

ANTICUERPOS IGF1R

REFERENCIA CRUZADA

Esta solicitud reivindica el beneficio de la U.S. Provisional App. No. 63/500,168, presentada el 4 de mayo de 2023, y la U.S. Provisional App. No. 63/351,077 presentada el 10 de junio de 2022, ambas incorporadas por referencia en el presente documento en su totalidad.

RESUMEN

La administración subcutánea de tratamientos con anticuerpos a un paciente es una vía más conveniente y rentable que la administración intravenosa, ya que dichos tratamientos pueden administrarse en casa y no requieren la presencia de un especialista médico entrenado. Sin embargo, un obstáculo para la administración subcutánea de anticuerpos es la reducción sustancial del volumen de una formulación de anticuerpo para su uso en una jeringa precargada, infusor en el cuerpo, autoinyector, etc. Para resolver este problema, se necesitan formulaciones de anticuerpos de alta concentración, pero esto puede ser poco práctico para la administración subcutánea debido a los retos de viscosidad, el comportamiento de agregación y otros factores agravantes para formular moléculas grandes. Una solución es el uso de nuevos anticuerpos que se unen a un objetivo con mayor afinidad o que ejercen una mayor actividad biológica que los anticuerpos conocidos. Además, los anticuerpos que comprenden ciertas mutaciones de la región Fc poseen una semivida más larga in vivo, lo que puede reducir aún más la cantidad de anticuerpo que debe incluirse en una formulación subcutánea.

En el presente documento se describen anticuerpos IGF1R con alta afinidad de unión y alta actividad inhibidora biológica. También, se describen en el presente documento anticuerpos IGF1R con semivida prolongada y bajos niveles de actividad ADCC. Dichos anticuerpos pueden incluirse eficazmente en formulaciones para administración subcutánea con el fin de mejorar la facilidad de administración para los pacientes. En un aspecto, se describe en el presente documento un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une al receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF1R), en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: (a) una cadena pesada de inmunoglobulina CDR1 (HCDR1) que comprende la secuencia de aminoácidos SX₁GMH, en la que X₁ es H, Y, A, o T; (b) una cadena pesada de inmunoglobulina CDR2 (HCDR2) que comprende la secuencia de aminoácidos X₁IX₂X₃DX₄SX₅TYVADSVRG, en la que X₁ es I, T o Y, X₂ es W, N o A, X₃ es F, H, A o G, X₄ es G o A, X₅ es S o T; (c) una cadena pesada de inmunoglobulina CDR3 (HCDR3) que comprende la secuencia de aminoácidos ELX₁RRYFDL, en la que X₁ es G o N; (d) una cadena ligera de inmunoglobulina CDR1 (LCDR1) que comprende la secuencia de aminoácidos RASQSVSSX₁LA, en la que X₁ es Y, A, o T; (e) una cadena ligera de inmunoglobulina CDR2 (LCDR2) que comprende la secuencia de aminoácidos DASKRAT; y/o una cadena ligera de

inmunoglobulina CDR3 (LCDR3) que comprende la secuencia de aminoácidos QQRX₁KX₂PPWT, en la que X₁ es S o G, X₂ es Y o W; en la que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo no comprende una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina idéntica a SEQ ID NO: 1 y/o una región variable de cadena ligera de

5 inmunoglobulina idéntica a SEQ ID NO: 2. En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une al receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF1R), en la que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: (a) una cadena pesada de inmunoglobulina CDR1 (HCDR1) que comprende la secuencia de aminoácidos SX₁GMH, en la que X₁ es H, Y, A, o T; (b) una cadena pesada de inmunoglobulina

10 CDR2 (HCDR2) que comprende la secuencia de aminoácidos X₁IX₂X₃DX₄SX₅TYADSVRG, en la que X₁ es I, T o Y, X₂ es W, N o A, X₃ es F, H, A o G, X₄ es G o A, X₅ es S o T; (c) una cadena pesada de inmunoglobulina CDR3 (HCDR3) que comprende la secuencia de aminoácidos ELX₁RRYFDL, en la que X₁ es G o N; (d) una cadena ligera de inmunoglobulina CDR1 (LCDR1) que comprende la secuencia de aminoácidos RASQSVSSX₁LA, en la que X₁ es Y, A, o T; (e)

15 una cadena ligera de inmunoglobulina CDR2 (LCDR2) que comprende la secuencia de aminoácidos DASKRAT; y/o una cadena ligera de inmunoglobulina CDR3 (LCDR3) que comprende la secuencia de aminoácidos QQRX₁KX₂PPWT, en la que X₁ es S o G, X₂ es Y o W; en la que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo no comprende una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina idéntica a SEQ ID NO: 1 y una región variable

20 de cadena ligera de inmunoglobulina idéntica a SEQ ID NO: 2. En ciertas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada de inmunoglobulina CDR1 (HCDR1), una cadena pesada de inmunoglobulina CDR2 (HCDR2), una cadena pesada de inmunoglobulina CDR3 (HCDR3), una cadena ligera de inmunoglobulina CDR1 (LCDR1) una cadena ligera de inmunoglobulina CDR2 (LCDR2), y/o una cadena ligera

25 de inmunoglobulina CDR3 (LCDR3), en las que: (a) el HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos SHGMH; (b) el HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos YIWFDGSSTYYADSVRG; (c) el HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos ELGRRYFDL; (d) el LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos RASQSVSSALA; (e) el LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos DASKRAT; y/o (f) el LCDR3 comprende la secuencia

30 de aminoácidos QQRSKYPPWT. En ciertas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada de inmunoglobulina CDR1 (HCDR1), una cadena pesada de inmunoglobulina CDR2 (HCDR2), una cadena pesada de inmunoglobulina CDR3 (HCDR3), una cadena ligera de inmunoglobulina CDR1 (LCDR1) una cadena ligera de inmunoglobulina CDR2 (LCDR2), y/o una cadena ligera de inmunoglobulina CDR3 (LCDR3), en

35 las que: (a) el HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos SYGMH; (b) el HCDR2

comprende la secuencia de aminoácidos IIWFDGSSTYYADSVRG; (c) el HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos ELGRRYFDL; (d) el LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos RASQSVSSYLA; (e) el LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos DASKRAT; y/o (f) el LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos QQRSKYPPWT. En

5 ciertas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada de inmunoglobulina CDR1 (HCDR1), una cadena pesada de inmunoglobulina CDR2 (HCDR2), una cadena pesada de inmunoglobulina CDR3 (HCDR3), una cadena ligera de inmunoglobulina CDR1 (LCDR1) una cadena ligera de inmunoglobulina CDR2 (LCDR2), y/o una cadena ligera de inmunoglobulina CDR3 (LCDR3), en las que: (a) el HCDR1 comprende la

10 secuencia de aminoácidos SHGMH; (b) el HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos IIAGDASTTYYADSVRG; (c) el HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos ELGRRYFDL; (d) el LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos RASQSVSSYLA; (e) el LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos DASKRAT; y/o (f) el LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos QQRSKYPPWT. En determinadas realizaciones, las CDR se ajustan a la

15 definición de Kabat. En determinadas realizaciones, las CDR se ajustan a la definición de Chothia. En determinadas realizaciones, las CDR se ajustan a la definición del IMGT. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina, en las que la región variable de cadena pesada de

20 inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 3; y en las que la región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 4. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo

25 comprende una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina, en las que la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 5; y en las que la región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al

30 menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 6. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina, en las que la región variable de cadena pesada de

35 inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 7; y en las que la región

variable de la cadena ligera de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 8. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de

5 cadena ligera de inmunoglobulina, en las que la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 9; y en las que la región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al

10 NO: 10. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina, en las que la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 11; y en las que la región

15 variable de la cadena ligera de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 12. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina, en las que la cadena pesada de inmunoglobulina

20 comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 13; y en las que la región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 14. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo

25 comprende una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina, en las que la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 15; y en las que la región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al

30 menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 16. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina, en las que la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente

35 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 17; y en las que la región

variable de la cadena ligera de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 18. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina, en las que la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 19; y en las que la región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 20. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina, en las que la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 21; y en las que la región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 22. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo IgG. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un Fab, F(ab)₂, o un fragmento variable de cadena simple (scFv). En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es quimérico o humanizado. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada de inmunoglobulina y una cadena ligera de inmunoglobulina, en las que la cadena pesada de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 51; y en las que la cadena ligera de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 52. En determinadas realizaciones, el anticuerpo posee una semivida de 14 días o más en un ser humano. En determinadas realizaciones, el anticuerpo posee una semivida de 21 días o más en un ser humano. En determinadas realizaciones, el anticuerpo posee una semivida de 25 días o más en un ser humano. En determinadas realizaciones, el anticuerpo posee una semivida de 30 días o más en un ser humano. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una sustitución M252Y/S254T/T256E de acuerdo a la numeración UE en una o ambas regiones constantes de cadena pesada. En determinadas realizaciones, el anticuerpo inhibe la señalización a través de IGF1R. En determinadas realizaciones, el anticuerpo posee

un K_D de menos de 5×10^{-9} M. En determinadas realizaciones, el anticuerpo posee un K_D de menos de 1×10^{-9} M. En determinadas realizaciones, el anticuerpo posee un K_D de menos de 5×10^{-10} M. También se describe en el presente documento un ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. También se describe en el presente documento una línea celular que comprende el ácido nucleico que codifica el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo. En determinadas realizaciones, la línea celular es una línea celular de Ovario de Hámster Chino. También se describe en el presente documento una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo y un excipiente, portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica está formulada para administración intravenosa. En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica está formulada para administración subcutánea. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo o la composición farmacéutica es para uso en método de inhibición de la señalización de IGF1R en un individuo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las características novedosas descritas en el presente documento se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Una mejor comprensión de las características y ventajas de las características descritas en el presente documento se obtendrá por referencia a la siguiente descripción detallada que expone ejemplos ilustrativos, en los que se utilizan los principios de las características descritas en el presente documento, y los dibujos adjuntos de los cuales:

FIG. 1A ilustra la alineación de secuencias múltiples de las regiones variables de cadena pesada descritas en el presente documento.

FIG. 1B ilustra la alineación de secuencias múltiples de las regiones variables de cadena ligera descritas en el presente documento.

FIG. 2 ilustra un ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) realizado con clon D03 formateado con diferentes regiones constantes de cadena pesada (la mutación "YTE", que posee mutaciones en M252Y/S254T/T256E de acuerdo a la numeración EU; y la mutación "LS" Met428Leu/Asn434Ser de acuerdo a la numeración EU). RLU=Unidades relativas de luz.

FIG. 3 ilustra la inhibición de la señalización IGF-1R por Teprotumumab y D03-YTE.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En la siguiente descripción, se exponen ciertos detalles específicos con el fin de proporcionar una comprensión completa de diversas realizaciones. Sin embargo, un experto en la técnica entenderá que las realizaciones proporcionadas pueden practicarse sin estos detalles.

A menos que el contexto requiera lo contrario, en toda la especificación y las reivindicaciones que siguen, la palabra "comprende" y sus variaciones, tales como "comprenden" y "que comprende" deben interpretarse en un sentido abierto e inclusivo, es decir, como "que incluye, pero no se limita a". Tal como se utilizan en esta especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contenido indique claramente lo contrario. También debe tenerse en cuenta que el término "o" se emplea generalmente en su sentido que incluye "y/o" a menos que el contenido dicte claramente lo contrario. Además, los encabezamientos que figuran en el presente documento se utilizan únicamente por comodidad y no interpretan el alcance o el significado de las realizaciones reivindicadas.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere a una cantidad que está cerca de la cantidad indicada en un 10% o menos.

Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "individuo", "paciente" o "sujeto" se refiere a individuos diagnosticados con, sospechosos de padecer o en riesgo de desarrollar al menos una enfermedad para cuyo tratamiento son útiles las composiciones y el método descritos. En determinadas realizaciones, el individuo es un mamífero. En determinadas realizaciones, el mamífero es un ratón, una rata, un conejo, un perro, un gato, un caballo, una vaca, una oveja, un cerdo, una cabra, una llama, una alpaca o un yak. En determinadas realizaciones, el individuo es un ser humano.

Entre los anticuerpos proporcionados se encuentran anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos y anticuerpos polirreactivos) y fragmentos de anticuerpos. Los anticuerpos incluyen conjugados de anticuerpo y moléculas que comprenden los anticuerpos, tales como moléculas quiméricas. Por lo tanto, un anticuerpo incluye, pero no se limita a, anticuerpos de longitud completa y nativos, así como fragmentos y porciones de los mismos que conservan las especificidades de unión de los mismos, tal como cualquier porción de unión específica de los mismos, incluidos los que tienen cualquier número de clases y/o isotipos de inmunoglobulina (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgD, IgE e IgM); y fragmentos biológicamente relevantes (de unión a antígeno) o porciones de unión específica de los mismos, incluyendo pero sin limitarse a Fab, F(ab')₂, Fv, y scFv (cadena simple o entidad relacionada). Un anticuerpo monoclonal es generalmente uno dentro de una composición de anticuerpos sustancialmente homogéneos; por lo tanto, cualquier anticuerpo individual comprendido dentro de la composición de anticuerpos monoclonales es idéntico excepto por posibles mutaciones de ocurrencia natural que pueden estar presentes en cantidades menores. El anticuerpo monoclonal puede comprender una región constante IgG1 humana. El anticuerpo monoclonal puede comprender una región constante IgG4 humana.

El término "anticuerpo" se utiliza en el presente documento en el sentido más amplio e incluye anticuerpos monoclonales, e incluye anticuerpos intactos y fragmentos de anticuerpos funcionales (de unión a antígeno) de los mismos, que incluye fragmentos de unión a antígeno (Fab), fragmentos $F(ab')_2$, fragmentos Fab', fragmentos Fv, fragmentos de IgG recombinante (rIgG), fragmentos de anticuerpos de cadena simple, que incluye fragmentos variables de cadena simple (sFv o scFv), y fragmentos de anticuerpos de dominio simple (por ejemplo, sdAb, sdFv, nanocuerpos). El término abarca formas de inmunoglobulinas modificadas genéticamente y/o de otro modo, tales como intracuerpos, peptidocuerpos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos totalmente humanos, anticuerpos humanizados y anticuerpos heteroconjugados, anticuerpos multiespecíficos, por ejemplo, biespecíficos, anticuerpos, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos, di-scFv en tándem, tri-scFv en tándem. A menos que se indique lo contrario, debe entenderse que el término "anticuerpo" engloba los fragmentos funcionales de anticuerpo de los mismos. El término también abarca los anticuerpos intactos o de longitud completa, incluyendo los anticuerpos de cualquier clase o subclase, incluyendo las IgG y sus subclases, IgM, IgE, IgA e IgD. El anticuerpo puede comprender una región constante IgG1 humana. El anticuerpo puede comprender una región constante IgG4 humana.

Los términos "región determinante de la complementariedad" y "CDR", que son sinónimos de "región hipervariable" o "HVR", son conocidos en la técnica para referirse a secuencias no contiguas de aminoácidos dentro de las regiones variables de los anticuerpos, que confieren especificidad de antígeno y/o afinidad de unión. En general, hay tres CDR en cada región variable de la cadena pesada (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) y tres CDR en cada región variable de la cadena ligera (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). "Regiones marco" y "FR" son conocidas en la técnica para referirse a las porciones no CDR de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera. En general, hay cuatro FR en cada región variable de cadena pesada de longitud completa (FR-H1, FR-H2, FR-H3 y FR-H4), y cuatro FR en cada región variable de cadena ligera de longitud completa (FR-L1, FR-L2, FR-L3 y FR-L4). Los límites precisos de la secuencia de aminoácidos de una CDR o FR dada pueden determinarse fácilmente utilizando cualquiera de los esquemas conocidos, incluidos los descritos por Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (esquema de numeración "Kabat"), Al-Lazikani et al., (1997) *JMB* 273,927-948 (esquema de numeración "Chothia"); MacCallum et al., *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (1996), "Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography," *J. Mol. Biol.* 262, 732-745." (esquema de numeración "Contact"); Lefranc MP et al., "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains," *Dev Comp Immunol*, 2003 Jan;27(1):55-77 (esquema de numeración "IMGT");

Honegger A and Plückthun A, "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool," *J Mol Biol*, 2001 Jun 8;309(3):657-70, (esquema de numeración "Aho"); y Whitelegg NR y Rees AR, "WAM: an improved algorithm for modelling antibodies on the WEB," *Protein Eng.* 2000 dic;13(12):819-24 (esquema de numeración "AbM"). En determinadas realizaciones, las CDR de los anticuerpos descritos en el presente documento pueden definirse mediante un método seleccionado de Kabat, Chothia, IMGT, Aho, AbM, o combinaciones de los mismos.

Los límites de un determinado CDR o FR pueden variar en función del esquema utilizado para la identificación. Por ejemplo, el esquema Kabat se basa en alineaciones estructurales, mientras que el esquema Chothia se basa en información estructural. La numeración de los esquemas de Kabat y Chothia se basa en las longitudes de secuencia más comunes de las regiones de anticuerpos, con inserciones acomodadas por letras de inserción, por ejemplo, "30a", y deleciones que aparecen en algunos anticuerpos. Los dos esquemas sitúan determinadas inserciones y deleciones ("indels") en posiciones diferentes, lo que da lugar a una numeración diferencial. El esquema Contact se basa en el análisis de estructuras cristalinas complejas y es similar en muchos aspectos al esquema de numeración Chothia.

El término "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que interviene en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera (V_H y V_L , respectivamente) de un anticuerpo nativo suelen tener estructuras similares, cada dominio que comprende cuatro regiones marco conservadas (FR) y tres CDR (Véase, por ejemplo, Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6ª ed., W.H. Freeman y Co., página 91(2007)). Un único dominio V_H o V_L puede ser suficiente para conferir especificidad de unión al antígeno. Además, los anticuerpos que se unen a un antígeno particular pueden aislarse usando un dominio V_H o V_L de un anticuerpo que se une al antígeno para cribar una biblioteca de dominios complementarios V_L o V_H , respectivamente (Véase, por ejemplo, Portolano et al, *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991)).

La unión específica o unión de moléculas de anticuerpos descrita en el presente documento se refiere a la unión mediada por una o más porciones CDR del anticuerpo. Puede que no todas las CDR sean necesarias para una unión específica. La unión específica puede demostrarse, por ejemplo, mediante un ELISA frente a un objetivo o antígeno específico recitado que muestre un aumento significativo de la unión en comparación con un anticuerpo de control del isotipo.

Tal como se describe en el presente documento, un "epítipo" se refiere al determinante de unión de un anticuerpo o fragmento descrito en el presente documento mínimamente

necesario para la unión específica del anticuerpo o fragmento del mismo a un antígeno objetivo. Cuando el antígeno objetivo es un polipéptido, el epítipo será un epítipo continuo o discontinuo. Un epítipo continuo está formado por una región del antígeno objetivo, mientras que un epítipo discontinuo puede estar formado por dos o más regiones separadas. Un epítipo discontinuo, por ejemplo, puede formarse cuando un antígeno objetivo adopta una estructura terciaria que reúne dos secuencias de aminoácidos y forma una estructura tridimensional unida por el anticuerpo. Cuando el antígeno objetivo es un polipéptido, el epítipo será generalmente una pluralidad de aminoácidos unidos en una cadena polipeptídica. Un epítipo continuo puede comprender 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos contiguos. Aunque un epítipo puede comprender un polímero contiguo de aminoácidos, no todos los aminoácidos del polímero pueden estar en contacto con un residuo de aminoácido del anticuerpo. Estos aminoácidos no contactados seguirán formando parte del epítipo, ya que pueden ser importantes para la estructura y la unión de los aminoácidos contactados. El experto puede determinar si un anticuerpo dado se une a un epítipo de un anticuerpo de referencia, por ejemplo, mediante experimentos de bloqueo cruzado con un anticuerpo de referencia. En determinadas realizaciones, descritas en el presente documento, son anticuerpos que se unen al mismo epítipo de los anticuerpos descritos. En determinadas realizaciones, descritas en el presente documento, son anticuerpos que son bloqueados competitivamente por los anticuerpos descritos. En determinadas realizaciones, descritas en el presente documento, son anticuerpos que compiten por la unión con los anticuerpos descritos.

Entre los anticuerpos suministrados hay fragmentos de anticuerpos. Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena simple (*por ejemplo*, scFv o sFv); y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. En determinadas realizaciones, los anticuerpos son fragmentos de anticuerpo de cadena simple que comprenden una región variable de cadena pesada y/o una región variable de cadena ligera, tales como los scFvs.

Los fragmentos de anticuerpos pueden fabricarse mediante diversas técnicas, que incluyen pero no se limitan a la digestión proteolítica de un anticuerpo intacto así como la producción mediante células huésped recombinantes. En algunas realizaciones, los anticuerpos son fragmentos producidos recombinantemente, tales como fragmentos que comprenden disposiciones que no se producen de forma natural, tales como aquellos con dos o más regiones o cadenas de anticuerpos unidas por enlazadores sintéticos, por ejemplo, enlazadores

polipeptídicos, y/o aquellos que no se producen por digestión enzimática de un anticuerpo intacto que se produce de forma natural. En algunos aspectos, los fragmentos de anticuerpo son scFvs.

5 Un anticuerpo "humanizado" es un anticuerpo en el que todos o prácticamente todos los residuos de aminoácidos CDR proceden de CDR no humanos y todos o prácticamente todos los residuos de aminoácidos FR proceden de FR humanos. Un anticuerpo humanizado puede incluir opcionalmente al menos una porción de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo no humano se refiere a una variante del anticuerpo no humano que ha sido humanizada, normalmente para reducir la
10 inmunogenicidad en humanos, pero conservando la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano parental. En algunas realizaciones, algunos residuos FR en un anticuerpo humanizado se sustituyen por residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que derivan los residuos CDR), por ejemplo, para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

15 Entre los anticuerpos proporcionados se encuentran anticuerpos humanos. Un "anticuerpo humano" es un anticuerpo con una secuencia de aminoácidos correspondiente a la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana, o una fuente no humana que utilice repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias codificantes de anticuerpos humanos, que incluyen las bibliotecas de anticuerpos humanos. El término excluye las formas
20 humanizadas de anticuerpos no humanos que comprenden regiones de unión a antígeno no humanas, tales como aquellas en las que todas o casi todas las CDR son no humanas.

Los anticuerpos humanos pueden prepararse administrando un inmunógeno a un animal transgénico que haya sido modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a una provocación antigénica. Estos
25 animales suelen contener todos o parte de los loci de inmunoglobulinas humanas, que sustituyen a los loci de inmunoglobulinas endógenas, o que están presentes de forma extracromosómica o integrados aleatoriamente en los cromosomas del animal. En estos animales transgénicos, los loci de inmunoglobulinas endógenas suelen estar inactivados. Los anticuerpos humanos también pueden derivarse de bibliotecas de anticuerpos humanos,
30 incluidas bibliotecas de visualización de fagos y bibliotecas libres de células, que contengan secuencias codificantes de anticuerpos derivadas de un repertorio humano.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se utilizan indistintamente para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos, y no están limitados a una longitud mínima. Los polipéptidos, incluidos los anticuerpos y cadenas de anticuerpos proporcionados y otros
35 péptidos, por ejemplo, enlazadores y péptidos de unión, pueden incluir residuos de aminoácidos,

incluidos residuos de aminoácidos naturales y/o no naturales. Los términos también incluyen modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilación, sialilación, acetilación, fosforilación y similares. En algunos aspectos, los polipéptidos pueden contener modificaciones con respecto a una secuencia nativa o natural, siempre que la proteína mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tales como a través de mutaciones de los hospedadores que producen las proteínas o errores debidos a la amplificación por PCR. En algunas realizaciones, se contemplan variantes de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos proporcionados en el presente documento. Una variante difiere típicamente de un polipéptido específicamente divulgado en el presente documento en una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones. Dichas variantes pueden ser naturales o pueden generarse sintéticamente, por ejemplo, modificando una o más de las secuencias polipeptídicas de la invención mencionadas anteriormente y evaluando una o más actividades biológicas del polipéptido como se describe en el presente documento y/o utilizando cualquiera de las técnicas conocidas. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Pueden prepararse variantes de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo introduciendo las modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo, o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones y/o inserciones y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Puede realizarse cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, *por ejemplo*, unión a antígeno.

El porcentaje (%) de identidad de secuencia con respecto a una secuencia polipeptídica de referencia es el porcentaje de residuos de aminoácidos de una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos de la secuencia polipeptídica de referencia, tras alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para alcanzar el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. La alineación para determinar el porcentaje de identidad de secuencias de aminoácidos puede lograrse de varias formas conocidas, utilizando software informáticos de acceso público tales como software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Se pueden determinar los parámetros adecuados para alinear secuencias, incluyendo los algoritmos necesarios para lograr la máxima alineación en toda la longitud de las secuencias comparadas. Sin embargo, a efectos del presente documento, los valores de % de identidad de secuencias de aminoácidos se generan utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue

creado por Genentech, Inc., y el código fuente ha sido archivado con la documentación del usuario en la Oficina de Derechos de Autor de EE.UU., Washington D.C., 20559, donde está registrado con el número de registro de derechos de autor de EE.UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente en Genentech, Inc., San Francisco Sur, California, o puede compilarse a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 debe compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, que incluye el digital UNIX V4.0D. Todos los parámetros de comparación de secuencias son establecidos por el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones en las que ALIGN-2 se emplea para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A con, hacia o frente a una secuencia de aminoácidos dada B (que puede expresarse alternativamente como una secuencia de aminoácidos dada A que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de aminoácidos con, hacia o frente a una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula como sigue: 100 veces la fracción X/Y , donde X es el número de residuos de aminoácidos considerados idénticos por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en la alineación de A y B realizada por dicho programa, y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no sea igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. A menos que se indique específicamente lo contrario, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos utilizados en el presente documento se obtienen tal como se describe en el párrafo inmediatamente anterior utilizando el programa informático ALIGN-2.

En algunas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento tiene una constante de disociación (K_D) de aproximadamente 1 μ M, 100 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM, 2 nM, 1 nM, 0.5 nM, 0.1 nM, 0.05 nM, 0.01 nM o menos (*por ejemplo*, 10^{-8} M o menos, *por ejemplo*, de 10^{-8} M a 10^{-13} M, *por ejemplo*, de 10^{-9} M a 10^{-13} M) para el objetivo de anticuerpo. En algunas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento tiene una constante de disociación (K_D) de aproximadamente 100 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM, 2 nM, 1 nM, 0.5 nM, 0.1 nM, 0.05 nM, 0.01 nM, o 0.001 nM o mayor (*por ejemplo*, 10^{-8} M o menos, *por ejemplo*, de 10^{-8} M a 10^{-13} M, *por ejemplo*, de 10^{-9} M a 10^{-13} M) para el objetivo de anticuerpo. K_D puede medirse mediante cualquier ensayo adecuado. En determinadas realizaciones, la K_D puede medirse utilizando ensayos de resonancia de plasmón superficial (*por ejemplo*, utilizando un BIACORE®-2000, un BIACORE®-3000 u Octet).

En algunas realizaciones, pueden introducirse una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en el presente documento,

generando así una variante de la región Fc. Una región Fc es en el presente documento una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. Una región Fc incluye regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. La variante de región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (*por ejemplo*, una región Fc IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácidos (*por ejemplo*, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos.

En algunas realizaciones, pueden introducirse una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en el presente documento, generando así una variante de la región Fc. Una región Fc es en el presente documento una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. Una región Fc incluye regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. La variante de región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (*por ejemplo*, una región Fc IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácidos (*por ejemplo*, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos.

En algunos casos, la región Fc de una inmunoglobulina es importante para muchas funciones importantes de los anticuerpos (por ejemplo, funciones efectoras), tales como la citotoxicidad celular dependiente de antígeno (ADCC), la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y la fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCP), que provocan la muerte de las células objetivo, aunque por mecanismos diferentes. En consecuencia, en algunas realizaciones, los anticuerpos descritos en el presente documento comprenden los dominios variables de la invención combinados con dominios constantes que comprenden diferentes regiones Fc, seleccionadas en función de las actividades biológicas del anticuerpo para el uso previsto. En ciertos casos, las IgG humanas, por ejemplo, pueden clasificarse en cuatro subclases, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y cada una de ellas comprende una región Fc con un perfil único de unión a uno o más receptores Fcγ (receptores activadores FcγRI (CD64), FcγRIIA, FcγRIIC (CD32); FcγRIIIA y FcγRIIIB (CD16) y receptor inhibidor FcγRIIB), y para el primer componente del complemento (C1q). Las IgG1 e IgG3 humanas se unen a todos los receptores Fcγ; la IgG2 se une a FcγRIIA_{H131}, y con menor afinidad a FcγRIIA_{R131} FcγRIIIA_{V158}; IgG4 se une a FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC, y FcγRIIIA_{V158}; y el receptor inhibidor FcγRIIB tiene menor afinidad por IgG1, IgG2 e IgG3 que todos los demás receptores Fcγ. Los estudios han demostrado que el FcγRI no se une a la IgG2, y el FcγRIIIB no se une a la IgG2 ni a la IgG4. Id. En general, con respecto a la actividad ADCC, la IgG1≥IgG3 humana>>IgG4≥IgG2.

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente divulgación son variantes que poseen funciones efectoras reducidas, lo que los convierte en candidatos deseables para

aplicaciones en las que ciertas funciones efectoras (tales como la fijación del complemento y la ADCC) son innecesarias o deletéreas. Dichos anticuerpos pueden presentar una disminución de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o de la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP). En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente divulgación son variantes que poseen funciones efectoras aumentadas para aplicaciones en las que una inmunogenicidad aumentada sería beneficiosa. Dichos anticuerpos pueden tener una mayor CDC, ADCC o ADCP, o una combinación de las mismas. Ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés se describen en U.S. Pat. No. 5,500,362 y 5,821,337. Alternativamente, pueden emplearse métodos de ensayo no radiactivos (*por ejemplo*, ACTI™ y ensayos de citotoxicidad no radiactivos CytoTox 96®). Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), monocitos, macrófagos y células Natural Killer (NK).

Los anticuerpos pueden tener semividas aumentadas y una unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn) (*Véase, por ejemplo*, US 2005/0014934). Dichos anticuerpos pueden comprender una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoren la unión de la región Fc al FcRn, e incluyen aquellos con sustituciones en uno o más de los residuos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434 de acuerdo al sistema de numeración de la UE (*Véase, por ejemplo*, U.S. Pat. No. 7,371,826). También se contemplan otros ejemplos de variantes de la región Fc (*Véase, por ejemplo*, Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); U.S. Pat. Nos. 5,648,260 y 5,624,821; y WO94/29351). Una de estas mutaciones que confiere una mayor semivida es la mutación "YTE", que posee mutaciones en M252Y/S254T/T256E de acuerdo a la numeración UE. Otra mutación de este tipo que confiere una semivida aumentada es la mutación "LS", que posee mutaciones en Met428Leu/Asn434Ser de acuerdo a la numeración UE.

En algunas realizaciones, puede ser deseable crear anticuerpos modificados con cisteína, por ejemplo, "tioMAbs", en los que uno o más residuos de un anticuerpo se sustituyen por residuos de cisteína. En algunas realizaciones, los residuos sustituidos se producen en sitios accesibles del anticuerpo. Los grupos tiol reactivos pueden colocarse en lugares de conjugación con otras fracciones, tales como fracciones farmacológicas o fracciones farmacológicas enlazadoras, para crear un inmunoconjugado. En algunas realizaciones, uno o más de los siguientes residuos pueden sustituirse por cisteína: V205 (numeración Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de la cadena pesada.

En algunas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento puede

modificarse adicionalmente para contener fracciones no proteicas adicionales conocidas y disponibles. Las fracciones adecuadas para la derivatización del anticuerpo incluyen, pero no se limitan a polímeros solubles en agua. Ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios), y dextrano o poli(n vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de polipropilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (*por ejemplo*, glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en el agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede ser ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si se unen dos o más polímeros, pueden ser moléculas iguales o diferentes.

Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden estar codificados por un ácido nucleico. Un ácido nucleico es un tipo de polinucleótido que comprende dos o más bases nucleotídicas. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico es un componente de un vector que puede utilizarse para transferir el polinucleótido codificador del polipéptido a una célula. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es el vector genómico integrado, o "vector integrado", que puede integrarse en el ADN cromosómico de la célula huésped. Otro tipo de vector es un vector "episomal", por ejemplo, un ácido nucleico capaz de replicarse extracromosómicamente. Los vectores capaces de dirigir la expresión de genes a los que están vinculados operativamente se denominan en el presente documento "vectores de expresión". Los vectores adecuados comprenden plásmidos, cromosomas artificiales bacterianos, cromosomas artificiales de levadura, vectores virales y similares. En los vectores de expresión, los elementos reguladores, tales como promotores, potenciadores y señales de poliadenilación para controlar la transcripción, pueden proceder de genes de mamíferos, microbios, virus o insectos. Además, puede incorporarse la capacidad de replicarse en un hospedador, normalmente conferida por un origen de replicación, y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de los transformantes. Pueden emplearse vectores derivados de virus, tales como lentivirus, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados y similares. Los vectores plasmídicos pueden linealizarse para su integración en una región genómica. En determinadas realizaciones, el vector de expresión es un plásmido. En determinadas realizaciones, el vector de expresión es un lentivirus, un adenovirus o un virus adenoasociado.

En determinadas realizaciones, el vector de expresión es un adenovirus. En

determinadas realizaciones, el vector de expresión es un virus adeno-asociado. En determinadas realizaciones, el vector de expresión es un lentivirus.

Como se utilizan en el presente documento, los términos "homóloga", "homología" o "porcentaje de homología" utilizados en este documento para describir una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácidos nucleicos en relación con una secuencia de referencia pueden determinarse utilizando la fórmula descrita por Karlin y Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-2268, 1990, modificado como en Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993). Dicha fórmula se incorpora a los programas de la herramienta básica de búsqueda de alineamiento local (BLAST) de Altschul et al. (J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990). El porcentaje de homología de las secuencias puede determinarse utilizando la versión más reciente de BLAST, en la fecha de presentación de esta solicitud.

Los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos descritos en el presente documento pueden utilizarse para infectar, transfectar, transformar o hacer transgénica de otro modo una célula adecuada para el ácido nucleico, permitiendo así la producción de anticuerpos para usos comerciales o terapéuticos. Las líneas celulares estándar y los métodos para la producción de anticuerpos a partir de un cultivo celular a gran escala son conocidos en la técnica. Véase, *por ejemplo*, Li et al., "Cell culture processes for monoclonal antibody production." *Mabs*. 2010 Sep-Oct; 2(5): 466-477. En determinadas realizaciones, la célula es una célula Eucariota. En determinadas realizaciones, la célula Eucariota es una célula de mamífero. En determinadas realizaciones, la célula de mamífero es una línea celular útil para producir anticuerpos es una célula de Ovario de Hámster Chino (CHO), una célula de mieloma murino NS0 o una célula PER.C6®. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico que codifica el anticuerpo se integra en un lugar genómico de una célula útil para producir anticuerpos. En determinadas realizaciones, se describe en el presente documento un método para fabricar un anticuerpo que comprende cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo bajo condiciones *in vitro* suficientes para permitir la producción y secreción de dicho anticuerpo.

En determinadas realizaciones, descritas en el presente documento, es un banco de células maestro que comprende: (a) una línea celular de mamífero que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo descrito en el presente documento integrado en una localización genómica; y (b) un crioprotector. En determinadas realizaciones, el crioprotector comprende glicerol o DMSO. En determinadas realizaciones, el banco celular maestro está contenido en un vial o contenedor adecuado capaz de soportar la congelación por nitrógeno líquido.

También se describen en el presente documento métodos para fabricar un anticuerpo descrito en el presente documento. Tales métodos comprenden la incubación de una célula o

línea celular que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo en un medio de cultivo celular bajo condiciones suficientes para permitir la expresión y secreción del anticuerpo, y la posterior recolección del anticuerpo del medio de cultivo celular. La recolección puede comprender además uno o más pasos de purificación para eliminar células vivas, restos celulares, proteínas o polipéptidos no anticuerpos, sales no deseadas, tampones y componentes del medio. En determinadas realizaciones, el o los pasos(s) de purificación adicional incluye(n) centrifugación, ultracentrifugación, purificación de proteína A, proteína G, proteína A/G o proteína L, y/o cromatografía de intercambio iónico.

"Tratar", "tratamiento" o "que trata", como se usa en el presente documento, se refiere a, *por ejemplo*, una intervención deliberada en un estado de enfermedad fisiológica que da como resultado la reducción de la gravedad de una enfermedad o afección; la reducción de la duración del curso de una afección; la mejora o eliminación de uno o más síntomas asociados con una enfermedad o afección; o la provisión de efectos beneficiosos a un sujeto con una enfermedad o afección. El tratamiento no requiere la cura de la enfermedad o afección subyacente.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz", "dosis eficaz", "cantidad efectiva" o "dosis terapéuticamente eficaz" de un fármaco o agente terapéutico es cualquier cantidad del fármaco que, cuando se utiliza solo o en combinación con otro agente terapéutico, protege a un sujeto contra la aparición de una enfermedad o favorece la regresión de la enfermedad evidenciada por una disminución de la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento de la frecuencia y duración de los periodos libres de síntomas de la enfermedad, o una prevención del deterioro o discapacidad debidos a la afección de la enfermedad. La capacidad de un agente terapéutico para promover la regresión de la enfermedad puede evaluarse utilizando una variedad de métodos conocidos por el profesional experto, tales como en sujetos humanos durante ensayos clínicos, en sistemas de modelos animales predictivos de la eficacia en humanos, o ensayando la actividad del agente en ensayos *in vitro*.

Tal como se utiliza en el presente documento, "farmacéuticamente aceptable" "con referencia a un portador" "excipiente" o "diluyente" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares que sean fisiológicamente compatibles. En algunos aspectos, el portador es adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, el anticuerpo, puede estar recubierto de un material para proteger el compuesto de la acción de los ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

Los compuestos farmacéuticos descritos en el presente documento pueden incluir una

o más sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" es una sal que conserva la actividad biológica deseada del compuesto original y no tiene efectos toxicológicos no deseados (véase, por ejemplo, Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1-19). Ejemplos de tales sales son las sales de adición de ácidos y las sales de adición de bases.

5 Las sales de adición ácida incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como el clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosfórico y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos, tales como los ácidos mono- y dicarboxílicos alifáticos, los ácidos alcanoicos sustituidos por fenilo, los ácidos hidroxialcanoicos, los ácidos aromáticos, los ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de adición de bases incluyen las
10 derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibencilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaina y similares.

En un aspecto, se describe en el presente documento un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une al receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF1R), en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: una
15 cadena pesada de inmunoglobulina CDR1 (HCDR1) que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 30 a 33; una cadena pesada de inmunoglobulina CDR2 (HCDR2) que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los SEQ ID NOs: 34 a 40; una cadena pesada de inmunoglobulina CDR3 (HCDR3) que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los SEQ ID NOs: 41 o 42; una cadena ligera de
20 inmunoglobulina CDR1 (LCDR1) que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los SEQ ID NOs: 43 a 45; una cadena ligera de inmunoglobulina CDR2 (LCDR2) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46; y/o una cadena ligera de inmunoglobulina CDR3 (LCDR3) que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los SEQ ID NOs:
25 47 a 49; en la que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo no comprende una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina idéntica a SEQ ID NO: 1 y/o una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina idéntica a SEQ ID NO: 2.

En un aspecto, se describe en el presente documento un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une al receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF1R), en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: (a)
30 una cadena pesada de inmunoglobulina CDR1 (HCDR1) que comprende la secuencia de aminoácidos SX₁GMH, en la que X₁ es H, Y, A, o T; (b) una cadena pesada de inmunoglobulina CDR2 (HCDR2) que comprende la secuencia de aminoácidos X₁IX₂X₃DX₄SX₅TYTADSVRG, en la que X₁ es I, T o Y, X₂ es W, N o A, X₃ es F, H, A o G, X₄ es G o A, X₅ es S o T; (c) una cadena
35 pesada de inmunoglobulina CDR3 (HCDR3) que comprende la secuencia de aminoácidos

ELX₁RRYFDL, en la que X₁ es G o N; (d) una cadena ligera de inmunoglobulina CDR1 (LCDR1) que comprende la secuencia de aminoácidos RASQSVSSX₁LA, en la que X₁ es Y, A, o T; (e) una cadena ligera de inmunoglobulina CDR2 (LCDR2) que comprende la secuencia de aminoácidos DASKRAT; y/o una cadena ligera de inmunoglobulina CDR3 (LCDR3) que

5 comprende la secuencia de aminoácidos QQRX₁KX₂PPWT, en la que X₁ es S o G, X₂ es Y o W; en la que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo no comprende una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina idéntica a SEQ ID NO: 1 y/o una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina idéntica a SEQ ID NO: 2. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada de

10 inmunoglobulina y una cadena ligera de inmunoglobulina, en las que la cadena pesada de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 3; y en las que la cadena ligera de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 4. En determinadas

15 realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada de inmunoglobulina y una cadena ligera de inmunoglobulina, en las que la cadena pesada de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 5; y en las que la cadena ligera de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al

20 menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 6. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada de inmunoglobulina y una cadena ligera de inmunoglobulina, en las que la cadena pesada de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID

25 NO: 7; y en las que la cadena ligera de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 8. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada de inmunoglobulina y una cadena ligera de inmunoglobulina, en las que la cadena pesada de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la

30 establecida en SEQ ID NO: 9; y en las que la cadena ligera de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 10. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada de inmunoglobulina y una

35 cadena ligera de inmunoglobulina, en las que la cadena pesada de inmunoglobulina comprende

una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 11; y en las que la cadena ligera de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 12. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada de inmunoglobulina y una cadena ligera de inmunoglobulina, en las que la cadena pesada de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 13; y en las que la cadena ligera de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 14. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada de inmunoglobulina y una cadena ligera de inmunoglobulina, en las que la cadena pesada de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 15; y en las que la cadena ligera de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 16. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada de inmunoglobulina y una cadena ligera de inmunoglobulina, en las que la cadena pesada de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 17; y en las que la cadena ligera de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 18. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada de inmunoglobulina y una cadena ligera de inmunoglobulina, en las que la cadena pesada de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 19; y en las que la cadena ligera de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 20. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada de inmunoglobulina y una cadena ligera de inmunoglobulina, en las que la cadena pesada de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 21; y en las que la cadena ligera de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID

NO: 22. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada de inmunoglobulina y una cadena ligera de inmunoglobulina, en las que la cadena pesada de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 51; y en las que la cadena ligera de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 52. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo IgG. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un Fab, F(ab)₂, o un fragmento variable de cadena simple (scFv). En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es quimérico o humanizado. En determinadas realizaciones, el anticuerpo inhibe la señalización a través de IGF1R. En determinadas realizaciones, el anticuerpo posee un K_D de menos de 5x10⁻⁹ M. En determinadas realizaciones, el anticuerpo posee un K_D de menos de 1x10⁻⁹ M. En determinadas realizaciones, el anticuerpo posee un K_D de menos de 5x10⁻¹⁰ M. En determinadas realizaciones, el anticuerpo posee una semivida de 14 días o más en un ser humano. En determinadas realizaciones, el anticuerpo posee una semivida de 21 días o más en un ser humano. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una sustitución M252Y/S254T/T256E de acuerdo a la numeración UE en una o ambas regiones constantes de cadena pesada.

En un aspecto, se describe en el presente documento un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une al receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF1R), en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: (a) un HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos SHGMH; (b) un HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos YIWFDGSSTYYADSVRG; (c) un HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos ELGRRYFDL; (d) un LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos RASQSVSSALA; (e) un LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos DASKRAT; y/o (f) un LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQRSKYPPWT. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada de inmunoglobulina y una cadena ligera de inmunoglobulina, en las que la cadena pesada de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 17; y en las que la cadena ligera de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 18. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada de inmunoglobulina y una cadena ligera de

inmunoglobulina, en las que la cadena pesada de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 17; y en el que la cadena ligera de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 18. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada de inmunoglobulina y una cadena ligera de inmunoglobulina, en las que la cadena pesada de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 51; y en las que la cadena ligera de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 52. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo IgG. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un Fab, F(ab)₂, o un fragmento variable de cadena simple (scFv). En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es quimérico o humanizado. En determinadas realizaciones, el anticuerpo inhibe la señalización a través de IGF1R. En determinadas realizaciones, el anticuerpo posee un K_D de menos de 5x10⁻⁹ M. En determinadas realizaciones, el anticuerpo posee un K_D de menos de 1x10⁻⁹ M. En determinadas realizaciones, el anticuerpo posee un K_D de menos de 5x10⁻¹⁰ M. En determinadas realizaciones, el anticuerpo posee una semivida de 14 días o más en un ser humano. En determinadas realizaciones, el anticuerpo posee una semivida de 21 días o más en un ser humano. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una sustitución M252Y/S254T/T256E de acuerdo a la numeración UE en una o ambas regiones constantes de cadena pesada.

En un aspecto, se describe en el presente documento un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une al receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF1R), en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: (a) un HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos SYGMH; (b) un HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos IIWFDGSSTYYADSVRG; (c) un HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos ELGRRYFDL; (d) un LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos RASQSVSSYLA; (e) un LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos DASKRAT; y/o (f) un LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQRSKYPPWT. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo IgG. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada de inmunoglobulina y una cadena ligera de inmunoglobulina, en las que la cadena pesada de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la

establecida en SEQ ID NO: 7; y en las que la cadena ligera de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 8. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada de inmunoglobulina y una cadena ligera de inmunoglobulina, en las que la cadena pesada de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 7; y en el que la cadena ligera de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 8. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un Fab, F(ab)₂, o un fragmento variable de cadena simple (scFv). En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es quimérico o humanizado. En determinadas realizaciones, el anticuerpo inhibe la señalización a través de IGF1R. En determinadas realizaciones, el anticuerpo posee un K_D de menos de 5x10⁻⁹ M. En determinadas realizaciones, el anticuerpo posee un K_D de menos de 1x10⁻⁹ M. En determinadas realizaciones, el anticuerpo posee un K_D de menos de 5x10⁻¹⁰ M. En determinadas realizaciones, el anticuerpo posee una semivida de 14 días o más en un ser humano. En determinadas realizaciones, el anticuerpo posee una semivida de 21 días o más en un ser humano. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una sustitución M252Y/S254T/T256E de acuerdo a la numeración UE en una o ambas regiones constantes de cadena pesada.

En un aspecto, se describe en el presente documento un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une al receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF1R), en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: (a) un HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos SHGMH; (b) un HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos IIAGDASTTYADSVRG; (c) un HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos ELGRRYFDL; (d) un LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos RASQSVSSYLA; (e) un LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos DASKRAT; y/o (f) un LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQRSKYPPWT. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada de inmunoglobulina y una cadena ligera de inmunoglobulina, en las que la cadena pesada de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 5; y en las que la cadena ligera de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 6. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada de inmunoglobulina y una cadena ligera de inmunoglobulina, en las que la cadena pesada de inmunoglobulina comprende una secuencia

de aminoácidos idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 5; y en el que la cadena ligera de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la establecida en SEQ ID NO: 6. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo IgG. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un Fab, F(ab)₂, o un fragmento variable de cadena simple (scFv). En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es quimérico o humanizado. En determinadas realizaciones, el anticuerpo inhibe la señalización a través de IGF1R. En determinadas realizaciones, el anticuerpo posee un K_D de menos de 5x10⁻⁹ M. En determinadas realizaciones, el anticuerpo posee un K_D de menos de 1x10⁻⁹ M. En determinadas realizaciones, el anticuerpo posee un K_D de menos de 5x10⁻¹⁰ M. En determinadas realizaciones, el anticuerpo posee una semivida de 14 días o más en un ser humano. En determinadas realizaciones, el anticuerpo posee una semivida de 21 días o más en un ser humano. En determinadas realizaciones, el anticuerpo posee una semivida de 25 días o más en un ser humano. En determinadas realizaciones, el anticuerpo posee una semivida de 30 días o más en un ser humano. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una sustitución M252Y/S254T/T256E de acuerdo a la numeración UE en una o ambas regiones constantes de cadena pesada.

En un aspecto, descrito en el presente documento, es un derivado de teprotumumab con afinidad aumentada, en el que el derivado de teprotumumab comprende una sustitución del triptófano en la posición 94 de SEQ ID NO: 2 a tirosina.

La señalización de IGF1R está perturbada (por ejemplo, aumentada) en varias enfermedades relevantes para los seres humanos, los anticuerpos descritos en el presente documento son potencialmente útiles para el tratamiento de tales enfermedades asociadas con esta señalización aberrante. Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden utilizarse para tratar eficazmente a individuos con trastornos IGF1R mediante la inhibición de la señalización IGF1R. La señalización del IGF1R se produce principalmente a través de las vías PI3K y RAS. La señalización o inhibición de IGF1R puede determinarse mediante la fosforilación de IGF1R. En determinadas realizaciones, los anticuerpos descritos en el presente documento exhiben una inhibición con una EC₅₀ de 10 ng/mL o menos. En determinadas realizaciones, los anticuerpos descritos en el presente documento exhiben una inhibición con una EC₅₀ de 9 ng/mL o menos. En determinadas realizaciones, los anticuerpos descritos en el presente documento exhiben una inhibición con una EC₅₀ de 8 ng/mL o menos. En determinadas realizaciones, los anticuerpos descritos en el presente documento exhiben una inhibición con una EC₅₀ de 7 ng/mL o menos. En determinadas realizaciones, los anticuerpos descritos en el presente documento exhiben una inhibición con una EC₅₀ de 6 ng/mL o menos. En

determinadas realizaciones, los anticuerpos descritos en el presente documento exhiben una inhibición con una EC50 de 5 ng/mL o menos. Tales ensayos para determinar la EC50 se describen en el presente documento y pueden llevarse a cabo con 200 ng/mL de IGF-1 humano recombinante utilizando 4×10^4 células NCI-H322/pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos pueden administrarse a un sujeto que los necesite (por ejemplo, aquejado de un trastorno de señalización de IGF1R o de una enfermedad asociada a una señalización aberrante de IGF1R) por cualquier vía adecuada para la administración de composiciones farmacéuticas que contengan anticuerpos, tales como, por ejemplo, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular o intratumoral, etc. En determinadas realizaciones, los anticuerpos se administran por vía intravenosa. En determinadas realizaciones, los anticuerpos se administran por vía subcutánea. En determinadas realizaciones, los anticuerpos se administran intratumoralmente. En determinadas realizaciones, los anticuerpos se administran en un esquema de dosificación adecuado, por ejemplo, semanal, dos veces por semana, mensual, dos veces por mes, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, o una vez al mes, etc. En determinadas realizaciones, los anticuerpos se administran una vez cada tres semanas. Los anticuerpos pueden administrarse en cualquier cantidad terapéuticamente eficaz. En determinadas realizaciones, la cantidad terapéuticamente aceptable está comprendida entre 0.1 mg/kg y aproximadamente 50 mg/kg. En determinadas realizaciones, la cantidad terapéuticamente aceptable está comprendida entre 1 mg/kg y aproximadamente 40 mg/kg. En determinadas realizaciones, la cantidad terapéuticamente aceptable está comprendida entre 1 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg. En determinadas realizaciones, la cantidad terapéuticamente aceptable está comprendida entre 1 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg. En determinadas realizaciones, la cantidad terapéuticamente aceptable está comprendida entre 5 mg/kg y aproximadamente 30 mg/kg. En determinadas realizaciones, la cantidad terapéuticamente aceptable está comprendida entre 5 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg.

Excipientes, soportes y diluyentes farmacéuticamente aceptables

En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-IGF1R de la presente divulgación se incluyen en una composición farmacéutica que comprende uno o más excipientes, portadores y diluyentes farmacéuticamente aceptables. Pueden incluirse excipientes, soportes y diluyentes farmacéuticamente aceptables para aumentar la vida útil, la estabilidad o la capacidad de administración del anticuerpo. Tales compuestos incluyen sales, tampones de pH, detergentes, anticoagulantes y conservantes. En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la presente divulgación se administran suspendidos en una solución estéril. En determinadas

realizaciones, la solución comprende aproximadamente 0.9% de NaCl. En determinadas realizaciones, la solución comprende aproximadamente un 5.0% de dextrosa. En determinadas realizaciones, la solución comprende además uno o más de: tampones, por ejemplo, acetato, citrato, histidina, succinato, fosfato, bicarbonato e hidroximetilaminometano (Tris); tensioactivos, por ejemplo, polisorbato 80 (Tween 80), polisorbato 20 (Tween 20) y poloxámero 188; poliol/disacárido/polisacáridos, por ejemplo, glucosa, dextrosa, manosa, manitol, sorbitol, sacarosa, trehalosa y dextrano 40; aminoácidos, por ejemplo, glicina o arginina; antioxidantes, por ejemplo, ácido ascórbico, metionina; o agentes quelantes, por ejemplo, EDTA o EGTA.

Los anticuerpos en formulaciones para administración subcutánea se presentan generalmente en forma altamente concentrada que comprende más de 50 mg/ml, 100 mg/ml, 200 mg/ml, o 300 mg/ml. Se conocen muchos excipientes útiles para las formulaciones subcutáneas. Véase, *por ejemplo*, Wang et al., *Antibody Therapeutics*, 2021, Vol. 4, No. 4 262–273

En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la presente divulgación pueden enviarse/almacenarse liofilizados y reconstituirse antes de su administración. En determinadas realizaciones, las formulaciones de anticuerpos liofilizados comprenden un agente de carga, tales como manitol, sorbitol, sacarosa, trehalosa, dextrano 40 o combinaciones de los mismos. La formulación liofilizada puede estar contenida en un vial de vidrio u otro material no reactivo adecuado. Cuando los anticuerpos son formulados, reconstituidos o no, pueden tamponarse a un pH determinado, generalmente inferior a 7.0. En determinadas realizaciones, el PH puede estar comprendido entre 4.5 y 7.0, 4.5 y 6.5, 4.5 y 6.0, 4.5 y 5.5, 4.5 y 5.0, o 5.0 y 6.0.

También se describen en el presente documento kits que comprenden uno o más de los anticuerpos descritos en el presente documento en un recipiente adecuado y uno o más componentes adicionales seleccionados entre: instrucciones de uso; un diluyente, un excipiente, un portador y un dispositivo para la administración (por ejemplo, una jeringa/aguja u otro inyector).

En determinadas realizaciones, se describe en el presente documento un método de preparación de una composición para inhibir la singularización de IGF1R en un individuo que comprende mezclar uno o más excipientes, portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables y un anticuerpo de la presente divulgación. En determinadas realizaciones, se describe en el presente documento un método de preparación de un tratamiento contra el cáncer para su almacenamiento o envío que comprende la liofilización de uno o más anticuerpos de la presente divulgación.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos ilustrativos son representativos de realizaciones de

composiciones y métodos descritos en el presente documento y no pretenden ser limitativos en modo alguno.

Ejemplo 1 -Determinación de la afinidad de los anticuerpos

Con el fin de desarrollar anticuerpos con mayor afinidad necesarios para una formulación subcutánea múltiples mutantes de un anticuerpo de referencia con regiones variables de teprotumumab (que comprenden regiones variables que comprenden SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO 2) para determinar la afinidad de unión. Los anticuerpos descritos en el presente documento fueron sometidos a pruebas de afinidad de unión al IGF1R por Octet. Los resultados se muestran a continuación en la **Tabla 1**. Las alineaciones de secuencias de todos los mutantes de teprotumumab se muestran en **FIG. 1A** y la **FIG. 1B**. Sorprendentemente, la mutación del triptófano en la posición 94 de la cadena ligera a tirosina estaba presente en todos los anticuerpos. Esto fue sorprendente, ya que generalmente las CDR de cadena ligera son menos importantes para la afinidad de unión que las CDR de cadena pesada.

Tabla 1			
Anticuerpo (Fab)	K_D (M)	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)
Referencia (Teprotumumab)	5.17E-09	1.51E+06	7.81E-03
B10	8.98E-10	9.21E+05	8.26E-04
B09	1.13E-09	7.05E+05	7.99E-04
B02	1.54E-09	8.10E+05	1.25E-03
D10	6.90E-10	9.84E+05	6.79E-04
F02	1.92E-09	1.20E+06	2.30E-03
H11	4.18E-10	1.78E+06	7.44E-04
C10	4.47E-10	1.08E+06	4.85E-04
D03	4.07E-10	1.48E+06	6.03E-04
A11	8.49E-10	8.95E+05	7.60E-04
E01	1.79E-10	2.66E+06	2.98E-04

Mediciones de afinidad de Variantes de Teprotumumab mediante Inferometría de Bicapa

El IGF-I R humano (Glu 31 - Asn 932 con una etiqueta de polihistidina en el extremo C) expresado a partir de células 293 humanas (HEK293) se adquirió a ACROBiosystems (Newark, DE). Se habilitaron biosensores Ni-NTA (NTA) de inmersión y lectura de Sartorius (Bohemia, NY) preinmovilizados con Tris-NTA cargado con níquel, para la caracterización cinética de nuevos anticuerpos anti IGF-I R humanos. Brevemente, las variantes de anticuerpos se digirieron en fragmentos Fab purificados (para permitir la unión 1:1 y el ajuste global). Se utilizó

el kit FabALACTICA Fab de GENOVIS (Cambridge, MA) para generar un dominio Fab de unión monovalente de cada variante de anticuerpo, los fragmentos Fab se separan posteriormente de Fc utilizando la columna CaptureSelect™ Fc. La unión de los Fabs variantes a IGF-I R humano capturado con NTA (marcado con His) se monitorizó mediante interferometría de bicapa (BLI) en un Octet RED96e (Sartorius). Los biosensores NTA se cargaron con 10 mM de NiCl₂ y, a continuación, se cargaron con IGF-I R humano marcado con His a aproximadamente 5 ug/mL hasta obtener una respuesta de carga media de 0.67 nm de desplazamiento. Los Fabs variantes se ensayaron de 0-100 nM en tampón cinético 10X (1X PBS, 0.1% BSA, 0.02% Tween-20 más Kathon como conservante) de Sartorius. La cinética y afinidades de unión se determinaron utilizando el software Octet Analysis Studio (Sartorius) aplicando un ajuste global 1:1 a los datos sustraídos con doble referencia.

Ejemplo 2 -Actividad biológica de los mutantes de teprotumumab

La actividad biológica de los mutantes de teprotumumab se determinó evaluando la inhibición de la fosforilación del IGF-1R y la unión de los ligandos IGF-1 e IGF-2 al receptor. Los resultados se muestran en las **Tablas 2 a 4**. Los clones generales mostraron una actividad biológica comparable o mejor que el teprotumumab de referencia, lo que indica que las mejoras en la afinidad observadas en el ejemplo 2 se extienden también a la actividad biológica.

Tabla 2	
Inhibición de la fosforilación	
	IC50 (ng/ml)
E01	6.4
D03	4.9
D10	6.7
B09	8.3
B10	16.2
B02	13.5
H11	21.1
C10	6.5
A11	11.5
Referencia de Teprotumumab	10.6

Tabla 3	
Inhibición de IGF-1	

	IC50 (ng/ml)
E01	387.5
D03	387.8
D10	386.3
B09	336.8
B10	394.5
B02	385.5
H11	452
C10	Sin datos
A11	351.5
Referencia de Teprotumumab	449

Tabla 4	
Inhibición de IGF-2	
	IC50 (ng/ml)
E01	141.5
D03	160.5
D10	173.5
B09	153.5
B10	176.0
B02	114.5
H11	156.5
C10	Sin datos
A11	157.5
Referencia de Teprotumumab	260.3

Inhibición de la fosforilación de IGF-1R

Se sembraron 4×10^4 células NCI-H322/pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo plano y se incubaron durante la noche en un incubador a 37°C, 5%. Las células se trataron con diferentes concentraciones de anti-IGF1R durante 1 hora y se estimularon con 200ng/mL de proteína IGF-1 humana recombinante durante 30 minutos. A continuación, se determinó el IGF-1 fosforilado en el lisado celular mediante el kit de lisado de células enteras Insulin Signaling Panel (MSD) siguiendo el protocolo del fabricante.

Ensayo de inhibición de la unión de IGF-1

Las placas Maxisorp se recubrieron con 1.5 ug/mL de IGF-1R durante la noche a 4°C. Se lavaron las placas y se bloquearon con BSA al 1%. Posteriormente, se incubaron anticuerpos anti-IGF1R diluidos en serie durante 30 min a temperatura ambiente, seguidos de una incubación con una concentración final de 20ng/mL de biotina IGF-1. Se lavaron las placas y se añadió estreptavidina-peroxidasa de rábano picante. Tras un último lavado, se añadió 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina durante 8 minutos. La reacción se terminó con una solución de parada a base de HCL. Se midió la absorbancia de las placas a 450 nM y se analizaron los datos con el software Softmax Pro 7.1.

Ensayo de inhibición de la unión de IGF-2

Las placas Maxisorp se recubrieron con 1.5 ug/mL de IGF-1R durante la noche a 4°C. Se lavaron las placas y se bloquearon con BSA al 1%. Posteriormente, se incubaron anticuerpos anti-IGF1R diluidos en serie durante 30 min a temperatura ambiente, seguidos de una incubación con una concentración final de 200ng/mL de biotina IGF-2. Se lavaron las placas y se añadió estreptavidina-peroxidasa de rábano picante. Tras un último lavado, se añadió 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina durante 8 minutos. La reacción se terminó con una solución de parada a base de HCL. Se midió la absorbancia de las placas a 450 nM y se analizaron los datos con el software Softmax Pro 7.1.

Ejemplo 3 -Clon D03 con mutación YTE muestra actividad ADCC comparable a teprotumumab

Los anticuerpos de mayor afinidad pueden promover una mayor citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) cuando se administran a un individuo. Para su uso en el tratamiento de afecciones oftálmicas y otras afecciones asociadas con afecciones autoinmunes o inflamatorias, un aumento de la ADCC sería indeseable. Se seleccionó el clon D03 para seguir probando su actividad ADCC utilizando diferentes mutaciones de la región constante de la cadena pesada (la mutación "YTE", que posee mutaciones en M252Y/S254T/T256E de acuerdo a la numeración de la UE; y la mutación "LS" Met428Leu/Asn434Ser de acuerdo a la numeración de la UE). Como se muestra en **FIG. 2**, comparado con teprotumumab (triángulos invertidos), el clon D03 formateado con una mutación LS ("D03-LS") mostró sorprendentemente una mayor ADCC en comparación con el clon D03 con la mutación YTE ("D03-YTE"). El D03-YTE mostró una ADCC comparable a la del teprotumumab.

Ensayo ADCC

Los anticuerpos se incubaron con células DU145 durante 4 horas a la concentración indicada, momento en el que se añadieron células efectoras con un reportero ADCC luminiscente para la incubación durante toda la noche, se añadió el reactivo de detección BioGlo

durante 10 minutos y se leyeron los resultados en un luminómetro.

Ejemplo 3 -El clon D03 con la mutación YTE presenta una semivida 2-3 veces mayor en comparación con el teprotumumab.

La semivida del clon D03-YTE se probó en monos cynomolgus. Los monos Cynomolgus recibieron dosis de D03-YTE de 150 mg/kg por vía intravenosa, 150 mg/kg por vía subcutánea o 75 mg/kg por vía subcutánea. Se recogieron muestras de suero a las 2, 6, 24, 96, 168, 336, 504, 672, 1008, 1344, 1680 y 2016 horas. Se analizaron muestras de suero para D03-YTE mediante ELISA. Como se muestra a continuación en la **Tabla 5** D03 posee una semivida sérica mayor en comparación con teprotumumab.

Tabla 5				
Dosis (mg/kg)	Vía	t_{1/2} (día)¹	AUC_{inf} (µg·día/mL)	C_{max} (µg/mL)
150 (n=3)	IV	29.9 (4.6)	47980 (5941)	3321 (489)
150 (n=2) ²	SC	22.4	27562	804 (33.0)
75 (n=5) ²	SC	18.6 (3.2)	12905 (2001)	412 (48.4)
Tepro (150)	IV	10.1	NA	NA

Ejemplo 4 -El clon D03 con la mutación YTE muestra una mayor inhibición de la fosforilación del IGF-1R en comparación con el teprotumumab.

Se comprobó la capacidad del D03-YTE para inhibir la fosforilación del IGF-1R. Se realizaron experimentos como los descritos en el Ejemplo 2, con la siguiente modificación: la dilución de los anticuerpos anti-IGF-1R se inició a 100 µg/mL y se diluyó 1/8 permitiendo una inhibición del 100% por teprotumumab. Los experimentos en **FIG. 3** muestran que en este montaje experimental Teprotumumab (círculos) exhibió una IC₅₀ de 397.4 ng/mL frente a 20.51 ng/mL para D03-YTE (cuadrados).

Ejemplo 5 - Los mutantes de Teprotumumab conservan la fabricabilidad del clon parental

Un factor limitante a la hora de desarrollar anticuerpos para inyección subcutánea, es que además de unirse con alta afinidad y/o poseer semividas más largas *in vivo*, los anticuerpos deben poseer propiedades biofísicas favorables tales como baja hidrofobicidad, propensión a formar agregados y la capacidad de existir en formulaciones con baja viscosidad. Cualquier mutación realizada en un anticuerpo puede afectar negativamente a estas características, sin

embargo, como se muestra en este ejemplo, a pesar del aumento de la afinidad y la potencia biológica, no se produjeron cambios perjudiciales con respecto a los criterios clave de fabricabilidad. Como se muestra en la **Tabla 6**, D03 con una mutación YTE no exhibió un aumento de la degradación cuando se sometió a degradación forzada a 40° C durante 28 días en comparación con teprotumumab con una mutación YTE (Composición del tampón: 20 mM Histidina/Histidina-HCl, 40 mM L-Metionina, 210 mM Trehalosa, pH 5.5, 0.2% PX188).

Tabla 6				
	% Pérdida de monómero/Mes		Fragmentación/Mes	Agregación/mes*
	Sin exclusiones	T0 Excluido	Sin exclusiones	T0 Excluido
B09 LS	0.4	0.52	0.52	-0.16
B09 YTE	0.6	0.68	0.6	0
D03 LS	0.24	0.4	0.52	-0.24
D03 YTE	0.4	0.4	0.52	-0.16
E01 LS	0.4	0.52	0.52	-0.12
E01 YTE	0.48	0.52	0.52	0
Tepro LS	N.A.	0.28	0.6	-1.04
Tepro WT	0	0.4	0.56	-0.56
Tepro YTE	0.32	0.52	0.64	-0.24

Se evaluaron las variantes anti-IGF-1R para garantizar que las mutaciones de los dominios Fc y variable no aumentaran significativamente la viscosidad. Véase **Tabla 7**. El aumento de la viscosidad no es deseable, ya que puede limitar las opciones de formulación líquida para la administración subcutánea. La viscosidad de las variantes anti-IGF-1R se evaluó inicialmente a ~130 mg/ml. Una variante (B09-YTE) mostró una mayor viscosidad en comparación con otras variantes y mAbs de control y esta variante no se evaluó a concentraciones más altas. Como había poca diferenciación a ~130 mg/ml, la viscosidad se evaluó a una concentración más alta (~170 mg/ml). A 170 mg/ml, todas las variantes D03 y E01 tuvieron mediciones de viscosidad por debajo de 20 cP y fueron similares a los controles de teprotumumab.

Los anticuerpos se formularon en el siguiente tampón: 20 mM Histidina/Histidina-HCl, 40 mM L-Metionina, 210 mM Trehalosa, pH 5.5, 0.2% PX188. Los anticuerpos se evaluaron a

concentraciones de 130 mg/ml y 170 mg/ml y a 20° y 25°C. La concentración de anticuerpos se determinó mediante SoloVPE (por triplicado). La viscosidad se evaluó mediante un RheoSense m-VROC con la velocidad de barrido de cizallamiento aplicada 400-2700 /s a 20°C y 25°C recogiendo 8-12 segmentos.

5

Tabla 7				
	Viscosidad (cP) 135mg/ml		Viscosidad (cP) 170mg/ml	
	20 °C	25 °C	20 °C	25 °C
B09 LS	8.1	6.9	N.D.	N.D.
B09 YTE	10.7	9.1	N.D.	N.D.
D03 LS	8	6.3	15.1	11
D03 YTE	8.4	6.6	12.7	9.3
E01 LS	7.8	6.5	12.8	10.5
E01 YTE	7.2	6	15.2	12.3
Tepro LS	7.2	6	13.9	11.2
Tepro WT	6.9	5.8	11.4*	9.3*
Tepro YTE	7.4	6.3	N.D.	N.D.

10

15

20

Las variantes anti-IGF-1R se evaluaron mediante análisis de cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) (Tabla 8). El HIC es una evaluación emergente del carácter hidrófobo de los anticuerpos y otras proteínas. Un exceso de carácter hidrófobo puede ser perjudicial para la estabilidad general y provocar un aumento de las uniones no específicas y de las autointeracciones. Todas las variantes Anti-IGF-1R presentaron perfiles de elución similares a los controles de teprotumumab. No se observaron aumentos del carácter hidrófobo. Teprotumumab y sus variantes eluyeron antes que el control positivo (NISTmAb) y significativamente antes que CNTO607 (un mAAb con conocido carácter hidrofóbico que causa problemas de desarrollabilidad). Estos datos sugieren que las mutaciones introducidas para aumentar la afinidad por el IGF-1R o la prolongación de la semivida no afectaron al carácter hidrofóbico general de las variantes.

25

30

El HIC se realizó utilizando un HPLC Agilent 1260 Infinity II con una columna ProPac HIC-10, 5 µm, 4.6 × 100 mm (ThermoFisher PN:063655). Los parámetros del método se tomaron directamente del inserto del producto MabPAC-10. Se utilizaron los siguientes

35

tampones: TampónA: 2 M de sulfato amónico , 0.1 M de fosfato sódico, 2-propanol (93:7 v/v), pH 7.0; TampónB: 0.1 M de fosfato sódico , 2-propanol (93:7 v/v), pH 7.0. Tras 5 minutos de equilibrio en Tampón A al 95% y Tampón B al 5%, se empleó un gradiente de 25 minutos que finalizó con Tampón B al 100%. La temperatura fue de 30°C y se utilizó detección UV a 214nM para visualizar la elución de proteínas. También se evaluaron como comparadores NISTmAb (IgG1 humana de control positivo) y CNTO607 (un mAb de carácter hidrofóbico conocido).

Tabla 8	
	Tiempo de retención (min)
B09 LS	21.0
B09 YTE	20.9
D03 LS	21.2
D03 YTE	21.1
E01 LS	21.2
E01 YTE	21.0
Tepro LS	21.5
Tepro WT	21.3
Tepro YTE	21.4
NISTmAb	22.6
CNTO607	25.7

Mientras que realizaciones preferentes de la presente invención se han mostrado y descrito en el presente documento, será obvio para los expertos en la técnica que tales realizaciones se proporcionan únicamente a modo de ejemplo. A los expertos en la técnica se les ocurrirán ahora numerosas variaciones, cambios y sustituciones sin apartarse de la invención. Debe entenderse que pueden emplearse diversas alternativas a las realizaciones de la invención descrita en el presente documento en la práctica de la invención.

Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes emitidas y otros documentos a los que se hace referencia en esta especificación se incorporan en el presente documento por referencia como si cada publicación individual, solicitud de patente, patente emitida u otro documento se indicara específica e individualmente que se incorpora por referencia en su totalidad. Las definiciones contenidas en textos incorporados por referencia quedan excluidas en la medida en que contradigan las definiciones de esta divulgación.

Secuencias descritas en el presente documento

SEQ ID NO 1

>Teprotumumab_VH

QVELVESGGGVVQPGRSQRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIIWFDGSSTYYA
DSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARELGRRYFDLWGRGTLVSVSS
SEQ ID NO 2

5 >Teprotumumab_VL

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASKRATGIPARFS
GSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSKWPPWTFGQGTKVESK
SEQ ID NO 3

>B02_VH

10 QVELVESGGGVVQPGRSQRLSCAASGFTFSSTGMHWVRQAPGKGLEWVAYIWFDGSSTYY
ADSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARELNRRYFDLWGRGTLVSVSS
SEQ ID NO 4

>B02_VL

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASKRATGIPARFS
15 GSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSKYPPWTFGQGTKVESK
SEQ ID NO 5

>B09_VH

QVELVESGGGVVQPGRSQRLSCAASGFTFSSHGMHWVRQAPGKGLEWVAIIAGDASTTYYA
DSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARELGRRYFDLWGRGTLVSVSS
20 SEQ ID NO 6

>B09_VL

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASKRATGIPARFS
GSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSKYPPWTFGQGTKVESK
SEQ ID NO 7

25 >E01_VH

QVELVESGGGVVQPGRSQRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIIWFDGSSTYYA
DSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARELGRRYFDLWGRGTLVSVSS
SEQ ID NO 8

>E01_VL

30 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASKRATGIPARFS
GSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSKYPPWTFGQGTKVESK
SEQ ID NO 9

>B10_VH

QVELVESGGGVVQPGRSQRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVATIWFDGSSTYY
35 ADSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARELGRRYFDLWGRGTLVSVSS

SEQ ID NO 10

>B10_VL

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASKRATGIPARFS
GSGSGTDFLTITISLEPEDFAVYYCQQRSKYPPWTFGQGGTKVESK

5 SEQ ID NO 11

>D10_VH

QVELVESGGGVVQPGRSQRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIINFDGSSTYYA
DSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARELGRRYFDLWGRGTLVSVSS

SEQ ID NO 12

10 >D10_VL

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASKRATGIPARFS
GSGSGTDFLTITISLEPEDFAVYYCQQRSKYPPWTFGQGGTKVESK

SEQ ID NO 13

>C10_VH

15 QVELVESGGGVVQPGRSQRLSCAASGFTFSSAGMHWRQAPGKGLEWVAIIWADGSSTYY
ADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARELGRRYFDLWGRGTLVSVSS

SEQ ID NO 14

>C10_VL

20 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASKRATGIPARFS
GSGSGTDFLTITISLEPEDFAVYYCQQRSKYPPWTFGQGGTKVESK

SEQ ID NO 15

>A11_VH

QVELVESGGGVVQPGRSQRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAYIWFDGSSTYY
ADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARELGRRYFDLWGRGTLVSVSS

25 SEQ ID NO 16

>A11_VL

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASKRATGIPARFS
GSGSGTDFLTITISLEPEDFAVYYCQQRSKYPPWTFGQGGTKVESK

SEQ ID NO 17

30 >D03_VH

QVELVESGGGVVQPGRSQRLSCAASGFTFSSHGMHWVRQAPGKGLEWVAYIWFDGSSTYY
ADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARELGRRYFDLWGRGTLVSVSS

SEQ ID NO 18

>D03_VL

35

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSALAWYQQKPGQAPRLLIYDASKRATGIPARFS
 GSGSGDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSKYPPWTFGQGTKVESK

SEQ ID NO 19

>F02_VH

5 QVELVESGGGVVQPGRSQRLSCAASGFTFSSHGMHWVRQAPGKGLEWVATIWFDDGSSTYY
 ADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARELGRRYFDLWGRGTLVSVSS

SEQ ID NO 20

>F02_VL

10 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSTLAWYQQKPGQAPRLLIYDASKRATGIPARFSG
 SSGSGDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSKYPPWTFGQGTKVESK

SEQ ID NO 21

>H11_VH

15 QVELVESGGGVVQPGRSQRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVATIWHDDGSSTYY
 ADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARELGRRYFDLWGRGTLVSVSS

SEQ ID NO 22

>H11_VL

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSALAWYQQKPGQAPRLLIYDASKRATGIPARFS
 GSGSGDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRGKYPPWTFGQGTKVESK

20	S E Q I D N O		SECUENCIA
25	30	HC DR 1	SHGMH
30	31	HC DR 1	STGMH
35	32	HC DR 1	SAGMH

5

10

15

20

25

30

35

33	HC DR 1	SYGMH
34	HC DR 2	IIAGDASTTYADSVRG
35	HC DR 2	YIWFDGSSTYYADSVRG
36	HC DR 2	IIWADGSSTYYADSVRG
37	HC DR 2	IINFDDGSSTYYADSVRG
38	HC DR 2	IIWFDGSSTYYADSVRG
39	HC DR 2	TIWHDGSSTYYADSVRG
40	HC DR 2	TIWFDGSSTYYADSVRG
41	HC DR 3	ELGRRYFDL
42	HC DR 3	ELNRRYFDL
43	LC DR 1	RASQSVSSALA

5	44	LC DR 1	RASQSVSSTLA
	45	LC DR 1	RASQSVSSYLA
	46	LC DR 2	DASKRAT
	47	LC DR 3	QQRGKYPPWT
	48	LC DR 3	QQRSKYPPWT
10	49	LC DR 3	QQRSKWPPWT
	51	Ca den a pes ada	QVELVESGGGVVQPGRSQRLSCAASGFTFSSHGMHWVRQAPGKGLEWVAYI WFDGSSTYYADSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARELGRRY FDLWGRGTLVSVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
25	52	Ca den a lige ra	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSALAWYQQKPGQAPRLLIYDASKR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSKYPPWTFGQGTKVESK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C