también se evaluó en 3 donantes de *Macaca fascicularis* en el formato en fase sólida para las siguientes citocinas: IL-1 β , IL-6, IL-2, IFN γ , IL-8 e IL 10. Anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 provocó producción de IL-8 ligeramente por encima del nivel de fondo, según lo definido por trastuzumab, en 1 de los 3 donantes evaluados. En los estudios de toxicología de *Macaca fascicularis* sin GLP y GLP para anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2, no se observaron síntomas clínicos agudos representativos de la liberación de citocinas a ningún nivel de dosis.

Tabla 11: Liberación de citocinas de PBMC humanas en respuesta a anticuerpos activables conjugados anti-CD71 en fase sólida y otros artículos de prueba

pg/mL de citocina enumerada por el donante N.º								
Donante N.º:	32150	32151	32289	32165	32314	32147	32156	32169
IL-1β								
anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	735	89	39	77	4	96	5594	493
anti-CD71-TF02.13-2011 (IgG1 κ)	294	90	40	64	6	111	4088	299
AB095-vcMMAE-E2	49	24	7	68	0	51	2704	141
AB095 (IgG1 κ)	121	44	10	8	1	72	70	50
Amortiguador	1	0	0	0	0	0	0	0
Trastuzumab	570	111	29	14	2	103	381	525
TGN1412	288	208	148	128	58	875	104	200
Visilizumab	439	231	616	465	270	172	61	35
LPS	3007	1570	1994	803	2272	0	0	0
IL-6								
anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	2022	176	110	102	8	71	>10000	1182
anti-CD71-TF02.13-2011 (IgG1 κ)	763	160	116	111	15	83	>10000	1213
AB095-vcMMAE-E2	278	59	37	103	5	78	9781	423
AB095 (IgG1 κ)	195	63	42	19	2	37	305	132
Amortiguador	15	1	1	0	1	1	1	8
Trastuzumab	1262	119	60	23	3	33	2776	879
TGN1412	655	521	296	214	207	151	208	248
Visilizumab	292	103	253	76	291	397	234	202
LPS	9668	9244	>10000	5655	>10000	1	1	10
TNFα								
anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	3741	497	583	2110	133	2830	8581	3854
anti-CD71-TF02.13-2011 (IgG1 κ)	3438	693	881	1425	114	1554	5163	2309
AB095-vcMMAE-E2	1660	568	296	1458	51	1221	4815	815
AB095 (IgG1 κ)	3703	634	349	443	50	1906	664	658
Amortiguador	93	0	1	0	1	0	2	15
Trastuzumab	5276	931	506	553	70	1131	2180	3701
TGN1412	>10000	9651	8913	>10000	>10000	>10000	9126	>10000
Visilizumab	>10000	6593	>10000	>10000	>10000	>10000	3157	1642
LPS	470	308	293	322	257	2	0	12
IFNγ								
anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	1950	19	3	12	7	349	354	52
anti-CD71-TF02.13-2011 (IgG1 κ)	7099	44	8	10	2	129	139	245
AB095-vcMMAE-E2	6119	35	4	4	1	161	53	14
AB095 (IgG1 κ)	>10000	125	13	14	3	433	30	33
Amortiguador	26	0	2	1	0	0	0	8
Trastuzumab	9173	59	6	7	1	300	58	4100
TGN1412	>10000	>10000	>10000	>10000	3488	>10000	8685	>10000
Visilizumab	>10000	6159	7957	>10000	7965	>10000	2048	873
LPS	376	607	30	7	29	0	0	14
IL-2								
anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	145	4	3	3	3	2	3	3
anti-CD71-TF02.13-2011 (IgG1 κ)	217	2	3	5	1	1	3	13
AB095-vcMMAE-E2	126	2	3	2	1	1	8	2
AB095 (IgG1 κ)	301	8	3	4	2	1	5	3
Amortiguador	447	6	8	30	7	2	24	33
Trastuzumab	262	5	4	8	1	2	3	12
TGN1412	>10000	8485	9018	8223	>10000	821	636	1318
Visilizumab	396	459	1863	609	4643	>10000	1517	1038
LPS	78	3	6	4	4	7	15	34

EJEMPLO 19: Eficacia antitumoral de AADC anti-CD71 en el modelo de xenoinjerto SW-48 de ratón

[0557] Este ejemplo muestra la eficacia del anticuerpo activado conjugado anti-CD71 de la presente divulgación en un modelo de xenoinjerto de tumor de ratón, con células SW-48 (cáncer colorrectal humano).

[0558] En este estudio de ejemplo, se administraron inyecciones intraperitoneales únicas de anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 (AADC) a las dosis indicadas a grupos de 8 ratones, y se observó la media de volumen tumoral con el tiempo. Como se muestra en la Figura 13 y la Tabla 12, se observó un rango de inhibición del crecimiento total (TGI) a los 23 días en comparación con el control de vehículo en todas las dosis, con una regresión tumoral completa observada a las dosis de 6 y 12 mg/kg.

Tabla 12: Inhibición del crecimiento tumoral de xenoinjerto después del tratamiento con AADC anti-CD71

Dosis de AADC (mg/kg)	TGI (%)	TGD (%)	PR (%)	CR (%)	TR (%)
0,75	35	21	0	0	0
1,5	66	71	0	0	0
3	96	>521	12,5	50	62,5
6	100	>521	0	100	100
12	100	>521	0	100	100

CR = respuesta completa; PR = respuesta parcial; TGI = inhibición del crecimiento tumoral; TGD = retraso del crecimiento tumoral; TR = respuesta total.

EJEMPLO 20: Eficacia antitumoral de AADC anti-CD71 en el modelo de PDX DLBCL de ratón

[0559] Este ejemplo muestra la eficacia del anticuerpo activado conjugado anti-CD71 de la presente divulgación en cinco (5) modelos de xenoinjerto derivado de paciente (PDX) con tumor de ratón, con linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL) derivado de paciente HuPrime en ratones SCID o NOG hembra.

[0560] En este estudio de ejemplo, se establecieron grupos de 3 ratones con tumores subcutáneos (100 - 200 mm³) y se les administraron 6 mg/kg de anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 (AADC) o un control de vehículo en los días 0 y 7. Como se muestra en los resultados de ejemplo de la Figura 14, el artículo de prueba AADC logró >100 % de TGI en 4 de 5 modelos y 72 % de TFI en 1 modelo en comparación con el grupo de control de vehículo. Se observaron respuestas completas (es decir, ausencia de tumor medible al finalizar el estudio) en los modelos administrados con el

AADC en 2 de 3 ratones para LY2345, 3 de 3 ratones para el modelo LY6933, 2 de 3 ratones para el modelo LY6934 y 2 o 3 ratones para el modelo LY2318. No se observaron respuestas completas para el modelo LY3604. Estos resultados de ejemplo demuestran que el AADC de la presente divulgación demostró eficacia, hasta respuestas completas en algunos modelos.

EJEMPLO 21: Eficacia antitumoral de AADC anti-CD71 en modelos de PDX TumorGraft de ratón

[0561] Este ejemplo muestra la eficacia del anticuerpo activado conjugado anti-CD71 de la presente divulgación en nueve (9) modelos de xenoinjerto derivado de paciente (PDX) con tumor de ratón, con cáncer de mama humano derivado de paciente TumorGraft (CTG-0437, CTG-0869, CTG -1059), cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPNM) (CTG-1082, CTG-0860, CTG-0160, CTG-1012) y carcinoma de células pequeñas de cabeza y cuello (HNSCC) (CTG-1140, CTG-1082) en ratones lampiños.

[0562] En este estudio de ejemplo, se establecieron grupos de 3 ratones para cada modelo de PDX con tumores subcutáneos (150 - 300 mm³) y se les administraron 6 mg/kg de anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 (AADC) o un control de vehículo en los días 0 y 7. Como se muestra en los resultados de ejemplo de las Figuras 15A, 15B y 15C, el artículo de prueba AADC logró >100 % de inhibición del crecimiento tumoral (TGI) en 6 de 9 modelos en las tres indicaciones de cáncer. En estos 6 modelos en los que se observó >100 % de TGI, 6 de 18 ratones que recibieron el AADC lograron una respuesta completa (es decir, ausencia de tumor medible al finalizar el estudio). En 2 modelos adicionales, se observó 92 % y 78 % de TGI para HNSCC y NSCLC, respectivamente. Un modelo de NSCLC no respondió al AADC. Como se muestra en estos resultados de ejemplo, el AADC de la presente divulgación demostró eficacia, incluso respuestas completas en algunos casos, en modelos de PDX derivados de una variedad de tipos de cáncer humanos.

EJEMPLO 22: Eficacia antitumoral de AADC anti-CD71 en el modelo de PDX de páncreas HuPrime de ratón

[0563] Este ejemplo muestra la eficacia del anticuerpo activado conjugado anti-CD71 de la presente divulgación en un modelo de xenoinjerto derivado de paciente (PDX) de ratón, con cáncer de páncreas humano derivado de paciente HuPrime (PA6237) en ratones SCID.

[0564] En este estudio de ejemplo, se estableció un grupo de 3 ratones con tumores subcutáneos (100 - 200 mm³) y se le administraron 3 o 6 mg/kg de anti-CD71-

TF02.13-2011-vcMMAE E2 (AADC) o un control de vehículo en los días 0 y 7. Como se muestra en los resultados de ejemplo de la Figura 16, el artículo de prueba AADC logró >100 % de inhibición del crecimiento tumoral (TGI) a 3 y 6 mg/kg. En este grupo de 6 mg/kg, se observaron 3 de 3 respuestas completas hasta el día 59, mientras que el grupo de 3 mg/kg mantuvo la respuesta completa hasta el día 31, seguido de un nuevo crecimiento tumoral.

EJEMPLO 23: Estudios de toxicidad piloto no GLP de anticuerpo activable conjugado anti-CD71

[0565] Este ejemplo muestra las toxicidades relativas del anticuerpo activable conjugado anti-CD71 (AADC) anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 de la presente divulgación a niveles de dosis que varían de 6 a 18 mg/kg con respecto a anticuerpos conjugados anti-CD71 (ADC) Ab21.12-vcMMAE E2 a niveles de dosis que varían de 0,6 a 6 mg/kg en *Macaca fascicularis* (1-2 monos por sexo por grupo) después de la inyección intravenosa de bolo una vez cada 3 semanas (Q3W) o una vez cada 2 semanas (Q2W). Se realizaron necropsias terminales en los animales de prueba el día 29 (7 días después de la última dosis). Las evaluaciones durante el estudio incluyeron signos clínicos, peso corporal, consumo de alimentos, patología clínica, patología anatómica, TK e inmunogenicidad. En la Tabla 13 se muestra un resumen del estudio de toxicidad piloto.

Tabla 13: Estudio de toxicidad piloto no GLP en *Macaca fascicularis*

Artículo de prueba	Nivel de la dosis (mg/kg)	Relación fármaco-proteína	Día de dosis	Macho/hembra
anti-CD71-TF02.13-3011-vcMMAE	6	2,7	1 (sin 2.ª dosis)	1/1
anti-CD71-TF02.13-3011-vcMMAE	3	2,7	1, 22	1/1
anti-CD71-TF01-3011-vcMMAE	6	2,9	1, 22	1/1
anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE	6	2,9	1, 22	1/1
anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	12	2,0	1, 22	1/1

Artículo de prueba	Nivel de la dosis (mg/kg)	Relación fármaco-proteína	Día de dosis/necropsia	Macho/hembra
Control de vehículo	0	N/A	1, 22 / 29	2/1
anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	6	2,0	1, 22 / 29	2/1
anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	12	2,0	1, 22 / 29	2/1
anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	18	2,0	1 / 22 (sin 2.ª dosis)	2/1
anti-CD71-TF02.13-3011-vcMMAE E2	9	2,0	1, 22 / 29	1/1
anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	8	2,0	1, 15 / 50	1/1
Ab21.12-vcMMAE E2	6	2,0	1 / 10 (sin 2.ª dosis)	1/0
Ab21.12-vcMMAE E2	2	2,0	1 (sin 2.ª dosis)	0/1
Ab21.12-vcMMAE E2	0,6	2,0	1, 22 / 29	1/1

[0566] Se observó toxicidad grave manifestada por postura encorvada, disminución de la actividad y elevación de la temperatura corporal en grupos que recibieron una dosis alta de CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 (18 mg/kg), dosis frecuentes de CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 (dosis en los días 1 y 15), o el conjugado fármaco-anticuerpo anti-CD71 parental no enmascarado (ADC) (Ab21.12-vcMMAE E2) a 6 y 2 mg/kg. Cuando se pudo establecer una causa de muerte, se determinó que era una infección secundaria a la supresión inmunitaria relacionada con el fármaco.

[0567] Los resultados relacionados con el artículo de prueba fueron similares para CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 y Ab21.12-vcMMAE E2 y consistieron principalmente en toxicidad hematológica. Los hallazgos clave incluyeron (1) se observó mortalidad atribuida a infección secundaria en grupos que recibieron una dosis única de CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 a 18 mg/kg, CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 en los días 1 y 15 a 8 mg/kg, o una dosis única del ADC (Ab21.12-vcMMAE E2) a ≥ 2 mg/kg, (2) disminución del peso corporal 2 semanas después de la dosis, con recuperación a las 3 semanas después de la dosis a ≥ 12 mg/kg de CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2, (3) disminuciones dependientes de la dosis en la masa de glóbulos rojos y todas las poblaciones de leucocitos con recuperación parcial a completa observada 3 semanas después de la dosis, (4) aumento transitorio de los niveles de plaquetas 2 semanas después de la dosis, (5) aumentos leves a moderados de fibrinógeno, disminución de la albúmina y aumento de la globulina, (6) disminuciones leves a moderadas de la médula ósea, el bazo y la celularidad tímica, con reducciones correspondientes de peso en el timo y el bazo. También se observó

una disminución de la celularidad en varios tejidos linfoides.

[0568] En este estudio de ejemplo, las dosis más altas toleradas de CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 y Ab21.12-vcMMAE E2 (el ADC correspondiente) en estos estudios fueron de 12 mg/kg y 0,6 mg/kg, respectivamente, administradas una vez cada 3 semanas por 2 dosis.

EJEMPLO 24: Estudios de toxicidad GLP de anticuerpo activable conjugado anti-CD71

[0569] Este ejemplo muestra un estudio de toxicidad de dosis repetidas de GLP en *Macaca fascicularis* del anticuerpo activable conjugado anti-CD71 (AADC) anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 de la presente divulgación a niveles de dosis de 0, 2, 6 o 12 mg/kg en los días 1 y 22 mediante inyección intravenosa de bolo. Los grupos de dosis se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14: Estudio de toxicidad GLP en *Macaca fascicularis*

Artículo de prueba	Nivel de la dosis (mg/kg)	Relación fármaco-proteína	Día de dosis	Macho/hembra
Vehículo	0	N/A	1, 22	6/6
anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	2	2,0	1, 22	6/6
anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	6	2,0	1, 22	6/6
anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	12	2,0	1 (sin dosis) 2. ^a	6/6

[0570] En este estudio de ejemplo, cada grupo de 6 monos machos y 6 hembras recibieron dosis de anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 o vehículo (bolo IV de la dosis indicada en los días 1 y 22) como se muestra en la Tabla 14. Se realizaron necropsias terminales el día 29 y se realizaron necropsias de recuperación el día 64. Las evaluaciones de toxicidad incluyeron mortalidad, signos clínicos, cambios en el peso corporal, consumo de alimentos, patología clínica, patología anatómica, exámenes de oftalmología y evaluaciones de las funciones cardiovascular, respiratoria y del sistema nervioso central. El estudio incluyó análisis TK y una evaluación de la formación de ADA. Se hicieron las siguientes observaciones de ejemplo. Un resumen de los resultados seleccionados del estudio de toxicidad GLP de anti-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE E2, que tiene una DAR de ~2, en comparación con los correspondientes estudios no GLP de un conjugado fármaco-anticuerpo (ADC) anti-CD71 no enmascarado Ab21.12-vcMMAE E2 (que también tiene una DAR de ~2), se resume en la Tabla 15.

Tabla 15: Resultados de estudio de toxicidad piloto GLP en *Macaca fascicularis*

Artículo de prueba (q3wx2)	Nivel de la dosis (mg/kg)	Pérdida de peso corporal	Recuento de neutrófilos promedio $\pm$ SD	Tolerabilidad
anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	12	0 %	61 $\pm$ 44	No tolerado
anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	6	0 %	277 $\pm$ 132	Tolerado
Ab21.12-vcMMAE E2	2	6 %	70	No tolerado
Ab21.12-vcMMAE E2	0,6	4 %	280 $\pm$ 42	Tolerado

[0571] No hubo efectos relacionados con el AADC sobre el peso corporal, el consumo de alimentos, la frecuencia respiratoria, la electrocardiografía, la coagulación y los parámetros de análisis de orina, ni hubo efectos neurológicos, efectos oculares o hallazgos de patología macroscópica.

[0572] La mortalidad relacionada con el AADC se observó a dosis de 12 mg/kg; 1 hembra fue encontrada muerta el día 10 y 2 hembras se sometieron a eutanasia el día 11 en condición clínica decadente. La patología clínica relacionada con el AADC y los hallazgos microscópicos en estos animales fueron similares a los presentes en los animales que sobrevivieron a la necropsia programada (día 29), con la excepción de la evidencia microscópica de infección bacteriana, que se consideró una consecuencia de la inmunosupresión relacionada con el AADC.

[0573] Como se muestra en la Tabla 15, el anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 demostró una tolerabilidad superior con respecto a Ab21.12-vcMMAE E2 sin pérdida detectable de peso corporal. Como se muestra, Ab21.12-vcMMAE E2 carecía de tolerabilidad dentro de los 8 días de una dosis única a 2 mpk, mientras que anti-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 proporcionó una protección ≥ 10 veces sobre el Ab21.12-vcMMAE E2 no enmascarado.

[0574] Los signos clínicos relacionados con el AADC en animales con dosis de 12 mg/kg que sobrevivieron hasta la necropsia programada fueron lesiones/heridas cutáneas consistentes con la infección que se correlacionó con la disminución de las poblaciones de leucocitos y signos de respuesta de fase aguda (disminución de la albúmina y el colesterol y aumento de las globulinas, bilirrubina total y triglicéridos).

[0575] Los cambios en los parámetros de hematología a ≥ 6 mg/kg después de la primera dosis consistieron en disminuciones en la masa de glóbulos rojos, reticulocitos y todos los subconjuntos de leucocitos, junto con aumentos en las plaquetas. Los cambios en la hematología a 2 mg/kg se limitaron a un leve aumento de plaquetas

después de la primera y segunda dosis.

[0576] El cambio relacionado con el AADC en los parámetros de química clínica después de la primera dosis fue más notable a 12 mg/kg y consistió en una respuesta de fase aguda (disminución de albúmina y colesterol, y aumento de globulinas, triglicéridos [solo hembras], bilirrubina total) y aumento de nitrógeno ureico (solo individuos) y creatinina, y disminución de fósforo. Solo se observaron cambios en la química clínica a 6 mg/kg después de la primera dosis y se limitaron a un aumento mínimo de la bilirrubina y a un aumento de las globulinas en hembras individuales.

[0577] Los hallazgos de química clínica y hematológicos relacionados con el AADC se recuperaron al final de la fase de recuperación.

[0578] Los hallazgos microscópicos relacionados con el AADC en la eutanasia terminal estaban presentes en el timo, la glándula suprarrenal y la médula ósea a ≥ 6 mg/kg/dosis. Se observaron hallazgos en el sitio de inyección en todos los grupos, y se interpreta que están relacionados con el procedimiento de administración y no específicamente con el AADC. Los pesos tímicos disminuyeron en monos machos a los que se les administraron 12 mg/kg y monos hembras a los que se les administraron 6 mg/kg, lo que se correlacionó histológicamente con una disminución de la celularidad, particularmente de la corteza tímica. Los pesos de las glándulas suprarrenales aumentaron en monos machos a los que se les administraron 12 mg/kg y monos hembras a los que se les administraron 6 mg/kg y el correlato histológico fue hipertrofia corticosuprarrenal. La disminución de la celularidad estaba presente en la médula ósea, específicamente en el fémur, en monos machos que recibieron dosis con ≥ 6 mg/kg. Después de un intervalo de 6 semanas sin dosis, la disminución de la celularidad del timo y la hipertrofia corticosuprarrenal no estaban presentes, lo que es consistente con la recuperación completa de estos cambios. El aumento de la celularidad de la médula ósea persistió pero con una gravedad disminuida, consistente con una recuperación parcial.

EJEMPLO 25: Conjugación de MMAE con el anticuerpo activable contra CD71 y métodos para reducir la DAR del anticuerpo activado conjugado contra CD71 resultante a una DAR de alrededor de 3

[0579] Este ejemplo describe los métodos que se usaron para conjugar vc-MMAE con el anticuerpo activable anti-CD71, anti-CD71 TF02.13-2011, para crear anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE que contenía una carga de fármaco de 2 moléculas de MMAE por cada molécula TF02.13-2011 anti-CD71, además de los métodos utilizados para enriquecer la DAR a alrededor de 3.

Método de conjugación

[0580] Anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE enriquecido con E2: A una solución de anti-CD71 TF02.13-2011 (13,95 mg/mL, solución de 39 g, 544 mg, 3,5 nmol) se le agregaron EDTA 0,5 M (0,39 mL) y TCEP (0,77 mL, 10 mM en WFI, 7,7 nmol, 2,2 equivalentes) a 2-8 °C durante la noche. El anticuerpo reducido luego se diluyó con DMSO (2,29 mL), se trató con vcMMAE en DMSO (1,89 mL de vcMMAE 9,49 mM en DMSO, 17,9 nmol, 5,1 equivalentes) a temperatura ambiente durante 1 h. El anticuerpo conjugado se trató con N-acetilcisteína (0,29 mL de 100 mM en WFI, 29 nmol, 8,2 equivalentes) para inactivar el exceso de vcMMAE. La solución inactivada se analizó mediante HIC (cromatografía de interacción hidrófoba) para especies de DAR > E4 (especies de DAR mayor, 20,9 % en la preparación anterior).

Método para enriquecer hasta DAR menor

[0581] La reacción de conjugación se suspendió con resina de HIC, como las disponibles en el comercio a través de Tosoh Biosciences (alquilo Toyopearl como ejemplo) en porciones a temperatura ambiente durante 2 h para reducir las especies de DAR más alta a un nivel diana (generalmente <2 %). La solución tratada se filtró y la resina se lavó sucesivamente con PBSE (fosfato de potasio 125 mM, NaCl 150 mM, EDTA 6,3 mM, pH 7,2, 22 g) seguido de PBS (fosfato de potasio 5 mM, NaCl 200 mM, pH 7, 35 g). El filtrado y los enjuagues combinados se concentraron y se sometieron a intercambio de amortiguador mediante un filtro centrífugo de corte de 30 K_d de peso molecular y luego se diluyeron con componentes de formulación para el almacenamiento.

[0582] El producto resultante contenía 228 mg (A280 6,5 mg/mL) y se demostró que tenía una DAR de alrededor de 2,9 medida a partir de una columna de HIC disponible en el comercio y que constituía las siguientes características y especies de DAR: SEC 98,7 % de monómero, 0,2 % de peso molecular más alto, 1,1 % de peso molecular más bajo, endotoxina <0,06 EU/mg, las especies de DAR más alta que E4 tenían menos de 2 % de área; DAR E0 tenía alrededor de 6,2 % de área, DAR E2 tenía alrededor de 40,7 % de área, y DAR E4 tenía alrededor de 46,8 % de área).

[0583] En los ejemplos descritos en la presente, este producto de DAR enriquecido se denomina “anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE (que tiene una DAR promedio de ~3)”

EJEMPLO 26: Conjugación de MMAE con el anticuerpo activable CD71 y métodos para enriquecer la DAR del anticuerpo activado conjugado CD71 resultante a una DAR de alrededor de 2 (“E2”)

[0584] Este ejemplo describe los métodos que se usaron para conjugar vc-MMAE con

el anticuerpo activable anti-CD71, anti-CD71 TF02.13-2011, para crear anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE que contiene una carga de fármaco de 2 moléculas de MMAE por cada molécula TF02.13-2011 anti-CD71, además de los métodos utilizados para enriquecer la DAR a alrededor de 2.

Método de conjugación

[0585] Anti-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2: Una solución de anti-CD71 TF02.13-2011 (20,3 mg/mL) se diluyó con 1457 g de PBSE (fosfato de potasio 125 mM, NaCl 150 mM, 6,3 mM EDTA, pH 7,7) y se enfrió hasta 4 °C. A la solución enfriada se le agregó TCEP (10 mM en WFI, 30,2 mL, 0,30 mmol, 1,5 equivalentes) y se mantuvo a 4 °C durante 15 horas. Al anticuerpo reducido se le agregó una solución de vc-MMAE (1,056 g, 0,80 mmol, 4 equivalentes) en DMSO (300 g) con enfriamiento seguido de un enjuague con DMSO (65 g), después de lo cual la solución se dejó calentar hasta temperatura ambiente. Después de 3,5 h, se agregó N-acetilcisteína (0,262 g, 1,60 mmol, 8 equivalentes) para inactivar el exceso de vc-MMAE y la mezcla de reacción se almacenó a 2-8 °C hasta la purificación.

Método para enriquecer hasta DAR menor

[0586] El producto se purificó en porciones en columnas de purificación de HIC disponibles en el comercio como las disponibles en el comercio a través de GE Life Sciences (alquilo Sepharose) con un gradiente de amortiguadores de sulfato de amonio/fosfato a pH 7,1 con monitoreo a 280 nm por UV. El grupo de productos de DAR 2 recolectados (aproximadamente 9,5 g, 30 % de rendimiento) se sometió a intercambio de amortiguador con amortiguador a pH 6,0 mediante TFF con membranas Pellicon 3 Ultracel 30 K_d y luego se diluyó con componentes de formulación para el almacenamiento.

[0587] El producto resultante (A280 6,4 mg/mL) se demostró que tenía una DAR de alrededor de 2 medida a partir de una columna de HIC disponible en el comercio y que constituía las siguientes características y especies de DAR: SEC 99,6 % de monómero, 0,2 % HMW, 0,2 % LMW, endotoxina <0,06 EU/mg y DAR E2 tenía alrededor de 99,0 % de área, con variabilidad de ejecución a ejecución entre 94 a 99 % de DAR E2.

[0588] En los ejemplos descritos en la presente, este producto de DAR 2 enriquecido ("E2") se denomina "anti-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE E2".

EJEMPLO 27: Evaluación de las características biofísicas de E2 en comparación con especies de DAR mayor en modelos murinos preclínicos

[0589] El producto conjugado no purificado con HIC obtenido a partir del método

descrito en el Ejemplo 25 se ejecutó sobre una columna de HIC con amortiguadores y procedimientos estándar como se describe en la presente. Como se muestra en la Figura 18A, se identificaron varias especies con una carga de fármaco entre 0 y 8.

[0590] El producto E2 purificado obtenido a partir del Ejemplo 26 se sometió a la misma cromatografía HIC. Como se muestra en la Figura 18B, solo se observó una sola especie que contenía una carga de fármaco de 2.

[0591] Los productos no purificados y E2 se radioetiquetaron y se inyectaron en ratones para evaluar la depuración y toxicidad general de cada producto. Como se muestra en la Figura 18C, se demostró que el producto E2 purificado tenía una depuración significativamente menor en relación con el producto no purificado con alta carga de fármaco.

OTRAS FORMAS DE REALIZACIÓN

[0592] Aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de esta, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que está definido por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

RESUMEN

La invención se refiere en general a anticuerpos activables conjugados que se fijan a CD71 en su forma activa y a métodos para elaborar y usar estos anticuerpos activables conjugados anti-CD71 en una variedad de indicaciones terapéuticas, de diagnóstico y profilácticas.

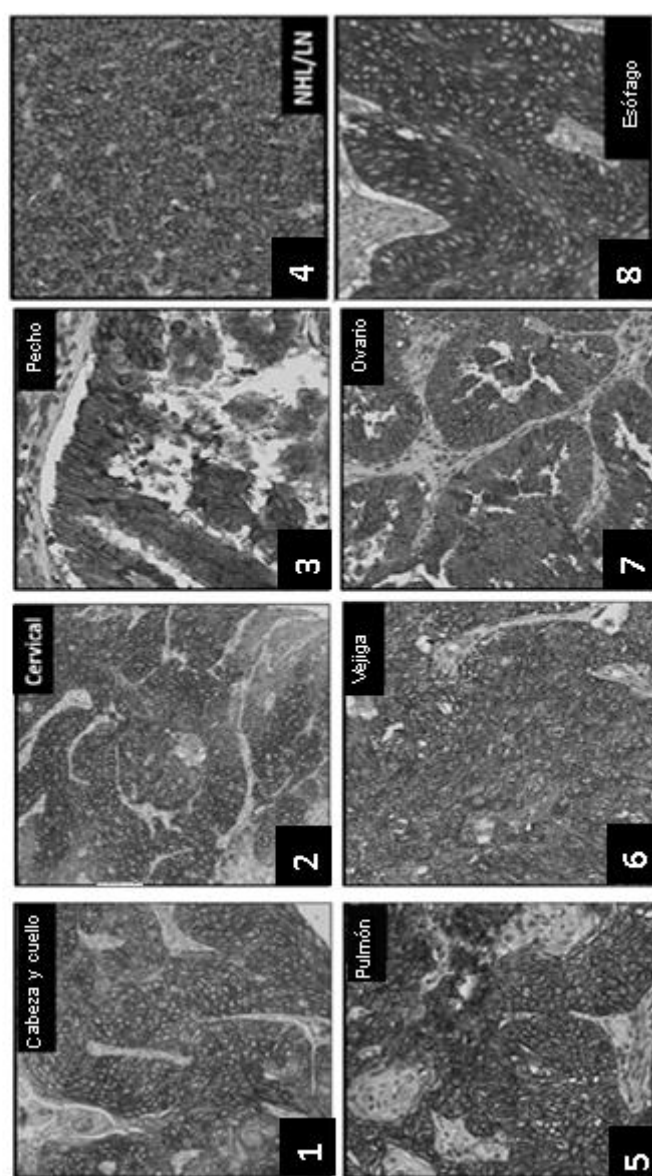
FIG. 1

FIG. 2

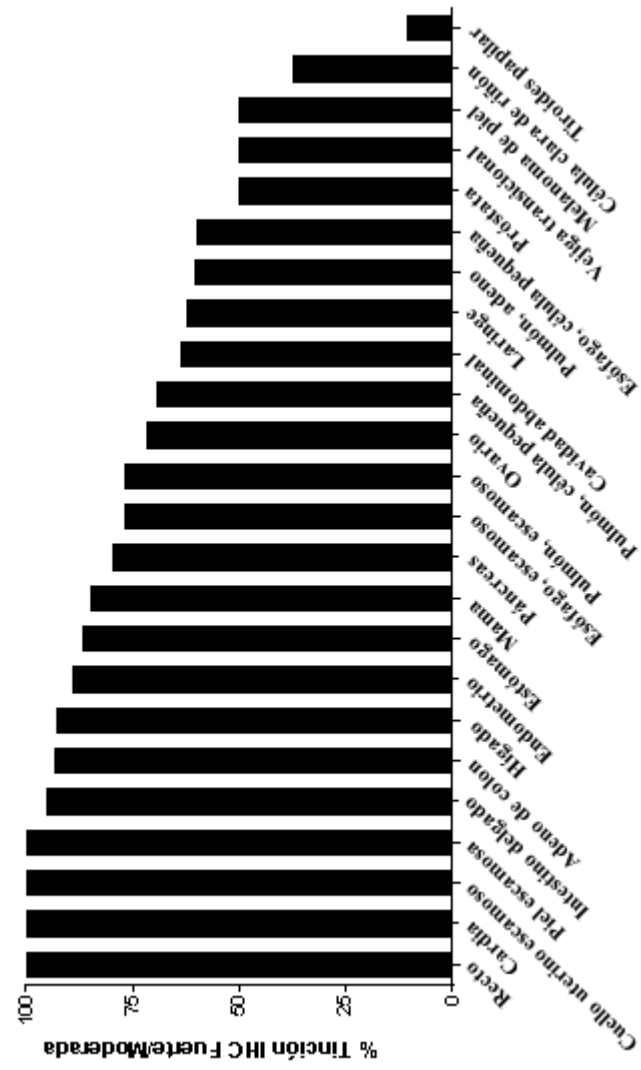
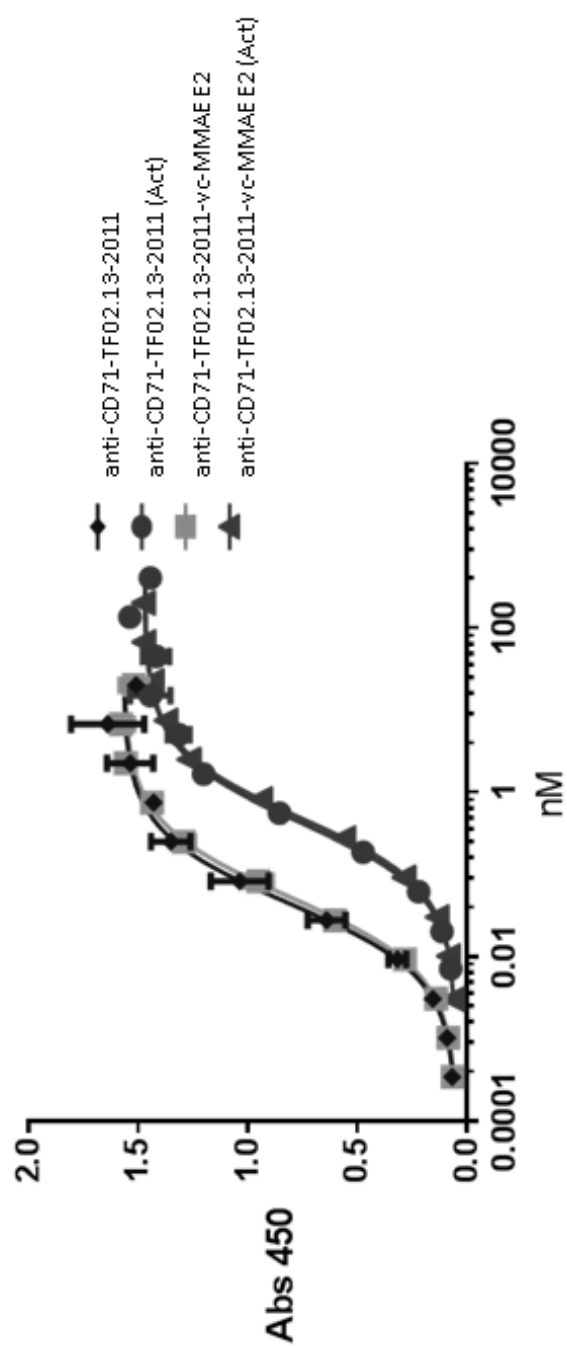


FIG. 3A



Fijación a CD71 humano recombinante

FIG. 3B

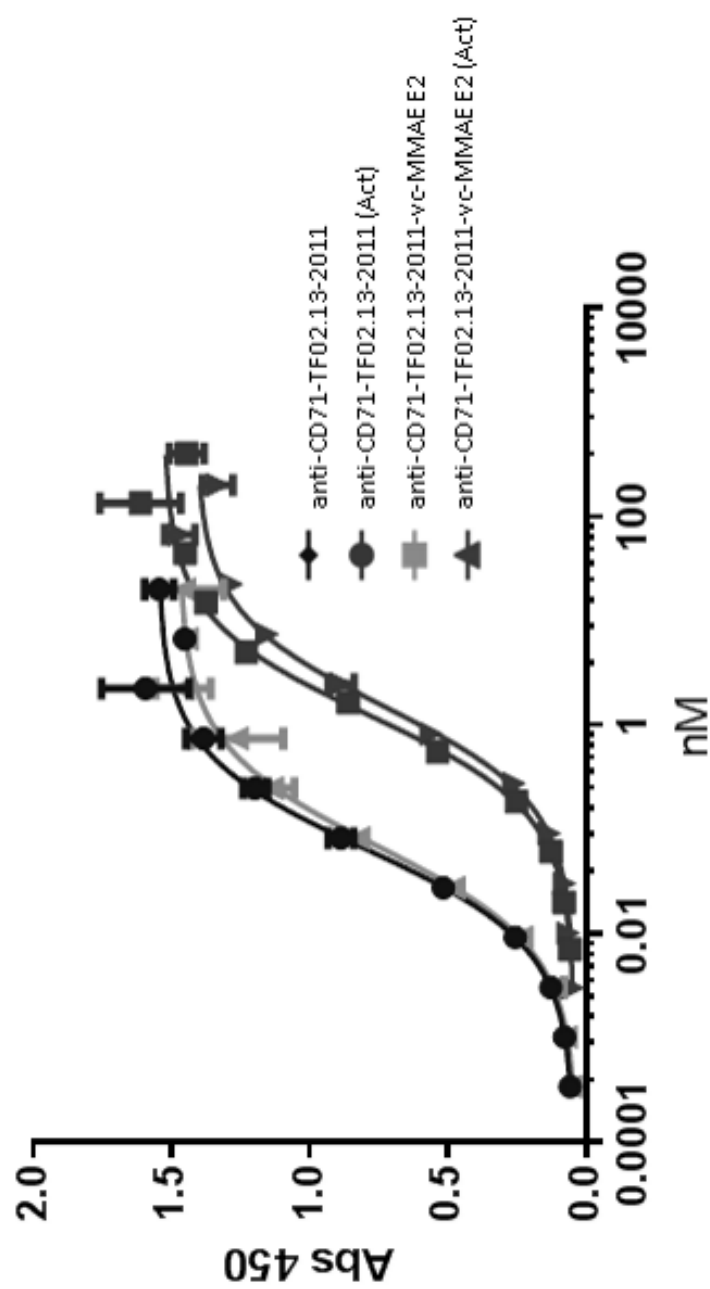
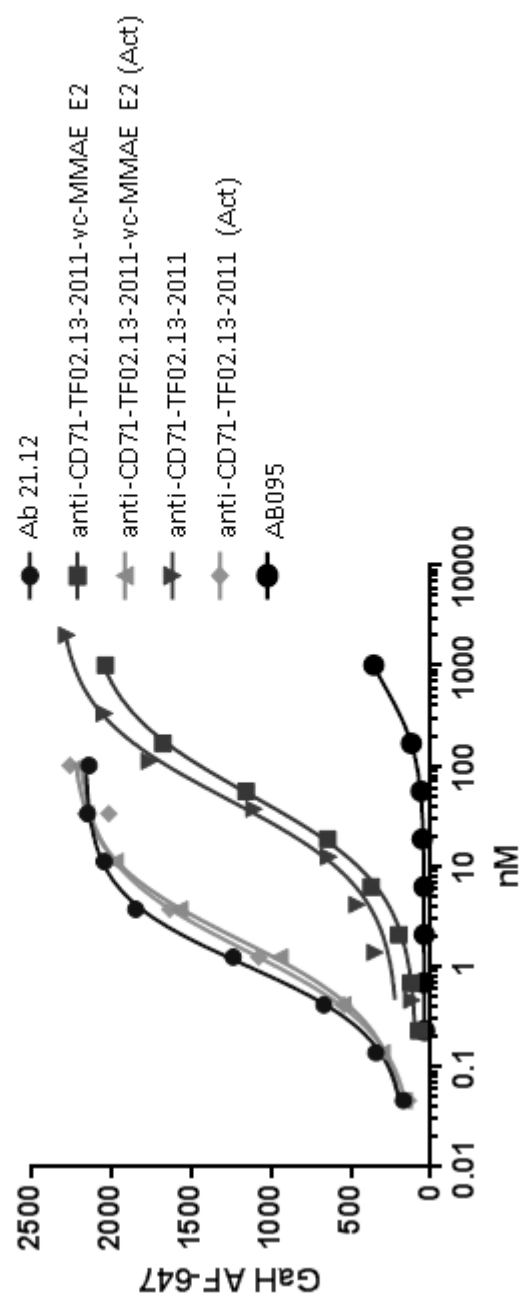
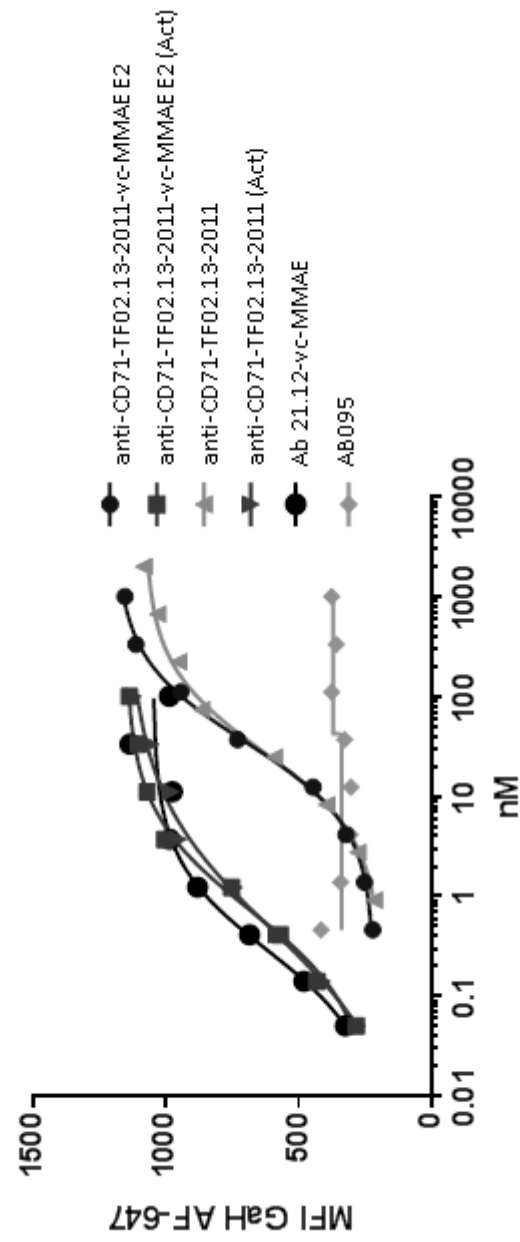
Fijación a CD71 de *Macaca fascicularis* recombinante

FIG. 3C



Fijación a CD71 humano (H292)

FIG. 3D



Fijación a CD71 *Macaca fascicularis* (CHO que expresa
CD71 de *Macaca fascicularis*)

FIG. 4A

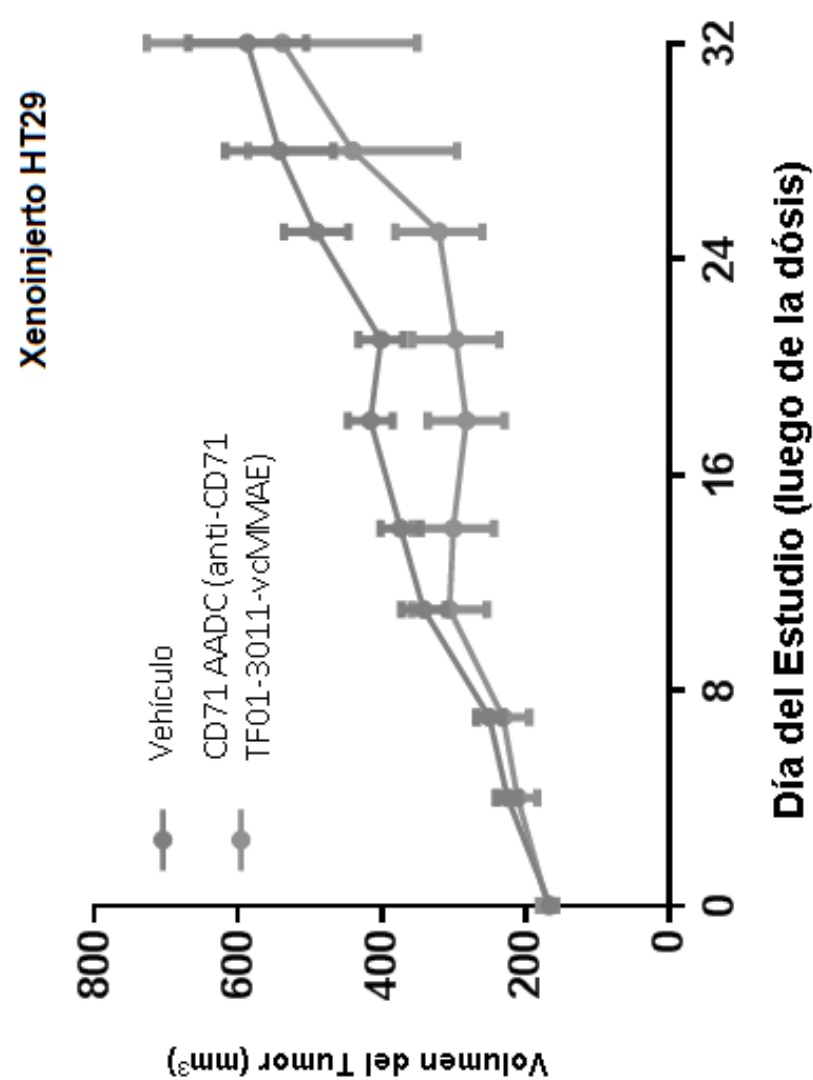


FIG. 4B

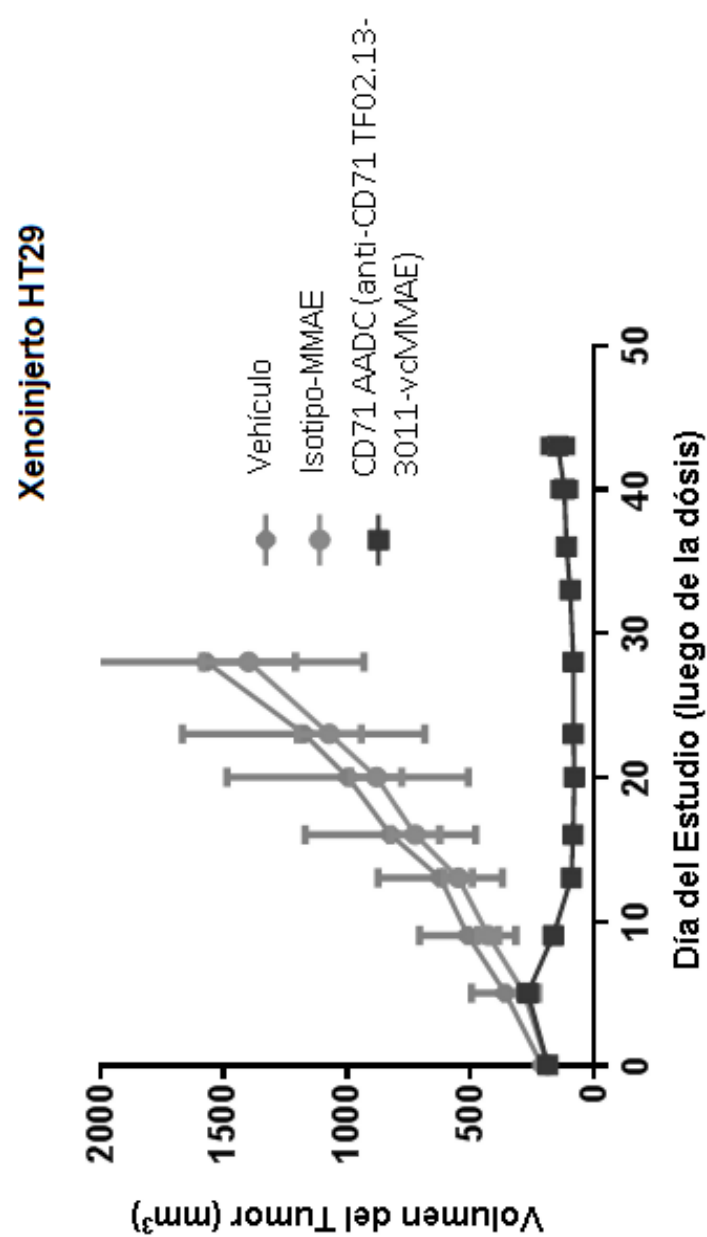


FIG. 4C

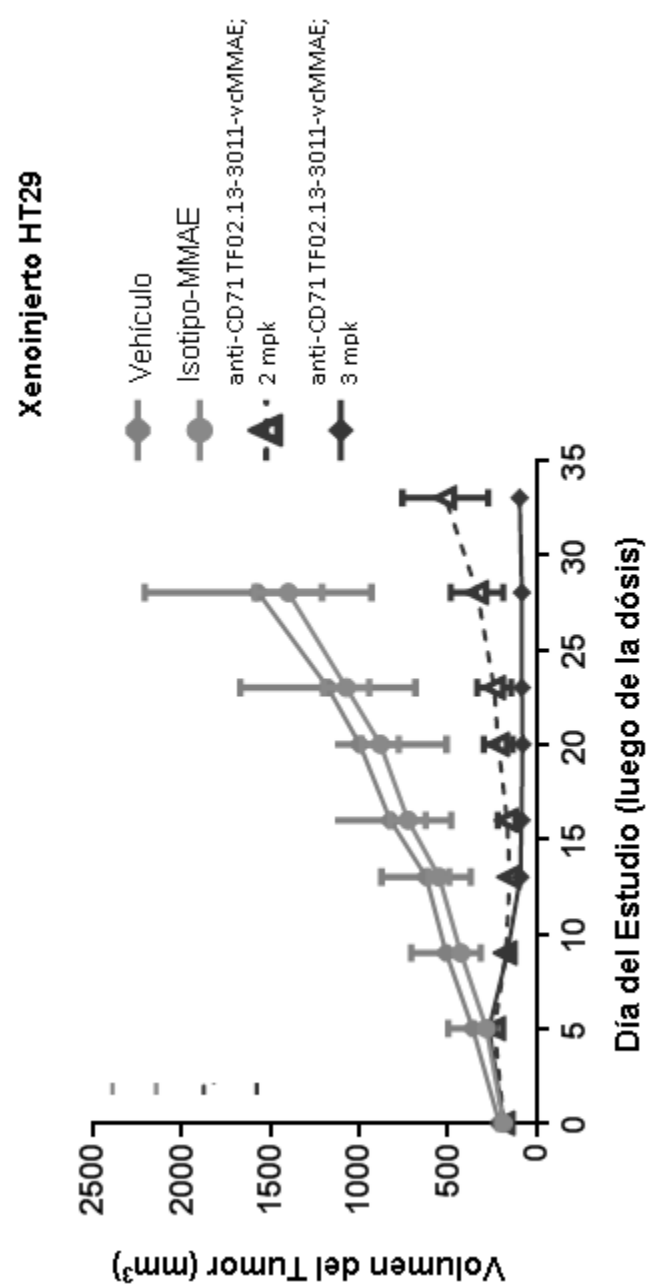


FIG. 5

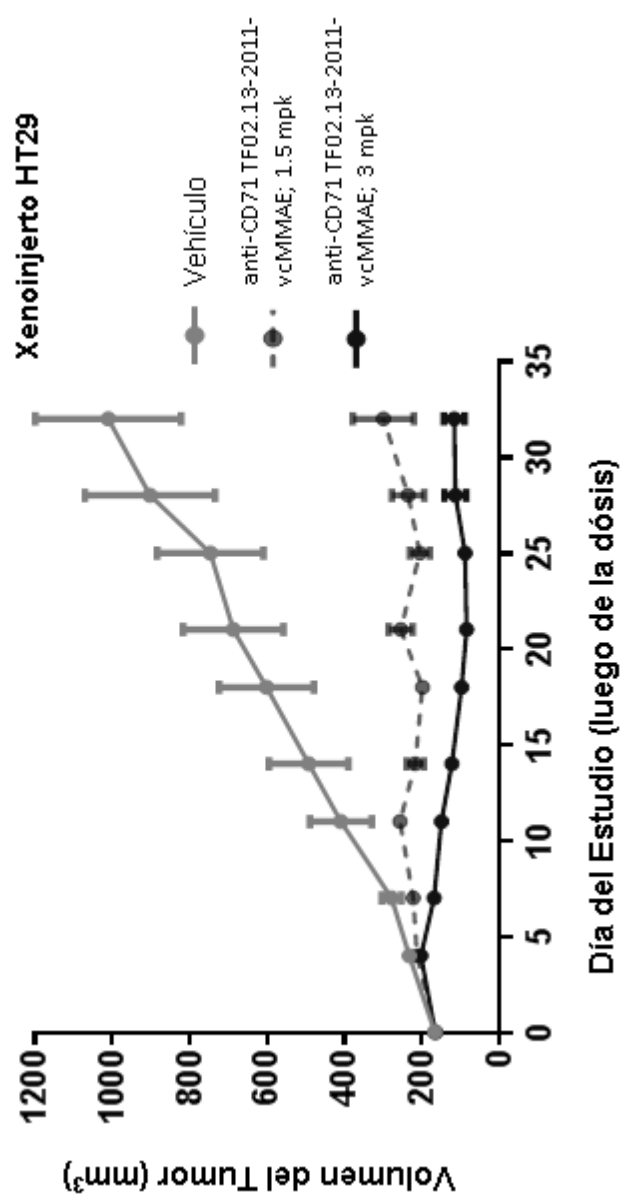


FIG. 6A

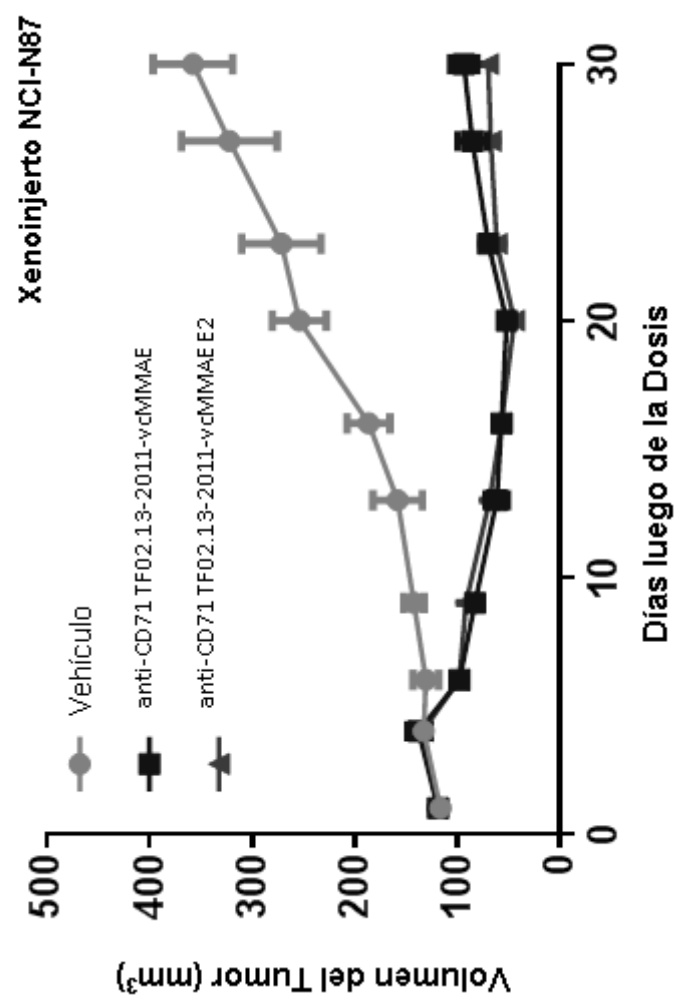


FIG. 6B

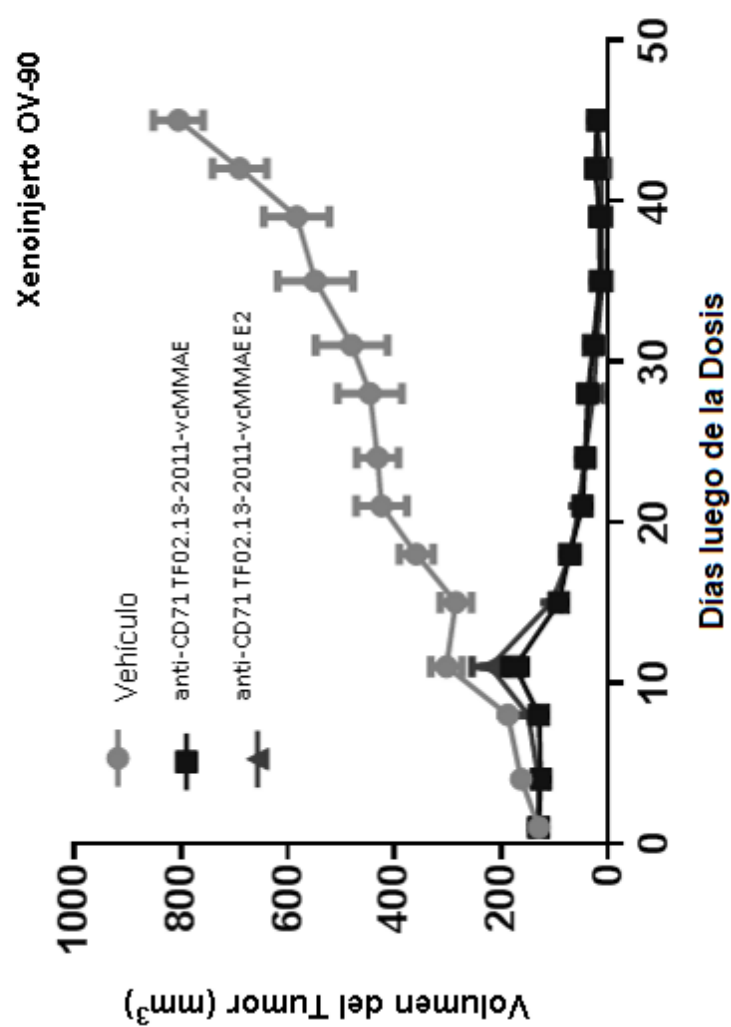


FIG. 6C

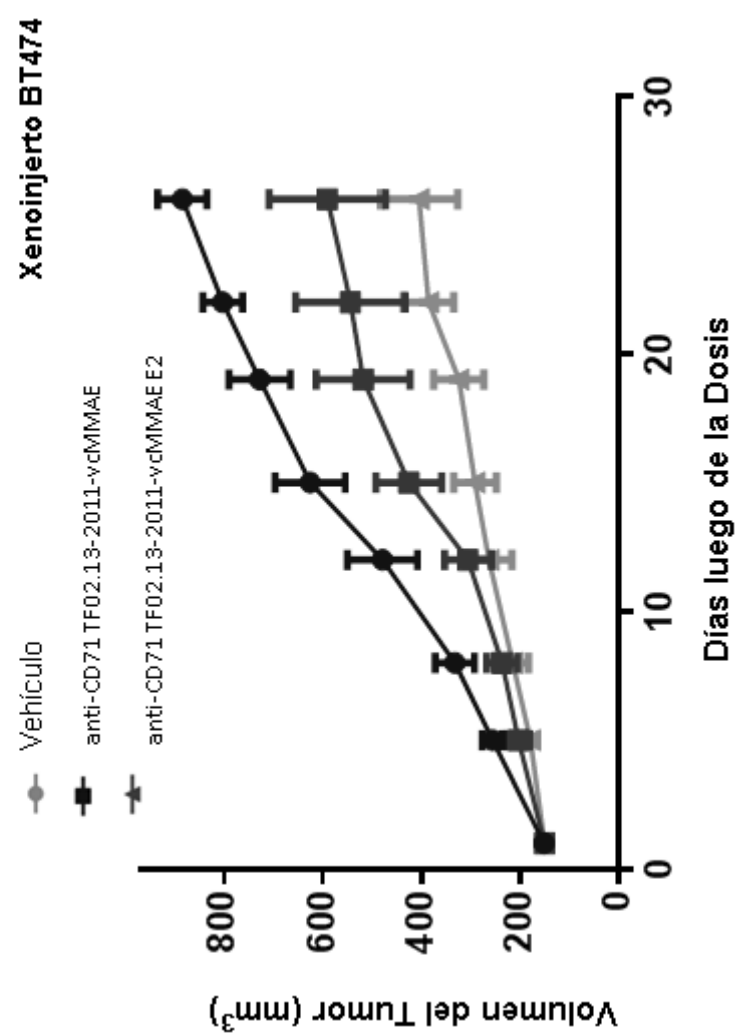


FIG. 6D

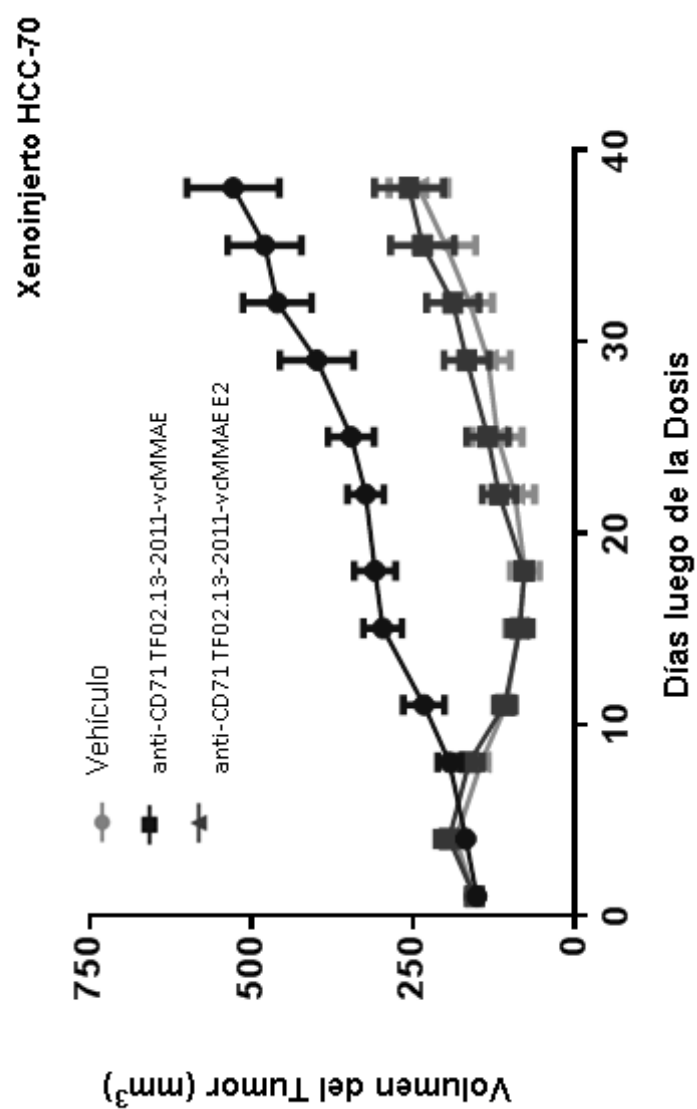


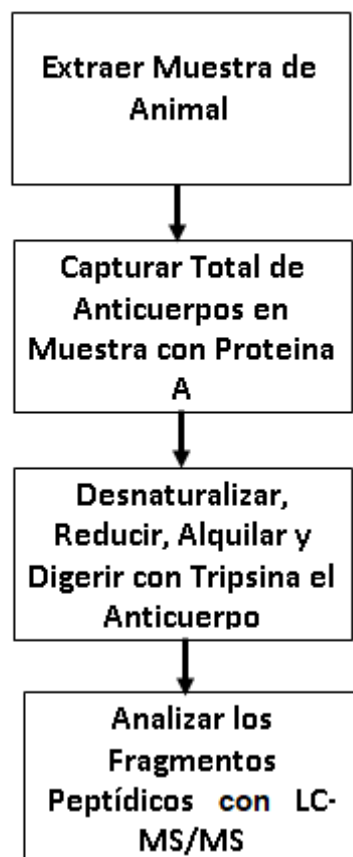
FIG. 7A

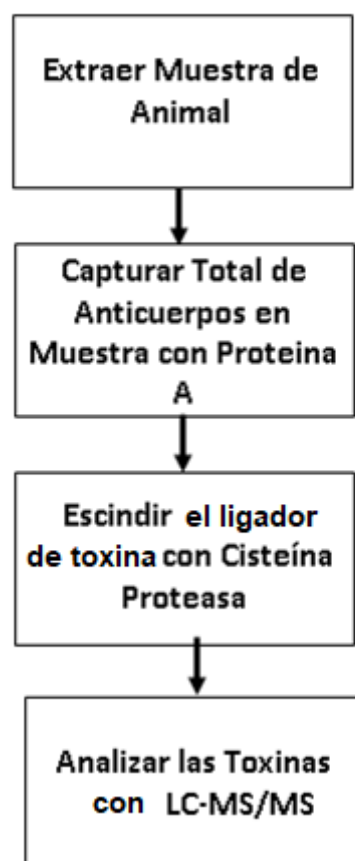
FIG. 7B

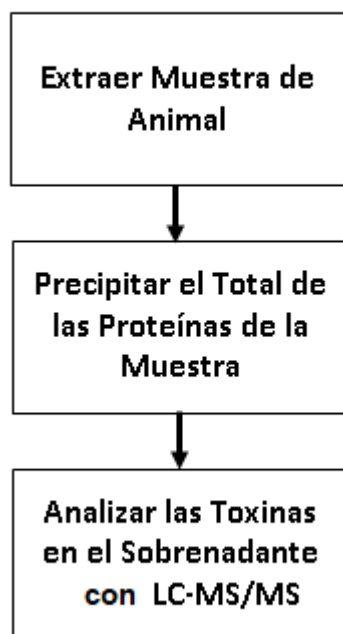
FIG. 7C

FIG. 8A

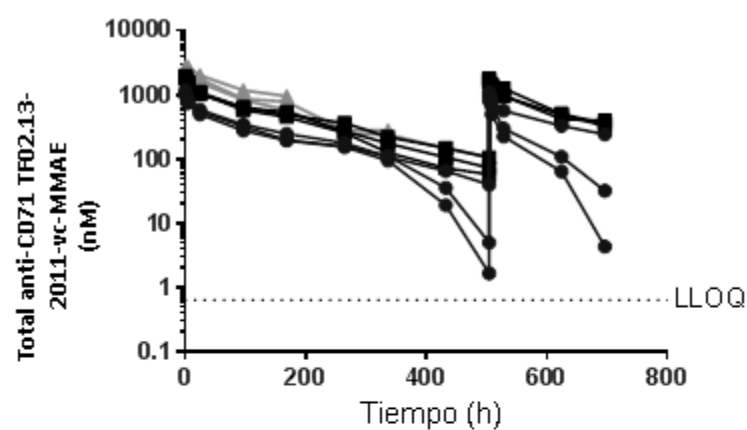


FIG. 8B

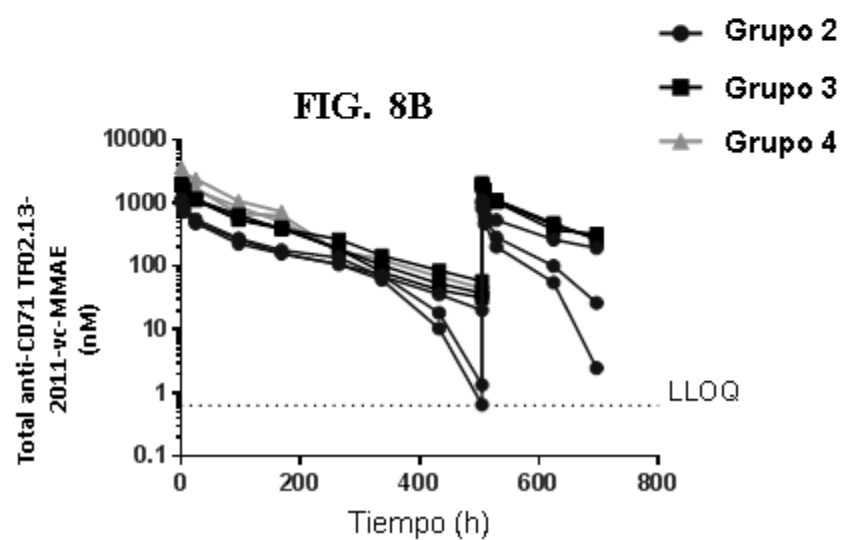


FIG. 9A

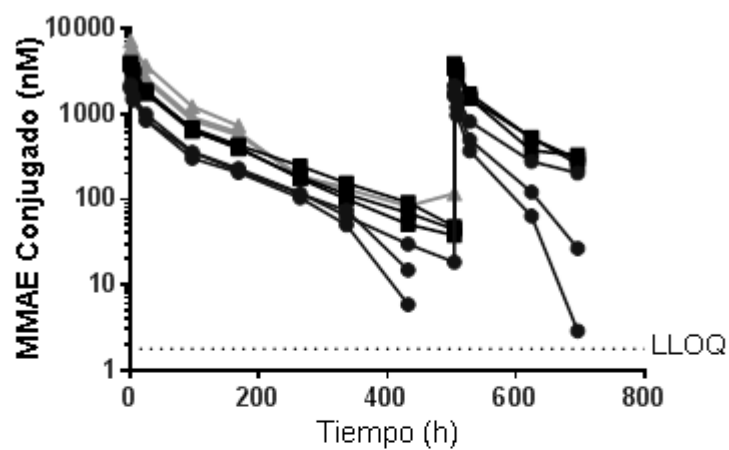


FIG. 9B

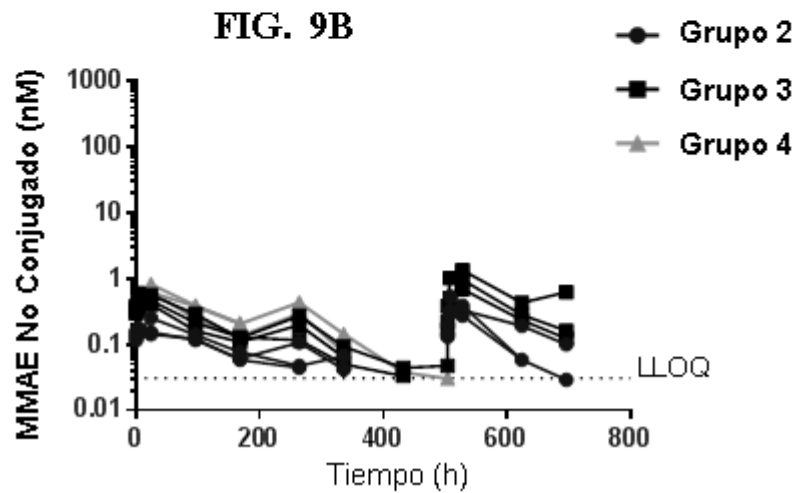


FIG. 10

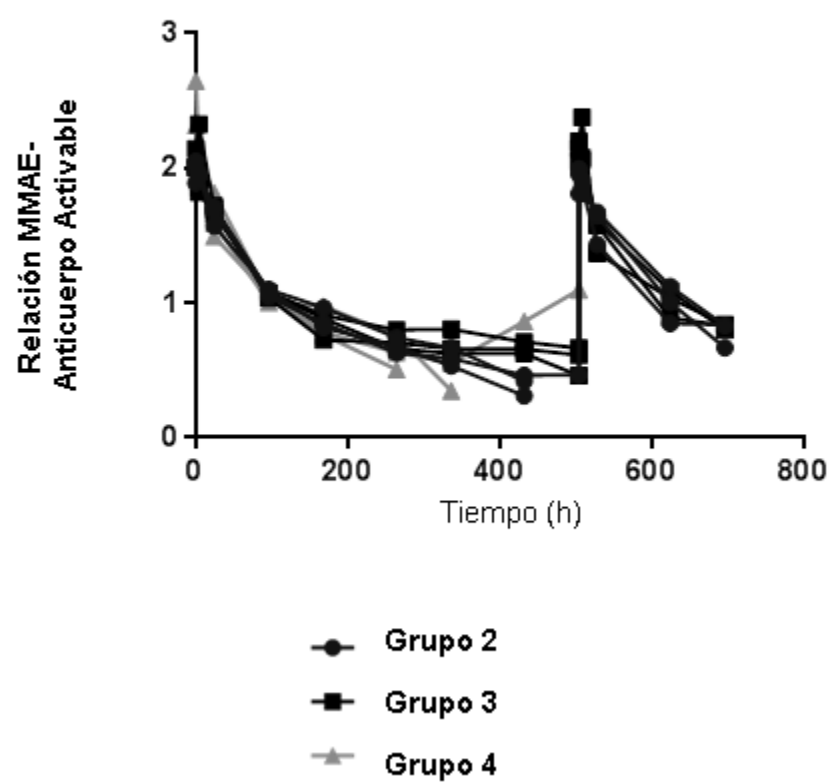


FIG. 11

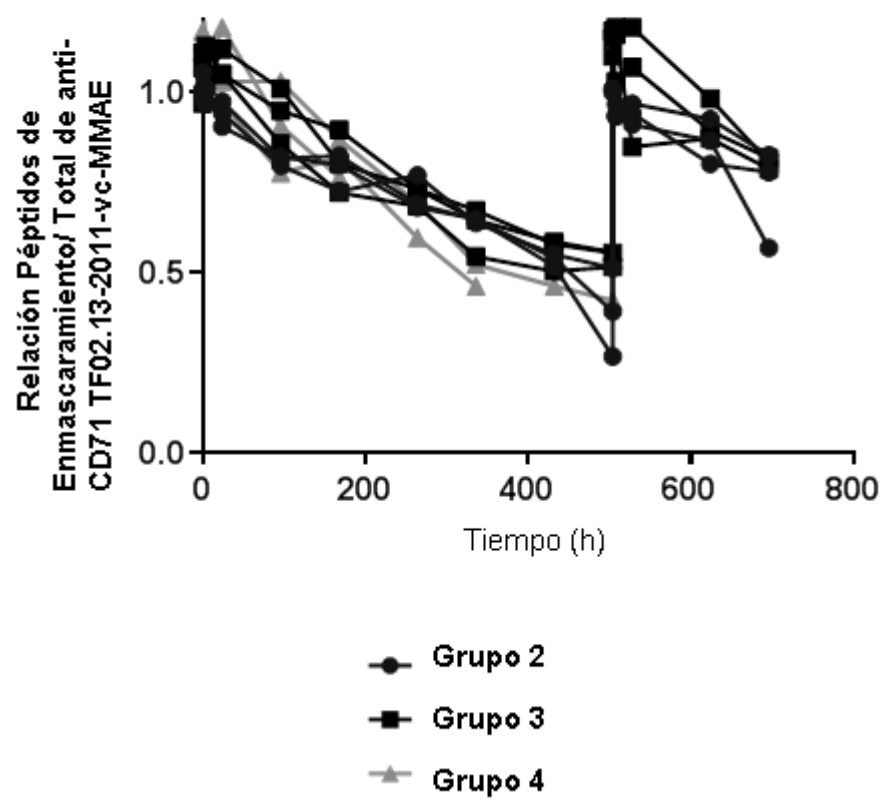


FIG. 14
Ratón DLBCL PDX

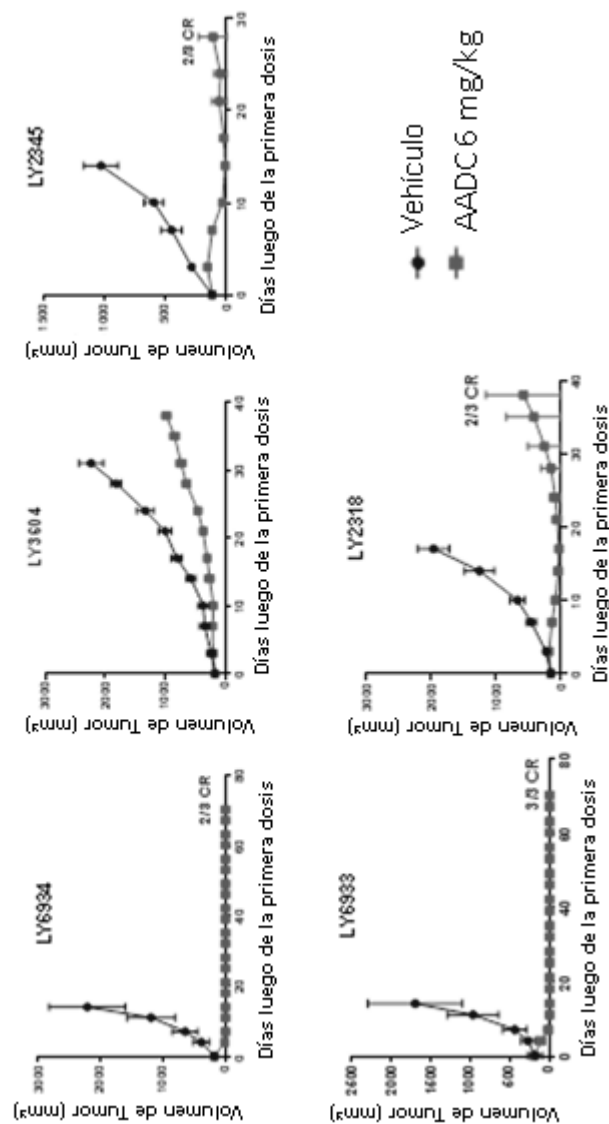


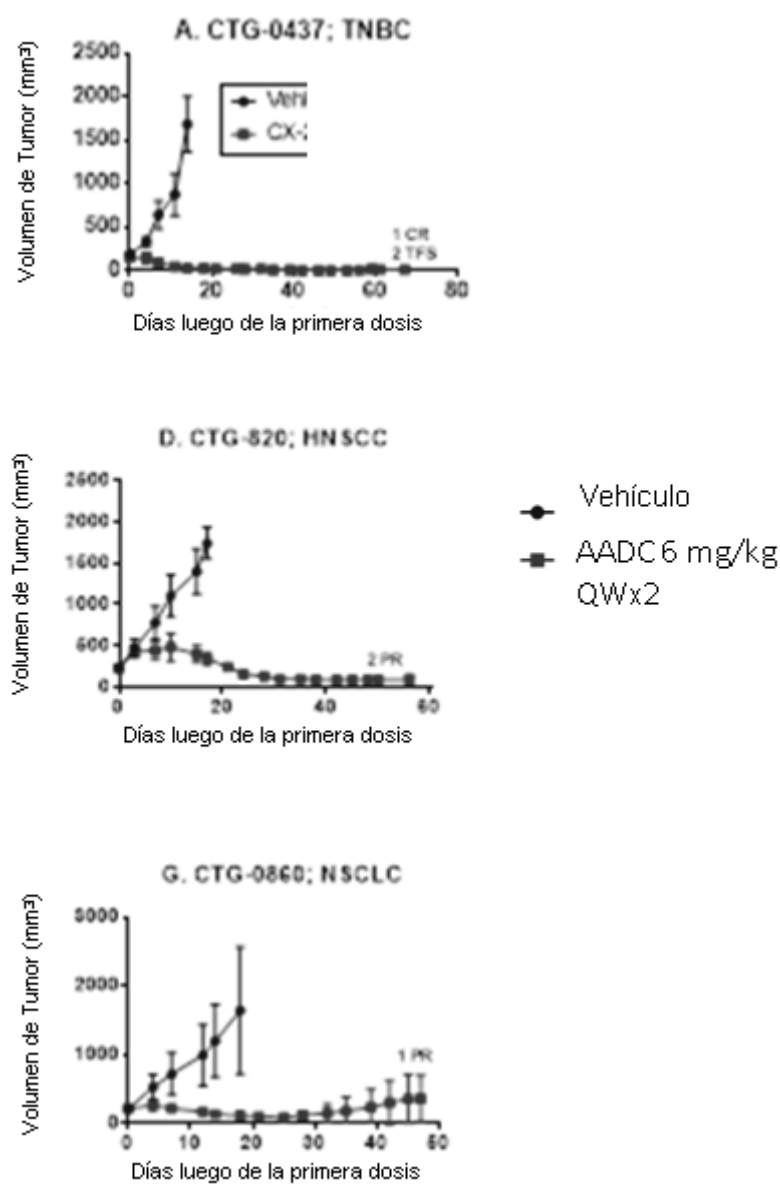
FIG. 15A: Ratón PDX

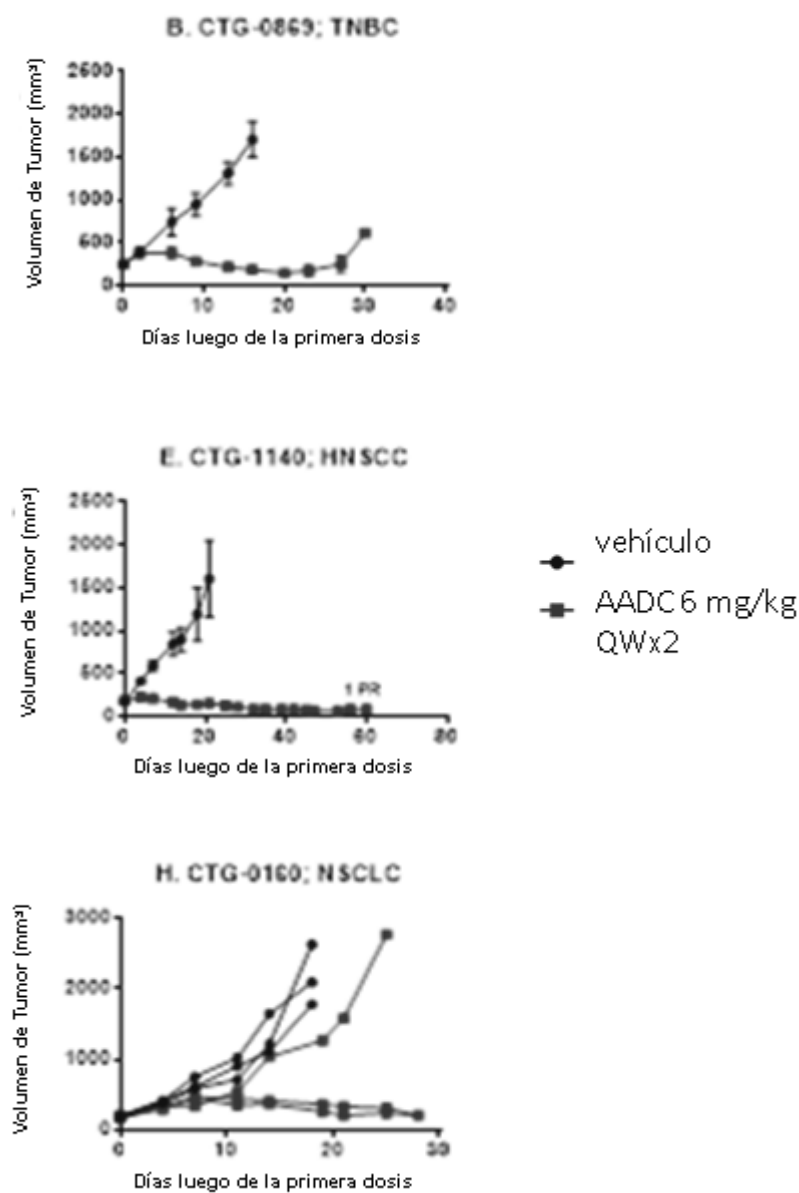
FIG. 15B: Ratón PDX

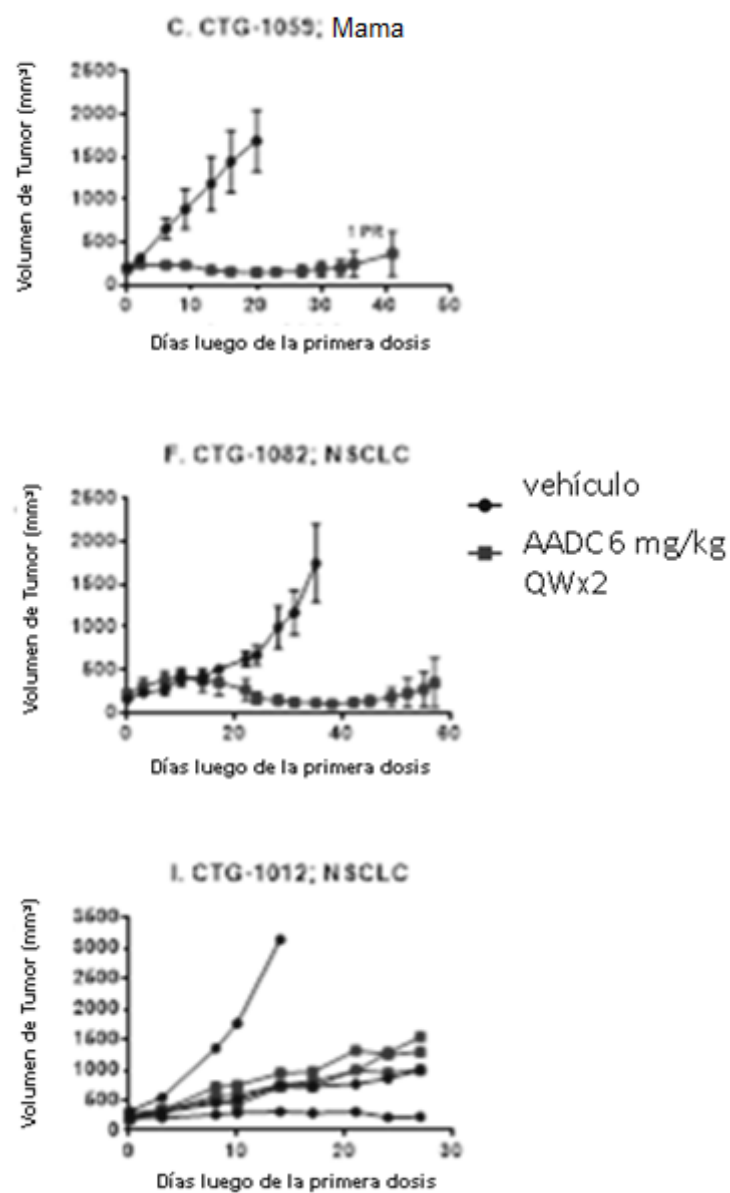
FIG. 15C: Ratón PDX

FIG. 16
PDX Pancreático

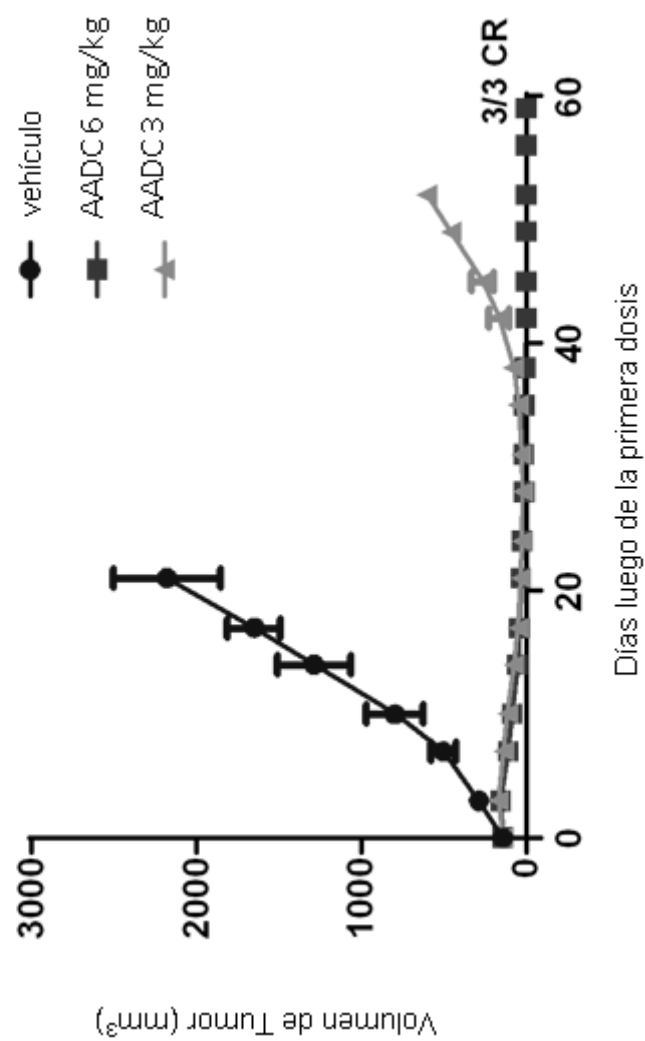


FIG. 17
Resumen de Tolerabilidad y Estabilidad de Anti-CD71 AADC y ADC en Macaca fascicularis

Artículo de Prueba (Relación Fármaco- Anticuerpo (DAR))	Dosis (mg/kg)	Pérdida de Peso de Peso Corporal	Recuento de neutrófilos promedio ± SD (por µL)	Estabilidad relativa del anticuerpo activable circulante	Signos clínicos / tolerabilidad
Anti-CD71 TF02.13-3011- vc-MMAE (~3)	6	~10%	98 ± 60	Menor	Neutropenia grave, letargo, inapetencia. No tolerado
Anti-CD71 TF02.13-2011- vc-MMAE (~3)	6	~8%	290 ± 290	Mayor	Ninguno. Tolerado
Anti-CD71 TF02.13-2011- vc-MMAE E2 (~2)	12	0%	180 ± 210	Mayor	Ninguno. Tolerado
Anti-CD71-vc-MMAE E2 (~2)	2	~8%	70	N/A	Letal a ~ 1 semana después de la 1.ª dosis

FIG. 18A

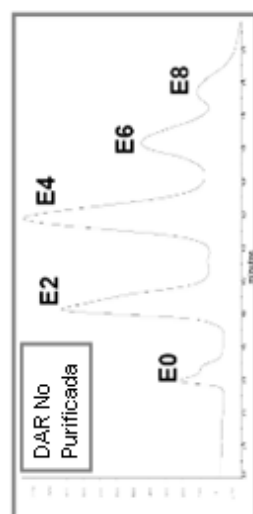


FIG. 18B

