

ANTICUERPOS ANTI-*PSEUDOMONAS* BIESPECÍFICOS CON REGIONES FC
MODIFICADAS Y MÉTODOS DE USO DE ESTOS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de los EE. UU. núm. 63/501.036 presentada el 9 de mayo de 2023, la cual se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS PRESENTADO ELECTRÓNICAMENTE

10 El contenido del listado de secuencias presentado electrónicamente (Nombre: PSEUD-110-WO-PCT_Seqlisting_ST26.xml; tamaño: 58.580 bytes; y fecha de creación: 23 de abril de 2024), que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA DESCRIPCIÓN

15 Esta descripción se relaciona con anticuerpos biespecíficos anti-Psl y anti-PcrV de *Pseudomonas*. Tales anticuerpos se pueden usar, por ejemplo, en la prevención y tratamiento de infecciones por *Pseudomonas*. Ventajosamente, los anticuerpos biespecíficos anti-Psl y anti-PcrV de *Pseudomonas* exhiben una agregación reducida durante la elaboración y tienen una vida media clínicamente útil. Además, la descripción
20 proporciona composiciones útiles en tales terapias.

ANTECEDENTES DE LA DESCRIPCIÓN

La *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) es un patógeno oportunista gramnegativo que causa infecciones tanto agudas como crónicas en individuos comprometidos (Ma et al., *Journal of Bacteriology* 189(22):8353-8356 (2007)). Esto se debe en parte a la alta
5 resistencia innata de la bacteria a los antibióticos usados clínicamente y en parte a la formación de biopelículas altamente resistentes a los antibióticos (Drenkard E., *Microbes Infect* 5:1213-1219 (2003); Hancoke & Speert, *Drug Resist Update* 3:247-255 (2000)).

P. aeruginosa es una causa común de infecciones adquiridas en hospitales en el mundo occidental. Es un agente causal frecuente de bacteriemia en víctimas de
10 quemaduras e individuos inmunocomprometidos (Lyczak et al., *Microbes Infect* 2:1051-1060 (2000)). También es la causa más común de neumonía gramnegativa nosocomial (Craven et al., *Semin Respir Infect* 11:32-53 (1996)), especialmente en pacientes ventilados mecánicamente, y es el patógeno más prevalente en los pulmones de individuos con fibrosis quística (Pier et al., *ASM News* 6:339-347 (1998)).

Además, se sabe que la *P. aeruginosa* coloniza las vías respiratorias en pacientes
15 con bronquiectasias por fibrosis no quística. La bronquiectasia por fibrosis no quística es una enfermedad crónica caracterizada por dilatación anormal y permanente de los bronquios que da como resultado tos crónica, producción de esputo e infecciones bacterianas recurrentes de las vías respiratorias. Los pacientes con bronquiectasias sufren una alta morbilidad
20 debido a las frecuentes exacerbaciones que deterioran la calidad de vida y facilitan la resistencia a los antibióticos, lo que conduce a una reducción de la función pulmonar.

Se informa que el exopolisacárido Psl de *Pseudomonas* está anclado a la superficie de *P. aeruginosa* y se cree que es importante para facilitar la colonización de los tejidos

del huésped y para establecer/mantener la formación de biopelículas (Jackson, K. D., et al., *J Bacteriol* 186, 4466-4475 (2004)). Su estructura comprende pentasacáridos repetitivos ricos en manosa (Byrd, M. S., et al., *Mol Microbiol* 73, 622-638 (2009)).

La PcrV es un componente del sistema de secreción tipo III. La PcrV parece ser un
 5 componente integral del aparato de translocación del sistema de secreción tipo III que media el suministro de las toxinas secretoras tipo III a las células eucariotas diana (Sawa T., et al. *Nat. Med.* 5, 392-398 (1999)). La inmunización activa y pasiva contra PcrV mejoró la lesión pulmonar aguda y la mortalidad de ratones infectados con *P. aeruginosa* citotóxica (Sawa et al. 2009). El principal efecto de la inmunización contra PcrV se debió al bloqueo
 10 de la translocación de las toxinas secretoras tipo III a células eucariotas.

Debido al aumento de la resistencia a múltiples fármacos, sigue existiendo una necesidad en la técnica de desarrollar agentes mejorados para dirigirse a las *Pseudomonas*.

BREVE SUMARIO

15 En la presente se proporcionan anticuerpos biespecíficos contra la proteína PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* y exopolisacárido Psl que comprenden modificaciones en su región Fc que pueden dar como resultado una vida media aumentada.

En algunos aspectos proporcionados en la presente, la presente descripción se relaciona con un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a la proteína PcrV de
 20 *Pseudomonas aeruginosa* y exopolisacárido Psl, en donde el anticuerpo comprende una región Fc de IgG modificada, la región Fc de IgG modificada que comprende sustituciones de aminoácidos en dos o más de las posiciones 432 a 437, enumeradas de acuerdo con el índice de numeración EU de Kabat, en relación con una región Fc de IgG silvestre; en donde

(i) las posiciones 432 y 437 están sustituidas cada una con cisteína;

(ii) la posición 433 es histidina o está sustituida por arginina, prolina, treonina, lisina, serina, alanina, metionina o asparagina;

(iii) la posición 434 es asparagina o está sustituida por arginina, triptófano, histidina, fenilalanina, tirosina, serina, metionina o treonina;

(iv) la posición 435 es histidina; y

(v) la posición 436 es tirosina o fenilalanina o está sustituida por leucina, arginina, isoleucina, lisina, metionina, valina, histidina, serina o treonina; y

en donde el anticuerpo tiene una vida media aumentada en comparación con la vida media de un anticuerpo correspondiente que tiene la región Fc IgG silvestre.

En algunos aspectos, la región Fc IgG modificada es una región Fc IgG1 modificada. En algunos aspectos, la región Fc IgG modificada es una región Fc IgG humana modificada (p. ej., una región Fc IgG1 humana modificada).

En algunos aspectos, el anticuerpo biespecífico exhibe menos agregación en solución que un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 19, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 20. En algunos aspectos, el anticuerpo biespecífico exhibe menos agregación en una prueba de sobrecrecimiento en placa agitada que un anticuerpo que comprende la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 19, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 20.

En algunos aspectos, el anticuerpo biespecífico promueve la actividad de destrucción opsonofagocítica de *P. aeruginosa*, opcionalmente en donde el anticuerpo

biespecífico media la actividad de destrucción opsonofagocítica *in vitro* similar de *P. aeruginosa* como un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 19, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 20.

5 En algunos aspectos, el anticuerpo biespecífico promueve además una inserción de aminoácidos después de la posición 437, opcionalmente en donde la inserción de aminoácidos es ácido glutámico.

 En algunos aspectos, la afinidad de unión del anticuerpo biespecífico para FcRn a pH 6,0 es mayor que la afinidad de unión para FcRn de un anticuerpo correspondiente que tiene la región Fc IgG1 humana silvestre a pH 6. En algunos aspectos, la afinidad de unión del anticuerpo biespecífico para FcRn a pH 7,4 es mayor que la afinidad de unión para FcRn de un anticuerpo correspondiente que tiene la región Fc IgG1 humana silvestre a pH 7,4. En algunos aspectos proporcionados en la presente, la región Fc IgG1 humana modificada exhibe una dependencia del pH aumentada en la afinidad de unión para FcRn en comparación con un anticuerpo correspondiente que tiene la región Fc IgG1 humana silvestre.

 En algunos aspectos, la región Fc IgG1 humana modificada tiene sustituciones de aminoácidos en tres de las posiciones 432, 433, 434, 435, 436 y 437. En algunos aspectos, la región Fc IgG1 humana modificada tiene sustituciones de aminoácidos en cuatro de las posiciones 432, 433, 434, 435, 436 y 437. En algunos aspectos, la región Fc IgG1 humana modificada tiene sustituciones de aminoácidos en cinco de las posiciones 432, 433, 434, 435, 436 y 437. En algunos aspectos, la región Fc IgG1 humana modificada tiene sustituciones de aminoácidos en seis de las posiciones 432, 433, 434, 435, 436 y 437.

En algunos aspectos, la región Fc IgG1 humana modificada comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 44 o la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 33.

En algunos aspectos, el anticuerpo biespecífico no es un HexaBody.

5 En algunos aspectos, el anticuerpo biespecífico inhibe competitivamente la unión a PcrV de un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 13 y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 14.

10 En algunos aspectos, el anticuerpo biespecífico se une al mismo epítipo de PcrV que un anticuerpo que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 13 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 14.

En algunos aspectos, el anticuerpo biespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une a la proteína PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* y comprende una VH-
 15 CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1, una VH-
 CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 2, una VH-
 CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 3, una VL-
 CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 4, una VL-
 CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 5 y una VL-
 20 CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 6.

En algunos aspectos, el dominio de unión al antígeno que se une a la proteína PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* comprende una VH que comprende la secuencia de

aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 13 y/o una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 14.

En algunos aspectos, el dominio de unión al antígeno que se une a la proteína PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* comprende una región variable de cadena pesada y una
5 región variable de cadena ligera en polipéptidos separados.

En algunos aspectos, el anticuerpo biespecífico inhibe competitivamente la unión a Psl de un anticuerpo que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 15 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 16.

10 En algunos aspectos, el anticuerpo biespecífico se une al mismo epítipo de Psl como un anticuerpo que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 15 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 16.

En algunos aspectos proporcionados en la presente, el anticuerpo comprende un
15 dominio de unión al antígeno que se une al exopolisacárido Psl de *Pseudomonas aeruginosa* y comprende una región variable de cadena pesada VH-CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 7, una VH-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 8, una VH-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 9, una región variable de cadena ligera VL-
20 CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 10, una VL-CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 11 y una VL-CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 12.

En algunos aspectos proporcionados en la presente, el dominio de unión al antígeno que se une al exopolisacárido Psl de *Pseudomonas aeruginosa* comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 15 y/o una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 16.

5 En algunos aspectos, el dominio de unión al antígeno que se une al exopolisacárido Psl de *Pseudomonas aeruginosa* comprende una VH y una VL en el mismo polipéptido. En algunos aspectos, el dominio de unión al antígeno que se une al exopolisacárido Psl de *Pseudomonas aeruginosa* comprende un enlazador entre la VH y la VL, opcionalmente en donde el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 18.

10 En algunos aspectos, el dominio de unión al antígeno que se une al exopolisacárido Psl de *Pseudomonas aeruginosa* comprende un scFv. En algunos aspectos, el scFv comprende un enlazador, opcionalmente en donde el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 18. En algunos aspectos, el scFv está en la orientación VH-enlazador-VL. En algunos aspectos, el scFv comprende la secuencia de
15 aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 17. En algunos aspectos, el scFv está en la misma cadena polipeptídica que el VH del dominio de unión al antígeno que se une a la proteína PcrV de *Pseudomonas aeruginosa*. En algunos aspectos, el scFv es C-terminal a la VH del dominio de unión al antígeno que se une a la proteína PcrV de *Pseudomonas aeruginosa*.

En algunos aspectos, el anticuerpo biespecífico comprende (i) una cadena pesada
20 de la fórmula VH-CH1-H1-L1-S-L2-H2-CH2-CH3, en donde VH es un dominio variable de cadena pesada de anti-PcrV de *Pseudomonas aeruginosa*; CH1 es un dominio 1 de región constante de cadena pesada; H1 es un primer fragmento de región bisagra de cadena pesada; L1 es un primer enlazador; S es una molécula scFv de anti-Psl de *Pseudomonas*

aeruginosa; L2 es un segundo enlazador; H2 es un segundo fragmento de región bisagra de cadena pesada; CH2 es un dominio 2 de región constante de cadena pesada; y CH3 es un dominio 3 de región constante de cadena pesada; y (ii) una cadena ligera de fórmula VL-CL, en donde VL es un dominio variable de cadena ligera de anti-PcrV de *Pseudomonas aeruginosa*, y CL es una región constante kappa de cadena ligera del anticuerpo o una región constante lambda de cadena ligera del anticuerpo.

En algunos aspectos, CH1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 21. En algunos aspectos, H1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 22. En algunos aspectos, L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 28. En algunos aspectos, L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 28. En algunos aspectos, H2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 23. En algunos aspectos, CH2-CH3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 30. En algunos aspectos, CL es una región constante kappa de cadena ligera de anticuerpo. En algunos aspectos, CL comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 24.

En algunos aspectos, el anticuerpo biespecífico comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 31, y/o una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 20.

En algunos aspectos proporcionados en la presente, la presente descripción se relaciona con un polinucleótido aislado que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada del anticuerpo biespecífico descrito en la presente. En algunos aspectos, el polinucleótido aislado comprende además una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera del anticuerpo biespecífico descrito en la presente.

En algunos aspectos proporcionados en la presente, la presente descripción se relaciona con un vector que comprende (i) una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada del anticuerpo biespecífico, o (ii) una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada del anticuerpo biespecífico descrito en la presente y una
5 molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera del anticuerpo biespecífico descrito en la presente. En algunos aspectos, la presente descripción se relaciona con un par de vectores, en donde el primer vector del par de vectores comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada del anticuerpo biespecífico descrito en la presente, y el segundo vector del par de vectores comprende una molécula de ácido
10 nucleico que codifica la cadena ligera del anticuerpo biespecífico descrito en la presente.

En algunos aspectos proporcionados en la presente, la presente descripción se relaciona con una célula huésped que comprende (i) un polinucleótido aislado que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada del anticuerpo biespecífico descrito en la presente, (ii) un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que
15 codifica la cadena pesada del anticuerpo biespecífico descrito en la presente, y una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera del anticuerpo biespecífico descrito en la presente, o (iii) una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada del anticuerpo biespecífico descrito en la presente y una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera del anticuerpo biespecífico descrito en la presente. En algunos aspectos proporcionados
20 en la presente, la presente descripción se relaciona con una célula huésped que comprende un par de vectores, en donde el primer vector del par de vectores comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada del anticuerpo biespecífico descrito en la

presente, y el segundo vector del par de vectores comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera del anticuerpo biespecífico descrito en la presente.

En algunos aspectos proporcionados en la presente, la presente descripción se relaciona con un método para producir un anticuerpo biespecífico, el método que
5 comprende el cultivo de la célula huésped descrita en la presente, y opcionalmente aislar el anticuerpo biespecífico. En algunos aspectos, la presente descripción se relaciona con anticuerpos biespecíficos producidos por el método descrito en la presente.

En algunos aspectos proporcionados en la presente, la presente descripción se relaciona con una composición que comprende el anticuerpo biespecífico descrito en la
10 presente, y un portador farmacéuticamente aceptable.

En algunos aspectos proporcionados en la presente, la presente descripción se relaciona con un método para tratar o prevenir una infección por *Pseudomonas* en un sujeto que lo necesita, el método que comprende administrar el anticuerpo biespecífico descrito en la presente, o la composición que comprende el anticuerpo biespecífico descrito en la presente
15 al sujeto. En algunos aspectos proporcionados en la presente, la presente descripción se relaciona con el uso del anticuerpo biespecífico descrito en la presente o la composición que comprende el anticuerpo biespecífico descrito en la presente en la preparación de un medicamento para usar en el tratamiento o prevención de una infección por *Pseudomonas* en un sujeto que lo necesita. En algunos aspectos proporcionados en la presente, la presente
20 descripción se relaciona con el anticuerpo biespecífico descrito en la presente o a la composición que comprende el anticuerpo biespecífico descrito en la presente para usar en el tratamiento o prevención de una infección por *Pseudomonas* en un sujeto que lo necesita.

En algunos aspectos, la infección es una infección pulmonar, una infección del tracto respiratorio, neumonía, bacteriemia, una infección ósea, una infección articular, una infección de la piel, una infección por quemaduras, una infección de herida, o cualquier combinación de las mismas.

5 En algunos aspectos proporcionados en la presente, la presente descripción se relaciona con un método para tratar bronquiectasias en un sujeto que lo necesita, el método que comprende administrar el anticuerpo biespecífico descrito en la presente o la composición que comprende el anticuerpo biespecífico descrito en la presente. En algunos aspectos proporcionados en la presente, la presente descripción se relaciona con el uso del anticuerpo
10 biespecífico descrito en la presente o la composición que comprende el anticuerpo biespecífico descrito en la presente en la preparación de un medicamento para usar en el tratamiento de bronquiectasias en un sujeto que lo necesita. En algunos aspectos proporcionados en la presente, la presente descripción se relaciona con el anticuerpo biespecífico descrito en la presente o a la composición que comprende el anticuerpo biespecífico descrito en la presente
15 para usar en el tratamiento de bronquiectasias en un sujeto que lo necesita.

En algunos aspectos proporcionados en la presente, la presente descripción se relaciona con un método para mejorar el volumen espiratorio forzado en 1 segundo (FEV₁, por sus siglas en inglés) prebroncodilatador en un sujeto con bronquiectasia, el método que comprende administrar el anticuerpo biespecífico descrito en la presente o la composición que comprende
20 el anticuerpo biespecífico descrito en la presente. En algunos aspectos proporcionados en la presente, la presente descripción se relaciona con el uso del anticuerpo biespecífico descrito en la presente o la composición que comprende el anticuerpo biespecífico descrito en la presente en la preparación de un medicamento para usar en la mejora del volumen espiratorio forzado

en 1 segundo (FEV₁) prebroncodilatador en un sujeto con bronquiectasia. En algunos aspectos proporcionados en la presente, la presente descripción se relaciona con el anticuerpo biespecífico descrito en la presente o a la composición que comprende el anticuerpo biespecífico descrito en la presente para usar en la mejora del volumen espiratorio forzado en 1 segundo (FEV₁) prebroncodilatador en un sujeto con bronquiectasia.

En algunos aspectos proporcionados en la presente, la presente descripción se relaciona con un método para reducir la carga de *Pseudomonas aeruginosa* en un sujeto con bronquiectasia, el método que comprende administrar el anticuerpo biespecífico descrito en la presente o la composición que comprende el anticuerpo biespecífico descrito en la presente al sujeto. En algunos aspectos proporcionados en la presente, la presente descripción se relaciona con el uso del anticuerpo biespecífico descrito en la presente o a la composición que comprende el anticuerpo biespecífico descrito en la presente en la preparación de un medicamento para usar en la reducción de la carga de *Pseudomonas aeruginosa* en un sujeto con bronquiectasia. En algunos aspectos proporcionados en la presente, la presente descripción se relaciona con el anticuerpo biespecífico descrito en la presente o a la composición que comprende el anticuerpo biespecífico descrito en la presente para usar en la reducción de la carga de *Pseudomonas aeruginosa* en un sujeto con bronquiectasia.

En algunos aspectos proporcionados en la presente, la presente descripción se relaciona con un método para reducir las exacerbaciones de bronquiectasia en un sujeto que lo necesita, el método que comprende administrar el anticuerpo biespecífico descrito en la presente o la composición que comprende el anticuerpo biespecífico descrito en la presente al sujeto. En algunos aspectos proporcionados en la presente, la presente descripción se relaciona con el uso del anticuerpo biespecífico descrito en la presente o la composición que

comprende el anticuerpo biespecífico descrito en la presente en la preparación de un medicamento para usar en la reducción de las exacerbaciones de bronquiectasia en un sujeto que lo necesita. En algunos aspectos proporcionados en la presente, la presente descripción se relaciona con el anticuerpo biespecífico descrito en la presente o a la composición que comprende el anticuerpo biespecífico descrito en la presente para usar en la reducción de las exacerbaciones de bronquiectasia en un sujeto que lo necesita.

En algunos aspectos proporcionados en la presente, la presente descripción se relaciona con un método para reducir la necesidad de antibióticos intravenosos en un sujeto con bronquiectasia, el método que comprende administrar el anticuerpo biespecífico descrito en la presente o la composición que comprende el anticuerpo biespecífico descrito en la presente al sujeto. En algunos aspectos proporcionados en la presente, la presente descripción se relaciona con el uso del anticuerpo biespecífico descrito en la presente o la composición que comprende el anticuerpo biespecífico descrito en la presente en la preparación de un medicamento para usar en la reducción de la necesidad de antibióticos intravenosos en un sujeto con bronquiectasia. En algunos aspectos proporcionados en la presente, la presente descripción se relaciona con el anticuerpo biespecífico descrito en la presente o a la composición que comprende el anticuerpo biespecífico descrito en la presente para usar en la reducción de la necesidad de antibióticos intravenosos en un sujeto con bronquiectasia.

En algunos aspectos proporcionados en la presente, la presente descripción se relaciona con un método para estabilizar la función pulmonar en un sujeto con bronquiectasia, el método que comprende administrar el anticuerpo biespecífico descrito en la presente o a la composición que comprende el anticuerpo biespecífico descrito en la presente al sujeto. En algunos aspectos proporcionados en la presente, la presente descripción se relaciona con el uso del anticuerpo

biespecífico descrito en la presente o la composición que comprende el anticuerpo biespecífico descrito en la presente en la preparación de un medicamento para usar en la estabilización de la función pulmonar en un sujeto con bronquiectasia. En algunos aspectos proporcionados en la presente, la presente descripción se relaciona con el anticuerpo biespecífico descrito en la presente o a la composición que comprende el anticuerpo biespecífico descrito en la presente para usar en la estabilización de la función pulmonar en un sujeto con bronquiectasia.

En algunos aspectos, la bronquiectasia es bronquiectasia por fibrosis no quística.

En algunos aspectos, el método o uso o anticuerpo para usar o composición para usar comprende además administrar un antibiótico.

En algunos aspectos, el sujeto está colonizado con *Pseudomonas aeruginosa*, opcionalmente en donde el tracto respiratorio del sujeto está colonizado con *Pseudomonas aeruginosa*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1A** muestra la actividad de destrucción opsonofagocítica (OPK, por sus siglas en inglés) de AZD0292 y gremubamab (MEDI3902) en un ensayo de opsonofagocitosis. Los datos demuestran que AZD0292 exhibe actividad de destrucción opsonofagocítica equivalente a la del gremubamab. (Ver el Ejemplo 1.)

La **Figura 1B** muestra la actividad de eliminación anticitotóxica de AZD0292 y gremubamab (MEDI3902) en un ensayo anticitotoxicidad. Los datos demuestran que AZD0292 exhibe actividad anticitotóxica equivalente a la del gremubamab. (Ver el Ejemplo 1.)

La **Figura 2** muestra que la actividad opsonofagocítica de AZD0292, gremubamab (MEDI3902), gremubamab afucosilado (Gremubamab-AFuc), gremubamab-AFuc que

comprende adicionalmente las mutaciones de extensión de vida media de YTE en su región Fc (Gremubamab-AFuc-YTE), e IgG mAb de control negativo. Los datos demuestran que AZD0292, que comprende mutaciones de extensión de vida media N3Y, es más activo en un ensayo opsonofagocítico en comparación con un derivado de extensión de vida media de YTE de gremubamab.

La **Figura 3** muestra una exposición sérica aumentada de AZD0292 en ratones, en comparación con gremubamab después de la administración intravenosa (IV) de 10 mg/kg. El estudio se realizó en ratones transgénicos FcRn humanos Tg32 (n = 4 por punto temporal). (Ver el Ejemplo 2.)

La **Figura 4A** muestra la actividad de destrucción opsonofagocítica de AZD0292 y gremubamab cuando se exponen a variaciones de temperatura (4 °C y 45 °C) y exposición a la luz, en comparación con los grupos control. No se observó diferencia entre AZD0292 y gremubamab en estas condiciones de estrés. (Ver el Ejemplo 3.)

La **Figura 4B** muestra la actividad anticitotoxicidad entre AZD0292 y gremubamab cuando se exponen a variaciones de temperatura (4 °C y 45 °C) y exposición a la luz, en comparación con los grupos control. No se observó diferencia entre AZD0292 y gremubamab en estas condiciones de estrés. (Ver el Ejemplo 3.)

La **Figura 5A** muestra el porcentaje de monómero en composiciones AZD0292 (barras biseladas) y MEDI3902 (barras vacías). (Ver el Ejemplo 4.)

La **Figura 5B** muestra los agregados porcentuales en las composiciones AZD0292 (barras biseladas) y MEDI3902 (barras vacías). (Ver el Ejemplo 4.)

La **Figura 6** muestra el porcentaje de agregación para AZD0292 y MEDI3902 para cada clon ensayado. (Ver el Ejemplo 4.) El etiquetado del eje Y “A-H” y el etiquetado del

eje X “1-12” indican las posiciones de la cuadrícula en una placa de 96 pocillos, y cada posición representa un clon de expresión diferente.

La **Figura 7** muestra una matriz de diagrama de dispersión para evaluar la correlación entre el porcentaje de especies de alto peso molecular, la concentración media de la muestra purificada de proteína A PhyTip, y el título en el último día del biorreactor de placa de 96 pocillos con alimentación por lotes. (Ver el Ejemplo 4.)

Las **Figuras 8A-8B** muestran los resultados de la prueba de normalidad para agregados AZD0292 (**Figura 8A**) y MEDI3902 (**Figura 8B**) usando pruebas de Anderson-Darling y Shapiro-Wilk. (Ver el Ejemplo 4.)

La **Figura 8C** muestra los resultados de la prueba t comparando el porcentaje promedio de agregación entre clones que expresan MEDI3902 y AZD0292. (Ver el Ejemplo 4.)

Las **Figuras 9A-9B** muestran el porcentaje de agregación (**Figura 9A**) y el título de fin de cultivo (**Figura 9B**) y asociado con cada clon que expresa AZD0292 (barras biseladas) y MEDI3902 (barras vacías). Los clones se graficaron basados en los valores de agregación porcentual en orden ascendente de izquierda a derecha. (Ver el Ejemplo 4.)

La **Figura 10** muestra el porcentaje de agregación a lo largo de meses de almacenamiento a 40 °C. Los puntos de datos para MEDI3902 se muestran como cuadrados (■) y AZD0292 se muestran como triángulos (▲). (Ver el Ejemplo 4.)

DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. Definiciones

Los títulos proporcionados en la presente no son limitaciones de los diversos
5 aspectos de la descripción, que se pueden tener como referencia a la memoria descriptiva en su totalidad. En consecuencia, los términos definidos inmediatamente más abajo se definen más completamente como referencia a la memoria descriptiva en su totalidad.

Cabe señalar que el término “un/a” o “un/a” entidad se relaciona con uno o más de esa entidad; por ejemplo, “un anticuerpo”, se entiende que representa uno o más
10 anticuerpos. Como tal, los términos “un/a” (o “un/a”), “uno o más” y “al menos uno” pueden usarse indistintamente en la presente.

Además, “y/o”, cuando se usa en la presente, debe tomarse como una descripción específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por lo tanto, el término “y/o” como se usa en una frase tal como “A y/o B” en la
15 presente pretende incluir “A y B”, “A o B”, “A” (solo) y “B” (solo). De la misma manera, el término “y/o” como se usa en una frase tal como “A, B y/o C” pretende abarcar cada uno de los siguientes aspectos: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

Como se usa en la presente, los términos “alrededor de” y “aproximadamente”,
20 cuando se usan para modificar un valor numérico o rango numérico, indican que las desviaciones de hasta un 10 % por encima y hasta un 10 % por debajo del valor o rango, permanecen dentro del significado previsto del valor o rango mencionado, e incluyen el número exacto que estos términos están modificando. Se entiende que siempre que en la

presente se describen aspectos con los términos “acerca de” o “aproximadamente” un valor o rango numérico, también se proporcionan, de cualquier otra manera, aspectos análogos que se refieren al valor o rango numérico específico.

Se entiende que donde quiera que se describen los aspectos en la presente con la expresión “que comprende”, también se proporcionan los aspectos análogos de cualquier otra manera descritos en términos de “que consiste en” y/o “que consiste esencialmente en”. En esta descripción, “comprende”, “que comprende”, “que contiene” y “que tiene” y lo similar puede significar “incluye”, “que incluye” y lo similar; “que consiste esencialmente en” o “consiste esencialmente” son abiertos, que permiten la presencia de más de lo que se menciona, siempre que las características básicas o novedosas de lo que se menciona, no se modifiquen por la presencia de más de lo que se menciona, pero se excluyen aspectos de la técnica anterior.

Las unidades, prefijos y símbolos se denotan en su forma aceptada del *Système International de Unites* (SI). Los rangos numéricos incluyen los números que definen el rango.

A menos que se indique de cualquier otra manera, las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en orientación amino a carboxi.

A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que se refiere esta descripción. Por ejemplo, el *Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology*, Juo, Pei-Show, 2.^a ed., 2002, CRC Press; *The Dictionary of Cell and Molecular Biology*, 3.^a ed., 1999, Academic Press; y el *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*, Revisada, 2000, Oxford University Press, proporcionan a un experto en la técnica un diccionario general de muchos de los términos usados en esta descripción.

Como se usa en la presente, los términos “anticuerpo” e “inmunoglobulina” se usan indistintamente y se refieren a una molécula de anticuerpo que reconoce y se une específicamente a una diana, tal como una proteína, polipéptido, péptido, carbohidrato, polinucleótido, lípido, o combinaciones de los anteriores (*p. ej.*, una glicoproteína), a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno dentro de la región variable de la molécula de inmunoglobulina. El término “anticuerpo” abarca anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos biespecíficos y cualquier otra molécula de inmunoglobulina siempre que los anticuerpos exhiban la actividad biológica deseada. Un anticuerpo puede ser de cualquiera de las cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, o subclases (isotipos) de estas (*p. ej.*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), basadas en la identidad de sus dominios constantes de cadena pesada denominados alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las diferentes clases de anticuerpos tienen estructuras de subunidades diferentes y bien conocidas y configuraciones tridimensionales. Para la estructura y propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, ver, *p. ej.*, *Basic and Clinical Immunology*, 8th Ed., Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y capítulo 6.

El término “fragmento de anticuerpo” se relaciona con una porción de un anticuerpo. Un “fragmento de unión al antígeno” de un anticuerpo se relaciona con una porción de un anticuerpo que se une a un antígeno. Un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo puede contener las regiones determinantes antigénicas de un anticuerpo (*p. ej.*, las regiones determinantes de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés)). Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno incluyen, pero no se limitan a fragmentos Fab, Fab', F (ab')₂ y Fv, anticuerpos lineales y anticuerpos de cadena única.

Un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo puede ser monovalente o multivalente (*p. ej.*, bivalente). Un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo puede ser monoespecífico o multiespecífico (*p. ej.*, biespecífico). Un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo se puede derivar de cualquier especie animal, tal como roedores (*p. ej.*,
5 ratón, rata o hámster) y humanos o se puede producir artificialmente.

Un “dominio de unión al antígeno” o “región de unión al antígeno” se refiere a una porción monovalente de un anticuerpo que se une a un antígeno. Un “dominio de unión al antígeno” puede comprender las regiones determinantes antigénicas de un anticuerpo (*p. ej.*, las regiones determinantes de complementariedad (CDR)). Un anticuerpo o fragmento
10 de unión al antígeno de este (que incluye anticuerpos monoespecíficos y multiespecíficos (*p. ej.*, biespecíficos) o fragmentos de unión al antígeno de estos puede comprender un dominio de unión al antígeno.

El término “región Fc”, a veces referido como “Fc” o “dominio Fc”, como se usa en la presente, se relaciona con la porción de una molécula de IgG que se correlaciona con un
15 fragmento cristizable obtenido por digestión con papaína de una molécula de IgG. La región Fc consiste en la mitad C-terminal de las dos cadenas pesadas de una molécula de IgG que están unidas por enlaces disulfuro. No tiene actividad de unión al antígeno pero contiene la entidad de carbohidrato y los sitios de unión para los receptores del complemento y Fc, que incluye el receptor FcRn (ver a continuación). La región Fc contiene todo el segundo dominio
20 constante CH2 (residuos 231-340 de la IgG1 humana, de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat) y el tercer dominio constante CH3 (residuos 341-447). Los residuos de aminoácidos de los dominios constantes y variables de IgG a los que se hace referencia en la presente se numeran de acuerdo con el índice de numeración EU de Kabat *et al.* (*Sequences*

of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., 1991 NIH Pub. núm. 91-3242, que se incorpora como referencia en la presente en su totalidad), e incluyen residuos correspondientes en otros dominios constantes de IgG determinados por alineación de secuencia.

Los términos “región bisagra Fc”, “región Fc-bisagra”, “dominio bisagra Fc” o “dominio Fc-bisagra”, como se usan en la presente, se usan indistintamente y se refieren a una región de una molécula de IgG que consiste en la región Fc (residuos 231-447) y una región bisagra (residuos 216-230) que se extiende desde el extremo N de la región Fc.

Los fragmentos de anticuerpo que incluyen anticuerpos monocatenarios pueden comprender la(s) región(es) variable(s) sola(s) o en combinación con la totalidad o una porción de los siguientes: región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3.

También se incluyen fragmentos de unión al antígeno que también comprenden cualquier combinación de región(es) variable(s) con una región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3.

Los anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de estos descritos en la presente pueden ser de cualquier origen animal que incluye aves y mamíferos. Los anticuerpos pueden ser humanos, murinos, burros, conejos, cabras, conejillos de indias, camellos, llamas, caballos o pollos.

Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda (κ , λ). Cada clase de cadena pesada se puede unir con una cadena ligera kappa o lambda. En general, las cadenas ligeras y pesadas se unen covalentemente entre sí, y las porciones de “cola” de las dos cadenas pesadas se unen entre sí mediante enlaces disulfuro covalentes o enlaces no covalentes cuando las inmunoglobulinas son generadas por hibridomas, células B o células huésped modificadas genéticamente. En la cadena pesada, las secuencias de

aminoácidos van desde un extremo N en los extremos bifurcados de la configuración Y hasta el extremo C en la parte inferior de cada cadena.

Tanto la cadena ligera como la pesada se dividen en regiones de homología estructural y funcional. Los términos “constante” y “variable” se utilizan funcionalmente. El término “dominio constante” se relaciona con la porción de una molécula de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos más conservada en relación con la otra porción de la inmunoglobulina, el dominio variable, que contiene el sitio de unión al antígeno. El dominio constante de la cadena pesada contiene los dominios CH1, CH2 y CH3 y el dominio constante de la cadena ligera contiene el dominio CL. Los dominios variables de las porciones de cadena ligera (VL) y pesada (VH) determinan el reconocimiento y la especificidad del antígeno. Por el contrario, los dominios constantes de la cadena ligera (CL) y la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) confieren importantes propiedades biológicas tales como secreción, movilidad transplacentaria, unión al receptor Fc, unión al complemento y lo similar. Por convención, la numeración de los dominios de la región constante aumenta a medida que se alejan del sitio de unión al antígeno o del extremo amino del anticuerpo. La porción N-terminal es una región variable y la porción C-terminal es una región constante; los dominios CH3 y CL comprenden el extremo carboxiterminal de la cadena pesada y ligera, respectivamente.

Como se indicó anteriormente, la región variable permite que la molécula de unión reconozca selectivamente y se una específicamente a epítopos sobre antígenos. Es decir, el dominio VL y el dominio VH, o subconjunto de las regiones determinantes de complementariedad (CDR), de una molécula de unión, *p. ej.*, un anticuerpo, se combinan para formar la región variable que define un sitio de unión al antígeno tridimensional. Esta estructura de molécula de unión cuaternaria forma el sitio de unión al antígeno presente en

el extremo de cada brazo de la Y. Más específicamente, el sitio de unión al antígeno se define por tres CDR en cada una de las cadenas VH y VL.

En los anticuerpos de origen natural, las seis “regiones determinantes de complementariedad” o “CDR” presentes en cada dominio de unión a antígeno son secuencias cortas, no contiguas de aminoácidos que se posicionan específicamente para formar el dominio de unión al antígeno a medida que el anticuerpo asume su configuración tridimensional en un ambiente acuoso. El resto de los aminoácidos en los dominios de unión a antígenos, referidos como regiones “marco”, muestran menos variabilidad intermolecular. Las regiones del marco adoptan en gran medida una conformación de lámina β y las CDR forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β . Por lo tanto, las regiones marco actúan para formar un andamio que proporciona el posicionamiento de las CDR en orientación correcta mediante interacciones entre cadenas, no covalentes. El dominio de unión al antígeno formado por las CDR posicionadas define una superficie complementaria al epítipo en el antígeno inmunorreactivo. Esta superficie complementaria promueve la unión no covalente del anticuerpo a su epítipo cognado. Los aminoácidos que comprenden las CDR y las regiones marco, respectivamente, se pueden identificar fácilmente para cualquier región variable de cadena pesada o ligera dada por una persona experta en la técnica, ya que han sido definidos con precisión (ver, “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, Kabat, E., *et al.*, U.S. Department of Health and Human Services, (1983); y Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987), que se incorporan en la presente como referencia en su totalidad).

Los términos “numeración de Kabat”, “índice de numeración EU de Kabat” y términos similares se reconocen en la técnica y se refieren a un sistema de numeración de residuos de aminoácidos en las regiones variables de cadena pesada y ligera de un

anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de este. En ciertos aspectos, las CDR se pueden determinar de acuerdo con el sistema de numeración Kabat (ver, *p. ej.*, Kabat EA & Wu TT (1971) Ann NY Acad Sci 190: 382-391 and Kabat EA *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Usando el sistema de numeración de Kabat, las CDR dentro de una molécula de cadena pesada de anticuerpo están típicamente presentes en las posiciones de aminoácidos 31 a 35, que opcionalmente pueden incluir uno o dos aminoácidos adicionales, después de 35 (referidos en el esquema de numeración de Kabat como 35A y 35B) (CDR1), posiciones de aminoácidos 50 a 65 (CDR2) y posiciones de aminoácidos 95 a 102 (CDR3). Usando el sistema de numeración de Kabat, las CDR dentro de una molécula de cadena ligera de anticuerpo están típicamente presentes en las posiciones de aminoácidos 24 a 34 (CDR1), posiciones de aminoácidos 50 a 56 (CDR2) y posiciones de aminoácidos 89 a 97 (CDR3). En algunos aspectos, las CDR de los anticuerpos descritos en la presente se han determinado de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat.

Chothia se refiere en cambio a la ubicación de los bucles estructurales (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). El final del bucle CDR-H1 de Chothia cuando se numera usando la convención de numeración de Kabat varía entre H32 y H34 dependiendo de la longitud del bucle (esto se debe a que el esquema de numeración de Kabat coloca las inserciones en H35A y H35B; si ni 35A ni 35B están presentes, el bucle termina en 32; si solo 35A está presente, el bucle termina en 33; si tanto 35A como 35B están presentes, el bucle termina en 34). Las regiones hipervariables AbM representan un compromiso entre

las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y son usadas por el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular.

Bucle	Kabat	AbM	Chothia
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32..34
		<u>(Numeración de Kabat)</u>	
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32
		<u>(Numeración de Chothia)</u>	
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

- 5 Las moléculas de Fv monocatenarios (scFv, por sus siglas en inglés) son conocidas en la técnica y se describen, *p. ej.*, en la patente de los EE. UU. 5.892.019. Las moléculas de inmunoglobulina o anticuerpo comprendidas por esta descripción pueden ser de cualquier tipo (*p. ej.*, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (*p. ej.*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina.
- 10 Un anticuerpo “monoclonal” o un fragmento de unión al antígeno de este se refiere a una población homogénea de anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno involucrados en el reconocimiento y unión altamente específicos de un único determinante antigénico o epítipo. Esto contrasta con los anticuerpos policlonales que incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes antigénicos.
- 15 El término anticuerpo “monoclonal” o un fragmento de unión al antígeno de este comprende tanto los anticuerpos monoclonales intactos y de longitud completa, así como

los fragmentos de anticuerpos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), mutantes de cadena monocatenaria (scFv), proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento del antígeno. Además, un anticuerpo “monoclonal” o un fragmento de unión al antígeno de este se refiere a tales anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de estos elaborados de diversas maneras, que incluyen, pero no se limitan a, hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante y animales transgénicos.

Como se usa en la presente, los anticuerpos “humanos” incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulina humana o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, como se describe a *continuación* y, por ejemplo, en la patente de los EE. UU. núm. 5.939.598 por Kucherlapati *et al.*

Por “se une específicamente”, generalmente quiere decir que una molécula de unión, *p. ej.*, un anticuerpo biespecífico o un fragmento, variante o derivado de este, se une a un epítipo mediante un dominio de unión al antígeno, y que la unión implica cierta complementariedad entre un dominio de unión al antígeno y el epítipo. Una molécula de unión como se proporciona en la presente puede contener uno, dos, tres, cuatro o más dominios de unión que pueden ser iguales o diferentes, y que pueden unirse al mismo epítipo, o a dos o más epítopos diferentes. De acuerdo con esta definición, se dice que una molécula de unión se “une específicamente” a un epítipo cuando se une a ese epítipo, mediante su dominio de unión al antígeno más fácilmente de lo que se uniría a un epítipo aleatorio no relacionado. El término “especificidad” se usa en la presente para calificar la afinidad relativa mediante la cual

una determinada molécula de unión se une a un cierto epítipo. Por ejemplo, puede considerarse que la molécula de unión “A” tiene una especificidad más alta para un epítipo dado que la molécula de unión “B”, o puede decirse que la molécula de unión “A” se une al epítipo “C” con una especificidad más alta que la que tiene para el epítipo relacionado “D”.

5 Un anticuerpo que “se une al mismo epítipo” como un anticuerpo de referencia se relaciona con un anticuerpo que entra en contacto con los mismos residuos de aminoácidos y/o azúcares que el anticuerpo de referencia. La capacidad de un anticuerpo para unirse al mismo epítipo que un anticuerpo de referencia se puede determinar usando mutagénesis por escaneo peptídico o mutagénesis por escaneo de alanina de alto rendimiento.

10 Se dice que un anticuerpo “inhibe competitivamente” la unión de un anticuerpo de referencia a un epítipo dado si se une preferentemente a ese epítipo o a un epítipo superpuesto de tal manera que bloquea, hasta cierto grado, la unión del anticuerpo de referencia al epítipo. La inhibición competitiva puede determinarse mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, ensayos ELISA de competencia. Puede decirse
15 que un anticuerpo inhibe competitivamente la unión del anticuerpo de referencia a un epítipo dado en al menos 90 %, al menos 80 %, al menos 70 %, al menos 60 %, o al menos 50 %.

 El término “anticuerpo biespecífico” tal como se usa en el presente documento se relaciona con un anticuerpo que tiene dominios de unión específicos para dos antígenos o epítopos diferentes dentro de una sola molécula de anticuerpo. Se apreciará que otras
20 moléculas además de la estructura del anticuerpo canónico se pueden construir con dos especificidades de unión. Se apreciará además que la unión al antígeno por anticuerpos biespecíficos puede ser simultánea o secuencial. Los triomas y los hibridomas híbridos son dos ejemplos de líneas celulares que pueden secretar anticuerpos biespecíficos. Los

anticuerpos biespecíficos también se pueden construir por medios recombinantes. (Ströhlein and Heiss, *Future Oncol.* 6:1387-94 (2010); Mabry and Snavely, *IDrugs.* 13:543-9 (2010)).

Como se usa en la presente, el término “MEDI3902” o “gremubamab” se refiere a un anticuerpo biespecífico que tiene una cadena pesada con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 19 y una cadena ligera con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 20. MEDI3902 también se conoce como Gremubamab.

Como se usa en la presente, el término “AZD0292” se refiere a un anticuerpo biespecífico que tiene una cadena pesada con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 31 y una cadena ligera con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 20.

El término “receptor FcRn” o “FcRn” como se usa en la presente se refiere con un receptor Fc (“n” indica neonatal) que se sabe que está implicado en la transferencia de IgG maternas a un feto a través de la placenta humana o de primate, o el saco vitelino (conejos) y a un recién nacido desde el calostro a través del intestino delgado. También se sabe que FcRn está implicado en el mantenimiento de niveles constantes de IgG sérica uniéndose a las moléculas de IgG y reciclándolas en el suero. La unión de FcRn a moléculas IgG1, IgG2 e IgG4 de origen natural es estrictamente dependiente del pH con una unión óptima a pH 6. La IgG3 tiene una variación conocida en la posición 435 (es decir, la IgG humana tiene R435 en lugar de H435 que se encuentra en IgG1, IgG2 e IgG4 humanas), lo que puede resultar en una unión reducida a pH 6. El FcRn comprende un heterodímero de dos polipéptidos, cuyos pesos moleculares son aproximadamente 50 kD y 15 kD, respectivamente. Los dominios extracelulares del polipéptido de 50 kD se relacionan con las cadenas α de clase I del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) y se demostró que el

polipéptido de 15 kD es la β_2 -microglobulina no polimórfica (β_2 -m). Además de la placenta y el intestino neonatal, el FcRn también se expresa en diversos tejidos de distintas especies, así como en varios tipos de líneas de células endoteliales. También se expresa en el endotelio vascular, la vasculatura muscular y los sinusoides hepáticos de adultos humanos y se sugiere
 5 que las células endoteliales pueden ser las más responsables del mantenimiento de los niveles de IgG sérica en humanos y ratones. Los receptores de FcRn incluyen, *p. ej.*, proteínas FcRn humanas y murinas, así como homólogos de estas que tienen actividad FcRn.

Un “fragmento de unión al FcRn” de un dominio constante de IgG, tal como se usa ese término en la presente, se relaciona con un fragmento de un dominio constante de IgG
 10 que se une al receptor FcRn. Un fragmento de unión al FcRn de un dominio constante de IgG puede incluir la región Fc, o la región Fc de bisagra; por lo tanto, puede incluir porciones de la región CH2-CH3 de cadena pesada o la región bisagra CH2-CH3 que están implicadas en la unión a FcRn (ver Roopenian *et al.*, Nature Rev. Immunol. 7:715-725 (2007)).

“KD” como término que se usa en la presente (a veces también denominado K_d, K_D
 15 o K_d) es la constante de disociación en equilibrio, una interacción de unión entre dos moléculas, tales como una IgG y FcRn. KD se puede calcular a partir de las constantes de velocidad observadas para la asociación (k_{activado}) y la disociación (k_{desactivado}), de tal manera que KD es igual a la relación de k_{desactivado}/k_{activado}.

El término “vida media *in vivo*” como se usa en la presente se relaciona con una
 20 vida media biológica de un tipo particular de molécula de IgG o sus fragmentos que contienen sitios de unión a FcRn en la circulación de un animal determinado y se representa por un tiempo requerido para que la mitad de la cantidad administrada en el animal se elimine de la circulación y/u de otros tejidos en el animal. Cuando se construye

una curva de aclaramiento de una IgG determinada en función del tiempo, la curva suele ser bifásica con una fase α rápida que representa un equilibrio de las moléculas de IgG inyectadas entre el espacio intra y extravascular y que está, en parte, determinada por el tamaño de las moléculas, y una fase β más larga que representa el catabolismo de las moléculas de IgG en el espacio intravascular. El término “vida media *in vivo*” corresponde prácticamente a la vida media de las moléculas de IgG en la fase β .

Como se usa en la presente, el término “anticuerpo diseñado genéticamente” se relaciona con un anticuerpo en el que el dominio variable en la cadena pesada y ligera o en ambas se altera por el reemplazo al menos parcial de una o más CDR de un anticuerpo de especificidad conocida y, si es necesario, por reemplazo parcial de la región marco y cambio de secuencia. Aunque las CDR se pueden derivar de un anticuerpo de la misma clase o incluso subclase que el anticuerpo del que se derivan las regiones marco, se prevé que las CDR se derivarán de un anticuerpo de diferente clase y preferentemente de un anticuerpo de una especie diferente. Un anticuerpo diseñado genéticamente en el que una o más CDR “donantes” de un anticuerpo no humano de especificidad conocida se injertan en una región marco de cadena pesada o ligera humana se denomina en la presente “anticuerpo humanizado”. No es necesario reemplazar todas las CDR con las CDR completas de la región variable donante para transferir la capacidad de unión al antígeno de un dominio variable a otro. Más bien, puede que sólo sea necesario transferir aquellos residuos que son necesarios para mantener la actividad del sitio de unión diana. Dadas las explicaciones establecidas en, *p. ej.*, la patente de los EE. UU. núms. 5.585.089, 5.693.761, 5.693.762, y 6.180.370, los expertos en la técnica podrán, ya sea mediante experimentación rutinaria o pruebas de ensayo y error, obtener un anticuerpo funcional diseñado genéticamente o humanizado.

Un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que se “aísle” es un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que se encuentra en una forma que no se encuentra en la naturaleza. Los polipéptidos, anticuerpos, polinucleótidos, vectores, células o composiciones aislados incluyen aquellos que han sido purificados hasta un grado que ya no están en una forma en la que se encuentran en la naturaleza. En algunos aspectos, un anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que se aísla es sustancialmente puro. Como se usa en la presente, “sustancialmente puro” se relaciona con material que es al menos 50 % puro (es decir, libre de contaminantes), al menos 90 % puro, al menos 95 % puro, al menos 98 % puro, o al menos 99 % puro.

Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan indistintamente en la presente para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados, y puede ser interrumpido por no aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácido que ha sido modificado de forma natural o por intervención; por ejemplo, formación de enlace disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como la conjugación con un componente de etiquetado. También se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (que incluyen, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Se entiende que, debido a que los polipéptidos de esta descripción son a base de anticuerpos, en algunos aspectos, los polipéptidos pueden presentarse como cadenas simples o cadenas asociadas.

La administración “en combinación con” uno o más agentes terapéuticos adicionales (*p. ej.*, un antibiótico) incluye la administración simultánea (concurrente) o consecutiva en cualquier orden.

Los términos tales como “que trata” o “tratamiento” o “tratar” o “que alivia” o “aliviar” se refieren a medidas terapéuticas que curan, retardan, disminuyen los síntomas y/o detienen la progresión de una condición o trastorno patológico diagnosticado. Por lo tanto, entre quienes necesitan tratamiento se incluyen aquellos que ya tienen un diagnóstico o se sospecha que padecen el trastorno.

El término “neutrofilia de las vías respiratorias” se relaciona con una acumulación de neutrófilos en el espacio aéreo de los pulmones.

El término “neutrofilia en esputo” se relaciona con la presencia de neutrófilos en el esputo de un sujeto. En algunos aspectos, los neutrófilos en el esputo de un sujeto que necesita tratamiento, *p. ej.*, un sujeto con bronquiectasias, se aumentan en relación con los neutrófilos en el esputo de controles sanos.

Por “sujeto” o “individuo” o “animal” o “paciente” o “mamífero”, se entiende cualquier sujeto, *p. ej.*, un sujeto mamífero, para quien se desea un diagnóstico, pronóstico o terapia. Los sujetos mamíferos incluyen humanos, animales domésticos, animales de granja y animales de zoológico, deportivos o mascotas tales como perros, gatos, conejillos de indias, conejos, ratas, ratones, caballos, ganado, vacas, osos, etc.

20

II. Anticuerpos anti-pseudomonas biespecíficos con regiones Fc modificadas

En la presente se proporcionan anticuerpos biespecíficos que se unen específicamente a Psl y PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* y que comprenden regiones Fc

modificadas. Como se proporciona en la presente, se descubrió sorprendentemente que las modificaciones en las regiones Fc de tales anticuerpos biespecíficos pueden dar como resultado un aumento de la vida media, pero también en una disminución de la agregación asociada a la elaboración sin disminuir la potencia contra *Pseudomonas aeruginosa*.

- 5 Las secuencias ilustrativas que pueden estar presentes en un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a Psl y PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* se presentan en la Tabla 1, definidas de acuerdo con la nomenclatura/numeración de Kabat.

Tabla 1: Secuencias de anticuerpos biespecíficos

Sec. con núm. de ident.:	Descripción	Secuencia
1	HCDR1 de anti-PcrV	SYAMN
2	HCDR2 de anti-PcrV	AITMSGITAYYTDDVKG
3	HCDR3 de anti-PcrV	EEFLPGTHYYYGMDV
4	LCDR1 de anti-PcrV	RASQGIRNDLG
5	LCDR2 de anti-PcrV	SASTLQS
6	LCDR3 de anti-PcrV	LQDYNYPWT
7	HCDR1 de anti-Psl	PYYWT
8	HCDR2 de anti-Psl	YIHSSGYTDYNPSLKS
9	HCDR3 de anti-Psl	ADWDRLRALDI

Sec. con número de ident.:	Descripción	Secuencia
10	LCDR1 de anti-PsI	RASQSIRSHLN
11	LCDR2 de anti-PsI	GASNLQS
12	LCDR3 de anti-PsI	QQSTGAWN
13	VH de anti- PcrV	EVQLLES GGGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAP GKGLEWVSAITMSGITAYYTDDVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKEEFLPGTHYYYGMDVWGQGTTVTVSS
14	VL de anti- PcrV	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGK APKLLIYSASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCLQDYNYPWTFGQG TKVEIK
15	VH de anti- PsI	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISPYWWTWIRQPPG KCLELIGYIHSSGYTDYNPSL KSRVTISGDTSKKQFSLKLSSVT AADTAVYYCARADWDRLRALDIWGQGTMTVTVSS
16	VL de anti- PsI	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIRSHLNWYQQKPGKA PKLLIYGASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQSTGAWNWF GCGTKVEIK
17	scFv de anti- PsI	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISPYWWTWIRQPPG KCLELIGYIHSSGYTDYNPSL KSRVTISGDTSKKQFSLKLSSVT AADTAVYYCARADWDRLRALDIWGQGTMTVTVSSGGGGSGG GGSGGGGGSGGGGSDIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI RSHLNWYQQKPGKAPKLLIYGASNLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTIS SLQPEDFATYYCQQSTGAWNWF GCGTKVEIK
18	Enlazador de scFv de anti-PsI	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
19	MEDI3902 pesado	EVQLLES GGGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAP GKGLEWVSAITMSGITAYYTDDVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKEEFLPGTHYYYGMDVWGQGTTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSGGSISPYWWTWIRQPPG KCLELIGYIHSSGYT DYNPSL KSRVTISGDTSKKQFSLKLSSVT AADTAVYYCARAD WDRLRALDIWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SDIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIRSHLNWYQQKPGK

Sec. con número de ident.:	Descripción	Secuencia
		APKLLIYGASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT YYCQQSTGAWNWFSGCGTKVEIKGGGGSGGGGSDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
20	MEDI3902 y AZD0292 ligero	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKA PKLLIYSASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC LQDYNYPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
21	CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSQGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRV
22	H1	EPKSC
23	H2	DKTHTCPPCP
24	CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
25	MEDI3902 CH2-CH3	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
26	Enlazador	[GGGGS]n, donde n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5
27	Enlazador	[GGGG]n, donde n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5
28	L1	[GGGGS]n, donde n es 2
29	L2	[GGGGS]n, donde n es 4
30	CH2-CH3 (N3Y)	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS

Sec. con núm. de ident.:	Descripción	Secuencia
		FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEACSYHLCQKSLSLSPGK
31	AZD0292 Cadena pesada	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAP GKGLEWVSAITMSGITAYYTDDVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKEEFLPGTHYYYGMDVWGQGTTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKSCGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSGGSISPYWTWIRQPPGKCLELIGYIHSSGYT DYNPSLKSRTISGDTSKKQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAD WDRRLRALDIWGQGTMTVSSGGGGSGGGGS SDIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIRSHLNWYQQKPGK APKLLIYGASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQSTGAWNWFVCGTKVEIKGGGGSGGGGSDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEACSYHLCQ KSLSLSPGK
32	Subsecuenci a Fc silvestre	MHEALHNHYTQKSLSLS
33	Subsecuenci a Fc que contiene N3Y	MHEAC <u>SYHL</u> CQKSLSLS
34	Bucle His435 silvestre de IgG1, IgG2, IgG4	LHNHYT
35	Bucle His435 silvestre de IgG3	LHNRFT
36	Variante de región de	CXRHXC

Sec. con núm. de ident.:	Descripción	Secuencia
	bucle His435 modificada	
37	Variante de región de bucle His435 modificada	CRRHXC
38	Variante de región de bucle His435 modificada	CXRHRC
39	Región de bucle His435 modificada	CSWHLC
40	Región de bucle His435 modificada	CSWHLE
41	Variante de región de bucle His435 modificada	CXXXXC, en donde cada X indica cualquier aminoácido
42	Variante de región de bucle His435 modificada	CXXXXCE, en donde cada X indica cualquier aminoácido
43	Variante de Gremubam- ab de YTE	EVQLLES G GGLVQP G GSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAP GKGLEWVSAITMSGITAYYTDDVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKEEFLPGTHYYYGMDVWGQGTTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSGGSISPYWWTWIRQPPGKCLELIGYIHSSGYT DYNPSLKSRTISGDTSKKQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAD WDRLRALDIWGQGTMTVSSGGGGSGGGGS GGGGSGGGG SDIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIRSHLNWYQQKPGK APKLLIYGASNLQSGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT YYCQQSTGAWNWF GCGTKVEIKGGGGSGGGGSDKTHCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD

Sec. con número de ident.:	Descripción	Secuencia
		WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
44	Región del bucle His435 modificada ("N3Y")	CSYHLC
45	AZD0292 Cadena pesada - ADNc	tcagatctca ccgtccttga cacgaagctt actgagcaca caggacctgc agggccgccca ccatgggctg gtctgcac atcctgttct tggtagccac agctacaggt gtacactccg aggtgcagct gttggagctt gggggaggct tggtacagcc tgggggggtcc ctgagactct cctgtgcagc ctctggattc accttagca gctatgcat gaactgggtc cgccaggctc cagggaaggg gctggagtgg gtctcagcta ttactatgag tggattacc gcatactaca ccgacgacgt gaagggcccg ttaccatct cagagacaa ttcaagaac acgtatatc tgcaaatgaa cagcctgagg gccgaggaca cgccgtata ttactgtgcg aaggaagaat ttctacgtg aacgcactac tactacggt tgacgtctg gggccaagg accacgttca ccgtctctc agcgtcgacc aagggcccat ccgtcttccc cctggcacc tctccaaga gcaccttgg gggcacagcg gccctgggct gcctgggtcaa ggactactc cccgaaccg tgacgggtgc ctggaactca ggcgtctga ccagcggcgt gcacacctc ccggctgtcc tacagtctc aggactctac tccctcagca gcgtgggtac cgtgccctcc agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gattgagcc caaatctgt ggcggagggg gctctggcgg agggggatcc cagggtgcagc tgcaggaatc tggccctggc ctctgaagc cctccgagac actgtctctg acctgcaccg tgtccggcgg ctccatctc cttactact ggacctggat cagacagccc cctggcaagt gcctggaact gatcggctac atccactct ccggctacac cgactacaac cccagcctga agtccagagt gaccatctcc ggcgacacct ccaagaagca gttctccctg aagctgtcct ccgtgaccgc cgctgatacc gccgtgtact actgcgccag agccgactgg gacagactga gagccctgga catctggggc cagggcacaa tggcaccgt gtctagcggg ggcggaggat ctgggtgtgg tggatctggc ggcggaggaa gtggtggcgg aggtctgat atccagctga cccagtcccc ctccagcctg tctgttctg tgggcgaccg cgtgaccatc acctgtagag cctccagtc catccggtcc cactgaact ggtatcagca gaagcccggc aaggccccca agctgtgat ctacggcgcc tccaatctgc agtccggcgt gccctctaga ttctccgat ctggctccg caccgacttt acctgacca tcagctcct gcagcccag gacttcgcca cctactactg ccagcagct accggcgctt ggaattgggt cggctgcggc accaagggtg aaatcaaggg cggagggtgg tctggcggag ggggatccga

Sec. con número de ident.:	Descripción	Secuencia
		caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctggggggag cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccttg aggtcacatg cgtgggtgtg gacgtgagcc acgaagaccc tgagggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggt cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggctctc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tctacaccct gcccctatcc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccag cctcccgctg tggactccga cggctcctc ttctctata gcaagctcac cgtggacaag agcagggtgc agcaggggaa cgtcttctca tgcctcgtga tgcattgagg ttgctcatat cacctctgcc agaagagctt aagcctgtct ccgggtaaat gagcgggccgc gaattcacgt gccagccatc tgttgttgcc cctcccccg tgccttctt gacctggaa ggtgccactc ccatgtctt ttctaataa aatagggaaa ttgcatcgca ttgtctgagt aggtgtcatt ctattctggg ggggtgggtg gggcaggaca gcaaggggga ggattgggaa gacaatagca ggcattgatca attt
46	AZD0292 Cadena ligera - cDNA	tcagatctca ccgtccttga cacgaagcta ttcgaactac agttactgag cacacaggac ctctgaccgc catctacca tggacatgag ggtgccggcc cagctgtctg gctgtctgt gctgtggctg cccggggcca agtgcgctat tcagatgacc cagtcacctt ccagcctgtc cgctctgtg ggcgacagag tgaccatcac ctgtcggggc tcccaggga tcagaaacga cctgggctg tatcagcaga agcccggcaa ggcccccaag ctgctgatct actctgcctc cacctgcag tccggcgctg cctccagatt ttccggctct ggctctggca ccgactttac cctgaccatc agctccctgc agcccaggga ctctgccacc tactactgtc tgcaagacta caactacccc tggacctctg gccagggcac caaggaggaa atcaagcga ccgtggccgc tccctccgtg tcatcttcc cacctccga cgagcagctg aagtccggca ccgcctccgt ggtctgcctg ctgaacaact tctacccccg cgaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgccctgcag tccggcaact cccaggaatc cgtcaccgag caggactcca aggacagcac ctactcctg tccagcacc tgacctgtc caaggccgac tacgagaagc acaagggtga cgctgcgaa gtgaccacc agggcctgtc cagccctgtg accaagtct tcaaccgggg cgagtgtga tgaacgtgcc agccatctgt tgttgcccc tccccgtgc ctctctgac cctggaagg gccactcca ctgtccttc ctaataaaat gaggaattg catcgcatg tctgagtagg tgcattcta ttctgggggg tgggtgggg caggacagca agggggagga ttgggaagac aatagcaggc a

a. Dominios de unión al antígeno de anticuerpos anti-*Pseudomonas* biespecíficos con regiones Fc modificadas

En la presente se proporcionan anticuerpos biespecíficos que se unen específicamente al exopolisacárido Psl (Psl) de *Pseudomonas aeruginosa* y a la proteína de secreción tipo 3, PcrV. En consecuencia, en algunos aspectos, los anticuerpos biespecíficos comprenden un dominio de unión a Psl y un dominio de unión a PcrV.

Un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente puede comprender un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a PcrV de *P. aeruginosa* e inhibe competitivamente la unión a PcrV de un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 13 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 14. En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a PcrV de *P. aeruginosa* y se une al mismo epítipo de PcrV como un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 13 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 14.

En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a PcrV de *P. aeruginosa* y comprende (i) una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada en la sec. con núm. de ident.: 13 (*p. ej.*, las CDR definidas por Kabat, definidas por AbM o definidas por Chothia) y (ii) una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera que comprende las secuencias

de aminoácidos de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada en la sec. con núm. de ident.: 14 (*p. ej.*, las CDR definidas por Kabat, definidas por AbM o definidas por Chothia).

En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a PcrV de *P. aeruginosa* y comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1, una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 2, una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 3, una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 4, una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 5, y una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 6. En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a PcrV de *P. aeruginosa* y comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 13. En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a PcrV de *P. aeruginosa* y comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 14. En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a PcrV de *P. aeruginosa* y comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 13 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 14.

En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente comprende un dominio de unión a PcrV con una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera en polipéptidos separados.

En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente
5 comprende un dominio de unión a PcrV con una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera en el mismo polipéptido. En algunos aspectos, un dominio de unión a PcrV con una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera en el mismo polipéptido comprende un enlazador. El enlazador puede estar, por ejemplo, entre la
10 región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera. El enlazador puede ser, por ejemplo, un enlazador rico en glicina o un enlazador glicina-serina. En algunos aspectos, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 18.

En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente comprende un dominio de unión a PcrV que es un scFv. En algunos aspectos, el scFv de unión a PcrV está en la orientación VH-VL, p. ej., VH-enlazador-VL. En algunos aspectos,
15 el scFv de unión a PcrV está en la orientación VL-VH, p. ej., VL-enlazador-VH.

En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a Psl de *P. aeruginosa* e inhibe competitivamente la unión a Psl de un anticuerpo que comprende una
20 región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 15 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 16. En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a Psl de *P. aeruginosa* y se une al mismo epítipo de Psl que un

anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 15 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 16.

En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a Psl de *P. aeruginosa* y comprende (i) una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada en la sec. con núm. de ident.: 15 (p. ej., las CDR definidas por Kabat, definidas por AbM o definidas por Chothia) y (ii) una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada en la sec. con núm. de ident.: 16 (p. ej., las CDR definidas por Kabat, definidas por AbM o definidas por Chothia).

En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a Psl de *P. aeruginosa* y comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 7, una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 8, una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 9, una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 10, una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 11, y una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 12. En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a Psl de *P. aeruginosa* y comprende una región variable de cadena pesada que comprende la

secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 15. En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a Psl de *P. aeruginosa* y comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:

5 16. En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a Psl de *P. aeruginosa* y comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 15 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 16.

10 En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a Psl de *P. aeruginosa* y comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera en el mismo polipéptido. En algunos aspectos, un dominio de unión a PcrV con una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera en el mismo
15 polipéptido comprende un enlazador. El enlazador puede estar, por ejemplo, entre la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera. El enlazador puede ser, por ejemplo, un enlazador rico en glicina o un enlazador glicina-serina. En algunos aspectos, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 18.

En algunos aspectos, el anticuerpo biespecífico comprende un dominio de unión a Psl
20 que es un scFv. El scFv puede comprender un enlazador. El enlazador puede ser, por ejemplo, un enlazador rico en glicina o un enlazador glicina-serina. En algunos aspectos, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 18. En algunos aspectos, el scFv está en la orientación VH-VL, p. ej., VH-enlazador-VL. En algunos aspectos,

el scFv está en la orientación VL-VH, p. ej., VL-enlazador-VH. En algunos aspectos, el scFv comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 17.

En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente comprende un dominio de unión a Psl con una región variable de cadena pesada y una
5 región variable de cadena ligera en polipéptidos separados.

b. Estructura de anticuerpos anti-Pseudomonas biespecíficos con regiones Fc modificadas

En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente es
10 un anticuerpo IgG. El anticuerpo IgG puede ser, por ejemplo, un anticuerpo IgG1. En algunos aspectos, el anticuerpo IgG1 es un anticuerpo IgG1 humano. En algunos aspectos, el anticuerpo IgG1 es un anticuerpo IgG1 humanizado.

El anticuerpo IgG puede ser, por ejemplo, un anticuerpo IgG2. En algunos aspectos, el anticuerpo IgG2 es un anticuerpo IgG2 humano. En algunos aspectos, el anticuerpo
15 IgG2 es un anticuerpo IgG1 humanizado.

El anticuerpo IgG puede ser, por ejemplo, un anticuerpo IgG3. En algunos aspectos, el anticuerpo IgG3 es un anticuerpo IgG3 humano. En algunos aspectos, el anticuerpo IgG3 es un anticuerpo IgG3 humanizado.

El anticuerpo IgG puede ser, por ejemplo, un anticuerpo IgG4. En algunos aspectos, el anticuerpo IgG4 es un anticuerpo IgG4 humano. En algunos aspectos, el anticuerpo
20 IgG4 es un anticuerpo IgG4 humanizado.

En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico como se describe en la presente tiene la estructura de BS1, BS2, BS3 o BS4, todo como se muestra en la Figura 17 de WO 2013/070615, que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico como se describe en la presente
5 tiene la estructura BS4, descrita en detalle en WO 2013/070615, que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad. Por ejemplo, esta descripción proporciona un anticuerpo biespecífico en el que una molécula de scFv anti-Psl se inserta en la región bisagra de cada cadena pesada de un anticuerpo anti-PcrV o fragmento de este.

En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente
10 comprende (i) una cadena pesada de la fórmula VH-CH1-H1-L1-S-L2-H2-CH2-CH3, en donde VH es un dominio variable de cadena pesada de anti-PcrV de *P. aeruginosa*; CH1 es un dominio 1 de región constante de cadena pesada; H1 es un primer fragmento de región bisagra de cadena pesada; L1 es un primer enlazador; S es una molécula de scFv de anti-Psl de *P. aeruginosa*; L2 es un segundo enlazador; H2 es un segundo fragmento de región bisagra
15 de cadena pesada; CH2 es un dominio 2 de región constante de cadena pesada; y CH3 es un dominio 3 de región constante de cadena pesada; y (ii) una cadena ligera de la fórmula VL-CL, en donde VL es un dominio variable de cadena ligera de anti-PcrV de *P. aeruginosa*, y CL es una región constante kappa de cadena ligera del anticuerpo o una región lambda de la cadena ligera del anticuerpo. En algunos aspectos, CL es una región constante kappa de
20 cadena ligera de anticuerpo. En algunos aspectos, la VH comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 13 y la VL comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 14. En algunos aspectos, el scFv comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 15, y la secuencia de aminoácidos de la sec. con

núm. de ident.: 16. En algunos aspectos, la VH comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 13, la VL comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 14, el scFv comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 15 y la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 16. En algunos aspectos, el scFv comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 17. En algunos aspectos, el VH comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 13, la VL comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 14, el scFv comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 17. En algunos aspectos, CH1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 21. En algunos aspectos, L1 y L2 pueden ser iguales o diferentes, y pueden comprender independientemente (a) [GGGGS] n , donde n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5 (sec. con. núm. de ident.: 26), (b) [GGGG] n , donde n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5 (sec. con. núm. de ident.: 27), o una combinación de (a) y (b). En algunos aspectos, H1 comprende la secuencia de aminoácidos EPKSC (sec. con. núm. de ident.: 22). En algunos aspectos, L1 comprende [GGGGS] n , donde n es 2 (sec. con. núm. de ident.: 28). En algunos aspectos, L2 comprende [GGGGS] n , donde n es 2 (sec. con. núm. de ident.: 28). En algunos aspectos, H2 comprende la secuencia de aminoácidos DKTHTCPPCP (sec. con. núm. de ident.: 23). En algunos aspectos CH2-CH3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 30. En algunos aspectos, CL comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 24.

En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 31. En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la

sec. con núm. de ident.: 20. En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 31, y un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 20.

5 En algunos aspectos, los anticuerpos biespecíficos proporcionados en la presente pueden ser un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv) en tándem, que contienen dos fragmentos scFv diferentes unidos covalentemente entre sí por un enlazador (*p. ej.*, un enlazador polipeptídico). (Ren-Heidenreich *et al. Cancer* 100:1095-1103 (2004); Korn *et al. J Gene Med* 6:642-651 (2004)). En algunos aspectos, el enlazador puede contener, o ser,
 10 todo o parte de una región constante polipeptídica de cadena pesada tal como un dominio CH1. En algunos aspectos, los dos fragmentos de anticuerpo pueden estar unidos covalentemente entre sí por medio de un enlazador de poliglicina-serina o poliserina-glicina como se describe en, *p. ej.*, las patentes de los EE. UU. núms. 7.112.324 y 5.525.491, respectivamente. Los métodos para generar anticuerpos scFv biespecíficos en tándem se
 15 describen en, *p. ej.*, Maletz *et al. Int J Cancer* 93:409-416 (2001); y Honemann *et al. Leukemia* 18:636-644 (2004). Alternativamente, los anticuerpos pueden ser “anticuerpos lineales” como se describe en, *p. ej.*, Zapata *et al. Protein Eng.* 8:1057-1062 (1995). Brevemente, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que forman un par de regiones de unión al antígeno.

20 La descripción también abarca formas variantes de anticuerpos biespecíficos tales como las moléculas de inmunoglobulina de dominio variable dual (DVD-Ig) tetravalente descritas en Wu *et al.* (2007) *Nat Biotechnol* 25(11):1290-1297. Las moléculas DVD-Ig están diseñadas de tal manera que dos dominios variables de cadena ligera (VL)

diferentes de dos anticuerpos parentales diferentes se unen en tándem directamente o mediante un enlazador corto mediante técnicas de ADN recombinante, seguido del dominio constante de cadena ligera. Por ejemplo, el polipéptido de cadena ligera DVD-Ig puede contener en tándem: (a) la VL de un dominio de unión a PcrV; y (b) la VL de un dominio de unión a Psl. Similarmente, la cadena pesada comprende los dos dominios variables de cadena pesada (VH) diferentes unidos en tándem, seguidos por el dominio constante CH1 y la región Fc. Por ejemplo, el polipéptido de cadena pesada DVD-Ig puede contener en tándem: (a) la VH de un dominio de unión a PcrV; y (b) la VH de un dominio de unión a Psl. En este caso, la expresión de las dos cadenas en una célula da como resultado un heterotetrámero que contiene cuatro sitios de combinación de antígenos, dos que se unen específicamente a PcrV y dos que se unen específicamente a Psl. Los métodos para generar moléculas de DVD-Ig a partir de dos anticuerpos parentales se describen adicionalmente en, *p. ej.*, las publicaciones PCT núms. WO 2008/024188 y WO 2007/024715, cada una de las cuales se incorpora como referencia en su totalidad.

En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente no comprende una modificación que potencie la formación de hexámero. En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente no es un HexaBody. En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente no es una IgG-hexabody. La tecnología HexaBody se discute, por ejemplo, en de Jong RN, *et al.*, PLoS Biol. 2016 Jan 6;14(1):e1002344. doi: 10.1371/journal.pbio.1002344. PMID: 26736041; PMCID: PMC4703389, que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente no comprende una sustitución E345R. En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico

proporcionado en la presente no comprende una sustitución E430G. En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente no comprende una sustitución S440Y. En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente no comprende una sustitución E345R, E430G o S440Y.

5

c. Regiones Fc modificadas en anticuerpos anti-*Pseudomonas* biespecíficos

Como se proporciona en la presente, un anticuerpo biespecífico con una región Fc modificada puede tener una o más propiedades alteradas en comparación con un anticuerpo “correspondiente” sin la región Fc modificada (*p. ej.*, con una región Fc silvestre). Un anticuerpo “correspondiente” a un anticuerpo de referencia con una región Fc modificada es un anticuerpo que contiene la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de referencia excepto por las modificaciones especificadas en la región Fc. Por lo tanto, por ejemplo, para AZD0292, gremubamab (MEDI3902) es un anticuerpo “correspondiente” porque gremubamab contiene la misma secuencia de aminoácidos que AZD0292 excepto por la modificación N3Y en la región Fc de AZD0292.

Los anticuerpos biespecíficos anti-Psl y anti-PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* proporcionados en la presente pueden explotar el reciclaje mediado por FcRn para lograr vidas medias séricas que pueden ser similares o diferentes a las de la IgG endógena, dependiendo de las propiedades deseadas. Al dotar adicionalmente a los agentes terapéuticos biológicos y de diagnóstico de propiedades farmacocinéticas mejoradas, la presente descripción proporciona oportunidades para dosificaciones más deseables, frecuencia de administración reducida o mejor eliminación, mientras mantiene la eficacia.

La presente descripción proporciona anticuerpos biespecíficos anti-Psl y anti-PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* cuyas vidas medias *in vivo* se alteran (aumentan o disminuyen) por la presencia de un dominio constante de IgG, o fragmento de unión a FcRn de este (*p. ej.*, una región Fc o región bisagra Fc) (*p. ej.*, de una IgG humana, *p. ej.*, IgG1 humana), que tienen
5 modificaciones de uno o más de residuos de aminoácidos en al menos el dominio CH3. Las modificaciones pueden incluir sustituciones de aminoácidos, inserciones, deleciones, o cualquier combinación de los mismos. Debe entenderse que todas las referencias a residuos de aminoácidos de los dominios constantes y variables de IgG que aparecen en la presente están numeradas de acuerdo con el índice de numeración EU de Kabat *et al.* (Sequences of
10 Proteins of Immunological Interest, 5th ed., 1991 NIH Pub. núm. 91-3242, que se incorpora como referencia en la presente en su totalidad), e incluyen residuos correspondientes en otros dominios constantes de IgG determinados por alineación de secuencia.

Más particularmente, la descripción proporciona anticuerpos biespecíficos anti-Psl y anti-PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* cuyas vidas medias *in vivo* están alteradas (aumentadas o
15 disminuidas) por la presencia de un dominio constante de IgG, o fragmento de unión a FcRn de este (*p. ej.*, una región Fc o una región bisagra Fc (*p. ej.*, de una IgG humana, *p. ej.*, IgG1 humana)), que tienen modificaciones de uno o más de los residuos de aminoácidos 432, 433, 434, 435, 436 o 437, y/o que tienen una sola inserción de aminoácido entre los aminoácidos 437 y 438, cuya inserción se denomina en la presente 437*, en la región de bucle His435 del
20 dominio CH3, cuyas sustituciones y/o inserciones de aminoácidos alteran (aumentan o disminuyen) la afinidad de unión del dominio constante de IgG o fragmento de unión a FcRn de este para FcRn a un pH particular (*p. ej.*, pH 6,0 o pH 7,4). Tales modificaciones, que incluyen inserciones entre los residuos 437 y 438, se denominarán generalmente modificaciones dentro

de la región de bucle His435, es decir, en los residuos de aminoácidos 432-437. En ciertos aspectos, estas modificaciones pueden excluir el residuo 435, de tal manera que el dominio constante de IgG modificado, o la porción de unión a FcRn de este (*p. ej.*, una región Fc o región bisagra Fc), contiene His435 que se encuentra en IgG1, IgG2 e IgG4 humanas silvestres. En

5 ciertos aspectos, por ejemplo, la modificación de la región de bucle análoga His435 en la IgG3 humana que en la molécula silvestre incluye la arginina en la posición (R435) en lugar de la histidina (H435) que se encuentra en IgG1, IgG2 e IgG4 y, además, es un sitio de variación alélica conocida, estas modificaciones incluyen la sustitución de un residuo no histidina silvestre 435 con una histidina, para producir H435. En un aspecto, el dominio constante de IgG

10 modificado, o porción de unión a FcRn de este (*p. ej.*, una región Fc o región bisagra Fc), es un dominio constante de IgG humano o humanizado o una porción de unión a FcRn de este, aunque puede ser murino. El dominio constante de IgG humano o humanizado puede ser un dominio constante de un dominio de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, o cualquier subtipo de estos.

Como se proporciona en la presente, las modificaciones de aminoácidos en la región

15 de bucle His435 del dominio CH3 del fragmento Fc de IgG humana, pueden afectar la afinidad de unión del anticuerpo biespecífico a FcRn a uno o más pH. Estas modificaciones pueden dar como resultado una alteración en la dependencia del pH de la unión del anticuerpo biespecífico a FcRn. En algunos aspectos, las modificaciones de aminoácidos en la región de bucle His435 pueden dar como resultado una mayor afinidad de unión del anticuerpo

20 biespecífico para FcRn a pH 6, a pH 7,4, o tanto a pH 6,0 como a 7,4, que la exhibida por un anticuerpo correspondiente con un dominio constante de IgG silvestre. Adicional o alternativamente, las modificaciones pueden afectar la vida media *in vivo* de la molécula.

La región de bucle His435 incluye los residuos de aminoácidos 432, 433, 434, 435, 436 y 437. La secuencia de aminoácidos silvestres de la región de bucle His435 (residuos 432 a 437) del dominio CH3 del fragmento Fc de IgG1, IgG2 e IgG4 humanas es Leu-His-Asn-His-Tyr-Thr (sec. con núm. de ident.: 34) y de IgG3 humana es Leu-His-Asn-Arg-Phe-Thr (sec. con núm. de ident.: 35). En algunos aspectos, una o más modificaciones de aminoácidos en una región Fc se realizan en o cerca de uno o más de los residuos 432, 433, 434, 435, 436 y 437, *p. ej.*, en un dominio constante de IgG humana, o dominio de unión a FcRn de este (*p. ej.*, una región Fc o región bisagra Fc), o residuos análogos de estos, como se determina mediante la alineación de secuencia de aminoácidos, en otras IgG. Tales mutaciones incluyen sustituciones de aminoácidos, así como delecciones e inserciones. Un sitio ilustrativo para una inserción de aminoácidos está entre los residuos 437 y 438, posición añadida a la que se hace referencia en la presente como 437*.

En un aspecto del dominio constante de IgG modificada, o fragmento de unión a FcRn de este (*p. ej.*, una región Fc o una región bisagra Fc), el residuo 435 se mantiene como una histidina (His435) (tal como en IgG1, IgG2 e IgG4 humanas silvestres) o mutado a una histidina (como en IgG3, que contiene de forma nativa R435 y, por lo tanto, se muta a R435H), mientras que al menos uno de los residuos 432, 433, 434, 436 o 437 se sustituye, y/o se realiza una inserción en la posición 437*. En un aspecto, ni el residuo 435 (His435) ni el residuo 433 (His433) se mutan (excepto que, para la IgG3 humana, el residuo 435 tiene la mutación R435H de manera que es His435), mientras que al menos uno de los residuos 432, 434, 436, o 437 se sustituye, y/o se realiza una inserción en la posición 437*. En un aspecto, el dominio de unión a FcRn tiene una sustitución en 1, 2, 3, 4, o la totalidad 5 de los residuos 432, 433, 434, 436, 437, y/o tiene una inserción en la posición 437* en la región de bucle His435. En otro

aspecto, el dominio de unión a FcRn tiene una sustitución en tres o más de las posiciones 432, 433, 434, 435, 436 o 437. En otro aspecto, el dominio de unión a FcRn tiene una sustitución en cuatro o más de las posiciones 432, 433, 434, 435, 436 o 437.

En un aspecto, al menos una de las posiciones 432 y 437 está sustituida con cisteína, y los residuos 433, 434, 435 y 436 están cada uno independientemente sustituido o no sustituido. En ciertos aspectos, los residuos 432 y 437 están ambos sustituidos con cisteínas, y los residuos 433, 434, 435 y 436 están sustituidos independientemente o no sustituidos.

En un aspecto, al menos una de las posiciones 432 y 437 está sustituida con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glutamina, ácido glutámico, ácido aspártico, lisina, arginina e histidina, y los residuos 433, 434, 435 y 436 están cada uno independientemente sustituido o no sustituido. En ciertos aspectos, ambas posiciones 432 y 437 están sustituidas con un aminoácido seleccionado independientemente del grupo que consiste en glutamina, ácido glutámico, ácido aspártico, lisina, arginina e histidina, y los residuos 433, 434, 435 y 436 están cada uno independientemente sustituido o no sustituido.

En un aspecto, un dominio constante de IgG modificada, o fragmento de unión a FcRn de este (*p. ej.*, una región Fc o región bisagra Fc), contiene al menos tres mutaciones en la región de bucle His435, y tiene una histidina en la posición 435 (la histidina en la posición 435 pueden ser residuos silvestres o una mutación). Cualquiera de las diversas permutaciones de tres o más mutaciones (sin incluir una mutación en 435, si está presente) está comprendida por la descripción, que incluyen, pero sin limitarse a, las mutaciones en los siguientes sitios:

Posiciones: 432, 433 y cualquiera de 434, 436, 437 y 437*

Posiciones: 432, 434, y cualquiera de 436, 437 y 437*

Posiciones: 432, 436, y cualquiera de 437 y 437*

Posiciones: 432, 437 y 437*

Posiciones: 433, 434, y cualquiera de 436, 437 y 437*

Posiciones: 433, 436, y cualquiera de 437 y 437*

Posiciones: 433, 437, y 437*

5 Posiciones: 434, 436, y cualquiera de 437 y 437*

Posiciones: 434, 437, y 437*

Posiciones: 436, 437, y 437*

Posiciones: 432, 433, 434, y cualquiera de 436, 437 y 437*

Posiciones: 432, 433, 436, y cualquiera de 437 y 437*

10 Posiciones: 432, 433, 437, y 437*

Posiciones: 432, 434, 436, y cualquiera de 437 y 437*

Posiciones: 432, 434, 437, y 437*

Posiciones: 432, 436, 437, y 437*

Posiciones: 433, 434, 436, y cualquiera de 437 y 437*

15 Posiciones: 433, 434, 437, y 437*

Posiciones: 434, 436, 437, y 437*

Posiciones: 432, 433, 434, 436, y cualquiera de 437 y 437*

Posiciones: 432, 433, 434, 437, y 437*

Posiciones: 432, 433, 436, 437, y 437*

20 Posiciones: 432, 434, 436, 437, y 437*

Posiciones: 433, 434, 436, 437, y 437*

Posiciones: 432, 433, 434, 436, 437, y 437*

En algunos aspectos, el dominio constante de IgG modificada, o fragmento de unión a FcRn de este (*p. ej.*, una región Fc o región bisagra Fc), contiene una mutación en la región de bucle His435 en las posiciones 432, 433, 434, 436 y 437, y tiene una histidina en la posición 435 (la histidina en la posición 435 puede ser un residuo silvestre o una mutación). En un aspecto, una región Fc de IgG modificada comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 44. En un aspecto, una región Fc de IgG1 modificada comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 44. En un aspecto, una región Fc de IgG humana modificada comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 44. En un aspecto, una región Fc de IgG1 humana modificada comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 44. La secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 44 puede denominarse la modificación “N3Y”, mutaciones “N3Y” y lo similar.

En un aspecto, una región Fc de IgG modificada comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 33. En un aspecto, una región Fc de IgG1 modificada comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 33. En un aspecto, una región Fc de IgG humana modificada comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 33. En un aspecto, una región Fc de IgG1 humana modificada comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 33.

En un aspecto del dominio constante de IgG modificada, o fragmento de unión a FcRn de este (*p. ej.*, una región Fc o región bisagra Fc), la región de bucle His435 del dominio CH3 del fragmento Fc tiene la secuencia de aminoácidos CXXXXC (residuos 432-437; sec. con núm. de ident.: 41) o CXXXXCE (residuos 432 a 437* en donde 437* es una inserción; sec. con núm. de ident.: 42). En un aspecto, se pueden generar secuencias de

aminoácidos de bucle His435 ilustrativas para diversos mutantes de IgG HB20.3 a partir de un CXXXXCE (sec. con núm. de ident.: 42).

Sin la intención de limitarse a la teoría, los dos residuos de cisteína pueden ejercer un efecto estabilizador sobre la región de bucle, posiblemente formando una cistina disulfuro. La distancia predicha entre las dos cisteínas es de aproximadamente 6,7 Å, que se encuentra dentro del rango (4,6-7 Å) compatible con la formación de una cistina. En ciertos aspectos basados en el motivo de bucle His435 CXXXXC (sec. con núm. de ident.: 41), las modificaciones de aminoácidos para un dominio constante de IgG modificada, o fragmento de unión a FcRn de este (*p. ej.*, una región Fc o región bisagra Fc), son sustituciones en una o más de las posiciones 432-437, con ambas posiciones 432 y 437 sustituidas con cisteína. La posición 435 es histidina. La posición 433 se puede sustituir por arginina, prolina, treonina, lisina, serina, alanina, metionina o asparagina; en un aspecto, la posición 433 es serina. La posición 434 se puede sustituir por asparagina, triptófano, histidina, fenilalanina, tirosina, serina, metionina o treonina; en un aspecto, la posición 434 es tirosina. La posición 436 se puede sustituir por leucina, arginina, isoleucina, lisina, metionina, valina, histidina, serina o treonina; en un aspecto, la posición 436 es leucina. En algunos aspectos, la región del bucle His435 mutada contiene una inserción de ácido glutámico en la posición 437*.

En un aspecto, las posiciones 432 y 437 son cisteína; la posición 433 es arginina, prolina, treonina, lisina, serina, alanina, metionina, asparagina o histidina; la posición 434 es arginina, triptófano, histidina, fenilalanina, tirosina, serina, metionina, treonina o asparagina; la posición 435 es histidina; y la posición 436 es leucina, arginina, isoleucina, lisina, metionina, valina, histidina, serina, treonina, tirosina o fenilalanina. En un aspecto, la región de bucle His435 es CXRHXC (sec. con núm. de ident.: 36), en donde la posición 433 es histidina o está

sustituida con arginina, prolina, serina o asparagina, y en donde la posición 436 está sustituida con leucina, arginina, isoleucina, metionina o serina. En un aspecto, la región de bucle His435 es CRRHXC (sec. con núm. de ident.: 37) en donde la posición 436 está sustituida con leucina, arginina, isoleucina, lisina, metionina, valina, histidina, serina o treonina. En un aspecto, la
 5 región de bucle His435 es CXRHRC (sec. con núm. de ident.: 38) en donde la posición 433 es arginina, prolina, treonina, lisina, serina, alanina, metionina o asparagina. En un aspecto, la región de bucle His435 es CSWHLC (sec. con núm. de ident.: 39) o CSWHLE (sec. con núm. de ident.: 40). En algunos aspectos, en cualquiera de estos aspectos, la región del bucle His435 mutada contiene una inserción de ácido glutámico en la posición 437*.

10 Las modificaciones de aminoácidos se pueden realizar mediante cualquier método conocido en la técnica y muchos de tales métodos son bien conocidos y rutinarios para el experto en la técnica. Por ejemplo, pero no a manera de limitación, las sustituciones, deleciones e inserciones de aminoácidos pueden lograrse usando cualquier técnica bien conocida basada en la PCR. Las sustituciones de aminoácidos pueden hacerse mediante
 15 mutagénesis dirigida al sitio (ver, por ejemplo, Zoller and Smith, Nucl. Acids Res. 10:6487-6500, 1982; Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci USA 82:488, 1985, que se incorporan en la presente como referencia en su totalidad). Los mutantes que dan como resultado una afinidad aumentada para FcRn y un aumento de la vida media *in vivo* pueden ser fácilmente cribados usando ensayos bien conocidos y rutinarios, tales como los descritos en la presente. Las
 20 sustituciones de aminoácidos se pueden introducir en uno o más residuos en el dominio constante de IgG o fragmento de unión a FcRn de este (*p. ej.*, una región Fc o región bisagra Fc), y los dominios constantes mutados o fragmentos se pueden expresar en las superficies del bacteriófago que después se criban para una afinidad aumentada de unión a FcRn.

Una vez generado, puede usarse un dominio constante de IgG mutada, o fragmento de este (*p. ej.*, una región Fc o región bisagra Fc), en la construcción de un anticuerpo biespecífico (*p. ej.*, mediante la fusión con las porciones variables de un anticuerpo biespecífico de interés) o una molécula de fusión Fc (*p. ej.*, mediante la fusión/conjugación de una entidad heteróloga).

- 5 Una molécula de fusión de IgG o Fc modificada de la descripción puede generarse mediante métodos bien conocidos por un experto en la técnica. Brevemente, tales métodos incluyen, pero no se limitan a, combinar una región variable con la especificidad deseada (*p. ej.*, una región variable aislada de una genoteca de expresión o presentación de fagos o derivada de un anticuerpo humano o no humano) con una región constante IgG modificada, o un fragmento de
10 unión a FcRn de esta (*p. ej.*, una región Fc o región bisagra Fc) que tiene una vida media alterada como se proporciona en la presente. Alternativamente, un experto en la técnica puede generar una molécula de fusión de IgG o Fc modificada de la descripción sustituyendo al menos un residuo de aminoácido en la región Fc de un anticuerpo o molécula de fusión de Fc.

- Además de afectar a la vida media, las modificaciones de aminoácidos descritas en la
15 presente pueden alterar (es decir, aumentar o disminuir) la biodisponibilidad (*p. ej.*, el transporte a las superficies mucosas u otros tejidos diana) de las moléculas, en particular, altera (es decir, aumentan o disminuyen) el transporte (o la concentración o la vida media) de la molécula a las superficies mucosas (*p. ej.*, de los pulmones) u otras porciones de un tejido diana. En algunos aspectos, las modificaciones de aminoácidos alteran (*p. ej.*, aumentan o disminuyen) el
20 transporte o concentración o vida media de la molécula a los pulmones. En algunos aspectos, las modificaciones de aminoácidos alteran (*p. ej.*, aumentan o disminuyen) el transporte (o concentración o vida media) de la molécula al corazón, páncreas, hígado, riñón, vejiga, estómago, intestino grueso o delgado, tracto respiratorio, ganglios linfáticos, tejido nervioso

(tejido nervioso central y/o periférico), músculo, epidermis, hueso, cartílago, articulaciones, vasos sanguíneos, médula ósea, próstata, ovario, útero, tejido tumoral o canceroso, etc.

En algunos aspectos, las modificaciones de aminoácidos no suprimen, o no alteran, una o más funciones de unión al receptor o efectores inmunitarios del dominio constante, por ejemplo, pero sin limitarse a la fijación del complemento, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés), la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, por sus siglas en inglés), la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP, por sus siglas en inglés) y/o la unión a uno o más receptores Fc gamma tales como FcγRI, FcγRII, y FcγRIII. Las IgG modificadas y otras moléculas de la descripción se pueden evaluar para la función efectora usando métodos bien conocidos y rutinarios en la técnica.

Además, la descripción proporciona IgG modificadas adecuadas para una variedad de propósitos diagnósticos y terapéuticos. La descripción proporciona IgG modificadas que exhiben niveles variables de dependencia del pH de su unión a FcRn. Los diferentes niveles de dependencia del pH pueden dar como resultado o correlacionarse con diferentes propiedades farmacocinéticas, que a su vez producen IgG modificadas que son más adecuadas para algunos propósitos que para otros.

Por ejemplo, algunas de las IgG modificadas descritas en la presente exhiben una alta afinidad de unión a FcRn a pH 6,0 junto con un alto nivel de dependencia del pH en su unión a FcRn, y un aumento observado en la vida media in vivo. Las IgG modificadas de este aspecto de la descripción tienen utilidad, por ejemplo, cuando se emplean como agentes terapéuticos en aplicaciones en donde es deseable una vida media in vivo más larga. Opcionalmente, la IgG modificada también exhibe otras propiedades farmacocinéticas mejoradas, tales como capacidad retenida o potenciada para interactuar con ligandos Fc

tales como receptores Fcγ y C1q, actividad robusta de destrucción opsonofagocítica (OPK), y la capacidad de mediar funciones efectoras de Fc (*p. ej.*, CDC, ADCC).

Por el contrario, algunas de las IgG modificadas descritas en la presente exhiben una alta afinidad de unión a FcRn a pH 6,0 junto con un menor nivel de dependencia del pH en su unión a FcRn (típicamente como resultado de una afinidad mejorada para FcRn a pH 7,4), y una disminución observada en la vida media *in vivo*. Las IgG modificadas de este aspecto de la descripción tienen utilidad, por ejemplo, cuando se emplean como agentes terapéuticos en aplicaciones en donde es deseable una vida media *in vivo* más corta, tal como en el tratamiento de ciertas afecciones autoinmunitarias. También pueden ser adecuados para aplicaciones de diagnóstico, tal como cuando se usan como agente de imágenes biológicas, donde se desea una eliminación rápida de fluidos o tejidos corporales.

Adicionalmente, la descripción se relaciona con modificaciones de aminoácidos (*p. ej.*, sustituciones, inserciones o deleciones) en el dominio constante de IgG, o fragmento de unión a FcRn de este (*p. ej.*, una región Fc o una región Fc bisagra), que se ha descubierto que aumentan la afinidad del dominio constante de IgG, o fragmento de este, para FcRn a pH 6, y que opcionalmente alteran la afinidad de la IgG o fragmento de esta para FcRn a pH. 7,4, alterando de esta manera la dependencia del pH de la afinidad de unión del dominio constante de IgG, o fragmento de este (*p. ej.*, una región Fc o región bisagra Fc) para FcRn. Además, estas modificaciones pueden aumentar o disminuir la vida media *in vivo* de la molécula.

En un aspecto, la descripción aborda la importancia farmacéutica de aumentar las vidas medias *in vivo* de anticuerpos biespecíficos anti-Psl y anti-PcrV de *Pseudomonas aeruginosa*. Con este fin, la descripción proporciona anticuerpos biespecíficos anti-Psl y anti-PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* que contienen un dominio constante de IgG modificada o un

fragmento de unión a FcRn de este (*p. ej.*, una región Fc o región bisagra Fc (*p. ej.*, de una IgG humana, *p. ej.*, IgG1 humana)) que confieren una vida media aumentada *in vivo* a las inmunoglobulinas y otras moléculas bioactivas. En este aspecto, la presente descripción se relaciona con anticuerpos biespecíficos anti-Psl y anti-PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* que

5 tienen una vida media *in vivo* aumentada en virtud de la presencia de un dominio constante de IgG modificada, o fragmento de unión a FcRn de este (*p. ej.*, una región Fc o región bisagra Fc (*p. ej.*, de una IgG humana, *p. ej.*, IgG1 humana)) en donde el dominio constante de IgG, o fragmento de este, se modifica (*p. ej.*, mediante sustitución, delección o inserción de aminoácidos) para cambiar (aumentar o disminuir) la afinidad de unión del dominio constante

10 de IgG o fragmento de unión a FcRn para FcRn a un pH particular (*p. ej.*, pH 6,0 o pH 7,4). En un aspecto, el dominio constante de IgG, o fragmento de unión a FcRn de este, se modifica para aumentar la afinidad de unión por FcRn a pH 6,0 en relación con la afinidad de unión para FcRn a pH 7,4. Las vidas medias *in vivo* de las IgG modificadas de la descripción se pueden evaluar convenientemente en un modelo de ratón transgénico humano o un modelo

15 de primates de mono cynomolgus, como se describe, *p. ej.*, en el Ejemplo 2 a continuación.

La mayoría de los anticuerpos modificados de la descripción, ya sea que exhiban vidas medias *in vivo* aumentadas o disminuidas en comparación entre sí o con sus contrapartes no modificadas o silvestres, contienen un dominio constante de IgG, o fragmento de unión a FcRn de este, que exhibe una afinidad aumentada de unión hacia

20 FcRn a pH 6,0 que el dominio constante de IgG silvestre.

De manera más general, un experto en la técnica entenderá que las variantes de Fc de la descripción, ya sea que exhiban vidas medias *in vivo* aumentadas o disminuidas en comparación entre sí o sus contrapartes no modificadas o silvestres, pueden tener propiedades

de unión a FcRn alteradas. Los ejemplos de propiedades de unión incluyen, pero no se limitan a, especificidad de unión, constante de disociación en equilibrio (KD), tasas de disociación y asociación (k_{activado} , y $k_{\text{desactivado}}$ respectivamente), afinidad de unión y/o avidéz. Es bien conocido en la técnica que la constante de disociación de equilibrio (KD) se define como $k_{\text{desactivado}}/k_{\text{activado}}$.

- 5 Se entiende que una interacción de mayor afinidad tendrá una KD menor y a la inversa que una interacción de menor afinidad tendrá una KD mayor. Sin embargo, en algunos casos el valor k_{activado} o $k_{\text{desactivado}}$ puede ser más relevante que el valor de la KD.

Si bien las relaciones entre la afinidad de unión de IgG para FcRn, la dependencia del pH de tal afinidad de unión y la vida media *in vivo* son complejas, para aquellos dominios constantes de IgG que exhiben una unión de afinidad alta a FcRn a pH 6,0 (*p. ej.*, las KD de menos de aproximadamente 500 nM), ya que la afinidad de unión para FcRn a pH 7,4 aumenta (reflejando generalmente una dependencia reducida del pH de la unión a FcRn), por ejemplo, si la KD a pH 7,4 cae por debajo de aproximadamente 1 μM en el rango nanomolar, el resultado puede en algunos casos ser una vida media *in vivo* más corta para la IgG modificada. Por el contrario, la afinidad de unión reducida para FcRn a pH 7,4 (*p. ej.*, las KD a pH 7,4 por encima de aproximadamente 1 μM) junto con una alta afinidad de unión a pH 6,0 (*p. ej.*, las KD de menos de aproximadamente 500 nM), que generalmente refleja una mayor dependencia del pH de la unión a FcRn, puede en algunos casos dar como resultado una vida media *in vivo* más larga.

20 En algunos aspectos, las IgG modificadas y otras moléculas de la descripción contienen un dominio constante de IgG modificada o un fragmento de unión a FcRn de este (*p. ej.*, una región Fc o región bisagra Fc), que exhibe una KD para la unión a FcRn a pH 6,0 de menos de 100 nM, menos de 200 nM, menos de 300 nM, menos de 400 nM,

menos de 500 nM o menos de 1000 nM. Las IgG modificadas de la descripción pueden, por ejemplo, caracterizarse por valores de KD para la unión a FcRn a pH 6,0 de 10 nM a 500 nM, 50 nM a 500 nM. En algunos aspectos, la IgG modificada de la descripción exhibe al menos una mejora de 10 veces, al menos una mejora de 20 veces, o al menos una mejora de 50 veces de la afinidad de unión para FcRn a pH 6,0 en comparación con un dominio constante de IgG silvestre, o fragmento de unión a FcRn de este.

Adicional o alternativamente, una IgG modificada puede exhibir una afinidad de unión para FcRn a pH 7,4 que está entre 10 nM y 50 μ M. Sin la intención de limitarse a la teoría, se observa que puede existir un umbral: a pH 7,4, una KD de aproximadamente 1 μ M o superior (*p. ej.*, una KD de 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M, 50 μ M, o superior; es decir, las afinidades de unión en el rango micromolar o milimolar que evidencian una menor afinidad de unión para FcRn) que pueden estar asociadas con una IgG modificada u otra molécula que tenga una vida media más larga (eliminación más lenta), mientras que una KD de menos de 1 pM a pH 7,4 (*p. ej.*, una KD de 50 nM, 100 nM, 200 nM, 500 nM, 800 nM hasta aproximadamente 1000 nM; es decir, las afinidades de unión en el rango nanomolar, que evidencian una mayor afinidad de unión para FcRn) puede estar asociada con una IgG modificada u otra molécula que tenga una vida media más corta (eliminación más rápida). Una vida media aumentada para la IgG modificada u otra molécula se asocia generalmente, pero no siempre, con la unión dependiente del pH a FcRn caracterizada por una KD de 50 nM a 400 nM o 500 nM para la unión a pH 6, y una KD de más de 1 μ M a pH 7,4.

La estructura del dominio constante de IgG (o fragmento de unión a FcRn de este, *p. ej.*, una región Fc o región bisagra Fc) fuera de la región de bucle His435 puede denominarse en la presente “estructura base” o “fondo” de IgG de la molécula y estos dos

términos se usan indistintamente. Por lo tanto, la descripción contempla IgG modificadas con mutaciones en la región de bucle His435 incorporadas en una estructura base IgG silvestre o una estructura de base IgG mutante. Se puede utilizar cualquier estructura base de IgG mutante; en la presente se describen estructuras base de IgG mutante ilustrativas pero no limitantes. En ciertos aspectos, la estructura base de IgG tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 25 o 19.

Las moléculas de inmunoglobulina modificadas de la descripción incluyen moléculas de IgG que contienen naturalmente un dominio de unión a FcRn, así como otras inmunoglobulinas no IgG (*p. ej.*, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY) o fragmentos de inmunoglobulinas que han sido diseñadas genéticamente para contener un fragmento de unión a FcRn (es decir, proteínas de fusión que comprenden una inmunoglobulina no IgG o un fragmento de esta y un dominio de unión a FcRn, tal como una región Fc o una región bisagra Fc). En ambos casos, el dominio de unión a FcRn tiene una o más modificaciones de aminoácidos que aumentan la afinidad del fragmento de dominio constante para FcRn a pH 6,0 y, opcionalmente, afectan (ya sea aumentan o disminuyen) la dependencia del pH de la unión a FcRn.

Las inmunoglobulinas modificadas incluyen cualquier molécula de inmunoglobulina que se une (preferentemente, inmunoespecíficamente, es decir, compete por la unión no específica), como se determina mediante inmunoensayos bien conocidos en la técnica para el estudio de la unión antígeno-anticuerpo específica) a un antígeno y contiene un fragmento de unión a FcRn. Tales anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, biespecíficos, multiespecíficos, humanos, humanizados y quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla.

Las inmunoglobulinas (y otras proteínas usadas en la presente) pueden ser de cualquier origen animal que incluye aves y mamíferos. Los anticuerpos pueden ser, por ejemplo, humanos, roedores (*p. ej.*, ratón y rata), burro, oveja, conejo, cabra, conejillos de indias, camello, caballo o pollo. Como se usa en la presente, los anticuerpos “humanos” incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulina humana o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, como se describe más adelante y, por ejemplo, en la patente de los EE. UU. núm. 5.939.598 de Kucherlapati *et al.*

10

d. Propiedades adicionales de anticuerpos anti-*Pseudomonas* biespecíficos con regiones Fc modificadas

En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente (*p. ej.*, AZD0292) media la actividad citotóxica contra *Pseudomonas* (*p. ej.*, *Pseudomonas aeruginosa*). En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente (*p. ej.*, AZD0292) se dirige a *Pseudomonas* (*p. ej.*, *Pseudomonas aeruginosa*) para la destrucción opsonofagocítica (OPK). Los métodos para evaluar la actividad citotóxica y/o la OPK son conocidos en la técnica y se proporcionan en la presente, *p. ej.*, en el Ejemplo 1.

15

En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente (*p. ej.*, AZD0292) tiene una actividad citotóxica similar contra *Pseudomonas* (*p. ej.*, *Pseudomonas aeruginosa*) como gremubamab (MEDI3902). En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente (*p. ej.*, AZD0292) tiene una actividad OPK similar contra *Pseudomonas* (*p. ej.*, *Pseudomonas aeruginosa*) como

20

gremubamab. En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente (*p. ej.*, AZD0292) tiene actividad citotóxica y actividad OPK similares contra *Pseudomonas* (*p. ej.*, *Pseudomonas aeruginosa*) como gremubamab.

En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente (*p. ej.*, AZD0292) previene la unión celular, *p. ej.*, previene la unión de *Pseudomonas* (*p. ej.*, *Pseudomonas aeruginosa*), a células huésped. Se conocen en la técnica métodos para evaluar la prevención de la unión y se proporcionan, *p. ej.*, en WO 2013/070615, y se incorporan en la presente como referencia en su totalidad. En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente (*p. ej.*, AZD0292) interrumpe la formación de biopelículas. En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente (*p. ej.*, AZD0292) inhibe la formación de colonias primarias.

En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente (*p. ej.*, AZD0292) exhibe menos agregación en solución que gremubamab. En algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente (*p. ej.*, AZD0292) exhibe menos agregación en una prueba de sobrecrecimiento en placa agitada que gremubamab (ver, *p. ej.*, el Ejemplo 4).

III. Usos de anticuerpos anti-pseudomonas biespecíficos con regiones Fc modificadas

También se proporcionan en la presente métodos para preparar y administrar moléculas de unión a anti-Psl y/o anti-PcrV de *Pseudomonas*, *p. ej.*, un anticuerpo o fragmento, variante o derivado de este, como se describe en la presente a un sujeto que lo necesita. La vía de administración de las moléculas de unión a anti-Psl y/o anti-PcrV de *Pseudomonas*, *p. ej.*, anticuerpo o fragmento, variante o derivado de estos, puede ser, por

ejemplo, parenteral. El término parenteral como se usa en la presente incluye, *p. ej.*, administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular o subcutánea. Una forma adecuada para la administración sería una solución inyectable, en particular para inyección intravenosa o intraarterial o goteo. Sin embargo, en otros métodos compatibles con las enseñanzas de la presente, una molécula de unión a anti-Psl y/o anti-PcrV de *Pseudomonas*, *p. ej.*, anticuerpo o fragmento, variante o derivado de estos, como se describe en la presente, se puede suministrar directamente al sitio de la población celular adversa, *p. ej.*, infección, aumentando de esta manera la exposición del tejido enfermo al agente terapéutico. Por ejemplo, una molécula de unión a anti-Psl y/o anti-PcrV de *Pseudomonas* se puede administrar directamente al tejido ocular, lesión por quemadura o tejido pulmonar.

Las moléculas de unión a anti-Psl y/o anti-PcrV de *Pseudomonas*, *p. ej.*, anticuerpos o fragmentos, variantes o derivados de estos, como se describe en la presente, se pueden administrar en una cantidad farmacéuticamente efectiva para el tratamiento *in vivo* de una infección por *Pseudomonas*. En este sentido, se apreciará que los anticuerpos biespecíficos descritos se formularán para facilitar la administración y promover la estabilidad del agente activo. Para los fines de la solicitud inmediata, una cantidad farmacéuticamente efectiva se relaciona con una cantidad suficiente para lograr una unión efectiva a una diana y para lograr un beneficio, *p. ej.*, tratar, mejorar, disminuir, eliminar o prevenir la infección por *Pseudomonas*.

Algunos aspectos están dirigidos a un método para prevenir o tratar una infección por *Pseudomonas* en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de la molécula de unión o fragmento de esta, el anticuerpo o fragmento de este. En aspectos adicionales, la infección por *Pseudomonas* es una infección por *P. aeruginosa*. En algunos aspectos, el sujeto es un humano. En ciertos aspectos, la infección es una infección

ocular, una infección pulmonar, una infección por quemadura, una infección de la herida, una infección de la piel, una infección de la sangre, una infección ósea, o una combinación de dos o más de dichas infecciones. En aspectos adicionales, el sujeto padece neumonía aguda, lesión por quemadura, infección corneal, fibrosis quística, o una combinación de estas.

5 Ciertos aspectos están dirigidos a un método de bloqueo o prevención de la unión de *P. aeruginosa* a células epiteliales que comprende poner en contacto una mezcla de células epiteliales y *P. aeruginosa* con la molécula de unión o fragmento de esta, el anticuerpo o fragmento de este descrito en la presente.

10 También se describe un método para potenciar la OPK de *P. aeruginosa* que comprende contactar una mezcla de células fagocíticas y *P. aeruginosa* con la molécula de unión o fragmento de esta, el anticuerpo o fragmento de este, la composición, el polinucleótido, el vector, o la célula huésped descrita en la presente. En aspectos adicionales, las células fagocíticas son células HL-60 diferenciadas o leucocitos polimorfonucleares humanos (PMN).

15 a. Métodos y usos de anticuerpos anti-*Pseudomonas* biespecíficos con regiones Fc modificadas en el tratamiento de bronquiectasias

20 Como se demuestra en la presente, los anticuerpos biespecíficos que se unen específicamente a Psl y PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* y tienen regiones Fc modificadas (p. ej., AZD0292) son útiles en el tratamiento de sujetos con bronquiectasia. En consecuencia, en la presente se proporcionan métodos de tratamiento que usan tales anticuerpos biespecíficos, usos de tales anticuerpos biespecíficos en la preparación de medicamentos y anticuerpos biespecíficos para usar en tratamientos.

En algunos aspectos, en la presente se proporcionan métodos para tratar bronquiectasias (*p. ej.*, bronquiectasia por fibrosis no quística). Los métodos pueden comprender administrar al sujeto un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a la proteína PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* y exopolisacárido Psl y que comprende una
5 región Fc modificada (*p. ej.*, AZD0292). El sujeto puede ser, *p. ej.*, un sujeto que esté colonizado con *Pseudomonas aeruginosa*.

En algunos aspectos, en la presente se proporcionan métodos para mejorar el volumen espiratorio forzado en 1 segundo (FEV₁) prebroncodilatador en un sujeto con bronquiectasia (*p. ej.*, bronquiectasia por fibrosis no quística). Los métodos pueden
10 comprender administrar al sujeto un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a la proteína PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* y exopolisacárido Psl y que comprende una región Fc modificada (*p. ej.*, AZD0292). El sujeto puede ser, *p. ej.*, un sujeto que esté colonizado con *Pseudomonas aeruginosa*.

En algunos aspectos, en la presente se proporcionan métodos para reducir la carga
15 de *Pseudomonas aeruginosa* en un sujeto con bronquiectasia (*p. ej.*, bronquiectasia por fibrosis no quística). Los métodos pueden comprender administrar al sujeto un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a la proteína PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* y exopolisacárido Psl y que comprende una región Fc modificada (*p. ej.*, AZD0292). El sujeto puede ser, *p. ej.*, un sujeto que esté colonizado con *Pseudomonas aeruginosa*.

20 En algunos aspectos, en la presente se proporcionan métodos para reducir las exacerbaciones de bronquiectasias en un sujeto con bronquiectasia (*p. ej.*, bronquiectasia por fibrosis no quística). Los métodos pueden, por ejemplo, reducir las exacerbaciones de bronquiectasias que requieren hospitalización y/o reducir las exacerbaciones de

bronquiectasias que requieren antibióticos. Los métodos pueden comprender administrar al sujeto un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a la proteína PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* y exopolisacárido Psl y que comprende una región Fc modificada (p. ej., AZD0292). El sujeto puede ser, p. ej., un sujeto que esté colonizado con

5 *Pseudomonas aeruginosa*.

En algunos aspectos, en la presente se proporcionan métodos para reducir la necesidad de antibióticos intravenosos en un sujeto con bronquiectasia (p. ej., bronquiectasia de fibrosis no quística). Los métodos pueden comprender administrar al sujeto un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a la proteína PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* y

10 exopolisacárido Psl y que comprende una región Fc modificada (p. ej., AZD0292). El sujeto puede ser, p. ej., un sujeto que esté colonizado con *Pseudomonas aeruginosa*.

En algunos aspectos, en la presente se proporcionan métodos para estabilizar la función pulmonar en un sujeto con bronquiectasia (p. ej., bronquiectasia por fibrosis no quística). Los métodos pueden comprender administrar al sujeto un anticuerpo biespecífico

15 que se une específicamente a la proteína PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* y exopolisacárido Psl y que comprende una región Fc modificada (p. ej., AZD0292). El sujeto puede ser, p. ej., un sujeto que esté colonizado con *Pseudomonas aeruginosa*.

En algunos aspectos, en la presente se proporcionan métodos para mejorar la frecuencia y/o intensidad de la tos en un sujeto con bronquiectasia (p. ej., bronquiectasia por

20 fibrosis no quística). Los métodos pueden comprender administrar al sujeto un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a la proteína PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* y exopolisacárido Psl y que comprende una región Fc modificada (p. ej., AZD0292). El sujeto puede ser, p. ej., un sujeto que esté colonizado con *Pseudomonas aeruginosa*.

En algunos aspectos, en la presente se proporcionan métodos para disminuir los síntomas de bronquiectasia en un sujeto con bronquiectasia (*p. ej.*, bronquiectasia por fibrosis no quística). Los métodos pueden comprender administrar al sujeto un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a la proteína PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* y exopolisacárido Psl y que comprende una región Fc modificada (*p. ej.*, AZD0292). El sujeto puede ser, *p. ej.*, un sujeto que esté colonizado con *Pseudomonas aeruginosa*.

En algunos aspectos, en la presente se proporcionan métodos para mejorar la calidad de vida en un sujeto con bronquiectasia (*p. ej.*, bronquiectasia por fibrosis no quística). Los métodos pueden comprender administrar al sujeto un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a la proteína PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* y exopolisacárido Psl y que comprende una región Fc modificada (*p. ej.*, AZD0292). El sujeto puede ser, *p. ej.*, un sujeto que esté colonizado con *Pseudomonas aeruginosa*.

En algunos aspectos, en la presente se proporcionan métodos para erradicar *Pseudomonas aeruginosa* en un sujeto con bronquiectasia (*p. ej.*, bronquiectasia por fibrosis no quística). Los métodos pueden comprender administrar al sujeto un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a la proteína PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* y exopolisacárido Psl y que comprende una región Fc modificada (*p. ej.*, AZD0292). El sujeto puede ser, *p. ej.*, un sujeto que esté colonizado con *Pseudomonas aeruginosa*.

En algunos aspectos, en la presente se proporcionan métodos para inducir la supresión sostenida de *Pseudomonas aeruginosa* en un sujeto con bronquiectasia (*p. ej.*, bronquiectasia de fibrosis no quística). Los métodos pueden comprender administrar al sujeto un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a la proteína PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* y

exopolisacárido Psl y que comprende una región Fc modificada (p. ej., AZD0292). El sujeto puede ser, p. ej., un sujeto que esté colonizado con *Pseudomonas aeruginosa*.

En algunos aspectos, en la presente se proporcionan métodos para reducir el riesgo de progresión de bronquiectasias relacionado con *Pseudomonas aeruginosa* en un sujeto con bronquiectasia (p. ej., bronquiectasia por fibrosis no quística). Los métodos pueden comprender administrar al sujeto un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a la proteína PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* y exopolisacárido Psl y que comprende una región Fc modificada (p. ej., AZD0292). El sujeto puede ser, p. ej., un sujeto que esté colonizado con *Pseudomonas aeruginosa*.

Una bronquiectasia adecuada para el tratamiento de acuerdo con los métodos y usos proporcionados en la presente puede ser bronquiectasia por fibrosis no quística. En algunos aspectos, la bronquiectasia por fibrosis no quística se confirmó mediante tomografía computarizada (TC) de tórax demostrando bronquiectasia que afecta a 1 o más lóbulos en un sujeto.

Un sujeto con bronquiectasia (p. ej., bronquiectasia por fibrosis no quística) adecuado para el tratamiento de acuerdo con los métodos y usos proporcionados en la presente puede ser un sujeto que esté colonizado con *Pseudomonas aeruginosa*. Se pueden identificar sujetos con colonización por *Pseudomonas aeruginosa*, p. ej., usando cultivo de esputo rutinario. En algunos aspectos, el sujeto está colonizado con una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* que comprende un genoma que comprende un operón Psl. En algunos aspectos, el sujeto está colonizado con una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* que comprende un genoma que comprende un loci que codifica PcrV.

En algunos aspectos, el sujeto está infectado crónicamente con *Pseudomonas aeruginosa*. Como se usa en la presente, un sujeto que está “infectado crónicamente” se relaciona con un sujeto colonizado con al menos dos aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*, de manera concurrente o secuencial, mientras se mantiene clínicamente estable durante un año.

Un sujeto con bronquiectasia (*p. ej.*, bronquiectasia por fibrosis no quística) adecuado para el tratamiento de acuerdo con los métodos y usos proporcionados en la presente puede ser un sujeto con neutrofilia de las vías respiratorias y/o neutrofilia de esputo.

Un sujeto con bronquiectasia (*p. ej.*, bronquiectasia por fibrosis no quística) adecuado para el tratamiento de acuerdo con los métodos y usos proporcionados en la presente puede ser un sujeto con antecedentes de al menos dos exacerbaciones de bronquiectasia moderada a grave por año que requieren antibióticos.

Un sujeto con bronquiectasia (*p. ej.*, bronquiectasia por fibrosis no quística) adecuado para el tratamiento de acuerdo con los métodos y usos proporcionados en la presente puede ser un sujeto con antecedentes de al menos una exacerbación que requiere atención hospitalaria.

Un sujeto con bronquiectasia (*p. ej.*, bronquiectasia por fibrosis no quística) adecuado para el tratamiento de acuerdo con los métodos y usos proporcionados en la presente puede ser un sujeto que recibe antibióticos nebulizados a largo plazo.

Un sujeto con bronquiectasia (*p. ej.*, bronquiectasia por fibrosis no quística) adecuado para el tratamiento de acuerdo con los métodos y usos proporcionados en la presente puede ser un sujeto con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

Un sujeto con bronquiectasia (*p. ej.*, bronquiectasia por fibrosis no quística) adecuado para el tratamiento de acuerdo con los métodos y usos proporcionados en la presente puede ser un sujeto humano.

Como se proporciona en la presente, la bronquiectasia (*p. ej.*, bronquiectasia por
5 fibrosis no quística) de cualquier causa se puede tratar de acuerdo con los métodos y usos proporcionados en la presente. Por ejemplo, en algunos aspectos, la bronquiectasia (*p. ej.*, bronquiectasia por fibrosis no quística) fue causada por hipogammaglobulinemia. En algunos aspectos, la bronquiectasia (*p. ej.*, bronquiectasia por fibrosis no quística) fue causada por inmunodeficiencia variable común. En algunos aspectos, la bronquiectasia (*p.*
10 *ej.*, bronquiectasia por fibrosis no quística) fue causada por deficiencia de alfa-1-antitripsina.

Los métodos y usos proporcionados en la presente pueden comprender administrar un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a la proteína PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* y exopolisacárido de Psl y que comprende una región Fc modificada (*p. ej.*, AZD0292) a un sujeto. La administración puede ser administración
15 intravenosa. La administración puede ser administración subcutánea.

Los métodos y usos proporcionados en la presente son efectivos en el tratamiento de bronquiectasias (*p. ej.*, bronquiectasia por fibrosis no quística). En algunos aspectos de los métodos y usos proporcionados en la presente, la administración de un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a la proteína PcrV de *Pseudomonas aeruginosa*
20 y exopolisacárido de Psl y que comprende una región Fc modificada (*p. ej.*, AZD0292) reduce la *Pseudomonas aeruginosa* en cultivos de esputo obtenidos del sujeto, *p. ej.*, en comparación con la *Pseudomonas aeruginosa* en cultivos de esputo obtenidos del sujeto antes de la administración. La reducción puede ocurrir, *p. ej.*, dentro de las 12 semanas

siguientes a la primera administración del anticuerpo biespecífico, dentro de las 8 semanas siguientes a la primera administración del anticuerpo biespecífico o dentro de las 4 semanas siguientes a la primera administración del anticuerpo biespecífico. En algunos aspectos de los métodos y usos proporcionados en la presente, la administración de un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a la proteína PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* y exopolisacárido de Psl y que comprende una región Fc modificada (*p. ej.*, AZD0292) disminuye el uso de antibióticos por parte del sujeto, *p. ej.*, en comparación con el uso del sujeto antes de la administración. En algunos aspectos de los métodos y usos proporcionados en la presente, la administración de un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a la proteína PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* y el exopolisacárido de Psl (*p. ej.*, AZD0292) erradica la *Pseudomonas aeruginosa* en el sujeto.

Los métodos y usos proporcionados en la presente pueden comprender administrar un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a la proteína PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* y exopolisacárido de Psl y que comprende una región Fc modificada (*p. ej.*, AZD0292) a un sujeto en combinación con un antibiótico. En algunos aspectos, los métodos y usos proporcionados en la presente comprenden administrar un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a la proteína PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* y exopolisacárido Psl y que comprende una región Fc modificada (*p. ej.*, AZD0292) a un sujeto en combinación con un aminoglucósido, ticarcilina, una ureidopenicilina, ciprofloxacina, cefepima, gentamicina, amikacina, tobramicina, ceftazidima, aztreonam, cefotaxima, meropenem, polimixina b, o cualquier combinación de estas.

b. Métodos y usos de anticuerpos anti-*Pseudomonas* biespecíficos con regiones Fc modificadas en la prevención o tratamiento de infecciones nosocomiales

Esta descripción proporciona un método para prevenir la infección nosocomial en un sujeto humano susceptible, donde el método incluye administrar al sujeto un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a la proteína PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* y exopolisacárido Psl y que comprende una región Fc modificada (*p. ej.*, AZD0292). Un sujeto humano susceptible es una persona que está en riesgo de contraer una infección nosocomial pero en el momento de la administración no presenta una infección o no muestra síntomas de una infección; o una persona que haya contraído una infección nosocomial que requiera intervención o mitigación. El método incluye además monitorizar al sujeto para detectar síntomas después de la administración del anticuerpo biespecífico durante, *p. ej.*, 1 día, 3 días, 5 días, 7 días, 10 días, 15 días, 21 días, 28 días o 30 días. En un aspecto, el método incluye monitorear al sujeto para detectar síntomas a través de al menos aproximadamente 21 días o más desde el día de la administración. Las “infecciones nosocomiales” se definen en otra parte de la presente e incluyen, *p. ej.*, neumonía, bacteriemia, infección ósea, infección articular, infección de la piel, infección por quemaduras, infección de heridas, peritonitis, sepsis y/o un absceso. Los síntomas asociados con infecciones nosocomiales, *p. ej.*, neumonía, son conocidos en la técnica. En ciertos aspectos, la infección nosocomial es causada por, o es exacerbada por *P. aeruginosa*. De acuerdo con este método, el sujeto humano es tratado exitosamente si, *p. ej.*, a 1 día, 3 días, 5 días, 8 días, 10 días, 15 días, 21 días, 28 días o 30 días después de la administración, el sujeto permanece libre de síntomas (si el sujeto estaba libre de síntomas en el momento de la administración) o muestra síntomas menos graves de lo que se esperaría si no se tratara con un anticuerpo anti-*Pseudomonas* biespecífico que comprende una

región Fc modificada (*p. ej.*, AZD0292). En un aspecto, el sujeto humano se trata con éxito si a los 21 días después de la administración, el sujeto permanece libre de síntomas (si el sujeto estaba libre de síntomas en el momento de la administración) o muestra síntomas menos graves de lo que se esperaría si no se tratara con un anticuerpo *anti-Pseudomonas* biespecífico que comprende una región Fc modificada (*p. ej.*, AZD0292). En otro aspecto, el sujeto humano es tratado exitosamente si a los 28 o 30 días después de la administración, el sujeto permanece libre de síntomas (si el sujeto estaba libre de síntomas en el momento de la administración) o muestra síntomas menos graves de lo que se esperaría si no se tratara con un anticuerpo *anti-Pseudomonas* biespecífico que comprende una región Fc modificada (*p. ej.*, AZD0292).

En otro aspecto, esta descripción proporciona un método para prevenir o tratar la neumonía, *p. ej.*, neumonía adquirida en el hospital o no adquirida en el hospital en un sujeto humano susceptible, donde el método incluye administrar al sujeto un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a la proteína PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* y exopolisacárido de Psl y que comprende una región Fc modificada (*p. ej.*, AZD0292). En ciertos aspectos la neumonía es nosocomial o iatrogénica. Un sujeto humano susceptible es una persona que está en riesgo de contraer neumonía pero en el momento de la administración no presenta síntomas de neumonía; o una persona que ha contraído neumonía que requiere intervención o mitigación. El método incluye además monitorear al sujeto para detectar síntomas de neumonía después de la administración del anticuerpo biespecífico durante, *p. ej.*, 1 día, 3 días, 5 días, 7 días, 10 días, 15 días, 21 días, 28 días o 30 días. En un aspecto, el método incluye monitorear al sujeto para detectar síntomas al menos aproximadamente 21 días desde el día de la administración. Los síntomas asociados con la neumonía son conocidos en la técnica. En ciertos aspectos la neumonía

es causada por, o es exacerbada por, *P. aeruginosa*. De acuerdo con este método, el sujeto humano es tratado exitosamente si, p. ej., a 1 día, 3 días, 5 días, 8 días, 10 días, 15 días, 21 días, 28 días o 30 días después de la administración, el sujeto permanece libre de síntomas (si el sujeto estaba libre de síntomas en el momento de la administración) o muestra síntomas menos graves de lo que se esperaría si no se tratara con un anticuerpo anti-*Pseudomonas* biespecífico que comprende una región Fc modificada (p. ej., AZD0292). En un aspecto, el sujeto humano es tratado exitosamente si a los 7 días después de la administración, el sujeto permanece libre de síntomas (si el sujeto estaba libre de síntomas en el momento de la administración) o muestra síntomas menos graves de lo que se esperaría si no se tratara con un anticuerpo anti-*Pseudomonas* biespecífico que comprende una región Fc modificada (p. ej., AZD0292). En un aspecto, el sujeto humano es tratado exitosamente si a los 21 días después de la administración, el sujeto permanece libre de síntomas (si el sujeto estaba libre de síntomas en el momento de la administración) o muestra síntomas menos graves de lo que se esperaría si no se tratara con un anticuerpo anti-*Pseudomonas* biespecífico que comprende una región Fc modificada (p. ej., AZD0292). En otro aspecto, el sujeto humano es tratado exitosamente si a los 28 o 30 días después de la administración, el sujeto permanece libre de síntomas (si el sujeto estaba libre de síntomas en el momento de la administración) o muestra síntomas menos graves de lo que se esperaría si no se tratara con un anticuerpo anti-*Pseudomonas* biespecífico que comprende una región Fc modificada (p. ej., AZD0292).

En otro aspecto, esta descripción proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad causada por *Pseudomonas aeruginosa*, p. ej., neumonía, traqueobronquitis, bacteriemia, endocarditis, meningitis, otitis media, queratitis bacteriana, endoftalmitis,

osteomielitis, enfermedad gastrointestinal, infección cutánea, septicemia, o cualquier combinación de estas, en un sujeto humano susceptible. En ciertos aspectos la enfermedad causada por *Pseudomonas aeruginosa* es nosocomial o iatrogénica. Un sujeto humano susceptible es una persona que está en riesgo de contraer una enfermedad tratable o prevenible por los métodos proporcionados en la presente pero que en el momento de la administración no presenta síntomas de la enfermedad; o una persona que haya contraído una enfermedad causada por *Pseudomonas aeruginosa* que requiera tratamiento, intervención o mitigación.

Los métodos proporcionados en la presente son adecuados para usar con sujetos humanos susceptibles como se describe en otra parte de la presente. Los ejemplos incluyen sujetos que están a punto de ser hospitalizados, que actualmente están hospitalizados, que fueron hospitalizados recientemente, que están a punto de estar, están actualmente o recientemente con un respirador mecánico, o una combinación de estos. La hospitalización, en algunos casos, puede ser en una unidad de cuidados intensivos (UCI). La ventilación mecánica, si se requiere, puede ser a través de intubación, *p. ej.*, a través de una sonda endotraqueal o nasotraqueal, o a través de una traqueostomía. Los pacientes que están a punto de estar, están actualmente o estuvieron recientemente con ventilación mecánica pueden tener un mayor riesgo de contraer una infección respiratoria, *p. ej.*, neumonía, *p. ej.*, neumonía por *Pseudomonas aeruginosa*. En aquellas situaciones en las que está indicada la ventilación mecánica, la administración de un anticuerpo biespecífico como lo proporcionado por los métodos descritos puede reducir el riesgo de contraer neumonía, por ejemplo, mientras se está con ventilación mecánica, después de que ya no se requiere ventilación mecánica, o una combinación de estos.

En ciertos aspectos, el sujeto está colonizado con *Pseudomonas aeruginosa* en el tracto respiratorio, *p. ej.*, el tracto respiratorio inferior, en el momento de la administración del anticuerpo biespecífico. En ciertos aspectos el tracto respiratorio del sujeto se coloniza con *P. aeruginosa* uno, dos, tres o cuatro días antes de la administración del anticuerpo biespecífico.

5 La colonización se puede medir, *p. ej.*, mediante la detección de *P. aeruginosa* en un aspirado traqueal dentro de las 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, o 96 horas antes de la administración del anticuerpo biespecífico. En ciertos aspectos de los métodos proporcionados en la presente, el sujeto no ha recibido antibióticos considerados activos contra la cepa de *P. aeruginosa* con la que se coloniza el sujeto antes de la administración del anticuerpo
10 biespecífico. En ciertos aspectos, el tracto respiratorio del sujeto puede ser colonizado adicionalmente por *staphylococcus aureus* en el momento de la administración del anticuerpo anti-*Pseudomonas* biespecífico que comprende una región Fc modificada (*p. ej.*, AZD0292).

En ciertos aspectos el sujeto no presenta síntomas de neumonía al momento de la administración del anticuerpo biespecífico. Los síntomas se pueden medir de acuerdo con
15 la Escala clínica de infección pulmonar (CPIS, por sus siglas en inglés). Se puede inferir una falta de síntomas *p. ej.*, si a las 24 horas previas a la administración del anticuerpo biespecífico el sujeto tiene una CPIS menor que 6.

Los métodos proporcionados en la presente incluyen monitorear a un sujeto para detectar síntomas de enfermedad, *p. ej.*, síntomas de neumonía, después de la administración
20 del anticuerpo biespecífico. En ciertos aspectos, el sujeto puede ser monitoreado para detectar neumonía mediante radiografía de tórax, observación de signos o síntomas respiratorios de neumonía, confirmación microbiológica de neumonía o cualquier combinación de estas. Se puede determinar que un sujeto tiene neumonía, *p. ej.*, cuando se observa un infiltrado nuevo o

que empeora, compatible con neumonía, en una radiografía de tórax, cuando el sujeto muestra al menos dos signos o síntomas respiratorios menores o al menos uno mayor de neumonía, cuando el espécimen obtenido del sujeto da positivo para *P. aeruginosa* por cultivo, o cualquier combinación de estos. En ciertos aspectos el espécimen es una secreción respiratoria del sujeto. Se puede obtener una secreción respiratoria a partir del esputo expectorado, mediante aspiración endotraqueal, broncoscopia con lavado broncoalveolar, el uso de un cepillo de espécimen protegido en un sujeto intubado, o cualquier combinación de estos.

Los signos o síntomas respiratorios menores de neumonía incluyen, sin limitarse a, una temperatura corporal mayor que aproximadamente 38 °C, una temperatura corporal central menor que aproximadamente 35 °C, un recuento de glóbulos blancos mayor que aproximadamente 10.000 células por milímetro cúbico (mm^3), un recuento de glóbulos blancos menor que aproximadamente 4500 células por mm^3 , un recuento de neutrófilos en banda mayor que aproximadamente 15 %, producción de nuevas secreciones endotraqueales purulentas o esputo, nuevos hallazgos auscultatorios, matidez a la percusión, una nueva aparición de tos, disnea, taquipnea, hipoxemia o cualquier combinación de estas. Los principales signos o síntomas respiratorios de neumonía pueden incluir, sin limitarse a, un cambio agudo realizado en el sistema de soporte ventilatorio para potenciar la oxigenación que comprende una relación $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ menor que aproximadamente 240 mm Hg mantenida durante al menos cuatro horas, una disminución en la relación $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ mayor que aproximadamente 50 mm Hg mantenida durante al menos cuatro horas, la necesidad de iniciar o reiniciar la ventilación mecánica en un sujeto no ventilado mecánicamente, o cualquier combinación de estos. La confirmación microbiológica de la neumonía puede incluir, sin limitarse a, un espécimen respiratorio positivo para *P. aeruginosa* por cultivo, un hemocultivo

positivo para *P. aeruginosa*, un aspirado de líquido pleural o cultivo de tejido pulmonar positivo para *P. aeruginosa*, o cualquier combinación de estos.

En ciertos aspectos, los métodos proporcionados por esta descripción pueden incluir además administrar un antibiótico al sujeto antes, simultáneamente con, y/o después de la administración del anticuerpo biespecífico. Los antibióticos adecuados pueden incluir, sin limitarse a, aminoglucósidos, ticarcilina, ureidopenicilinas, ciprofloxacina, cefepima, gentamicina, amikacina, tobramicina, ceftazidima, aztreonam, cefotaxima, o cualquier combinación de estos. Las dosis adecuadas y la duración del tratamiento pueden determinarse fácilmente por un proveedor de atención médica. En ciertos aspectos, la cepa de *P. aeruginosa* con la que se coloniza el sujeto es sensible al antibiótico elegido para su administración. En otros aspectos, sin embargo, la cepa de *P. aeruginosa* con la que se coloniza el sujeto es resistente o parcialmente resistente a uno o más de los antibióticos disponibles elegidos para su administración.

IV. Métodos para producir anticuerpos anti-Pseudomonas biespecíficos

Un anticuerpo anti-*Pseudomonas* biespecífico que comprende una región Fc modificada (*p. ej.*, AZD0292) de la descripción se puede producir mediante cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, en particular, mediante síntesis química o mediante técnicas de expresión recombinante.

La presente descripción también proporciona polinucleótidos que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo biespecíficos anti-Psl y anti-PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* que comprende un dominio constante de IgG modificada de la descripción o un fragmento de unión a FcRn de este (*p. ej.*, una región Fc o región bisagra

Fc), así como vectores que comprenden dichos polinucleótidos. En aspectos particulares, la presente descripción proporciona un polinucleótido aislado que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada del anticuerpo biespecífico descrito en la presente. En algunos aspectos, el polinucleótido aislado comprende además una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera del anticuerpo biespecífico descrito en la presente.

La secuencia de nucleótidos de los anticuerpos biespecíficos anti-PsI y anti-PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* que comprenden el dominio constante de IgG modificada y los polinucleótidos que codifican el mismo puede obtenerse mediante cualquier método conocido en la técnica, que incluye el método de secuenciación general del ADN, tal como el método de terminación de cadena didesoxi (secuenciación de Sanger), y el cebador oligonucleótido en combinación con PCR, respectivamente.

La secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo puede obtenerse a partir de cualquier información disponible para los expertos en la técnica (es decir, de Genbank, la literatura, o mediante clonación rutinaria). Si un clon que contiene un ácido nucleico que codifica un anticuerpo particular o un fragmento de unión al epítipo de este no está disponible, pero se conoce la secuencia de la molécula de anticuerpo o fragmento de unión al epítipo de esta, un ácido nucleico que codifica la inmunoglobulina puede sintetizarse químicamente u obtenerse de una fuente adecuada (*p. ej.*, una genoteca de ADNc de anticuerpo o una genoteca de ADNc generada a partir de, o ácido nucleico, por ejemplo, ARN poli A+, aislado de cualquier tejido o célula que exprese el anticuerpo, tal como células de hibridoma seleccionadas para expresar un anticuerpo) mediante amplificación por PCR usando cebadores sintéticos hibridables a los extremos 3' y 5' de la secuencia o mediante clonación usando una sonda de oligonucleótidos específica para la secuencia de genes

particular para identificar, *p. ej.*, un clon de ADNc de una genoteca de ADNc que codifica el anticuerpo. Los ácidos nucleicos amplificados generados por PCR pueden después clonarse en vectores de clonación replicables usando cualquier método bien conocido en la técnica.

Una vez que se determina la secuencia de nucleótidos del anticuerpo, la secuencia
5 de nucleótidos del anticuerpo puede manipularse usando métodos bien conocidos en la técnica para la manipulación de secuencias de nucleótidos, *p. ej.*, técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida al sitio, PCR, etc. (ver, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al.*, 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; y Ausubel *et al.*, eds., 1998, Current
10 Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY, que se incorporan ambos en la presente como referencia en su totalidad), para generar anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo, introduciendo sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos en las regiones del dominio de unión a epítopos de los anticuerpos, por ejemplo, en las regiones bisagra Fc de los anticuerpos que están
15 implicadas en la interacción con FcRn. Se pueden generar anticuerpos que tienen una o más modificaciones en los residuos de aminoácidos 432-437 u otras ubicaciones.

En modalidades particulares, la molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada del anticuerpo biespecífico tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 45. En modalidades particulares, la molécula de ácido nucleico que codifica la
20 cadena ligera del anticuerpo biespecífico tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 46.

La expresión recombinante de un anticuerpo requiere la construcción de un vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo. Una vez

que se ha obtenido una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de anticuerpo o una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, o una porción de este (opcionalmente, pero no necesariamente, que contiene la región variable de cadena pesada o ligera), el vector para la producción de la molécula de anticuerpo puede producirse mediante tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en la técnica. Por lo tanto, en la presente se describen métodos para preparar una proteína expresando un polinucleótido que contiene un anticuerpo que codifica una secuencia nucleotídica. Los métodos que son bien conocidos por los expertos en la técnica se pueden usar para construir vectores de expresión que contienen secuencias codificantes de anticuerpos y señales de control transcripcional y traduccional apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante in vitro, técnicas sintéticas y recombinación genética in vivo. La descripción, por lo tanto, proporciona vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo con una o más modificaciones en los residuos de aminoácidos implicados en la interacción con FcRn (ver, *p. ej.*, la publicación PCT WO 86/05807; Publicación PCT WO 89/01036; y la patente de los EE. UU. núm. 5.122.464). La secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena pesada, región variable de cadena ligera, tanto las regiones variables de cadena pesada como de cadena ligera, un fragmento de unión a epítomos de la región variable de cadena pesada y/o ligera, o una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo puede clonarse en tal vector para la expresión.

Por lo tanto, en algunos aspectos proporcionados en la presente, la presente descripción se relaciona con un vector que comprende (i) una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada del anticuerpo biespecífico, o (ii) una molécula de ácido

nucleico que codifica la cadena pesada del anticuerpo biespecífico descrito en la presente y una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera del anticuerpo biespecífico descrito en la presente. En algunos aspectos, la presente descripción se relaciona con un par de vectores, en donde el primer vector del par de vectores comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada del anticuerpo biespecífico descrito en la presente, y el segundo vector del par de vectores comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera del anticuerpo biespecífico descrito en la presente. En modalidades particulares, la molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada del anticuerpo biespecífico tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 45.

En modalidades particulares, la molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera del anticuerpo biespecífico tiene una secuencia de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 46.

El vector de expresión se transfiere a una célula huésped mediante técnicas convencionales y las células transfectadas son entonces cultivadas mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo que tiene una afinidad aumentada para FcRn y una vida media in vivo aumentada. Por lo tanto, la descripción incluye células huésped que contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo, un dominio constante o un fragmento de unión a FcRn de este que tiene una o más modificaciones en los residuos de aminoácidos 432-437 u otras ubicaciones, opcionalmente unidos operativamente a un promotor heterólogo.

Puede utilizarse una variedad de sistemas de vectores de expresión huésped para expresar las moléculas de anticuerpos de la descripción. Tales sistemas de expresión huésped representan vehículos mediante los cuales las secuencias codificantes de interés pueden producirse y purificarse posteriormente, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas,

expresar una molécula de anticuerpo de la descripción *in situ*. Estos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias (*p. ej.*, *E. coli* y *B. subtilis*) transformadas con ADN de bacteriófago recombinante, ADN plasmídico o vectores de expresión de ADN cósmido que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; levadura (*p. ej.*, *Saccharomyces* y *Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (*p. ej.*, baculovirus) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (*p. ej.*, virus del mosaico de la coliflor, CaMV, por sus siglas en inglés; y el virus del mosaico del tabaco, TMV por sus siglas en inglés) o transformado con vectores de expresión plasmídicas recombinantes (*p. ej.*, plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; y sistemas celulares de mamíferos (*p. ej.*, células COS, CHO, BHK, 293, 3T3 y NS0) que albergan constructos de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (*p. ej.*, promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (*p. ej.*, el promotor tardío del adenovirus; el promotor del virus vaccinia 7.5K). Las células bacterianas tales como *Escherichia coli*, y las células eucariotas, que son muy adecuadas para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante completa, se usan para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante. Por ejemplo, las células de mamíferos tales como las células de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés), junto con un vector tal como el principal elemento promotor génico intermedio temprano del citomegalovirus humano, es un sistema de expresión efectivo para anticuerpos (Foecking *et al.*, Gene, 45:101, 1986, and Cockett *et al.*, Bio/Technology, 8:2, 1990).

En sistemas bacterianos, pueden seleccionarse ventajosamente varios vectores de expresión dependiendo del uso previsto para la molécula de anticuerpo que se expresa. Por ejemplo, cuando se debe producir una gran cantidad de tal proteína, para la generación de composiciones farmacéuticas de una molécula de anticuerpo, pueden ser deseables vectores que dirijan la expresión de altos niveles de productos de proteína de fusión que se purifiquen fácilmente. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther *et al.*, EMBO, 12:1791, 1983), en el que la secuencia codificante del anticuerpo puede ligarse individualmente en el vector en el marco de la región codificante lacZ, de manera que se produce una proteína de fusión; y vectores pIN (Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res., 13:3101-3109, 1985 y Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem., 24:5503-5509, 1989).

En un sistema de insectos, el virus de la polihedrosis nuclear autographa californica (AcNPV, por sus siglas en inglés) se usa como vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante del anticuerpo puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de la polihedrina) del virus y colocarse bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el promotor de polihedrina).

En células huésped de mamíferos, pueden utilizarse varios sistemas de expresión basados en virus para expresar una molécula de anticuerpo de la descripción. En los casos en los que se usa un adenovirus como vector de expresión, la secuencia codificante del anticuerpo de interés puede ligarse a un complejo de control de transcripción/traducción de adenovirus, *p. ej.*, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico puede insertarse entonces en el genoma del adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (*p. ej.*, región E1 o E3) dará como resultado un virus

recombinante que es viable y capaz de expresar la molécula de anticuerpo en huéspedes infectados (*p. ej.*, ver Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:355-359, 1984). También pueden requerirse señales de iniciación específicas para una traducción eficiente de secuencias codificantes de anticuerpos insertadas. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y
5 secuencias adyacentes. Además, el codón de iniciación debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para asegurar la traducción de todo el inserto. Estas señales de control traduccionales exógenas y codones de iniciación pueden ser de una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficiencia de la expresión puede potenciarse mediante la inclusión de elementos potenciadores de transcripción apropiados, terminadores de
10 transcripción, etc. (ver, *p. ej.*, Bitter *et al.*, Methods in Enzymol., 153:516-544, 1987).

Además, puede elegirse una cepa de célula huésped que modula la expresión de las secuencias de anticuerpos, o modifica y procesa el anticuerpo de la manera específica deseada. Tales modificaciones (*p. ej.*, glicosilación) y procesamiento (*p. ej.*, escisión) de productos proteicos pueden ser importantes para la función del anticuerpo. Diferentes
15 células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento postraducciona y modificación de proteínas y productos génicos. Se pueden elegir líneas celulares o sistemas hospedadores apropiados para garantizar la modificación y el procesamiento correctos del anticuerpo expresado. Para ello, pueden usarse células huésped eucariotas que poseen la maquinaria celular necesaria para el correcto
20 procesamiento del transcrito primario, la glicosilación y la fosforilación del producto génico. Tales células huésped de mamíferos incluyen, pero no se limitan a, CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, y en particular, células de mieloma tales como células

NS0, y líneas celulares relacionadas, ver, por ejemplo, Morrison *et al.*, la patente de los EE. UU. núm. 5.807.715, que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

Para la producción a largo plazo de alto rendimiento de anticuerpos recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan de manera estable la molécula de anticuerpo pueden diseñarse genéticamente. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes virales de replicación, las células huésped se pueden transformar con ADN controlado por elementos de control de expresión apropiados (*p. ej.*, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador seleccionable. Después de la introducción del ADN extraño, puede permitirse que las células diseñadas genéticamente crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido, y después se cambien a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de manera estable el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos que a su vez se pueden clonarse y expandir en líneas celulares. Este método puede usarse ventajosamente para diseñar líneas celulares que expresan la molécula de anticuerpo. Tales líneas celulares diseñadas genéticamente pueden ser particularmente útiles en el cribado y evaluación de composiciones que interactúan directa o indirectamente con la molécula de anticuerpo.

Pueden usarse varios sistemas de selección, que incluyen, pero no se limitan a, los genes de la timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler *et al.*, Cell, 11:223, 1977), hipoxantinguanina fosforribosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48:202, 1992), y adenina fosforribosiltransferasa (Lowy *et al.*, Cell, 22:8-17, 1980) que se pueden emplear en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. También, la resistencia a antimetabolitos se puede usar como base de selección para los siguientes genes: dhfr, que

confiere resistencia al metotrexato (Wigler *et al.*, Natl. Acad. Sci. USA, 77:357, 1980 and O'Hare *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:1527, 1981); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:2072, 1981); neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418 (Wu and Wu, Biotherapy, 3:87-95, 1991; Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 32:573-596, 1993; Mulligan, Science, 260:926-932, 1993; y Morgan and Anderson, Ann. Rev. Biochem., 62: 191-217, 1993; y May, TIB TECH, 11(5):155-215, 1993); e hgro, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre *et al.*, Gene, 30:147, 1984). Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología del ADN recombinante pueden aplicarse de manera rutinaria para seleccionar el clon recombinante deseado, y tales métodos se describen, por ejemplo, en Ausubel *et al.* (eds.), 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY; en los Capítulos 12 y 13, Dracopoli *et al.* (eds), 1994, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY; y Colberre-Garapin *et al.*, J. Mol. Biol., 150:1, 1981, que se incorporan en la presente como referencia en su totalidad.

Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo se pueden aumentar mediante la amplificación vectorial (para una revisión, ver Bebbington and Hentschel, 1987, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol.3. Academic Press, New York). Cuando un marcador en el sistema vectorial que expresa un anticuerpo es amplificable, el aumento del nivel de inhibidor presente en el cultivo de la célula huésped aumentará el número de copias del gen marcador. Dado que la región amplificada se asocia con el gen del anticuerpo, la producción del anticuerpo también aumentará (Crouse *et al.*, Mol., Cell. Biol., 3:257, 1983).

La célula huésped puede cotransfectarse con dos vectores de expresión de la descripción, el primer vector codifica un polipéptido derivado de cadena pesada y el segundo vector codifica un polipéptido derivado de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten la expresión igual de polipéptidos de cadena pesada y ligera o diferentes marcadores seleccionables para asegurar el mantenimiento de ambos plásmidos. Alternativamente, puede usarse un único vector que codifica, y es capaz de expresar, polipéptidos de cadena pesada y ligera. En tales situaciones, la cadena ligera debe colocarse antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre de tóxicos (Proudfoot, Nature, 322:52, 1986; y Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:2 197, 1980). Las secuencias codificantes para las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Una vez que un anticuerpo anti-*Pseudomonas* biespecífico que comprende una región Fc modificada (*p. ej.*, AZD0292) de la descripción se ha producido mediante expresión recombinante, se puede purificar mediante cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, mediante cromatografía (*p. ej.*, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad por el antígeno específico después de la purificación de proteína A y cromatografía en columna de tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial o mediante cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos de la presente descripción o fragmentos de estos pueden fusionarse con secuencias polipeptídicas heterólogas descritas en la presente o, de cualquier otra manera, conocidas en la técnica para facilitar la purificación.

V. Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas usadas en esta descripción pueden comprender anticuerpos biespecíficos anti-Psl y anti-PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* que comprenden regiones Fc modificadas (*p. ej.*, AZD0292) y portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos por los expertos en la técnica. Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones acuosas o no acuosas estériles, suspensiones y emulsiones.

La vía de administración de un anticuerpo biespecíficos anti-Psl y anti-PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* con una región Fc modificada puede ser, por ejemplo, parenteral. El término parenteral como se usa en la presente incluye, *p. ej.*, la administración por vía intravenosa y subcutánea. En consecuencia, una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo biespecíficos anti-Psl y anti-PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* que comprende una región Fc modificada (*p. ej.*, AZD0292) se puede formular para la administración por vía intravenosa. En algunos aspectos, una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo biespecíficos anti-Psl y anti-PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* que comprende una región Fc modificada (*p. ej.*, AZD0292) se puede formular para la administración por vía subcutánea. Una forma adecuada para la administración sería una solución inyectable.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos biespecíficos anti-Psl y anti-PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* que comprenden regiones Fc modificadas (*p. ej.*, AZD0292) se pueden administrar y/o formular, *p. ej.*, para el tratamiento de una enfermedad de la descripción.

Los anticuerpos biespecíficos anti-Psl y anti-PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* que comprenden una región Fc modificada (*p. ej.*, AZD0292) se pueden administrar en una

cantidad farmacéuticamente efectiva para el tratamiento *in vivo* o la prevención de la infección por *Pseudomonas aeruginosa*.

Como se proporciona en la presente, las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos biespecíficos anti-Psl y anti-PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* que comprenden una región Fc modificada (*p. ej.*, AZD0292) se pueden formular para su administración en combinación con un antibiótico. En algunos aspectos, los anticuerpos biespecíficos se formulan para su administración en combinación con un aminoglucósido, ticarcilina, una ureidopenicilina, ciprofloxacina, cefepima, gentamicina, amikacina, tobramicina, ceftazidima, aztreonam, cefotaxima, meropenem, polimixina b, o cualquier combinación de estos.

VI. Kits que comprenden anticuerpos anti-*Pseudomonas* biespecíficos con regiones Fc modificadas

La descripción también proporciona un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la descripción. Opcionalmente, se puede asociar con tal(es) recipiente(s) un aviso en el formato prescrito por una agencia gubernamental que regula la elaboración, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, aviso que refleja la aprobación por parte de la agencia de la elaboración, el uso o la venta para administración humana.

La presente descripción proporciona kits que se pueden usar en los métodos anteriores. En un aspecto, un kit comprende un anticuerpo biespecíficos anti-Psl y anti-PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* que comprende una región Fc modificada de la descripción (*p. ej.*, AZD0292), opcionalmente en una forma purificada, en uno o más recipientes. En un aspecto específico, los kits de la presente descripción contienen un antígeno sustancialmente

aislado o una combinación de antígenos (*p. ej.*, PcrV y Psl) como control. Opcionalmente, los kits de la presente descripción comprenden además un anticuerpo de control, proteína de fusión o molécula conjugada que no reacciona con el antígeno incluido en el kit. En otro aspecto específico, los kits de la presente descripción contienen un medio para detectar la unión de un anticuerpo biespecíficos anti-Psl y anti-PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* que comprende una región Fc modificada de la descripción (*p. ej.*, AZD0292) a un antígeno (*p. ej.*, el anticuerpo biespecíficos anti-Psl y anti-PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* que comprende una región Fc modificada de la descripción (*p. ej.*, AZD0292), puede conjugarse con un sustrato detectable tal como un compuesto fluorescente, un sustrato enzimático, un compuesto radiactivo o un compuesto luminiscente, o un segundo anticuerpo que reconoce el primer anticuerpo puede conjugarse con un sustrato detectable). En aspectos específicos, el kit puede incluir un antígeno o combinación de antígenos producidos recombinantemente o sintetizados químicamente. El (los) antígeno(s) proporcionados en el kit también pueden estar unidos a un soporte sólido. En un aspecto más específico, los medios de detección del kit descrito anteriormente incluyen un soporte sólido al que se une un antígeno o una combinación de antígenos. Tal kit también puede incluir un anticuerpo antihumano etiquetado con indicador no adherido. En este aspecto, la unión del anticuerpo al antígeno puede detectarse mediante la unión de dicho anticuerpo etiquetado con indicador.

VII. Inmunoensayos

Los anticuerpos biespecíficos anti-Psl y anti-PcrV de *Pseudomonas* que comprenden una región Fc modificada de la descripción (*p. ej.*, AZD0292) se pueden analizar para la unión inmuno-específica mediante cualquier método conocido en la técnica.

Los inmunoensayos que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que usan técnicas tales como transferencia Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos “sándwich”, ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunorradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A, por nombrar solo algunos. Tales ensayos son rutinarios y bien conocidos en la técnica (*ver, p. ej., Ausubel et al., eds, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York, Vol. 1 (1994),* que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad). Los inmunoensayos ilustrativos se describen brevemente a continuación (sin que ello suponga una limitación).

Existe una variedad de métodos disponibles para medir la afinidad de una interacción anticuerpo-antígeno, pero relativamente pocos para determinar las constantes de velocidad. La mayoría de los métodos se basan en etiquetar anticuerpos o antígenos, lo que inevitablemente complica las mediciones rutinarias e introduce incertidumbres en las cantidades medidas. La afinidad de anticuerpos se puede medir mediante una serie de métodos, que incluyen OCTET®, BIACORE®, ELISA y FACS.

El sistema OCTET® usa biosensores en formato de placa de 96 pocillos para reportar el análisis cinético. Los eventos de unión y disociación de proteínas se pueden monitorear midiendo la unión de una proteína en solución a una segunda proteína inmovilizada en el biosensor FortéBio. En el caso de la medición de la unión de anticuerpos biespecíficos anti-Psl y anti-PcrV de *Pseudomonas* con modificaciones en la región Fc mediante inmovilización en puntas OCTET® seguido del análisis de la unión del

anticuerpo, que está en solución. A continuación, el sensor del instrumento detecta la asociación y disociación del anticuerpo a anticuerpos biespecíficos anti-Psl y anti-PcrV de *Pseudomonas* inmovilizados con modificaciones de la región Fc. Después, los datos se recopilan y exportan a GraphPad Prism para el ajuste de la curva de afinidad.

5 La resonancia de plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés) realizada en BIACORE® ofrece una serie de ventajas sobre los métodos convencionales para medir la afinidad de las interacciones anticuerpo-antígeno: (i) no es necesario etiquetar ni el anticuerpo ni el antígeno; (ii) los anticuerpos no necesitan purificarse previamente, el sobrenadante del cultivo celular se puede usar directamente; (iii) se pueden realizar
10 mediciones en tiempo real, que permiten una rápida comparación semicuantitativa de diferentes interacciones de anticuerpos monoclonales, y son suficientes para muchos propósitos de evaluación; (iv) la superficie bioespecífica se puede regenerar de manera que una serie de diferentes anticuerpos monoclonales se puedan comparar fácilmente en condiciones idénticas; (v) los procedimientos analíticos están completamente
15 automatizados y se pueden realizar amplias series de mediciones sin intervención del usuario. BIAapplications Handbook, versión AB (reimpreso 1998), código BIACORE® núm. BR-1001-86; BIAtechnology Handbook, versión AB (reimpreso 1998), código BIACORE® núm. BR-1001-84.

20 Los estudios de unión basados en SPR requieren que un miembro de un par de unión se inmovilice en la superficie de un sensor. El compañero de unión inmovilizado se denomina ligando. El compañero de unión en solución se denomina analito. En algunos casos, el ligando se une indirectamente a la superficie mediante la unión a otra molécula inmovilizada, a la que se hace referencia como la molécula de captura. La respuesta SPR

refleja un cambio en la concentración de masa en la superficie del detector a medida que los analitos se unen o disocian.

Basadas en SPR, las mediciones BIACORE® en tiempo real monitorean las interacciones directamente a medida que ocurren. La técnica es muy adecuada para la determinación de parámetros cinéticos. La clasificación de afinidad comparativa es extremadamente simple de realizar, y tanto las constantes cinéticas como de afinidad se pueden derivar de los datos del diagrama de sensores.

Cuando el analito se inyecta en un pulso discreto a través de una superficie de ligando, el diagrama de sensores resultante se puede dividir en tres fases esenciales: (i) asociación del analito con el ligando durante la inyección de la muestra; (ii) equilibrio o estado estacionario durante la inyección de la muestra, donde la velocidad de unión del analito se equilibra mediante la disociación del complejo; (iii) disociación del analito de la superficie durante el flujo del regulador.

Las fases de asociación y disociación proporcionan información sobre la cinética de la interacción analito-ligando (k_a y k_d , las tasas de formación y disociación de complejos, $k_d/k_a = K_D$). La fase de equilibrio proporciona información sobre la afinidad de la interacción analito-ligando (K_D).

El software BIAevaluation proporciona instalaciones integrales para el ajuste de curvas usando algoritmos de integración numérica y ajuste global. Con un análisis adecuado de los datos, se pueden obtener constantes de velocidad y afinidad separadas para la interacción a partir de investigaciones simples de BIACORE®. El rango de afinidades medibles por esta técnica es muy amplio, variando de mM a pM.

La especificidad del epítopo es una característica importante de un anticuerpo monoclonal. El mapeo de epítomos con BIACORE®, a diferencia de las técnicas convencionales que usan radioinmunoensayo, ELISA u otros métodos de absorción de superficie, no requiere etiquetado ni anticuerpos purificados y permite pruebas de
5 especificidad de múltiples sitios usando una secuencia de varios anticuerpos monoclonales. Además, se puede procesar automáticamente un gran número de análisis.

Los experimentos de unión por pares prueban la capacidad de dos MAb de unirse simultáneamente al mismo antígeno. Los MAb dirigidos contra epítomos separados se unirán independientemente, mientras que los MAb dirigidos contra epítomos idénticos o
10 estrechamente relacionados interferirán con la unión de cada uno. Estos experimentos de unión con BIACORE® son sencillos de llevar a cabo.

Por ejemplo, uno puede usar una molécula de captura para unir el primer MAb, seguido de la adición secuencial del antígeno y el segundo MAb. Los diagramas de sensores revelarán: 1. cuánto antígeno se une al primer MAb, 2. en qué medida el segundo MAb se
15 une al antígeno unido a la superficie, 3. si el segundo MAb no se une, determinar si invertir el orden de la prueba por pares altera los resultados.

La inhibición de péptidos es otra técnica usada para el mapeo de epítomos. Este método puede complementar los estudios de unión de anticuerpos por pares, y puede relacionar epítomos funcionales con características estructurales cuando se conoce la
20 secuencia primaria del antígeno. Se prueban péptidos o fragmentos de antígeno para la inhibición de la unión de diferentes MAb al antígeno inmovilizado. Se supone que los péptidos que interfieren con la unión de un MAb determinado están estructuralmente relacionados con el epítopo definido por ese MAb.

VIII. Usos de diagnóstico

En algunos aspectos proporcionados en la presente, los anticuerpos biespecíficos anti-Psl y anti-PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* con regiones Fc modificadas son útiles para detectar la presencia de anti-Psl y/o anti-PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* en una muestra o un individuo. El término “detectar” tal como se usa en el presente documento abarca la detección cuantitativa o cualitativa. En la presente se proporcionan métodos para usar los anticuerpos de esta descripción con fines de diagnóstico, tales como la detección de Psl y/o PcrV de *Pseudomonas aeruginosa* en un individuo o en muestras de tejido derivadas de un individuo. En algunos aspectos, el individuo es un humano. El método de detección puede implicar la cuantificación del anticuerpo unido al antígeno. La detección de anticuerpos en muestras biológicas puede ocurrir con cualquier método conocido en la técnica, que incluye microscopía de inmunofluorescencia, inmunocitoquímica, inmunohistoquímica, ELISA, análisis FACS, inmunoprecipitación o tomografía por emisión de micropositrones. En ciertos aspectos, el anticuerpo se radioetiqueta, por ejemplo con ¹⁸F, y posteriormente se detecta utilizando análisis de tomografía por emisión de micropositrones. La unión de anticuerpos también puede cuantificarse en un paciente mediante técnicas no invasivas, tales como la tomografía por emisión de positrones (PET, por sus siglas en inglés), la tomografía computarizada con rayos X, la tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT, por sus siglas en inglés), la tomografía computarizada (TC, por sus siglas en inglés) y la tomografía axial computarizada (CAT, por sus siglas en inglés).

La práctica de la descripción empleará, a menos que se indique de cualquier otra manera, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de la técnica. Tales técnicas se explican plenamente en la literatura. Ver, por ejemplo, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., Sambrook *et al.*, ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press: (1989); *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Sambrook *et al.*, ed., Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1992), *DNA Cloning*, D. N. Glover ed., Volumes I and II (1985); *Oligonucleotide Synthesis*, M. J. Gait ed., (1984); Mullis *et al.* U.S. Pat. No: 4.683.195; *Nucleic Acid Hybridization*, B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1984); *Transcription And Translation*, B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1984); *Culture Of Animal Cells*, R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., (1987); *Immobilized Cells And Enzymes*, IRL Press, (1986); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); the treatise, *Methods In Enzymology*, Academic Press, Inc., N.Y.; *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*, J. H. Miller and M. P. Calos eds., Cold Spring Harbor Laboratory (1987); *Methods In Enzymology*, Vols. 154 and 155 (Wu *et al.* eds.); *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology*, Mayer and Walker, eds., Academic Press, London (1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-IV, D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., (1986); *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); y en Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989).

Los principios generales de la ingeniería de anticuerpos se exponen en *Antibody Engineering*, 2nd edition, C.A.K. Borrebaeck, Ed., Oxford Univ. Press (1995). Los principios generales de ingeniería de proteínas se exponen en *Protein Engineering, A Practical Approach*, Rickwood, D., *et al.*, Eds., IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng. (1995).

Los principios generales de los anticuerpos y la unión anticuerpo-hapteno se exponen en: Nisonoff, A., *Molecular Immunology*, 2nd ed., Sinauer Associates, Sunderland, MA (1984); y Steward, M.W., *Antibodies, Their Structure and Function*, Chapman and Hall, New York, NY (1984). Además, los métodos estándar en inmunología conocidos en la técnica y no
 5 descritos específicamente generalmente se siguen como en *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Nueva York; Stites *et al.* (eds), *Basic and Clinical Immunology* (8th ed.), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994) and Mishell and Shiigi (eds), *Selected Methods in Cellular Immunology*, W.H. Freeman and Co., Nueva York (1980).

Los trabajos de referencia estándar que establecen principios generales de inmunología
 10 incluyen *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Nueva York; Klein, J., *Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination*, John Wiley & Sons, New York (1982); Kennett, R., *et al.*, eds., *Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, New York (1980); Campbell, A., “Monoclonal Antibody Technology” en Burden, R., *et al.*, eds., *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol.
 15 13, Elsevier, Amsterdam (1984), *Kuby Immunology* 4th ed. Ed. Richard A. Goldsby, Thomas J. Kindt and Barbara A. Osborne, H. Freeman & Co. (2000); Roitt, I., Brostoff, J. and Male D., *Immunology* 6th ed. London: Mosby (2001); Abbas A., Abul, A. and Lichtman, A., *Cellular and Molecular Immunology* Ed. 5, Elsevier Health Sciences Division (2005); Kontermann and Dubel, *Antibody Engineering*, Springer Verlag (2001); Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: A
 20 Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press (2001); Lewin, *Genes VIII*, Prentice Hall (2003); Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988); Dieffenbach and Dveksler, *PCR Primer* Cold Spring Harbor Press (2003).

EJEMPLOS

La presente descripción se ilustra mediante los siguientes ejemplos. Se debe entender que los ejemplos, materiales, cantidades y procedimientos particulares deben interpretarse ampliamente de acuerdo con el alcance y el espíritu de la descripción tal como se establece en la presente.

Ejemplo 1: Construcción de AZD0292 y actividad de destrucción opsonofagocítica y anticitotoxicidad

El anticuerpo gremubamab (también conocido como MEDI3902) es un anticuerpo biespecífico que contiene un dominio de unión al antígeno anti-Psl y un dominio de unión al antígeno anti-PcrV. Las secuencias de anticuerpos de gremubamab se proporcionan anteriormente en la Tabla 1. Se construyó un nuevo anticuerpo, llamado AZD0292, usando los mismos dominios de unión al antígeno anti-Psl y anti-PcrV, pero que contienen una modificación de extensión de vida media N3Y dentro del dominio CH3. El anticuerpo AZD0292 se construyó como se describe en DiGiandomenico et al., 2014 (Sci. Trans. Med.), excepto que la secuencia silvestre MHEALHNHYTQKSLSLS (sec. con núm. de ident.: 32) se reemplazó por la de una subsecuencia Fc modificada que comprende las mutaciones N3Y (subrayadas): MHEACSYHLCQKSLSLS (sec. con núm. de ident.: 33).

Se sabe que los anticuerpos monoclonales dirigidos a Psl y PcrV median la destrucción opsonofagocítica (OPK) y la actividad anticitotóxica, respectivamente, contra *P. aeruginosa*. (Ver DiGiandomenico et al., 2014 Sci. Trans. Med.). Por lo tanto, se evaluó la capacidad de AZD0292 para mediar la actividad de destrucción opsonofagocítica

dependiente del complemento de una cepa luminiscente de *P. aeruginosa* (DiGiandomenico et al., 2014 Sci. Trans. Med) en comparación con gremubamab, anticuerpo monoclonal anti-Psl (mAb) Psl0096, mAb anti-PcrV V2L2-MD, y una IgG de control. Este ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos usando 0,025 ml de cada componente; cepa luminiscente de *P. aeruginosa* PAO1, (DiGiandomenico et al., 2012 J. Exp. Med), suero de conejo bebé diluido (Cedar Lane), células HL-60 diferenciadas, y anticuerpo monoclonal. Los datos se adquirieron utilizando un lector de microplacas multimodo Tecan Spark (Tecan), y después se graficaron como porcentaje muerto, en comparación con un control que carece de anticuerpo a diversas temperaturas. Los resultados se muestran en la **Figura 1A**. AZD0292, gremubamab y el mAb anti-Psl Psl0096 mediaron una actividad OPK similar contra *P. aeruginosa*. Como se esperaba, no se observó actividad de destrucción opsonofagocítica con el mAb anti-PcrV V2L2-MD ni con los anticuerpos IgG de control.

También se evaluó AZD0292 por su actividad anticitotóxica. Este ensayo se realizó como se describe en DiGiandomenico et al., 2014., Sci. Trans. Med. Los anticuerpos probados se añadieron primero a células A549 (2×10^4 células/pocillo), que se sembraron en placas blancas de 96 pocillos (proporcionadas por Nunc Nunclon Delta) en medio de Eagle modificado de Dulbecco más 10 % de suero bovino fetal. La cepa 6077 de *P. aeruginosa* en fase log, que es capaz de expresar Exoenzima U, se añadió entonces a una multiplicidad de infección (MOI, por sus siglas en inglés) deseada de 10, y se incubó durante 2 horas a 37 °C con 5 % de CO₂. Posteriormente, se midió la liberación de lactato deshidrogenasa de las células lisadas. Los datos se adquirieron utilizando un lector de microplacas multimodo Tecan Spark (Tecan). Los resultados se muestran en la **Figura 1B**. En este ensayo, AZD0292, gremubamab y mAb anti-

PcrV V2L2-MD evitaron la destrucción celular con eficiencias similares, mientras que una IgG de control y un mAb anti-Psl Psl0096 no tuvieron actividad protectora como se esperaba.

Estos resultados indican que AZD0292 y gremubamab funcionan de manera equivalente tanto en ensayos de actividad funcional anti-Psl como anti-PcrV.

5 A continuación, para evaluar el impacto de diferentes tecnologías de extensión de vida media, se evaluó la capacidad de AZD0292 para mediar la actividad de destrucción opsonofagocítica dependiente del complemento de una cepa luminiscente de *P. aeruginosa* (DiGiandomenico *et al.*, 2014 Sci. Trans. Med) en comparación con gremubamab, versiones afucosiladas (Afuc) de gremubamab con extensión de vida media de YTE (sec. con núm. de
10 ident.: 43) y sin la extensión de vida media de YTE (sustituciones M252Y/S254T/T256E en la región Fc, numeración de acuerdo con Kabat) y una IgG de control. Se usó un sistema de expresión transitoria de ovario de hámster chino (CHO) para generar IgG afucosilada. Existen varios métodos ahora establecidos para generar proteínas afucosiladas recombinantes. Por ejemplo, la titulación de fucosa en medios de cultivo celular (Louie *et al*
15 Biotechnol Bioeng. 2017 Mar;114(3):632-644), coexpresión de la GDP-6-desoxi-D-lixo-4-hexulosa reductasa (von Horsten *et al* Glycobiology. 2010 Dec;20(12):1607-18), coexpresión de un intracuerpo anti-FUT8 (Joubert *et al* Biotechnol Bioeng. 2022 Aug;119(8):2206-2220), línea celular de inactivación FUT8 (Yamane-Ohnuki *et al* Biotechnol Bioeng. 2004 Sep 5;87(5):614-22; Malphettes *et al* Biotechnol Bioeng. 2010 Aug 1;106(5):774-83) y otras
20 estrategias (Pereira *et al* MAbs. 2018 Jul;10(5):693-711).

Este ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos usando 0,025 ml de cada componente; cepa luminiscente de *P. aeruginosa* PAO1, (DiGiandomenico *et al.*, 2012 J. Exp. Med), suero de conejo bebé diluido (Cedar Lane), células HL-60 diferenciadas, y anticuerpo

monoclonal. Los datos se adquirieron utilizando un lector de microplacas multimodo Tecan Spark (Tecan), y después se graficaron como porcentaje muerto, en comparación con un control que carece de anticuerpo a diversas temperaturas. Los resultados se muestran en la **Figura 2**. AZD0292, gremubamab y gremubamab-Afuc mediaron una actividad OPK similar
5 contra *P. aeruginosa*. En tanto, gremubamab-Afuc-YTE exhibió una actividad reducida en comparación con AZD0292, gremubamab y gremubamab-Afuc. No se observó actividad de destrucción opsonofagocítica con el anticuerpo IgG de control.

Estos resultados indican sorprendentemente que diferentes tecnologías de extensión de la vida media que modifican la región Fc pueden afectar la actividad de destrucción
10 opsonofagocítica del anticuerpo. Si bien la modificación de la extensión de la vida media de YTE provocó una disminución significativa en la actividad (observándose que la actividad de gremubamab afucosilado era similar a la de gremubamab), la modificación de la extensión de la vida media de N3Y no afectó la actividad de destrucción opsonofagocítica.

15 **Ejemplo 2: AZD0292 ha aumentado la exposición sérica en comparación con gremubamab**

La modificación N3Y de AZD0292 permite una afinidad aumentada de unión al receptor Fc neonatal (FcRn), que funciona como un receptor de reciclaje que se encarga de
20 mantener la IgG en la circulación. Para confirmar que AZD0292 exhibió aumento de exposición frente a gremubamab, se comparó la farmacocinética de cada molécula en un modelo de ratón transgénico para FcRn humano Tg32.

En el análisis farmacocinético, AZD0292 y gremubamab (10 mg/kg) se suministraron ambos por vía intravenosa a ratones de 7 semanas de edad, seguido de una toma de muestras de sangre a las 1, 4, 12, 54, 72 y 102 horas, así como a los 7, 9, 11, 14, 17, 21, 24, 28, 35 y 42 días después de la administración de anticuerpos. La sangre se recolectó en tubos de extracción de sangre en microrrecipientes BD, y el suero se procesó posteriormente por centrifugación a 500x g durante aproximadamente 10 minutos. El suero procesado se almacenó a -80 °C hasta la cuantificación del anticuerpo.

La cuantificación de gremubamab y AZD0292 en sueros de ratón se realizó usando ELISA específico de antígenos. Las placas Nunc MaxiSorp (Thermo Fisher Scientific) se recubrieron durante la noche a 4 °C con un anticuerpo antiidiotipo dirigido a la porción anti-PcrV de gremubamab y AZD0292. Después de un lavado con PBS, que contenía 0,1 % de Tween 20 (regulador de lavado), las placas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente (TA) con PBS + 5 % de BSA. Después de tres lavados con regulador de lavado, las placas se incubaron con sueros de ratón diluidos en PBS. Se utilizaron AZD0292 o gremubamab después como estándares.

Tras una incubación de 1,5 horas, mientras se agitaba (200 rpm) a temperatura ambiente (TA), las placas se lavaron e incubaron durante 30 min con 0,05 ml de un anticuerpo antiidiotipo dirigido al brazo anti-Psl de gremubamab/MEDI3902 y AZD0292. Después de tres lavados con regulador de lavado, se añadió 0,05 ml de IgG antihumana de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés) (1:10.000; Jackson Laboratories) y se incubó durante 30 minutos a TA. Después del lavado, se añadió 0,05 ml de sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (KPL) y la reacción se

detuvo después de aproximadamente 10 minutos con 0,05 ml de 0,2 M H₂SO₄. Se midió la densidad óptica a 450 nm (OD₄₅₀) con un espectrofotómetro (Molecular Devices).

Los resultados se muestran en la **Figura 3**. Tras la administración de 10 mg/kg IV de AZD0292 y gremubamab, se estimó una eliminación del 50 % menor para AZD0292 en comparación con gremubamab.

Ejemplo 3: AZD0292 fotoestresado y estresado por calor retiene actividad funcional de anti-PSI y anti-PcrV

Para determinar si AZD0292 retuvo actividad funcional después de la exposición a condiciones fotoestresantes y de estrés por calor, se evaluó su actividad en comparación con el gremubamab tratado de manera similar en ensayos OPK y anticitotoxicidad.

Se realizaron ensayos acelerados de estabilidad fotoestresantes y de estrés por calor como se describe (Dippel et al., 2023 MABS). Brevemente, en ensayos de estrés por calor, los anticuerpos se diluyeron a 1 mg/ml en PBS (pH 7,2), y se incubaron durante 2 semanas a 4 °C o 45 °C. En ensayos fotoestresantes, los anticuerpos se formularon a 2,5 mg/ml en PBS (pH 7,2), se llenaron en viales de vidrio Schott de 1 cc, se taparon/sellaron, y se colocaron en una cámara de fotoestabilidad compatible con ICH (Caron Model 6545-2). Las muestras fueron expuestas a una luz blanca fría de 3000 lux durante el transcurso de una semana, para una exposición total de aproximadamente 500.000 lux horas.

En los ensayos de OPK y anticitotoxicidad, los anticuerpos AZD0292 y gremubamab fotoestresantes y de estrés por calor se desempeñaron de manera similar a los AZD0292 no estresados y gremubamab. Ver las **Figuras 4A y 4B**. El cambio porcentual en la

formación de monómeros, agregados y fragmentos en comparación con el material no estresado se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2.

Anticuerpo	Fotoestabilidad			Estabilidad térmica acelerada		
	Cambio en el monómero (%)	Cambio en agregación (%)	Cambio en el fragmento (%)	Cambio en el monómero (%)	Cambio en agregación (%)	Cambio en el fragmento (%)
Gremubamab	1,27	1,27	0,00	2,61	0,00	2,61
AZD0292	1,49	1,49	0,00	2,70	0,00	2,70

5

Estos datos no indicaron diferencias en la actividad funcional de AZD0292 o gremubamab estresados y no estresados.

Ejemplo 4: AZD0292 demuestra sorprendentemente una agregación reducida

10

Se realizaron estudios para evaluar si había alguna diferencia de calidad del producto entre los clones que expresaban AZD0292 y MEDI3902 (evaluando específicamente los niveles de agregación, niveles de monómero, concentración de proteínas y título expresado).

Para evaluar el efecto de la mutación N3Y en AZD0292 sobre los niveles de agregación del producto de afinidad se realizó una prueba de sobrecrecimiento en placa agitada (SPOG, por sus siglas en inglés). En el estudio, se cribaron 384 clones, y se seleccionaron los 96 primeros basados en sus títulos expresados. El análisis de agregación se realizó en los 96

15

clones superiores usando captura de Proteína A a pequeña escala seguida de cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (HTSEC, por sus siglas en inglés).

Para la prueba de sobrecrecimiento en placa agitada, en resumen, tras la expansión de la línea celular clonal, se sembró el cultivo celular de cada clon estable a $0,7 \times 10^5$ células/ml en un volumen total de 350 μ l en una placa de 96 pocillos profundos y se sometió a un proceso de alimentación por lotes de 10 días usando medio de crecimiento celular y adiciones en bolo de nutrientes y glucosa. El día 10 de este experimento de alimentación por lotes, el cultivo celular de cada clon estable evaluado se cosechó. Se midió la densidad celular viable y la viabilidad celular de cada clon. Después, el medio de cultivo celular se clarificó por centrifugación y las muestras de sobrenadante se enviaron para el análisis del título de rProtein (cuantificado mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés) de proteína A en un Agilent HP1100 o HP1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) comparando el tamaño de pico de cada muestra con una curva de calibración). El análisis de agregación HTP se describe con más detalle a continuación.

La purificación de proteínas a partir del cultivo celular en placa de 96 pocillos profundos se realizó usando columnas de volumen PhyTip de 200 μ l, que contenían 20 μ l de resina de afinidad ProPlus (MabSelect SuRe™) (Biotage GB Limited, Hengoed, Reino Unido) operada en una plataforma robótica de manejo de líquidos Tecan Freedom EVO® 200 (TECAN Group Ltd.) con Freedom EVOware®, versión 2.7 (TECAN Group Ltd.).

Se usó solución salina regulada con fosfato como regulador de equilibrio de columna y de la primera etapa de lavado (lavado 1), mientras que el regulador de la segunda etapa de lavado (lavado 2) estaba compuesto por 25 mM de acetato de sodio, 120 mM de cloruro de sodio, pH 5,5. La elución se realizó con regulador de glicina 100 mM, pH 2,6, o con

regulador de acetato de sodio 25 mM, pH 3,6. Tras la purificación, las muestras se neutralizaron con regulador Tris 1 M, pH 7,5.

El análisis de agregación se realizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (HTSEC) monitoreando la absorbancia UV a 280 nm. Todos los equipos y paquetes de software para análisis de cromatografía se adquirieron de Agilent Technologies Inc. e incluyeron un sistema UHPLC Agilent 1260 Infinity II que incluye un desgasificador, una bomba cuaternaria, un muestreador múltiple termostatzado, y un detector de matriz de diodos (DAD, por sus siglas en inglés) junto con un compartimento multicolumna con una válvula de selección de columna. Todas las piezas de UHPLC se unieron mediante tubos capilares de acero inoxidable de 1,6 mm OD y 0,12 µm ID con accesorios de acero inoxidable. El control del sistema y el análisis de datos se realizaron con Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition, versión C.01.07. El análisis HTSEC se realizó usando la columna Acquity UPLC Protein BEH SEC 200 Å, 1,7 µm (Waters) con 2,1 × 150 mm (ID x longitud) y fase móvil compuesta por 50 mM de fosfato de sodio, 450 mM de arginina, pH 7,0. La visualización de datos y el análisis estadístico se realizaron usando el paquete de software JMP Pro16 (SAS).

Las **Figuras 5A y 5B** muestran una representación en gráficos de barras de los datos obtenidos del estudio para el porcentaje de monómero (**Figura 5A**) y el porcentaje de especies de agregados de mayor peso molecular (**Figura 5B**) para AZD0292 y MEDI3902. “Porcentaje de monómero” se relaciona con el anticuerpo monoclonal esperado (con 2 cadenas pesadas y 2 cadenas ligeras). Faltan datos de A5, A6, A9, B9, y E6 debido a la insuficiente disponibilidad de muestras para el análisis. Los datos obtenidos de este estudio muestran que, sorprendentemente, AZD0292 tenía significativamente menos especies de agregados de mayor peso molecular que MEDI3902. Esta demostración en múltiples clones de expresión

indica que la observación no es simplemente un artefacto de un solo clon, sino más bien un aspecto fundamental de las mutaciones N3Y de AZD0292 en comparación con MEDI3902.

Otra representación de estos datos de la **Figura 5B** se muestra en la **Figura 6**. La **Figura 6** muestra el % de agregación (porcentaje de especies de alto peso molecular) para cada clon. La coloración clara (menos agregados) a oscura (más agregados) es proporcional al % de agregados medidos en cada muestra por HTSEC. Esta representación visual demuestra claramente la sorprendente disminución en el % de agregación de AZD0292 en comparación con MEDI3902.

Los datos se graficaron en la **Figura 7** para evaluar la presencia de cualquier correlación entre el porcentaje de especies de alto peso molecular (p. ej., agregados), la concentración media de la muestra purificada de proteína A PhyTip, y el título en el último día del biorreactor de placa de 96 pocillos con alimentación por lotes. Sin embargo, no se observó correlación en la matriz del diagrama de dispersión (**Figura 7**). Estos datos indican que la agregación no es inducida por los niveles de concentración de la muestra en el rango evaluado y que la agregación no es inducida por el título final del día del proceso de alimentación por lotes.

Para comparar además los niveles de agregados entre los clones que expresan MEDI3902 y AZD0292, los datos se probaron alineándolos con el supuesto de normalidad requerido para usar la estadística de la prueba t de Student. Tanto las pruebas de Anderson-Darling y de Shapiro-Wilk (**Figuras 8A** y **8B** para las muestras AZD0292 y MEDI3902, respectivamente) confirmaron que los datos se distribuyen normalmente (valor $p > 0,05$). El enfoque de la prueba t usado asumió varianzas iguales basadas en una evaluación de la prueba F bilateral que dio un valor $p > 0,05$. Los resultados de la prueba t mostraron que los niveles de agregación promedio observados en clones que expresan MEDI3902 versus AZD0292 son

diferentes con significancia estadística (valor $p < 0,05$ basado en el intervalo de confianza del 95 %) (**Figura 8C**). En promedio, la diferencia observada fue de 2,99 % menos de agregados para las muestras AZD0292 en comparación con las muestras MEDI3902 (**Figura 8C**).

La **Figura 9A** muestra el % de agregación y la **Figura 9B** muestra los niveles de
5 título de anticuerpos para los clones que expresan AZD0292 y MEDI3902 medidos en todas las muestras y ordenados de los niveles de agregación bajos a altos (de izquierda a derecha en la **Figura 9A** con el nivel de titulación final del día del proceso de alimentación por lotes correspondiente a continuación en la **Figura 9B** para el mismo clon). La **Figura 9** muestra una agregación reducida de muestras AZD0292 en comparación con las
10 muestras MEDI3902. Los datos indican que la disminución en la agregación de AZD0292 no está correlacionada con reducciones en el nivel de título.

La **Figura 10** muestra los datos de porcentaje de agregación para AZD0292 y MEDI3902 durante tres meses a 40 °C. El aumento del porcentaje de agregación para AZD0292 y MEDI3902 a lo largo del tiempo fue comparable, lo que indica que ambas
15 moléculas (MEDI3902 y AZD0292) tuvieron tasas de degradación similares.

En general, estos resultados demuestran que los clones que expresan AZD0292 tenían significativamente menos agregados que los que expresan MEDI3902. Aunque el título de expresión medio de los clones que expresan MEDI3902 es ligeramente superior al de los que expresan AZD0292, la diferencia no es significativa. Los datos muestran que los niveles de
20 agregación relativos en AZD0292 variaron de 3,9 % a 18,0 %, y en MEDI3902 los niveles agregados de 7,0 % a 22,2 % (**Figura 9A** y **Figura 9B**). Sin embargo, los clones que expresan AZD0292 reportaron 3 % menos agregados que los que expresan MEDI3902. Esta diferencia porcentual en el nivel de agregación es mayor que el error del método analítico (diferencia de

área del 0,1 %) y, por lo tanto, es una diferencia significativa. Por lo tanto, los clones que expresan AZD0292 reportaron significativamente menos agregados que los que expresan MEDI3902. El nivel de agregación observado no mostró correlación con el título de expresión, confluencia, densidad celular viable, o viabilidad celular. Estos datos indican sorprendentemente

5 que la mutación N3Y en AZD0292 reduce los niveles de agregación en relación con MEDI3902.

Las descripciones completas de todas las patentes, solicitudes de patentes que incluyen las solicitudes de patentes provisionales, publicaciones que incluyen publicaciones de patentes y publicaciones que no son de patentes, y material disponible electrónicamente (que incluyen, por ejemplo, presentaciones de secuencias de nucleótidos

10 en, p. ej., GenBank y RefSeq, y presentaciones de secuencias de aminoácidos en, p. ej., SwissProt, PIR, PRF, PDB, y traducciones de regiones codificantes anotadas en GenBank y RefSeq) citadas en la presente se incorporan como referencia. La descripción detallada y los ejemplos anteriores se han dado únicamente para mayor claridad de entendimiento. A partir de ello no se deben entender limitaciones innecesarias. La invención no se limita

15 a los detalles exactos mostrados y descritos, ya que las variaciones obvias para un experto en la técnica se incluirán dentro de la invención definida por las reivindicaciones.