

CONJUGADOS DE ANTICUERPO ANTI-CACNG1 HUMANO-FÁRMACO Y USOS DE LOS MISMOS

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La solicitud se refiere a conjugados que comprenden un anticuerpo anti-hCACNG1 (o moléculas de unión- a antígeno que comprenden un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo anti-hCACNG1) y un agente terapéutico, conjugados que pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades. La solicitud se refiere además a métodos para preparar y usar conjugados que comprenden un anticuerpo anti-hCACNG1 (o moléculas de unión- a antígeno
- 10 que comprenden un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo anti-hCACNG1) y un agente terapéutico.

LISTADO DE SECUENCIAS

- Un Listado de Secuencias en formato xml titulado "250298_000513_SL.xml", que se creó el 31 de octubre de 2023 y tiene 337,817 bytes, se incorpora en la presente por referencia en su
- 15 totalidad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- El músculo esquelético es el órgano más grande del cuerpo, que comprende ~40 % de la masa corporal total. El músculo esquelético es uno de los tres tejidos musculares importantes en el cuerpo humano. Cada músculo esquelético consiste en miles de fibras musculares
- 20 envueltas conjuntamente por vainas de tejido conectivo. Los haces individuales de fibras musculares en un músculo esquelético se conocen como fascículos. La vaina de tejido conectivo más externa que rodea todo el músculo se conoce como epimisio. La vaina de tejido conectivo que cubre cada fascículo se conoce como perimisio, y la vaina más interna que rodea la fibra muscular individual se conoce como endomisio. Cada fibra muscular se
- 25 comprende de varias miofibrillas que contienen múltiples miofilamentos.

Cuando se agrupan, todas las miofibrillas se disponen en un patrón estriado único formando sarcómeros que son la unidad contráctil fundamental de un músculo esquelético. Los dos miofilamentos más significativos son los filamentos de actina y miosina dispuestos de manera distintiva para formar diferentes bandas en el músculo esquelético.

Las funciones primarias del músculo esquelético tienen lugar mediante su proceso de acoplamiento de excitación-contracción intrínseco. Conforme el músculo se une a los tendones óseos, la contracción del músculo conduce al movimiento de ese hueso que permite la realización de movimientos específicos. El músculo esquelético también proporciona soporte estructural y ayuda a mantener la postura del cuerpo. El músculo esquelético también actúa como una fuente de almacenamiento de aminoácidos que se pueden usar por diferentes órganos del cuerpo para sintetizar proteínas específicas de órganos. El músculo esquelético también actúa como un sitio de eliminación de glucosa en la forma de glucógeno muscular. El músculo esquelético también juega un papel central en el mantenimiento de la homeostasis y actúa como fuente de energía durante la inanición. Por lo tanto, el músculo esquelético juega un papel clave en la locomoción, termorregulación y en el control del metabolismo de todo el cuerpo.

En muchas enfermedades musculares, así como durante el envejecimiento normal, el tamaño y función del tejido muscular esquelético se reduce, dando por resultado movilidad funcional deteriorada; y, en el caso de enfermedades musculares severas, discapacidad a largo plazo y mortalidad temprana.

Los tratamientos para atrofia muscular y enfermedades musculares genéticas habitualmente consisten en terapias de acción amplia, tal como terapia con testosterona para atrofia muscular, glucocorticoides para distrofias musculares, etc. La administración no dirigida de estas terapias reduce la eficiencia de la captación muscular específica, en tanto que provoca efectos perjudiciales significativos fuera de diana en otros órganos.

Existe una necesidad en la técnica de nuevos anticuerpos anti-humanos y agentes terapéuticos de conjugados de anticuerpo-fármaco, capaces de unirse a un marcador específico de músculo y efectuar la internalización por células musculares de una carga útil terapéutica.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En la presente se describen conjugados de anticuerpo-fármaco que comprenden un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a CACNG1 humano. En la presente se describen conjugados de anticuerpo-fármaco que comprenden un anticuerpo anti-hCACNG1, fragmento de unión a antígeno del mismo, como se describe en la presente y una carga útil (por ejemplo, una carga útil terapéutica, por ejemplo, una molécula pequeña terapéutica). En algunas modalidades, el (a) anticuerpo anti-hCACNG1, fragmento de unión

a antígeno y/o proteína de unión multiespecífica y (b) la carga útil se unen covalentemente mediante un enlazador, como se analiza en la presente. En diferentes modalidades, el anticuerpo anti-hCACNG1 o fragmento de unión a antígeno puede ser cualquiera de los anticuerpos anti-CACNG1 o fragmentos descritos en la presente.

5 En un aspecto, la presente divulgación proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende una proteína de unión a antígeno que se une específicamente a la subunidad gamma 1 auxiliar de canal activado por voltaje de calcio humano (hCACNG1), en donde la proteína de unión a antígeno se conjuga directamente o mediante un enlazador a al menos un agente terapéutico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 En una modalidad, el conjugado de anticuerpo-fármaco tiene una estructura de acuerdo con la fórmula (I):

$$A - [L - P]_y \text{ (I),}$$

en donde A es la proteína de unión a antígeno;

L está ausente o un enlazador;

15 P es un agente terapéutico, y

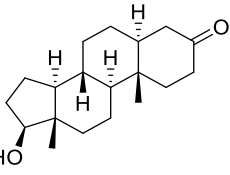
y es un número entero de 1 a 8.

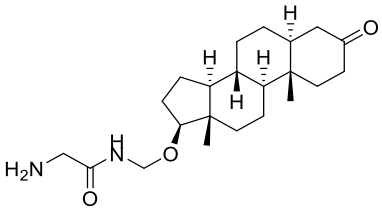
En una modalidad, el anticuerpo anti-hCACNG1 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada (HCVR o VH) y/o una región variable de cadena ligera (LCVR o VL).

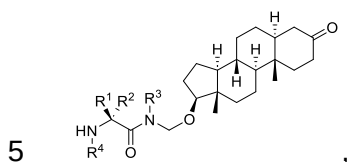
20 En una modalidad, el anticuerpo anti-hCACNG1 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada (HCVR o VH) y/o una región variable de cadena ligera (LCVR o VL).

25 En una modalidad, el anticuerpo anti-hCACNG1 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia a un par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2/10, SEQ ID NO: 18/26, SEQ ID NO: 34/42, SEQ ID NO: 50/58, SEQ ID NO: 66/74, SEQ ID NO: 82/90, SEQ ID NO: 98/106, SEQ ID NO: 114/122, SEQ ID NO: 130/138, SEQ ID NO: 146/154, SEQ ID NO: 162/170, SEQ ID NO: 178/186, SEQ ID NO: 294/301, y SEQ ID NO: 314/322.

En una modalidad, el agente terapéutico es dihidrotestosterona (DHT), o un profármaco o derivado de la misma. En una modalidad, el agente terapéutico se selecciona

del grupo que consiste en DHT que tiene la estructura  y proDHT que tiene

la estructura seleccionada del grupo que consiste en  y



en donde R_1 se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo de C_{1-6} , $(CH_2)_{0-6}-OH$, $(CH_2)_{0-6}-NH_2$, $(CH_2)_{0-6}-NH-C_{1-3}$ alquilo, y $(CH_2)_{0-6}-N-(C_{1-3}$ alquilo) $_2$;

R_2 se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo de C_{1-6} , $(CH_2)_{0-6}-OH$, $(CH_2)_{0-6}-NH_2$, $(CH_2)_{0-6}-NH-C_{1-3}$ alquilo, y $(CH_2)_{0-6}-N-(C_{1-3}$ alquilo) $_2$;

10 R_3 se selecciona del grupo que consiste en H y un alquilo de C_{1-3} , y

R_4 se selecciona del grupo que consiste en H y un alquilo de C_{1-3} .

En una modalidad, el agente terapéutico se conjuga a la proteína de unión a antígeno mediante el enlazador L.

En una modalidad, n es 2 o 4.

15 En una modalidad, el enlazador tiene la estructura:

-L1-B-L2-, en donde:

L1 es una primera unidad enlazadora unida covalentemente a la proteína de unión a antígeno;

B está ausente o una unidad que comprende al menos un aducto del grupo B', donde

el grupo B' se selecciona de $-N_3$, $-\xi \equiv \xi-$, $-\text{Q}-$; $-\text{N}=\text{N}-$; y $-\text{C}_6\text{H}_4-$, donde Q es C o N;

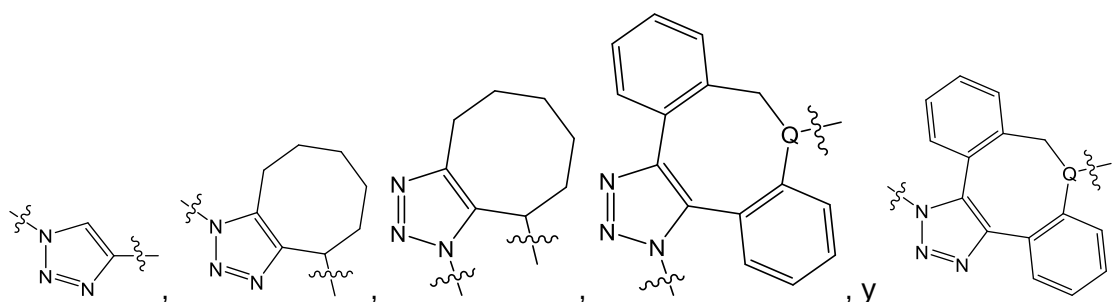
L2 está ausente o una segunda unidad enlazadora unida covalentemente a la unidad B mediante al menos un grupo B'', en donde el grupo B' y el grupo B'' forman el al menos un aducto.

siempre que cuando B esté ausente, L2 también esté ausente y L1 se una covalentemente al agente terapéutico, y cuando L2 esté presente, L2 se una covalentemente al agente terapéutico.

En una modalidad, el L1 comprende alquilo de C₁₋₆, fenilo, -NH-, -C(O)-, -(CH₂)_u-NH-
10 C(O)-, -(CH₂)_u-C(O)-NH-, -(CH₂-CH₂-O)_v-, -(CH₂)_u-(O-CH₂-CH₂)_v-C(O)-NH-, una unidad
peptídica que comprende de 2 a 4 aminoácidos o combinaciones de los mismos, cada uno de
los cuales se puede sustituir opcionalmente con uno o más de -S-, -S(O₂)-, -C(O)-, -C(O₂)-; y
CO₂H, en donde los subíndices u y v son independientemente un número entero de 1 a 8.

En una modalidad, el L1 es

15 En una modalidad, la B tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en:



en donde Q es C o N .

En una modalidad, el L2 tiene una estructura:

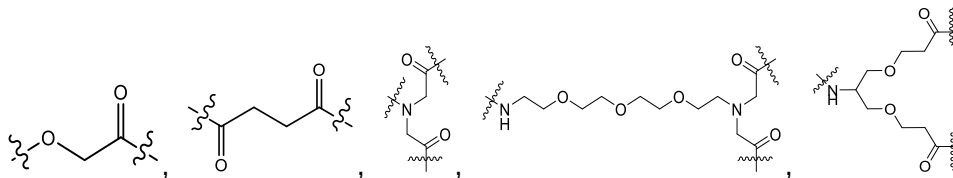
-SP1-AA-SP2- (L2), en donde:

20 SP1 está ausente o una primera unidad separadora;

AA está ausente o es una unidad peptídica que comprende de 2 a 4 aminoácidos;

SP2 está ausente o una segunda unidad separadora unida covalentemente al agente terapéutico.

En una modalidad, el SP1 está ausente o se selecciona del grupo que consiste en

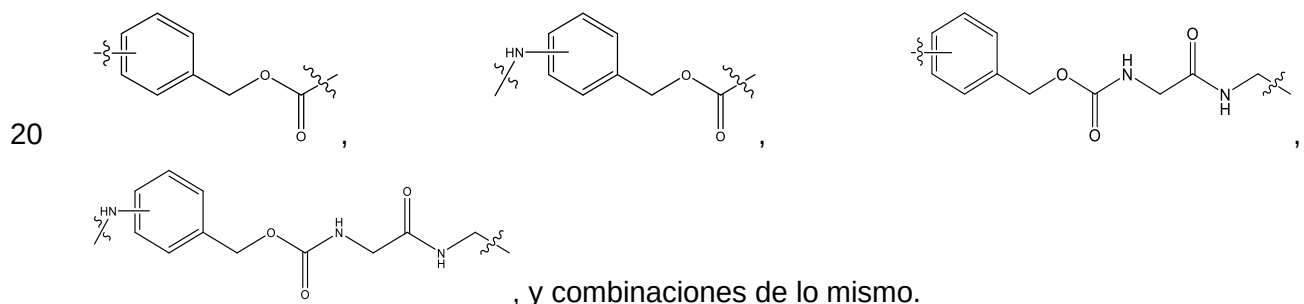


- 5 (CH₂-CH₂-O)_v-, -(CH₂-CH₂-O)_v-(CH₂)_u-, -(CH₂-CH₂-O)_v-(CH₂)_u-C(O), -O-CH₂-C(O)-NH-, -O-CH₂-C(O)-NH-(CH₂-CH₂-O)_v-(CH₂)_u-, -O-CH₂-C(O)-NH-(CH₂-CH₂-O)_v-(CH₂)_u-C(O)-NH-, -NH-, -C(O)-, -NH-C(O)-, -NH-(CH₂)_u-, -NH-(CH₂)_u-C(O)-, -NH-(CH₂-CH₂-O)_v-, -NH-(CH₂-CH₂-O)_v-C(O)-, -NH-(CH₂-CH₂-O)_v-(CH₂)_u-, -NH-(CH₂-CH₂-O)_v-(CH₂)_u-C(O)-, -(CH₂)_u-NH-C(O)-, -NH-(CH₂)_u-NH-C(O)-, -NH-(CH₂)_u-C(O)-NH-, o combinaciones de los mismos; en donde los
- 10 subíndices u y v son independientemente un número entero de 1 a 8.

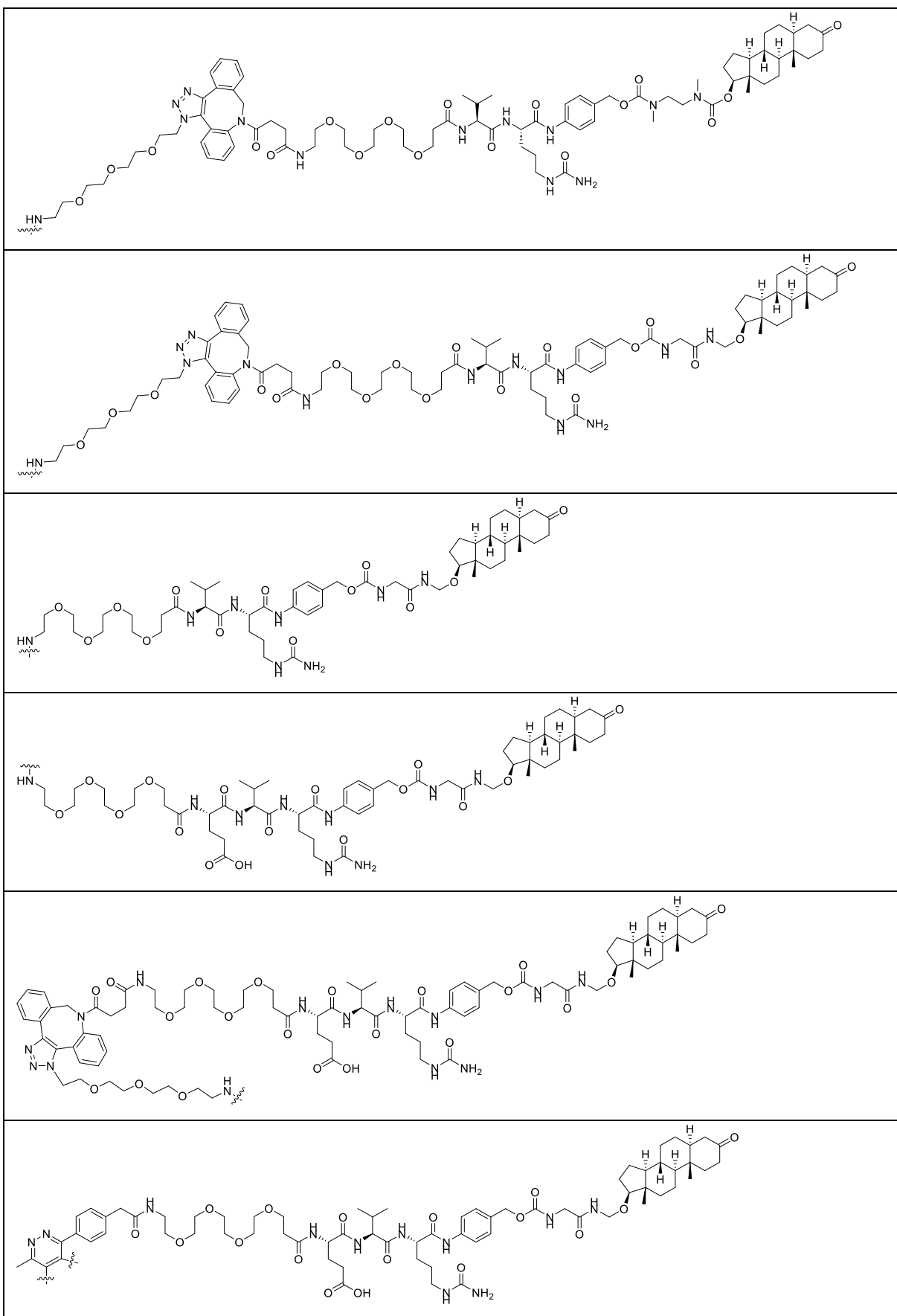
En una modalidad, la AA es una unidad peptídica que comprende de 2 a 4 aminoácidos seleccionados de glicina, valina, fenilalanina, prolina, ácido glutámico, lisina, N,N-dipropilisina, fenilalanina y citrulina, y combinaciones de los mismos.

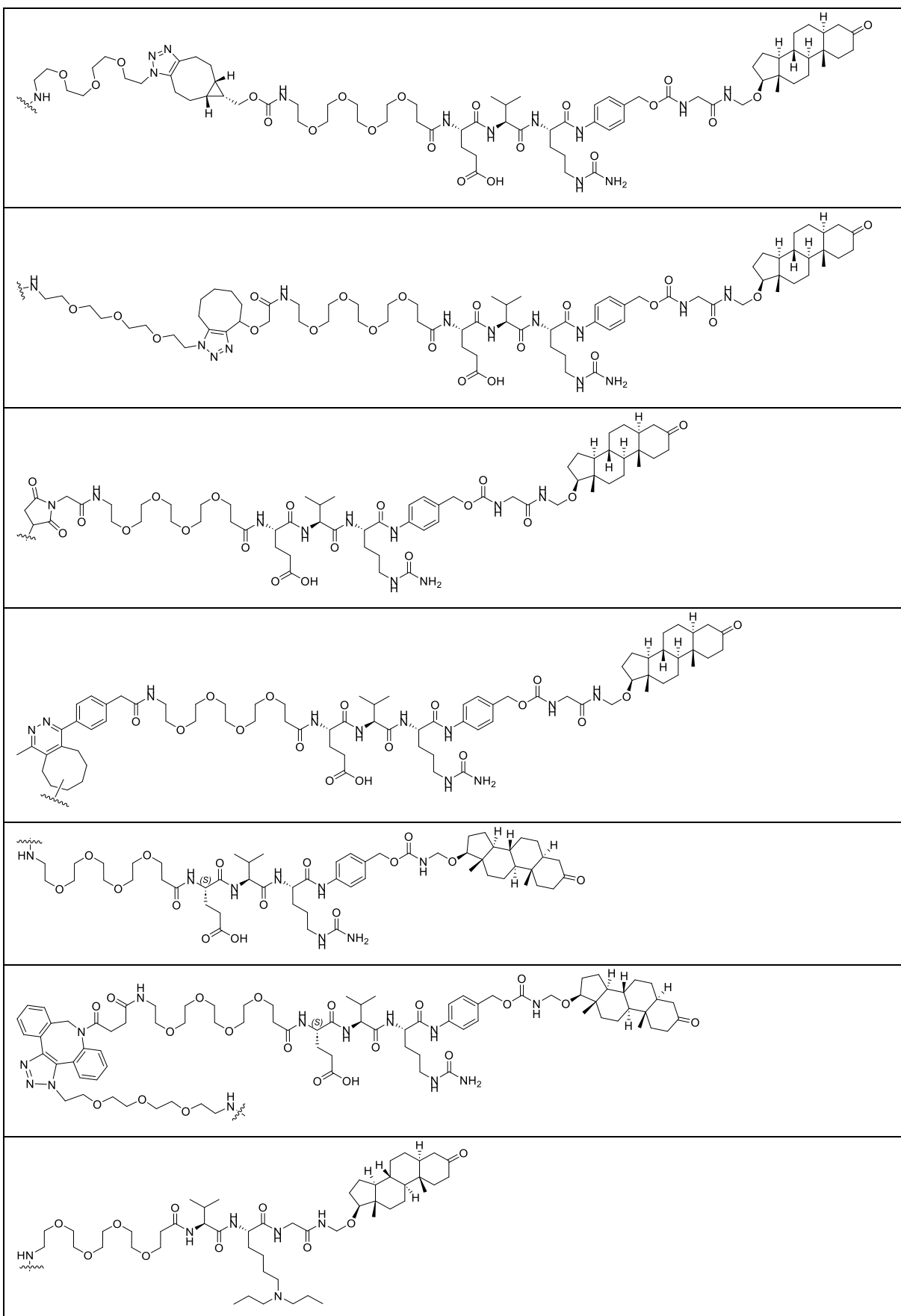
- 15 En una modalidad, la AA es valina-citrulina, valina-alanina, valina-lisina, valina-N,N-dipropil lisina, fenilalanina-lisina, glicina-glicina-glicina (GGG), glicina-glicina-glicina (GGGG (SEQ ID NO: 289)), glicina-glicina-fenilalanina (GGF), glicina-glicina-fenilalanina-glicina (GGFG (SEQ ID NO: 290)), ácido L-glutámico-valina-citrulina (^LEVC) y ácido D-glutámico-valina-citrulina (^DEVC).

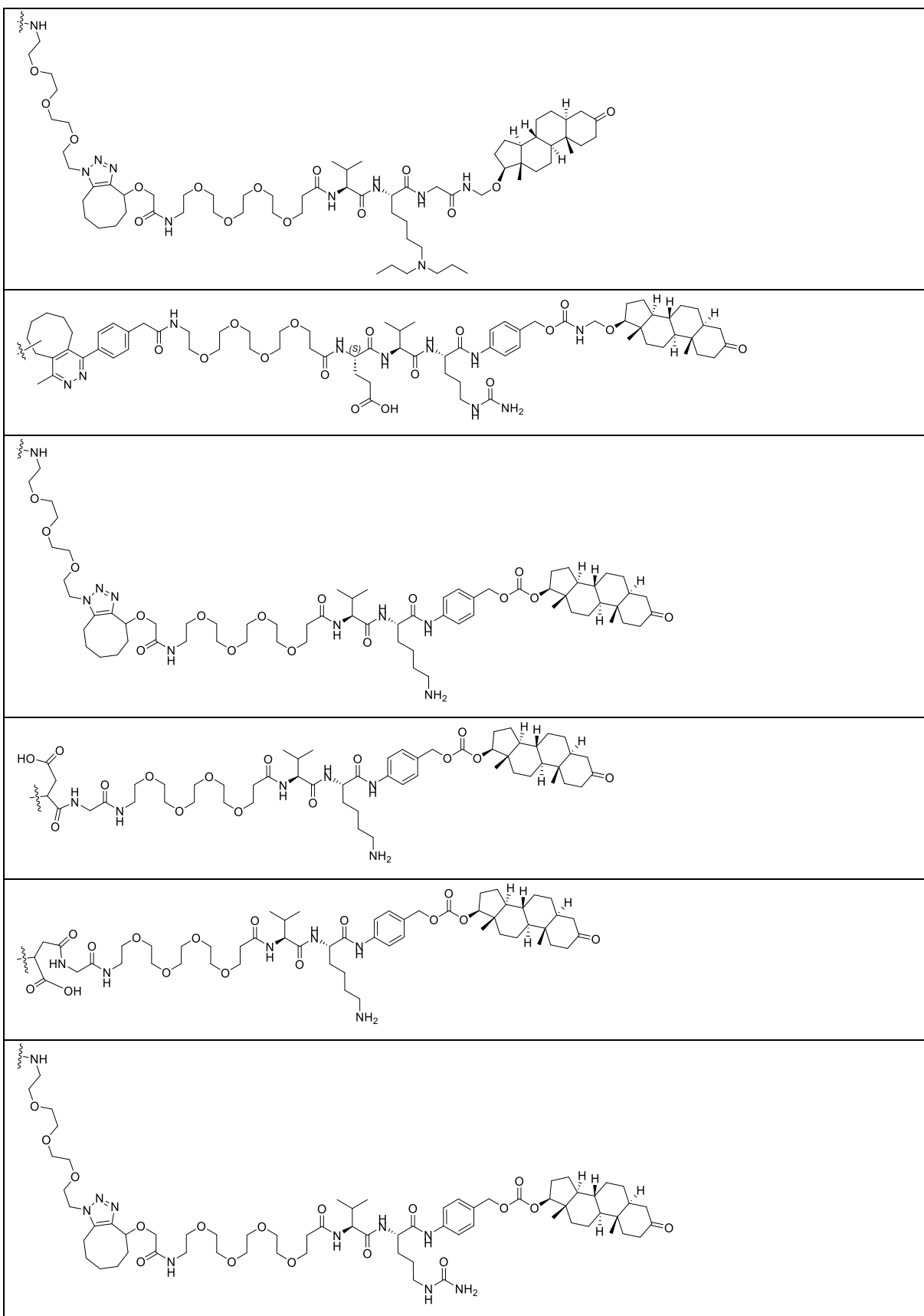
En una modalidad, el SP2 está ausente o se selecciona del grupo que consiste en

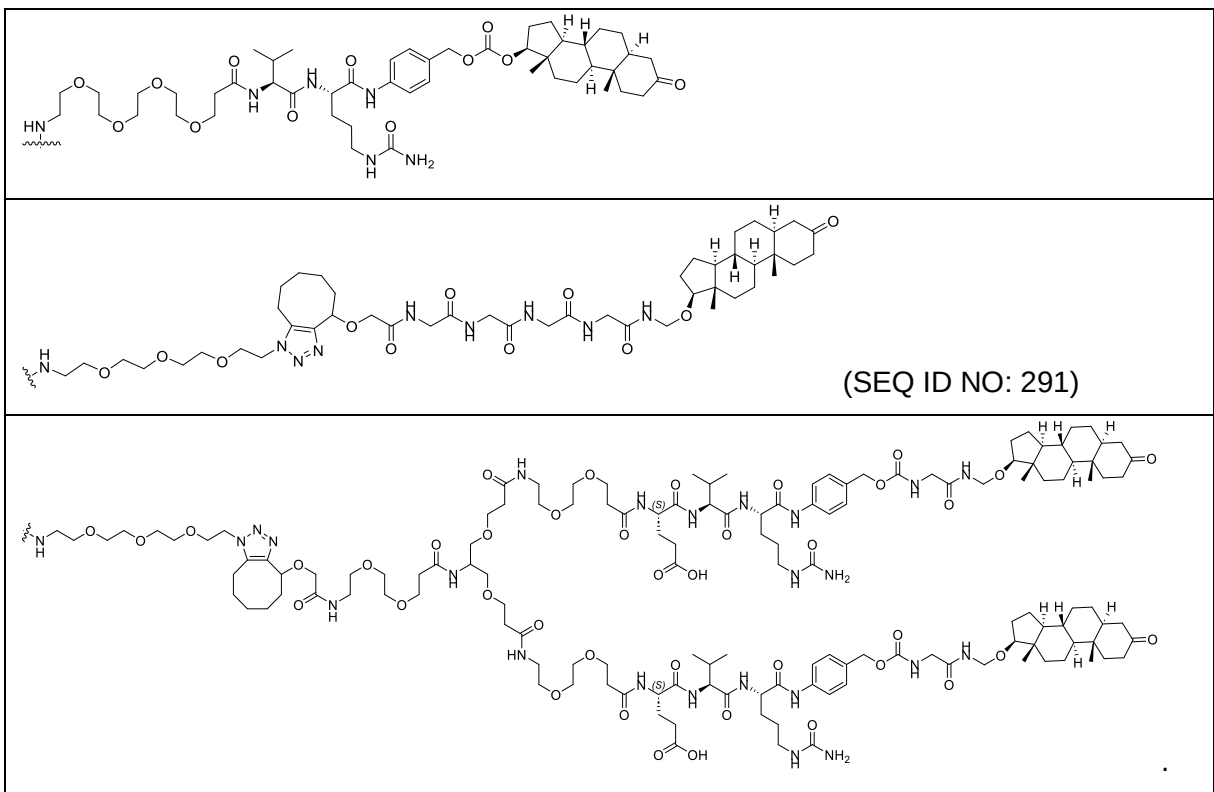


En una modalidad, el enlazador-agente terapéutico (L-P) tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en:







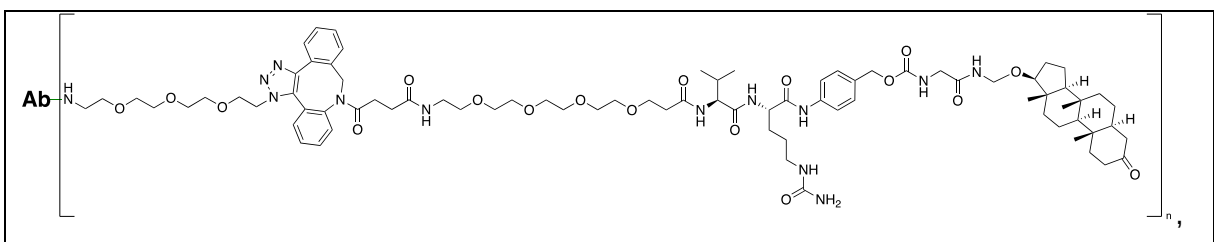


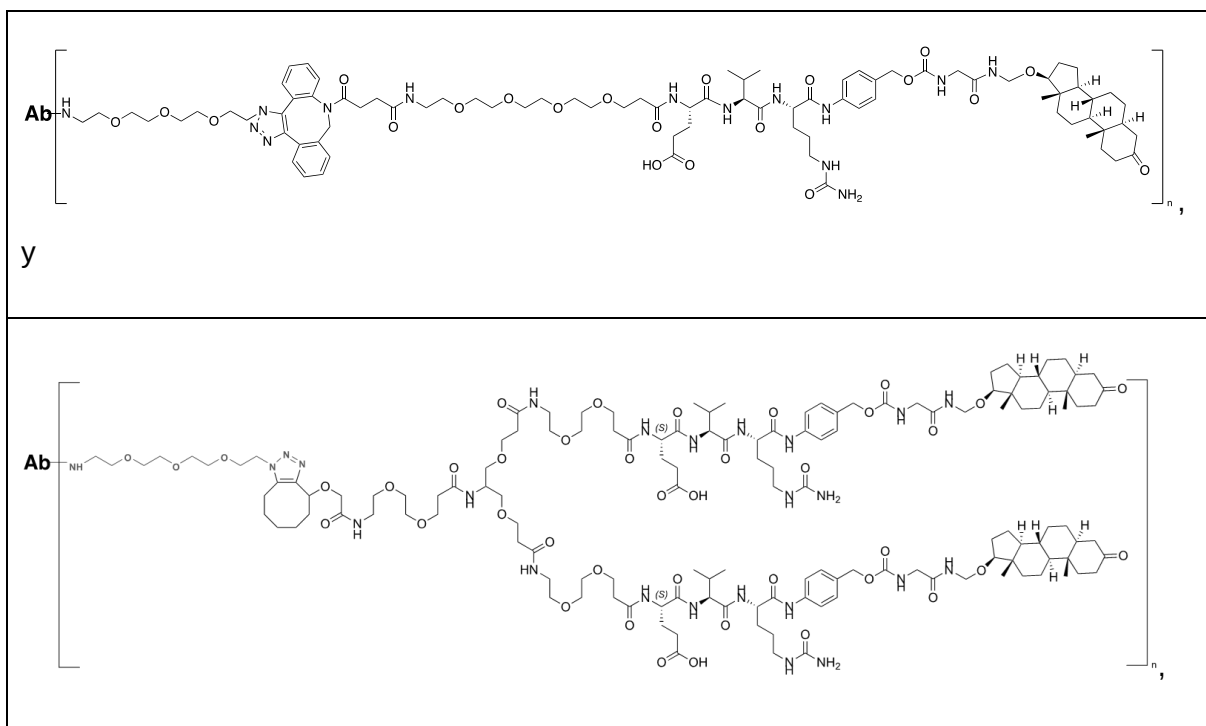
En una modalidad, el enlazador se une a la cadena lateral de un residuo de glutamina de la proteína de unión a antígeno.

En una modalidad, el residuo de glutamina está presente de manera natural en un dominio CH2 o CH3 de la proteína de unión a antígeno.

En una modalidad, el residuo de glutamina se introduce en la proteína de unión a antígeno al modificar uno o más aminoácidos.

En una modalidad, el conjugado de anticuerpo-fármaco tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en:





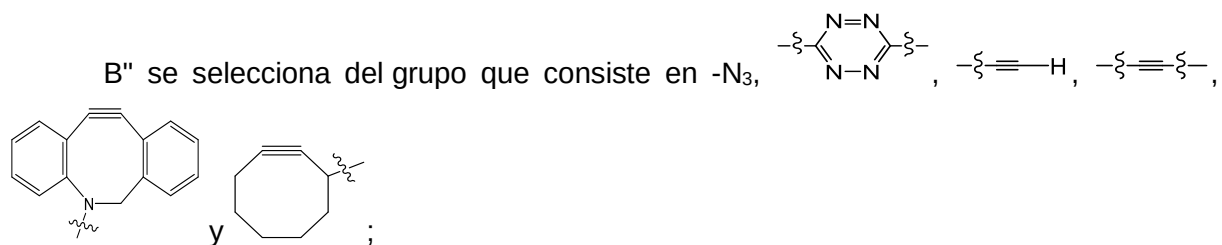
en donde Ab es la proteína de unión a antígeno y n es un número entero de 1 a 4.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula (L2-P) o (L2'-P):

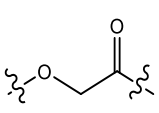
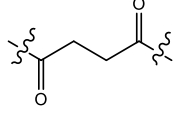
5 B"-SP1-AA-SP2-P (L2-P),

H₂N-SP1-AA-SP2-P)_p (L2'-P),

o una sal farmacéuticamente aceptable de lo mismo, en donde:



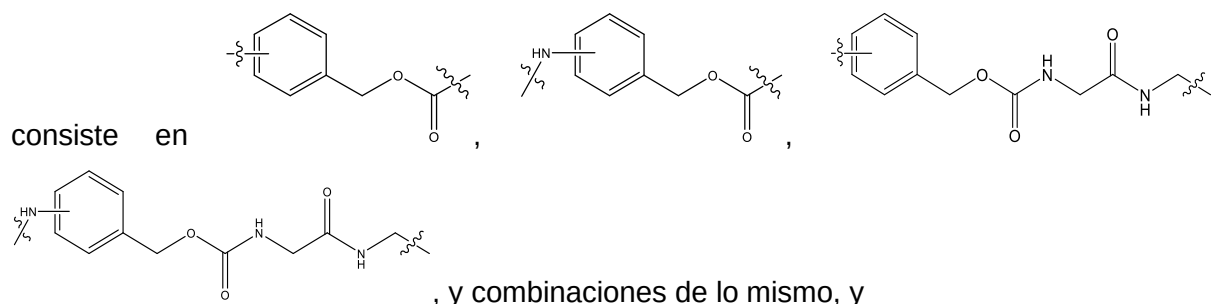
10 SP1 está ausente o es una primera unidad separadora seleccionada del grupo que

consiste en  y  ; un alquilo de C₁₋₆, -(CH₂-CH₂-O)_v-, -(CH₂-CH₂-O)_v-

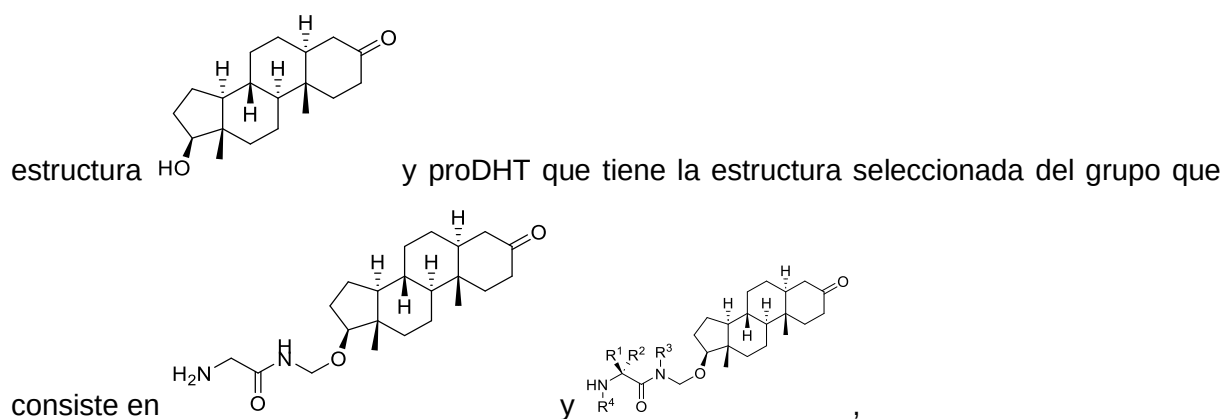
$(CH_2)_u$ -, $-(CH_2-CH_2-O)_v-(CH_2)_u-C(O)$, $-O-CH_2-C(O)-NH$, $-O-CH_2-C(O)-NH-(CH_2-CH_2-O)_v$
 $(CH_2)_u$ -, $-O-CH_2-C(O)-NH-(CH_2-CH_2-O)_v-(CH_2)_u-C(O)-NH$, $-NH$ -, $-C(O)$ -, $-NH-C(O)$ -, $-NH$ -
 $(CH_2)_u$ -, $-NH-(CH_2)_u-C(O)$ -, $-NH-(CH_2-CH_2-O)_v$ -, $-NH-(CH_2-CH_2-O)_v-C(O)$ -, $-NH-(CH_2-CH_2-O)_v$ -
 $(CH_2)_u$ -, $-NH-(CH_2-CH_2-O)_v-(CH_2)_u-C(O)$ -, $-(CH_2)_u-NH-C(O)$ -, $-NH-(CH_2)_u-NH-C(O)$ -, $-NH$ -
 5 $(CH_2)_u-C(O)-NH$ -, o combinaciones de lo mismo; en donde los subíndices u y v son
 independientemente un número entero de 1 a 8;

AA está ausente o es una unidad peptídica que comprende de 2 a 4 aminoácidos;

SP2 está ausente o una segunda unidad separadora seleccionada del grupo que



P es un agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en DHT que tiene la



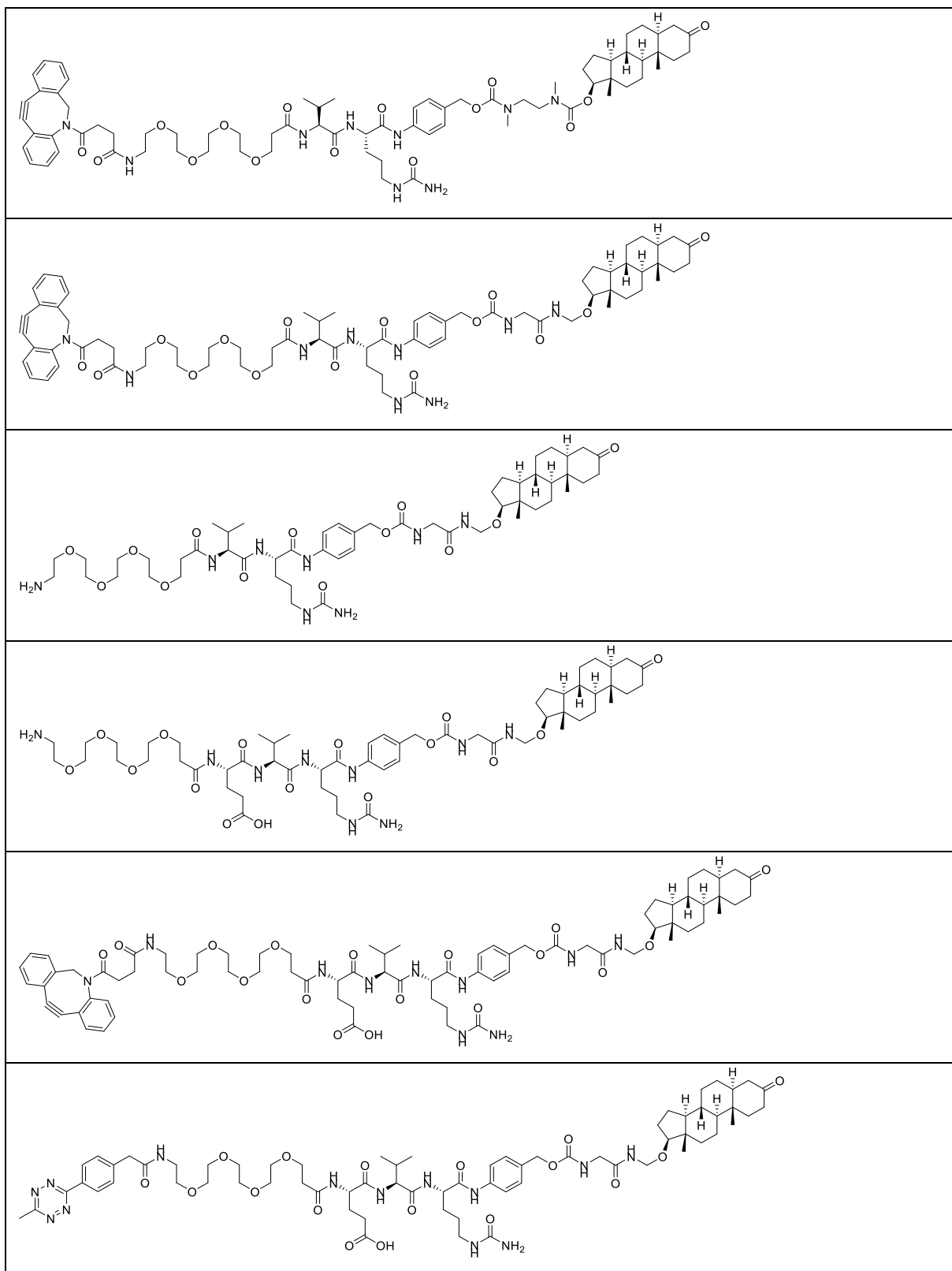
en donde R_1 se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo de C_{1-6} , $(CH_2)_{0-6}-OH$,
 15 $(CH_2)_{0-6}-NH_2$, $(CH_2)_{0-6}-NH-C_{1-3}$ alquilo, y $(CH_2)_{0-6}-N-(C_{1-3}$ alquilo) $_2$;

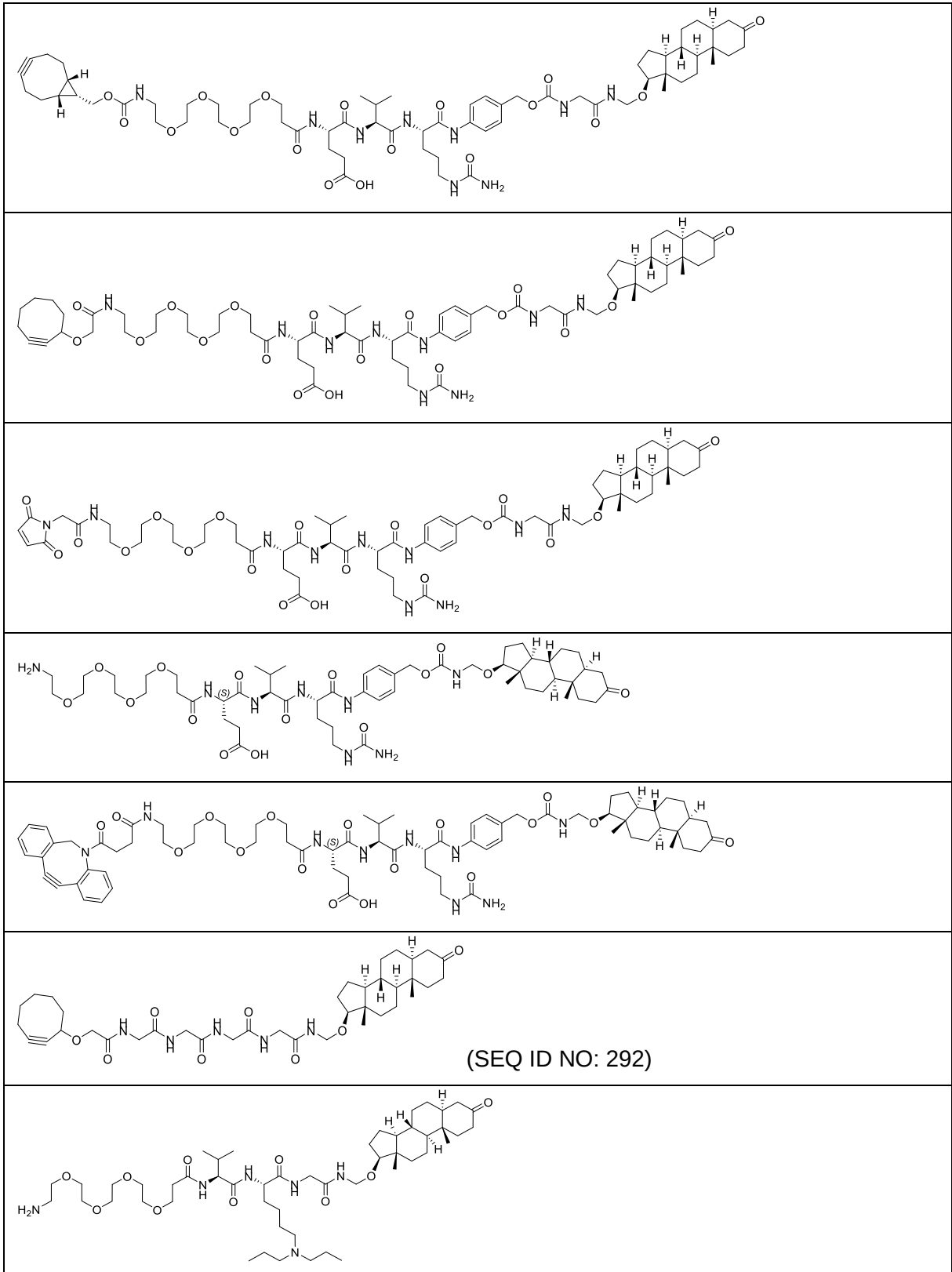
R_2 se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo de C_{1-6} , $(CH_2)_{0-6}-OH$, $(CH_2)_{0-6}-$
 NH_2 , $(CH_2)_{0-6}-NH-C_{1-3}$ alquilo, y $(CH_2)_{0-6}-N-(C_{1-3}$ alquilo) $_2$;

R_3 se selecciona del grupo que consiste en H y un alquilo de C_{1-3} , y

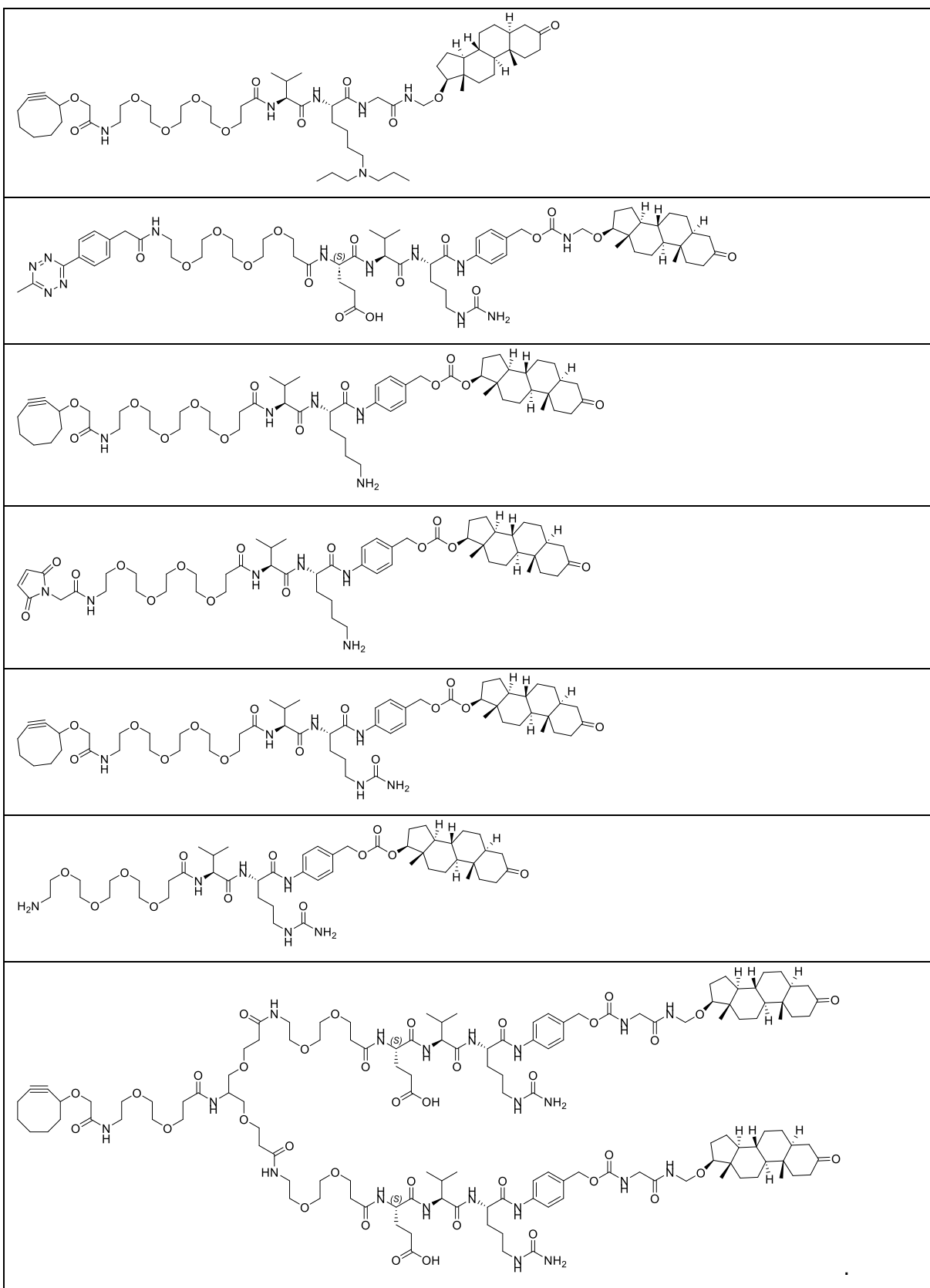
R_4 se selecciona del grupo que consiste en H y un alquilo de C_{1-3} .

En una modalidad, el compuesto tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en:



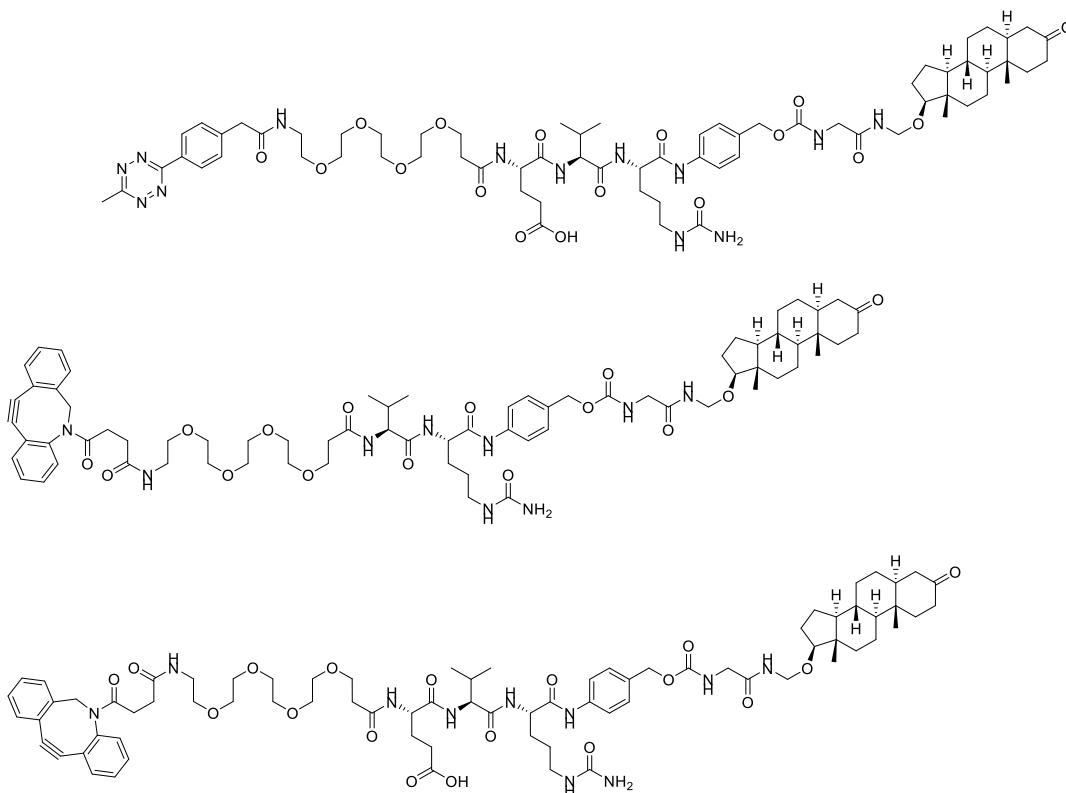


(SEQ ID NO: 292)



En aun otro aspecto, la presente divulgación proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende una proteína de unión a antígeno que se une específicamente a la subunidad gamma 1 auxiliar de canal activado por voltaje de calcio humano (hCACNG1) conjugada con el enlazador-carga útil

5 seleccionada del grupo que consiste en



y

En aun otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una población de los conjugados de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las modalidades anteriores que tiene una relación fármaco-anticuerpo (DAR) de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 8,0.

10

En una modalidad, la composición tiene una DAR de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 2,5

15 En una modalidad, la composición tiene una DAR de aproximadamente 2,0.

En una modalidad, la composición tiene una DAR de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 4,5

En una modalidad, la composición tiene una DAR de aproximadamente 4,0.

En una modalidad, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende el conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las modalidades anteriores y un diluyente, un portador y/o un excipiente.

5 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una forma de dosis farmacéutica que comprende el conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las modalidades anteriores o la composición farmacéutica de cualquiera de las modalidades anteriores.

En aun otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar una condición en un sujeto en necesidad del mismo, en donde el método comprende administrar al sujeto el conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las modalidades anteriores, la
10 composición farmacéutica de cualquiera de las modalidades anteriores, o la forma de dosis farmacéutica de cualquiera de las modalidades anteriores.

En una modalidad, la condición se selecciona del grupo que consiste en atrofia muscular y enfermedades musculares genéticas.

En una modalidad, la condición se selecciona del grupo que consiste en atrofia
15 muscular espinal adulta, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), anoctaminopatía, neuropatía autoinmunitaria, distrofia muscular de Becker, miopatía de Bethlem, calapainopatía, caveolinopatía, enfermedad de núcleo central, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT), desproporción tipo fibra congénita (CFTD), distrofia muscular congénita, síndrome miasténico congénito (CMS), miopatía congénita, distrofia miotónica congénita,
20 dermatomiositis (DM), trastornos de la unión neuromuscular, miopatía distal con vacuolas con reborde (DMRV), distrofia muscular de Duchenne (DMD), distrofia muscular de Emery-Dreifuss, distrofia muscular facioscapulohumeral (FSHD), distrofia muscular facioscapuloperoneal (FSPD), fibrodisplasia osificante progresiva (FOP), enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo V (GSD V), miopatía GNE (GNEM), miopatía hereditaria
25 por cuerpos de inclusión (HIBM), miopatía hereditaria por cuerpos de inclusión tipo 2 (HIBM 2), neuropatía motora y sensitiva hereditaria (HMSN), neuropatías hereditarias, miositis por cuerpos de inclusión (IBM), atrofia muscular espinal progresiva infantil, neuropatía inflamatoria, mielitis infecciosa, atrofia muscular espinal intermedia, dermatomiositis juvenil, atrofia muscular espinal juvenil, Landouzy-Dejerine, distrofias musculares de cinturas (LGMD),
30 enfermedad de McArdle, distrofia muscular congénita por deficiencia de merosina, miopatía metabólica, miopatía minicore, miopatía multicor, miopatía mitocondrial, distrofia muscular, miastenia gravis, miopatía miofibrilar, miositis, miositis osificante progresiva (MOP), distrofia miotónica, miopatía miotubular y otras miopatías centronucleares, miopatía nemalínica,

miopatía de Nonaka, distrofia muscular oculofaríngea (OPMD), parálisis periódica, polimiositis (PM) y dermatomiositis (DM), miopatía conservadora de cuádriceps (QSM), sarcoglicanopatía, sarcopenia, miopatía relacionada con SEPN1, atrofia muscular espinal (SMA), enfermedad de Steinert, distrofia muscular congénita de Ullrich, enfermedad de VCP y pérdida progresiva de masa y fuerza muscular relacionada con la edad.

En una modalidad, el sujeto es un adulto. En una modalidad, el sujeto tiene más de 65 años de edad.

En una modalidad, el sujeto tiene menos de 18 años de edad.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para administrar selectivamente un compuesto en una célula, en donde el compuesto es el conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las modalidades anteriores.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para dirigirse selectivamente a un antígeno en una superficie de una célula con un compuesto, en donde el compuesto es de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores.

En una modalidad, la célula es una célula de mamífero. En una modalidad, la célula es una célula humana. En una modalidad, la célula es una célula muscular.

En una modalidad, el conjugado de anticuerpo-fármaco se administra de manera intravenosa o de manera subcutánea.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para provocar la internalización de un compuesto por una miofibra, el método que comprende poner en contacto la miofibra con el conjugado de anticuerpo-fármaco de cualquiera de las modalidades anteriores.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para producir un compuesto que tiene una estructura de acuerdo con la fórmula (A):

$$\text{Ab}-(\text{L1-B-L2-P})_n \text{ (A)},$$

o una sal farmacéuticamente aceptable de lo mismo, en donde:

Ab es una proteína de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1-14;

L1 es un primer enlazador unido covalentemente a la cadena lateral de un residuo de

glutamina del Ab;

B es una porción que comprende un triazol;

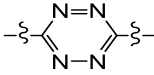
L2 es un segundo enlazador unido covalentemente al agente terapéutico P;

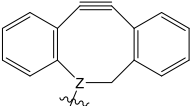
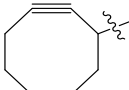
P es un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en DHT y proDHT, y

5 n es un número entero de 1 a 8, en donde el método comprende los pasos de:

a) poner en contacto, en la presencia de una transglutaminasa, el A que comprende al menos un residuo de glutamina con al menos un compuesto L1-B';

b) poner en contacto el producto del paso a) con uno o más equivalentes de un compuesto B"-L2-P, en donde el grupo B" es capaz de unirse covalentemente al grupo B',

10 en donde uno de los grupos B' y B" se selecciona de $-N_3$ y ; y el otro de los

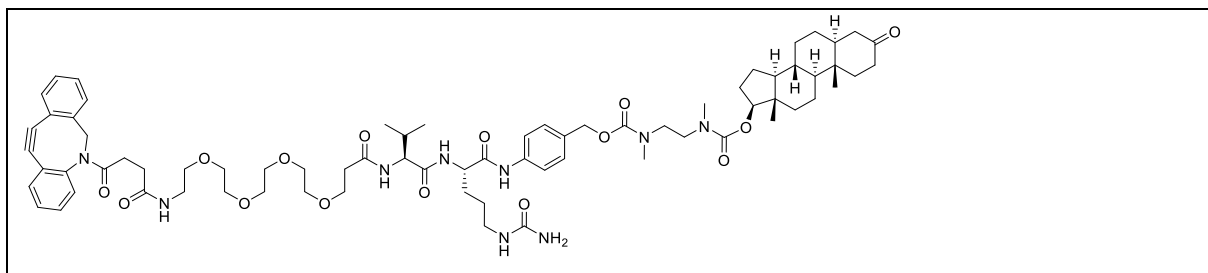
grupos B' y B" se selecciona de $-\xi \equiv \xi-$, ; y , donde Z es C o N; y

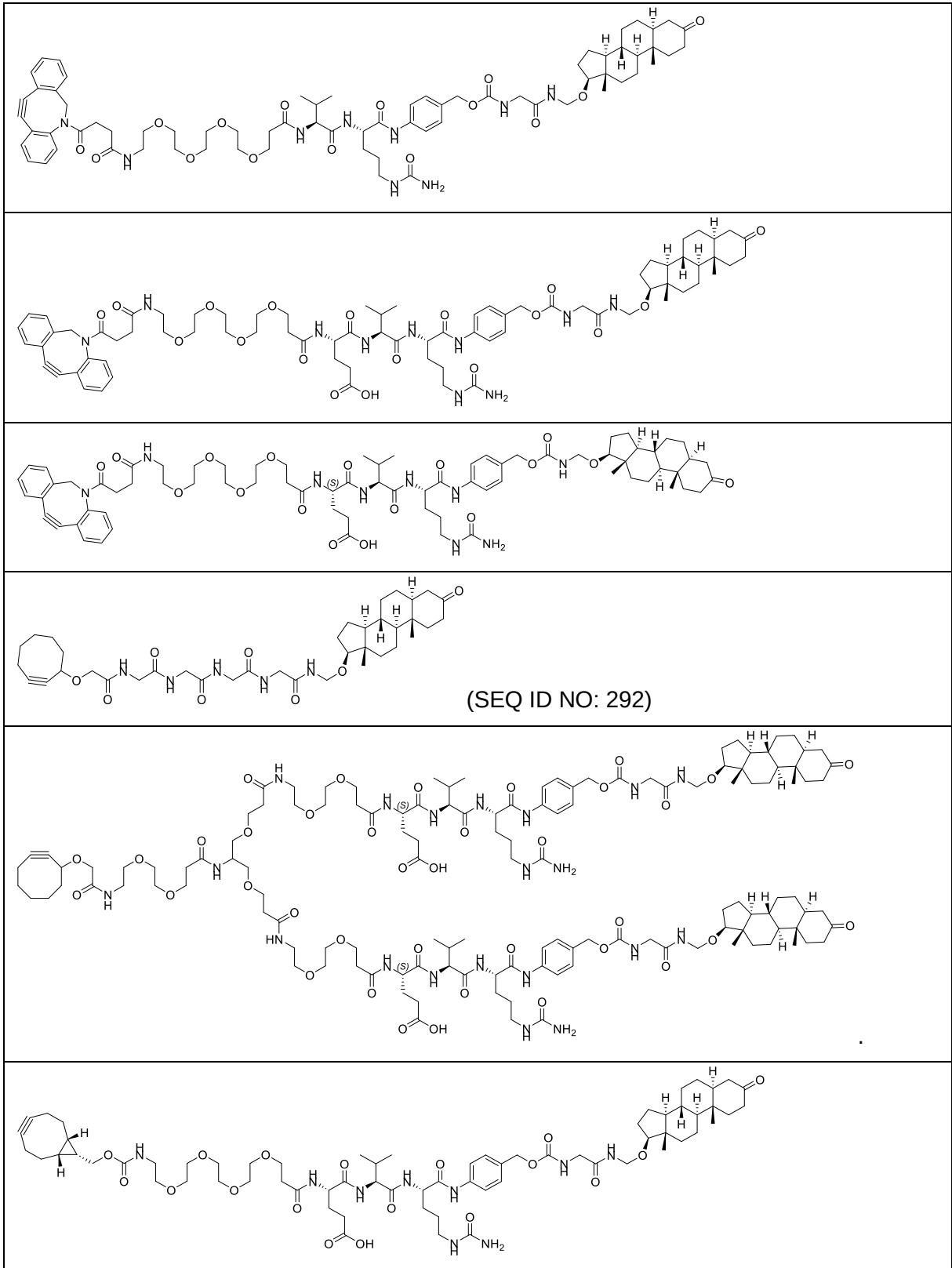
c) aislar el compuesto producido de la fórmula (A).

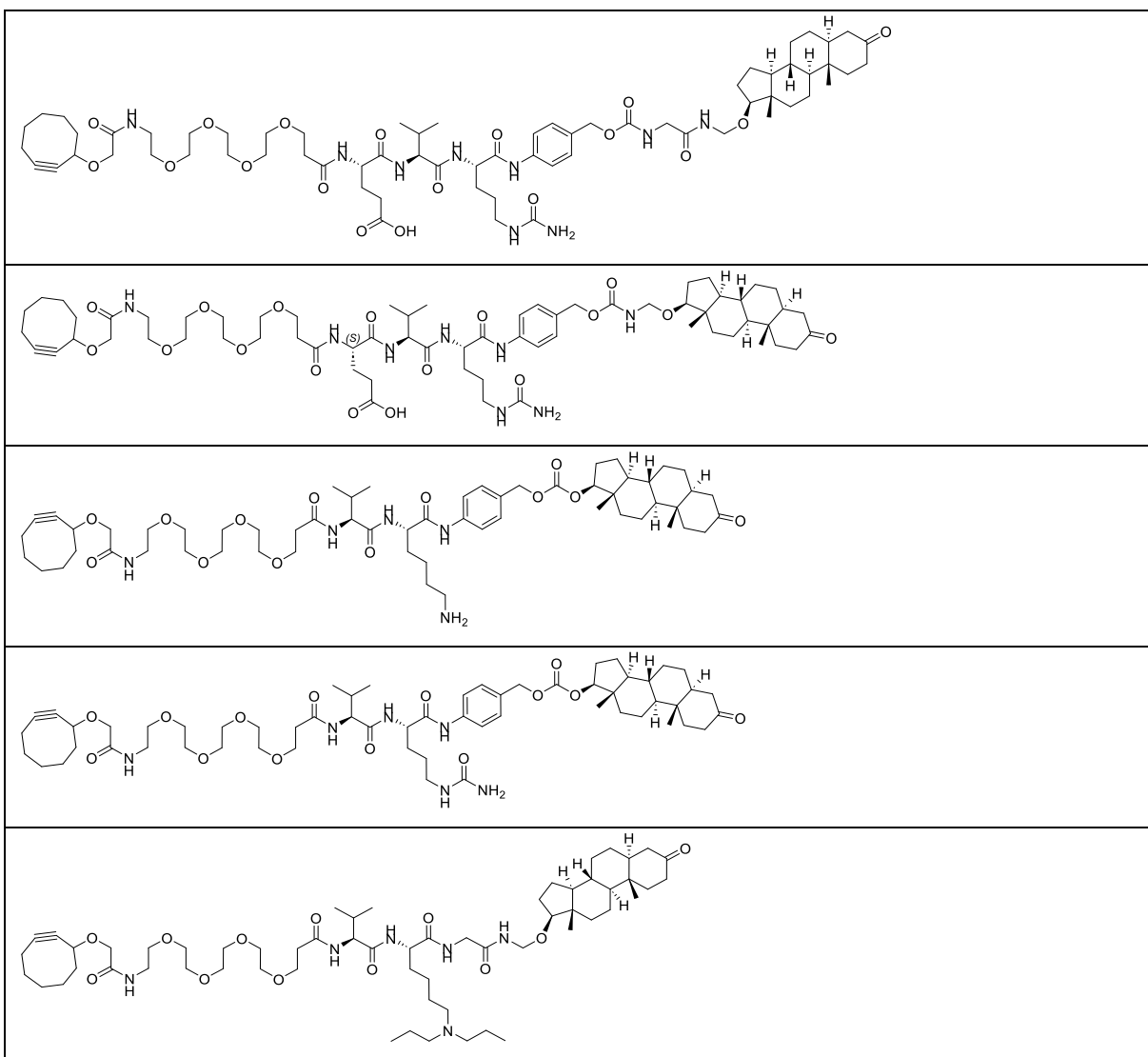
En una modalidad, el A tiene residuos de glutamina en las posiciones 295 (Q295) y 297 (N297Q).

15 En una modalidad, el L1-B' tiene la estructura $H_2N-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-N_3$.

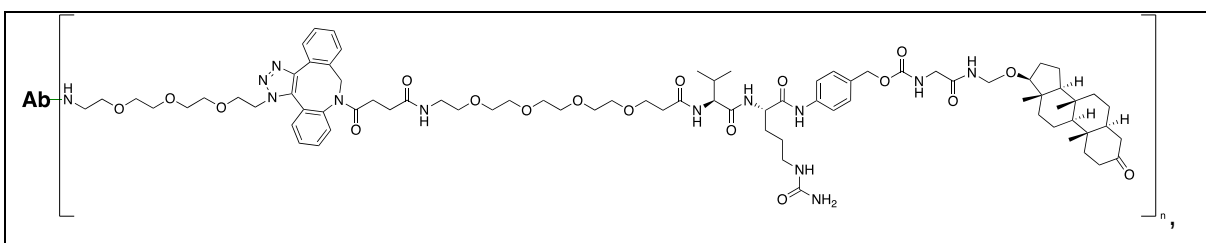
En una modalidad, el compuesto B"-L2-P tiene la estructura seleccionada del grupo que consiste en:

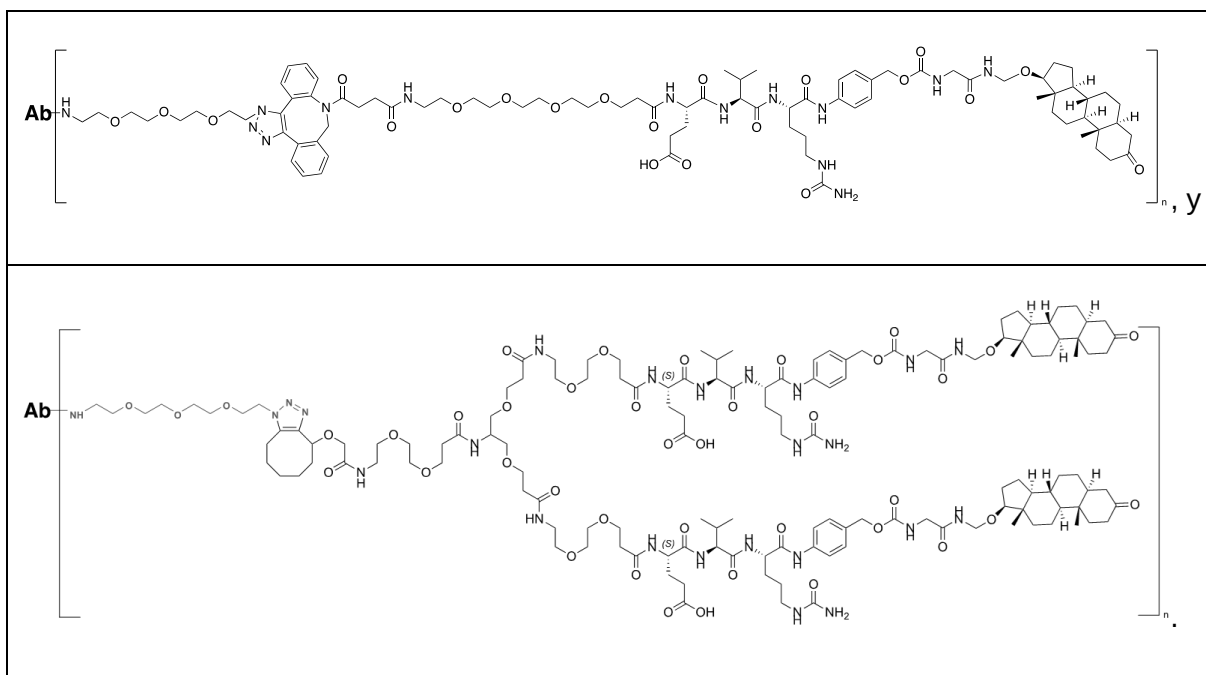




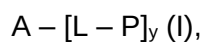


En una modalidad, el compuesto de la fórmula (A) tiene la estructura seleccionada del grupo que consiste en:





En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para producir un compuesto que tiene una estructura de acuerdo con la fórmula (I):



5 en donde A es la proteína de unión a antígeno;

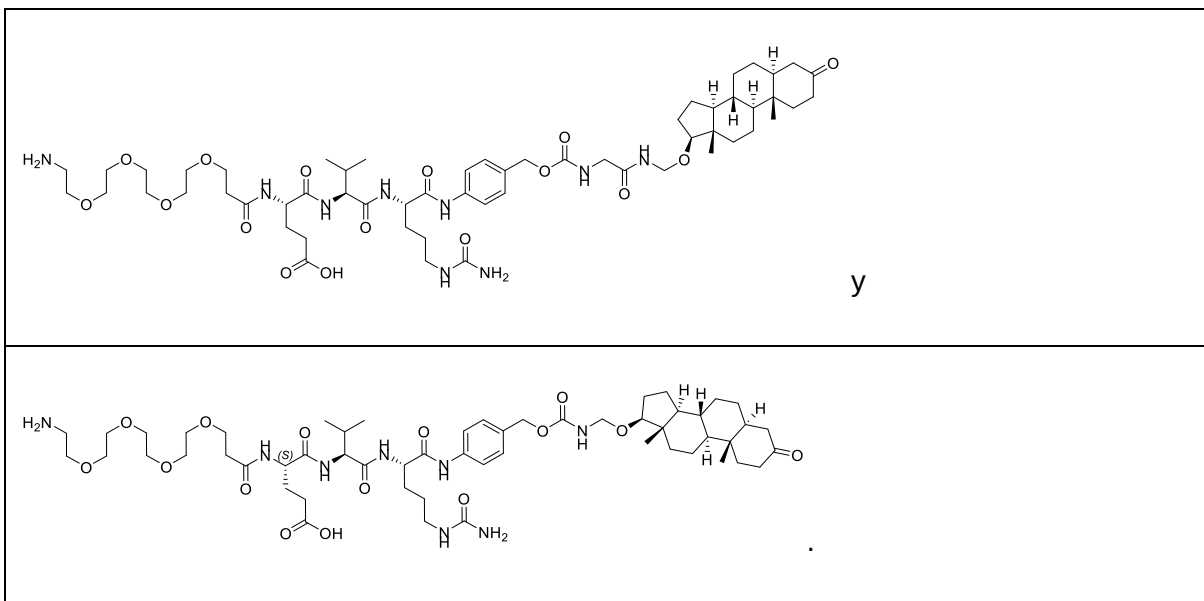
L es un enlazador;

P es un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en DHT y proDHT, y

y es un número entero de 1 a 8, en donde el método comprende los pasos de:

- 10 a) poner en contacto, en la presencia de una transglutaminasa, el A que comprende al menos un residuo de glutamina con al menos un compuesto L-P, en donde el compuesto L-P tiene al menos una porción de amina terminal, y
- b) aislar el compuesto producido de la fórmula (I).

En una modalidad, el compuesto L-P tiene la estructura seleccionada del grupo que consiste en:



Estos y otros aspectos de la presente invención llegarán a ser evidentes para aquellos expertos en la técnica después de una lectura de la siguiente descripción detallada de la invención, incluyendo las reivindicaciones anexas.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA FIGURAS

El archivo de patente o solicitud contiene al menos un dibujo ejecutado en color. Las copias de esta publicación de patente o solicitud de patente con dibujos a color se proporcionarán por la Oficina tras la solicitud y pago de la tarifa necesaria.

La **FIGURA 1** proporciona datos con respecto al flujo de calcio inducido por acetilcolina en miotubos humanos (unidades de luz relativas; eje y) después de la incubación con diferentes concentraciones (0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM y 10 μM ; eje x) de un anticuerpo anti-hCACNG1 (Ab 1 anti-hCACNG1, Ab 2 anti-hCACNG1 o Ab 3 anti-hCACNG1) o un anticuerpo de control de isotipo (Ab 1 de control de isotipo, Ab 2 de control de isotipo o Ab 3 de control de isotipo), o con nicardipino 20 μM como control positivo para bloqueo de calcio. Los anticuerpos anti-hCACNG1 probados aquí no inhiben el flujo de calcio inducido por acetilcolina en miotubos humanos a estas concentraciones.

La **FIGURA 2** proporciona imágenes de inmunohistoquímica de fluorescencia tomadas a un aumento de 20x de miofibras individuales *ex vivo* después del aislamiento de ratones tipo silvestre ("WT"), ratones que fueron homocigotos para la deleición de CACNG1 ("KO") o ratones que expresan solo CACNG1 humano ("CACNG1^{Hu/Hu}"); incubación con un anticuerpo

anti-CACNG1 humano (Ab 4 anti-hCACNG1 o Ab 1 anti-hCACNG1) o un anticuerpo de control de isotipo (Ab 5 de control de isotipo o Ab 2 de control de isotipo); y etiquetado con anticuerpos secundarios conjugados con fluorescencia. Los anticuerpos CACNG1 se unieron a miofibras CACNG1^{Hu/Hu}, en tanto que los anticuerpos de control de isotipo no lo hicieron.

5 La **FIGURA 3** proporciona imágenes de inmunohistoquímica de fluorescencia confocal de plano individual tomadas a un aumento de 20x de miofibras individuales *ex vivo* después del aislamiento de ratones tipo silvestre ("WT"), ratones que fueron homocigotos para la delección de CACNG1 (KO) o ratones que expresan solo CACNG1 humano ("CACNG1^{Hu/Hu}"); e incubación con un anticuerpo anti-CACNG1 humano (Ab 2 anti-hCACNG1) o un anticuerpo
10 de control de isotipo (Ab 4 de control de isotipo) conjugado con fluoróforo Alexa 647 (A647) durante 30 minutos, 4 horas u 8 horas. La imagenología confocal reveló que el anticuerpo CACNG1 conjugado con fluoróforo se unió a la superficie de las miofibras CACNG1^{Hu/Hu} después de 30 minutos de incubación, y que una porción del anticuerpo CACNG1 se internalizó y detectó dentro de la miofibra a las 4 horas y 8 horas de incubación. No se detectó
15 que el anticuerpo de control de isotipo conjugado con fluoróforo se uniera o internalizara en miofibras CACNG1^{Hu/Hu}.

La **FIGURA 4** proporciona imágenes de tomografía de criofluorescencia de un ratón 6 días después de la inyección sistémica de 10 mg/kg de un anticuerpo anti-hCACNG1 conjugado con Alexa 647 (Ab 2 anti-hCACNG1 o Ab 1 anti-hCACNG1) o un anticuerpo de
20 control de isotipo conjugado con Alexa 647.

La **FIGURA 5** proporciona imágenes de inmunohistoquímica de fluorescencia en mosaico tomadas a un aumento de 20x de imágenes de gastrocnemio/plantar/sóleo, tríceps, tibial anterior, trapecio, diafragma, músculos del suelo pélvico o secciones de lengua de ratones que expresan solo CACNG1 humano ("CACNG^{Hu/Hu}") después de la inyección en la
25 vena de la cola con 10 mg/kg de un anticuerpo anti-CACNG1 humano (Ab 1 anti-hCACNG1 o Ab 2 anti-hCACNG1) o un anticuerpo de control de isotipo (Ab 4 de control de isotipo) conjugado con fluoróforo Alexa 647 (A647) y sacrificio 6 días después de la inyección. El anticuerpo CACNG1 conjugado con fluoróforo se detectó en todos estos músculos esqueléticos, con Ab 2 anti-hCACNG1 que muestra una señal más fuerte en los músculos en
30 comparación con Ab 1 anti-hCACNG1. Solo se detectaron niveles bajos de fluorescencia en músculos de ratones de control de isotipo e inyectados con solución salina.

La **FIGURA 6** proporciona imágenes de inmunohistoquímica de fluorescencia en mosaico tomadas a un aumento de 20x de imágenes de secciones de hígado, bazo, riñón o

tejido adiposo marrón de ratones que expresan solo CACNG1 humano ("CACNG1^{Hu/Hu}") después de la inyección en la vena de la cola con 10 mg/kg de un anticuerpo anti-CACNG1 humano (Ab 1 anti-hCACNG1 o Ab 2 anti-hCACNG1) o un anticuerpo de control de isotipo (Ab 4 de control de isotipo) conjugado con fluoróforo Alexa 647 (A647) y sacrificio 6 días después de la inyección. Ninguno de los anticuerpos CACNG1 conjugados con fluoróforo mostró una señal apreciable en estos órganos, con niveles de Alexa 647 similares a los controles inyectados con isotipo y solución salina.

La **FIGURA 7** proporciona un esquema que representa una línea de tiempo experimental de ejemplo (panel superior) y fotomicrografías que muestran la distribución de anticuerpos CACNG1 al músculo sóleo bajo condiciones sedentarias y de ejercicio a una dosis de 10 mg/kg o 50 mg/kg (alta) (panel inferior). La distribución de CACNG1 se altera por ejercicio y dosis.

Las **FIGURAS 8A-8C** representan esquemas de diferentes vías de conjugación de ADC. La **FIGURA 8A** proporciona un esquema del procedimiento de conjugación de ADC de dos pasos de acuerdo con la presente divulgación. La **FIGURA 8B** proporciona un esquema del procedimiento de conjugación de ADC de un paso de acuerdo con la presente divulgación. La **FIGURA 8C** proporciona un esquema de conjugación de ADC Cys-maleimida.

Las **FIGURAS 9A-9B** representan ES-MS (**FIGURA 9A**) y la estructura esquemática (**FIGURA 9B**) de aCACNG1-(AL)₄.

Las **FIGURAS 10A-10C** representan ES-MS de ADC aCACNG1-(AL-LP2)₄ (**FIGURA 10A**), ES-MS de ADC FeID1-(AL-LP2)₄ (**FIGURA 10B**) y la estructura esquemática (**FIGURA 10C**) de aCACNG1-(AL-LP2)₄.

Las **FIGURAS 11A-11C** representan espectros de ES-MS de aCACNG1-(AL)₄ (**FIGURA 11A**), aCACNG1-(AL-LP3)₄ (**FIGURA 11B**), y FeID1-(AL-LP3)₄ (**FIGURA 11C**).

La **FIGURA 12** muestra los resultados del examen de antagonistas.

La **FIGURA 13** representa la estabilidad en plasma *in vitro* de Ab 5-L2 anti-hCACNG1 en plasma.

La **FIGURA 14** representa la estabilidad en plasma *in vitro* de Ab 5-L3 anti-hCACNG1 en plasma.

La **FIGURA 15** representa la activación del receptor de andrógeno (24 h) en la línea

de células LNCaP.hCANG1.AR.Luc después de 24 horas de tratamiento.

La **FIGURA 16** representa la activación del receptor de andrógenos (24 h) en la línea de células AR.Luc después de 24 horas de tratamiento. Muestra el nivel de activación de receptor de andrógenos (AR) en términos de unidades de luz relativas (RLU; eje y) después de una incubación de 24 horas de una línea de células LNCaP modificada para expresar luciferasa tras la activación de receptor de andrógenos (AR.Luc) con: dihidrotestosterona (DHT) sola (DHT no conjugada); un anticuerpo anti-hCANG1 (Ab 6 anti-hCANG1, Ab 7 anti-hCANG1, Ab 8 anti-hCANG1, Ab 9 anti-hCANG1, Ab 10 anti-hCANG1 o Ab 5 anti-hCANG1) conjugado mediante un enlazador VC-PAB a DHT (L2); o un anticuerpo de control de isotipo anti-FelD (Ab 1 de control de isotipo) conjugado mediante un enlazador VC-PAB a DHT (L2); a concentraciones variables (Log[Conc. (M)]; eje x). Solo se demostró que la DHT no conjugada activa el receptor de andrógenos en este ensayo, mientras que ninguno de los anticuerpos CACNG1 conjugados con DHT mostró ninguna activación apreciable del receptor de andrógenos en esta línea de células que no expresa hCANG1.

La **FIGURA 17** representa la activación del receptor de andrógeno (48 y 72 h) en la línea de células hCANG1.AR.Luc después de 24, 48 y 72 horas de tratamiento. Muestra el nivel de activación de receptor de andrógenos (AR) en términos de unidades de luz relativas (RLU; eje y) después de una incubación de 24 horas, 48 horas o 72 horas de una línea de células LNCaP modificada que expresa hCANG1 para expresar también luciferasa tras la activación de receptor de andrógenos (hCANG1.AR.Luc) con: dihidrotestosterona (DHT) sola (DHT no conjugada); un anticuerpo anti-hCANG1 (Ab 6 anti-hCANG1, Ab 7 anti-hCANG1, Ab 8 anti-hCANG1, Ab 9 anti-hCANG1, Ab 10 anti-hCANG1 o Ab 5 anti-hCANG1) conjugado mediante un enlazador VC-PAB a DHT (L2); o un anticuerpo de control de isotipo anti-FelD (Ab 1 de control de isotipo) conjugado mediante un enlazador VC-PAB a DHT (L2); a concentraciones variables (Log[Conc. (M)]; eje x). Varios conjugados de anticuerpo CACNG1-DHT activaron el receptor de andrógenos en esta línea de células que expresa hCANG1, y en tanto que la eficacia y la potencia de la activación del receptor de andrógenos fue menor que la de no conjugado a 24 horas después del tratamiento, la activación del receptor de andrógenos se mantuvo a 48 y 72 horas en comparación con DHT no conjugado.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En la presente se proporcionan nuevos anticuerpos anti-CACNG1 humano, y fragmentos de unión a antígeno monovalentes de los mismos, y conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC)

que son útiles para mediar en la internalización de CACNG1. Los anticuerpos anti-CACNG1 humano, y fragmentos de unión a antígeno monovalente de los mismos y ADC que los comprenden pueden ser útiles, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades, como parte de proteína de unión a antígeno multiespecífica y/o proteína terapéutica multidominio, y/o como un conjugado de anticuerpo-fármaco.

La descripción en la presente no se limita a modalidades, composiciones, métodos y condiciones experimentales particulares descritas, puesto que estas modalidades, composiciones, métodos y condiciones pueden variar. La terminología usada en la presente es para el propósito de describir modalidades particulares solamente y no se propone que sea limitante.

Aunque se puede usar cualquier método y material similar o equivalente a aquellos descritos en la presente en la práctica o prueba como se describe en la presente, ahora se describen algunos métodos y materiales preferidos. Todas las publicaciones citadas en la presente se incorporan en la presente por referencia para describir en su totalidad. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado como se entiende comúnmente por un experto en la técnica.

El término “aproximadamente”, cuando se usa con referencia a un valor numérico mencionado particular, significa que el valor puede variar del valor mencionado por no más de 1 %. Por ejemplo, la expresión “aproximadamente 100” incluye 99 y 101 y todos los valores intermedios (por ejemplo, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, etc.).

Los canales de calcio dependientes de voltaje en general se componen de cinco subunidades. La proteína codificada por el gen *CACNG1* representa una de estas subunidades. “CACNG1” incluye una proteína codificada por el gen *CACNG1*, y es una de dos proteínas de subunidad gamma conocidas. CACNG1 es parte del canal de calcio sensible a 1,4-dihidropiridina de músculo esquelético y es una proteína de membrana integral que desempeña un papel en el acoplamiento de excitación-contracción. CACNG1 es parte de una subfamilia de proteínas de ocho miembros funcionalmente diversa de la familia PMP-22/EMP/MP20 y se ubica en un cúmulo con dos miembros de la familia que funcionan como proteínas reguladoras de receptor AMPA transmembrana (TARP). CACNG1 se expresa altamente y de manera específica en el músculo esquelético. El gen que codifica para CACNG1 humano (*CACNG1*) se ubica en el brazo largo del cromosoma 17. *CACNG1* comprende 4 exones y tiene aproximadamente 12,244 bases de longitud. A una secuencia de ejemplo para el gen *CACNG1* humano se le asigna el número de acceso NCBI

NM_000727.4 (SEQ ID NO: 241). A una proteína CACNG1 humana de ejemplo se le asigna el número de acceso NCBI NP_000718 (SEQ ID NO: 241).

La frase “un anticuerpo que se une a CACNG1” o un “anticuerpo anti-hCACNG1” incluye un anticuerpo y fragmento de unión a antígeno del mismo que reconoce específicamente una única molécula de CACNG1. Un anticuerpo y fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en la presente puede unirse a CACNG1 soluble y/o CACNG1 expresado en superficie celular. CACNG1 soluble incluye proteínas CACNG1 naturales, así como variantes de proteína CACNG1 recombinante que carecen de un dominio transmembrana o que de otro modo no están asociadas con una membrana celular.

La expresión “CACNG1 expresado en superficie celular” se refiere a una o más proteínas CACNG1 que se expresan en la superficie de una célula *in vitro* o *in vivo*, de modo que al menos una porción de una proteína CACNG1 se expone al lado extracelular de la membrana celular y es accesible a una porción de unión a antígeno de un anticuerpo. Una “CACNG1 expresada en superficie celular” puede comprender o consistir en una CACNG1 expresada en la superficie de una célula que normalmente expresa proteína CACNG1. De manera alternativa, “CACNG1 expresada en superficie celular” puede comprender o consistir en una proteína CACNG1 expresada en la superficie de una célula que normalmente no expresa CACNG1 humana en su superficie, pero se ha modificado de manera artificial para expresar CACNG1 en su superficie.

La expresión “molécula de unión a antígeno” incluye un anticuerpo y un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo.

El término “anticuerpo” se refiere a cualquier molécula de unión a antígeno o complejo molecular que comprende al menos una región determinante de complementariedad (CDR) que se une específicamente a o interactúa con un antígeno particular (por ejemplo, CACNG1).

El término “anticuerpo” como se usa en la presente, incluye moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces de disulfuro, así como multímeros de las mismas (por ejemplo, IgM). Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio, CL. Las regiones VH y VL se pueden subdividir adicionalmente en

regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad ("CDR"), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas "regiones marco" (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR, arregladas de extremo amino a extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (las CDR de cadena pesada se pueden abreviar como HCDR1, HCDR2 y HCDR3; las CDR de cadena ligera se pueden abreviar como LCDR1, LCDR2 y LCDR3. El término anticuerpo de "alta afinidad" se refiere a aquellos anticuerpos que tienen una afinidad de unión a su diana de al menos 10^{-9} M, al menos 10^{-10} M; al menos 10^{-11} M; o al menos 10^{-12} M, como se mide por resonancia de plasmones superficiales, por ejemplo, ELISA de afinidad de solución o BIACORE™. El término "anticuerpo" puede abarcar cualquier tipo de anticuerpo, tal como, por ejemplo, monoclonal o policlonal. Además, el anticuerpo puede ser de cualquier origen, tal como, por ejemplo, mamífero o no mamífero. En una modalidad, el anticuerpo puede ser de mamífero o de ave. En una modalidad adicional, el anticuerpo puede ser de origen humano y puede ser además un anticuerpo monoclonal humano.

El término "anticuerpo, también incluye fragmentos de unión a antígeno de moléculas de anticuerpo completas. Los términos "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo, "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo y similares, incluyen cualquier glicoproteína o polipéptido que se presenta de manera natural, obtenible enzimáticamente, sintético o genéticamente modificado que se une específicamente a un antígeno para formar un complejo. Los fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo se pueden derivar, por ejemplo, de moléculas de anticuerpo completas usando cualquier técnica estándar adecuada tal como digestión proteolítica o técnicas de modificación genética recombinante que implican la manipulación y expresión de ADN que codifica para dominios opcionalmente constantes y variables de anticuerpo. Este ADN se conoce y/o está fácilmente disponible de, por ejemplo, fuentes comerciales, bibliotecas de ADN (incluidas, por ejemplo, bibliotecas de fagos-anticuerpos), o se puede sintetizar. El ADN se puede secuenciar y manipular químicamente o al usar técnicas de biología molecular, por ejemplo, para disponer uno o más dominios variables y/o constantes en una configuración adecuada, o para introducir codones, crear residuos de cisteína, modificar, adicionar o eliminar aminoácidos, etc.

Los ejemplos no limitantes de fragmentos de unión a antígeno incluyen: (i) fragmentos Fab; (ii) fragmentos F(ab')₂; (iii) fragmentos Fd; (iv) fragmentos Fv; (v) moléculas de Fv de cadena individual (scFv); (vi) fragmentos dAb; y (vii) unidades de reconocimiento mínimas que consisten de los residuos de aminoácidos que imitan la región hipervariable de un anticuerpo (por ejemplo, una región determinante de complementariedad (CDR) aislada tal como un

péptido de CDR3) o un péptido de FR3-CDR3-FR4 restringido. Otras moléculas modificadas, tal como anticuerpos específicos de dominio, anticuerpos de dominio individual, anticuerpos eliminados de dominio, anticuerpos quiméricos, anticuerpos injertados en CDR, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos, nanocuerpos (por ejemplo, nanocuerpos monovalentes, nanocuerpos bivalentes, etc.), productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP) y dominios IgNAR variables de tiburón, también se abarcan dentro de la expresión “fragmento de unión a antígeno”.

Un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo comprenderá habitualmente al menos un dominio variable. El dominio variable puede ser de cualquier tamaño o composición de aminoácidos y en general comprenderá al menos una CDR, que es adyacente a o en marco con una o más secuencias de marco. En fragmentos de unión a antígeno que tienen un dominio V_H asociado con un dominio V_L , los dominios V_H y V_L se pueden situar uno respecto al otro en cualquier arreglo adecuado. Por ejemplo, la región variable puede ser dimérica y contener dímeros V_H - V_H , V_H - V_L o V_L - V_L . De manera alternativa, el fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede contener un dominio V_H o V_L monomérico.

En ciertas modalidades, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede contener al menos un dominio variable enlazado de manera covalente a al menos un dominio constante. Las configuraciones de ejemplo no limitantes de dominios variables y constantes que se pueden encontrar dentro de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo como se describen en la presente incluyen: (i) V_H - C_H1 ; (ii) V_H - C_H2 ; (iii) V_H - C_H3 ; (iv) V_H - C_H1 - C_H2 ; (v) V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (vi) V_H - C_H2 - C_H3 ; (vii) V_H - C_L ; (viii) V_L - C_H1 ; (ix) V_L - C_H2 ; (x) V_L - C_H3 ; (xi) V_L - C_H1 - C_H2 ; (xii) V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (xiii) V_L - C_H2 - C_H3 ; y (xiv) V_L - C_L . En cualquier configuración de dominios variables y constantes, incluida cualquiera de las configuraciones de ejemplo listadas anteriormente, los dominios variables y constantes se pueden enlazar ya sea directamente entre sí o se pueden enlazar por una región de enlazador o bisagra completa o parcial. Una región bisagra puede consistir de al menos 2 (por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 40, 60 o más) aminoácidos, que dan por resultado un enlace flexible o semiflexible entre dominios variables y/o constantes adyacentes en una molécula de polipéptido individual. Además, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo descrito en la presente puede comprender un homo-dímero o hetero-dímero (u otro multímero) de cualquiera de las configuraciones de dominio variable y constante listadas anteriormente en asociación no covalente entre sí y/o con uno o más dominios V_H o V_L monoméricos (por ejemplo, por enlaces de disulfuro).

Al igual que con las moléculas de anticuerpo completas, los fragmentos de unión a

antígeno pueden ser monoespecíficos o multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos). Un fragmento de unión a antígeno multiespecífico de un anticuerpo comprenderá habitualmente al menos dos dominios variables diferentes, en donde cada dominio variable es capaz de unirse específicamente a un antígeno separado o a un epítipo diferente en el mismo antígeno.

- 5 Cualquier formato de anticuerpo multiespecífico, incluidos los formatos de anticuerpo biespecífico de ejemplo divulgados en la presente, se puede adaptar para usarse en el contexto de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo como se describe en la presente usando técnicas de rutina disponibles en la técnica.

10 En ciertas modalidades, los anticuerpos anti-hCACNG1 como se describe en la presente son anticuerpos humanos. El término “anticuerpo humano”, se refiere a anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos como se describen en la presente pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o
15 específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR y en particular CDR3. Sin embargo, el término “anticuerpo humano”, no se propone que incluya anticuerpos en los cuales las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se hayan injertado en secuencias marco humanas.

20 Los anticuerpos como se describen en la presente pueden, en algunas modalidades, ser anticuerpos humanos recombinantes. El término “anticuerpo humano recombinante” se propone que incluya todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tal como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedadora (descrito adicionalmente más adelante), anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos combinatoria
25 recombinante (descrito adicionalmente más adelante), anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (ver, por ejemplo, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Estos
30 anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertas modalidades, sin embargo, estos anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los

anticuerpos recombinantes son secuencias que, en tanto que derivan y se relacionan con secuencias V_H y V_L de línea germinal humana, pueden no existir naturalmente dentro del repertorio de línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

5 Los anticuerpos humanos pueden existir en dos formas generales que se asocian con heterogeneidad de bisagra. En una forma general, una molécula de inmunoglobulina comprende una construcción de cuatro cadenas estable de aproximadamente 150-160 kDa en la cual los dímeros se mantienen juntos por un enlace de disulfuro de cadena pesada intercadena. En una segunda forma general, los dímeros no se enlazan mediante enlaces de disulfuro intercadena y se forma una molécula de aproximadamente 75-80 kDa compuesta
10 por una cadena ligera y pesada covalentemente acoplada (medio-anticuerpo). Estas formas han sido extremadamente difíciles de separar, incluso después de la purificación por afinidad.

La frecuencia de aparición de la segunda forma en diferentes isotipos de IgG intactos se debe a, pero no se limita a, diferencias estructurales asociadas con el isotipo de región bisagra del anticuerpo. Una sustitución de aminoácidos individual en la región bisagra de la
15 bisagra de IgG4 humana puede reducir significativamente la aparición de la segunda forma (Angal et al. (1993) Molecular Immunology 30:105) a niveles habitualmente observados usando una bisagra de IgG1 humana. Los anticuerpos como se describen en la presente pueden tener una o más mutaciones en la región bisagra, C_H2 o C_H3 que pueden ser deseables, por ejemplo, en la producción, para mejorar el rendimiento de la forma de
20 anticuerpo deseada.

Los anticuerpos como se describen en la presente pueden ser anticuerpos aislados. Un “anticuerpo aislado” se refiere a un anticuerpo que se ha identificado y separado y/o recuperado de al menos un componente de su ambiente natural. Por ejemplo, un anticuerpo que se ha separado o removido de al menos un componente de un organismo, o de un tejido
25 o célula en el cual el anticuerpo existe de forma natural o se produce de forma natural, se puede considerar un “anticuerpo aislado”. Un anticuerpo aislado también incluye un anticuerpo *in situ* dentro de una célula recombinante. Los anticuerpos aislados son anticuerpos que se han sometido a al menos un paso de purificación o aislamiento. De acuerdo con ciertas modalidades, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de
30 otros productos químicos y/o material celular.

También se describen en la presente anticuerpos de un solo brazo que se unen a CACNG1. El término “anticuerpo de un brazo” se refiere a una molécula de unión a antígeno que comprende una cadena pesada de anticuerpo individual y una cadena ligera de

anticuerpo individual. Los anticuerpos de un brazo como se describen en la presente pueden comprender cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR o CDR como se expone en la tabla 1.

Los anticuerpos anti-hCACNG1 divulgados en la presente pueden comprender una o
5 más sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos en las regiones marco y/o CDR
de los dominios variables de cadena pesada y ligera en comparación con las correspondientes
secuencias de línea germinal a partir de las cuales se derivaron los anticuerpos. Estas
mutaciones se pueden determinar fácilmente al comparar las secuencias de aminoácidos
divulgadas en la presente con secuencias de línea germinal disponibles de, por ejemplo,
10 bases de datos de secuencias de anticuerpos públicas. También se describen en la presente
anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se derivan de cualquiera
de las secuencias de aminoácidos divulgadas en la presente, en donde uno o más
aminoácidos dentro de una o más regiones marco y/o de CDR se mutan en el o los
correspondientes residuos de la secuencia de línea germinal de la cual se derivó el anticuerpo,
15 o en el o los correspondientes residuos de otra secuencia de línea germinal humana, o en una
sustitución conservadora de aminoácidos del o de los correspondientes residuos de línea
germinal (estos cambios de secuencia se refieren en la presente colectivamente como
“mutaciones de línea germinal”). Un experto en la técnica, comenzando con las secuencias
de región variable de cadena pesada y ligera divulgadas en la presente, puede producir
20 fácilmente numerosos anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprenden una o
más mutaciones de línea germinal individuales o combinaciones de las mismas. En ciertas
modalidades, todos los residuos marco y/o de CDR dentro de los dominios V_H y/o V_L se mutan
de nuevo a los residuos encontrados en la secuencia de línea germinal original de la cual se
derivó el anticuerpo. En otras modalidades, solo ciertos residuos se mutan nuevamente a la
25 secuencia de línea germinal original, por ejemplo, solo los residuos mutados encontrados
dentro de los primeros 8 aminoácidos de FR1 o dentro de los últimos 8 aminoácidos de FR4,
o solo los residuos mutados encontrados dentro de CDR1, CDR2 o CDR3. En otras
modalidades, uno o más de los residuos marco y/o de CDR se mutan en el o los
correspondientes residuos de una secuencia de línea germinal diferente (es decir, una
30 secuencia de línea germinal que es diferente de la secuencia de línea germinal de la cual se
derivó originalmente el anticuerpo). Además, los anticuerpos como se describen en la
presente pueden contener cualquier combinación de dos o más mutaciones de línea germinal
dentro de las regiones marco y/o CDR, por ejemplo, en donde ciertos residuos individuales se
mutan en el correspondiente residuo de una secuencia de línea germinal particular en tanto
35 que ciertos residuos diferentes que difieren de la secuencia de línea germinal original se

mantienen o se mutan en el correspondiente residuo de una secuencia de línea germinal diferente. Una vez obtenido, un anticuerpo y un fragmento de unión a antígeno que contiene una o más mutaciones de línea germinal se pueden probar fácilmente para una o más propiedades deseadas tal como, especificidad de unión mejorada, afinidad de unión incrementada, propiedades biológicas antagónicas o agonistas mejoradas o intensificadas (como pueda ser el caso), inmunogenicidad reducida, etc. En algunas modalidades, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno como se describe en la presente se obtiene de esta manera general.

También se describen en la presente anticuerpos anti-hCACNG1 que comprenden variantes de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR divulgadas en la presente que tienen una o más sustituciones conservadoras. Por ejemplo, algunas modalidades incluyen anticuerpos anti-hCACNG1 que tienen secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR con, por ejemplo, 10 o menos, 8 o menos, 6 o menos, 4 o menos, etc., sustituciones de aminoácidos conservadoras con respecto a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR expuestas en la tabla 1 en la presente.

La frase “anticuerpo biespecífico” incluye un anticuerpo capaz de unirse selectivamente a dos o más epítomos. Los anticuerpos biespecíficos en general comprenden dos cadenas pesadas diferentes, donde cada cadena pesada se une específicamente a un epítomo diferente, ya sea en dos moléculas diferentes (por ejemplo, antígenos) o en la misma molécula (por ejemplo, en el mismo antígeno). Si un anticuerpo biespecífico es capaz de unirse selectivamente a dos epítomos diferentes (un primer epítomo y un segundo epítomo), la afinidad de la primera cadena pesada por el primer epítomo en general será al menos de uno a dos o tres o cuatro órdenes de magnitud menor que la afinidad de la primera cadena pesada por el segundo epítomo, y viceversa. Los epítomos reconocidos por el anticuerpo biespecífico pueden estar en la misma o una diana diferente (por ejemplo, en la misma o una proteína diferente). Los anticuerpos biespecíficos se pueden elaborar, por ejemplo, al combinar cadenas pesadas que reconocen diferentes epítomos del mismo antígeno. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico que codifican para secuencias variables de cadena pesada que reconocen diferentes epítomos del mismo antígeno se pueden fusionar a secuencias de ácido nucleico que codifican para diferentes regiones constantes de cadena pesada, y estas secuencias se pueden expresar en una célula que expresa una cadena ligera de inmunoglobulina. Un anticuerpo biespecífico habitual tiene dos cadenas pesadas, cada una con tres CDR de cadena pesada, seguido de un dominio CH1 (de N-terminal a C-terminal),

una bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3, y una cadena ligera de inmunoglobulina que no confiere especificidad de unión a antígeno pero que se puede asociar con cada cadena pesada, o que se puede asociar con cada cadena pesada y que se puede unir a uno o más de los epítomos unidos por las regiones de unión a antígeno de cadena pesada, o que se puede asociar con cada cadena pesada y permitir la unión o una o ambas de las cadenas pesadas a uno o ambos epítomos.

La frase “cadena pesada” o “cadena pesada de inmunoglobulina” incluye una secuencia de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de cualquier organismo, y a menos que se especifique de otro modo incluye un dominio variable de cadena pesada. Los dominios variables de cadena pesada incluyen tres CDR de cadena pesada y cuatro regiones FR, a menos que se especifique de otro modo. Los fragmentos de cadenas pesadas incluyen CDR, CDR y FR, y combinaciones de las mismas. Una cadena pesada habitual tiene, después del dominio variable (de N-terminal a C-terminal), un dominio CH1, una bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. Un fragmento funcional de una cadena pesada incluye un fragmento que es capaz de reconocer específicamente un antígeno (por ejemplo, reconocer el antígeno con una KD en el intervalo micromolar, nanomolar o picomolar), que es capaz de expresar y secretar desde una célula, y que comprende al menos una CDR.

La frase “cadena ligera” incluye una secuencia de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina de cualquier organismo, y a menos que se especifique de otro modo incluye cadenas ligeras kappa y lambda humanas. Los dominios variables de cadena ligera (VL) habitualmente incluyen tres CDR de cadena ligera y cuatro regiones marco (FR), a menos que se especifique de otro modo. En general, una cadena ligera de longitud completa incluye, desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo, un dominio VL que incluye FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, y un dominio constante de cadena ligera. Las cadenas ligeras que pueden ser útiles incluyen, por ejemplo, aquellas que no se unen selectivamente al primer o segundo antígeno unido selectivamente por la proteína de unión a antígeno. Las cadenas ligeras adecuadas incluyen aquellas que se pueden identificar al examinar las cadenas ligeras más comúnmente empleadas en bibliotecas de anticuerpos existentes (bibliotecas en húmedo o *in silico*), donde las cadenas ligeras no interfieren sustancialmente con la afinidad y/o selectividad de los dominios de unión a antígeno de las proteínas de unión a antígeno. Las cadenas ligeras adecuadas incluyen aquellas que pueden unirse a uno o ambos epítomos que se unen por las regiones de unión a antígeno de la proteína de unión a antígeno.

La frase “dominio variable” incluye una secuencia de aminoácidos de una cadena

ligera o pesada de inmunoglobulina (modificada como se desee) que comprende las siguientes regiones de aminoácidos, en secuencia de N-terminal a C-terminal (a menos que se indique de otro modo): FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Un “dominio variable” incluye una secuencia de aminoácidos capaz de plegarse en un dominio canónico (VH o VL) que tiene una estructura de lámina beta dual en donde las láminas beta se conectan por un enlace de disulfuro entre un residuo de una primera lámina beta y una segunda lámina beta.

La frase “región determinante de complementariedad”, o el término “CDR”, incluye una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico de los genes de inmunoglobulina de un organismo que normalmente (es decir, en un animal tipo silvestre) aparece entre dos regiones marco en una región variable de una cadena ligera o pesada de una molécula de inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo o un receptor de células T). Una CDR se puede codificar, por ejemplo, por una secuencia de línea germinal o una secuencia reordenada o no reordenada, y por ejemplo, por una célula B sin tratamiento previo o madura o una célula T. En algunas circunstancias (por ejemplo, para una CDR3), las CDR se pueden codificar por dos o más secuencias (por ejemplo, secuencias de línea germinal) que no son contiguas (por ejemplo, en una secuencia de ácido nucleico no reordenada) pero son contiguas en una secuencia de ácido nucleico de células B, por ejemplo, como resultado de empalmar o conectar las secuencias (por ejemplo, recombinación V-D-J para formar una CDR3 de cadena pesada).

El término “fragmento de anticuerpo” se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término “fragmento de anticuerpo” incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente de disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un brazo individual de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.* (1989) Nature 241:544-546), que consiste en un dominio VH, (vi) una CDR aislada, y (vii) un scFv, que consiste en los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, unidos por un enlazador sintético para formar una cadena de proteína individual en la cual las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes. También se abarcan otras formas de anticuerpos de cadena individual, tal como diacuerpos bajo el término “anticuerpo” (ver, por ejemplo, Holliger *et al.* (1993) PNAS USA 90:6444-6448; Poljak *et al.* (1994) Structure 2:1121-1123).

La frase “proteína que contiene Fc” incluye anticuerpos, anticuerpos biespecíficos, inmunoadhesinas y otras proteínas de unión que comprenden al menos una porción funcional de una región CH2 y CH3 de inmunoglobulina. Una “porción funcional” se refiere a una región CH2 y CH3 que se puede unir a un receptor Fc (por ejemplo, un FcγR; o un FcRn, es decir, un receptor Fc neonatal), y/o que puede participar en la activación del complemento. Si la región CH2 y CH3 contiene delecciones, sustituciones y/o inserciones u otras modificaciones que la hacen incapaz de unirse a cualquier receptor Fc y también incapaz de activar el complemento, la región CH2 y CH3 no es funcional.

Las proteínas que contienen Fc pueden comprender modificaciones en los dominios de inmunoglobulina, incluso cuando las modificaciones afectan una o más funciones efectoras de la proteína de unión (por ejemplo, modificaciones que afectan la unión a FcγR, unión a FcRn y por lo tanto, la semivida y/o la actividad de CDC). Estas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, las siguientes modificaciones y combinaciones de las mismas, con referencia a la numeración UE de una región constante de inmunoglobulina: 238, 239, 248, 249, 250, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 315, 318, 320, 322, 324, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 342, 344, 356, 358, 359, 360, 361, 362, 373, 375, 376, 378, 380, 382, 383, 384, 386, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 428, 430, 433, 434, 435, 437, 438, y 439.

Por ejemplo, y no a modo de limitación, la proteína de unión es una proteína que contiene Fc y presenta una semivida en suero mejorada (en comparación con la misma proteína que contiene Fc sin las modificaciones mencionadas) y tiene una modificación en la posición 250 (por ejemplo, E o Q); 250 y 428 (por ejemplo, L o F); 252 (por ejemplo, L/Y/F/W o T), 254 (por ejemplo, S o T) y 256 (por ejemplo, S/R/Q/E/D o T); o una modificación en 428 y/o 433 (por ejemplo, L/R/SI/P/Q o K) y/o 434 (por ejemplo, H/F o Y); o una modificación en 250 y/o 428; o una modificación en 307 o 308 (por ejemplo, 308F, V308F) y 434. En otro ejemplo, la modificación puede comprender una modificación 428L (por ejemplo, M428L) y 434S (por ejemplo, N434S); una modificación 428L, 259I (por ejemplo, V259I) y 308F (por ejemplo, V308F); una modificación 433K (por ejemplo, H433K) y 434 (por ejemplo, 434Y); una modificación 252, 254 y 256 (por ejemplo, 252Y, 254T y 256E); una modificación 250Q y 428L (por ejemplo, T250Q y M428L); una modificación 307 y/o 308 (por ejemplo, 308F o 308P).

El término “proteína de unión a antígeno”, como se usa en la presente, se refiere a un polipéptido o proteína (uno o más polipéptidos vueltos complejos en una unidad funcional)

que reconoce específicamente un epítopo en un antígeno, tal como un antígeno específico de célula y/o un antígeno diana como se describe en la presente. Una proteína de unión a antígeno puede ser multiespecífica. El término “multiespecífica” con referencia a una proteína de unión a antígeno significa que la proteína reconoce diferentes epítomos, ya sea en el mismo antígeno o en diferentes antígenos. Una proteína de unión a antígeno multiespecífica como se describe en la presente puede ser un polipéptido multifuncional individual, o puede ser un complejo multimérico de dos o más polipéptidos que se asocian de forma covalente o no covalente entre sí. El término “proteína de unión a antígeno” incluye anticuerpos o fragmentos de los mismos como se describe en la presente que se pueden enlazar a o coexpresar con otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo se puede enlazar funcionalmente (por ejemplo, por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente u de otro modo) a una o más entidades moleculares diferentes, tal como una proteína o fragmento del mismo para producir una molécula de unión a antígeno biespecífica o multiespecífica con una segunda especificidad de unión.

El término “proteína” significa cualquier polímero de aminoácidos que tiene más de aproximadamente 20 aminoácidos enlazados covalentemente mediante enlaces de amida. Las proteínas contienen una o más cadenas de polímero de aminoácidos, en general conocidas en la técnica como “polipéptidos”. Por lo tanto, un polipéptido puede ser una proteína y una proteína puede contener múltiples polipéptidos para formar una biomolécula funcional individual. Los puentes de disulfuro (es decir, entre los residuos de cisteína para formar cistina) pueden estar presentes en algunas proteínas. Estos enlaces covalentes pueden estar dentro de una cadena de polipéptido individual, o entre dos cadenas de polipéptido individuales. Por ejemplo, los puentes disulfuro son esenciales para la estructura y función adecuadas de insulina, inmunoglobulinas, protamina y similares. Para una revisión reciente de la formación de enlaces disulfuro, ver Oka and Bulleid, “Forming disulfides in the endoplasmic reticulum”, 1833(11) Biochim Biophys Acta 2425-9 (2013).

Como se usa en la presente, “proteína” incluye proteínas bioterapéuticas, proteínas recombinantes usadas en investigación o terapia, proteínas Trap y otras proteínas de fusión de Fc, proteínas quiméricas, anticuerpos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanos, anticuerpos biespecíficos, fragmentos de anticuerpo, nanocuerpos, quimeras de anticuerpo recombinante, proteínas de fusión de scFv, citocinas, quimiocinas, hormonas peptídicas y similares. Las proteínas se pueden producir usando sistemas de producción basados en células recombinantes, tal como el sistema de baculovirus de insecto, sistemas de levadura

(por ejemplo, *Pichia* sp.), sistemas de mamífero (por ejemplo, células CHO y derivados de CHO como células CHO-K1). Para una revisión reciente que analiza las proteínas bioterapéuticas y su producción, ver Ghaderi *et al.*, "Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation," 28 Biotechnol Genet Eng Rev. 147-75 (2012).

Como se usa en la presente, el término "epítopo" se refiere a la porción del antígeno que se reconoce por el polipéptido de unión a antígeno multiespecífico. Un antígeno individual (tal como un polipéptido antigénico) puede tener más de un epítopo. Los epítopos se pueden definir como estructurales o funcionales. Los epítopos funcionales son en general un subconjunto de epítopos estructurales y se definen como aquellos residuos que contribuyen directamente a la afinidad de la interacción entre el polipéptido de unión a antígeno y el antígeno. Los epítopos también pueden ser conformacionales, es decir, compuestos de aminoácidos no lineales. En ciertas modalidades, los epítopos pueden incluir determinantes que son agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tal como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, grupos fosforilo o grupos sulfonilo y en ciertas modalidades, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos se retienen habitualmente en la exposición a solventes desnaturizantes, en tanto que los epítopos formados por plegamiento terciario se pierden habitualmente en el tratamiento con solventes desnaturizantes.

El término "dominio" se refiere a cualquier parte de una proteína o polipéptido que tiene una función o estructura particular. Preferentemente, los dominios como se describen en la presente se unen a antígenos diana o específicos de células. Los dominios de unión a antígeno o antígeno diana específicos de célula y similares, como se usan en la presente, incluyen cualquier glucoproteína o polipéptido que se presenta de manera natural, obtenible enzimáticamente, sintético o genéticamente modificado que se une específicamente a un antígeno.

El término "medio cuerpo" o "medio anticuerpo", que se usan indistintamente, se refiere a la mitad de un anticuerpo, que esencialmente contiene una cadena pesada y una cadena ligera. Las cadenas pesadas de anticuerpo pueden formar dímeros, por lo tanto, la cadena pesada de un semicuerpo puede asociarse con la cadena pesada asociada con una molécula diferente (por ejemplo, otro semicuerpo) u otro polipéptido que contiene Fc. Dos dominios Fc ligeramente diferentes se pueden "heterodimerizar" como en la formación de anticuerpos

biespecíficos u otros heterodímeros, -trímeros, -tetrámeros y similares. Ver Vincent y Murini, "Current strategies in antibody engineering: Fc engineering and pH-dependent antigen binding, bispecific antibodies and antibody drug conjugates," 7 Biotechnol. J. 1444-1450 (2012); y Shimamoto *et al.*, "Peptibodies: A flexible alternative format to antibodies," 4(5) 5 MAbs 586-91 (2012).

El término "fragmento variable de cadena simple" o "scFv" incluye un polipéptido de fusión de cadena individual que contiene una región variable de cadena pesada (VH) de inmunoglobulina y una región variable de cadena ligera (VL) de inmunoglobulina. En algunas modalidades, la VH y VL se conectan por una secuencia enlazadora de 10 a 25 aminoácidos. 10 Los polipéptidos ScFv también pueden incluir otras secuencias de aminoácidos, tal como regiones CL o CH1. Las moléculas de ScFv se pueden fabricar por visualización en fagos o se pueden preparar subclonando directamente las cadenas pesada y ligera de un hibridoma o célula B. Ahmad *et al.*, Clinical and Developmental Immunology, volumen 2012, artículo ID 98025 se incorpora en la presente por referencia para métodos de preparación de fragmentos 15 scFv por presentación en fago y clonación de dominio de anticuerpo.

Los términos "tratar" o "tratamiento" de un estado, trastorno o condición incluyen: (1) impedir, retardar, o reducir la incidencia y/o probabilidad de la aparición de al menos un síntoma clínico o subclínico del estado, trastorno o condición que se desarrolla en un sujeto que se puede afligir o predisponer al estado, trastorno o condición pero aún no experimenta 20 o muestra síntomas clínicos o subclínicos del estado, trastorno o condición; o (2) inhibir el estado, trastorno o condición, es decir, detener, reducir o retardar el desarrollo de la enfermedad o una recaída de la misma o al menos un síntoma clínico o subclínico de la misma; o (3) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión del estado, trastorno o condición o al menos uno de sus síntomas clínicos o subclínicos. El beneficio para un sujeto que se va a 25 tratar es estadísticamente significativo o al menos perceptible para el paciente o para el facultativo. En algunas modalidades, el tratamiento comprende métodos en donde las células se extirpan de tal manera que la enfermedad se afecta indirectamente. En ciertas modalidades, el tratamiento comprende agotar las células inmunitarias como un régimen de acondicionamiento hematopoyético antes de la terapia.

30 Un "sujeto" o "paciente" o "individuo" o "animal", como se utiliza en la presente, se refiere a seres humanos, animales veterinarios (por ejemplo, gatos, perros, vacas, caballos, ovejas, cerdos, etc.) y modelos animales experimentales de enfermedades (por ejemplo, ratones, ratas). En una modalidad preferida, el sujeto es un humano.

Como se usa en la presente, el término "efectivo" aplicado a la dosis o cantidad se refiere a la cantidad de un compuesto o composición farmacéutica que es suficiente para dar por resultado una actividad deseada después de la administración a un sujeto en necesidad de la misma. Se debe observar que cuando se administra una combinación de ingredientes
5 activos, la cantidad efectiva de la combinación puede o puede no incluir cantidades de cada ingrediente que habrían sido efectivas si se hubieran administrado individualmente. La cantidad exacta requerida variará de sujeto a sujeto, dependiendo de la especie, edad, y condición general del sujeto, la gravedad de la afección que se está tratando, el fármaco o fármacos particulares empleados, el modo de administración, y similares.

La frase "sal farmacéuticamente aceptable", como se usa en relación con las composiciones de la divulgación, se refiere a cualquier sal adecuada para administración a un paciente. Las sales adecuadas incluyen, pero no se limitan a, aquellas descritas en Berge et al., "Pharmaceutical Salts", *J. Pharm. Sci.*, 1977, 66:1, incorporada en la presente por referencia. Los ejemplos de sales incluyen, pero no se limitan a, sales derivadas de ácido,
15 derivadas de base, orgánicas, inorgánicas, de amina y de metal alcalino o alcalinotérreo, que incluyen, pero no se limitan a, sales de calcio, sales de magnesio, sales de potasio, sales de sodio, sales de ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido
20 benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico y similares. En algunos ejemplos, una carga útil descrita en la presente (por ejemplo, un análogo de rifamicina descrito en la presente) comprende una amina terciaria, donde el átomo de nitrógeno en la amina terciaria es el átomo a través del cual la carga útil se une a un enlazador o un enlazador-separador. En estos casos,
25 la unión a la amina terciaria de la carga útil produce una amina cuaternaria en la molécula de enlazador-carga útil. La carga positiva en la amina cuaternaria se puede equilibrar por un contraión (por ejemplo, cloro, bromo, yodo o cualquier otra porción cargada adecuadamente tal como aquellas descritas en la presente).

Por "que comprende" o "que contiene" o "que incluye" se entiende que al menos el
30 compuesto, elemento, partícula, o paso de método nombrado está presente en la composición o artículo o método, pero no excluye la presencia de otros compuestos, materiales, partículas, o pasos de método, incluso si los otros de estos compuestos, material, partículas, o pasos de método tienen la misma función que lo que se nombra.

Los compuestos de la presente divulgación incluyen aquellos descritos en general en la presente, y se ilustran adicionalmente por las clases, subclases y especies divulgadas en la presente. Como se usa en la presente, las siguientes definiciones se aplicarán a menos que se indique lo contrario. Para propósitos de esta divulgación, los elementos químicos se identifican de acuerdo con la tabla periódica de los elementos, versión CAS, Handbook of Chemistry and Physics, 75ª Ed. Además, los principios generales de la química orgánica se describen en "Organic Chemistry", Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999, y "March's Advanced Organic Chemistry", 5º Ed., Ed.: Smith, M.B. y March, J., John Wiley & Sons, Nueva York: 2001, cuyo contenido completo se incorpora en la presente como referencia.

Como se usa en la presente, el término "alquilo" se da su significado ordinario en la técnica y puede incluir grupos alifáticos saturados, incluidos grupos alquilo de cadena lineal, grupos alquilo de cadena ramificada, grupos cicloalquilo (alíciclicos), grupos cicloalquilo sustituidos con alquilo y grupos alquilo sustituidos con cicloalquilo. En ciertas modalidades, un alquilo de cadena lineal o cadena ramificada tiene aproximadamente 1–20 átomos de carbono en su cadena principal (por ejemplo, C₁–C₂₀ para cadena lineal, C₂–C₂₀ para cadena ramificada), y de manera alternativa, aproximadamente 1–10 átomos de carbono, o aproximadamente 1 a 6 átomos de carbono. En algunas modalidades, un anillo de cicloalquilo tiene de aproximadamente 3–10 átomos de carbono en su estructura de anillo donde estos anillos son monocíclicos o bicíclicos, y de manera alternativa aproximadamente 5, 6 o 7 carbonos en la estructura de anillo. En algunas modalidades, un grupo alquilo puede ser un grupo alquilo inferior, en donde un grupo alquilo inferior comprende 1-4 átomos de carbono (por ejemplo, C₁-C₄ para alquilos inferiores de cadena lineal).

Como se usa en la presente, el término "alquenilo" se refiere a un grupo alquilo, como se define en la presente, que tiene uno o más dobles enlaces.

Como se usa en la presente, el término "alquinilo" se refiere a un grupo alquilo, como se define en la presente, que tiene uno o más triples enlaces.

El término "heteroátomo" significa uno o más de oxígeno, azufre, nitrógeno, fósforo o silicio (incluida, cualquier forma oxidada de nitrógeno, azufre, fósforo o silicio; la forma cuaternizada de cualquier nitrógeno básico o; un nitrógeno sustituible de un anillo heterocíclico).

El término "halógeno" significa F, Cl, Br o I; el término "haluro" se refiere a un radical o

sustituyente de halógeno, específicamente, -F, -Cl, -Br o -I.

El término “aducto”, por ejemplo, “un aducto del grupo B” de la presente divulgación abarca cualquier porción que comprende el producto de una reacción de adición, por ejemplo, una reacción de adición del grupo B’, independientemente de los pasos sintéticos tomados para producir la porción.

El término “unión covalente” significa la formación de un enlace covalente, es decir, un enlace químico que implica compartir uno o más pares de electrones entre dos átomos. El enlace covalente puede incluir diferentes interacciones, incluido pero no limitado a enlace σ , enlace π , enlace metal a metal, interacciones agósticas, enlaces doblados y enlaces de dos electrones de tres centros. Cuando se dice que un primer grupo es “capaz de unirse covalentemente” a un segundo grupo, esto significa que el primer grupo es capaz de formar un enlace covalente con el segundo grupo, directa o indirectamente, por ejemplo, a través del uso de un catalizador o bajo condiciones de reacción específicas. Los ejemplos no limitantes de grupos capaces de unirse covalentemente entre sí pueden incluir, por ejemplo, una amina y un ácido carboxílico (formando un enlace de amida), un dieno y un dienófilo (mediante una reacción de Diels-Alder), y una azida y un alquino (formando un triazol mediante una reacción de 1,3-cicloadición).

Como se describe en la presente, los compuestos de la divulgación pueden contener porciones “opcionalmente sustituidas”. En general, el término “sustituido”, ya sea precedido por el término “opcionalmente” o no, significa que uno o más hidrógenos de la porción designada se reemplazan con un sustituyente adecuado. A menos que se indique de otro modo, un grupo “opcionalmente sustituido” puede tener un sustituyente adecuado en cada posición sustituible del grupo, y cuando más de una posición en cualquier estructura dada se puede sustituir con más de un sustituyente seleccionado de un grupo especificado, el sustituyente puede ser el mismo o diferente en cada posición. Las combinaciones de sustituyentes contempladas por esta divulgación son preferentemente aquellas que dan por resultado la formación de compuestos estables o químicamente factibles. El término “estable”, como se usa en la presente, se refiere a compuestos que no se alteran sustancialmente cuando se someten a condiciones para permitir su producción, detección y en ciertas modalidades, su recuperación, purificación y uso para uno o más de los propósitos divulgados en la presente.

A menos que se señale de otro modo, las estructuras representadas en la presente también pretenden incluir todas las formas isoméricas (por ejemplo, enantioméricas,

diastereoméricas y geométricas (o conformacionales)) de la estructura; por ejemplo, las configuraciones R y S para cada centro asimétrico, isómeros de doble enlace (Z) y (E) e isómeros conformacionales (Z) y (E). Por lo tanto, los isómeros estereoquímicos individuales, así como las mezclas enantioméricas, diastereoméricas y geométricas (o conformacionales) de los presentes compuestos están dentro del alcance de la divulgación.

A menos que se señale de otro modo, todas las formas tautoméricas de los compuestos de la divulgación están dentro del alcance de la divulgación.

Además, a menos que se señale de otro modo, las estructuras representadas en la presente también pretenden incluir compuestos que difieren solo en la presencia de uno o más átomos isotópicamente enriquecidos. Por ejemplo, los compuestos que tienen las presentes estructuras excepto para el reemplazo de hidrógeno por deuterio o tritio, o el reemplazo de un carbono por un carbono enriquecido con ^{11}C o ^{13}C o ^{14}C están dentro del alcance de esta divulgación.

También se va a entender que la mención de uno o más pasos de método no excluye la presencia de pasos de método adicionales o pasos de método intermedios entre aquellos pasos expresamente identificados. De manera similar, también se va a entender que la mención de uno o más componentes en un dispositivo o sistema no excluye la presencia de componentes adicionales o componentes intermedios entre aquellos componentes expresamente identificados.

A menos que se señale de otro modo, todas las formas cristalinas de los compuestos de la divulgación y sales de los mismos también están dentro del alcance de la divulgación. Los compuestos de la divulgación se pueden aislar en diferentes formas amorfas y cristalinas, incluido, sin limitación, formas que son anhidras, hidratadas, no solvatadas o solvatadas. Los hidratos de ejemplos incluyen hemihidratos, monohidratos, dihidratos y similares. En algunas modalidades, los compuestos de la divulgación son anhidros y no solvatados. Por “anhidro” se quiere decir que la forma cristalina del compuesto no contiene esencialmente agua unida en la estructura de red cristalina, es decir, el compuesto no forma un hidrato cristalino.

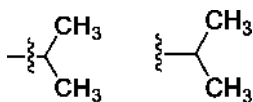
Como se usa en la presente, “forma cristalina” se refiere a una cierta configuración reticular de una sustancia cristalina. Las diferentes formas cristalinas de la misma sustancia habitualmente tienen diferentes redes cristalinas (por ejemplo, celdas unitarias) que se atribuyen a diferentes propiedades físicas que son características de cada una de las formas cristalinas. En algunos casos, diferentes configuraciones de red tienen diferente contenido de

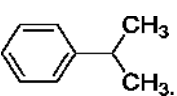
agua o solvente. Las diferentes redes cristalinas se pueden identificar por métodos de caracterización en estado sólido tal como por difracción de rayos X en polvo (PXRD). Otros métodos de caracterización tal como calorimetría diferencial de barrido (DSC), análisis termogravimétrico (TGA), sorción dinámica de vapor (DVS), RMN en estado sólido y similares ayudan además a identificar la forma cristalina, así como a determinar la estabilidad y contenido de solvente/agua.

Las formas cristalinas de una sustancia incluyen tanto formas solvatadas (por ejemplo, hidratadas) como no solvatadas (por ejemplo, anhidras). Una forma hidratada es una forma cristalina que incluye agua en la red cristalina. Las formas hidratadas pueden ser hidratos estequiométricos, donde el agua está presente en la red en una cierta relación agua/molécula tal como para hemihidratos, monohidratos, dihidratos, etc. Las formas hidratadas también pueden ser no estequiométricas, donde el contenido de agua es variable y depende de condiciones externas tal como humedad.

En algunas modalidades, los compuestos de la divulgación están sustancialmente aislados. Por “sustancialmente aislado” se quiere decir que un compuesto particular se aísla al menos parcialmente de las impurezas. Por ejemplo, en algunas modalidades, un compuesto de la divulgación comprende menos de aproximadamente 50 %, menos de aproximadamente 40 %, menos de aproximadamente 30 %, menos de aproximadamente 20 %, menos de aproximadamente 15 %, menos de aproximadamente 10 %, menos de aproximadamente 5 %, menos de aproximadamente 2,5 %, menos de aproximadamente 1 % o menos de aproximadamente 0,5 % de impurezas. Las impurezas en general incluyen cualquier cosa que no sea el compuesto sustancialmente aislado que incluye, por ejemplo, otras formas cristalinas y otras sustancias.

Ciertos grupos, porciones, sustituyentes y átomos se representan con una línea ondulada. La línea ondulada puede intersectar o tapar un enlace o enlaces. La línea ondulada indica el átomo a través del cual se unen los grupos, porciones, sustituyentes o átomos. Por ejemplo, un grupo fenilo que se sustituye con un grupo propilo representado como:



tiene la siguiente estructura: 

The image shows the chemical structure of a phenyl group (a benzene ring) substituted with an isopropyl group. The isopropyl group is represented as a central carbon atom bonded to two methyl groups (CH₃) and the phenyl ring.

Todas las abreviaturas de aminoácidos usadas en esta divulgación son aquellas

aceptadas por la Oficina de Patentes y Marcas de Estados Unidos como se expone en 37 C.F.R. § 1.822 (B)(J).

La secuencia de aminoácidos de un anticuerpo se puede numerar usando cualquier esquema de numeración conocido, incluidos aquellos descritos por Kabat et al., (esquema de numeración “Kabat”); Al-Lazikani et al., 1997, J. Mol. Biol., 273:927-948 (esquema de numeración “Chothia”); MacCallum et al., 1996, J. Mol. Biol. 262:732-745 (esquema de numeración “Contact”); Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol., 2003, 27:55-77 (esquema de numeración “IMGT”); y Honegge and Pluckthun, J. Mol. Biol., 2001, 309:657-70 (esquema de numeración “AHO”). A menos que se especifique de otro modo, el esquema de numeración usado en la presente es el esquema de numeración Kabat. Sin embargo, la selección de un esquema de numeración no se propone que implique diferencias en las secuencias donde no existen, y un experto en la técnica puede confirmar fácilmente una posición de secuencia al examinar la secuencia de aminoácidos de uno o más anticuerpos. A menos que se señale de otro modo, el “esquema de numeración EU” se usa en general cuando se refiere a un residuo en una región constante de cadena pesada de anticuerpo (por ejemplo, como se reporta en Kabat et al., supra).

El término “anticuerpo modificado con glutaminilo” se refiere a un anticuerpo con al menos un enlace covalente de una cadena lateral de glutamina a un compuesto de amina primaria de la presente divulgación. En modalidades particulares, el compuesto de amina primaria se enlaza a través de un enlace de amida en la cadena lateral de glutamina. En ciertas modalidades, la glutamina es una glutamina endógena. En otras modalidades, la glutamina es una glutamina endógena que se hace reactiva por modificación de polipéptidos (por ejemplo, mediante delección, inserción, sustitución o mutación de aminoácidos en el polipéptido). En modalidades adicionales, la glutamina es un polipéptido modificado con una etiqueta que contiene glutamina donante de acilo (por ejemplo, etiquetas peptídicas que contienen glutamina, etiquetas Q o etiqueta de reconocimiento de TGasa).

El término “etiqueta de reconocimiento de TGasa” se refiere a una secuencia de aminoácidos que comprende un residuo de glutamina aceptor y que cuando se incorpora a (por ejemplo, se adjunta a) una secuencia de polipéptidos, bajo condiciones adecuadas, se reconoce por una TGasa y conduce a la reticulación por la TGasa a través de una reacción entre una cadena lateral de aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos y un compañero de reacción. La etiqueta de reconocimiento puede ser una secuencia peptídica que no está presente de manera natural en el polipéptido que comprende la etiqueta de

reconocimiento de TGasa. En algunas modalidades, la etiqueta de reconocimiento de TGasa comprende al menos una Gln. En algunas modalidades, la etiqueta de reconocimiento de TGasa comprende una secuencia de aminoácidos XXQX, en donde X es cualquier aminoácido (por ejemplo, aminoácido convencional Leu, Ala, Gly, Ser, Val, Phe, Tyr, His, Arg, Asn, Glu, Asp, Cys, Gln, Ile, Met, Pro, Thr, Lys o Trp o aminoácido no convencional). En algunas modalidades, la etiqueta donante de acilo que contiene glutamina comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en LLQGG (SEQ ID NO: 270), LLQG (SEQ ID NO: 271), LSLSQG (SEQ ID NO: 272), GGGLLQGG (SEQ ID NO: 273), GLLQG (SEQ ID NO: 274), LLQ, GSPLAQSHGG (SEQ ID NO: 275), GLLQGGG (SEQ ID NO: 276), GLLQGG (SEQ ID NO: 277), GLLQ (SEQ ID NO: 278), LLQLLQGA (SEQ ID NO: 279), LLQGA (SEQ ID NO: 280), LLQYQGA (SEQ ID NO: 281), LLQGSG (SEQ ID NO: 282), LLQYQG (SEQ ID NO: 283), LLQLLQG (SEQ ID NO: 284), SLLQG (SEQ ID NO: 285), LLQLQ (SEQ ID NO: 286), LLQLLQ (SEQ ID NO: 287), y LLQGR (SEQ ID NO: 288). Ver, por ejemplo, WO2012059882, el contenido completo de la cual se incorpora en la presente.

El término “anticuerpo aglucosilado” se refiere a un anticuerpo que no comprende una secuencia de glucosilación que puede interferir con una reacción de transglutaminación, por ejemplo, un anticuerpo que no tiene un grupo sacárido en N297 en una o más cadenas pesadas. En modalidades particulares, una cadena pesada de anticuerpo tiene una mutación N297. En otras palabras, el anticuerpo se muta para que ya no tenga un residuo de asparagina en la posición 297 de acuerdo con el sistema de numeración EU como se divulga por Kabat et al. En modalidades particulares, una cadena pesada de anticuerpo tiene una mutación N297Q o N297D. Este anticuerpo se puede preparar por mutagénesis dirigida al sitio para remover o deshabilitar una secuencia de glucosilación o por mutagénesis dirigida al sitio para insertar un residuo de glutamina en el sitio aparte de cualquier sitio de glucosilación de interferencia o cualquier otra estructura de interferencia. Este anticuerpo también se puede aislar de fuentes naturales o artificiales. Los anticuerpos aglucosilados también incluyen anticuerpos que comprenden un T299 o S298P u otras mutaciones, o combinaciones de mutaciones que dan por resultado una falta de glucosilación.

El término “anticuerpo desglucosilado” se refiere a un anticuerpo en el cual se remueve un grupo sacárido para facilitar la conjugación mediada por transglutaminasa. Los sacáridos incluyen, pero no se limitan a, oligosacáridos N-enlazados. En algunas modalidades, la desglucosilación se realiza en el residuo N297. En algunas modalidades, la remoción de grupos sacáridos se logra enzimáticamente, incluido, pero no limitado a, mediante PNGasa.

Los términos “proteína conjugada” o “anticuerpo conjugado”, como se usan en la presente, se refieren a una proteína o un anticuerpo enlazado covalentemente a una o más porciones químicas. La porción química puede incluir un compuesto de amina de la presente divulgación. Los enlazadores (**L**) y cargas útiles (**D**) adecuados para usarse con la presente divulgación se describen con detalle en la presente. En modalidades particulares, un anticuerpo conjugado que comprende una porción terapéutica es un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC), también referido como un conjugado anticuerpo-carga útil, o un conjugado anticuerpo-enlazador-carga útil.

El término “relación fármaco a anticuerpo” o (DAR) es el número promedio de porciones terapéuticas, por ejemplo, fármacos, conjugadas a un agente de unión de la presente divulgación.

El término “relación enlazador a anticuerpo” o (LAR), también indicada como *l* minúscula en algunas modalidades, es el número promedio de compuestos de amina primaria reactivos conjugados con un agente de unión de la presente divulgación. Estos agentes de unión, por ejemplo, anticuerpos, se pueden conjugar con compuestos de amina primaria que comprenden, por ejemplo, una azida o alquino adecuado. El agente de unión resultante, que se funcionaliza con una azida o un alquino, puede reaccionar posteriormente con una porción terapéutica que comprende la azida o alquino correspondiente mediante la reacción de 1,3-cicloadición.

La frase “cantidad farmacéuticamente aceptable” se refiere a una cantidad efectiva o suficiente para tratar, reducir, aliviar o modular los efectos o síntomas de al menos un problema de salud en un sujeto en necesidad del mismo. Por ejemplo, una cantidad farmacéuticamente aceptable de un anticuerpo o conjugado de anticuerpo-fármaco es una cantidad efectiva para modular una diana biológica usando el anticuerpo o conjugado de anticuerpo-fármaco proporcionado en la presente. Las cantidades farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen, pero no se limitan a, de aproximadamente 0,001 % hasta aproximadamente 10 %, y cualquier cantidad intermedia, tal como aproximadamente 0,01 %, aproximadamente 0,02 %, aproximadamente 0,03 %, aproximadamente 0,04 %, aproximadamente 0,05 %, aproximadamente 0,06 %, aproximadamente 0,07 %, aproximadamente 0,08 %, aproximadamente 0,09 %, aproximadamente 0,1 %, aproximadamente 0,2 %, aproximadamente 0,3 %, aproximadamente 0,4 %, aproximadamente 0,5 %, aproximadamente 0,6 %, aproximadamente 0,7 %, aproximadamente 0,8 %, aproximadamente 0,9 %, aproximadamente 1 %, aproximadamente

2 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 4 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 6 %, aproximadamente 7 %, aproximadamente 8 %, aproximadamente 9 % o aproximadamente 10 % de un anticuerpo o conjugado de fármaco-anticuerpo proporcionado en la presente.

- 5 La frase “pH de reacción” se refiere al pH de una reacción después de que se han adicionado todos los componentes o reactivos de la reacción.

Moléculas de unión a antígeno biespecíficas

Un anticuerpo anti-hCACNG1 y fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en la presente puede ser monoespecífico, biespecífico o multiespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítopos de un polipéptido diana o pueden contener dominios de unión a antígeno específicos para más de un polipéptido diana. Ver, por ejemplo, Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer *et al.*, 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244. Un anticuerpo anti-hCACNG1 y fragmento de unión a antígeno de este como se describe en la presente se puede enlazar a o coexpresar con otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo se puede enlazar funcionalmente (por ejemplo, por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente u de otro modo) a una o más entidades moleculares diferentes, tal como otro anticuerpo o fragmento de anticuerpo para producir un anticuerpo biespecífico o multiespecífico con una segunda o adicional especificidad de unión.

20 El uso de la expresión “anticuerpo anti-hCACNG1” en la presente se propone que incluya tanto anticuerpos anti-hCACNG1 monoespecíficos como anticuerpos biespecíficos que comprenden un brazo de unión a CACNG1 y un brazo de unión a “diana”. Por lo tanto, en la presente se describen anticuerpos biespecíficos en donde un brazo de una inmunoglobulina se une a CACNG1 humano, y el otro brazo de la inmunoglobulina es específico para otra molécula diana. El brazo de unión a CACNG1 puede comprender cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR o CDR como se expone en la tabla 1 en la presente.

En ciertas modalidades, el brazo de unión a CACNG1 se une a CACNG1 humano e induce la internalización de CACNG1 y el anticuerpo unido a este. En ciertas modalidades, el brazo de unión a CACNG1 se une débilmente a CACNG1 humano e induce la internalización de CACNG1 y el anticuerpo unido a este.

En ciertas modalidades de ejemplo, la molécula de unión a antígeno biespecífica es un anticuerpo biespecífico. Cada dominio de unión a antígeno de un anticuerpo biespecífico comprende un dominio variable de cadena pesada (HCVR) y un dominio variable de cadena ligera (LCVR). En el contexto de una molécula de unión a antígeno biespecífica que comprende un primer y un segundo dominio de unión a antígeno (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico), las CDR del primer dominio de unión a antígeno se pueden designar con el prefijo "A1" y las CDR del segundo dominio de unión a antígeno se pueden designar con el prefijo "A2". Por lo tanto, las CDR del primer dominio de unión a antígeno se pueden referir en la presente como A1-HCDR1, A1-HCDR2 y A1-HCDR3; y las CDR del segundo dominio de unión a antígeno se pueden referir en la presente como A2-HCDR1, A2-HCDR2 y A2-HCDR3.

El primer dominio de unión a antígeno y el segundo dominio de unión a antígeno se pueden conectar directa o indirectamente entre sí para formar una molécula de unión a antígeno biespecífica como se describe en la presente. De manera alternativa, el primer dominio de unión a antígeno y el segundo dominio de unión a antígeno se pueden conectar cada uno a un dominio de multimerización separado. La asociación de un dominio de multimerización con otro dominio de multimerización facilita la asociación entre los dos dominios de unión a antígeno, formando de este modo una molécula de unión a antígeno biespecífica. Un "dominio de multimerización" es cualquier macromolécula, proteína, polipéptido, péptido o aminoácido que tiene la capacidad de asociarse con un segundo dominio de multimerización de la misma estructura o constitución o similar. Por ejemplo, un dominio de multimerización puede ser un polipéptido que comprende un dominio de inmunoglobulina C_H3. Un ejemplo no limitante de un componente de multimerización es una porción Fc de una inmunoglobulina (que comprende un dominio C_H2-C_H3), por ejemplo, un dominio Fc de una IgG seleccionada de los isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, así como cualquier alotipo dentro de cada grupo de isotipo.

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas como se describen en la presente habitualmente comprenderán dos dominios de multimerización, por ejemplo, dos dominios Fc que son cada uno individualmente parte de una cadena pesada de anticuerpo separada. El primer y segundo dominios de multimerización pueden ser del mismo isotipo de IgG tal como, por ejemplo, IgG1/IgG1, IgG2/IgG2, IgG4/IgG4. De manera alternativa, el primer y segundo dominio de multimerización pueden ser de diferentes isotipos de IgG tal como, por ejemplo, IgG1/IgG2, IgG1/IgG4, IgG2/IgG4, etc.

En ciertas modalidades, el dominio de multimerización es un fragmento Fc o una secuencia de aminoácidos de 1 a aproximadamente 200 aminoácidos de longitud que contiene al menos un residuo de cisteína. En otras modalidades, el dominio de multimerización es un residuo de cisteína o un péptido corto que contiene cisteína. Otros dominios de multimerización incluyen péptidos o polipéptidos que comprenden o consisten en una cremallera de leucina, un motivo de hélice-bucle o un motivo de hélice superenrollada.

Se puede usar cualquier formato o tecnología de anticuerpo biespecífico para elaborar las moléculas de unión a antígeno biespecíficas como se describe en la presente. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo que tiene una primera especificidad de unión a antígeno se puede enlazar funcionalmente (por ejemplo, por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente u de otro modo) a una o más entidades moleculares diferentes, tal como otro anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene una segunda especificidad de unión a antígeno para producir una molécula de unión a antígeno biespecífica. Los formatos biespecíficos de ejemplo específicos incluyen, sin limitación, por ejemplo, formatos biespecíficos de diacuerpo o basados en scFv, fusiones de IgG-scFv, dominio variable dual (DVD)-Ig, Quadroma, botones en ojales, cadena ligera común (por ejemplo, cadena ligera común con botones en ojales, etc.), CrossMab, CrossFab, (SEED)body, cremallera de leucina, Duobody, IgG1/IgG2, formatos biespecíficos Fab (DAF)-IgG y Mab² de doble acción (ver, por ejemplo, Klein *et al.* 2012, mAbs 4:6, 1-11, y referencias citadas en lo mismo, para una revisión de los formatos anteriores).

En el contexto de moléculas de unión a antígeno biespecíficas como se describe en la presente, los dominios de multimerización, por ejemplo, dominios Fc, pueden comprender uno o más cambios de aminoácidos (por ejemplo, inserciones, deleciones o sustituciones) en comparación con la versión tipo silvestre, que se presenta de manera natural del dominio Fc. Por ejemplo, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas pueden comprender una o más modificaciones en el dominio Fc que dan por resultado un dominio Fc modificado que tiene una interacción de unión modificada (por ejemplo, intensificada o disminuida) entre Fc y FcRn. En una modalidad, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende una modificación en una región C_H2 o C_H3, en donde la modificación incrementa la afinidad del dominio Fc a FcRn en un ambiente ácido (por ejemplo, en un endosoma donde el pH varía de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,0). Los ejemplos no limitantes de estas modificaciones de Fc incluyen, por ejemplo, una modificación en la posición 250 (por ejemplo, E o Q); 250 y 428 (por ejemplo, L o F); 252 (por ejemplo, L/Y/F/W o T), 254 (por ejemplo, S o T) y 256 (por ejemplo, S/R/Q/E/D o T); o una modificación en la posición 428 y/o 433 (por

ejemplo, L/R/S/P/Q o K) y/o 434 (por ejemplo, H/F o Y); o una modificación en la posición 250 y/o 428; o una modificación en la posición 307 o 308 (por ejemplo, 308F, V308F) y 434. En una modalidad, la modificación comprende una modificación 428L (por ejemplo, M428L) y 434S (por ejemplo, N434S); una modificación 428L, 259I (por ejemplo, V259I) y 308F (por ejemplo, V308F); una modificación 433K (por ejemplo, H433K) y 434 (por ejemplo, 434Y); una modificación 252, 254 y 256 (por ejemplo, 252Y, 254T y 256E); una modificación 250Q y 428L (por ejemplo, T250Q y M428L); y una modificación 307 y/o 308 (por ejemplo, 308F o 308P).

También se describen en la presente moléculas de unión a antígeno biespecíficas que comprenden un primer dominio C_H3 y un segundo dominio Ig C_H3, en donde el primer y segundo dominios Ig C_H3 difieren entre sí por al menos un aminoácido, y en donde al menos una diferencia de aminoácido reduce la unión del anticuerpo biespecífico a la proteína A en comparación con un anticuerpo biespecífico que carece de la diferencia de aminoácido. En una modalidad, el primer dominio C_H3 de Ig se une a proteína A y el segundo dominio C_H3 de Ig contiene una mutación que reduce o suprime la unión a proteína A tal como una modificación de H95R (por numeración de exón IMGT; H435R por numeración EU). El segundo C_H3 puede comprender además una modificación de Y96F (por IMGT; Y436F por EU). Ver, por ejemplo, patente de Estados Unidos No. 8,586,713. Modificaciones adicionales que se pueden encontrar dentro del segundo C_H3 incluyen: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M, y V82I (by IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M y V422I por EU) en el caso de anticuerpos de IgG1; N44S, K52N, y V82I (IMGT; N384S, K392N, y V422I por EU) en el caso de anticuerpos de IgG2; y Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q, y V82I (por IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q y V422I por EU) en el caso de anticuerpos de IgG4.

En ciertas modalidades, el dominio Fc puede ser quimérico, que combina secuencias de Fc derivadas de más de un isotipo de inmunoglobulina. Por ejemplo, un dominio Fc quimérico puede comprender parte o la totalidad de una secuencia C_H2 derivada de una región C_H2 de IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4 humana, y parte o la totalidad de una secuencia C_H3 derivada de una IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4 humana. Un dominio Fc quimérico también puede contener una región bisagra quimérica. Por ejemplo, una bisagra quimérica puede comprender una secuencia de "bisagra superior", derivada de una región bisagra de IgG1 humana, una IgG2 humana o una IgG4 humana, combinada con una secuencia de "bisagra inferior", derivada de una región bisagra de IgG1 humana, una IgG2 humana o una IgG4 humana. Un ejemplo particular de un dominio Fc quimérico que se puede incluir en cualquiera de las moléculas de unión a antígeno establecidas en la presente comprende, de extremo n-terminal a extremo C-terminal: [IgG4 C_H1] - [bisagra superior de IgG4] - [bisagra

inferior de IgG2] - [IgG4 CH2] - [IgG4 CH3]. Otro ejemplo de un dominio Fc quimérico que se puede incluir en cualquiera de las moléculas de unión a antígeno expuestas en la presente comprende, de extremo extremo N-terminal a extremo C-terminal: [IgG1 C_H1] - [bisagra superior de IgG1] - [bisagra inferior de IgG2] - [IgG4 CH2] - [IgG1 CH3]. Estos y otros
5 ejemplos de dominios Fc quiméricos que se pueden incluir en cualquiera de las moléculas de unión a antígeno como se describe en la presente se describen en la publicación de Estados Unidos 2014/0243504, publicada el 28 de agosto de 2014, que se incorpora en la presente en su totalidad. Los dominios Fc quiméricos que tienen estas disposiciones estructurales generales y variantes de los mismos, pueden tener unión a receptor de Fc alterada, que a su
10 vez afecta a la función efectora de Fc.

En ciertas modalidades, una cadena pesada de anticuerpo como se describe en la presente comprende una región constante de cadena pesada (CH) que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % idéntica a cualquiera de SEQ ID NO: 243, SEQ ID NO: 244, SEQ ID NO: 245,
15 SEQ ID NO: 246, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 250, SEQ ID NO: 251, SEQ ID NO: 252, SEQ ID NO: 253, SEQ ID NO: 254, SEQ ID NO: 255, SEQ ID NO: 330. En algunas modalidades, la región constante de cadena pesada (CH) comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 243, SEQ ID NO: 244, SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 246, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 248, SEQ
20 ID NO: 249, SEQ ID NO: 250, SEQ ID NO: 251, SEQ ID NO: 252, SEQ ID NO: 253, SEQ ID NO: 254, SEQ ID NO: 255 o SEQ ID NO: 330.

En algunas modalidades, una cadena pesada de anticuerpo como se describe en la presente comprende un dominio Fc que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % idéntica a cualquiera
25 de SEQ ID NO: 256, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 258, SEQ ID NO: 259, SEQ ID NO: 260, SEQ ID NO: 261, SEQ ID NO: 262, SEQ ID NO: 263, SEQ ID NO: 264, SEQ ID NO: 265, SEQ ID NO: 266 o SEQ ID NO: 267. En algunas modalidades, el dominio Fc comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 256, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 258, SEQ ID NO: 259, SEQ ID NO: 260, SEQ ID NO: 261, SEQ ID NO:
30 262, SEQ ID NO: 263, SEQ ID NO: 264, SEQ ID NO: 265, SEQ ID NO: 266 o SEQ ID NO: 267.

Mutaciones de línea germinal

Los anticuerpos anti-hCACNG1 divulgados en la presente pueden comprender una o

más sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos en las regiones marco y/o CDR de los dominios variables de cadena pesada en comparación con las correspondientes secuencias de línea germinal a partir de las cuales se derivaron los anticuerpos.

Un anticuerpo anti-hCACNG1 y un fragmento de unión a antígeno del mismo como se divulga en la presente se pueden derivar de cualquiera de las secuencias de aminoácidos divulgadas en la presente, en donde uno o más aminoácidos dentro de una o más regiones marco y/o de CDR se mutan en el o los correspondientes residuos de la secuencia de línea germinal de la cual se derivó el anticuerpo, o en el o los correspondientes residuos de otra secuencia de línea germinal humana, o en una sustitución conservadora de aminoácidos del o de los correspondientes residuos de línea germinal (estos cambios de secuencia se refieren en la presente colectivamente como “mutaciones de línea germinal”), y que tienen una unión débil o no detectable a un antígeno de CACNG1. Varios de estos anticuerpos de ejemplo que reconocen CACNG1 se describen en la tabla 1 en la presente.

Además, un anticuerpo anti-hCACNG1 y fragmento de unión a antígeno de este como se describe en la presente puede contener cualquier combinación de dos o más mutaciones de línea germinal dentro de las regiones marco y/o CDR, por ejemplo, en donde ciertos residuos individuales se mutan en el correspondiente residuo de una secuencia de línea germinal particular en tanto que ciertos residuos diferentes que difieren de la secuencia de línea germinal original se mantienen o se mutan en el correspondiente residuo de una secuencia de línea germinal diferente. Una vez obtenido, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que contiene una o más mutaciones de línea germinal se puede probar para una o más propiedades deseadas tal como, especificidad de unión mejorada, afinidad de unión débil o reducida, propiedades farmacocinéticas mejoradas o intensificadas, inmunogenicidad reducida, etc. En algunas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno como se describe en la presente se obtiene de esta manera general.

También se describen en la presente anticuerpos anti-hCACNG1 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden variantes de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR divulgadas en la presente que tienen una o más sustituciones conservadoras. Por ejemplo, un anticuerpo anti-hCACNG1 o fragmento de unión a antígeno de este como se describe en la presente puede comprender secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR con, por ejemplo, 10 o menos, 8 o menos, 6 o menos, 4 o menos, etc., sustituciones de aminoácidos conservadoras con respecto a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR expuestas en la tabla 1 en la

presente. Un anticuerpo y fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en la presente puede comprender una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos en las regiones marco y/o CDR de los dominios variables de cadena pesada y ligera en comparación con las correspondientes secuencias de línea germinal a partir de las cuales se derivaron los dominios de unión a antígeno individuales en tanto que se mantiene o mejora la unión débil a no detectable deseada a, por ejemplo, CACNG1. Una “sustitución de aminoácido conservadora” es una en la cual un residuo de aminoácido se sustituye por otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácidos conservadora no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína, es decir, la sustitución de aminoácidos mantiene o mejora la afinidad de unión débil o no detectable deseada en el caso de moléculas de unión anti-hCACNG1. Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen (1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; (2) cadenas laterales alifáticas-hidroxilo: serina y treonina; (3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; (4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano; (5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; (6) cadenas laterales ácidas: aspartato y glutamato, y (7) cadenas laterales que contienen azufre son cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservadores preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparagina-glutamina. De manera alternativa, un reemplazo conservador es cualquier cambio que tiene un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica de PAM250 divulgada en Gonnet *et al.* (1992) Science 256: 1443-1445. Un reemplazo “moderadamente conservador” es cualquier cambio que tenga un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica de PAM250.

También se describen en la presente anticuerpos anti-hCACNG1 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden un dominio de unión a antígeno con una secuencia de aminoácidos de HCVR y/o CDR que es sustancialmente idéntica a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR y/o CDR divulgadas en la presente, en tanto que se mantiene o mejora la afinidad débil deseada por el antígeno de CACNG1. El término “identidad sustancial” o “sustancialmente idéntico”, cuando se refiere a una secuencia de aminoácidos significa que dos secuencias de aminoácidos, cuando se alinean de manera óptima, tal como por los programas GAP o BESTFIT usando ponderaciones de separación predeterminadas, comparten al menos 95 % de identidad de secuencia, incluso más preferentemente al menos 98 % o 99 % de identidad de secuencia. Preferentemente, las

posiciones de residuo, que no son idénticas, difieren por sustituciones de aminoácidos conservadoras. En casos donde dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí por sustituciones conservadoras, el por ciento de identidad de secuencia o grado de similitud se puede ajustar hacia arriba para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. El medio
5 para realizar este ajuste se conocen bien por aquellos expertos en la técnica. *Ver, por ejemplo,*, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331.

La similitud de secuencia para los polipéptidos, que también se refiere como identidad de secuencia, se mide habitualmente usando el software de análisis de secuencia. El software de análisis de proteínas coincide con secuencias similares usando medidas de similitud
10 asignadas a diferentes sustituciones, deleciones y otras modificaciones, incluidas sustituciones de aminoácidos conservadoras. Por ejemplo, el software GCG contiene programas tal como Gap y Bestfit que se pueden usar con parámetros predeterminados para determinar la homología de secuencia o identidad de secuencia entre polipéptidos estrechamente relacionados, tal como polipéptidos homólogos de diferentes especies de
15 organismos o entre una proteína tipo silvestre y una muteína de lo mismo. *Ver, por ejemplo,*, GCG Versión 6,1. Las secuencias de polipéptidos también se pueden comparar usando FASTA usando parámetros predeterminados o recomendados, un programa en GCG versión 6,1. FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) proporciona alineaciones y por ciento de identidad de secuencia de las regiones de la mejor superposición entre las secuencias de
20 consulta y búsqueda (Pearson (2000) *supra*). Otro algoritmo preferido cuando se compara una secuencia como se describe en la presente con una base de datos que contiene un gran número de secuencias de diferentes organismos es el programa de computadora BLAST, especialmente BLASTP o TBLASTN, usando parámetros predeterminados. *Ver, por ejemplo,*
25 , Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 y Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402.

Una vez obtenidos, los dominios de unión a antígeno que contienen una o más mutaciones de línea germinal se probaron para disminuir la afinidad de unión utilizando uno o más ensayos *in vitro*. En general, los anticuerpos que reconocen un antígeno particular se seleccionan habitualmente para su propósito mediante la prueba de afinidad de unión alta (es
30 decir, fuerte) a antígeno.

Los beneficios inesperados, por ejemplo, propiedades farmacocinéticas mejoradas y baja toxicidad para el paciente se pueden lograr a partir de la modificación adicional de los anticuerpos como se describe en la presente por los métodos descritos en la presente.

Propiedades de unión de los anticuerpos

El término “unión” en el contexto de la unión de un anticuerpo, inmunoglobulina, fragmento de unión a anticuerpo o proteína que contiene Fc a, por ejemplo, un antígeno predeterminado, tal como una proteína de superficie celular o fragmento de la misma, típicamente se refiere a una interacción o asociación entre un mínimo de dos entidades o estructuras moleculares, tal como una interacción anticuerpo-antígeno.

Por ejemplo, la afinidad de unión corresponde habitualmente a un valor de K_D de aproximadamente 10^{-7} M o menos, tal como aproximadamente 10^{-8} M o menos, tal como aproximadamente 10^{-9} M o menos cuando se determina por, por ejemplo, tecnología de resonancia de plasmones superficiales (SPR) en un instrumento BIAcore 3000 usando el antígeno como el ligando y el anticuerpo, Ig, fragmento de unión a anticuerpo o proteína que contiene Fc como el analito (o antiligando). Las estrategias de unión basadas en células, tal como ensayos de unión de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), también se usan de forma rutinaria y proporcionan datos de caracterización de unión con respecto a proteínas expresadas en la superficie celular. Los datos de FACS se correlacionan bien con otros métodos tal como unión de competencia de radioligando y SPR (Benedict, CA, *J Immunol Methods*. 1997, 201(2):223-31; Geuijen, CA, et al. *J Immunol Methods*. 2005, 302(1-2):68-77).

Por consiguiente, un anticuerpo anti-hCACNG1 y fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en la presente se une a antígeno predeterminado o molécula de superficie celular (receptor) que tiene una afinidad que corresponde a un valor de K_D que es al menos diez veces menor que su afinidad por unirse a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína). La afinidad de un anticuerpo que corresponde a un valor de K_D que es igual a o menor de diez veces menor que un antígeno no específico se puede considerar unión no detectable, sin embargo, este anticuerpo se puede emparejar con un segundo brazo de unión a antígeno para la producción de un anticuerpo biespecífico como se describe en la presente.

El término “ K_D ” o “KD” en molar (M) se refiere a la constante de equilibrio de disociación de una interacción de anticuerpo-antígeno particular, o la constante de equilibrio de disociación de un anticuerpo o fragmento de unión a anticuerpo que se une a un antígeno. Existe una relación inversa entre K_D y la afinidad de unión, por lo tanto, cuanto menor sea el valor de K_D , mayor, es decir, más fuerte, es la afinidad. Por lo tanto, los términos “mayor afinidad” o “afinidad más fuerte” se refieren a una mayor capacidad para formar una

interacción y por lo tanto, un menor valor de K_D , y a la inversa, los términos “menor afinidad” o “afinidad más débil” se refieren a una menor capacidad para formar una interacción y por lo tanto, un mayor valor de K_D . En algunas circunstancias, una mayor afinidad de unión (o K_D) de una molécula particular (por ejemplo, anticuerpo) a su molécula de pareja interactiva (por ejemplo, antígeno X) en comparación con la afinidad de unión de la molécula (por ejemplo, anticuerpo) a otra molécula de pareja interactiva (por ejemplo, antígeno Y) se puede expresar como una relación de unión determinada al dividir el mayor valor de K_D (menor, o más débil, afinidad) por la menor K_D (mayor, o más fuerte, afinidad), por ejemplo, expresada como 5 veces o 10 veces mayor afinidad de unión, como sea el caso.

10 El término “ k_d ” (seg^{-1} o $1/\text{s}$) se refiere a la constante de velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular, o la constante de velocidad de disociación de un anticuerpo o fragmento de unión a anticuerpo. Este valor también se refiere como el valor $k_{\text{disociación}}$.

15 El término “ k_a ” ($M^{-1} \times \text{seg}^{-1}$ o $1/M$) se refiere a la constante de velocidad de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular, o la constante de velocidad de asociación de un anticuerpo o fragmento de unión a anticuerpo.

20 El término “ K_A ” (M^{-1} o $1/M$) se refiere a la constante de equilibrio de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular, o la constante de equilibrio de asociación de un anticuerpo o fragmento de unión a anticuerpo. La constante de equilibrio de asociación se obtiene al dividir k_a por k_d .

25 El término “ EC_{50} ” o “ EC_{50} ” se refiere a la concentración efectiva media máxima, que incluye la concentración de un anticuerpo que induce una respuesta a mitad de camino entre la línea de base y el máximo después de un tiempo de exposición especificado. La EC_{50} representa esencialmente la concentración de un anticuerpo donde se observa 50 % de su efecto máximo. En ciertas modalidades, el valor de EC_{50} es igual a la concentración de un anticuerpo como se describe en la presente que da la unión semimáxima a células que expresan CACNG1, como se determina, por ejemplo, por un ensayo de unión FACS o un ensayo de luciferasa de activación de receptor de andrógenos. Por lo tanto, se observa una unión reducida o más débil con un valor de concentración efectiva semimáxima o de EC_{50} incrementado.

En una modalidad, la unión disminuida se puede definir como una concentración de anticuerpo EC_{50} incrementada que permite la unión a la cantidad semimáxima de células

diana.

Variantes de secuencia

Un anticuerpo anti-hCACNG1 y fragmento de unión a antígeno como se describe en la presente puede comprender una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos en las regiones marco y/o CDR de los dominios variables de cadena pesada y ligera en comparación con las correspondientes secuencias de línea germinal a partir de las cuales se derivaron los dominios de unión a antígeno individuales. Estas mutaciones se pueden determinar fácilmente al comparar las secuencias de aminoácidos divulgadas en la presente con secuencias de línea germinal disponibles de, por ejemplo, bases de datos de secuencias de anticuerpos públicas. Las moléculas de unión a antígeno como se describen en la presente pueden comprender dominios de unión a antígeno que se derivan de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de ejemplo divulgadas en la presente, en donde uno o más aminoácidos dentro de una o más regiones marco y/o de CDR se mutan en el o los correspondientes residuos de la secuencia de línea germinal de la cual se derivó el anticuerpo, o en el o los correspondientes residuos de otra secuencia de línea germinal humana, o en una sustitución conservadora de aminoácidos del o de los correspondientes residuos de línea germinal (estos cambios de secuencia se refieren en la presente colectivamente como “mutaciones de línea germinal”). Un experto en la técnica, comenzando con las secuencias de región variable de cadena pesada y ligera divulgadas en la presente, puede producir fácilmente numerosos anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprenden una o más mutaciones de línea germinal individuales o combinaciones de las mismas. En ciertas modalidades, todos los residuos marco y/o de CDR dentro de los dominios V_H y/o V_L se mutan de nuevo a los residuos encontrados en la secuencia de línea germinal original de la cual se derivó originalmente el dominio de unión a antígeno. En otras modalidades, solo ciertos residuos se mutan nuevamente a la secuencia de línea germinal original, por ejemplo, solo los residuos mutados encontrados dentro de los primeros 8 aminoácidos de FR1 o dentro de los últimos 8 aminoácidos de FR4, o solo los residuos mutados encontrados dentro de CDR1, CDR2 o CDR3. En otras modalidades, uno o más de los residuos marco y/o de CDR se mutan en el o los correspondientes residuos de una secuencia de línea germinal diferente (es decir, una secuencia de línea germinal que es diferente de la secuencia de línea germinal de la cual se derivó originalmente el dominio de unión a antígeno). Además, los dominios de unión a antígeno pueden contener cualquier combinación de dos o más mutaciones de línea germinal dentro de las regiones marco y/o CDR, por ejemplo, en donde ciertos residuos individuales se mutan en el correspondiente residuo de una secuencia de línea germinal particular en tanto

que ciertos residuos diferentes que difieren de la secuencia de línea germinal original se mantienen o se mutan en el correspondiente residuo de una secuencia de línea germinal diferente. Una vez obtenidos, los dominios de unión a antígeno que contienen una o más mutaciones de línea germinal se pueden probar fácilmente para una o más propiedades
5 deseadas tal como, especificidad de unión mejorada, afinidad de unión incrementada, propiedades biológicas antagónicas o antagónicas mejoradas o intensificadas (como pueda ser el caso), inmunogenicidad reducida, etc. En la presente se describen moléculas de unión a antígeno que comprenden uno o más dominios de unión a antígeno obtenidos de esta manera general.

También se describen en la presente moléculas de unión a antígeno en donde uno o ambos dominios de unión a antígeno comprenden variantes de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR divulgadas en la presente que tienen una o más sustituciones conservadoras. Por ejemplo, las moléculas de unión a antígeno como se describe en la presente pueden comprender un dominio de unión a antígeno que tiene
15 secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR con, por ejemplo, 10 o menos, 8 o menos, 6 o menos, 4 o menos, etc., sustituciones de aminoácidos conservadoras con respecto a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR divulgadas en la presente. Una “sustitución de aminoácido conservadora” es una en la cual un residuo de aminoácido se sustituye por otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral (grupo
20 R) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácidos conservadora no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen (1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; (2) cadenas laterales alifáticas-hidroxilo: serina y
25 treonina; (3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; (4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano; (5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; (6) cadenas laterales ácidas: aspartato y glutamato, y (7) cadenas laterales que contienen azufre son cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservadores preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina,
30 lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparagina-glutamina. De manera alternativa, un reemplazo conservador es cualquier cambio que tiene un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica de PAM250 divulgada en Gonnet *et al.* (1992) Science 256: 1443-1445, incorporada en la presente por referencia. Un reemplazo “moderadamente conservador” es cualquier cambio que tenga un valor no negativo en la matriz de probabilidad
35 logarítmica de PAM250.

Las moléculas de unión a antígeno como se describen en la presente pueden comprender un dominio de unión a antígeno con una secuencia de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR que es sustancialmente idéntica a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR divulgadas en la presente. El término “identidad sustancial” o “sustancialmente idéntico”, cuando se refiere a una secuencia de aminoácidos significa que dos secuencias de aminoácidos, cuando se alinean de manera óptima, tal como por los programas GAP o BESTFIT usando ponderaciones de separación predeterminadas, comparten al menos 95 % de identidad de secuencia, incluso más preferentemente al menos 98 % o 99 % de identidad de secuencia. Preferentemente, las posiciones de residuo, que no son idénticas, difieren por sustituciones de aminoácidos conservadoras. En casos donde dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí por sustituciones conservadoras, el por ciento de identidad de secuencia o grado de similitud se puede ajustar hacia arriba para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. El medio para realizar este ajuste se conocen bien por aquellos expertos en la técnica. *Ver, por ejemplo,*, Pearson (1994) Methods Mol. Biol. 24: 307-331, incorporada en la presente por referencia.

La similitud de secuencia para los polipéptidos, que también se refiere como identidad de secuencia, se mide habitualmente usando el software de análisis de secuencia. El software de análisis de proteínas coincide con secuencias similares usando medidas de similitud asignadas a diferentes sustituciones, deleciones y otras modificaciones, incluidas sustituciones de aminoácidos conservadoras. Por ejemplo, el software GCG contiene programas tal como Gap y Bestfit que se pueden usar con parámetros predeterminados para determinar la homología de secuencia o identidad de secuencia entre polipéptidos estrechamente relacionados, tal como polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos o entre una proteína tipo silvestre y una muteína de lo mismo. *Ver, por ejemplo,*, GCG Versión 6,1. Las secuencias de polipéptidos también se pueden comparar usando FASTA usando parámetros predeterminados o recomendados, un programa en GCG versión 6,1. FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) proporciona alineaciones y por ciento de identidad de secuencia de las regiones de la mejor superposición entre las secuencias de consulta y búsqueda (Pearson (2000) supra). Otro algoritmo preferido cuando se compara una secuencia con una base de datos que contiene un gran número de secuencias de diferentes organismos es el programa de computadora BLAST, especialmente BLASTP o TBLASTN, usando parámetros predeterminados. *Ver, por ejemplo,*, Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 y Altschul *et al.* (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-402, cada una incorporada en la presente por referencia.

Unión dependiente de pH

También se describen en la presente anticuerpos anti-hCACNG1 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos con características de unión dependientes de pH. Por ejemplo, un anti-hCACNG1 como se describe en la presente puede exhibir unión reducida a CACNG1 a pH ácido en comparación con pH neutro. De manera alternativa, los anticuerpos anti-hCACNG1 como se describen en la presente pueden exhibir una unión mejorada a CACNG1 a pH ácido en comparación con pH neutro. La expresión “pH ácido” incluye valores de pH menores que aproximadamente 6,2, por ejemplo, aproximadamente 6,0, 5,95, 5,9, 5,85, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0 o menos. La expresión “pH neutro” significa un pH de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,4. La expresión “pH neutro” incluye valores de pH de aproximadamente 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 y 7,4.

En ciertos casos, “unión reducida... a pH ácido en comparación con pH neutro” se expresa en términos de una relación del valor de K_D del anticuerpo que se une a su antígeno a pH ácido al valor de K_D del anticuerpo que se une a su antígeno a pH neutro (o viceversa). Por ejemplo, se puede considerar que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo exhibe “unión reducida a CACNG1 a pH ácido en comparación con pH neutro” para los propósitos de la descripción en la presente si el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo exhibe una relación K_D ácida/neutra de aproximadamente 3,0 o mayor. En ciertas modalidades de ejemplo, la relación K_D ácida/neutra para un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno como se describe en la presente puede ser aproximadamente 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0, 70,0, 100,0 o mayor.

Los anticuerpos con características de unión dependientes de pH se pueden obtener, por ejemplo, por examen de una población de anticuerpos para reducir (o mejorar) la unión a un antígeno particular a pH ácido en comparación con pH neutro. Además, las modificaciones del dominio de unión a antígeno a nivel de aminoácidos pueden producir anticuerpos con características dependientes de pH. Por ejemplo, al sustituir uno o más aminoácidos de un dominio de unión a antígeno (por ejemplo, dentro de una CDR) con un residuo de histidina, se puede obtener un anticuerpo con unión a antígeno reducida a pH ácido con respecto a pH neutro.

Anticuerpos que comprenden variantes Fc

En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo anti-hCACNG1 y un fragmento de unión a antígeno de este (que incluye una molécula de unión a antígeno multiespecífica y una proteína terapéutica de múltiples dominios que comprende un anticuerpo anti-hCACNG1 o un fragmento de unión a antígeno de este) que comprende un dominio Fc que comprende una o más mutaciones que mejoran o disminuyen la unión de anticuerpo al receptor de FcRn, por ejemplo, a pH ácido en comparación con pH neutro. Por ejemplo, los anticuerpos como se describen en la presente pueden comprender una mutación en la región C_H2 o C_H3 del dominio Fc, en donde la o las mutaciones incrementan la afinidad del dominio Fc a FcRn en un ambiente ácido (por ejemplo, en un endosoma donde el pH varía de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,0). Estas mutaciones pueden dar por resultado un incremento en la semivida en suero del anticuerpo cuando se administra a un animal. Los ejemplos no limitantes de estas modificaciones de Fc incluyen, por ejemplo, una modificación en la posición 250 (por ejemplo, E o Q); 250 y 428 (por ejemplo, L o F); 252 (por ejemplo, L/Y/F/W o T), 254 (por ejemplo, S o T) y 256 (por ejemplo, S/R/Q/E/D o T); o una modificación en la posición 428 y/o 433 (por ejemplo, H/L/R/S/P/Q o K) y/o 434 (por ejemplo, H/F o Y); o una modificación en la posición 250 y/o 428; o una modificación en la posición 307 o 308 (por ejemplo, 308F, V308F) y 434. En una modalidad, la modificación comprende una modificación 428L (por ejemplo, M428L) y 434S (por ejemplo, N434S); una modificación 428L, 259I (por ejemplo, V259I) y 308F (por ejemplo, V308F); una modificación 433K (por ejemplo, H433K) y 434 (por ejemplo, 434Y); una modificación 252, 254 y 256 (por ejemplo, 252Y, 254T y 256E); una modificación 250Q y 428L (por ejemplo, T250Q y M428L); y una modificación 307 y/o 308 (por ejemplo, 308F o 308P).

Por ejemplo, un anticuerpo anti-hCACNG1 y fragmento de unión a antígeno como se describe en la presente puede comprender un dominio Fc que comprende uno o más pares o grupos de mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: 250Q y 248L (por ejemplo, T250Q y M248L); 252Y, 254T y 256E (por ejemplo, M252Y, S254T y T256E); 428L y 434S (por ejemplo, M428L y N434S); y 433K y 434F (por ejemplo, H433K y N434F). Todas las combinaciones posibles de las mutaciones de dominio Fc anteriores, y otras mutaciones dentro de los dominios variables de anticuerpo descritos en la presente, se contemplan dentro de la descripción en la presente.

Características biológicas de los anticuerpos y moléculas de unión a antígeno biespecíficas

En la presente también se describe un anticuerpo y fragmento de unión a antígeno del

mismo que se une a CACNG1 humano con alta, media o baja afinidad, dependiendo del contexto terapéutico y las propiedades de direccionamiento particulares que se deseen. Por ejemplo, en el contexto de una molécula de unión a antígeno biespecífica, en donde un brazo se une a CACNG1 y otro brazo se une a un antígeno diana (por ejemplo, un antígeno asociado a tumor), puede ser deseable que el brazo de unión a antígeno diana se una a antígeno diana con alta afinidad en tanto que el brazo anti-hCACNG1, se une a CACNG1 con solo afinidad moderada o baja. De esta manera, se puede lograr el direccionamiento preferencial de la molécula de unión a antígeno a células que expresan el antígeno diana en tanto que se evita la unión a CACNG1 general/no dirigida y los consiguientes efectos secundarios adversos asociados con la misma.

En la presente también se describen anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno y anticuerpos biespecíficos de los mismos que se unen a CACNG1 humano con afinidad débil (es decir, baja) o incluso no detectable. En algunas modalidades, un anticuerpo y fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en la presente se une a CACNG1 humano (por ejemplo, a 37 °C) con una K_D de más de aproximadamente 100 nM como se mide por resonancia de plasmones superficiales. En algunas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno como se describe en la presente se une a CACNG1 con una K_D de más de aproximadamente 110 nM, al menos 120 nM, más de aproximadamente 130 nM, más de aproximadamente 140 nM, más de aproximadamente 150 nM, al menos 160 nM, más de aproximadamente 170 nM, más de aproximadamente 180 nM, más de aproximadamente 190 nM, más de aproximadamente 200 nM, más de aproximadamente 250 nM, más de aproximadamente 300 nM, más de aproximadamente 400 nM, más de aproximadamente 500 nM, más de aproximadamente 600 nM, más de aproximadamente 700 nM, más de aproximadamente 800 nM, más de aproximadamente 900 nM o más de aproximadamente 1 μ M, o sin afinidad detectable, como se mide por resonancia de plasmones superficiales (por ejemplo, formato de captura de mAb o de captura de antígeno), o un ensayo sustancialmente similar.

Mapeo de epítomos y tecnologías relacionadas

El epítopo en CACNG1 para el cual un anticuerpo anti-hCACNG1, y fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en la presente puede consistir en una secuencia contigua individual de 3 o más (por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más) aminoácidos de una proteína CACNG1. De manera alternativa, el epítopo puede consistir de una pluralidad de aminoácidos no contiguos (o secuencias de aminoácidos)

de CACNG1. El término “epítopo” se refiere a un determinante antigénico que interactúa con un sitio de unión a antígeno específico en la región variable de una molécula de anticuerpo conocida como parátopo. Un antígeno individual puede tener más de un epítopo. Por lo tanto, diferentes anticuerpos pueden unirse a diferentes áreas en un antígeno y pueden tener diferentes efectos biológicos. Los epítomos pueden ser ya sea conformacionales o lineales. Un epítopo conformacional se produce por aminoácidos espacialmente yuxtapuestos de diferentes segmentos de la cadena de polipéptidos lineal. Un epítopo lineal es uno producido por residuos de aminoácidos adyacentes en una cadena de polipéptido. En ciertas circunstancias, un epítopo puede incluir porciones de sacáridos, grupos fosforilo o grupos sulfonilo en el antígeno.

Se pueden usar diferentes técnicas conocidas por personas expertas en la técnica para determinar si un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo “interactúa con uno o más aminoácidos” dentro de un polipéptido o proteína. Las técnicas de ejemplo incluyen, por ejemplo, ensayo de bloqueo cruzado de rutina tal como el descrito en Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), análisis mutacional de escaneo de alanina, análisis de transferencias de péptidos (Reineke, 2004, *Methods Mol Biol* 248:443-463) y análisis de escisión de péptidos. Además, se pueden emplear métodos tal como escisión de epítomos, extracción de epítomos y modificación química de antígenos (Tomer, 2000, *Protein Science* 9:487-496). Otro método que se puede usar para identificar los aminoácidos dentro de un polipéptido con el cual interactúa un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo es el intercambio de hidrógeno/deuterio detectado por espectrometría de masas. En términos generales, el método de intercambio de hidrógeno/deuterio implica etiquetar con deuterio la proteína de interés, seguido por unir el anticuerpo a la proteína etiquetada con deuterio. Después, el complejo de proteína/anticuerpo se transfiere a agua para permitir que el intercambio de hidrógeno-deuterio se presente en todos los residuos, excepto en los residuos protegidos por el anticuerpo (que permanecen etiquetados con deuterio). Después de la disociación del anticuerpo, la proteína diana se somete a escisión de proteasa y análisis de espectrometría de masas, revelando de este modo los residuos etiquetados con deuterio que corresponden a los aminoácidos específicos con los cuales interactúa el anticuerpo. Ver, por ejemplo, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen y Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A. La cristalografía de rayos X del complejo antígeno/anticuerpo también se puede usar para propósitos de mapeo de epítomos.

También se describen en la presente anticuerpos anti-hCACNG1 que se unen al mismo epítopo como cualquiera de los anticuerpos de ejemplo específicos descritos en la

presente (por ejemplo, anticuerpos que comprenden cualquiera de las secuencias de aminoácidos como se expone en la tabla 1 en la presente). Del mismo modo, también se describen en la presente anticuerpos anti-hCACNG1 que compiten por la unión a CACNG1 con cualquiera de los anticuerpos de ejemplo específicos descritos en la presente (por ejemplo, anticuerpos que comprenden cualquiera de las secuencias de aminoácidos como se expone en la tabla 1 en la presente).

Se puede determinar fácilmente si una molécula de unión a antígeno particular (por ejemplo, anticuerpo) o dominio de unión a antígeno de la misma se une al mismo epítipo como, o compite para unión con, una molécula de unión a antígeno de referencia como se describe en la presente al usar los métodos de rutina conocidos en la técnica. Por ejemplo, para determinar si un anticuerpo de prueba se une al mismo epítipo en CACNG1 como una molécula de unión a antígeno biespecífica de referencia como se describe en la presente, primero se permite que la molécula biespecífica de referencia se una a una proteína CACNG1. Después, se valora la capacidad de un anticuerpo de prueba para unirse a la molécula de CACNG1. Si el anticuerpo de prueba es capaz de unirse a CACNG1 después de la unión por saturación con la molécula de unión a antígeno biespecífica de referencia, se puede concluir que el anticuerpo de prueba se une a un epítipo diferente de CACNG1 que la molécula de unión a antígeno biespecífica de referencia. Por otra parte, si el anticuerpo de prueba no es capaz de unirse a la molécula CACNG1 después de la unión por saturación con la molécula de unión a antígeno biespecífica de referencia, entonces el anticuerpo de prueba puede unirse al mismo epítipo de CACNG1 como el epítipo unido por la molécula de unión a antígeno biespecífica de referencia como se describe en la presente. Entonces se puede llevar a cabo experimentación de rutina adicional (por ejemplo, mutación de péptidos y análisis de unión) para confirmar si la carencia de unión observada del anticuerpo de prueba se debe de hecho a la unión al mismo epítipo como la molécula de unión a antígeno biespecífica de referencia o si el bloqueo estérico (u otro fenómeno) es responsable de la carencia de unión observada. Los experimentos de este tipo se pueden realizar usando ELISA, RIA, Biacore, citometría de flujo o cualquier otro ensayo de unión a anticuerpos cuantitativo o cualitativo disponible en la técnica. De acuerdo con algunas modalidades descritas en la presente, dos proteínas de unión a antígeno se unen al mismo epítipo (o se superponen) si, por ejemplo, un exceso de 1, 5, 10, 20 o 100 veces de una proteína de unión a antígeno inhibe la unión de la otra por al menos 50 % pero preferentemente 75 %, 90 % o incluso 99 % como se mide en un ensayo de unión competitivo (ver, por ejemplo, Junghans et al., Cancer Res. 1990:50:1495-1502). De manera alternativa, se considera que dos proteínas de unión a antígeno se unen al mismo epítipo si esencialmente todas las mutaciones de aminoácidos en el antígeno que

reducen o eliminan la unión de una proteína de unión a antígeno reducen o eliminan la unión de la otra. Se considera que dos proteínas de unión a antígeno tienen “epítomos superpuestos” si solo un subconjunto de las mutaciones de aminoácidos que reducen o eliminan la unión de una proteína de unión a antígeno reducen o eliminan la unión de la otra.

5 Para determinar si un anticuerpo o dominio de unión a antígeno del mismo compete por unión con una molécula de unión a antígeno de referencia, la metodología de unión descrita anteriormente se realiza en dos orientaciones: En una primera orientación, se permite que la molécula de unión a antígeno de referencia se una a una proteína CACNG1 bajo condiciones de saturación seguido por valoración de la unión del anticuerpo de prueba a la molécula
10 CACNG1. En una segunda orientación, se permite que el anticuerpo de prueba se una a una molécula CACNG1 bajo condiciones de saturación seguido por valoración de la unión de la molécula de unión a antígeno de referencia a la molécula CACNG1. Si, en ambas orientaciones, solo la primera molécula de unión a antígeno (de saturación) es capaz de unirse a la molécula CACNG1, entonces se concluye que el anticuerpo de prueba y la molécula de
15 unión a antígeno de referencia compiten para unión a CACNG1. Como se apreciará por una persona experta en la técnica, un anticuerpo que compite por unión con una molécula de unión a antígeno de referencia puede no unirse necesariamente al mismo epítopo como el anticuerpo de referencia, pero puede bloquear estéricamente la unión del anticuerpo de referencia al unirse a un epítopo superpuesto o adyacente.

20 Preparación de dominios de unión a antígeno y construcción de moléculas bienespecíficas

Los dominios de unión a antígeno específicos para antígenos particulares se pueden preparar por cualquier tecnología de generación de anticuerpos conocida en la técnica. Una vez obtenidos, dos dominios de unión a antígeno diferentes, específicos para dos antígenos
25 diferentes (por ejemplo, CACNG1 y un antígeno diana), se pueden disponer adecuadamente entre sí para producir una molécula de unión a antígeno bienespecífica como se describe en la presente usando métodos de rutina. (Un análisis de formatos de anticuerpos bienespecíficos de ejemplo que se pueden usar para construir las moléculas de unión a antígeno bienespecíficas como se describe en la presente se proporciona en otra parte de la presente). En ciertas
30 modalidades, uno o más de los componentes individuales (por ejemplo, cadenas pesadas y ligeras) de las moléculas de unión a antígeno como se describe en la presente se derivan de anticuerpos quiméricos, humanizados o completamente humanos. Los métodos para elaborar estos anticuerpos se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, una o más de las cadenas

pesada y/o ligera de las moléculas de unión a antígeno como se describe en la presente se pueden preparar usando tecnología VELOCIMUNE^{MR}. Usando tecnología VELOCIMUNETM (o cualquier otra tecnología generadora de anticuerpos humanos), los anticuerpos quiméricos de alta afinidad contra un antígeno particular (por ejemplo, CACNG1) se aíslan inicialmente con una región variable humana y una región constante de ratón. Los anticuerpos se caracterizan y seleccionan para características deseables, incluida afinidad, selectividad, epítipo, etc. Las regiones constantes de ratón se reemplazan con una región constante humana deseada para generar cadenas pesadas y/o ligeras completamente humanas que se pueden incorporar en las moléculas de unión a antígeno como se describe en la presente.

Los animales genéticamente modificados se pueden usar para elaborar moléculas de unión a antígeno biespecíficas humanas. Por ejemplo, se puede usar un ratón modificado genéticamente que es incapaz de reordenar y expresar una secuencia variable de cadena ligera de inmunoglobulina de ratón endógena, en donde el ratón expresa solo uno o dos dominios variables de cadena ligera humana codificados por secuencias de inmunoglobulina humana enlazadas operativamente al gen constante kappa de ratón en el locus kappa de ratón endógeno. Estos ratones modificados genéticamente se pueden usar para aislar regiones variables de cadena pesada y cadena ligera para producir moléculas de unión a antígeno biespecíficas completamente humanas. Como tal, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas completamente humanas comprenden dos cadenas pesadas diferentes que se asocian con la misma cadena ligera. (*Ver, por ejemplo, , US 2011/0195454*). Completamente humano se refiere a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno o dominio de inmunoglobulina del mismo, que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por un ADN derivado de una secuencia humana en toda la longitud de cada polipéptido del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o dominio de inmunoglobulina del mismo. En algunos casos, la secuencia completamente humana se deriva de una proteína endógena a un humano. En otros casos, la proteína o secuencia de proteína completamente humana comprende una secuencia quimérica en donde cada secuencia componente se deriva de una secuencia humana. En tanto que no se limitan por ninguna teoría, las proteínas quiméricas o secuencias quiméricas se diseñan en general para reducir al mínimo la creación de epítopos inmunogénicos en las uniones de secuencias componentes, por ejemplo, en comparación con cualquier región o dominio de inmunoglobulina humana tipo silvestre.

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas se pueden construir con una cadena pesada que tiene un dominio Fc modificado que anula su unión a proteína A, permitiendo de

este modo un método de purificación que produce una proteína heterodimérica. Ver, por ejemplo, patente de Estados Unidos No. 8,586,713. Como tal, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas comprenden un primer dominio C_H3 y un segundo dominio Ig C_H3, en donde el primer y segundo dominios Ig C_H3 difieren entre sí por al menos un aminoácido, y en donde al menos una diferencia de aminoácido reduce la unión del anticuerpo biespecífico a la proteína A en comparación con un anticuerpo biespecífico que carece de la diferencia de aminoácido. En una modalidad, el primer dominio C_H3 de Ig se une a proteína A y el segundo dominio C_H3 de Ig contiene una mutación/modificación que reduce o suprime la unión a proteína A tal como una modificación de H95R (por numeración de exón IMGT; H435R por numeración EU). El segundo C_H3 puede comprender además una modificación de Y96F (por IMGT; Y436F por EU).

Bioequivalentes

También se describen en la presente moléculas de unión a antígeno que tienen secuencias de aminoácidos que varían de aquellas de las moléculas de ejemplo descritas en la presente pero que retienen la capacidad para unirse a CACNG1. Estas moléculas variantes pueden comprender una o más adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de origen, pero exhiben actividad biológica que es esencialmente equivalente a la de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas descritas.

También se describen moléculas de unión a antígeno que son bioequivalentes a cualquiera de las moléculas de unión a antígeno de ejemplo expuestas en la presente. Dos proteínas de unión a antígeno, o anticuerpos, se consideran bioequivalentes si, por ejemplo, son equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas cuya velocidad y grado de absorción no muestran una diferencia significativa cuando se administran a la misma dosis molar bajo condiciones experimentales similares, ya sea dosis individual o dosis múltiple. Algunas proteínas de unión a antígeno se considerarán equivalentes o alternativas farmacéuticas si son equivalentes en el grado de su absorción pero no en su velocidad de absorción y sin embargo, se pueden considerar bioequivalentes debido a que estas diferencias en la velocidad de absorción son intencionales y se reflejan en el etiquetado, no son esenciales para el logro de concentraciones efectivas de fármacos corporales en, por ejemplo, uso crónico, y se consideran médicamente insignificantes para el producto de fármaco particular estudiado.

En una modalidad, dos proteínas de unión a antígeno son bioequivalentes si no hay diferencias clínicamente significativas en su seguridad, pureza y potencia.

En una modalidad, dos proteínas de unión a antígeno son bioequivalentes si un paciente puede cambiar una o más veces entre el producto de referencia y el producto biológico sin un incremento esperado en el riesgo de efectos adversos, incluido un cambio clínicamente significativo en inmunogenicidad, o efectividad disminuida, en comparación con terapia continua sin este cambio.

En una modalidad, dos proteínas de unión a antígeno son bioequivalentes si ambas actúan por un mecanismo o mecanismos de acción comunes para la condición o condiciones de uso, en la medida en que se conocen estos mecanismos.

La bioequivalencia se puede demostrar por métodos *in vivo* e *in vitro*. Las medidas de bioequivalencia incluyen, por ejemplo, (a) una prueba *in vivo* en humanos u otros mamíferos, en la cual la concentración del anticuerpo o sus metabolitos se mide en sangre, plasma, suero u otro fluido biológico como una función del tiempo; (b) una prueba *in vitro* que se ha correlacionado con y es razonablemente predictiva de los datos de biodisponibilidad *in vivo* de humanos; (c) una prueba *in vivo* en humanos u otros mamíferos en la cual el efecto farmacológico agudo apropiado del anticuerpo (o su diana) se mide como una función del tiempo; y (d) en un ensayo clínico bien controlado que establece seguridad, eficacia o biodisponibilidad o bioequivalencia de una proteína de unión a antígeno.

Las variantes bioequivalentes de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de ejemplo establecidas en la presente se pueden construir, por ejemplo, haciendo diferentes sustituciones de residuos o secuencias o eliminando residuos terminales o internos o secuencias no necesarias para actividad biológica. Por ejemplo, los residuos de cisteína no esenciales para actividad biológica se pueden eliminar o reemplazar con otros aminoácidos para prevenir la formación de puentes de disulfuro intramoleculares innecesarios o incorrectos en la renaturalización. En otros contextos, las proteínas de unión a antígeno bioequivalentes pueden incluir variantes de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de ejemplo establecidas en la presente que comprenden cambios de aminoácidos que modifican las características de glucosilación de las moléculas, por ejemplo, mutaciones que eliminan o remueven la glucosilación.

Selectividad de especies y reactividad cruzada de especies

En algunas modalidades, las moléculas de unión a antígeno como se describen en la presente se unen a CACNG1 humana pero no a CACNG1 de otras especies. También se describen en la presente moléculas de unión a antígeno que se unen a CACNG1 humana y a

CACNG1 de una o más especies no humanas.

En algunas modalidades, las moléculas de unión a antígeno como se describen en la presente que se unen a CACNG1 humana pueden unirse, o no unirse, como pueda ser el caso, a uno o más de CACNG1 de ratón, rata, conejillo de indias, hámster, jerbo, cerdo, gato, 5 perro, conejo, cabra, oveja, vaca, caballo, camello, macaco cangrejero, tití, mano rhesus o chimpancé.

Conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC)

En la presente también se describen conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) que comprenden un anticuerpo anti-hCACNG1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo 10 conjugado a un fármaco, por ejemplo, carga útil o carga molecular, (por ejemplo, una molécula pequeña y/o porción terapéutica, etc.). También se proporcionan anticuerpos anti-hCACNG1, o fragmento de unión a antígeno del mismo, conjugados con una porción terapéutica. En términos generales, los ADC comprenden: $A - [L - P]_y$, en el que A es una molécula de unión a antígeno, por ejemplo, un anticuerpo anti-hCACNG1, o un fragmento del mismo (por 15 ejemplo, un fragmento que comprende al menos una HCDR3 seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCDR3 listadas en la tabla 1), L es un enlazador, P es la carga útil o carga molecular, e y es un número entero de 1 a 30.

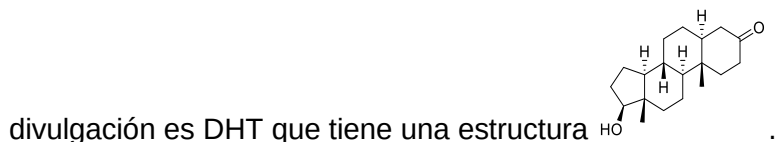
En diferentes modalidades, el ADC comprende un anticuerpo anti-hCACNG1 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende las CDR de una HCVR o una LCVR 20 que tiene las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO expuestas en la tabla 1 (por ejemplo, SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 294 y 314 o 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 301 y 322), o pares HCVR/LCVR específicos (por ejemplo, SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 294/301, y 314/322). En algunos casos, el anticuerpo o fragmento 25 anti-hCACNG1 comprende CDR con las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO o secuencias expuestas en la tabla 1 (por ejemplo, SEQ ID NO: 4-6-8-12-AAS-16, 20-22-24-26-28-ATS-32, 36-38-40-44-KAS-48, 52-54-56-60-GAS-64; 68-70-72-76-AAS-80 84-86-88-92-AAS-96; 100-102-104-108-AAS-112, 116-118-120-124-GA-128; 132-134-136-140-GAS-144; 148-150-152-156-RN-160; 164-166-168-172-DNN-176; 180-182-186-188-GAS-192; y 36- 30 297-299-303-YNS-305; y 316-318-152-324-RNN-326). En algunos casos, el anticuerpo o fragmento anti-hCACNG1 comprende una HCVR y una LCVR que tiene las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO expuestas en la tabla 1 (por ejemplo, SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 294 y 314 y 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154,

170, 186, 301 y 322), o pares de secuencias de aminoácidos específicos (por ejemplo, SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 294/301, y 314/322).

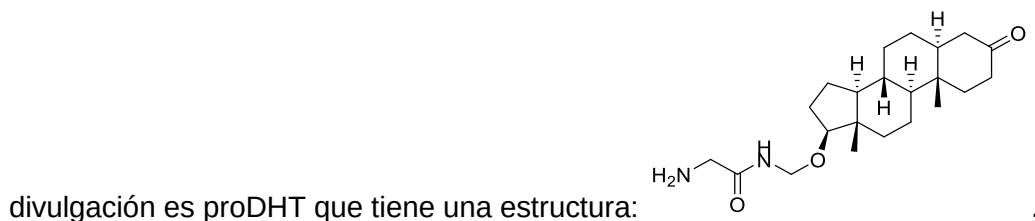
En algunas modalidades, la carga útil o carga molecular comprende una molécula
5 pequeña como agente terapéutico, por ejemplo, un agente terapéutico que puede ser útil para tratar la atrofia muscular o enfermedades musculares genéticas. Una molécula pequeña (SM) puede ingresar fácilmente a las células debido a que tiene un bajo peso molecular (habitualmente, hasta aproximadamente 1 kDa). Una vez dentro de las células, la molécula
10 pequeña puede afectar a otras moléculas, como proteínas, y puede, por ejemplo, provocar que las células cancerosas mueran. Esto es diferente de muchas moléculas de gran peso molecular como los anticuerpos. Un ejemplo de una molécula pequeña se puede conjugar con una proteína de unión a antígeno anti-CACNG1, para formar un conjugado anti-CACNG1:SM.

Los agentes terapéuticos que pueden ser útiles para tratar la atrofia muscular o
15 enfermedades musculares genéticas incluyen testosterona y variantes biológicamente activas de la misma, (por ejemplo, dihidrotestosterona (DHT), o profármacos o derivados de la misma), agonistas del receptor β 2-adrenérgico (por ejemplo, clenbuterol), rapamicina o sus análogos, inhibidores de MAPK o inhibidores de histona desacetilasa, etc.

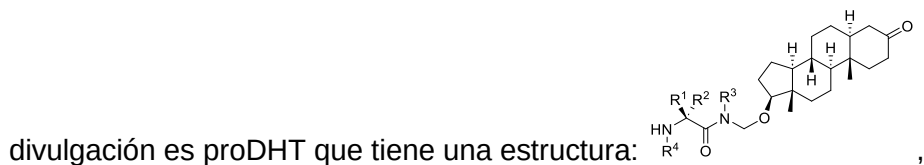
En una modalidad, el agente terapéutico conjugado a los anticuerpos de la presente



20 En una modalidad, el agente terapéutico conjugado con los anticuerpos de la presente



En una modalidad, el agente terapéutico conjugado con los anticuerpos de la presente



en donde R₁ se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo de C₁₋₆, (CH₂)₀₋₆-OH, (CH₂)₀₋₆-NH₂, (CH₂)₀₋₆-NH-C₁₋₃ alquilo, y (CH₂)₀₋₆-N-(C₁₋₃ alquilo)₂;

R₂ se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo de C₁₋₆, (CH₂)₀₋₆-OH, (CH₂)₀₋₆-NH₂, (CH₂)₀₋₆-NH-C₁₋₃ alquilo, y (CH₂)₀₋₆-N-(C₁₋₃ alquilo)₂;

5 R₃ se selecciona del grupo que consiste en H y un alquilo de C₁₋₃, y

R₄ se selecciona del grupo que consiste en H y un alquilo de C₁₋₃.

En la presente también se proporcionan conjugados de anticuerpo-radionúclido (ARC) que comprenden anticuerpos anti-hCACNG1 conjugados con uno o más radionúclidos. Los radionúclidos de ejemplo que se pueden usar en el contexto de este aspecto de la descripción incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, ²²⁵Ac, ²¹²Bi, ²¹³Bi, ¹³¹I, ¹⁸⁶Re, ²²⁷Th, ²²²Rn, ²²³Ra, ²²⁴Ra e ⁹⁰Y.

enlazadores (L)

En ciertas modalidades proporcionadas en la presente, se proporcionan ADC que comprenden, por ejemplo, una proteína de unión a antígeno anti-hCACNG1 conjugada a un agente terapéutico (por ejemplo, cualquiera de los agentes terapéuticos descritos anteriormente) a través de una molécula enlazadora. Los enlazadores son cualquier grupo o porción que enlaza, conecta o une el anticuerpo o proteínas de unión a antígeno descritas en la presente con una porción terapéutica, por ejemplo, agente citotóxico. Los enlazadores adecuados se pueden encontrar, por ejemplo, en *Antibody-Drug Conjugates and Immunotoxins*; Phillips, G. L., Ed.; Springer Verlag: New York, 2013; *Antibody-Drug Conjugates*; Ducry, L., Ed.; Humana Press, 2013; *Antibody-Drug Conjugates*; Wang, J., Shen, W.-C., and Zaro, J. L., Eds.; Springer International Publishing, 2015, los contenidos de cada una incorporados en la presente en su totalidad por referencia. En general, los enlazadores de agente de unión adecuados para los conjugados de anticuerpo descritos en la presente son aquellos que son suficientemente estables para explotar la semivida circulante del anticuerpo y al mismo tiempo, capaces de liberar su carga útil después de la internalización mediada por antígeno del conjugado. Los enlazadores pueden ser escindibles o no escindibles. Los enlazadores escindibles incluyen enlazadores que se escinden por metabolismo intracelular después de la internalización, por ejemplo, escisión mediante hidrólisis, reducción o reacción enzimática. Los enlazadores no escindibles incluyen enlazadores que liberan una carga útil unida mediante degradación lisosomal del anticuerpo

después de internalización. Los enlazadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, enlazadores lábiles a ácido, enlazadores lábiles a hidrólisis, enlazadores enzimáticamente escindibles, enlazadores lábiles a reducción, enlazadores auto-inmolativos y enlazadores no escindibles. Los enlazadores adecuados también incluyen, pero no se limitan a, aquellos que son o comprenden péptidos, glucurónidos, tioéteres de succinimida, unidades de polietilenglicol (PEG), hidrazonas, unidades de mal-caproilo, unidades de dipéptidos, unidades de valina-citrulina y unidades de para-aminobencilo (PAB).

Cualquier molécula enlazadora o tecnología enlazadora conocida en la técnica se puede usar para crear o construir un ADC de la presente descripción. En ciertas modalidades, el enlazador es un enlazador escindible. De acuerdo con otras modalidades, el enlazador es un enlazador no escindible. Los enlazadores de ejemplo que se pueden usar en el contexto de la presente divulgación incluyen enlazadores que comprenden o consisten de, por ejemplo, MC (6-maleimidocaproilo), MP (maleimidopropanoilo), val-cit (valina-citrulina), val-ala (valina-alanina), val-gly (valina-glicina), sitio dipéptido en enlazador escindible por proteasa, ala-phe (alanina-fenilalanina), sitio dipéptido en enlazador escindible por proteasa, PAB (p-aminobenciloxycarbonilo), SPP (N-succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato), SMCC (N-succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1 carboxilato), SIAB (N-succinimidil (4-yodo-acetil)aminobenzoato) y variantes y combinaciones de los mismos. Se proporcionan ejemplos adicionales de enlazadores que se pueden usar en el contexto de la presente divulgación, por ejemplo, en US 7,754,681 y en Ducry, Bioconjugate Chem., 2010, 21:5-13, y las referencias citadas en la misma, el contenido de la cual se incorpora por referencia en la presente en su totalidad.

En ciertas modalidades, los enlazadores son estables en condiciones fisiológicas. En ciertas modalidades, los enlazadores son escindibles, por ejemplo, capaces de liberar al menos la porción de carga útil en la presencia de una enzima o en un intervalo o valor de pH particular. En algunas modalidades, un enlazador comprende una porción escindible por enzima. Las porciones escindibles por enzima ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, enlaces peptídicos, enlaces de éster, hidrazonas y enlaces de disulfuro. En algunas modalidades, el enlazador comprende un enlazador escindible por cathepsina.

En algunas modalidades, el enlazador comprende una porción no escindible.

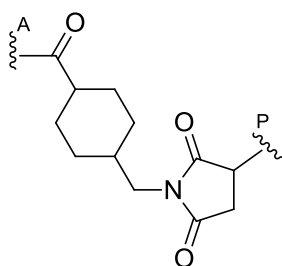
Los enlazadores adecuados también incluyen, pero no se limitan a, aquellos que se unen químicamente a dos residuos de cisteína de un agente de unión individual, por ejemplo, anticuerpo. Estos enlazadores pueden servir para imitar los enlaces de disulfuro del

anticuerpo que se interrumpen como resultado del proceso de conjugación.

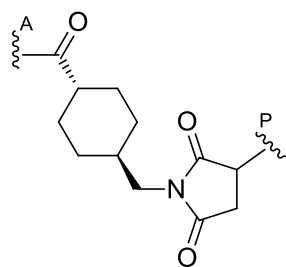
En algunas modalidades, el enlazador comprende uno o más aminoácidos. Los aminoácidos adecuados incluyen aminoácidos naturales, no naturales, estándar, no estándar, proteinogénicos, no proteinogénicos y L- o D- α aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador comprende alanina, valina, glicina, leucina, isoleucina, metionina, triptófano, fenilalanina, prolina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, histidina o citrulina, un derivado de los mismos o una combinación de los mismos. En ciertas modalidades, una o más cadenas laterales de los aminoácidos se enlazan a un grupo de cadena lateral, descrito más adelante. En algunas modalidades, el enlazador comprende valina y citrulina. En algunas modalidades, el enlazador comprende lisina, valina y citrulina. En algunas modalidades, el enlazador comprende lisina, valina y alanina. En algunas modalidades, el enlazador comprende valina y alanina.

En algunas modalidades, el enlazador comprende un grupo autoinmolativo. El grupo autoinmolativo puede ser cualquier grupo conocido por aquellos expertos. En modalidades particulares, el grupo autoinmolativo es *p*-aminobencilo (PAB), o un derivado del mismo. Los derivados útiles incluyen *p*-aminobenciloxicarbonilo (PABC). Aquellos expertos en la técnica reconocerán que un grupo autoinmolativo es capaz de llevar a cabo una reacción química que libera los átomos restantes de un enlazador de una carga útil.

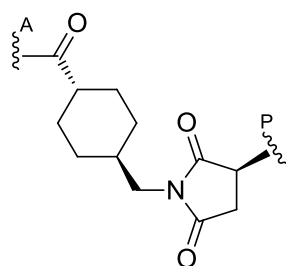
En algunas modalidades, el enlazador es:



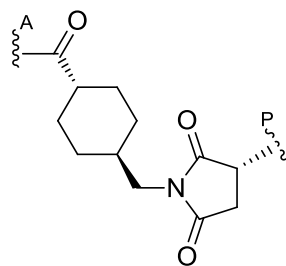
en donde ξ^A es un enlace al anticuerpo o proteína de unión a antígeno (por ejemplo, mediante residuo de lisina) y ξ^P es un enlace a la carga útil terapéutica (por ejemplo, testosterona o una variante biológicamente equivalente de la misma). En algunas modalidades, el enlazador es:



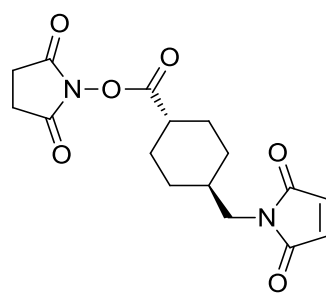
en donde $\begin{array}{c} \text{A} \\ \text{---} \end{array}$ es un enlace al anticuerpo o proteína de unión a antígeno (por ejemplo, mediante residuo de lisina) y $\begin{array}{c} \text{P} \\ \text{---} \end{array}$ es un enlace a una carga útil terapéutica (por ejemplo, testosterona o una variante biológicamente equivalente de la misma). En ciertas modalidades, el enlazador es:



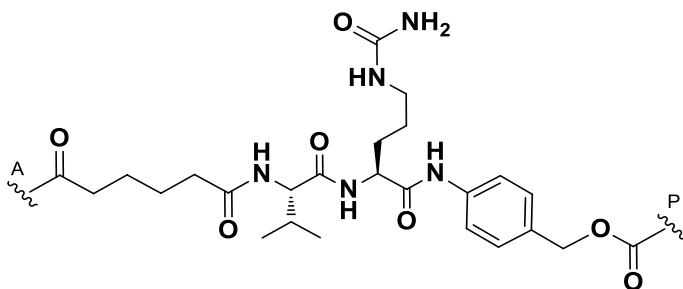
En ciertas modalidades, el enlazador es:



En algunas modalidades, el enlazador se deriva de maleimidimetil-4-trans-ciclohexanocarboxisuccinato:



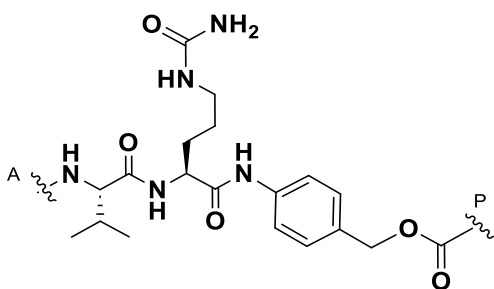
En algunas modalidades, el enlazador es:



en donde ξ^A es un enlace al anticuerpo o proteína de unión a antígeno (por ejemplo, mediante residuo de lisina) y ξ^P es un enlace a carga útil terapéutica (por ejemplo, testosterona o una variante biológicamente equivalente de la misma).

5

En algunas modalidades, el enlazador es:



en donde ξ^A es un enlace al anticuerpo o proteína de unión a antígeno (por ejemplo, mediante residuo de lisina) y ξ^P es un enlace a carga útil terapéutica (por ejemplo, testosterona o una variante biológicamente equivalente de la misma).

10

La presente divulgación comprende ADC en los que un enlazador conecta una proteína de unión a antígeno anti-hCACNG1 como se describe en la presente a un agente terapéutico a través de una unión en un aminoácido particular dentro del anticuerpo o molécula de unión a antígeno. Uniones de aminoácidos de ejemplo que se pueden usar en el contexto de este aspecto, por ejemplo, lisina (ver, por ejemplo, US 5,208,020; US 2010/0129314; Hollander *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 2008, 19:358-361; WO 2005/089808; US 5,714,586; y US 2013/0101546), cisteína (ver, por ejemplo, US 2007/0258987; WO 2013/055993; WO 2013/055990; WO 2013/053873; WO 2013/053872; WO 2011/130598; US 2013/0101546; y US 7,750,116), selenoistéina (ver, por ejemplo, WO 2008/122039; y Hofer *et al.*, *Proc. Natl.*

15

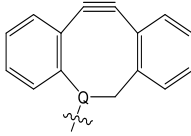
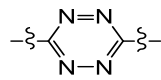
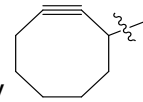
Acad. Sci., USA, 2008, 105:12451-12456), formil glicina (ver, por ejemplo, Carrico *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 2007, 3:321-322; Agarwal *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2013, 110:46-51, y Rabuka *et al.*, *Nat. Protocols*, 2012, 10:1052-1067), aminoácidos no naturales (ver, por ejemplo, WO 2013/068874 y WO 2012/166559) y aminoácidos ácidos (ver, por ejemplo, WO 2012/05982). Los enlazadores también se pueden conjugar a una proteína de unión a antígeno mediante unión a carbohidratos (ver, por ejemplo, US 2008/0305497, WO 2014/065661, y Ryan *et al.*, *Food & Agriculture Immunol.*, 2001, 13:127-130) y enlazadores de disulfuro (ver, por ejemplo, WO 2013/085925, WO 2010/010324, WO 2011/018611 y Shaunak *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 2006, 2:312-313). Las técnicas de conjugación específicas de sitio también se pueden emplear para dirigir la conjugación a residuos particulares del anticuerpo o proteína de unión a antígeno (ver, por ejemplo, Schumacher *et al. J Clin Immunol* (2016) 36(Suppl 1): 100). Las técnicas de conjugación específicas de sitio incluyen, pero no se limitan a conjugación de glutamina mediante transglutaminasa (ver, por ejemplo, Schibli, *Angew Chemie Inter Ed.* 2010, 49 ,9995). En algunas modalidades, un residuo de un anticuerpo como se describe en la presente, por ejemplo, un residuo en una región constante de cadena pesada del anticuerpo, se puede sustituir con una glutamina para facilitar adicionalmente la conjugación de glutamina a través de transglutaminasa. Como un ejemplo no limitante, una región constante de cadena pesada humana se puede modificar con la sustitución N180Q que se encuentra en la secuencia de la región constante de cadena pesada de IgG1 humana como se expone en SEQ ID NO: 269. Esta sustitución proporciona un total de 4 glutaminas para la conjugación por transglutaminasa.

En un aspecto de la presente divulgación, el enlazador (L) tiene la siguiente estructura:

-L1-B-L2-, en donde:

L1 es una primera unidad enlazadora unida covalentemente a la proteína de unión a antígeno;

B está ausente o una unidad que comprende al menos un aducto del grupo B', donde

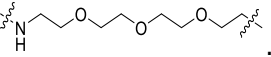
el grupo B' se selecciona de $-N_3$, $-\xi \equiv \xi -$, ; ; y , donde Q es C o N;

L2 está ausente o una segunda unidad enlazadora unida covalentemente a la unidad B mediante al menos un grupo B'', en donde el grupo B' y el grupo B'' forman el al menos un

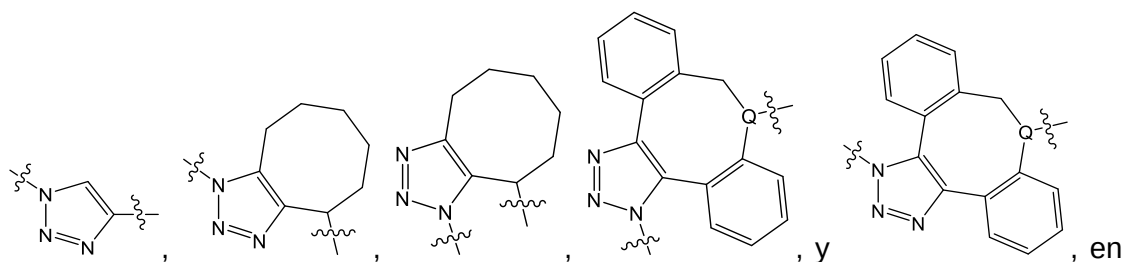
aducto,

siempre que cuando B esté ausente, L2 también esté ausente y L1 se una covalentemente al agente terapéutico, y cuando L2 esté presente, L2 se una covalentemente al agente terapéutico.

- 5 En algunas modalidades, L1 comprende alquilo de C₁₋₆, fenilo, -NH-, -C(O)-, -(CH₂)_u-NH-C(O)-, -(CH₂)_u-C(O)-NH-, -(CH₂-CH₂-O)_v-, -(CH₂)_u-(O-CH₂-CH₂)_v-C(O)-NH-, una unidad peptídica que comprende de 2 a 4 aminoácidos o combinaciones de los mismos, cada uno de los cuales se puede sustituir opcionalmente con uno o más de -S-, -S(O₂)-, -C(O)-, -C(O₂)-, y CO₂H, en donde los subíndices u y v son independientemente un número entero de 1 a 8.

- 10 En una modalidad, L1 es .

En algunas modalidades, B tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en:



donde Q es C o N.

- 15 En algunas modalidades, L2 tiene una estructura:

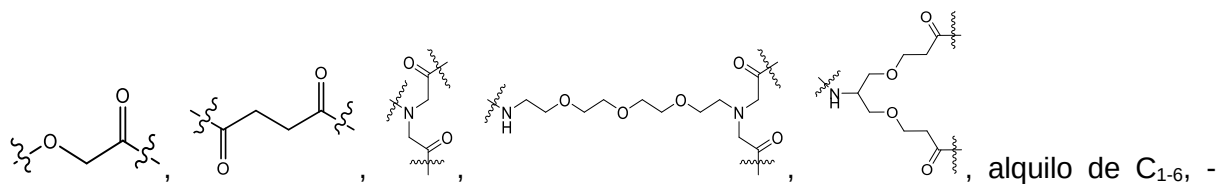
-SP1-AA-SP2- (L2), en donde:

SP1 está ausente o una primera unidad separadora;

AA está ausente o es una unidad peptídica que comprende de 2 a 4 aminoácidos;

- 20 SP2 está ausente o una segunda unidad separadora unida covalentemente al agente terapéutico.

En algunas modalidades, SP1 está ausente o se selecciona del grupo que consiste en

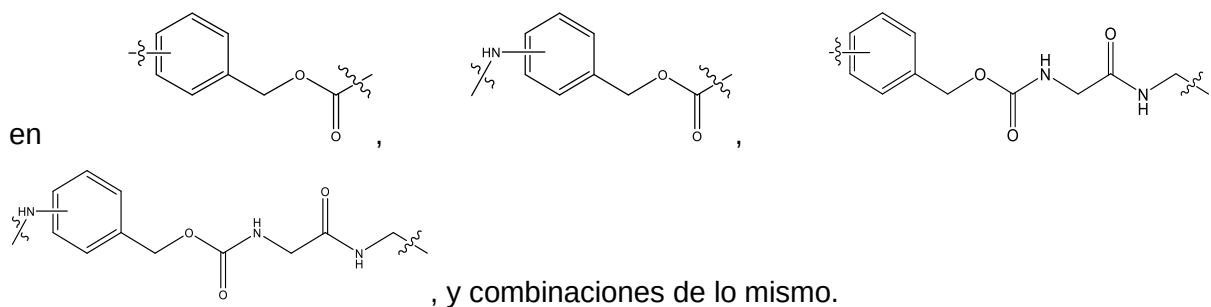


, alquilo de C₁₋₆, - (CH₂-CH₂-O)_v-, -(CH₂-CH₂-O)_v-(CH₂)_u-, -(CH₂-CH₂-O)_v-(CH₂)_u-C(O), -O-CH₂-C(O)-NH-, -O-CH₂-C(O)-NH-(CH₂-CH₂-O)_v-(CH₂)_u-, -O-CH₂-C(O)-NH-(CH₂-CH₂-O)_v-(CH₂)_u-C(O)-NH-, -NH-, -C(O)-, -NH-C(O)-, -NH-(CH₂)_u-, -NH-(CH₂)_u-C(O)-, -NH-(CH₂-CH₂-O)_v-, -NH-(CH₂-CH₂-O)_v-C(O)-, -NH-(CH₂-CH₂-O)_v-(CH₂)_u-, -NH-(CH₂-CH₂-O)_v-(CH₂)_u-C(O)-, -(CH₂)_u-NH-C(O)-, -NH-(CH₂)_u-NH-C(O)-, -NH-(CH₂)_u-C(O)-NH-, o combinaciones de los mismos; en donde los subíndices u y v son independientemente un número entero de 1 a 8;

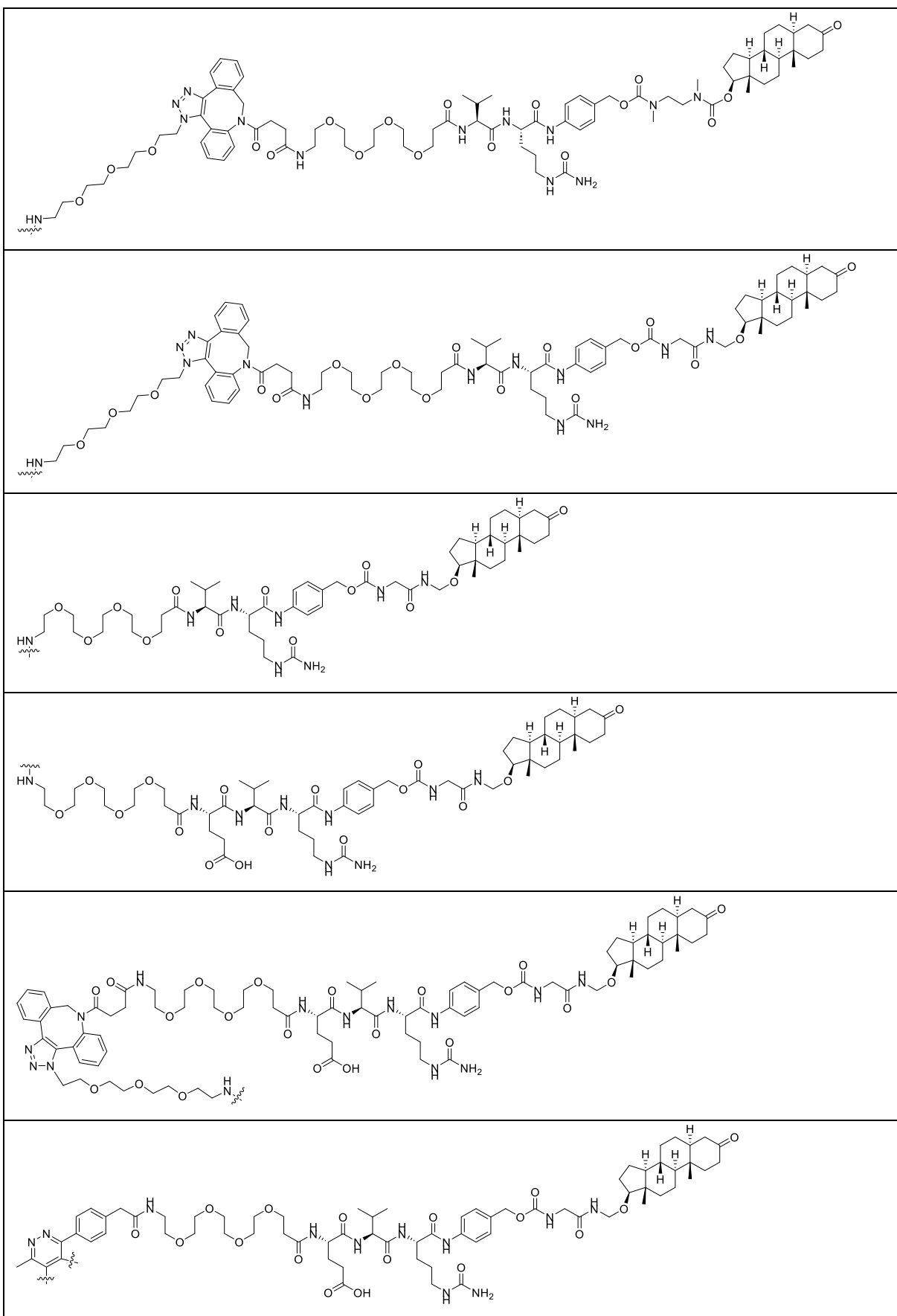
En algunas modalidades, la AA es una unidad peptídica que comprende de 2 a 4 aminoácidos seleccionados de glicina, valina, fenilalanina, prolina, ácido glutámico, lisina, N,N-dipropilisina, fenilalanina y citrulina, y combinaciones de los mismos.

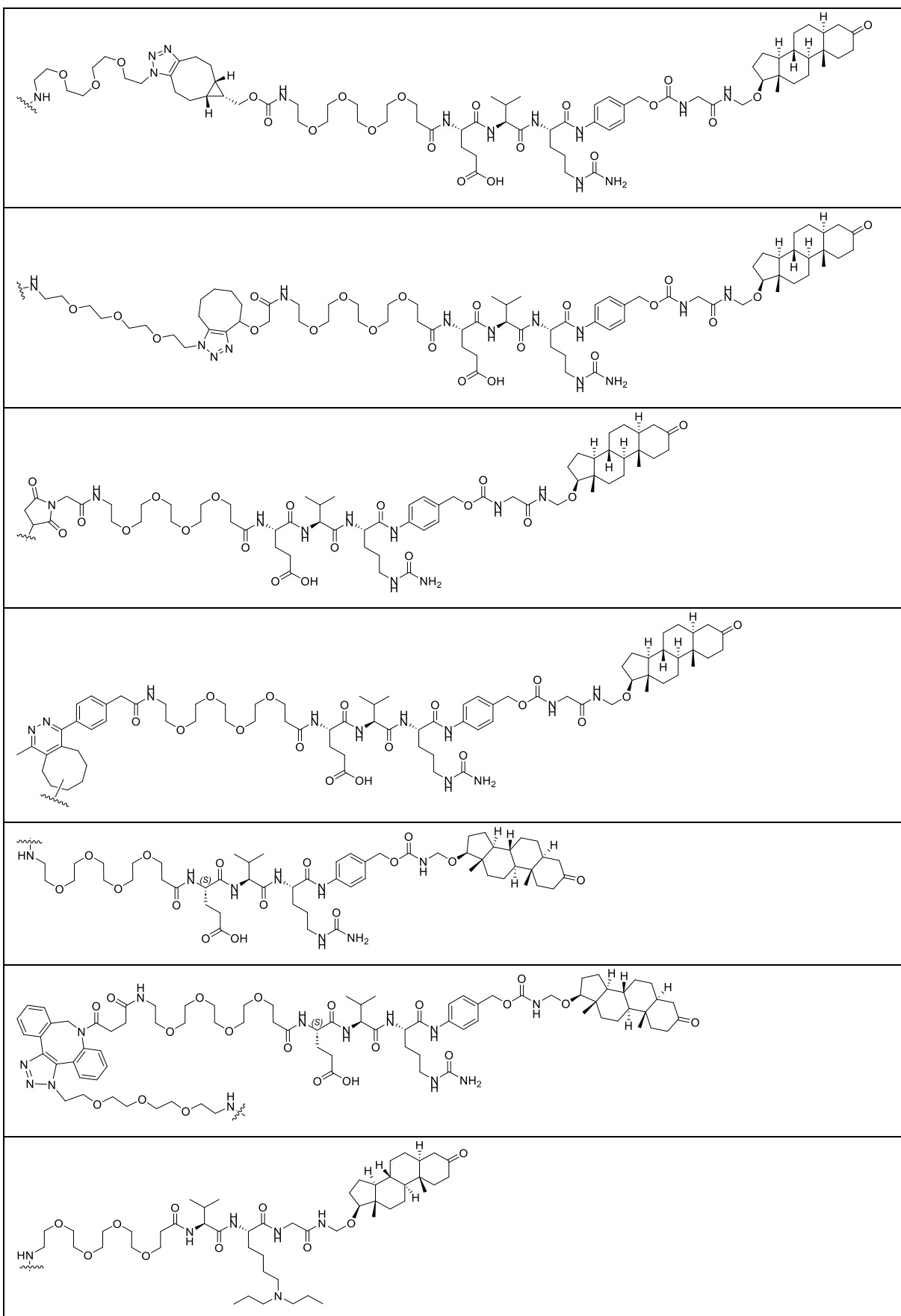
En algunas modalidades, la AA es valina-citrulina, valina-alanina, valina-lisina, valina-N,N-dipropil lisina, fenilalanina-lisina, glicina-glicina-glicina (GGG), glicina-glicina-glicina (GGGG (SEQ ID NO: 289)), glicina-glicina-fenilalanina (GGF), glicina-glicina-fenilalanina-glicina (GGFG (SEQ ID NO: 290)), ácido L-glutámico-valina-citrulina (^LEVC) y ácido D-glutámico-valina-citrulina (^DEVC).

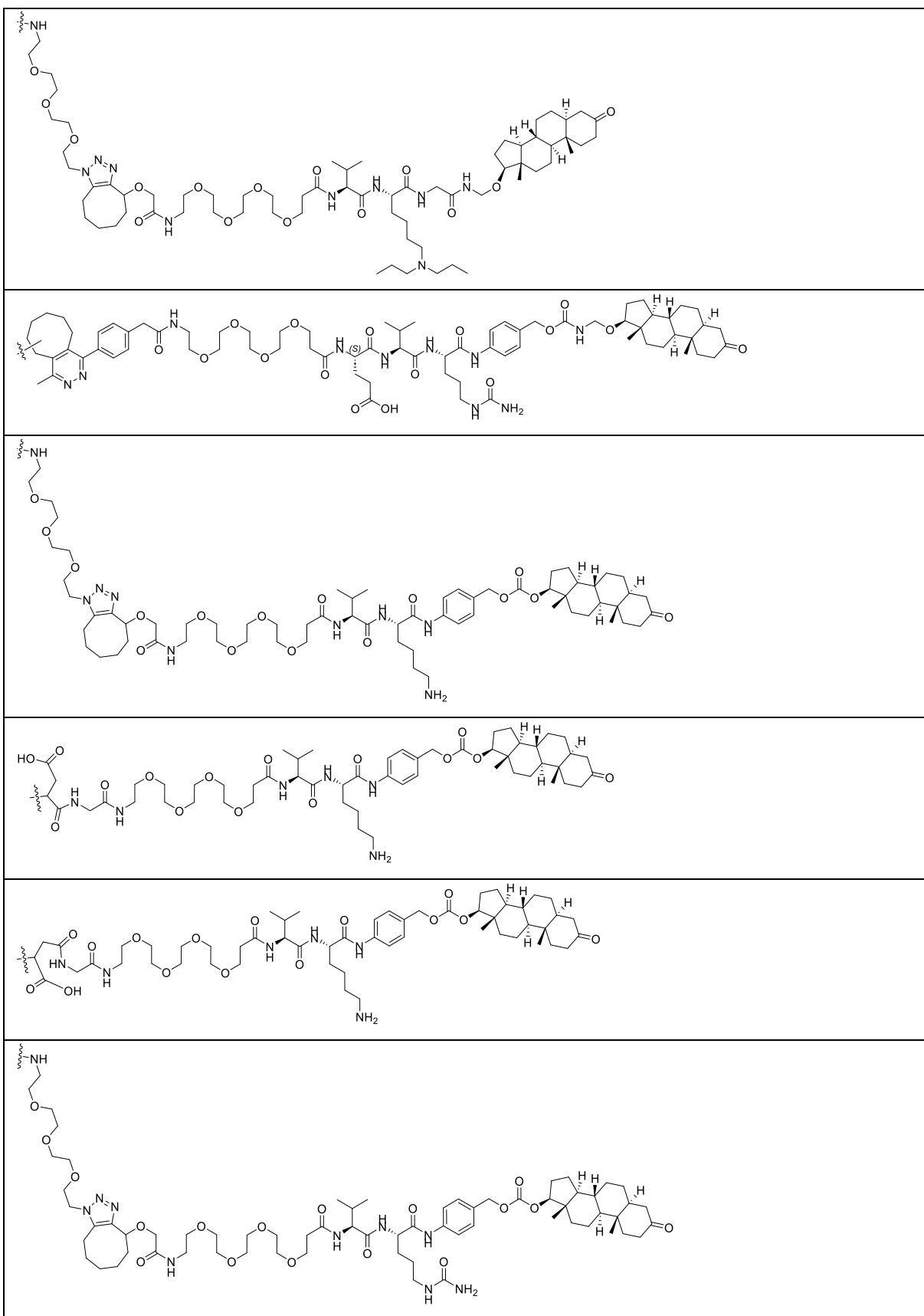
En algunas modalidades, el SP2 está ausente o se selecciona del grupo que consiste

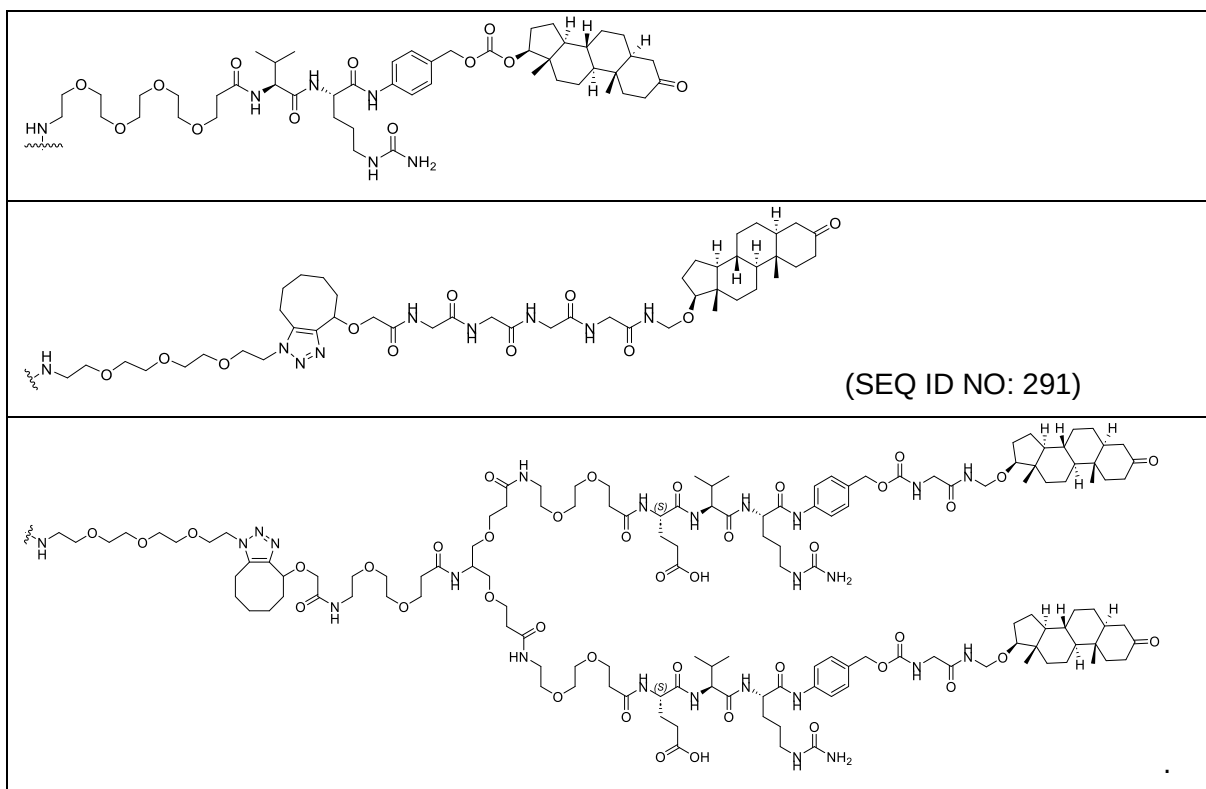


En algunas modalidades, el enlazador-agente terapéutico (L-P) tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en:







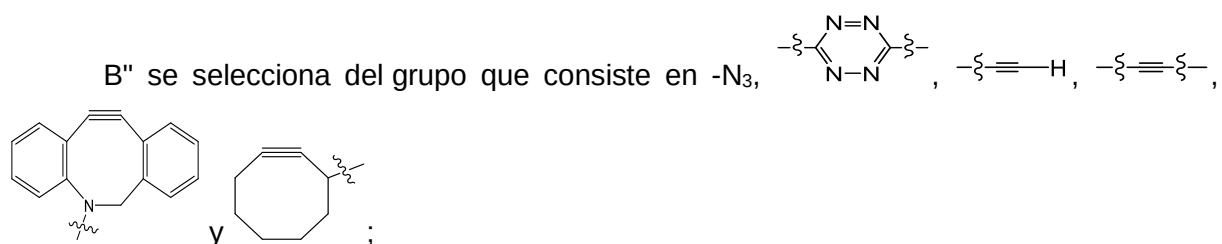


En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula (L2-P) o (L2'-P):

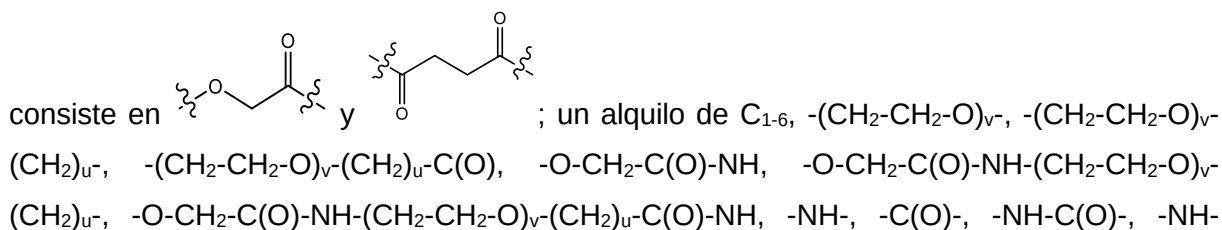
B"-SP1-AA-SP2-P (L2-P),

H₂N-SP1-AA-SP2-P)_p (L2'-P),

5 o una sal farmacéuticamente aceptable de lo mismo, en donde:



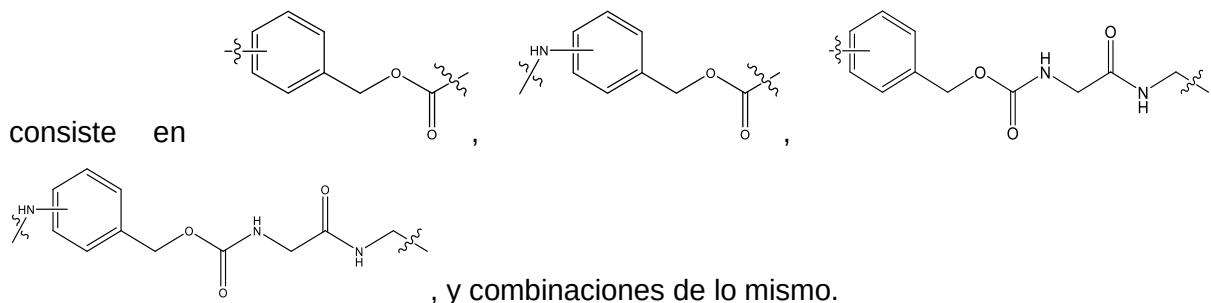
SP1 está ausente o es una primera unidad separadora seleccionada del grupo que



$(\text{CH}_2)_u$ -, $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_u-\text{C}(\text{O})$ -, $-\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_v$ -, $-\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_v-\text{C}(\text{O})$ -, $-\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_v$ -, $(\text{CH}_2)_u$ -, $-\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_v-(\text{CH}_2)_u-\text{C}(\text{O})$ -, $-(\text{CH}_2)_u-\text{NH}-\text{C}(\text{O})$ -, $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_u-\text{NH}-\text{C}(\text{O})$ -, $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_u-\text{C}(\text{O})-\text{NH}$ -, o combinaciones de los mismos; en donde los subíndices u y v son independientemente un número entero de 1 a 8;

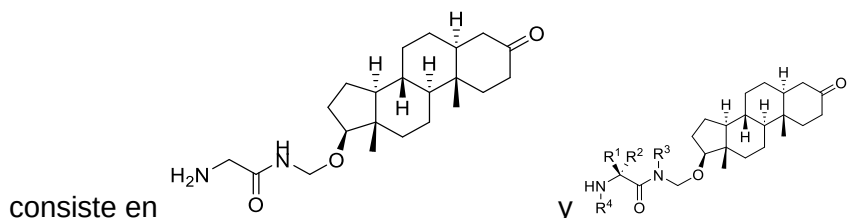
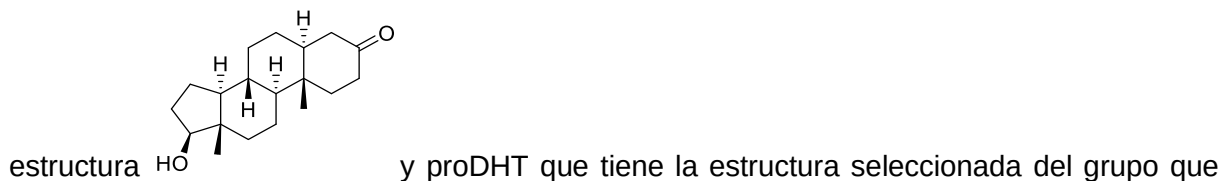
5 AA está ausente o es una unidad peptídica que comprende de 2 a 4 aminoácidos;

SP2 está ausente o una segunda unidad separadora seleccionada del grupo que



y

10 P es un agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en DHT que tiene la



en donde R_1 se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo de C_{1-6} , $(\text{CH}_2)_{0-6}-\text{OH}$, $(\text{CH}_2)_{0-6}-\text{NH}_2$, $(\text{CH}_2)_{0-6}-\text{NH}-C_{1-3}$ alquilo, y $(\text{CH}_2)_{0-6}-N-(C_{1-3}$ alquilo) $_2$;

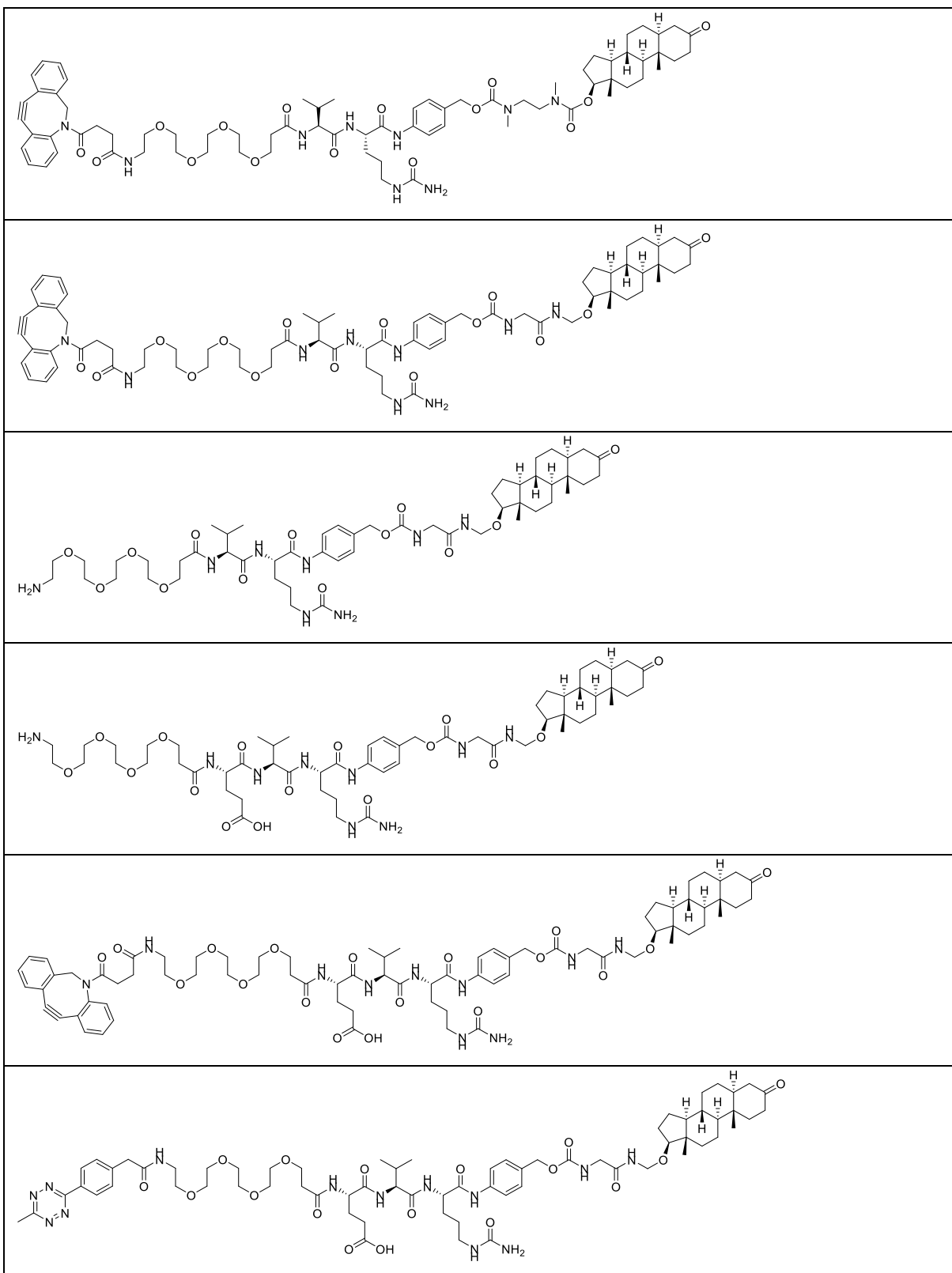
15 R_2 se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo de C_{1-6} , $(\text{CH}_2)_{0-6}-\text{OH}$, $(\text{CH}_2)_{0-6}-\text{NH}_2$, $(\text{CH}_2)_{0-6}-\text{NH}-C_{1-3}$ alquilo, y $(\text{CH}_2)_{0-6}-N-(C_{1-3}$ alquilo) $_2$;

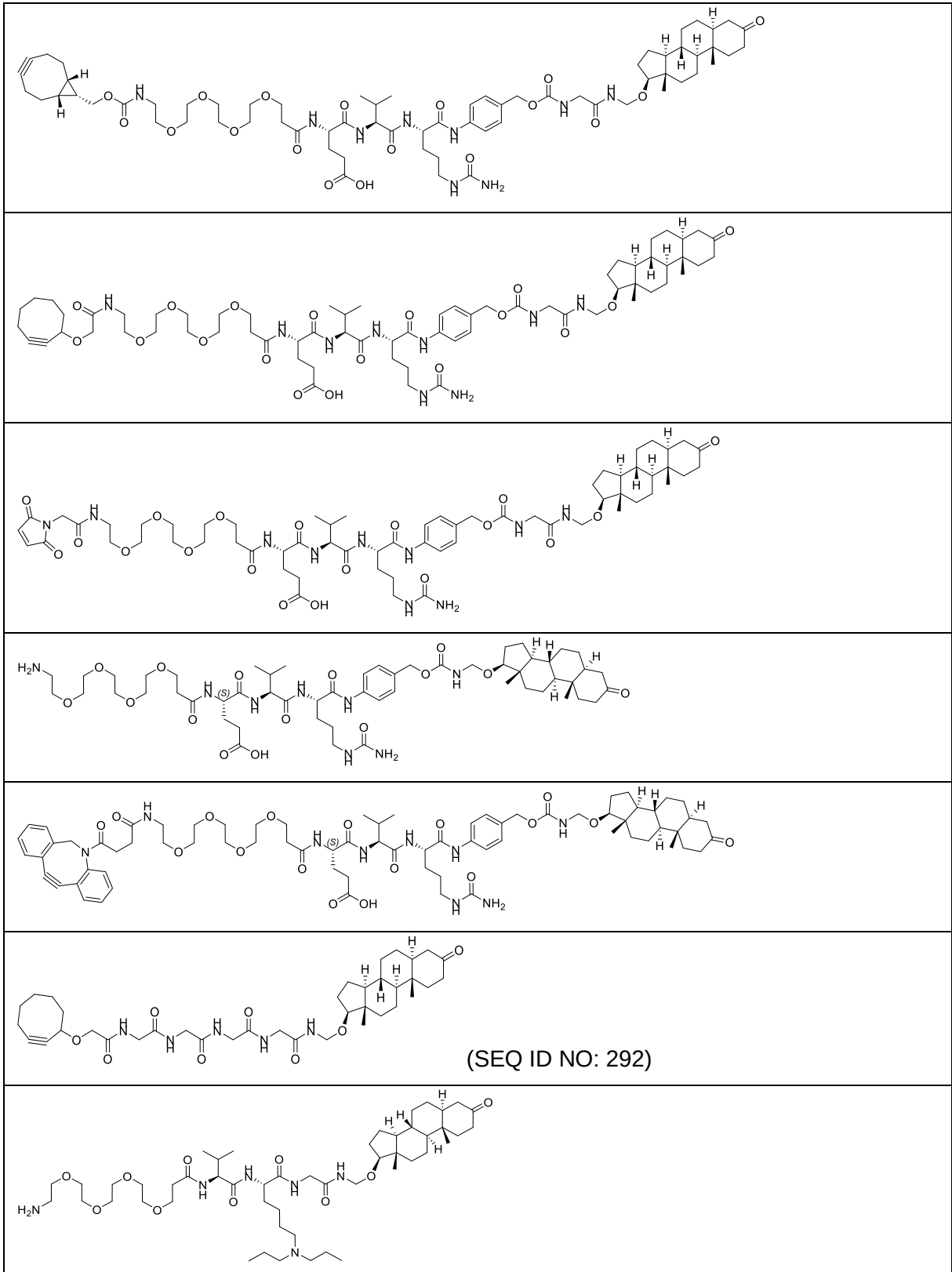
R_3 se selecciona del grupo que consiste en H y un alquilo de C_{1-3} , y

R_4 se selecciona del grupo que consiste en H y un alquilo de C_{1-3} .

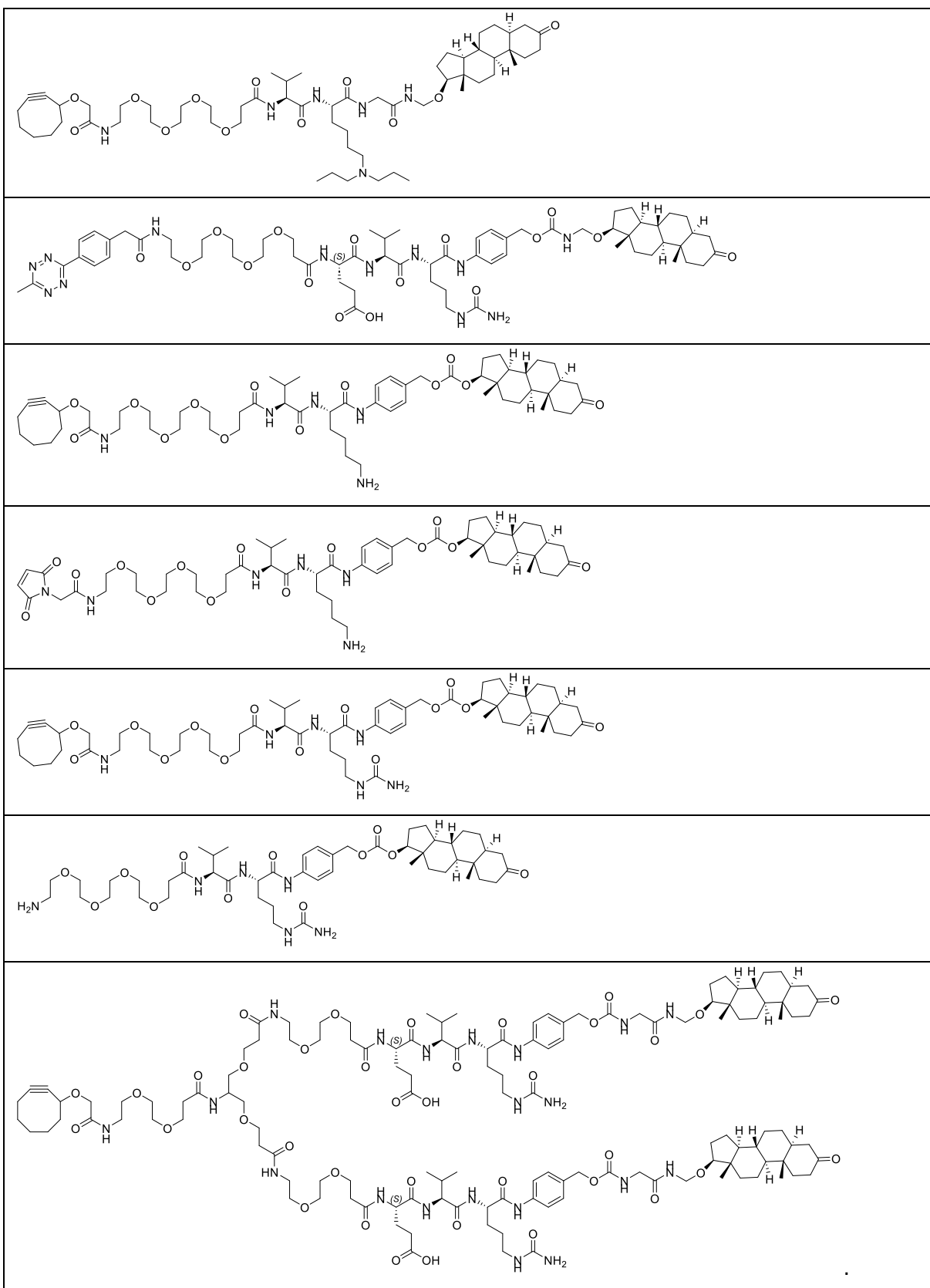
En una modalidad, el compuesto de acuerdo con la fórmula (L2-P) o (L2'-P) tiene una

estructura seleccionada del grupo que consiste en:



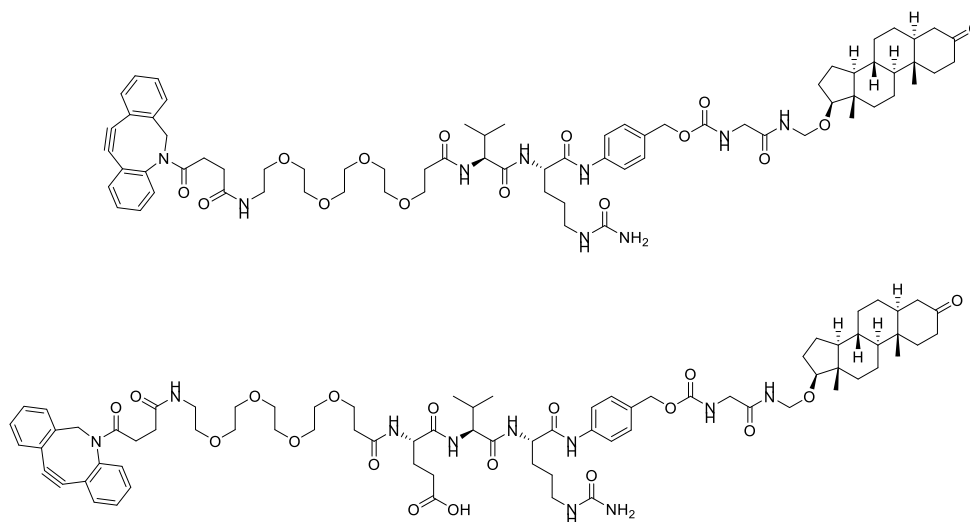


(SEQ ID NO: 292)



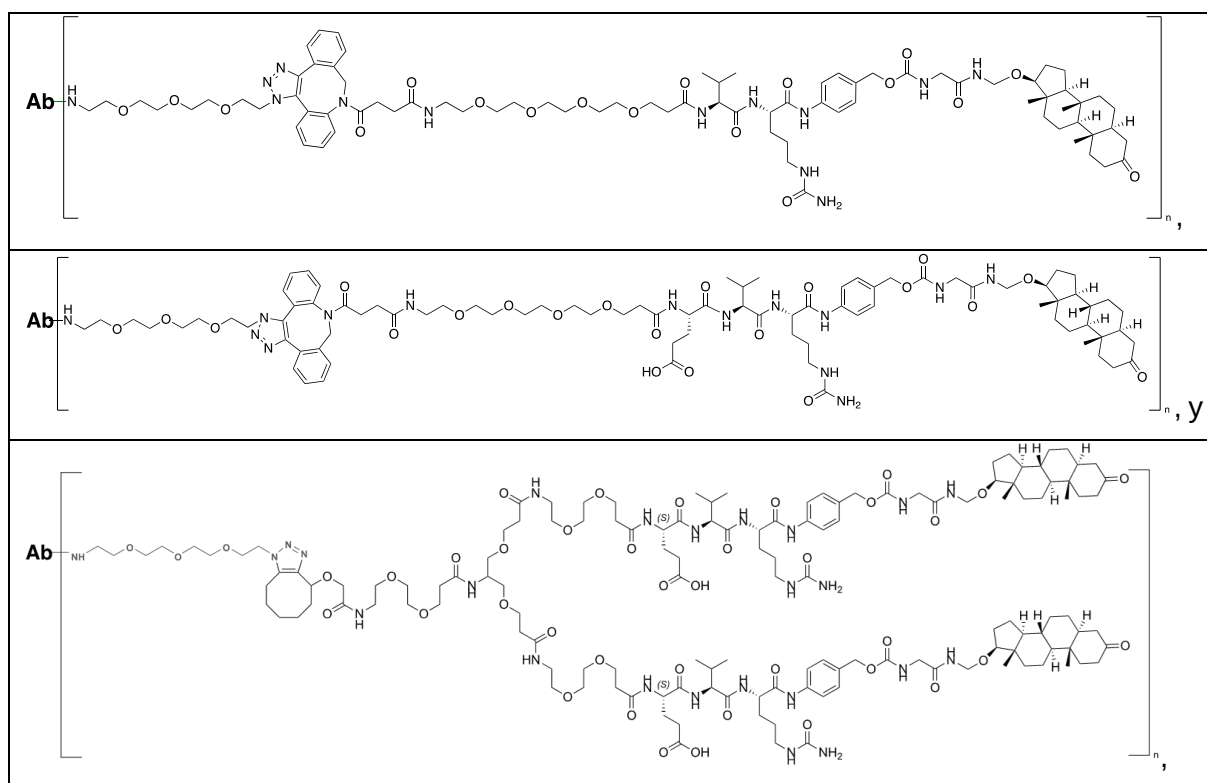
En una modalidad particular, la presente divulgación proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende la proteína de unión a antígeno como se describió anteriormente conjugada con el enlazador-carga útil seleccionada del grupo que consiste en

5



y

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en:

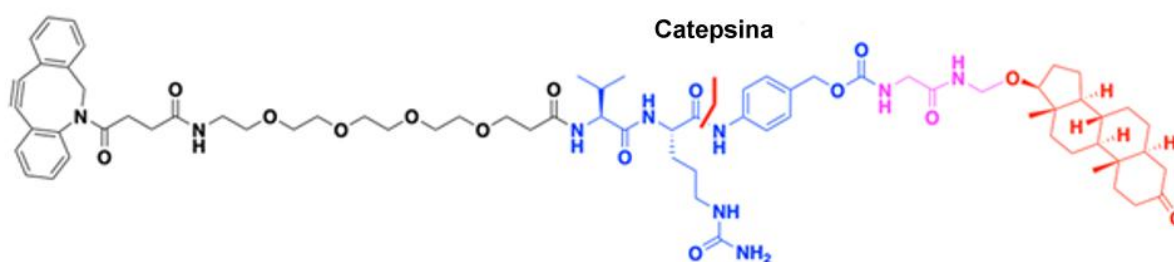


en donde Ab es la proteína de unión a antígeno anti-hCAGNG1 como se describió anteriormente y n es un número entero de 1 a 4.

Preparación de ADC

Los conjugados de fármaco-anticuerpo descritos en la presente se pueden preparar usando condiciones de conjugación conocidas por aquellos expertos en la técnica, (ver, por ejemplo, Doronina *et al. Nature Biotechnology* 2003, 21, 7, 778, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad). En algunas modalidades, un conjugado de fármaco y proteína de unión a antígeno anti-hCAGNG1 se prepara al poner en contacto una proteína de unión a antígeno anti-hCAGNG1 como se describe en la presente con un compuesto que comprende el enlazador y agente terapéutico deseado, en donde este enlazador posee una porción que es reactiva con el anticuerpo o proteína de unión a antígeno, por ejemplo, en el residuo deseado del anticuerpo o proteína de unión a antígeno.

En algunas modalidades, en la presente se proporcionan procesos para preparar un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende poner en contacto una proteína de unión a antígeno anti-hCAGNG1 descrita en la presente, que incluye una proteína de unión a antígeno anti-hCAGNG1 funcionalizada con azido, con un compuesto que tiene la siguiente fórmula A¹:



A1

y una transglutaminasa, ver, por ejemplo, patente de Estados Unidos No. 9,676,871, que se incorpora en la presente en su totalidad por referencia. En A¹ se muestra un sitio de escisión de catepsina.

En algunas modalidades, los conjugados de proteína-fármaco de la presente divulgación se producen de acuerdo con un proceso de dos pasos, donde el paso 1 es conjugación específica de sitio mediada por transglutaminasa y el paso 2 es una reacción de

conjugación (carga útil) de agente terapéutico (por ejemplo, una reacción de 1,3-cicloadición).

Paso 1: Conjugación específica de sitio mediada por transglutaminasa

En algunas modalidades, las proteínas de unión a antígeno anti-hCACNG1 de la divulgación se pueden modificar de acuerdo con métodos conocidos para proporcionar proteínas modificadas con glutaminilo. Las técnicas para conjugar anticuerpos y compuestos de amina primaria se conocen en la técnica. En la presente se emplean técnicas de conjugación específicas de sitio para dirigir la conjugación a glutamina usando conjugación de glutamina mediante transglutaminasa (ver, por ejemplo, Schibli, *Angew Chemie Inter Ed.* 2010, 49, 9995).

Los compuestos que comprenden amina primaria (por ejemplo, enlazadores L1) de la presente divulgación se pueden conjugar con uno o más residuos de glutamina de una proteína de unión a antígeno (por ejemplo, una proteína de unión a antígeno anti-hCACNG1) mediante conjugación quimioenzimática basada en transglutaminasa (ver, por ejemplo, Dennler et al., *Protein Conjugate Chem.* 2014, 25, 569-578, y WO 2017/147542). Por ejemplo, en la presencia de transglutaminasa, uno o más residuos de glutamina de un anticuerpo se pueden acoplar a un compuesto enlazador de amina primaria. Brevemente, en algunas modalidades, una proteína de unión a antígeno anti-hCACNG1 de acuerdo con la divulgación que tiene un residuo de glutamina (por ejemplo, un residuo de Gln 295, es decir, Q295) se trata con un enlazador que contiene amina primaria L1, descrito anteriormente, en la presencia de la enzima transglutaminasa. En ciertas modalidades, la proteína de unión a antígeno se aglucosila. En ciertas modalidades, la proteína de unión a antígeno se desglucosila.

En ciertas modalidades, la proteína de unión a antígeno comprende al menos un residuo de glutamina en al menos una secuencia de cadena de polipéptidos. En ciertas modalidades, el agente de unión comprende dos polipéptidos de cadena pesada, cada uno con un residuo de Gln 295. En modalidades adicionales, el agente de unión comprende uno o más residuos de glutamina en un sitio diferente de una cadena pesada 295.

En algunas modalidades, se puede preparar un agente de unión, tal como un anticuerpo, por mutagénesis dirigida al sitio para insertar un residuo de glutamina en un sitio sin dar por resultado la función o unión de anticuerpo deshabilitado. Por ejemplo, en la presente se incluyen anticuerpos que portan la o las mutaciones Asn297Gln (N297Q) como se describe en la presente. En algunas modalidades, un anticuerpo que tiene un residuo de Gln 295 y/o una mutación N297Q contiene uno o más residuos de glutamina que se presentan

de manera natural adicionales en sus regiones variables, que pueden ser accesibles para transglutaminasa y por lo tanto capaces de conjugación a un enlazador o un enlazador-carga útil. Un residuo de glutamina que se presenta de manera natural de ejemplo se puede encontrar, por ejemplo, en Q55 de la cadena ligera. En estos casos, el agente de unión, por ejemplo, anticuerpo, conjugado mediante transglutaminasa puede tener un valor LAR mayor de lo esperado (por ejemplo, una LAR mayor de 4). Cualquiera de estos anticuerpos se puede aislar de fuentes naturales o artificiales.

En ciertas modalidades de la divulgación, la relación enlazador-anticuerpo o LAR es de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 moléculas L1 enlazadoras por anticuerpo. En algunas modalidades, la LAR es de 1 a 8. En algunas modalidades, la LAR es de 1 a 6. En ciertas modalidades, la LAR es de 2 a 4. En algunos casos, la LAR es de 2 a 3. En ciertos casos, la LAR es de 0,5 a 3,5. En algunas modalidades, la LAR es aproximadamente 1, o aproximadamente 1,5, o aproximadamente 2, o aproximadamente 2,5, o aproximadamente 3, o aproximadamente 3,5. En algunas modalidades, la LAR es 2. En algunas modalidades, la LAR es 4.

Paso 2: Reacción de conjugación de carga útil

En ciertas modalidades, los enlazadores L1 de acuerdo con la presente divulgación comprenden al menos un grupo reactivo B' capaz de una reacción adicional después de la transglutaminación. En estas modalidades, la proteína de unión a antígeno modificada con glutaminilo es capaz de reaccionar adicionalmente con un compuesto de carga útil reactivo o un compuesto de carga útil-enlazador reactivo (por ejemplo, L2-P como se divulga en la presente), para formar un conjugado de proteína de unión a antígeno-carga útil. Más específicamente, el enlazador reactivo-compuesto de carga útil L2-P puede comprender un grupo reactivo B'' que es capaz de reaccionar con el grupo reactivo B' del enlazador L1. En ciertas modalidades, un grupo reactivo B' de acuerdo con la presente divulgación comprende una porción que es capaz de experimentar una reacción de 1,3-cicloadición. En ciertas modalidades, el grupo reactivo B' es una azida. En ciertas modalidades, el grupo reactivo B'' comprende un alquino (por ejemplo, un alquino terminal o un alquino tensado interno). En ciertas modalidades de la presente divulgación, el grupo reactivo B' es compatible con la proteína de unión a antígeno y las condiciones de reacción de transglutaminación.

En ciertas modalidades de la divulgación, las moléculas de enlazador L1 comprenden un grupo reactivo B'. En ciertas modalidades de la divulgación, las moléculas de enlazador L1 comprenden más de un grupo reactivo B'.

En ciertas modalidades, el enlazador reactivo-carga útil L2-P comprende una molécula de carga útil ($n=1$). En ciertas modalidades diferentes, el enlazador reactivo-carga útil L2-P comprende dos o más moléculas de carga útil ($n \geq 2$). En ciertas modalidades, el enlazador reactivo-carga útil L2-P comprende de 1 a 12 moléculas de carga útil, o de 1 a 10 moléculas de carga útil, o de 1 a 8 moléculas de carga útil, o de 1 a 6 moléculas de carga útil, o de 1 a 4 moléculas de carga útil, o de 1 a 2 moléculas de carga útil.

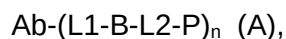
En ciertas modalidades, el enlazador reactivo-carga útil L2-P comprende una molécula de carga útil. Cuando el L2-P se hace reaccionar con un Ab-L1-B', la DAR será aproximadamente igual a la LAR del Ab-L1-B'. Por ejemplo, si L2-P que comprende una molécula de carga útil se hace reaccionar con un Ab-L1-B' que tiene una LAR de 4 (por ejemplo, mediante transglutaminación de Q295 y N297Q), el conjugado de proteína-fármaco resultante tendrá una DAR de 4.

En ciertas modalidades, el enlazador reactivo-carga útil L2-P comprende 2 moléculas de carga útil. Cuando el L2-P se hace reaccionar con un L1-B', la DAR será aproximadamente 2 veces la LAR del Ab-L1-B'. Por ejemplo, si L2-P que comprende dos moléculas de carga útil se hace reaccionar con un Ab-L1-B' que tiene una LAR de 4 (por ejemplo, mediante transglutaminación de Q295 y N297Q), el conjugado de proteína-fármaco resultante tendrá una DAR de 8.

En ciertas modalidades de la divulgación, la relación fármaco-anticuerpo o DAR (por ejemplo, abreviada como la letra minúscula n) es de aproximadamente 1 a aproximadamente 24, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 20, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 16, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 12, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 8, o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 moléculas de carga útil por anticuerpo. En algunas modalidades, la DAR es de 1 a 24. En algunas modalidades, la DAR es de 1 a 16. En algunas modalidades, la DAR es de 1 a 8. En algunas modalidades, la DAR es de 1 a 6. En ciertas modalidades, la DAR es de 2 a 4. En algunos casos, la DAR es de 2 a 3. En ciertos casos, la DAR es de 0,5 a 3,5. En ciertos casos, la DAR es de 10 a 14. En ciertos casos, la DAR es de 14 a 18. En ciertos casos, la DAR es de 0,20 a 24,5. En algunas modalidades, la DAR es aproximadamente 1, o aproximadamente 1,5, o aproximadamente 2, o aproximadamente 2,5, o aproximadamente 3, o aproximadamente 3,5. En algunas modalidades, la DAR es 2. En algunas modalidades, la DAR es 4. En algunas modalidades, la DAR es 8. En algunas modalidades, la DAR es 12. En algunas modalidades, la DAR es 16. En algunas modalidades,

la DAR es 24.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para producir un compuesto que tiene una estructura de acuerdo con la fórmula (A):



5 o una sal farmacéuticamente aceptable de lo mismo, en donde:

Ab es una proteína de unión a antígeno anti-hCACNG1 descrita en la presente;

L1 es un primer enlazador unido covalentemente a la cadena lateral de un residuo de glutamina del Ab;

B es una porción que comprende un triazol;

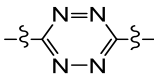
10 L2 es un segundo enlazador unido covalentemente al agente terapéutico P;

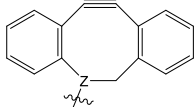
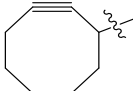
P es un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en DHT y proDHT, y

n es un número entero de 1 a 8, en donde el método comprende los pasos de:

a) poner en contacto, en la presencia de una transglutaminasa, el A que comprende al menos un residuo de glutamina con al menos un compuesto L1-B';

15 b) poner en contacto el producto del paso a) con uno o más equivalentes de un compuesto B"-L2-P, en donde el grupo B" es capaz de unirse covalentemente al grupo B',

en donde uno de los grupos B' y B" se selecciona de $-\text{N}_3$ y ; y el otro de los

grupos B' y B" se selecciona de $-\text{Z}-\text{C}\equiv\text{C}-$, ; y  , donde Z es C o N; y

c) aislar el compuesto producido de la fórmula (A).

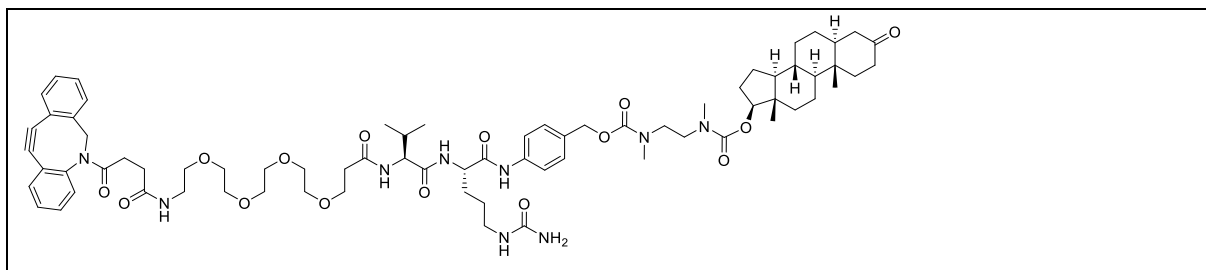
20 En una modalidad, el A tiene residuos de glutamina en las posiciones 295 (Q295) y 297 (N297Q).

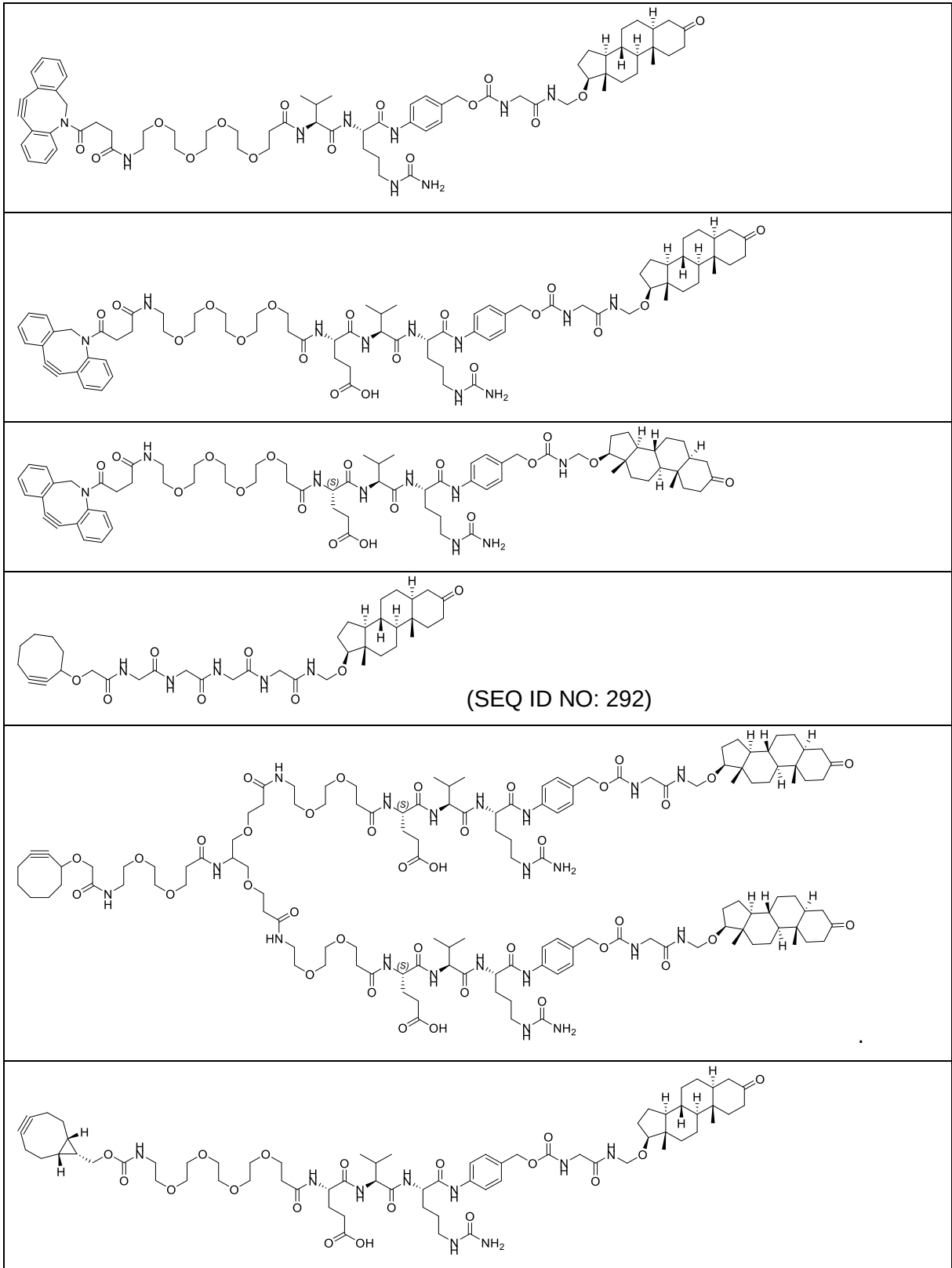
En una modalidad, L1-B' tiene la estructura seleccionada del grupo que consiste en:

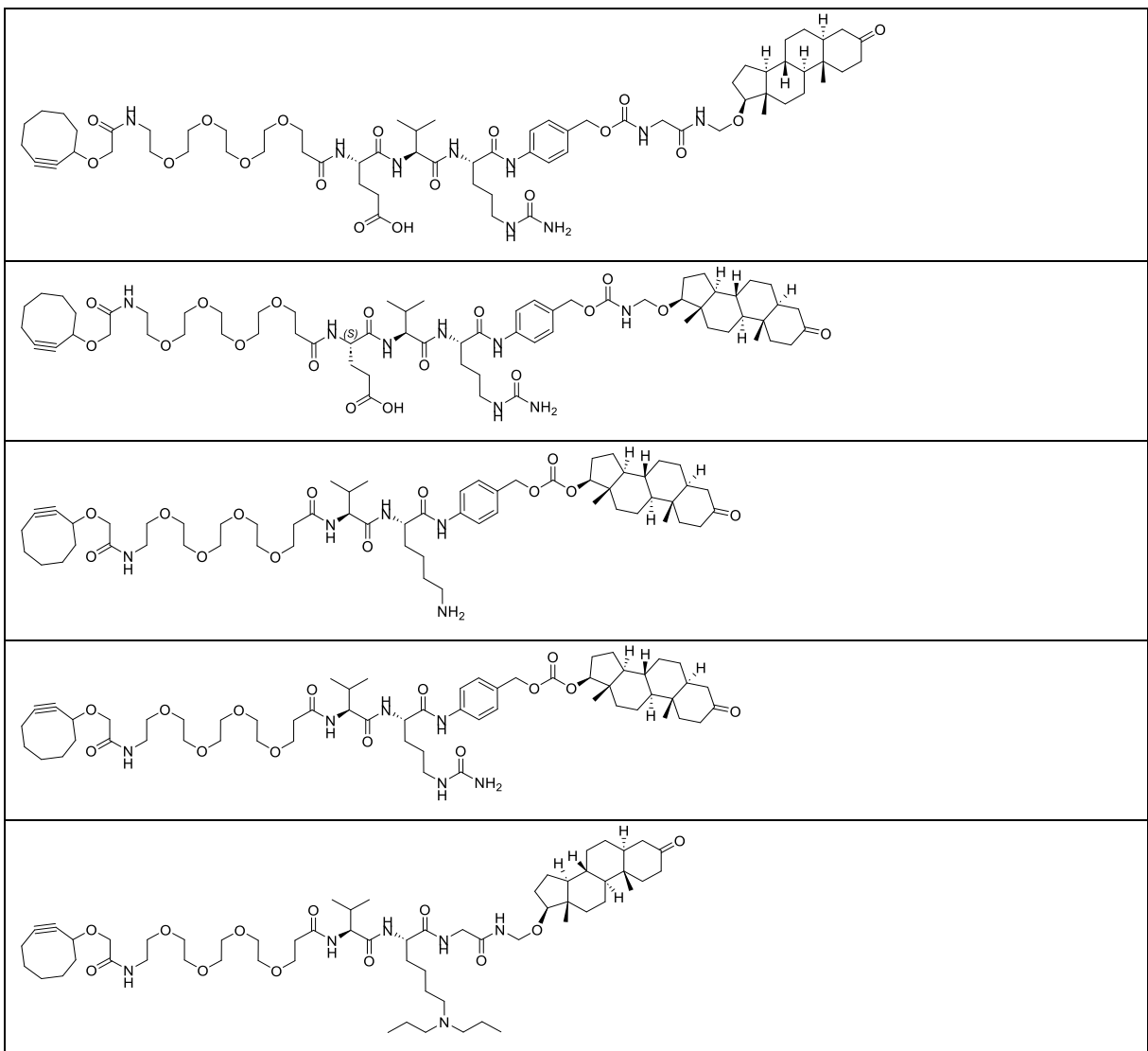
<chem>NCCOCCOCCOCC(B')</chem>
<chem>NCCOCCOCCOCCOCC(B')</chem>
<chem>NCCOCCOCCOCCOCCOCCOCC(B')</chem>
<chem>NCCOCCOCCOCCOCCOCCOCCOCCOCC(B')</chem>
<chem>NCCCC[C@H](C(=O)O)NS(=O)(=O)CCNC(=O)CCOCCOCCOCCOCC(B')</chem>
<chem>NCCCCCCS(=O)(=O)NCCOCCOCC(B')</chem>
<chem>NCCCCCS(=O)(=O)NC(=O)CCOCCOCC(B')</chem>
<chem>NCCSS(C)(C)C[C@H](C(=O)O)NC(=O)CCOCCOCC(B')</chem>
<chem>NCCOCC(=O)N[C@@H](C)C(=O)N[C@@H](CCCNC(=O)N)C(=O)Nc1ccc(C(B'))cc1</chem> ,

En una modalidad, el L1-B' tiene la estructura NCCOCCOCCOCCN=[N+]=[N-].

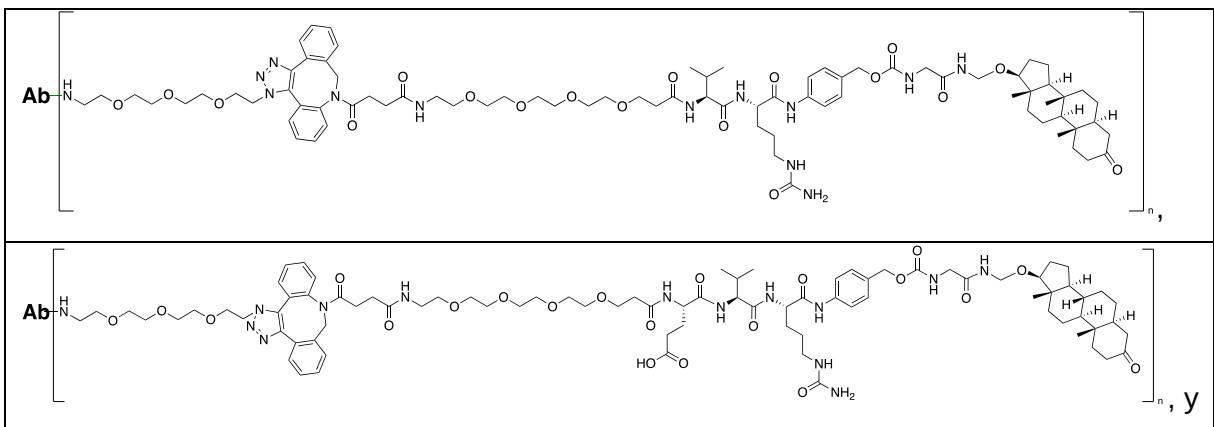
En una modalidad, el compuesto B"-L2-P tiene la estructura seleccionada del grupo que consiste en:

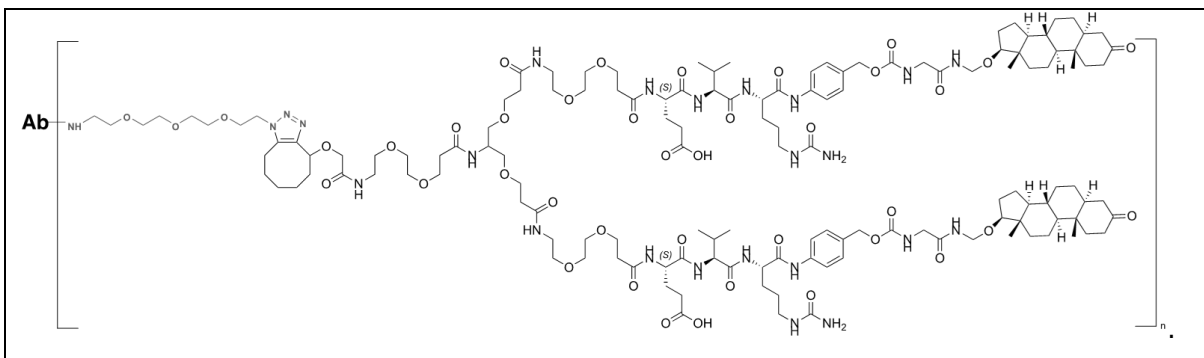






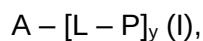
En una modalidad, el compuesto de la fórmula (A) tiene la estructura seleccionada del grupo que consiste en:





En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para producir conjugados de proteína de unión a antígeno-fármaco en un paso individual. En este proceso, la proteína de unión a antígeno de acuerdo con la divulgación (es decir, una proteína de unión a antígeno anti-hCACNG1 descrita en la presente) se trata con un enlazador-carga útil que contiene amina primaria L-P, descrita anteriormente, en la presencia de la enzima transglutaminasa. En ciertas modalidades, la proteína de unión a antígeno se aglucosila. En ciertas modalidades, la proteína de unión a antígeno se desglucosila.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para producir un compuesto que tiene una estructura de acuerdo con la fórmula (I):



en donde A es la proteína de unión a antígeno;

L es un enlazador;

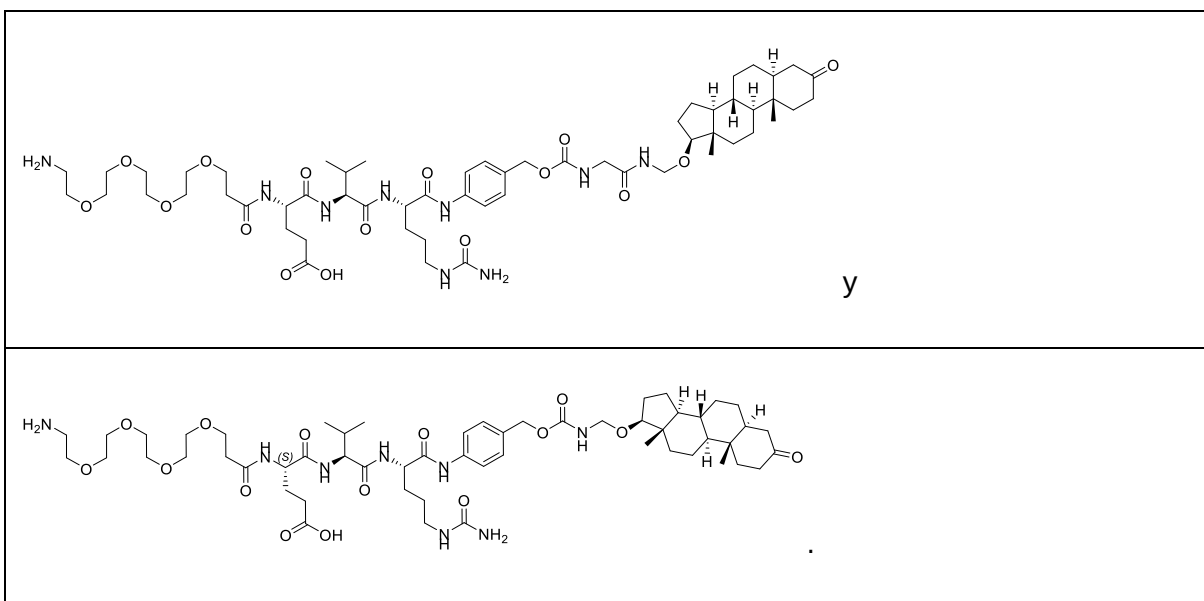
P es un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en DHT y proDHT, y

y es un número entero de 1 a 8, en donde el método comprende los pasos de:

c) poner en contacto, en la presencia de una transglutaminasa, el A que comprende al menos un residuo de glutamina con al menos un compuesto L-P, en donde el compuesto L-P tiene al menos una porción de amina terminal, y

d) aislar el compuesto producido de la fórmula (I).

En una modalidad, el compuesto L-P tiene la estructura seleccionada del grupo que consiste en:



Administración y formulación terapéutica

También se describen en la presente composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de unión a antígeno como se describe en la presente. En algunas modalidades,

5 las composiciones farmacéuticas se pueden formular con portadores, excipientes y otros agentes adecuados que proporcionan transferencia, administración, tolerancia mejorada y similares. Se puede encontrar una multitud de formulaciones apropiadas en el formulario conocido por todos los químicos farmacéuticos: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas,

10 ungüentos, jaleas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípidos (catiónicos o aniónicos) (tal como LIPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidra, emulsiones de aceite en agua y agua en aceite, emulsiones de carbowax (polietilenglicoles de diferentes pesos moleculares), geles semisólidos y mezclas semisólidas que contienen carbowax. Ver también Powell et al. "Compendium of excipients

15 for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

La dosis de molécula de unión a antígeno administrada a un paciente puede variar dependiendo de la edad y el tamaño del paciente, enfermedad diana, condiciones, vía de administración y similares. La dosis preferida se calcula habitualmente de acuerdo con el peso corporal o área de superficie corporal. Cuando una molécula de unión a antígeno como

20 se describe en la presente se usa para propósitos terapéuticos en un paciente adulto, puede ser ventajoso administrar de manera intravenosa la molécula de unión a antígeno como se

describe en la presente normalmente en una dosis individual de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal, más preferentemente de aproximadamente 0,02 a aproximadamente 7, aproximadamente 0,03 a aproximadamente 5 o aproximadamente 0,05 a aproximadamente 3 mg/kg de peso corporal. Dependiendo de la severidad de la condición, se puede ajustar la frecuencia y la duración del tratamiento. Las dosis y programas efectivos para administrar una molécula de unión a antígeno biespecífica se pueden determinar empíricamente; por ejemplo, el progreso del paciente se puede monitorear por valoración periódica y la dosis se puede ajustar en consecuencia. Además, la modificación de escala entre especies de las dosis se puede realizar usando métodos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, Mordenti *et al.*, 1991, *Pharmaceut. Res.* 8:1351).

Se conocen diferentes sistemas de administración y se pueden usar para administrar la composición farmacéutica como se describe en la presente, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar los virus mutantes, endocitosis mediada por receptores (ver, por ejemplo, Wu *et al.*, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432). Los métodos de introducción incluyen, pero no se limitan a, vía intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. La composición se puede administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y se puede administrar conjuntamente con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local.

Una composición farmacéutica como se describe en la presente se puede administrar de manera subcutánea o de manera intravenosa con una aguja y jeringa estándar. Además, con respecto a la administración subcutánea, un dispositivo de administración de pluma tiene fácilmente aplicaciones para administrar una composición farmacéutica como se describe en la presente. Este dispositivo de administración de pluma puede ser reutilizable o desechable. Un dispositivo de administración de pluma reutilizable en general utiliza un cartucho reemplazable que contiene una composición farmacéutica. Una vez que se ha administrado toda la composición farmacéutica dentro del cartucho y el cartucho está vacío, el cartucho vacío se puede desechar fácilmente y reemplazarse con un cartucho nuevo que contiene la composición farmacéutica. El dispositivo de administración de pluma entonces se puede reutilizar. En un dispositivo de administración de pluma desechable, no hay cartucho reemplazable. En cambio, el dispositivo de administración de pluma desechable viene precargado con la composición farmacéutica retenida en un depósito dentro del

dispositivo. Una vez que el depósito se vacía de la composición farmacéutica, se desecha todo el dispositivo.

5 Numerosas plumas reutilizables y dispositivos de administración de autoinyector tienen aplicaciones en la administración subcutánea de una composición farmacéutica como se describe en la presente. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), pluma DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Suiza), pluma HUMALOG MIX 75/25™, pluma HUMALOG™, pluma HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II y III (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca), pluma BD™
10 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ y OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Alemania), por nombrar solo algunos. Los ejemplos de dispositivos de administración de pluma desechables que tienen aplicaciones en administración subcutánea de una composición farmacéutica como se describe en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, la pluma SOLOSTAR™
15 (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) y KWIKPEN™ (Eli Lilly), el autoinyector SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Alemania), el EPIPEN (Dey, L.P.), y la pluma HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park IL), por nombrar solo algunos.

20 En ciertas situaciones, la composición farmacéutica se puede administrar en un sistema de liberación controlada. En una modalidad, se puede usar una bomba (ver Langer, supra; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). En otra modalidad, se pueden usar materiales poliméricos; ver, Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. En aun otra modalidad, se puede colocar un sistema de liberación controlada en proximidad de la diana de la composición, requiriendo de
25 este modo solo una fracción de la dosis sistémica (ver, por ejemplo, Goodson, 1984, en Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, págs. 115-138). Otros sistemas de liberación controlada se analizan en la revisión de Langer, 1990, Science 249:1527-1533.

30 Las preparaciones inyectables pueden incluir formas de dosis para inyecciones intravenosas, subcutáneas, intracutáneas e intramusculares, infusiones por goteo, etc. Estas preparaciones inyectables se pueden preparar por métodos públicamente conocidos. Por ejemplo, las preparaciones inyectables se pueden preparar, por ejemplo, al disolver, suspender o emulsionar el anticuerpo o su sal descrita anteriormente en un medio acuoso estéril o un medio oleoso usado convencionalmente para inyecciones. Como medio acuoso

para inyecciones, hay, por ejemplo, solución salina fisiológica, una solución isotónica que contiene glucosa y otros agentes auxiliares, etc., que se puede usar en combinación con un agente solubilizante apropiado tal como un alcohol (por ejemplo, etanol), un polialcohol (por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol), un agente tensioactivo no iónico [por ejemplo, polisorbato 80, HCO-50 (aducto de polioxietileno (50 mol) de aceite de ricino hidrogenado)], etc. Como medio oleoso, se emplean, por ejemplo, aceite de sésamo, aceite de soja, etc., que se pueden usar en combinación con un agente solubilizante tal como benzoato de bencilo, alcohol bencílico, etc. La inyección preparada de esta manera se rellena preferentemente en una ampolla apropiada.

De manera ventajosa, las composiciones farmacéuticas para uso oral o parenteral descritas anteriormente se preparan en formas de dosis en una dosis unitaria adecuada para ajustarse a una dosis de los ingredientes activos. Estas formas de dosis en una dosis unitaria incluyen, por ejemplo, tabletas, píldoras, cápsulas, inyecciones (ampollas), supositorios, etc. La cantidad del anticuerpo mencionado anteriormente contenido en general es aproximadamente 5 a aproximadamente 500 mg por forma de dosis en una dosis unitaria; especialmente en la forma de inyección, se prefiere que el anticuerpo mencionado anteriormente esté contenido en aproximadamente 5 a aproximadamente 100 mg y en aproximadamente 10 a aproximadamente 250 mg para las otras formas de dosis.

Usos terapéuticos y diagnósticos de los mismos

En la presente también se divulgan métodos que comprenden administrar a un sujeto en necesidad del mismo una composición terapéutica que comprende un anticuerpo anti-hCACNG1, fragmento de -unión a antígeno del mismo o un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo anti-hCACNG1 (por ejemplo, un anticuerpo anti-hCACNG1 o ADC que comprende cualquiera de las secuencias de HCVR/LCVR o CDR como se expone en la tabla 1 en la presente). La composición terapéutica puede comprender cualquiera de los anticuerpos anti-hCACNG1, fragmentos de unión a antígeno de los mismos o ADC descritos en la presente y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Los anticuerpos, fragmento de -unión a antígeno de los mismos o un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo anti-hCACNG1 como se describe en la presente pueden ser útiles, entre otras cosas, para el tratamiento, prevención y/o mejora de cualquier enfermedad o trastorno asociado con el tejido muscular esquelético. Por ejemplo, los anticuerpos y ADC como se describe en la presente pueden ser útiles para el tratamiento de trastornos de desgaste muscular (por ejemplo, caquexia, pérdida muscular inducida por

glucocorticoides, pérdida muscular inducida por insuficiencia cardíaca, desgaste por VIH, desuso, envejecimiento, etc.) y/o distrofias/miopatías musculares.

Los anticuerpos anti-hCACNG1 como se describen en la presente tienen diferentes utilidades. Por ejemplo, en algunas modalidades, los anticuerpos anti-hCACNG1 como se describe en la presente se pueden usar en ensayos de diagnóstico para CACNG1, por ejemplo, detectar su expresión en células, tejidos, etc. específicos, por ejemplo, como un reactivo para identificar/marcar fibras de músculo esquelético. Se pueden usar diferentes técnicas de ensayo de diagnóstico y pronóstico conocidas en la técnica, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos de sándwich directos o indirectos y ensayos de inmunoprecipitación realizados en fases heterogéneas u homogéneas (Zola (1987) Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc. pp. 147-1581). Los anticuerpos usados en los ensayos se pueden etiquetar con una porción detectable. La fracción detectable debe ser capaz de producir, ya sea directa o indirectamente, una señal detectable. Se puede emplear cualquier método conocido en la técnica para conjugar el anticuerpo con la porción detectable.

En otra modalidad, se proporciona un método de tratamiento de una enfermedad, tal como un trastorno de desgaste muscular. El método puede incluir el paso de proporcionar un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno CACNG1 del mismo, como se describió anteriormente, a un sujeto que requiere dicho tratamiento.

Ejemplo 1: Anticuerpos CACNG1 de ejemplo

Generación de anticuerpos anti-CACNG1 humana

Se obtuvieron anticuerpos anti-CACNG1 humana al inmunizar un ratón (por ejemplo, un ratón modificado que comprende ADN que codifica para regiones variables de cadena ligera kappa humana y pesada de inmunoglobulina humana), con CACNG1 humana.

Después de la inmunización, los esplenocitos se cosecharon de cada ratón y (1) se fusionaron con células de mieloma de ratón para conservar su viabilidad y formar células de hibridoma y se seleccionaron para determinar la especificidad de CACNG1 humano, o (2) se clasificaron de células B (como se describe en US 2007/0280945A1) usando un fragmento de CACNG1 humano como el reactivo de clasificación que se une e identifica anticuerpos reactivos (células B positivas para antígeno).

Los anticuerpos quiméricos contra CACNG1 humana se aislaron inicialmente con una

región variable humana y una región constante de ratón usando, por ejemplo, tecnología VELOCIMMUNE como se describe en la patente de Estados Unidos No. 7,105,348; patente de Estados Unidos No. 8,642,835; y US 9,622,459, cada una de las cuales se incorpora en la presente por referencia.

En algunos anticuerpos, para propósitos de prueba, las regiones constantes de ratón se reemplazaron con una región constante humana deseada, por ejemplo, CH humana de tipo silvestre o CH humana modificada (por ejemplo, isotipos IgG1, IgG2 o IgG4), y región constante de cadena ligera (CL), para generar un anticuerpo anti-hCACNG1 completamente humano, o porción de unión a antígeno del mismo. En tanto que la región constante seleccionada puede variar de acuerdo con el uso específico, las características de unión a antígeno de alta afinidad y de especificidad diana residen en la región variable.

Ciertas propiedades biológicas de los anticuerpos anti-CACNG1 humana de ejemplo generados de acuerdo con los métodos de este ejemplo se describen en detalle en los ejemplos establecidos más adelante.

Secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de región variable de cadena pesada y ligera de anticuerpos anti-hCACNG1

La tabla 1 expone identificadores de secuencia o secuencias de una secuencia de ácido nucleico (NA) que codifica, y entre paréntesis una secuencia de aminoácidos (AA) de, una región variable de cadena pesada o ligera (HCVR o LCVR, respectivamente), o una CDR de cadena pesada o ligera (HCDR y LCdr, respectivamente) de anticuerpos anti-hCACNG1 seleccionados usados para generar las proteínas anti-hCACNG1 terapéuticas descritas en el presente documento.

Tabla 1: Identificadores o secuencias anti-hCACNG1

	SEQ ID NO:							
Designación de anticuerpo	HCVR NA (AA)	HCDR1 NA (AA)	HCDR2 NA (AA)	HCDR3 NA (AA)	LCVR NA (AA)	LCDR1 NA (AA)	LCDR2 NA (AA)	LCDR3 NA (AA)
1 Ab 18 anti-hCACNG1 / anti-	1 (2)	3 (4)	5 (6)	7 (8)	9 (10)	11 (12)	GCTGCATCC (AAS)	15 (16)

hCACNG1 Ab 5/ Ab 2 anti- hCACNG1								
2 Ab 6 anti- hCACNG1 / Ab 14 anti- hCACNG1	17 (18)	19 (20)	21 (22)	23 (24)	25 (26)	27 (28)	GCTACATCC (ATS)	31 (32)
3 Ab 8 anti- hCACNG1 / Ab 14 anti- hCACNG1	33 (34)	35 (36)	37 (38)	39 (40)	41 (42)	43 (44)	AAGGCGTCT (KAS)	47 (48)
4 Ab 7 anti- hCACNG1 / Ab 14 anti- hCACNG1	49 (50)	51 (52)	53 (54)	55 (56)	57 (58)	59 (60)	GGTGCATCC (GAS)	63 (64)
5 Ab 10 anti- hCACNG1 / Ab 17 anti- hCACNG1	65 (66)	67 (68)	69 (70)	71 (72)	73 (74)	75 (76)	GCTGCATCC (AAS)	79 (80)
6 anti- hCACNG1 Ab 3	81 (82)	83 (84)	85 (86)	87 (88)	89 (90)	91 (92)	GCTGCATCC (AAS)	95 (96)
7 Ab 20 anti- hCACNG1 / Ab 1 anti- hCACNG1	97 (98)	99 (100)	101 (102)	103 (104)	105 (106)	107 (108)	GCTGCATCC (AAS)	111 (112)
8 Ab 4 anti- hCACNG1	113 (114)	115 (116)	117 (118)	119 (120)	121 (122)	123 (124)	GGTGCATCC (GA)	127 (128)
9	129	131	133	135	137	139	GGTGCATCC	143

Ab 11 anti-hCACNG1	(130)	(132)	(134)	(136)	(138)	(140)	(GAS)	(144)
10 Ab 12 anti-hCACNG1	145 (146)	147 (148)	149 (150)	151 (152)	153 (154)	155 (156)	AGGAATAAT (RN)	159 (160)
11 Ab 9 anti-hCACNG1 / Ab 13 anti-hCACNG1	161 (162)	163 (164)	165 (166)	167 (168)	169 (170)	171 (172)	GACAATAAT (DNN)	175 (176)
12 Ab 19 anti-hCACNG1	177 (178)	179 (180)	181 (182)	183 (184)	185 (186)	187 (188)	GGTGCATCC (GAS)	191 (192)
13 Ab 21 anti-hCACNG1	293 (294)	295 (36)	296 (297)	298 (299)	300 (301)	302 (303)	TATAACAGC (YNS)	304 (305)
14 Ab 22 anti-hCACNG1	313 (314)	315 (316)	317 (318)	319 (152)	321 (322)	323 (324)	AGAAATAAT (RNN)	325 (326)

Ejemplo 2: Cinética de unión de Biacore de anticuerpos monoclonales anti-CACNG1 a nanodisco de CACNG1 humano en un formato de captura de antígeno a 25 °C

Las constantes de disociación de equilibrio (valores de K_D) para CACNG1 humano

5 incrustado en nanodisco expresado con una etiqueta PADRE-Flag-His C-terminal (nanodisco CACNG1 humano) que se une a anticuerpos anti-hCACNG1 purificados se determinaron usando una tecnología de biosensor de resonancia de plasmones superficiales en tiempo real con un instrumento Biacore T200. La superficie del sensor CM5 Biacore se derivatizó por acoplamiento de amina con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-His (Cytiva; Marlborough,

10 MA). Todos los estudios de unión de Biacore se realizaron en un amortiguador compuesto por HEPES 0,01M, NaCl 0,15M, CaCl_2 1 mM, MgCl_2 0,5 mM, pH 7,4 (amortiguador de ejecución HBS-N++). Se inyectaron diferentes concentraciones de anticuerpos anti-hCACNG1 (que varían de 300 nM a 12 nM en diluciones en serie de 5 veces) preparados en amortiguador de ejecución HBS-N++ sobre el nanodisco de CACNG1 humano capturado a una velocidad de

15 flujo de 30 $\mu\text{l}/\text{minuto}$. La asociación de anticuerpos se monitoreó durante 2 minutos mientras

que la disociación se monitoreó en amortiguador de ejecución HBS-N++ durante 5 minutos. Al final de cada ciclo, la superficie de captura de nanodisco de CACNG1 humano se regeneró usando tres inyecciones de 10 segundos de Gly 10 mM pH1,5. Todos los experimentos de cinética de unión se realizaron a 25 °C.

5 Los sensogramas específicos de SPR-Biacore se obtuvieron por un procedimiento de doble referencia. La doble referencia se realizó al restar primero la señal de cada inyección sobre una superficie de referencia (anti-His) de la señal sobre la superficie experimental (nanodisco CACNG1 humano capturado anti-His) removiendo de este modo las contribuciones de los cambios en el índice de refracción. Además, se realizaron inyecciones
10 de amortiguador de ejecución para permitir la sustracción de los cambios de señal resultantes de la disociación de anticuerpos capturados de la superficie anti-His acoplada. Las constantes de tasa de asociación (k_a) y disociación (k_d) cinéticas se determinaron al ajustar los sensorgramas en tiempo real a un modelo de unión 1:1 usando el software de ajuste de curva Scrubber v2.0c. Las constantes de equilibrio de disociación de unión (K_D) y las semividas de
15 disociación ($t_{1/2}$) se calcularon a partir de las constantes de velocidad cinética como:

$$K_D (M) = \frac{k_d}{k_a}, \quad y \quad t_{1/2} (min) = \frac{\ln(2)}{60 \cdot k_d}$$

Los resultados cinéticos de anticuerpos anti-hCACNG1 se presentan en la tabla 2. Como se muestra en la tabla 2, todos los anticuerpos se unieron al nanodisco CACNG1 humano capturado en superficie con varios anticuerpos que se unen con afinidades nM de un
20 solo dígito o pM de tres dígitos.

Tabla 2: Parámetros de unión cinética y de equilibrio de anticuerpos anti-hCACNG1 a nanodisco de CACNG1 humano capturado en superficie a 25 °C

	Nanodisc o CACNG1 capturado (RU)	mAb unido a 300 nM (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
Ab 18 anti-hCACNG1 / Ab 2 anti-hCACNG1	122 ± 0,7	25	7,50E+05	5,59E-04	7,45E-10	20,7
Ab 3 anti-hCACNG1	112 ± 0,6	16	2,31E+03	3,95E-04	1,71E-09	2,9

			5	03	08	
Ab 20 anti-hCACNG1 / Ab 1 anti-hCACNG1	140 ± 1,3	14	1,04E+05	8,40E-03	8,10E-08	1,4
Ab 4 anti-hCACNG1	126 ± 0,9	19	3,42E+05	4,06E-04	1,19E-09	28,4
Ab 11 anti-hCACNG1	209 ± 1,9	23	1,93E+06	2,43E-02	1,26E-08	0,5
Ab 12 anti-hCACNG1	191 ± 3,3	22	3,31E+05	1,37E-03	4,15E-09	8,4
Ab 13 anti-hCACNG1	167 ± 1	53	7,42E+04	4,72E-05	6,35E-10	245,0
Ab 14 anti-hCACNG1	159 ± 1,5	31	1,52E+05	3,01E-04	1,98E-09	38,4
Ab 15 anti-hCACNG1	152 ± 1,9	31	7,30E+05	8,36E-05	1,14E-10	138,2
Ab 16 anti-hCACNG1	148 ± 1,9	7	2,94E+05	3,04E-02	1,04E-07	0,4
Ab 17 anti-hCACNG1	139 ± 0,6	9	1,36E+05	1,27E-02	9,35E-08	0,9

Ejemplo 3 : Examen *in vitro* y *ex vivo* de anticuerpos CACNG1 purificados usando miotubos humanos y de ratón

Un total de 43 anticuerpos CACNG1 purificados de dos campañas de inmunización se cribaron *in vitro* usando miotubos humanos y de ratón. La incubación de miotubos vivos con anticuerpos CACNG1 seguida de detección secundaria conjugada con fluoróforo se realizó para valorar la unión de anticuerpo. La tinción Live de miotubos humanos con 25 nM de anticuerpo anti-CACNG1 seguida de detección de anticuerpo secundario conjugado con fluoróforo mostró una unión robusta en comparación con el control de isotipo. La incubación de miotubos con anticuerpos CACNG1 seguida de secundaria conjugada con duocarmicina se realizó para valorar la internalización de anticuerpos mediante aniquilación celular.

La inmunotinción para CACNG1 en miofibras individuales de ratón CACNG1Hu/Hu y secciones transversales de tejido muscular confirmó que CACNG1 se expresa en la superficie celular de la miofibra.

Ejemplo 4: Unión de anticuerpos monoclonales anti-hCACNG1 a miotubos de ratón o humanos, y efecto de la unión en el flujo de calcio por mioblastos humanos

CACNG1 es la subunidad $\gamma 1$ del canal de calcio de tipo L específico del músculo esquelético (receptor de dihidropiridina), aunque la delección genética de CACNG1 parece no tener un impacto importante en la función del músculo esquelético. Para determinar si los anticuerpos que se unen a CACNG1 impactan la función muscular, se realizó un ensayo de flujo de calcio en miotubos humanos que se incubaron con anticuerpos CACNG1 para determinar si estos anticuerpos afectan la liberación de calcio inducida por acetilcolina.

Los mioblastos esqueléticos humanos (Cook Myosite, Inc.) se colocaron en placas a 10,000 células/pozo de una placa de 96 pozos y se diferenciaron durante 7 días en miotubos. En el último día de diferenciación, los medios se reemplazaron con 50 μ L de colorante FLIPR de calcio 5 con probenecid (Invitrogen) y 50 μ L de amortiguador de ensayo (BSA-DMEM al 0,1 %) por pozo. Los anticuerpos de control de isotipo y CACNG1 se diluyeron en serie en amortiguador de ensayo y se añadieron a las células y se incubaron a 37 °C en una incubadora de CO₂ al 5 % durante 1 hora antes del ensayo de flujo de calcio. Se añadió clorhidrato de nicardipina (Sigma) a los pozos no tratados para servir como un control para el bloqueo de los canales de calcio. Después de 1 hora, se añadió acetilcolina (Sigma) a una concentración final de 20 μ M para inducir la liberación de calcio en miotubos, y las placas se ensayaron en un FLIPR Tetra (Molecular Devices, LLC).

Como se esperaba, el nicardipino redujo sustancialmente la liberación de calcio en miotubo humano, en tanto que ninguno de los anticuerpos CACNG1 o anticuerpos de control de isotipo tuvo un impacto importante en el flujo de calcio (FIGURA 1). En general, esto demuestra que los anticuerpos anti-hCACNG1 se unen y se internalizan, pero no bloquean la liberación de calcio en miotubos humanos cultivados *in vitro*.

Ejemplo 4: Unión e internalización de anticuerpos CACNG1 en miofibras ex vivo

Después de la confirmación de la unión de anticuerpo CACNG1 a miotubos humanos, se probó un subconjunto de anticuerpos para unión a miofibras completamente maduras *ex vivo*. Se aislaron miofibras individuales de ratones tipo silvestre, ratones que eran homocigotos para la delección de CACNG1 (referidos como ratones de inactivación de CACNG1), o ratones que eran homocigotos para la expresión de CACNG1 humana en lugar de CACNG1 de ratón (referida como CACNG1Hu/Hu). Se removió el músculo gastrocnemio, se digirió con collagenasa y se aislaron miofibras individuales, se lavaron y se incubaron

durante la noche a 37 °C a CO₂ al 5 %, en DMEM + suero de caballo al 10 %. Después de la incubación durante la noche, se incubaron miofibras individuales con 100 nM de cada anticuerpo CACNG1 o un anticuerpo de control de isotipo durante 30 minutos. Las miofibras entonces se lavaron dos veces en DMEM + suero de caballo al 10 %, y posteriormente se incubaron con 10 µg/mL de anticuerpos secundarios conjugados con fluorescencia durante 30 minutos, se lavaron dos veces en DMEM + suero de caballo al 10 %, y entonces se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4 % durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las fibras individuales entonces se lavaron dos veces con PBS, se tiñeron con Hoechst durante 5 minutos, se lavaron una vez más con PBS, entonces se transfirieron a portaobjetos de microscopio, se cubrieron y se obtuvieron imágenes usando un microscopio confocal Zeiss LSM 710.

Por separado, para determinar si un anticuerpo anti-CACNG1 humano como se describe en la presente puede internalizarse en miofibras *ex vivo*, el fluoróforo Alexa 647 (A647) se conjugó directamente con el anticuerpo CACNG1 y un anticuerpo de control de isotipo. Las miofibras individuales se aislaron, se lavaron y se incubaron durante la noche. Al día siguiente, las miofibras se incubaron con 100 nM de los anticuerpos conjugados con A647 durante 30 minutos, 4 horas u 8 horas, y entonces se lavaron dos veces con PBS. Las miofibras se fijaron entonces con PFA al 4 % durante 15 minutos, se tiñeron con Hoechst durante 5 minutos, se lavaron una vez más con PBS, entonces se transfirieron a portaobjetos de microscopio, se cubrieron y se obtuvieron imágenes usando un microscopio confocal Zeiss LSM 710.

Dos anticuerpos CACNG1, Ab 4 anti-hCACNG1 y Ab 1 anti-hCACNG1, demostraron unión a miofibras CACNG1Hu/Hu *ex vivo* y no se unieron a miofibras tipo silvestre o inactivadas de CACNG1. Los anticuerpos de control de isotipo no se unieron a miofibras CACNG1Hu/Hu o miofibras tipo silvestre. (FIGURA 3).

La imagenología confocal de plano individual reveló que el anticuerpo CACNG1 conjugado con fluoróforo, Ab 2 anti-hCACNG1, se unió a la superficie de la miofibra después de 30 minutos de incubación, y que se internalizó dentro de la miofibra a las 4 horas. (FIGURA 1)

En conclusión, los anticuerpos CACNG1 se pueden unir a la superficie de miofibras individuales *ex vivo*. Además, el seguimiento de un anticuerpo CACNG1 conjugado con fluoróforo demuestra la unión inicial a la superficie de la miofibra, seguido de la internalización en la miofibra después de varias horas.

Ejemplo 5: Ensayo indicador de andrógenos de conjugado de anticuerpo CACNG1-DHT

CACNG1 es la subunidad $\gamma 1$ del receptor de dihidropiridina que se expresa específicamente en el músculo esquelético. Por lo tanto, los anticuerpos generados contra CACNG1 se podrían usar para administrar cargas terapéuticas conjugadas específicamente a músculo esquelético para mejorar la eficacia terapéutica en músculo y reducir la toxicidad fuera de diana. Por ejemplo, la conjugación del potente metabolito de testosterona, dihidrotestosterona (DHT), con anticuerpos CACNG1, puede permitir la señalización del receptor de andrógenos en el músculo, lo que conduce a un aumento de la masa y función muscular. Aquí, los anticuerpos CACNG1 conjugados con un enlazador con carga útil de DHT se probaron en una línea de células indicadora de receptor de andrógenos (AR) para determinar si estos conjugados de anticuerpo pueden activar específicamente el AR en células que expresan CACNG1 *in vitro*.

Para valorar la señalización a mediante el AR, las células LNCaP se transfectaron con lentivirus (Qiagen; ARE.Luc Signal Lenti) para generar una línea de células estable que expresara el indicador de AR-luciferasa (AR.Luc). Un subconjunto de estas células seleccionadas se transdujo para expresar CACNG1 humano y se seleccionó adicionalmente, con esta línea de células que se refiere como hCACNG1.AR.Luc.

Para el bioensayo, las células AR.Luc o hCACNG1.AR.Luc se colocaron en placas a 5,000 células/pozo en OptiMEM y FBS despojado de carbón al 0,5 % en placas de 96 pozos recubiertas con PDL. Las células entonces se incubaron durante 24, 48 o 27 horas con anticuerpos CACNG1 o anticuerpo de control de isotipo conjugado con DHT (a través de enlazador de carga útil L2), o DHT no conjugada sola. Todos los anticuerpos se conjugaron con DHT a una relación fármaco-anticuerpo (DAR) de ~ 4 . Después de los puntos de tiempo respectivos, las células se lisaron e incubaron con amortiguador One-GLO, y la luminiscencia se leyó en un lector de placas Envision. Las unidades de luminiscencia relativa (RLU) se graficaron contra la concentración logarítmica en mol/L, ajustada para DAR.

AR activado por DHT no conjugado en líneas de células AR.Luc (FIGURA 2) y hCACNG1.AR.Luc (FIGURA 3), en tanto que DHT conjugada con un anticuerpo de control de isotipo (Ab 1-L2 de control de isotipo) no activó AR en ninguna de estas líneas de células. Varios conjugados de anticuerpo CACNG1-DHT activaron AR solo en la línea de células hCACNG1.AR.Luc (FIGURA 3), pero no en la línea de células AR.Luc (FIGURA 2). En tanto que la eficacia y potencia de la activación de AR de conjugados de anticuerpo CACNG1-DHT

fue menor que la de DHT no conjugada a 24 horas después del tratamiento, la activación de AR se mantuvo a 48 y 72 horas con estos conjugados, mientras que la señal de AR no conjugada disminuyó sustancialmente en estos puntos de tiempo. En general, estos datos demuestran que la conjugación de DHT a anticuerpos de CACNG1 permite la activación específica del AR en células que expresan hCACNG1, y que DHT conjugada a anticuerpos de CACNG1 mantiene la señalización de AR sostenida durante varios días en células que expresan hCACNG1 *in vitro*.

Ejemplo 6: Biodistribución *in vivo*

Para determinar si los anticuerpos CACNG1 pueden dirigirse específicamente al músculo esquelético *in vivo*, se conjugaron anticuerpos CACNG1 (Ab 1 anti-hCACNG1 y Ab 2 anti-hCACNG1) y un anticuerpo de control de isotipo (Ab 4 de control de isotipo) con tinte fluorescente Alexa Fluor 647, y se inyectaron en la vena de la cola en ratones (n = 1/grupo) que eran homocigotos para la expresión de CACNG1 humano en lugar de CACNG1 de ratón (referido como CACNG1Hu/Hu) a una dosis de 10 mg/kg, o con control de solución salina. Seis días después de la inyección, los ratones se crioconservaron para el análisis de distribución de anticuerpos de cuerpo completo usando tomografía de criofluorescencia (Invivo). Un conjunto separado de ratones (n = 1/grupo) que se inyectaron con los mismos anticuerpos (o control de solución salina) se sacrificaron a los 6 días posteriores a la inyección y se perfundieron con PBS, y se recolectaron los siguientes tejidos para el análisis de inmunofluorescencia: tibial anterior, complejo gastrocnemio/plantar/sóleo, diafragma, lengua, músculo del suelo pélvico, tríceps, trapecio, hígado, riñón, bazo, adiposo pardo. Los tejidos se incrustaron en compuesto de tomografía de coherencia óptica (OCT), se congelaron en isopentano enfriado con nitrógeno líquido y posteriormente se crioseccionaron a 10 μ m en portaobjetos de microscopio. Las secciones de tejido se permeabilizaron entonces con Triton X-100, se bloquearon con BSA al 4 % y se incubaron con un anticuerpo de laminina derivado de conejo (Sigma) durante la noche. Al día siguiente, las secciones se lavaron, se tiñeron con anticuerpo secundario anti-Alexa 488 de conejo (Thermo Fisher), se contratiñeron con Hoescht, se lavaron, se fijaron con PFA al 4 %, se lavaron y se montaron con Fluoromount-G (Thermo Fisher). Los tejidos se formaron en imágenes en un escáner de portaobjetos Zeiss Axioscan Z1 para visualizar la distribución tisular de anticuerpos conjugados con Alexa 647.

Los anticuerpos CACNG1 conjugados con Alexa 647, Ab 2 anti-hCACNG1 y Ab 1 anti-hCACNG1 mostraron una señal clara en múltiples músculos esqueléticos mediante imagenología por tomografía de criofluorescencia, en tanto que el anticuerpo de control de

isotipo no mostró captación muscular y se acumuló principalmente en la vejiga (FIGURA 4). El control dosificado con solución salina no mostró ninguna señal fluorescente apreciable en todo el ratón. La señal fluorescente en el músculo pareció más fuerte en el ratón dosificado con Ab 2 anti-hCACNG1 del anticuerpo CACNG1 en comparación con Ab 1 anti-hCACNG1, aunque su patrón de distribución muscular general fue similar.

La imagenología de fluorescencia de las secciones de tejido reveló la captación de anticuerpos CACNG1 conjugados con Alexa 647 Ab 2 anti-hCACNG1 y Ab 1 anti-hCACNG1 en múltiples músculos esqueléticos, que incluyen: complejo gastrocnemio/plantar/sóleo, diafragma, lengua, músculo del suelo pélvico, tríceps y trapecio (FIGURA 5). De manera similar a los descubrimientos de imagenología de tomografía de criofluorescencia, la señal general de Ab 2 anti-hCACNG1 pareció más fuerte en las secciones musculares en comparación con Ab 1 anti-hCACNG1. Ni el Ab 2 anti-hCACNG1 ni Ab 1 anti-hCACNG1 mostraron ninguna tinción clara en múltiples tejidos no musculares, incluido: hígado, riñón, bazo y tejido adiposo pardo (FIGURA 6).

Estos estudios de biodistribución *in vivo* demostraron que los anticuerpos CACNG1 conjugados con fluoróforo se dirigen específicamente al músculo esquelético y no son captados por otros tejidos no musculares.

Ejemplo 7 : La distribución de anticuerpos CACNG1 en el músculo se altera por ejercicio y dosis

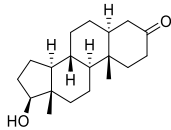
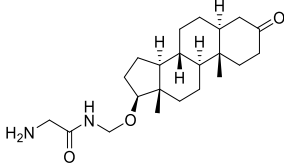
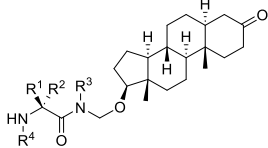
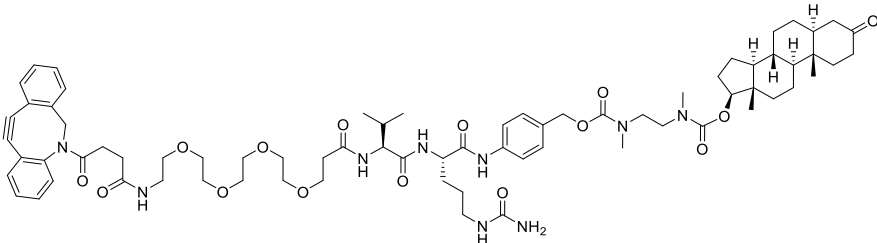
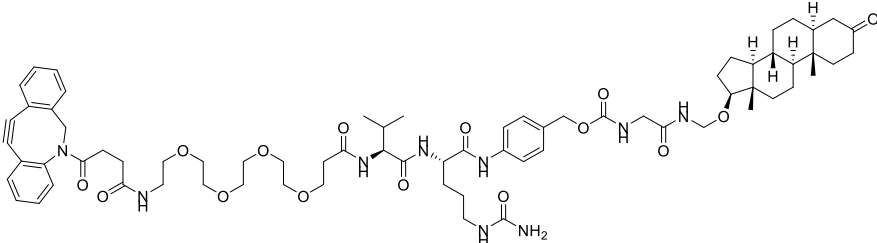
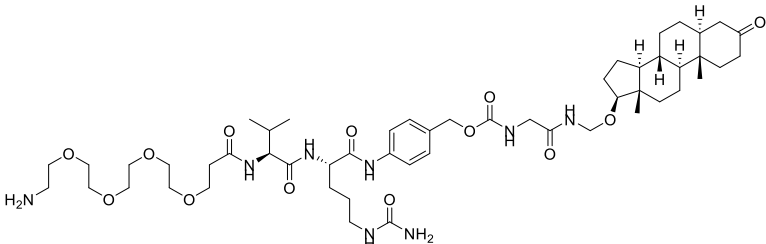
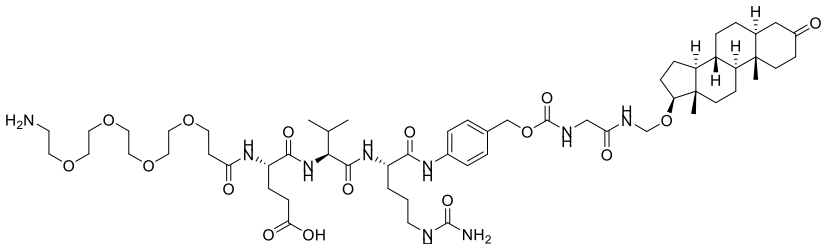
Para probar métodos para mejorar la distribución de anticuerpos CACNG1 al músculo, se dosificaron ratones CACNG1^{Hu/Hu} con 10 mg/kg o 50 mg/kg de anticuerpo CACNG1, y se proporcionó acceso a un subconjunto de ratones a ruedas de ejercicio (FIGURA 7, panel superior). La ejecución de la rueda mejoró la distribución de anticuerpos CACNG1 al músculo sóleo de trabajo, y la dosis de 50 mg/kg también mostró una distribución mejorada en todo el sóleo (FIGURA 7, panel inferior).

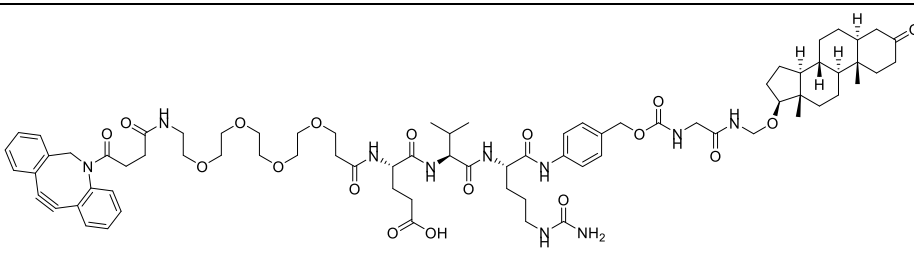
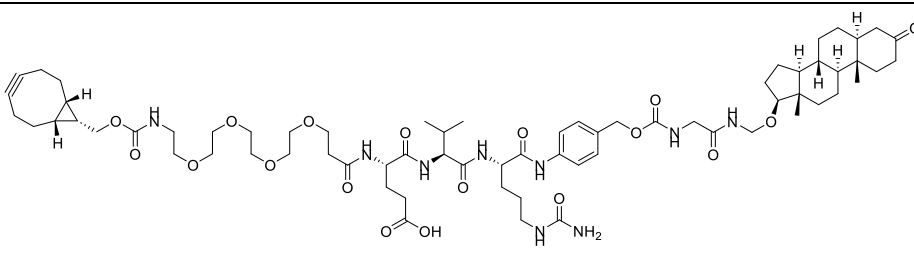
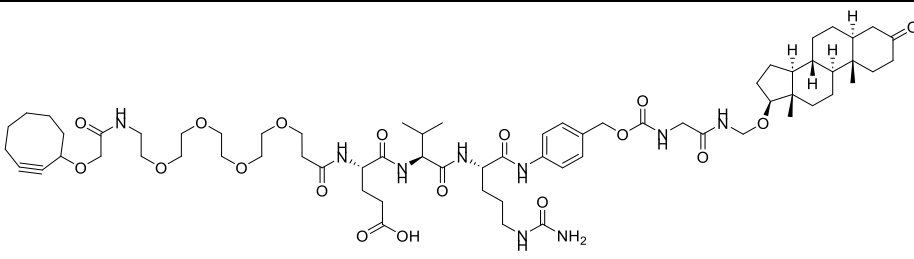
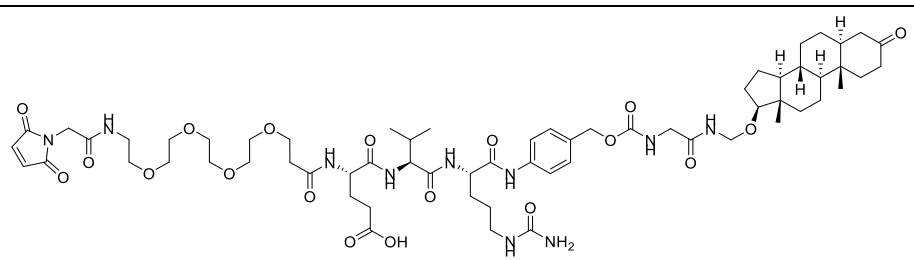
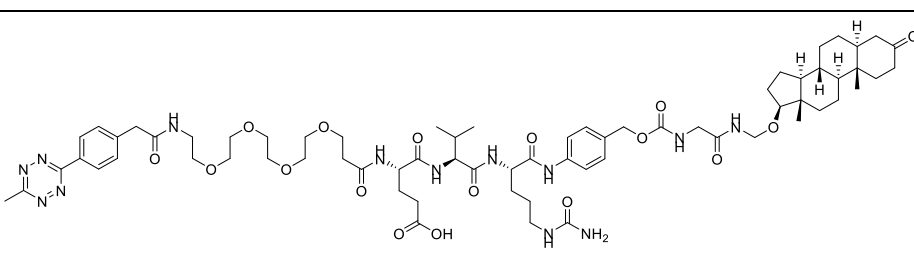
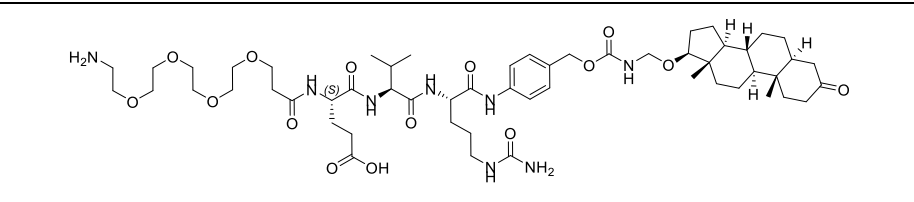
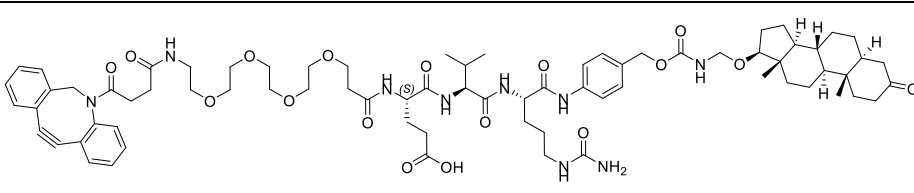
Ejemplo 8: Preparación de cargas útiles y enlazador-cargas útiles

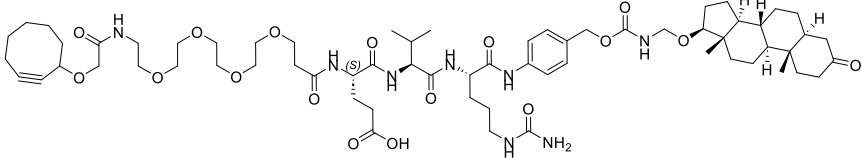
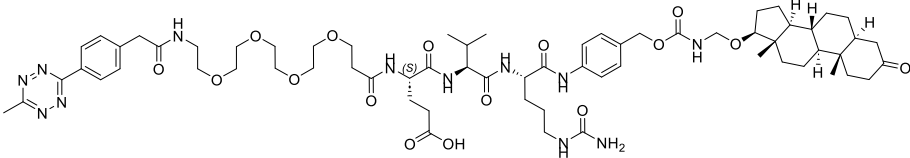
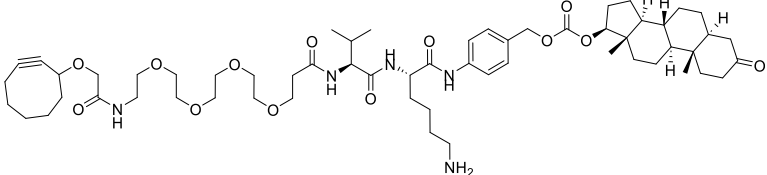
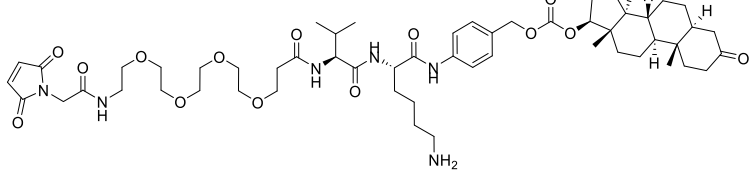
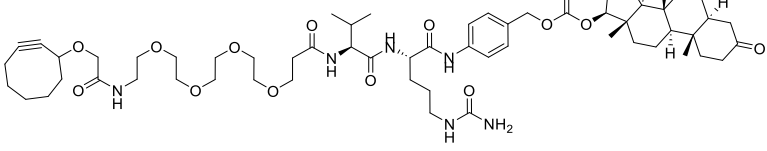
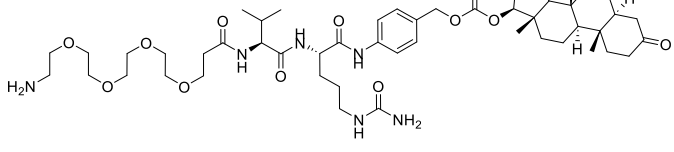
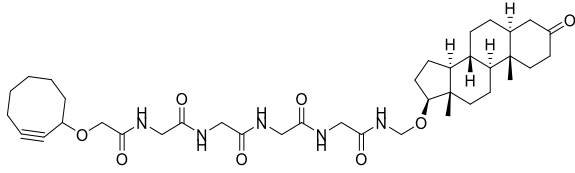
Los compuestos de ejemplo (cargas útiles y enlazador-cargas útiles) de acuerdo con la presente divulgación se representan en la tabla 3, a continuación.

Tabla 3. Estructuras de compuestos

Comp.	Enlazador	Estructuras
-------	-----------	-------------

No.		
DHT	/	
ProDHT	Gly-NHCH ₂ -DHT	
Otros AA-ProDHT	AA-NRCH ₂ -DHT	
LP1	DIBAC-PEG ₄ -vcPAB-DME-DHT	
LP2	DIBAC-PEG ₄ -vcPAB-ProDHT	
LP2A	NH ₂ -PEG ₄ -vcPAB-ProDHT	
LP3A	NH ₂ -PEG ₄ -EvcPAB-ProDHT	

LP3	DIBAC- PEG ₄ - EvcPAB- ProDHT	
LP31	BCN-PEG ₄ - EvcPAB- ProDHT	
LP32	COT-PEG ₄ - EvcPAB- ProDHT	
LP33	Mc-PEG ₄ - EvcPAB- ProDHT	
LP4	Tz-PEG ₄ - EvcPAB- ProDHT	
LP5A	NH ₂ -PEG ₄ - EvcPAB- NHCH ₂ - DHT	
LP5	DIBAC- PEG ₄ - EvcPAB- NHCH ₂ -	

	DHT	
LP51	COT-PEG ₄ - EvcPAB- NHCH ₂ - DHT	
LP52	Tz-PEG ₄ - EvcPAB- NHCH ₂ - DHT	
LP41	COT-PEG ₄ - VK-PABC- DHT	
LP42	Mc-PEG ₄ - VK-PABC- DHT	
LP43	COT-PEG ₄ - vcPABC- DHT	
LP44	NH ₂ -PEG ₄ - vcPABC- DHT	
LP6	COT- GGGG- NHCH ₂ - DHT (SEQ ID NO: 292)	(SEQ ID NO: 292) 

LP61A	NH ₂ -PEG ₄ - VK(Pr ₂)G- NHCH ₂ - DHT	
LP61	COT-PEG ₄ - VK(Pr ₂)G- NHCH ₂ - DHT	
LP7	COT-PEG ₄ - ramificación -PEG ₂ - EvcPAB- ProDHT	

Las propiedades químicas de los compuestos de ejemplo (cargas útiles y enlazador-cargas útiles) de acuerdo con la presente divulgación se representan en la tabla 4, más adelante.

5 Tabla 4. Propiedades químicas de cargas útiles y enlazador-cargas útiles:

Comp. No.	Nombre de enlazador	cLogP	MF	MW	Pureza de HPLC (%)	HPLC RT (min)	Masa ESI m/z
ProDHT	Gly-NHCH ₂ -DHT	2,26	C ₂₂ H ₃₆ N ₂ O ₃	376,5	>99 (LCMS)	1,03 (LCMS)	399 (M + Na) ⁺
LP1	DIBAC-PEG ₄ -vcPAB-DME-DHT	5,46	C ₇₃ H ₁₀₁ N ₉ O ₁₅	1344,7	>99	8,31	672,9 (M/2 + H) ⁺
LP2	DIBAC-PEG ₄ -	4,33	C ₇₁ H ₉₇ N ₉ O ₁₅	1316,6	>99	8,40	659 (M/2 + H) ⁺

	vcPAB-ProDHT						
LP2A	NH ₂ -PEG ₄ -vcPAB-ProDHT	1,51	C ₅₂ H ₈₄ N ₈ O ₁₃	1029,3	>90		1029,6 (M + H) ⁺
LP3A	NH ₂ -PEG ₄ -EvcPAB-ProDHT	-1,64	C ₅₇ H ₉₁ N ₉ O ₁₆	1158,4	>93 (LCMS)	1,36 (LCMS)	1160 (M + H) ⁺
LP3	DIBAC-PEG ₄ -EvcPAB-ProDHT	3,44	C ₇₆ H ₁₀₄ N ₁₀ O ₁₈	1445,7	>99	7,32	723 (M/2 + H) ⁺
LP31	BCN-PEG ₄ -EvcPAB-ProDHT	3,31	C ₆₈ H ₁₀₃ N ₉ O ₁₈	1334,6	96		668 (M/2 + H) ⁺
LP32	COT-PEG ₄ -EvcPAB-ProDHT	2,69	C ₆₇ H ₁₀₃ N ₉ O ₁₈	1322,6	97		662 (M/2 + H) ⁺ .
LP33	Mc-PEG ₄ -EvcPAB-ProDHT	-0,27	C ₆₃ H ₉₄ N ₁₀ O ₁₉	1295,5	>90		648,3 (M/2 + H) ⁺
LP4	Tz-PEG ₄ -EvcPAB-ProDHT	1,78	C ₆₈ H ₉₉ N ₁₃ O ₁₇	1370,6	>98	8,74	1371 (M + H) ⁺
LP5A	NH ₂ -PEG ₄ -EvcPAB-NHCH ₂ O-DHT	-0,54	C ₅₅ H ₈₈ N ₈ O ₁₅	1101,4	>98	6,90	1101 (M + H) ⁺
LP5	DIBAC-PEG ₄ -EvcPAB-NHCH ₂ O-DHT	4,54	C ₇₄ H ₁₀₁ N ₉ O ₁₇	1388,7	>99	7,24	695 (M/2 + H) ⁺

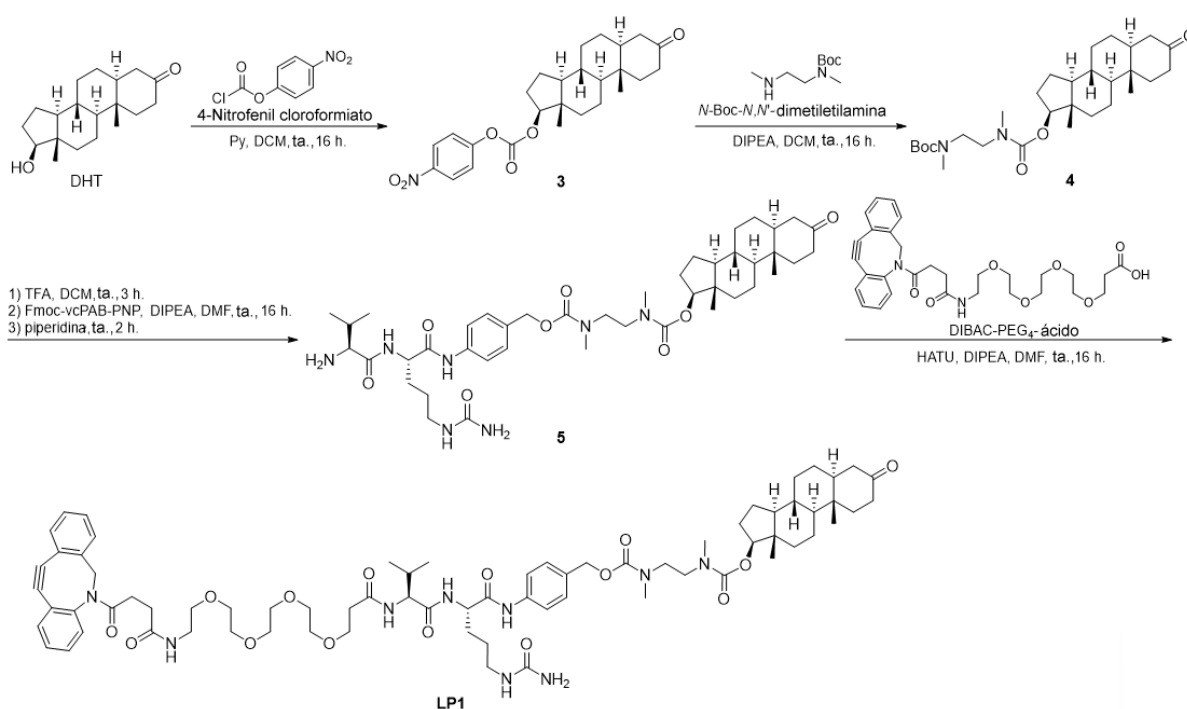
LP51	COT-PEG ₄ - EvcPAB- NHCH ₂ -DHT	3,80	C ₆₅ H ₁₀₀ N ₈ O ₁₇	1265,6	96		632,3 (M/2 + H) ⁺
LP52	Tz-PEG ₄ - EvcPAB- NHCH ₂ -DHT	2,81	C ₆₆ H ₉₆ N ₁₂ O ₁₆	1313,6	>90		657,3 (M/2 + H) ⁺
LP41	COT-PEG ₄ - VK-PABC- DHT	6,32	C ₅₉ H ₉₁ N ₅ O ₁₃	1078,4	>95		1079,5 (M + H) ⁺
LP42	Mc-PEG ₄ - VK-PABC- DHT	3,35	C ₅₅ H ₈₂ N ₆ O ₁₄	1051,3	>98		1052 (M + H) ⁺
LP43	COT-PEG ₄ - vcPABC- DHT	5,36	C ₅₉ H ₉₀ N ₆ O ₁₄	1107,4	>95		1108 (M + H) ⁺
LP44	NH ₂ -PEG ₄ - vcPABC- DHT	3,28	C ₄₉ H ₇₈ N ₆ O ₁₂	943,2	>90		943,5 (M + H) ⁺
LP6	COT- GGGG- NHCH ₂ -DHT (SEQ ID NO: 292)	1,02	C ₃₈ H ₅₇ N ₅ O ₈	711,9	>99	7,99	422 (M _{LP6} – M _{DHT} + H) ⁺
LP61A	NH ₂ -PEG ₄ - VK(Pr ₂)G- NHCH ₂ -DHT	3,18	C ₅₀ H ₉₀ N ₆ O ₁₀	935,9	>90		935,7 (M + H) ⁺
LP61	COT-PEG ₄ - VK(Pr ₂)G- NHCH ₂ -DHT	5,26	C ₆₀ H ₁₀₂ N ₆ O ₁₂	1099,5	>90		1100,0 (M + H) ⁺
LP7	COT-PEG ₄ - ramificación- PEG2- EvcPAB-	1,40	C ₁₃₂ H ₂₀₄ N ₂₀ O ₃₇	2663,2	>98	7,50	1332 (M/2 + H) ⁺

(0,30 g, 58 % de rendimiento) como un sólido blanco. ESI m/z 399 ($M + Na$)⁺. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,60-8,41 (m, 1H), 4,69-4,48 (m, 2H), 3,57-3,39 (m, 4H), 3,14 (s, 1H), 2,46-2,36 (m, 1H), 2,34-2,25 (m, 1H), 2,12-1,82 (m, 4H), 1,79-1,71 (m, 1H), 1,65-1,58 (m, 1H), 1,56-1,03 (m, 12H), 0,97 (s, 3H), 0,94-0,63 (m, 2H), 0,63 (s, 3H) ppm.

5 LP1

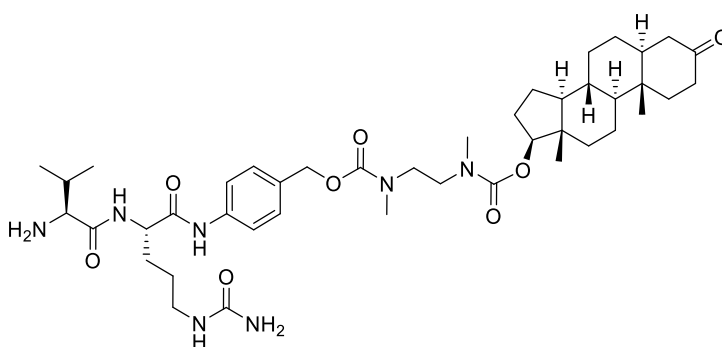
La síntesis de LP1 se representa en el esquema de reacción 2, más adelante.

Esquema 2. Síntesis de LP1



{4-[(2S)-2-[(2S)-2-amino-3-metilbutanamido]-5-(carbamoilamino)pentanamido]

10 fenil]metilo N-{2-[[{[(1S,2S,7S,10R,11S,14S,15S)-2,15-dimetil-5-oxotetraciclo [8.7.0.0.2⁷,7.0¹¹,1¹⁵]heptadecan-14-il]oxi}carbonil](metil)amino]etil}-N-metilcarbamato (5)

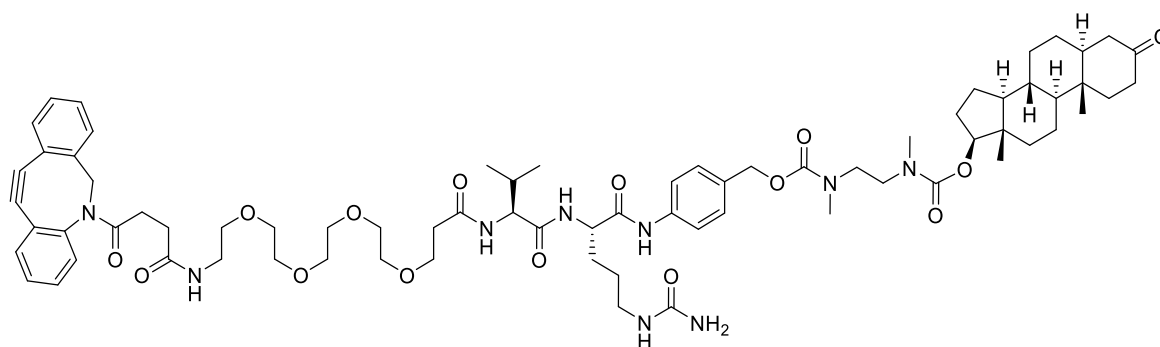


Una mezcla de DHT (1,2 g, 4,1 mmol) y cloroformiato de 4-nitrofenilo (0,89 g, 4,4 mmol) en DCM (15 ml) se enfrió a 0 °C y, a esta temperatura, se adicionó piridina (0,38 g, 4,8 mmol) a la mezcla. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas, que se monitoreó por LCMS. La mezcla resultante se diluyó con DCM (150 ml), se lavó con bicarbonato de sodio ac. sat. (30 ml) y salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía rápida en gel de sílice (30-100 % de DCM en éter de petróleo) para dar el compuesto **3** (1,6 g) como un sólido blanquecino.

A una solución del compuesto **3** (0,91 g, 2,0 mmol) en DCM (10 ml) se adicionaron *N*-Boc-*N,N'*-dimetiletilamina (0,75 g, 4,0 mmol) y DIPEA (0,52 g, 4,0 mmol), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas, que se monitoreó por LCMS. La mezcla resultante se diluyó con DCM (150 ml), se lavó con ácido cítrico ac. (1 M, 40 ml x 2), bicarbonato de sodio ac. sat. (40 ml x 2) y salmuera (40 ml) sucesivamente, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró *al vacío* para dar el compuesto **4** (0,50 g) como un sólido blancuzco.

A una solución del compuesto **4** (0,20 g, 0,40 mmol) en DCM (5 ml) se adicionó TFA (0,5 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla resultante se concentró al vacío. El residuo se disolvió en DMF (3 ml), y a la solución se adicionaron Fmoc-vcPAB-PNP (CAS: 863971-53-3, 0,30 g, 0,39 mmol) y DIPEA (0,5 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas, que se monitoreó por LCMS. A la solución resultante entonces se adicionó piperidina (0,2 ml) en una porción y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante otras 2 horas hasta que Fmoc removió totalmente de acuerdo con LCMS. La mezcla se separó directamente por prep-HPLC (5-95 % de acetonitrilo en TFA ac. (0,1 %)) para dar el compuesto **5** (50 mg, 6,0 % de rendimiento total a partir de DHT) como un sólido blanco. ESI *m/z* 810,3 (*M* + *H*)⁺.

N-{2-[[[(1*S*,2*S*,7*S*,10*R*,11*S*,14*S*,15*S*)-2,15-dimetil-5-oxotetraciclo[8.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]heptadecan-14-il]oxi]carbonil(metil)amino]etil]-*N*-metilcarbamato de {4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-azatriciclo [10.4.0.0^{4,9}]hexadeca-1(12),4(9),5,7,13,15-hexaen-10-in-2-il]-4-oxobutanamido)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amido]-3-metilbutanamido]-5-(carbamoilamino)pentanamido]fenil}metilo (LP1)

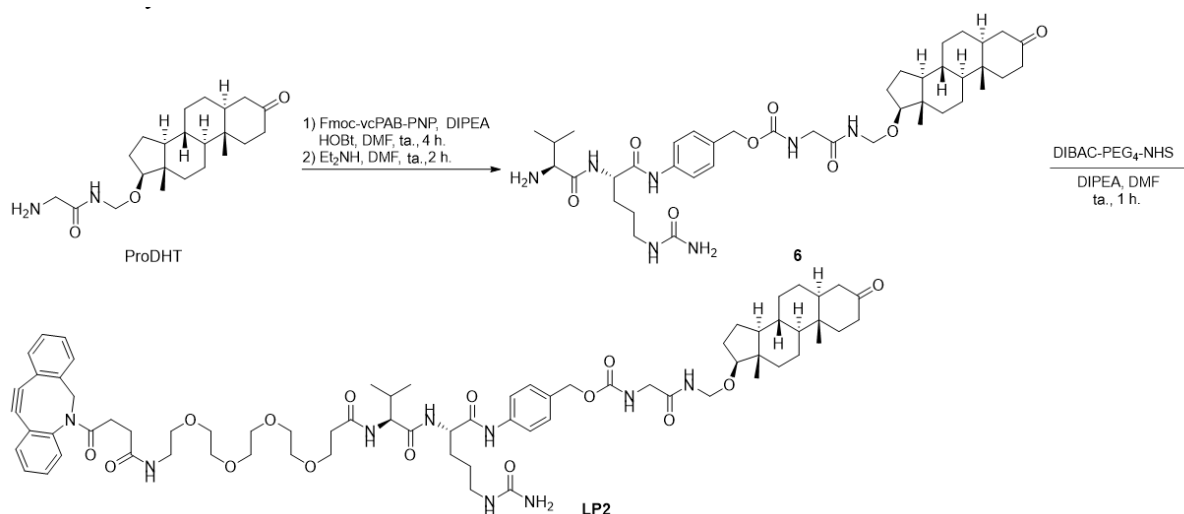


A una solución del compuesto **5** (0,25 g, 31 μmol) en DMF (0,55 ml) se adicionaron ácido DIBAC-PEG4 (CAS: 1537170-85-6, 20 mg, 37 μmol), DIPEA (19 mg, 0,15 mmol) y HATU (17 mg, 45 μmol), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas, que se monitoreó por LCMS. La mezcla resultante se separó directamente por prep-HPLC (5-95 % de acetonitrilo en bicarbonato ac. (10 mM)) para dar **LP1** (13 mg, 31 % de rendimiento) como un sólido blanco. ESI m/z 672,9 ($M/2 + H$)⁺. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,98 (s, 1H), 8,12 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H), 7,91-7,24 (m, 13H), 5,98 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 5,41 (s, 2H), 5,08-4,88 (m, 3H), 4,45-4,15 (m, 3H), 3,64-3,55 (m, 3H), 3,50-3,42 (m, 9H), 3,31-3,28 (m, 2H), 3,14-2,89 (m, 4H), 2,88-2,65 (m, 5H), 2,64-2,16 (m, 20H), 2,13-1,83 (m, 6H), 1,81-1,15 (m, 14H), 1,01-0,63 (m, 14H) ppm.

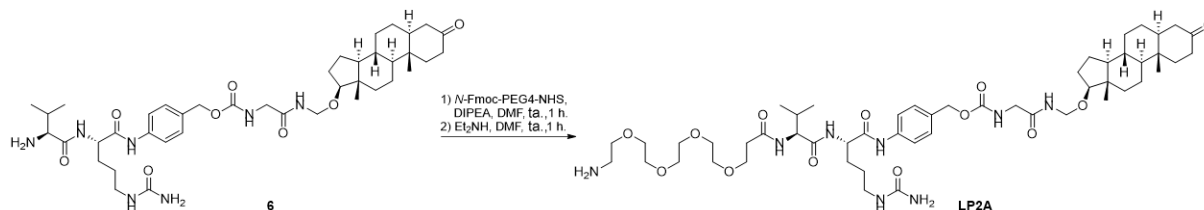
LP2 y LP2A

La síntesis de LP2 se representa en el esquema de reacción 3, y la síntesis de LP2A se representa en el esquema 3a, más adelante.

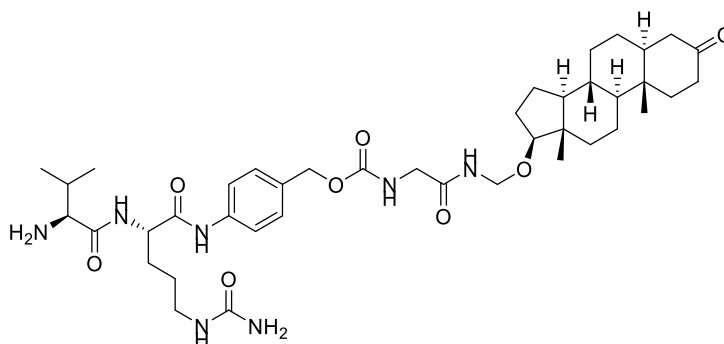
Esquema 3. Síntesis de LP2



Esquema 3A. Síntesis de LP2A

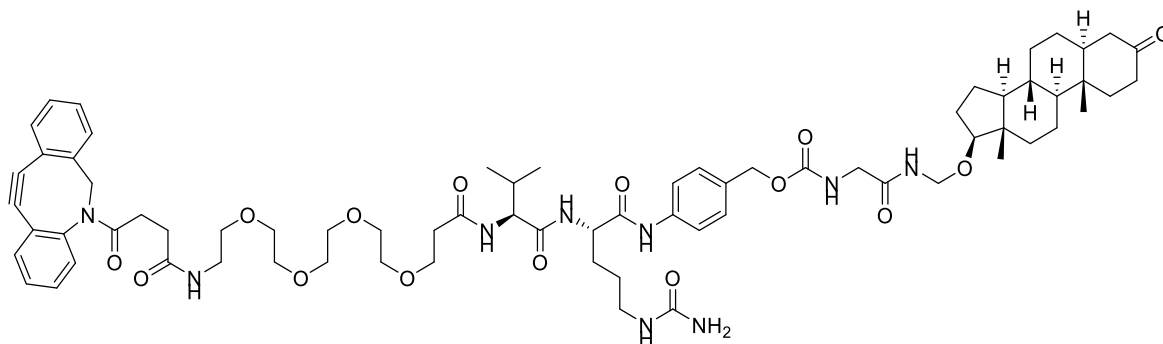


5 N-[[[[(1S,2S,7S,10R,11S,14S,15S)-2,15-dimetil-5-oxotetraciclo[8.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]heptadecan-14-il]oxi}metil)carbamoil]metil]carbamato de {4-[(2S)-2-[(2S)-2-amino-3-metilbutanamido]-5-(carbamoilamino)pentanamido]fenil}metilo (6)



10 A una solución de ProDHT (0,10 g, 0,27 mmol) en DMF (5 ml) se adicionaron HOBT (18 mg, 0,13 mmol) y DIPEA (0,11 g, 0,81 mmol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos antes de la adición de Fmoc-vcPAB-PNP (0,21 g, 0,27 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas, que se monitoreó por LCMS. La mezcla resultante se separó directamente por prep-HPLC (5-95 % de acetonitrilo en TFA ac. (0,1 %)) para dar un sólido blanco (0,17 g, ESI m/z 1027,5 (M + Na)⁺), que se disolvió en DMF (5 ml). A la solución se adicionó dietilamina (60 mg, 0,82 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, que se monitoreó por LCMS. La mezcla
15 resultante se purificó directamente por cromatografía rápida de fase inversa (0-100 % de acetonitrilo en bicarbonato de amonio ac. (10 mM)) para dar el compuesto **6** (0,11 g, 52 % de rendimiento) como un sólido blanco. ESI m/z 783 (M + H)⁺.

20 N-[[[[(1S,2S,7S,10R,11S,14S,15S)-2,15-dimetil-5-oxotetraciclo[8.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]heptadecan-14-il]oxi}metil) carbamoil]metil]carbamato de {4-[(2S)-2-[(2S)-2-[1-(4-{2-azatriciclo[10.4.0.0^{4,9}]hexadeca-1(12),4(9),5,7,13,15-hexaen-10-in-2-il]-4-oxobutanamido)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amido]-3-metilbutanamido]-5-(carbamoilamino)pentanamido]fenil}metilo (LP2)



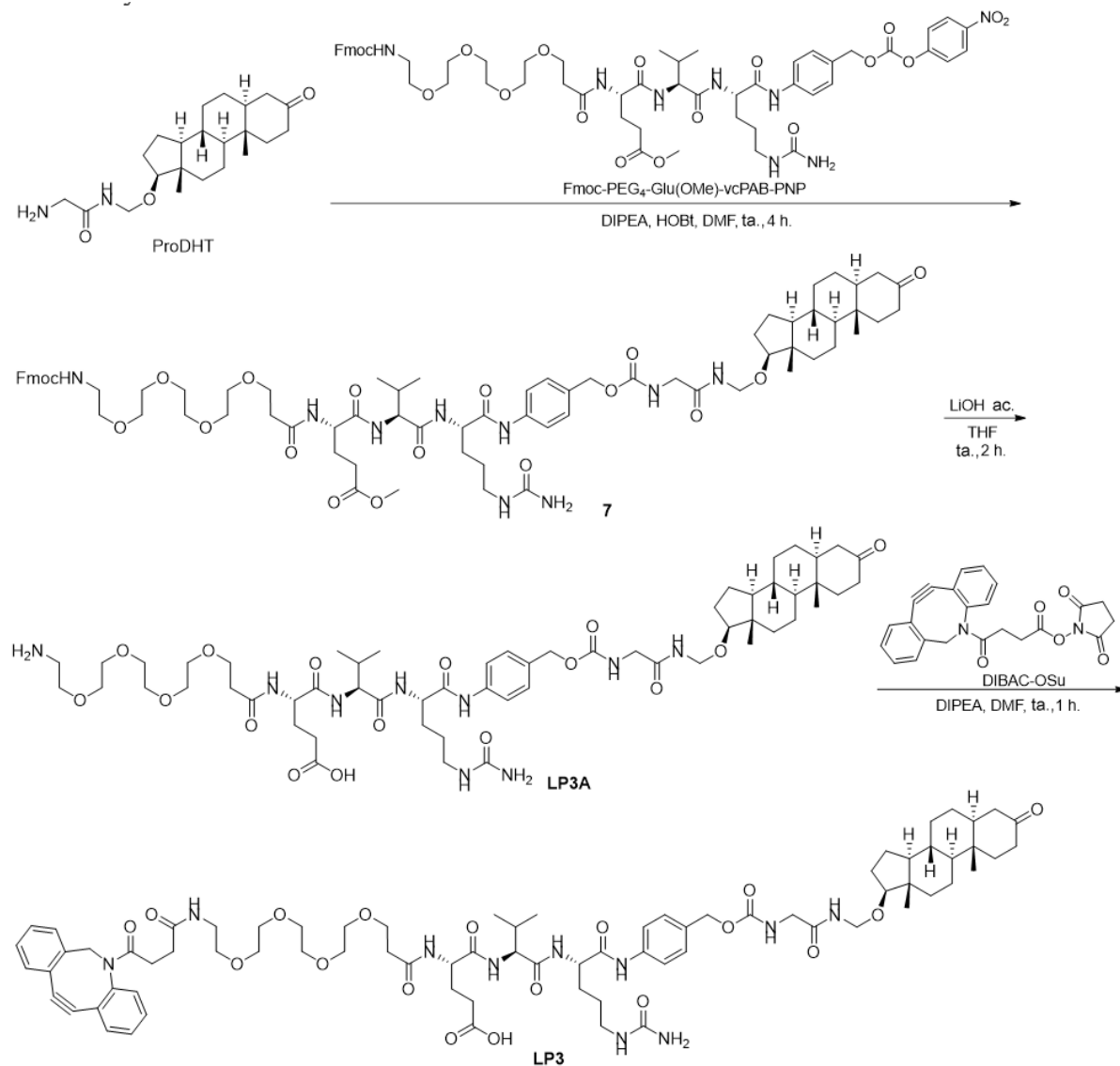
A una solución agitada del compuesto **6** (0,11 g, 0,14 mmol) en DMF (4 ml) se adicionaron DIBAC-PEG₄-NHS (0,14 g, 0,14 mmol) y DIPEA (53 mg, 0,41 mmol), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una hora, que se monitoreó por LCMS.

5 La mezcla resultante se separó directamente por cromatografía rápida de fase inversa (5-95 % de acetonitrilo en bicarbonato de amonio ac. (10 mM)) para dar **LP2** (90 mg, 51 % de rendimiento) como un sólido blanco. ESI m/z 659 (M/2 + H)⁺. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,00 (s, 1H), 8,56 (t, *J* = 6,7 Hz, 1H), 8,14 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,89 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 7,78 (t, *J* = 5,5 Hz, 1H), 7,68 (dd, *J* = 7,3, 1,4 Hz, 1H), 7,65-7,58 (m, 3H), 7,52-7,39 (m, 4H), 7,38-
 10 7,33 (m, 2H), 7,31-7,27 (m, 2H), 5,98 (t, *J* = 6,0 Hz, 1H), 5,42 (s, 2H), 5,03 (d, *J* = 14,0 Hz, 1H), 4,96 (s, 2H), 4,60-4,51 (m, 1H), 4,50-4,45 (m, 1H), 4,42-4,26 (m, 1H), 4,23-4,20 (m, 1H), 3,67-3,55 (m, 5H), 3,52-3,42 (m, 11H), 3,30-3,15 (m, 2H), 3,13-2,89 (m, 5H), 2,70-2,20 (m, 6H), 2,15-1,65 (m, 8H), 1,58-1,05 (m, 21H), 0,96 (s, 3H), 0,84 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H), 0,82 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H), 0,67 (s, 3H) ppm.

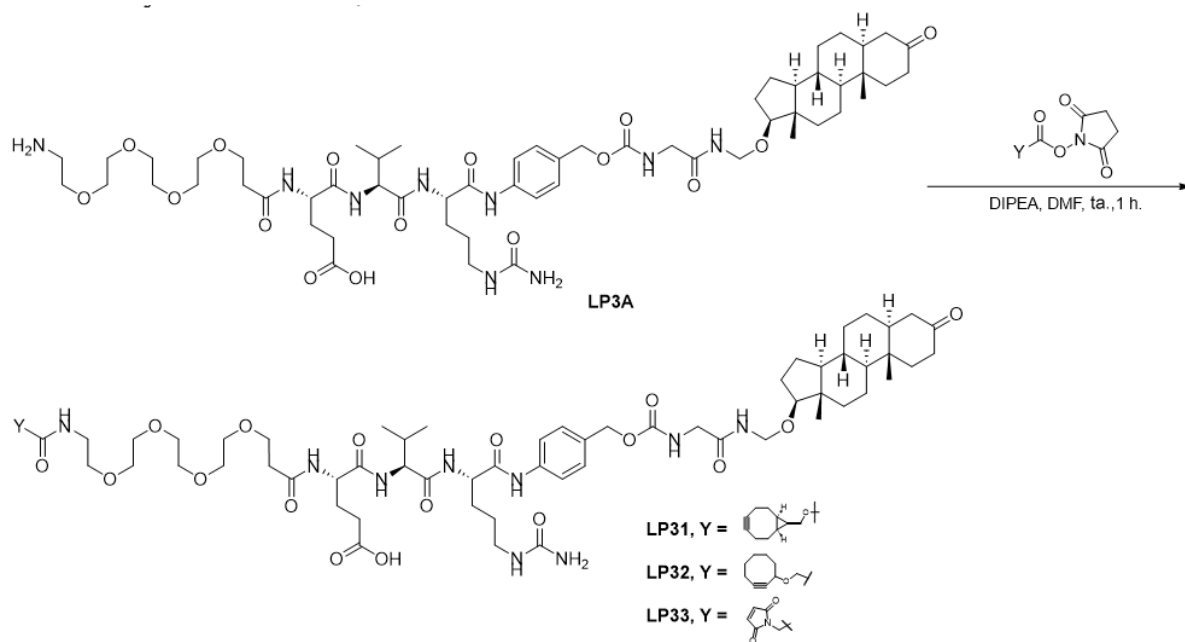
15 LP3A, LP3, LP31, LP32 y LP33

La síntesis de LP3A y LP3 se representa en el esquema de reacción 4, más adelante. Sintetizar si LP31, LP32 y LP33 se representan en el esquema de reacción 4a, más adelante.

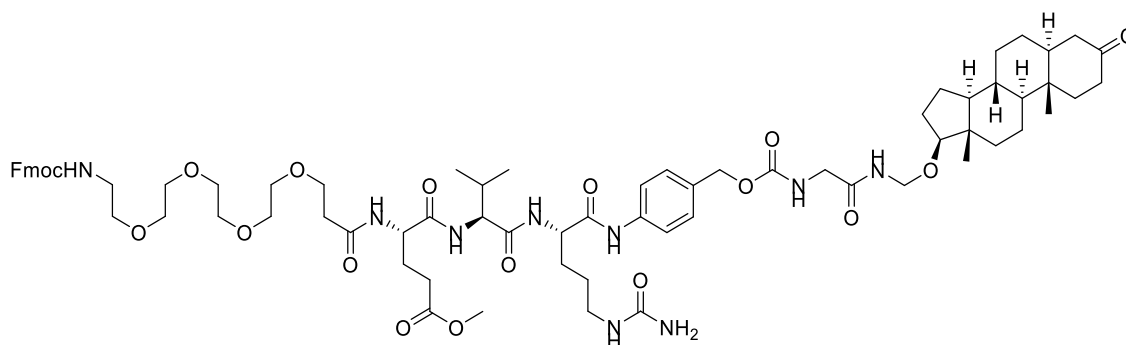
Esquema 4. Síntesis de LP3



Esquema 4a. Síntesis de LP31, LP32 y LP33

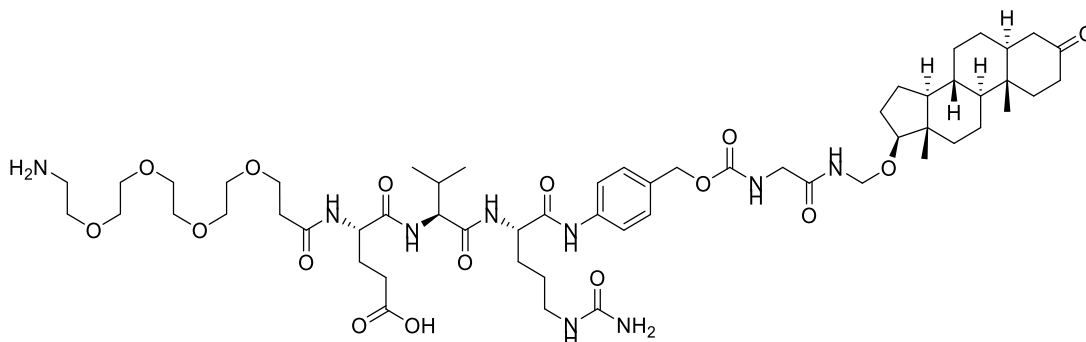


(4S)-4-[[[(1S)-1-[[[(1S)-4-(carbamoilamino)-1-[4-[[[(1S,2S,7S,10R,11S,14S,15S)-2,15-dimetil-5-oxotetraciclo[8.7.0.0²,7.0¹¹,1⁵]]heptadecan-14-il]oxi}metil)carbamoil]metil]carbamoil]oxi]metil]fenil)carbamoil]butil]carbamoil]-2-metilpropil]carbamoil]-4-[1-((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil]amino)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amido]butanoato de metilo (7)



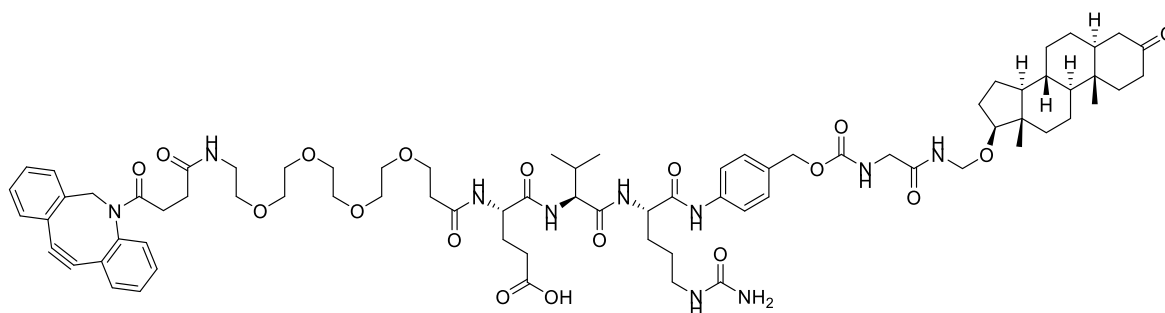
A una solución de ProDHT (35 mg, 93 μmol) en DMF (5 ml) se adicionaron HOBt (6,0 mg, 44 μmol) y DIPEA (35 mg, 0,27 mmol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos antes de la adición de Fmoc-PEG4-Glu(OMe)-vcPAB-PNP (CAS: 2758874-82-5, sintetizado de acuerdo con WO2022015656, 0,11 g, 95 μmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas, que se monitoreó por LCMS. La mezcla resultante se separó directamente por prep-HPLC (5-95 % de acetonitrilo en TFA ac. (0,01 %)) para dar el compuesto **7** (0,11 g, 85 % de rendimiento) como un sólido blanco. ESI m/z 1396 (M + H)⁺.

Ácido (4S)-4-(1-amino-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amido)-4-[[[(1S)-1-[[[(1S)-4-(carbamoylamino)-1-[(4-[[[[(1S,2S,7S,10R,11S,14S,15S)-2,15-dimetil-5-oxotetraciclo[8.7.0.0²,⁷.0¹¹,¹⁵]heptadecan-14-il]oxi}metil)carbamoyl]metil]carbamoyl]oxi]metil]fenil)carbamoyl]butil]carbamoyl]-2-metilpropil]carbamoyl]butanoico (LP3A)



A una solución del compuesto **7** (0,11 g, 77 μ mol) en THF (5 ml) se adicionó hidróxido de litio ac. (1 M, 0,38 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, que se monitoreó por LCMS. Los compuestos volátiles se removieron al vacío y el residuo se separó por cromatografía rápida de fase inversa (5-95 % de acetonitrilo en TFA ac. (0,01 %)) para dar el compuesto **LP3A** (78 mg, 88 % de rendimiento) como un sólido blanco. ESI m/z 1160 (M + H)⁺.

Ácido (4S)-4-[1-(4-{2-azatriciclo[10.4.0.0⁴,⁹]hexadeca-1(12),4(9),5,7,13,15-hexaen-10-in-2-il}-4-oxobutanamido)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amido]-4-[[[(1S)-1-[[[(1S)-4-(carbamoylamino)-1-[(4-[[[[(1S,2S,7S,10R,11S,14S,15S)-2,15-dimetil-5-oxotetraciclo[8.7.0.0²,⁷.0¹¹,¹⁵]heptadecan-14-il]oxi}metil)carbamoyl]metil]carbamoyl]oxi]metil]fenil)carbamoyl]butil]carbamoyl]-2-metilpropil]carbamoyl]butanoico (LP3)

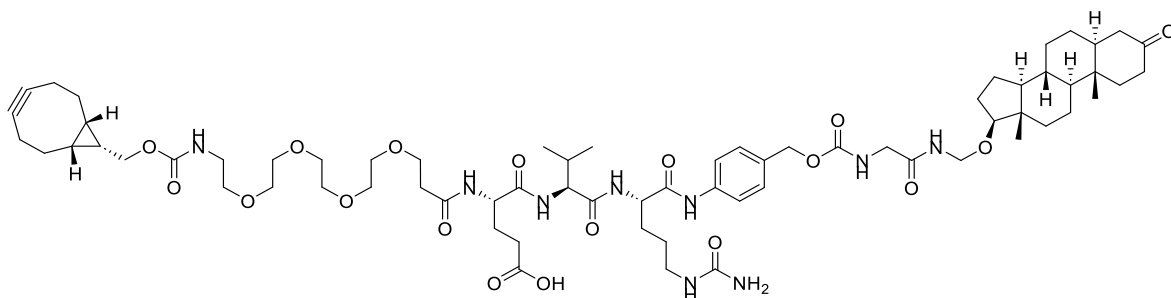


A una mezcla agitada de **LP3A** (78 mg, 67 μ mol) en DMF (4 ml) se adicionó DIBAC-

OSu (CAS: 1353016-71-3, comercial, 41 mg, 67 μ mol) y DIPEA (26 mg, 0,20 mmol) sucesivamente, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una hora, que se monitoreó por LCMS. La mezcla resultante se separó directamente por prep-HPLC (5-95 % de acetonitrilo en bicarbonato de amonio ac. (10 mM)) para dar **LP3** (30 mg, 31 % de rendimiento) como un sólido blanco. ESI m/z 723 (M/2 + H)⁺. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10,00 (s, 1H), 8,56 (t, J = 6,7 Hz, 1H), 8,14 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,89 (d, J = 8,9 Hz, 1H), 7,83-7,70 (m, 1H), 7,68 (dd, J = 7,3, 1,4 Hz, 1H), 7,65-7,55 (m, 3H), 7,52-7,25 (m, 8H), 6,01 (br s, 1H), 5,42 (s, 2H), 5,03 (d, J = 14,0 Hz, 1H), 4,96 (s, 2H), 4,60-4,51 (m, 1H), 4,50-4,45 (m, 1H), 4,42-4,26 (m, 1H), 4,23-4,20 (m, 1H), 3,67-3,55 (m, 5H), 3,52-3,20 (m, 15H), 3,13-2,89 (m, 5H), 2,70-2,40 (m, 9H), 2,30-1,84 (m, 8H), 1,80-1,05 (m, 22H), 0,96 (s, 3H), 0,85 (d, J = 6,7 Hz, 3H), 0,83 (d, J = 6,7 Hz, 3H), 0,67 (s, 3H) ppm. (no se reveló COOH).

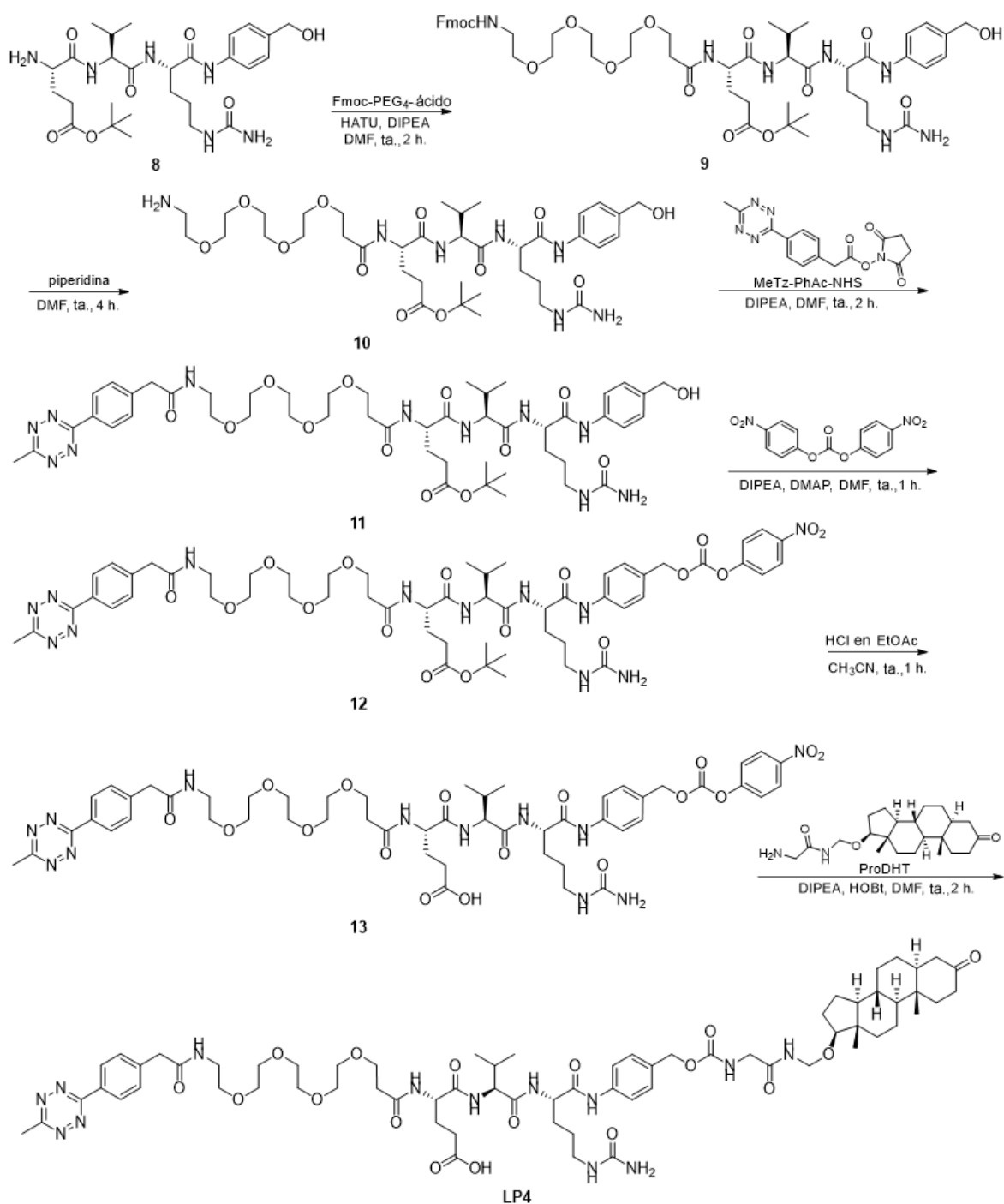
LP31, LP32 y LP33

Ácido (4S)-4-{1-[[[[(1R,8S,9R)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-il]metoxi]carbonil]amino]-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amido}-4-[[[(1S)-1-[[[(1S)-4-(carbamoilamino)-1-[[4-[[[[(1S,2S,7S,10R,11S,14S,15S)-2,15-dimetil-5-oxotetraciclo[8.7.0.0²,⁷.0¹¹,¹⁵]heptadecan-14-il]oxi]metil]carbamoil]metil]carbamoil]oxi]metil]fenil]carbamoil]butil]carbamoil]-2-metilpropil]carbamoil]butanoico (LP31)

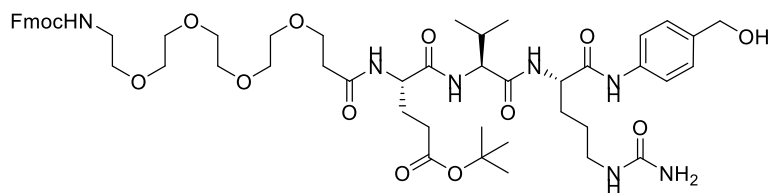


Si siguiendo un procedimiento similar a LP3, excepto que se usó BCN-OSu en lugar de DIBAC-OSu, se obtuvo el enlazador-carga útil LP31 (1,2 mg, 18 % de rendimiento) como un sólido blanco. ESI m/z: 667,9 (M/2 + H)⁺.

Ácido (4S)-4-[[[(1S)-1-[[[(1S)-4-(carbamoilamino)-1-[[4-[[[[(1S,2S,7S,10R,11S,14S,15S)-2,15-dimetil-5-oxotetraciclo[8.7.0.0²,⁷.0¹¹,¹⁵]heptadecan-14-il]oxi]metil]carbamoil]metil]carbamoil]oxi]metil]fenil]carbamoil]butil]carbamoil]-2-metilpropil]carbamoil]-4-{1-[2-(ciclooct-2-in-1-iloxi)acetamido]-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amido}butanoico (LP32)

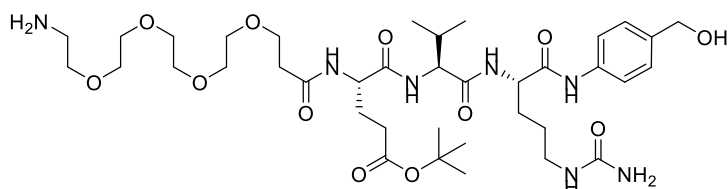


(4S)-4-[[[(1S)-1-[[[(1S)-4-(carbamoylamino)-1-[[4-(hidroximetil)fenil]carbamoil]butil]carbamoil]-2-metilpropil]carbamoil]-4-[1-[[[(9H-fluoren-9-il)metoxi]carbonil]amino]-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amido]butanoato de *terc*-butilo (9)



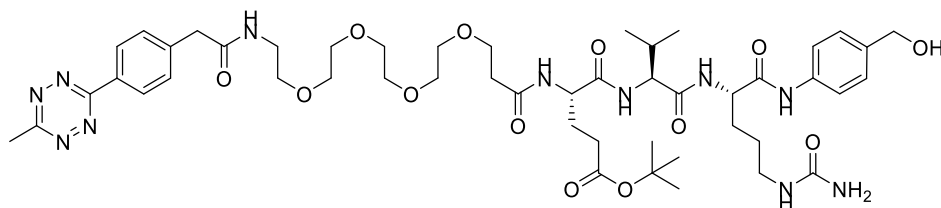
A una solución del compuesto Fmoc-PEG4-ácido (CAS: 557756-85-1, 0,49 g, 1,0 mmol) en DMF (5 ml) se adicionaron HATU (0,38 g, 1,0 mmol) y DIPEA (0,26 g, 2,0 mmol), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos. A la solución se
5 adicionó el compuesto **8** (CAS: 2757059-05-3, sintetizado de acuerdo con WO2021262910, 0,56 g, 1,0 mmol), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, que se monitoreó por LCMS. La mezcla resultante se diluyó con agua (100 ml) y se extrajo con acetato de etilo (100 mL). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío para dar el compuesto crudo **9**, que se purificó por cromatografía rápida en
10 gel de sílice (8-10 % de metanol en DCM) para dar el compuesto **9** (0,50 g, 48 % de rendimiento) como aceite incoloro. ESI m/z: 1034,3 (M + H)⁺.

(4S)-4-(1-amino-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amido)-4-[[[(1S)-1-[[[(1S)-4-(carbamoilamino)-1-[[4-(hidroximetil)fenil]carbamoil]butil]carbamoil]-2-metilpropil]carbamoil]butanoato de *terc*-butilo] (10)



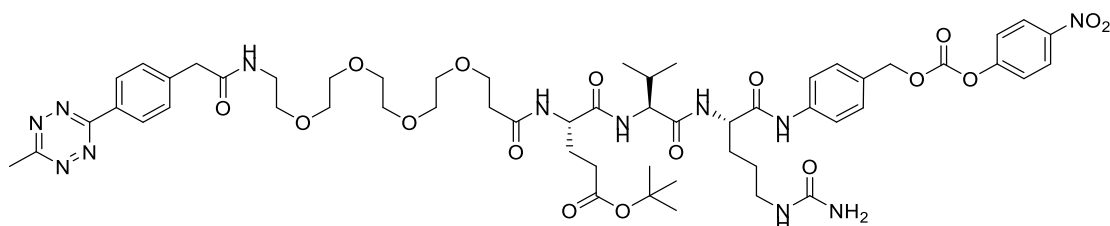
A una solución del compuesto **9** (0,50 g, 0,48 mmol) en DMF (5 ml) se adicionó piperidina (82 mg, 0,96 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas, que se monitoreó por LCMS. La mezcla resultante se purificó directamente por cromatografía rápida de fase inversa (5-95 % de acetonitrilo en TFA ac. (0,03 %)) para dar el compuesto **10** (0,30 g, 67 % de rendimiento, sal de TFA) como un aceite incoloro. ESI m/z: 812,9 (M + H)⁺.

(4S)-4-[[[(1S)-1-[[[(1S)-4-(carbamoilamino)-1-[[4-(hidroximetil)fenil]carbamoil]butil]carbamoil]-2-metilpropil]carbamoil]-4-(1-{2-[4-(6-metil-1,2,4,5-tetrazin-3-il)fenil]acetamido}-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amido)butanoato de *terc*-butilo (11)



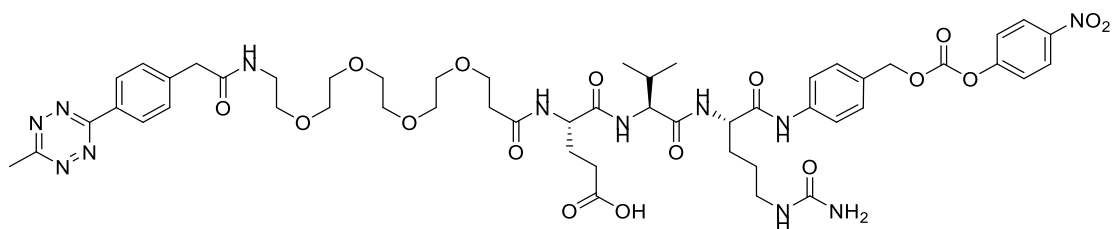
A una solución de MeTz-PhAc-NHS (CAS: 1644644-96-1, 33 mg, 0,10 mmol) en DMF (5 ml) se adicionaron compuesto **10** (93 mg, 0,10 mmol, sal de TFA) y DIPEA (26 mg, 0,20 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, que se
 5 monitoreó por LCMS. La mezcla resultante se purificó directamente por cromatografía rápida de fase inversa (5-95 % de acetonitrilo en TFA ac. (0,03 %)) para dar el compuesto **11** (80 mg, 78 % de rendimiento) como un sólido rojo. ESI m/z: 1023,5 (M + H)⁺.

(4S)-4-[[[(1S)-1-[[[(1S)-4-(carbamoilamino)-1-[[4-[[[(4-nitrofenoxi)carbonil]oxi]metil]fenil]carbamoil]butil]carbamoil]-2-metilpropil]carbamoil]-4-(1-{2-[4-(6-metil-1,2,4,5-tetrazin-3-il)fenil]acetamido}-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amido)butanoato de *terc*-butilo (12)



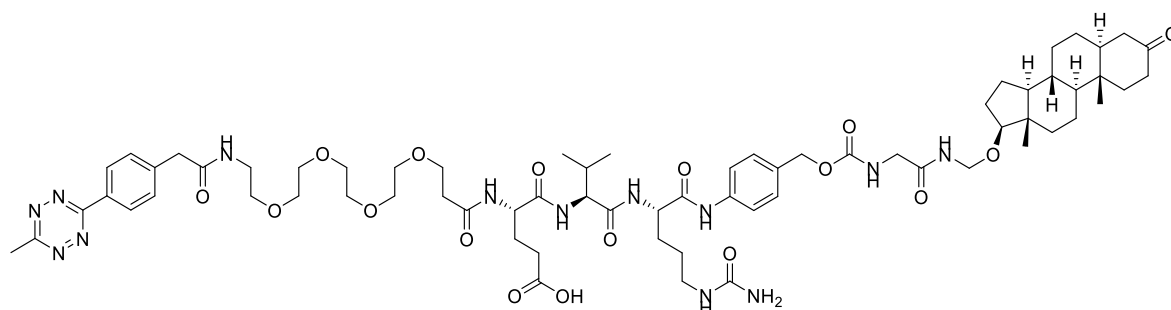
A una solución del compuesto **11** (0,10 g, 98 μmol) en DMF (5 ml) se adicionaron DIPEA (26 mg, 0,20 mmol), DMAP (12 mg, 98 μmol) y carbonato de bis(4-nitrofenilo) (0,12 g, 0,40 mmol), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una hora, que
 15 se monitoreó por LCMS. La mezcla resultante se separó directamente por cromatografía rápida de fase inversa (5-95 % de acetonitrilo en TFA ac. (0,03 %)) para dar el compuesto **12** (60 mg, 51 % de rendimiento) como un sólido rojo. ESI m/z: 1189,5 (M + H)⁺.

Ácido (4S)-4-[[[(1S)-1-[[[(1S)-4-(carbamoilamino)-1-[[4-[[[(4-nitrofenoxi)carbonil]oxi]metil]fenil]carbamoil]butil]carbamoil]-2-metilpropil]carbamoil]-4-(1-{2-[4-(6-metil-1,2,4,5-tetrazin-3-il)fenil]acetamido}-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amido)butanoico (13)



A una solución del compuesto **12** (60 mg, 51 μmol) en acetonitrilo (2,5 mL) se adicionó una solución de HCl en acetato de etilo (4 N, 2,5 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una hora, que se monitoreó por LCMS. La mezcla de reacción se extinguió con bicarbonato de sodio ac. sat. hasta pH 6-7. La capa orgánica se separó, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía rápida de fase inversa (0-100 % de acetonitrilo en TFA ac. (0,03 %)) para dar el compuesto **13** (30 mg, 51 % de rendimiento) como un sólido rojo. ESI m/z : 1133,5 ($M + H$)⁺.

Ácido (4S)-4-[[[(1S)-1-[[[(1S)-4-(carbamoilamino)-1-[(4-
 10 {[(1S,2S,7S,10R,11S,14S,15S)-2,15-dimetil-5-oxotetraciclo[8.7.0.0²,7.0¹¹,1⁵]heptadecan-14-il]oxi]metil]carbamoil]metil]carbamoil]oxi]metil]fenil]carbamoil]butil]carbamoil]-2-metilpropil]carbamoil]-4-(1-{2-[4-(6-metil-1,2,4,5-tetrazin-3-il)fenil]acetamido}-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amido)butanoico (LP4)



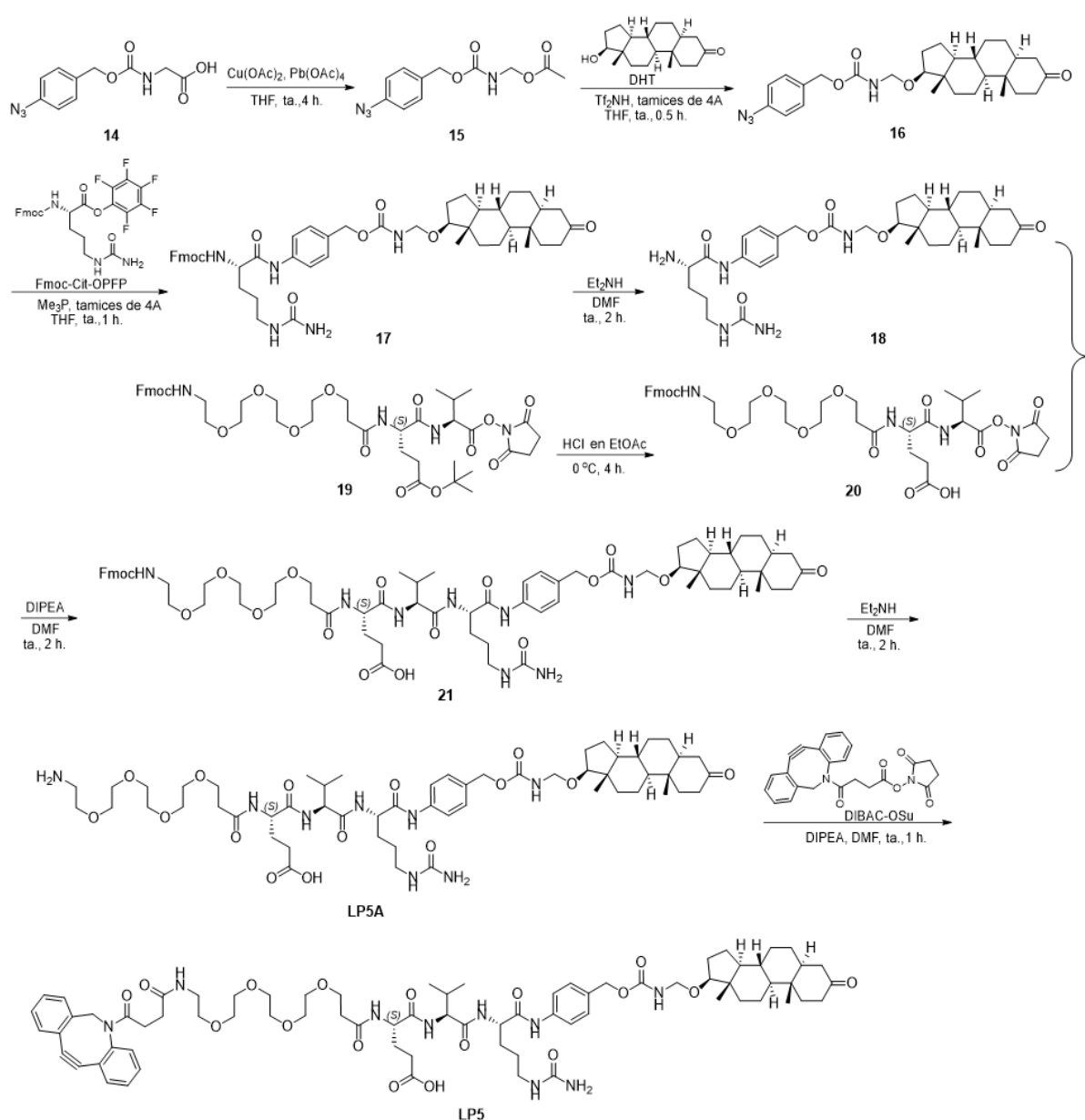
A una solución del compuesto **13** (50 mg, 44 μmol) en DMF (5 ml) se adicionaron ProDHT (17 mg, 44 μmol), DIPEA (11 mg, 88 μmol) y HOBt (3,0 mg, 22 μmol), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, que se monitoreó por LCMS. La mezcla resultante se separó directamente por cromatografía rápida de fase inversa (0-100 % de acetonitrilo en TFA ac. (0,03 %)) para dar **LP4** (10 mg, 17 % de rendimiento) como un sólido rojo. ESI m/z : 1371 ($M + H$)⁺, 1393 ($M + Na$)⁺. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,05 (s, 1H), 8,55 (t, J = 6,0 Hz, 1H), 8,40 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 8,30 (t, J = 6,0 Hz, 1H), 8,20 (d, J = 6,0 Hz, 1H), 8,10 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,75 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 7,58 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,54 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,42 (t, J = 6,0 Hz, 1H), 7,29 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,27 (br s, 1H), 6,03-6,00 (m,

1H), 5,52 (s, 2H), 4,97 (s, 2H), 4,60-4,58 (m, 1H), 4,55-4,45 (m, 3H), 4,20 (t, $J = 6,0$ Hz, 1H), 3,65-3,60 (m, 5H), 3,45-3,40 (m, 14H), 3,25-3,20 (m, 4H), 3,00 (s, 3H), 2,45-2,40 (m, 6H), 2,05-1,90 (m, 8H), 1,85-1,30 (m, 10H), 1,25-1,20 (m, 8H), 1,00 (s, 3H), 0,90-0,80 (m, 8H), 0,80 (s, 3H) ppm.

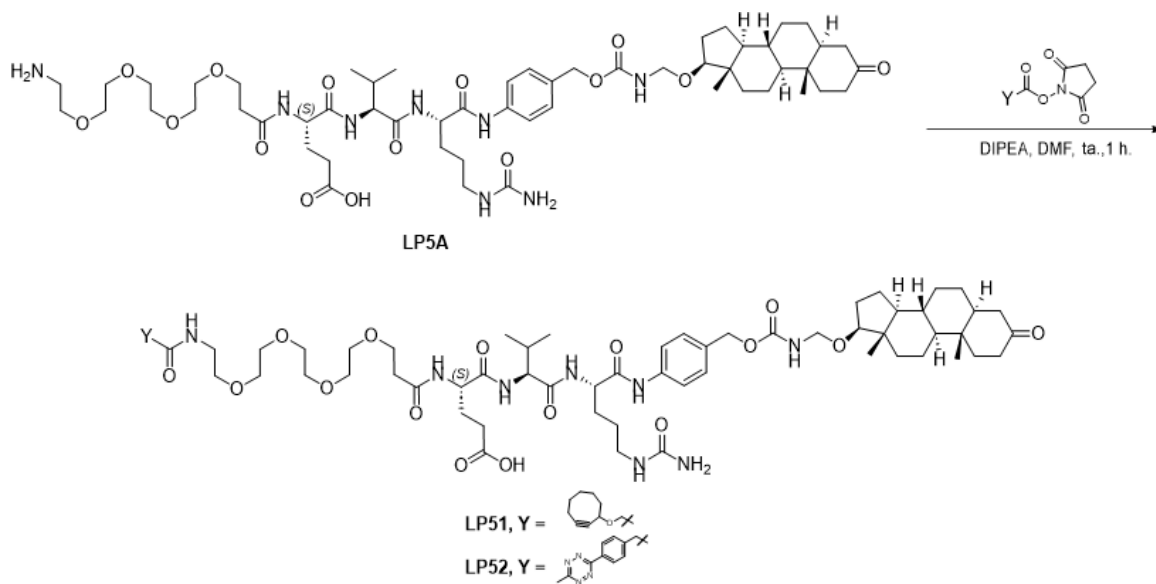
5 LP5A, LP5, LP51 y LP52

La síntesis de LP5 y LP5A se representa en el esquema de reacción 6, más adelante. La síntesis de LP51 y LP52 se representa en el esquema de reacción 6a, más adelante.

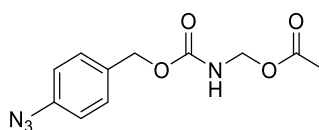
Esquema 6. Síntesis de LP5A y LP5



Esquema 6a. Síntesis de LP51 y LP52

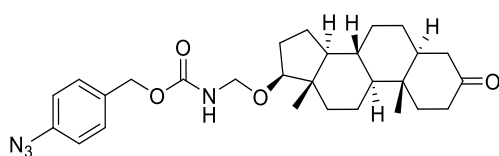


Acetato de ([[(4-azidofenil)metoxi]carbonil]amino)metilo (15)



- 5 A una solución del compuesto **14** (CAS: 179806-96-3, sintetizado de acuerdo con *J. Chem. SOC., Perkin Trans. I*, **1996**, 1205-1211, 0,50 g, 2,0 mmol) en THF (15 ml) se adicionaron tetraacetato de plomo (2,7 g, 6,0 mmol) y acetato de cobre (35 mg, 0,20 mmol), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas, que se monitoreó por LCMS. La mezcla resultante se diluyó con agua (100 mL) y se extrajo con acetato de etilo
- 10 (150 mL x 2). La solución orgánica combinada se lavó con salmuera (100 mL), se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía rápida en gel de sílice (0-15 % de acetato de etilo en éter de petróleo) para dar el compuesto **15** (0,42 g, 80 % de rendimiento) como un sólido amarillo. ESI m/z: 287,1 (M + Na)⁺.

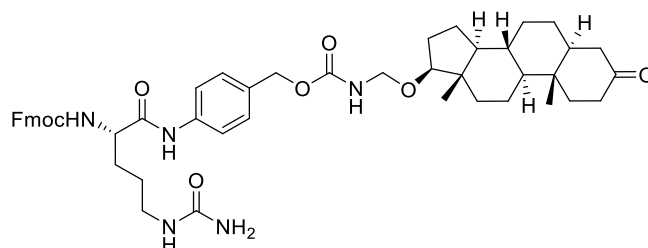
- 15 *N*-([[(1*S*,2*S*,7*S*,10*R*,11*S*,14*S*,15*S*)-2,15-dimetil-5-oxotetraciclo[8.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]heptadecan-14-il]oxi]metil]carbamato de (4-azidofenil)metilo (16)



A una solución del compuesto **15** (0,18 g, 0,69 mmol) en THF seco (25 ml) se adicionaron tamices moleculares 4 A y **DHT** (0,20 g, 0,69 mmol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante media hora antes de una solución de bis(trifluorometano)sulfonimida (CAS: 82113-65-3, 0,27 g, 2,1 mmol) en THF seco (5 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante media hora, que se monitoreó por LC y TLC. Tanto LC como TLC mostraron un nuevo producto formado y **DHT** ya no se redujo (la tasa de **DHT** frente al nuevo pico ~ 1 : 3 por LC). La mezcla de reacción se filtró y la solución se diluyó con agua (100 ml) y se extrajo con DCM (100 ml x 3). La solución orgánica combinada se lavó con salmuera (100 mL), se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía rápida de fase inversa (0-70 % de acetonitrilo en bicarbonato de amonio ac. (10 mM)) para dar el compuesto **16** (0,22 g, 65 % de rendimiento) como un sólido blanco y **DHT** reciclada (20 mg, 10 % de rendimiento reciclado). ESI m/z: sin señal de masa.

^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7,36 (d, $J = 4,4$ Hz, 2H), 7,01 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 5,11-5,08 (m, 2H), 4,75-4,64 (m, 2H), 2,44-2,25 (m, 3H), 2,12-1,98 (m, 3H), 1,85-1,79 (m, 2H), 1,74-1,66 (m, 1H), 1,59-1,50 (m, 3H), 1,45-1,21 (m, 8H), 1,15-1,05 (m, 1H), 1,03-1,00 (m, 3H), 0,96-0,84 (m, 2H), 0,77-0,74 (m, 3H) ppm.

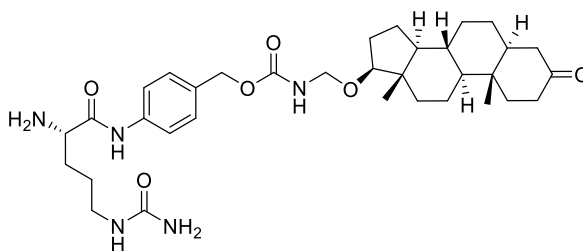
N-[(1S)-4-(carbamoilamino)-1-[[4-({[(1S,2S,7S,10R,11S,14S,15S)-2,15-dimetil-5-oxotetraciclo[8.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]heptadecan-14-il]oxi}metil)carbamoil]oxi}metil]fenil]carbamoil]butil]carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (17)



A una solución del compuesto **16** (0,20 g, 0,40 mmol) en THF seco (30 ml) se adicionaron tamices moleculares de 4 A (1,5 g) y Fmoc-Cit-OPFP (CAS: 1356537-03-5, 0,34 g, 0,60 mmol) y la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante media hora. A la mezcla se adicionó trimetilfosfina (1 M en THF, 0,80 ml, 0,80 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una hora hasta que el compuesto **16** se consumió totalmente, que se monitoreó por LCMS. La mezcla resultante se filtró y la solución se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía rápida de fase inversa (0-70 % de

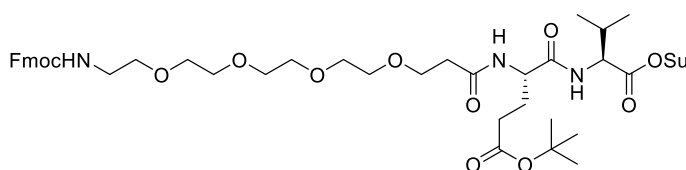
acetonitrilo en bicarbonato de amonio ac. (10 mM)) para dar el compuesto **17** (50 mg, 15 % de rendimiento) como un sólido blanco. ESI m/z: 848,3 (M + H)⁺ (muy débil).

5 *N*-([[(1*S*,2*S*,7*S*,10*R*,11*S*,14*S*,15*S*)-2,15-dimetil-5-oxotetraciclo[8.7.0.0²,⁷.0¹¹,¹⁵]heptadecan-14-il]oxi]metil]carbamato de {4-[(2*S*)-2-amino-5-(carbamoilamino)pentanamido]fenil]metilo (18)



10 A una solución del compuesto **17** (50 mg, 59 μmol) en DMF (2 ml) se adicionó dietilamina (43 mg, 0,59 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas hasta que Fmoc removió totalmente, que se monitoreó por LCMS. La mezcla resultante se separó directamente por cromatografía rápida de fase inversa (0-70 % de acetonitrilo en bicarbonato de amonio ac. (10 mM)) para dar el compuesto **18** (25 mg, 68 % de rendimiento) como un sólido blanco. ESI m/z: 626,3 (M + H)⁺.

15 (4*S*)-4-[(2*S*)-1-[(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi]-3-metil-1-oxobutan-2-il]carbamoil]-4-[1-([[(9*H*-fluoren-9-il)metoxi]carbonil]amino)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amido]butanoato de *terc*-butilo (19)

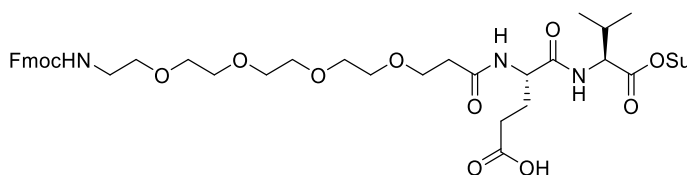


20 A una solución de H-Glu(O^tBu)-Val-OH (29 g, 56 mmol) en DMF (200 ml) se adicionó una solución de Fmoc-PEG₄-OSu (31 g, 53 mmol) en DCM (200 ml) y DIPEA (7,2 g, 56 mmol, 9,7 ml), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, que se monitoreó por LCMS. Después, los compuestos volátiles se removieron al vacío. El residuo se diluyó con agua (100 ml), se lavó con MTBE (80 ml x 3) y se acidificó con ácido cítrico a pH 5. La mezcla se extrajo con acetato de etilo (120 ml x 2) y la solución orgánica combinada se lavó con salmuera (60 ml x 2), se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío para dar Fmoc-PEG₄-Glu(O^tBu)-Val-OH (33 g) como aceite amarillo. ESI m/z: 772 (M +

H)⁺.

A una solución de HOSu (7,9 g, 68 mmol) en DMF (150 ml) y DCM (150 ml) se adicionaron dic (6,5 g, 51 mmol) y Fmoc-PEG₄-Glu(O^tBu)-Val-OH (33 g) obtenidos anteriormente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas, que se monitoreó por TLC y LCMS. La mezcla resultante se filtró y el filtrado se concentró al vacío. El residuo se diluyó con agua (200 ml) y se extrajo con acetato de etilo (150 ml x 3). La solución orgánica combinada se lavó con salmuera (150 ml x 3), se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró *al vacío* para dar el compuesto **19** (14 g) como aceite amarillo. ESI m/z 870 (M + H)⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,76 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 7,64-7,58 (m, 2H), 7,42-7,37 (m, 2H), 7,34-7,28 (m, 2H), 4,86-4,76 (m, 1H), 4,56-4,34 (m, 3H), 4,28-4,18 (m, 1H), 3,76-3,73 (m, 3H), 3,66-3,56 (m, 13H), 3,39 (br d, J = 4,9 Hz, 1H), 2,81 (br s, 6H), 2,50-2,46 (m, 2H), 2,40-2,32 (m, 2H), 2,14-2,04 (m 1H), 1,97-1,81 (m, 4H), 1,44 (s, 9H), 1,05 (s, 3H), 1,04 (s, 3H) ppm.

Ácido (4S)-4-[[[(2S)-1-[(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi]-3-metil-1-oxobutan-2-il]carbamoil]-4-[1-[[[(9H-fluoren-9-il)metoxi]carbonil]amino]-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amido]butanoico (20)



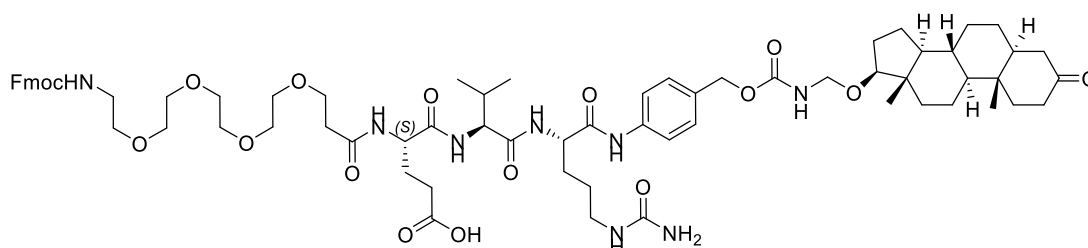
A una solución del compuesto **19** (Fmoc-PEG₄-Glu(O^tBu)-Val-OSu, 0,10 g, 0,12 mmol) en acetato de etilo (2 ml) se adicionó una solución de HCl en acetato de etilo (4 N, 4 ml, 16 mmol), y la mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 4 horas, que se monitoreó por LCMS. Los compuestos volátiles se removieron al vacío y el residuo se purificó por cromatografía rápida de fase inversa (0-50 % de acetonitrilo en ácido fórmico ac. (0,02 %)) para dar el compuesto **20** (Fmoc-PEG₄-Glu-Ala-OSu) (32 mg, 33 % de rendimiento) como un sólido blanco. ESI m/z: 813,2 (M + H)⁺.

Método alternativo (método de ampliación):

A una solución del compuesto **19** (0,14 g, 0,16 mmol, obtenido anteriormente) en DCM (0,5 mL) se adicionó TFA (0,72 g, 0,47 mL, 6,3 mmol), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una hora, que se monitoreó mediante LCMS. Los compuestos volátiles se removieron al vacío y el residuo se trituró en MTBE (10 ml x 2). Los precipitados blanquecinos se recolectaron por centrifugación para dar el compuesto **20** (0,13 g, 22 % de

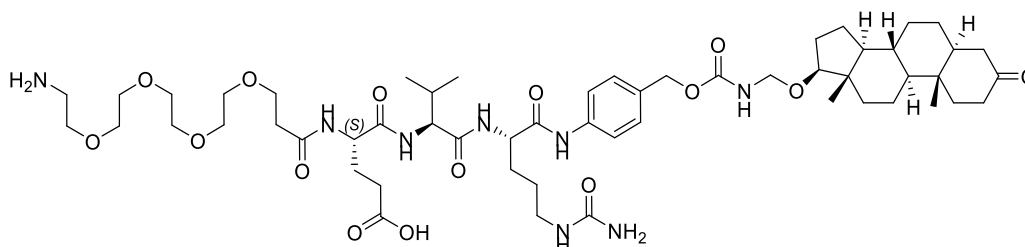
rendimiento a partir de H-Glu(O^tBu)-Val-OH) como un sólido blanquecino. ESI m/z: 813 (M + H)⁺.

Ácido (4S)-4-[[[(1S)-1-[[[(1S)-4-(carbamoylamino)-1-[[4-
 5 ((([(1S,2S,7S,10R,11S,14S,15S)-2,15-dimetil-5-oxotetraciclo[8.7.0.0²,7.0¹¹,1⁵]heptadecan-
 14-il]oxi}metil)carbamoyl]oxi}metil)fenil]carbamoyl]butil]carbamoyl}-2-metilpropil]carbamoyl]-4-
 [1-(([(9H-fluoren-9-il)metoxi]carbonil)amino)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-
 amido]butanoico (21)



A una solución del compuesto **18** (25 mg, 40 μmol) en DMF (3 ml) se adicionaron
 10 DIPEA (16 mg, 0,12 mmol) y el compuesto **20** (32 mg, 40 μmol), y la mezcla de reacción se
 agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, que se monitoreó por LCMS. La mezcla
 resultante se purificó por cromatografía rápida de fase inversa (0-70 % de acetonitrilo en
 bicarbonato de amonio ac. (10 mM)) para dar el compuesto **21** (25 mg, 47 % de rendimiento)
 como un sólido blanco. ESI m/z: 698,3 (M/2 + H)⁺.

Ácido (4S)-4-(1-amino-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amido)-4-[[[(1S)-1-[[[(1S)-4-
 15 (carbamoylamino)-1-[[4-(((1S,2S,7S,10R,11S,14S,15S)-2,15-dimetil-5-
 oxotetraciclo[8.7.0.0²,7.0¹¹,1⁵]heptadecan-14-
 il]oxi}metil)carbamoyl]oxi}metil)fenil]carbamoyl]butil]carbamoyl]-2-
 metilpropil]carbamoyl]butanoico (LP5A)



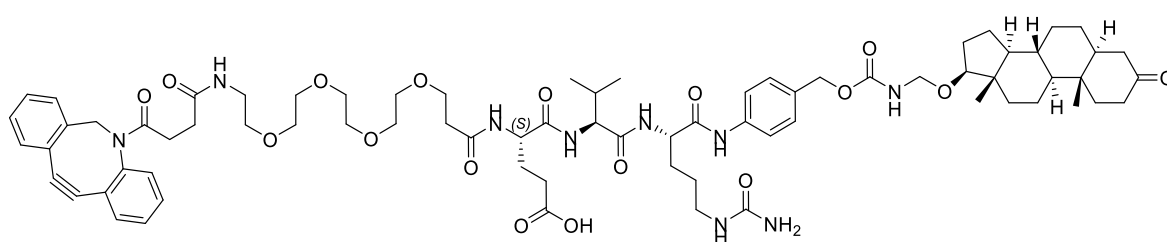
20

A una solución del compuesto **21** (15 mg, 11 μmol) en DMF (2 ml) se adicionó
 dietilamina (8,0 mg, 0,11 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente
 durante 2 horas hasta que Fmoc removi6 totalmente, que se monitoreó por LCMS. La mezcla

resultante se separó directamente por prep-HPLC (10-95 % de acetonitrilo en bicarbonato de amonio *ac.* (10 mM)) para dar **LP5A** (2,2 mg, 18 % de rendimiento) como un sólido blanco. ESI *m/z*: 1101 (*M* + *H*)⁺.

5 LP5: Ácido (4*S*)-4-[1-(4-{2-azatriciclo[10.4.0.0^{4,9}]hexadeca-1(12),4(9),5,7,13,15-hexaen-10-in-2-il}-4-oxobutanamido)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amido]-4-[[[(1*S*)-1-[[[(1*S*)-4-(carbamoilamino)-1-[[4-[[[(1*S*,2*S*,7*S*,10*R*,11*S*,14*S*,15*S*)-2,15-dimetil-5-oxotetraciclo[8.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]heptadecan-14-il]oxi}metil]carbamoil]oxi}metil]fenil]carbamoil]butil]carbamoil]-2-metilpropil]carbamoil]butanoico (LP5)

10

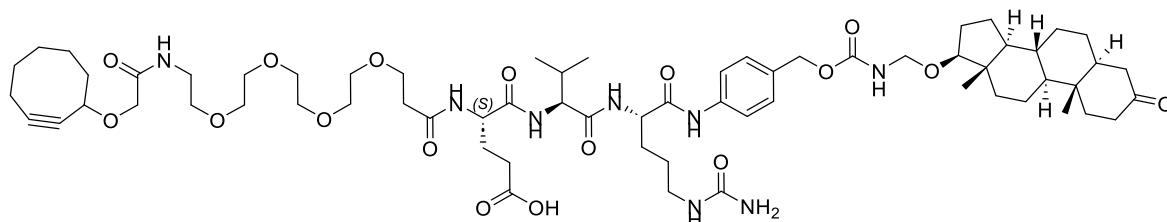


Siguiendo el procedimiento similar a **LP3A** a **LP3**, excepto a partir de **LP5A**, se obtuvo el enlazador-carga útil **LP5** (2,7 mg, 18 % de rendimiento) como un sólido blanco. ESI *m/z*: 695,0 (*M*/2 + *H*)⁺.

LP51 y LP52

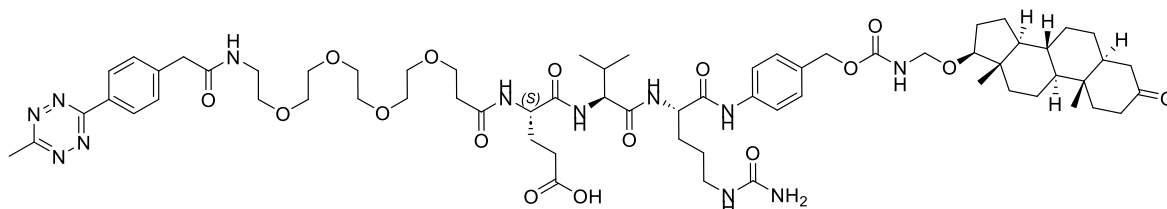
15 Ácido (4*S*)-4-[[[(1*S*)-1-[[[(1*S*)-4-(carbamoilamino)-1-[[4-[[[(1*S*,2*S*,7*S*,10*R*,11*S*,14*S*,15*S*)-2,15-dimetil-5-oxotetraciclo[8.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]heptadecan-14-il]oxi}metil]carbamoil]oxi}metil]fenil]carbamoil]butil]carbamoil]-2-metilpropil]carbamoil]-4-{1-[2-(ciclooct-2-in-1-iloxi)acetamido]-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amido}butanoico (LP51)

20



Siguiendo un procedimiento similar a **LP3A** a **LP3**, excepto que a partir de **LP5A** que reacciona con COT-OSu, se obtuvo el enlazador-carga útil **LP51** (1,0 mg, 16 % de rendimiento) como un sólido blanco. ESI *m/z*: 632,3 (*M*/2 + *H*)⁺.

Ácido (4S)-4-[[[(1S)-1-[[[(1S)-4-(carbamoilamino)-1-[[4-
 ((([[(1S,2S,7S,10R,11S,14S,15S)-2,15-dimetil-5-oxotetraciclo[8.7.0.0²,⁷.0¹¹,¹⁵]heptadecan-
 14-il]oxi}metil)carbamoil]oxi}metil)fenil]carbamoil]butil]carbamoil]-2-metilpropil]carbamoil]-4-
 (1-{2-[4-(6-metil-1,2,4,5-tetrazin-3-il)fenil]acetamido}-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-
 5 amido)butanoico (LP52)

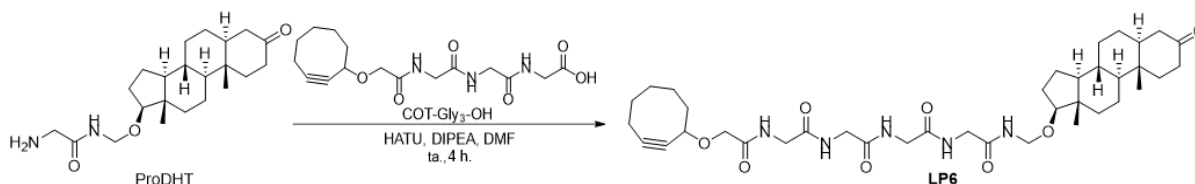


Siguiendo un procedimiento similar a **LP3A** a **LP3**, excepto que a partir de **LP5A** reacciona con MeTz-PhAc-NHS (CAS: 1644644-96-1), el enlazador-carga útil **LP52** (0,9 mg, 14 % de rendimiento) se obtuvo como un sólido blanco. ESI m/z: 657,3 (M/2 + H)⁺.

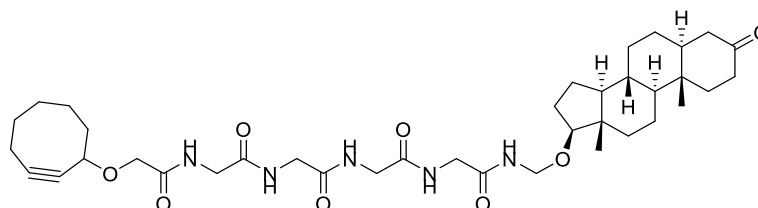
10 LP6

La síntesis de LP6 se representa en el esquema de reacción 7, más adelante.

Esquema 7. Síntesis de LP6. LP6 se divulga como SEQ ID NO: 292.



2-(ciclooct-2-in-1-iloxi)-N-[[[([[[[([[(1S,2S,7S,10R,11S,14S,15S)-2,15-dimetil-5-
 15 oxotetraciclo[8.7.0.0²,⁷.0¹¹,¹⁵]heptadecan-14-
 il]oxi}metil)carbamoil]metil]carbamoil]metil]carbamoil]metil]carbamoil]metil]acetamida (LP6).
 LP6 se divulga como SEQ ID NO: 292.



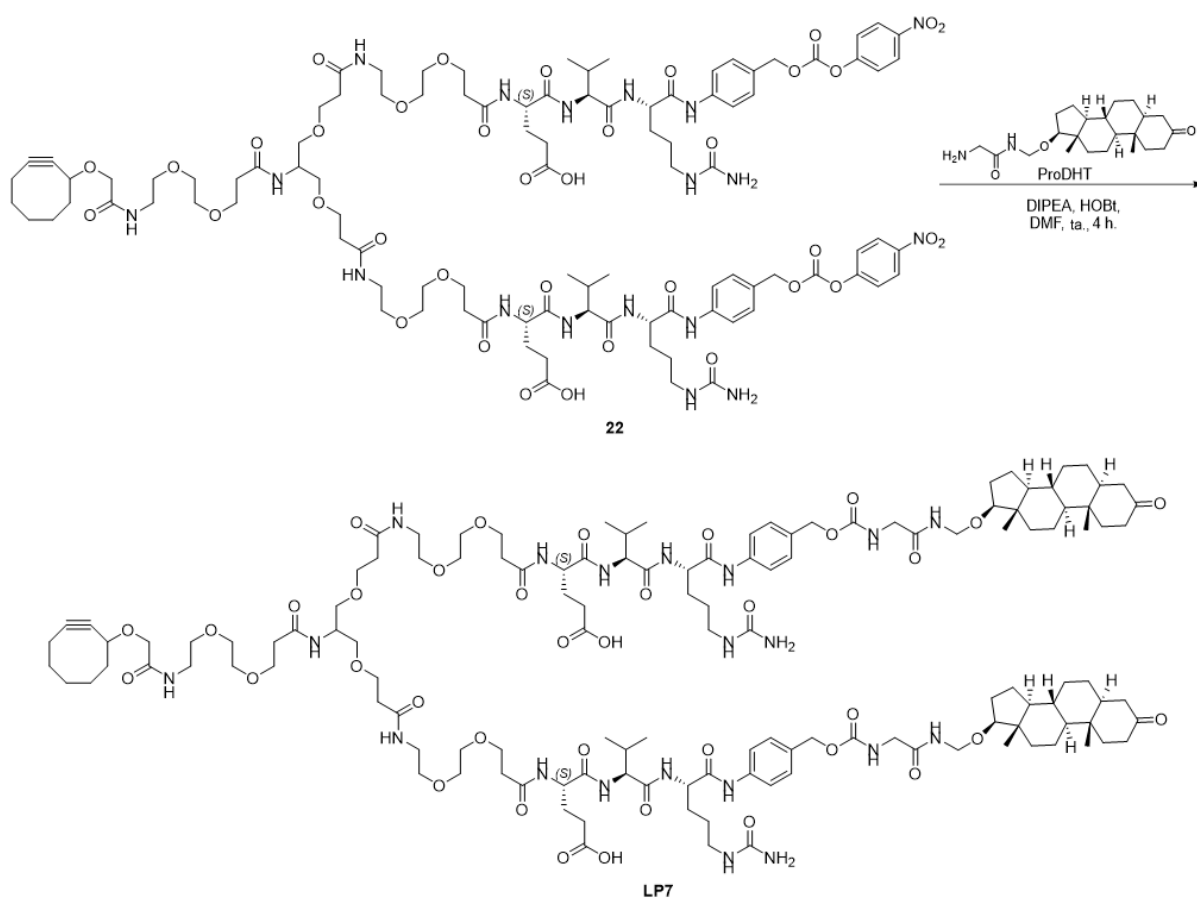
A una solución de COT-Gly₃-OH (CAS: 2504011-15-6, sintetizado de acuerdo con

WO2022015656, 24 mg, 66 μ mol) en DMF (3 ml) se adicionaron HATU (38 mg, 0,10 mmol) y DIPEA (26 mg, 0,20 mmol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos antes de la adición de ProDHT (25 mg, 66 μ mol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas, que se monitoreó por LCMS. La mezcla resultante se purificó por prep-HPLC (5-95 % de acetonitrilo en TFA ac. (0,01 %)) para dar **LP6** (7,2 mg, 15 % de rendimiento) como un sólido blanco. ESI m/z 422 ($M_{LP4} - M_{DHT} + H$)⁺, 734 ($M + Na$)⁺. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,49 (t, *J* = 6,5 Hz, 1H), 8,20 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H), 8,18-8,09 (m, 2H), 7,83 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H), 4,65-4,51 (m, 1H), 4,51-4,49 (m, 1H), 4,35-4,29 (m, 1H), 4,00-3,66 (m, 10H), 2,50-2,05 (m, 8H), 1,98-1,60 (m, 8H), 1,66-1,08 (m, 15H), 0,97 (s, 3H), 0,90-0,83 (m, 2H), 0,68 (s, 3H) ppm.

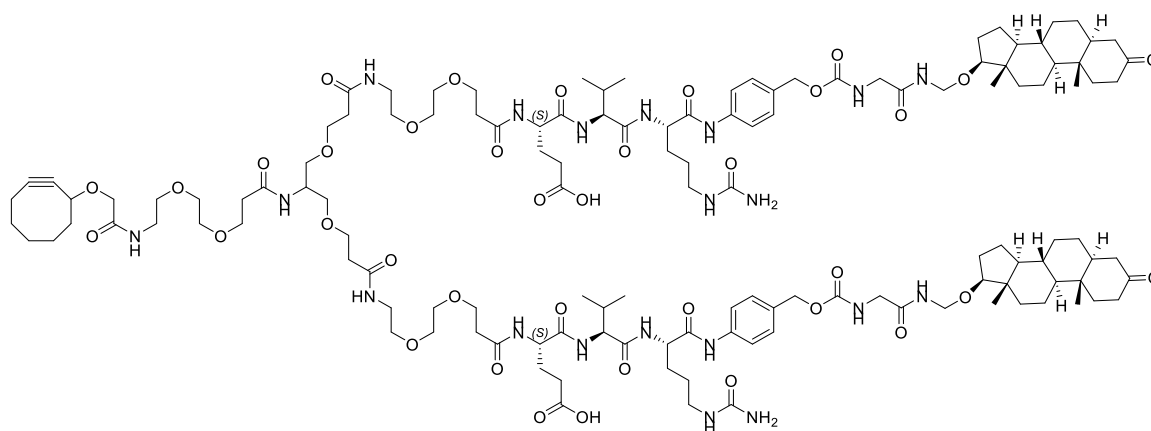
LP7

La síntesis de LP7 se representa en el esquema de reacción 8, más adelante.

Esquema 8. Síntesis de LP7



{{{{((1S,2S,7S,10R,11S,14S,15S)-2,15-dimetil-5-oxotetraciclo[8.7.0.0²,⁷.0¹¹,¹⁵] heptadecan-14-il]oxi}metil)carbamoil]metil}carbamoil]oxi}metil}fenil)carbamoil]butil]carbamoil}-2-metilpropil]carbamoil}-4-(3-{2-[2-(3-{3-[2-({2-[2-(2-[[[(1S)-1-[[[(1S)-1-[[[(1S)-4-(carbamoilamino)-1-(4-[[[[[(1S,2S,7S,10R,11S,14S,15S)-2,15-dimetil-5-oxotetraciclo[8.7.0.0²,⁷.0¹¹,¹⁵]heptadecan-14-il]oxi}metil)carbamoil]metil}carbamoil]oxi}metil}fenil)carbamoil]butil]carbamoil}-2-metilpropil]carbamoil}-3-carboxipropil]carbamoil]etoxi]etoxi]etil}carbamoil]etoxi]-2-[3-(2-[2-(2-(ciclooct-2-in-1-iloxi)acetamido]etoxi]etoxi)propanamido]propoxi}propanamido)etoxi]etoxi}propanamido)butanoico (LP7)

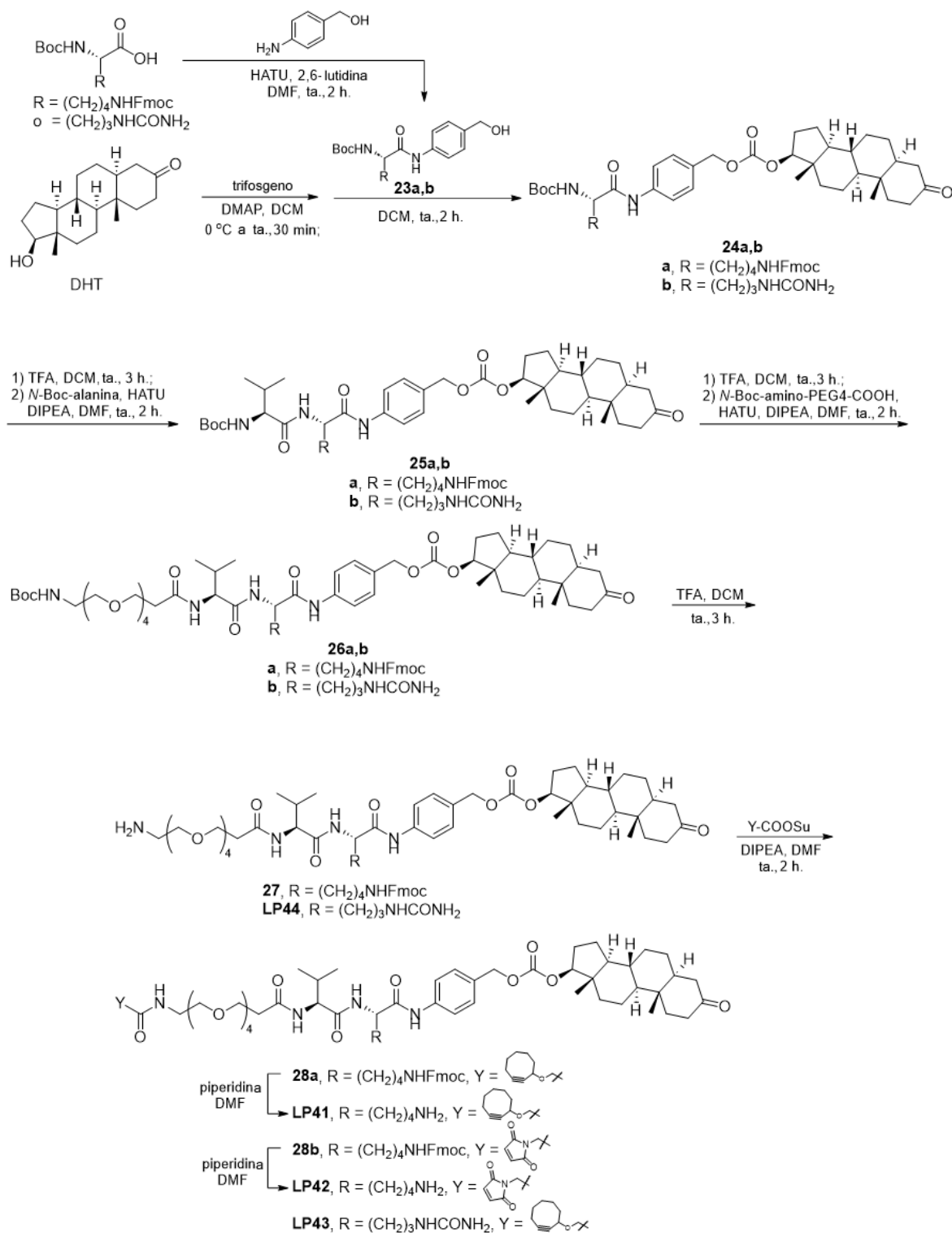


A una solución del compuesto **22** (0,18 g, 82 μ mol) en DMF (5 ml) se adicionaron **ProDHT** (60 mg, 0,16 mmol) y **HOBt** (10 mg, 74 μ mol), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas, que se monitoreó por LCMS. La mezcla resultante se separó directamente por cromatografía rápida de fase inversa (10-95 % de acetonitrilo en bicarbonato de amonio ac. (10 mM)) para dar **LP7** (20 mg, 9 % de rendimiento) como un sólido blanco. ESI m/z: 1331,7 (M/2 + H)⁺. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,0 (s, 2H), 8,55 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H), 8,18 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 8,08 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,93 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H), 7,75 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H), 7,60-7,55 (m, 4H), 7,41 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H), 7,29-7,27 (m, 4H), 6,00-5,98 (m, 2H), 5,40 (s, 4H), 5,00 (s, 4H), 4,60-4,50 (m, 2H), 4,45-4,35 (m, 2H), 4,30-4,20 (m, 5H), 4,20-4,15 (m, 2H), 3,80-3,75 (m, 1H), 3,75-3,50 (m, 11H), 3,55 (br, 10H), 3,50-3,45 (m, 6H), 3,45-3,40 (m, 10H), 3,10 (br, 6H), 3,00-2,90 (m, 3H), 2,25-2,15 (m, 16H), 1,80-1,60 (m, 19H), 1,50-1,45 (m, 20H), 1,45-1,40 (m, 20H), 0,95-0,90 (m, 16H), 0,85 (s, 6H), 0,60-0,55 (m, 9H) ppm.

LP41, LP42, LP43 y LP44

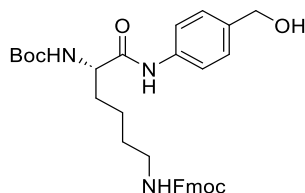
La síntesis de LP41, LP42, LP43 y LP44 se representa en el esquema de reacción 9, más adelante.

Esquema 9. Síntesis de LP41, LP42, LP43 y LP44



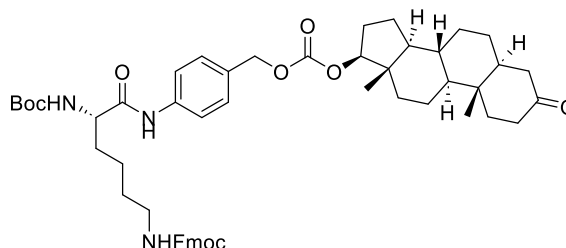
LP41, LP42, LP43 y LP44

(hidroximetil)fenil]carbamoil]pentil]carbamato de terc-butilo (23a)



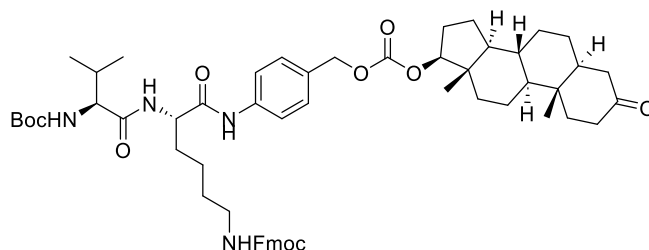
A una solución de Boc-Lys(Fmoc)-OH (1,0 g, 2,1 mmol) en DMF(10 ml) se adicionaron (4-aminofenil)metanol (0,26 g, 2,1 mmol), HATU (1,2 g, 3,2 mmol) y 2,6-Lutidina (0,68 g, 6,3 mmol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla resultante se purificó por cromatografía rápida de fase inversa (0-95 % de acetonitrilo en TFA ac. (0,1 %)) para dar el compuesto **23a** (1,0 g, 82 % de rendimiento) como un sólido blanco. ESI m/z: 574,3 (M + H)⁺.

Carbonato de {4-[(2S)-2-[(terc-butoxi)carbonil]amino]-6-([(9H-fluoren-9-il)metoxi]carbonil]amino)hexanamido]fenil}metilo (1S,2S,7S,10R,11S,14S,15S)-2,15-dimetil-5-oxotetraciclo[8.7.0.0²,⁷.0¹¹,¹⁵]heptadecan-14-ilo (24a)



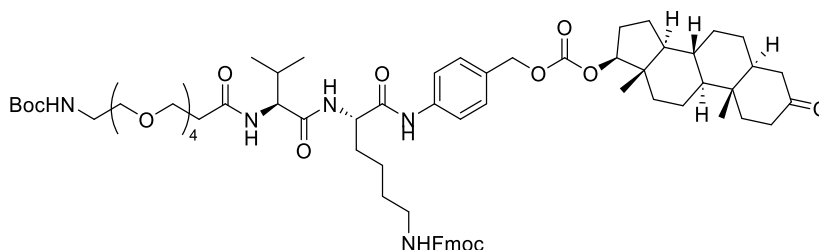
A una solución de **DHT** (0,50 g, 1,7 mmol) en DCM (10 ml) se adicionó DMAP (1,2 g, 10 mmol). Después de que la mezcla se enfrió a 0 °C, se adicionó trifosgeno (0,15 g, 0,85 mmol) a la mezcla. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una hora y a la mezcla se adicionó **23a** (1,0 g, 3,4 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla resultante se concentró al vacío y el residuo se purificó por cromatografía rápida (5-95 % de acetonitrilo en TFA ac. (0,1 %)) para dar **24a** (0,50 g, 50 % de rendimiento) como un sólido blanco. ESI m/z: 890,2 (M + H)⁺.

Carbonato de {4-[(2S)-2-[(2S)-2-[(terc-butoxi)carbonil]amino]-3-metilbutanamido]-6-([(9H-fluoren-9-il)metoxi]carbonil]amino)hexanamido]fenil}metilo (1S,2S,7S,10R,11S,14S,15S)-2,15-dimetil-5-oxotetraciclo[8.7.0.0²,⁷.0¹¹,¹⁵]heptadecan-14-ilo (25a)



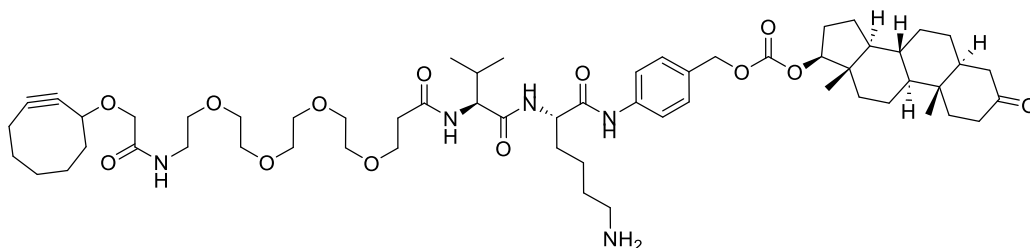
A una solución del compuesto **24a** (0,50 g, 1,7 mmol) en DCM (8 ml) se adicionó TFA (1,0 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla resultante se concentró al vacío, y el residuo se disolvió en DMF (5 ml). A la solución se
 5 adicionaron Boc-valina (0,11 g, 0,5 mmol), HATU (0,29 g, 0,75 mmol) y DIPEA (0,19 g, 1,5 mmol), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla resultante se purificó por cromatografía rápida de fase inversa (0-95 % de acetonitrilo en TFA ac. (0,1 %)) para dar el compuesto **25a** (0,30 g, 54 % de rendimiento) como un sólido blanco. ESI m/z: 990,2 (M + H)⁺.

- 10 Carbonato de {4-[(2S)-2-[(2S)-2-(1-[(terc-butoxi)carbonil]amino)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amido)-3-metilbutanamido]-6-([(9H-fluoren-9-il)metoxi]carbonil)amino)hexanamido]fenil}metilo (1S,2S,7S,10R,11S,14S,15S)-2,15-dimetil-5-oxotetraciclo[8.7.0.0²,⁷.0¹¹,¹⁵]heptadecan-14-ilo (26a)



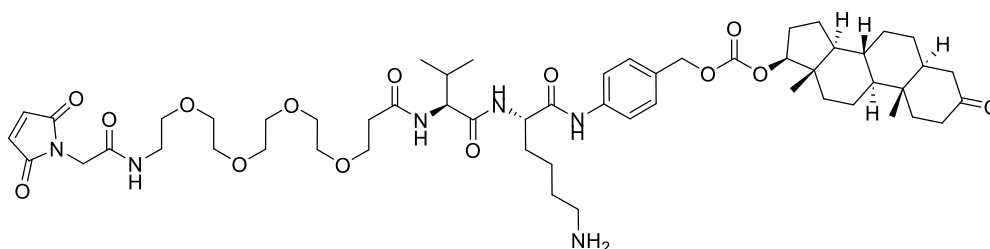
- 15 Siguiendo el procedimiento similar a **25a**, excepto que se usó *N*-Boc-PEG4-ácido en lugar de Boc-valina, el compuesto **26a** (0,20 g, 58 % de rendimiento) como un sólido blanco. ESI m/z: 1237,6 (M + H)⁺.

- Carbonato de {4-[(2S)-2-[(2S)-2-(1-amino-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amido)-3-metilbutanamido]-6-([(9H-fluoren-9-il)metoxi]carbonil)amino)hexanamido]fenil}metilo
 20 (1S,2S,7S,10R,11S,14S,15S)-2,15-dimetil-5-oxotetraciclo[8.7.0.0²,⁷.0¹¹,¹⁵]heptadecan-14-ilo (27)



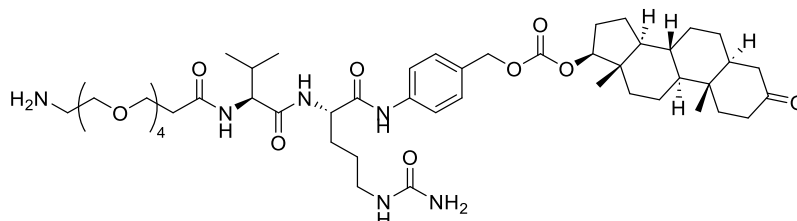
A una solución de **28a** (90 mg, 68 μ mol) en DMF (2 ml) se adicionó piperidina (0,2 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla se separó directamente por cromatografía rápida de fase inversa (5-95 % de acetonitrilo en TFA ac. (0,1 %)) para dar **LP41** (40 mg, 54 % de rendimiento) como un sólido blanco. ESI m/z: 1079,5 (M + H)⁺.

Carbonato de {4-[(2S)-6-amino-2-[(2S)-2-{1-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetamido]-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amido}-3-metilbutanamido]hexanamido]fenil}metilo (1S,2S,7S,10R,11S,14S,15S)-2,15-dimetil-5-oxotetraciclo[8.7.0.0²,⁷.0¹¹,¹⁵]heptadecan-14-ilo (LP42)



Siguiendo el procedimiento similar a **LP41**, excepto que se usa AMAS (CAS: 55750-61-3) en lugar de COT-OSu, enlazador-carga útil **LP42** (4,5 mg, 20 % de rendimiento) como un sólido blanco. ESI m/z: 1051,6 (M + H)⁺.

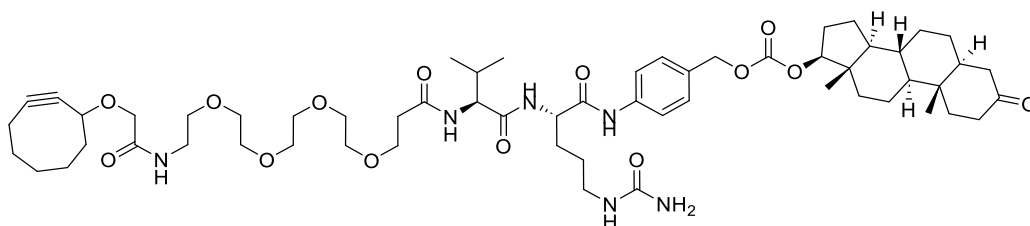
Carbonato de {4-[(2S)-2-[(2S)-2-(1-amino-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amido)-3-metilbutanamido]-5-(carbamoylamino)pentanamido]fenil}metilo (1S,2S,7S,10R,11S,14S,15S)-2,15-dimetil-5-oxotetraciclo[8.7.0.0²,⁷.0¹¹,¹⁵]heptadecan-14-ilo (LP44)



Siguiendo los procedimientos similares al compuesto **27**, excepto que a partir de *N*-Boc-Cit-OH, se obtuvieron los compuestos **23B**, **24b**, **25b**, **26B** y **LP44**.

LP44 (20 mg, 15 % de rendimiento total): ESI m/z: 943,5 (M + H)⁺.

Carbonato de {4-[(2*S*)-5-(carbamoilamino)-2-[(2*S*)-2-{1-[2-(ciclooct-2-in-1-ilo)acetamido]-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amido}-3-metilbutanamido]pentanamido]fenil}metilo (1*S*,2*S*,7*S*,10*R*,11*S*,14*S*,15*S*)-2,15-dimetil-5-oxotetraciclo[8.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]heptadecan-14-ilo (LP43)

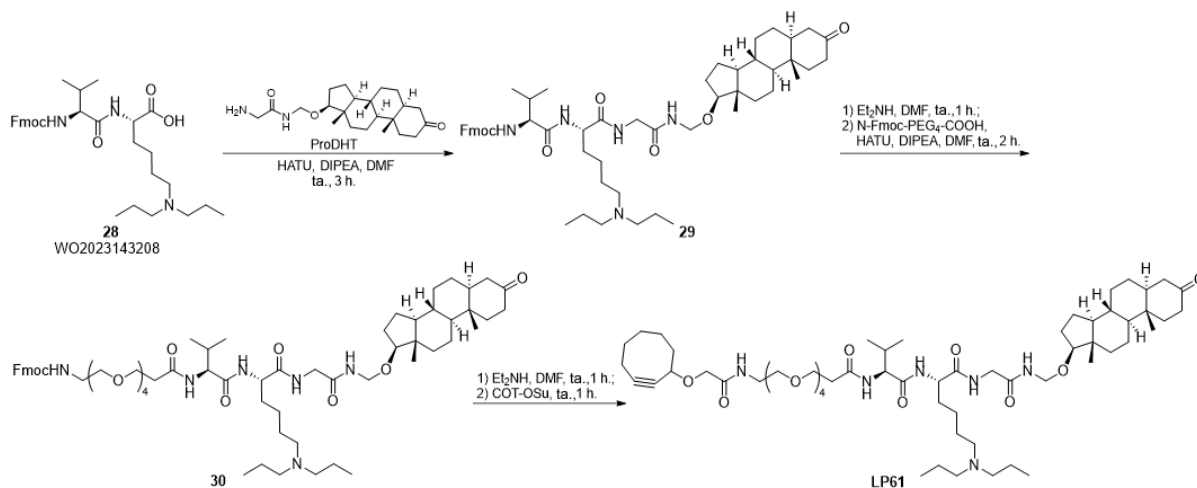


Siguiendo el procedimiento similar a **LP41**, excepto que se usó **LP44** en lugar del compuesto **27**, se obtuvo el enlazador-carga útil **LP43** (2,5 mg, 60 % de rendimiento) como un sólido blanco. ESI m/z: 1107,7 (M + H)⁺.

LP61 y **LP61A**

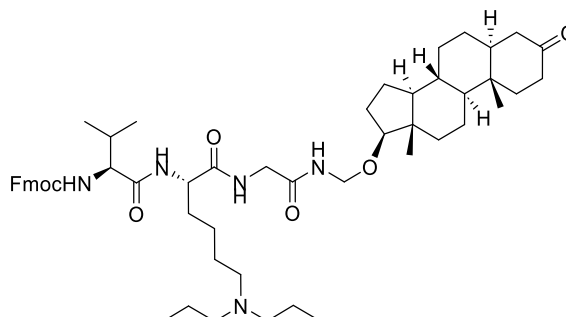
La síntesis de **LP61** se representa en el esquema de reacción 10, más adelante.

Esquema 10. Síntesis de **LP61**



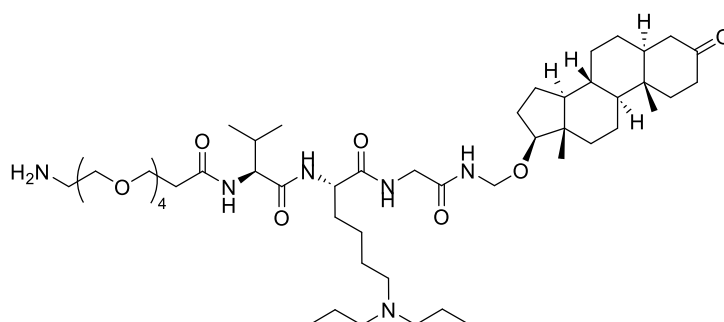
LP61 y **LP61A**

N-[(1S)-1-[[[(1S)-1-[[[(1S,2S,7S,10R,11S,14S,15S)-2,15-dimetil-5-oxotetraciclo[8.7.0.0²,⁷.0¹¹,¹⁵]heptadecan-14-il]oxi]metil]carbamoil]metil]carbamoil]-5-(dipropilamino)pentil]carbamoil]-2-metilpropil]carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (29)



5 A una solución del compuesto **28** (sintetizado de acuerdo con WO2023143208, 33 mg, 60 μ mol) en DMF (3 ml) se adicionaron HATU (38 mg, 0,10 mmol) y DIPEA (26 mg, 0,20 mmol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos antes de la adición de ProDHT (19 mg, 50 μ mol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas, que se monitoreó por LCMS. La mezcla resultante se purificó por prep-HPLC (5-95
10 % de acetonitrilo en TFA ac. (0,01 %)) para dar el compuesto **29** (10 mg, 22 % de rendimiento) como un sólido blanco. ESI m/z 910,6 (M + H)⁺.

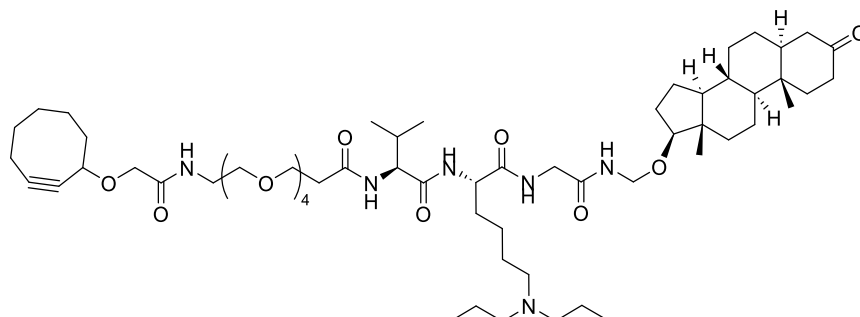
1-amino-N-[(1S)-1-[[[(1S)-1-[[[(1S,2S,7S,10R,11S,14S,15S)-2,15-dimetil-5-oxotetraciclo[8.7.0.0²,⁷.0¹¹,¹⁵]heptadecan-14-il]oxi]metil]carbamoil]metil]carbamoil]-5-(dipropilamino)pentil]carbamoil]-2-metilpropil]-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amida
15 (LP61A)



Siguiendo los procedimientos similares a **LP2A**, excepto que se usó el compuesto **29** en lugar de Fmoc-vcPAB-ProDHT, se obtuvo el enlazador-carga útil **LP61A** (6,0 mg, 58 % de rendimiento) como un sólido blanco. ESI m/z: 935,7 (M + H)⁺.

20 1-[2-(ciclooct-2-in-1-iloxi)acetamido]-N-[(1S)-1-[[[(1S)-1-

(([[[[(1S,2S,7S,10R,11S,14S,15S)-2,15-dimetil-5-oxotetraciclo[8.7.0.0²,⁷.0¹¹,¹⁵]heptadecan-14-il]oxi]metil]carbamoil]metil]carbamoil)-5-(dipropilamino)pentil]carbamoil]-2-metilpropil]-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amida (LP61)



- 5 Siguiendo el procedimiento similar a **28a**, excepto que se usó **LP61A** en lugar del compuesto **27**, se obtuvo el enlazador-carga útil **LP61** (0,5 mg, 21 % de rendimiento) como un sólido blanco. ESI m/z: 1100,0 (M + H)⁺.

Ejemplo 9: Preparación de conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC)

- 10 Los procedimientos genéricos para elaborar conjugados específicos de sitio se describen a continuación y se muestran en la **FIGURA 8**.

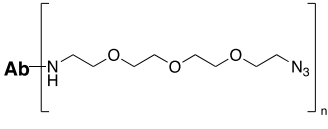
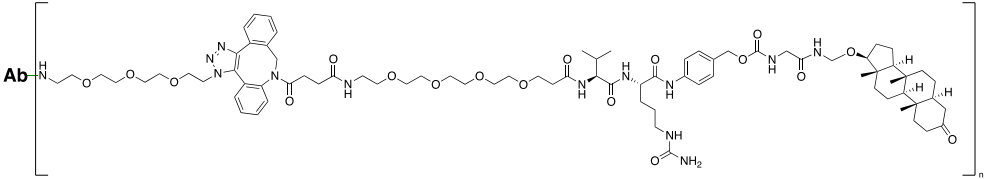
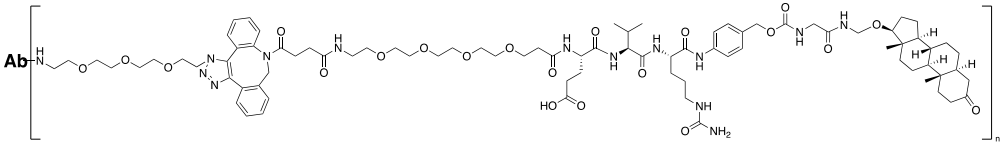
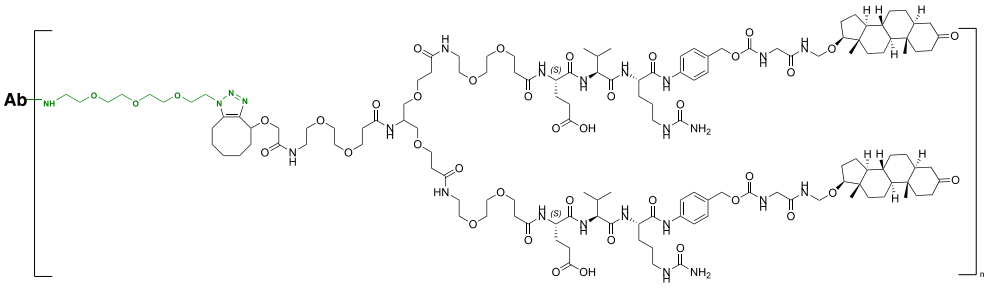
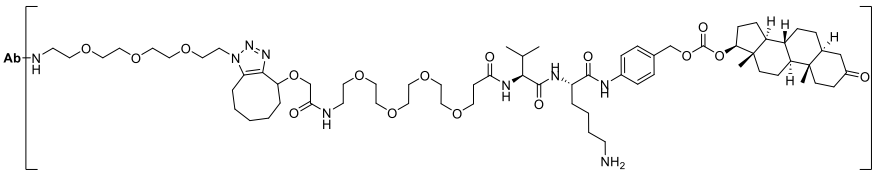
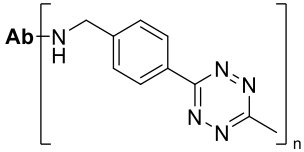
Se usaron IgG de anticuerpo humano aglucosilado (IgG1, IgG4, etc.) que contiene una mutación N297Q o N297D en conjugaciones de ADC. La conjugación se realizó mediante un proceso de dos pasos (**FIGURA 8A**), y los resultados de la conjugación con las estructuras y los valores de MS-DAR se resumen en la tabla 5.

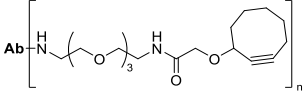
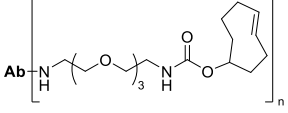
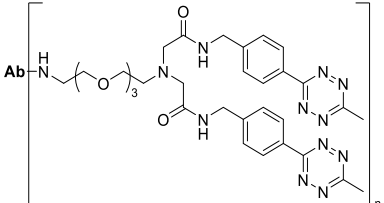
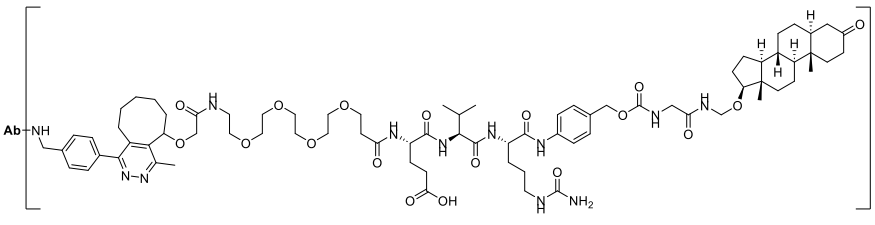
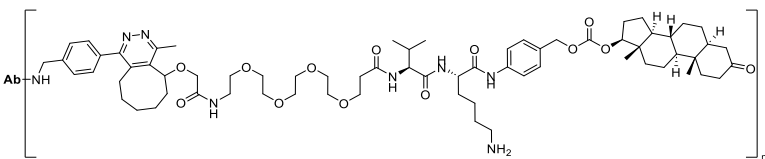
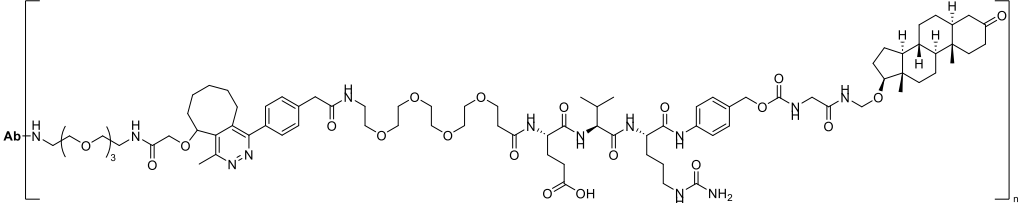
- 15 Tabla 5. Lista de anticuerpos, anticuerpos funcionalizados con azido y ADC

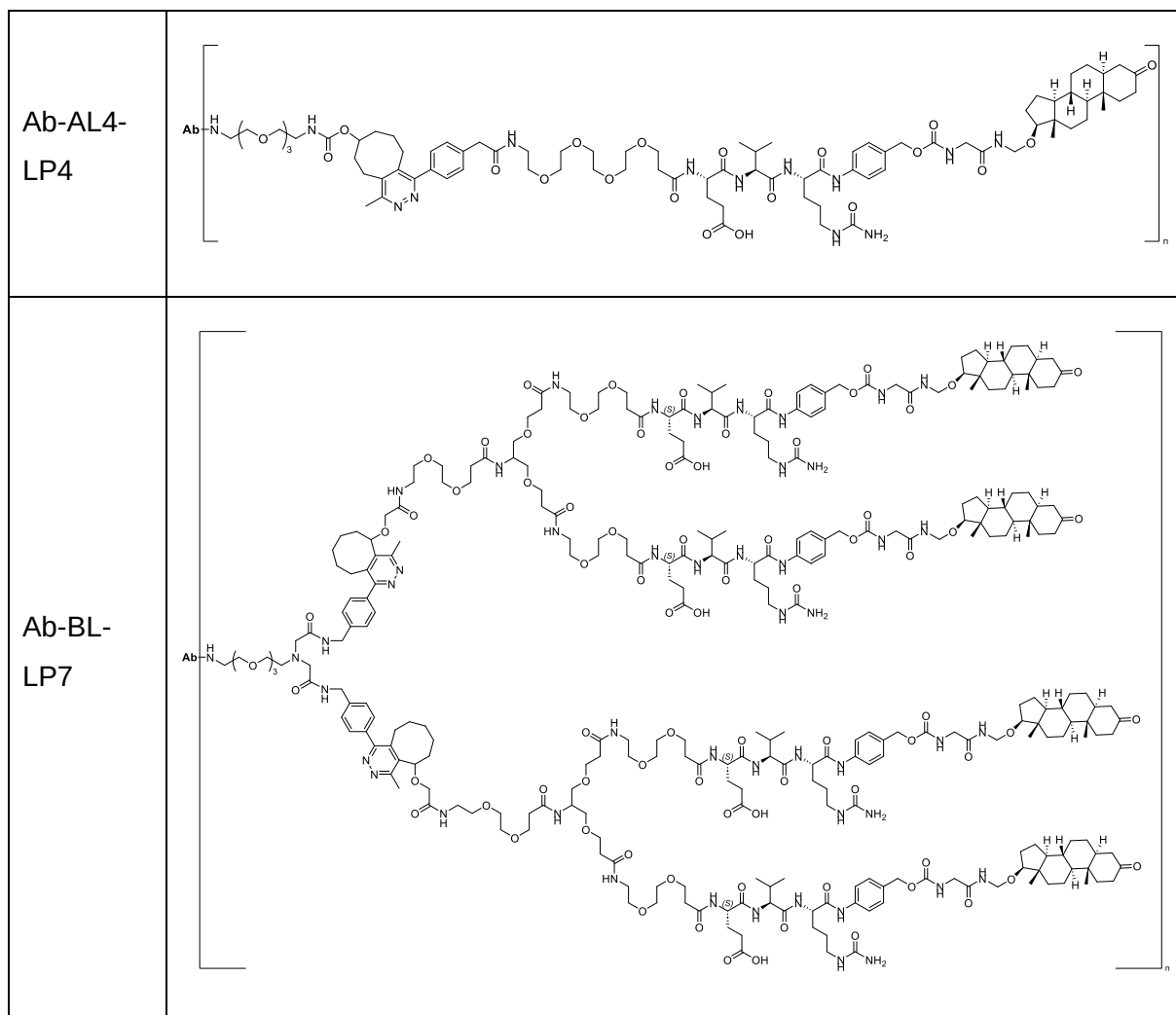
Descripción de ADC	enlazador-carga útil	DAR	ES-MS
mAb1 aCACNG			145580
mAb2 aCACNG			144909
mAb3 aCACNG			144426
mAb4 aCACNG			145183
mAb5 aCACNG			144332
mAb6 aCACNG			145091
mAb7 aCACNG			145075
mAb Fel D1			145439

mAb aCACNG1 - M404	Ab1-(AL) ₄	4,0	146389
mAb aCACNG1 - M404	Ab2-(AL) ₄	3,9	145713
mAb aCACNG1 - M404	Ab3-(AL) ₄	4,0	145227
mAb aCACNG1 - M404	Ab4-(AL) ₄	4,0	145985
mAb aCACNG1 - M404	Ab5-(AL) ₄	4,0	145135
mAb aCACNG1 - M404	Ab6-(AL) ₄	4,0	145894
mAb aCACNG1 - M404	Ab7-(AL) ₄	4,0	145874
mAb aCACNG1 - M404	Cont.Ab-(AL) ₄	4,0	146248
ADC1	Ab1-(AL-LP) ₄	4,0	151671
ADC2	Ab2-(AL-LP) ₄	3,9	150977
ADC3	Ab3-(AL-LP) ₄	3,9	150486
ADC4	Ab4-(AL-LP) ₄	3,9	151244
ADC5	Ab5-(AL-LP) ₄	4,0	150394
ADC6	Ab6-(AL-LP) ₄	4,0	151153
ADC7	Ab7-(AL-LP) ₄	4,0	151133
ADC9	Ab-(AL-LP) ₄	3,9	151489
ADC10	Ab2-(AL-LP) ₄	3,8	151756
ADC11	Ab7-(AL-LP) ₄	3,7	151656
Control. ADC1	Control.Ab-(AL-LP) ₄	4,0	151543
Control. ADC2	Control. Ab-(AL-LP) ₄	3,8	152038

Tabla 6: Anticuerpos-enlazadores y ADC seleccionados ejemplificados de acuerdo con la presente divulgación

ADC No.	Estructura de ADC
Ab-grupo funcional = Ab-AL	
Ab-AL-LP2	
Ab-AL-LP3	
Ab-AL-LP7	
Ab-AL-LP41	
Ab-grupo funcional 2 = Ab-AL2	

Ab-grupo funcional 3 = Ab-AL3	
Ab-grupo funcional 4 = Ab-AL4	
Ab-grupo funcional 4 = Ab-BL	
Ab-AL2-LP32	
Ab-AL2-LP41	
Ab-AL3-LP4	



Paso 1: la conjugación específica del sitio de la amina funcionalizada con grupo funcional con un anticuerpo generó un conjugado de anticuerpo modificado que contenía 1-4 grupos funcionales por anticuerpo.

- 5 Se mezcló IgG de anticuerpo humano aglucosilado que contiene una mutación N297Q o mutación N297D en amortiguador BupH (pH 7,4) con ≥ 100 equivalentes molares de grupo funcional-amina (**AL**) no ramificada o ramificada. La solución resultante se mezcló con transglutaminasa (350 U/ml; 1 U mTG por mg de anticuerpo, SLCK1576, Sigma; o 25 U/ml; 1 U mTG por mg de anticuerpo, Zedira, Darmstadt, Alemania; o 10 U/ml; 0,06 mg mTG por mg de anticuerpo, Modernist Pantry-ACTIVA TI contiene maltodextrina de Ajinomoto, Japón)
- 10 dando como resultado una concentración final del anticuerpo en 0,5-20mg/mL. La mezcla de reacción se incubó a 25-37 °C durante 24 horas en tanto que se agitaba suavemente en tanto que se monitoreaba por ESI-MS. Una vez completado, el exceso de amina y mTG se

eliminaron por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) o cromatografía en columna de proteína A. El conjugado se caracterizó por UV-Vis, SEC y ESI-MS.

Paso 2: reacciones click entre los anticuerpos funcionalizados con grupo funcional (Ab-grupo funcional) y un enlazador-carga útil (LP) en la tabla 3 para generar los ADC específicos del sitio.

El anticuerpo funcionalizado con grupo funcional (Ab-(AL)_n, 1-20 mg/ml) en PBS (pH 7,4) se incubó con ≥ 2 -10 equivalentes molares de un enlazador-carga útil (LP) disuelto en un solvente orgánico tal como DMSO o DMA (10 mg/ml) para tener la mezcla de reacción general que contiene 5-15 % de solvente orgánico (v/v), a 25-37 °C durante 1-48 horas en tanto que se agita suavemente. La reacción se monitoreo por ESI-MS. Una vez completado, la cantidad en exceso de LP y solvente orgánico se removió a través de una columna de desalación con BupH (pH 7,4), y los agregados de proteínas (si los hubiera) se removieron por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). El conjugado purificado, Ab-(AL-LP)_n ADC o Ab-(AL-(LP)₂)₄ ADC, se concentró, se filtró de forma estéril y se caracterizó por UV-Vis, SEC y ESI-MS. La pureza de monómero de conjugado fue >95 % por SEC.

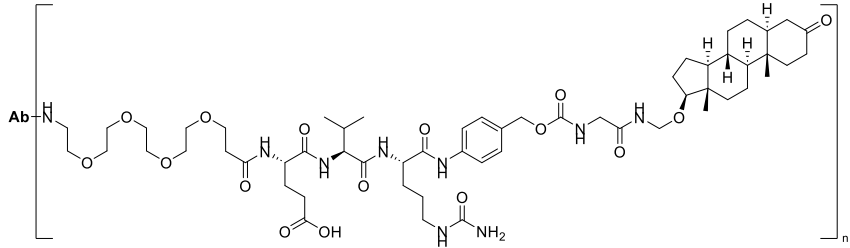
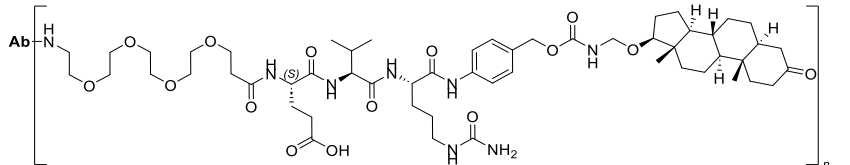
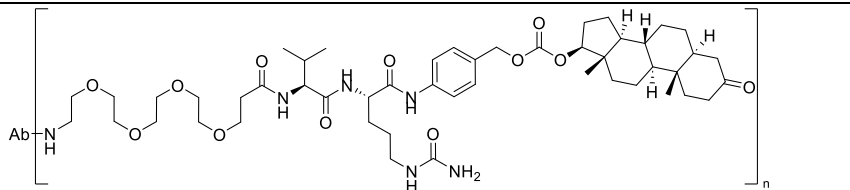
Todos los ADC se purificaron por SEC usando un instrumento ÄKTA de Cytiva, usando una columna 16/600 Superdex® 200, eluyendo con DPBS, a una velocidad de flujo de 1,5 ml/min a pH 7,4. Los valores de DAR de los ADC se midieron por ESI-MS. Se observó un incremento de masa de 4 x LP de Ab-[AL]₄, que se correlaciona con 4DAR ADC.

Procedimiento de conjugación detallado

Lo siguiente ejemplifica un ADC 4DAR representativo del enfoque I. El anticuerpo IgG humano anti-CACNG1 aglucosilado que contiene una mutación N297Q se mezcló con 100 equivalentes molares de una azido-dPEG3-amina (AL1, PM 218,26 g/mol). La solución resultante se mezcló con transglutaminasa microbiana (350 U/ml; 1 U mTG por mg de anticuerpo, Sigma) dando como resultado una concentración final del anticuerpo en 3,4 mg/ml. La mezcla de reacción se incubó a 32 °C durante una hora en tanto que se agitaba suavemente en tanto que se monitoreaba por ESI-MS. Una vez completado, el exceso de amina y mTG se eliminaron por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). El conjugado se caracterizó por UV-Vis, SEC y ESI-MS. Los enlazadores azido unidos al anticuerpo dieron como resultado un incremento de masa de 811Da en comparación con el mAb, lo que indica que 4 AL se conjugó con el anticuerpo (Ab-(AL)₄) con 4 grupos funcionales azido.

El conjugado de azido de anticuerpo específico de sitio (6,9 mg/ml) en PBS (pH 7,0) se mezcló con 6 equivalentes molares de enlazador-carga útil (**LP1**) en 2 mM de DMSO para tener la mezcla de reacción que contiene 12 % de solvente orgánico (v/v), y la solución se ajustó a 37 °C durante 4 horas en tanto que se agita suavemente. La reacción se monitoreo por ESI-MS. Una vez completado, la cantidad en exceso de carga útil de enlazador y agregados de proteínas se eliminó por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). El conjugado purificado se concentró, se filtró de forma estéril y se caracterizó por UV-Vis, SEC y ESI-MS. La pureza de monómero de conjugados fue 99,8 % por SEC. El anticuerpo unido al fármaco dio como resultado un incremento de masa de 5264 Da para el conjugado DAR4. La pureza del monómero de los conjugados C fue >99 % por SEC.

Tabla 7: Seleccione los ADC preparados de acuerdo con el procedimiento de un solo paso como se muestra en la **FIGURA 8B**.

LP No.	Estructura de ADC
Ab-LP3A	
Ab-LP5A	
Ab-LP44	

Conjugación de disulfuro intercatenario

Los anticuerpos (2 mg/ml) en HEPES 50 mM, EDTA 2 mM, pH 7,4, se trataron con ditiotretitol 1 mM o TCEP 5 mM a 37 °C durante 90 min. Después de la filtración de Amicon (30K), el derivado de carga útil del enlazador maleimido (1,0-2,0 equivalentes/grupo SH del residuo de cisteína, LP33 o LP42) en DMSO o DMA (solución 8 mM) se agregó al anticuerpo reducido. Después de 1 h, la finalización de la reacción se confirmó por monitoreo de LC-MS.

Los conjugados se purificaron por cromatografía de exclusión por tamaño bajo condición de elución de amortiguador isocrático usando PBS (1X) pH 7,4 o cromatografía de interacción hidrófoba bajo condición de elución de gradiente usando NaCl 3M en fosfato de sodio 50 mM como amortiguador de unión a pH 7,4 y fosfato de sodio 50 mM con 15 % - 20 % de IPA como amortiguador de elución a pH 7,4. Las fracciones puras se concentraron y el amortiguador se intercambió en PBS (1 X) pH 7,4 por filtro Amicon de 30 K seguido de la formulación con glicerol al 5 % (v/v) y se filtró estéril. Las concentraciones de carga útil de proteína y enlazador se determinaron por análisis espectral UV. La HPLC de exclusión por tamaño estableció que todos los conjugados usados eran >95 % monoméricos, y la RP-HPLC estableció que había <0,5 % de carga útil de enlazador no conjugado.

Se conoce en la técnica que el anillo de succinimida de 5 miembros formado durante la conjugación existe como un equilibrio entre el anillo cerrado y dos isoformas de anillo abierto por hidrólisis en condiciones neutras o alcalinas.

Tabla 8: ADC seleccionado preparado de acuerdo con el procedimiento de Cys-maleimida como se muestra en la **FIGURA 8C**

LP No.	Estructura de ADC
Ab-LP33	

Ejemplo 10: Caracterización de ADC ejemplificados

Los espectros de ESI-MS seleccionados de ADC y Ab-grupo funcional se muestran en las **FIGURAS 9-11**.

Ejemplo 10A: SDS-PAGE para análisis de integridad y pureza de ADC

En un método, las condiciones de ejecución de SDS-PAGE incluyen muestras no reducidas y reducidas (1-2 µg) junto con estándares de doble color de proteína Precision Plus (Bio-rad, 500 µl, Cat# 1610374) se cargan por carril en (1,0 mm × 10 pozos) Novex 4-20 % sin gel de Tris-glicina y se ejecuta a 180 V, 300 mA, durante 80 minutos. Se prepara una muestra no reducida usando amortiguador de muestra NuPAGE® LDS (4X) (Thermo Fisher Scientific, Cat#1887691) y la muestra reducida se prepara con amortiguador de muestra SDS

(4X) que contiene 10 % de agente reductor de muestra (10X) (Thermo Fisher Scientific, Cat#1769410).

5 Los pesos moleculares de los anticuerpos y ADC en SDS-PAGE se determinan en condiciones no reductoras y reductoras. Los cambios de masa pueden no ser obvios en condiciones no reductoras debido a porcentajes relativamente pequeños de cambios de masa. Sin embargo, las masas de las cadenas pesadas incrementan de los anticuerpos desnudos a los anticuerpos funcionalizados con azido, y además a los conjugados de ADC.

Ejemplo 10B: Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para análisis y purificación de ADC

10 Para determinar la pureza de los conjugados de anticuerpo-fármaco, se realiza cromatografía de exclusión por tamaño. Los experimentos analíticos de SEC se ejecutan usando un instrumento Thermo UltiMate™ 3000, en una columna XBridge Protein BEH SEC (Waters, 200Å, 3,5 µm, 7,8 mm X 300 mm), y cada muestra (30-40µg, 20µL) se ejecuta a una velocidad de flujo de 0,5mL/min usando PBS pH 7,4 con 2-propanol al 15 % y se monitorea a
15 λ280nm usando un detector de matriz de diodos de separación rápida Thermo DAD-3000 RS.

Los ADC se purifican por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y se concentran usando ultracentrifugación. Para separar los conjugados de anticuerpo y fármaco de la mezcla de reacción, se realizan purificaciones preparativas de SEC usando el instrumento ÄKTA de GE Healthcare, en una columna Superdex® 200 de incremento 10/300
20 GL (1,0×30 cm), a la velocidad de flujo de 0,6 mL/min eluyendo con BupH a pH 7,4 y monitoreado a λ280nm. Para concentrar el producto, se usan filtros centrífugos Amicon ® Ultra-4 (Ultracel-10K) en la centrífuga Allegra x-12r, y la solución se agita después de cada concentración para evitar una alta agregación.

Ejemplo 10c: Procedimiento experimental del ensayo indicador de andrógenos
25 CACNG1

El ensayo de indicador de andrógeno CACNG1 se describe a continuación, que incluye líneas de células relevantes, proteínas, reactivos y tipo y modelo de instrumento. CACNG1 es la subunidad γ1 del receptor de dihidropiridina que se expresa específicamente en el músculo esquelético. Por lo tanto, los anticuerpos generados contra CACNG1 se podrían usar para
30 administrar cargas terapéuticas conjugadas específicamente a músculo esquelético para mejorar la eficacia terapéutica en músculo y reducir la toxicidad fuera de diana. La conjugación

del potente metabolito de testosterona, dihidrotestosterona (DHT), con anticuerpos CACNG1, puede permitir la señalización del receptor de andrógenos en el músculo, lo que conduce a masa y función muscular incrementadas. Aquí, los anticuerpos CACNG1 conjugados con un enlazador con carga útil de DHT se probaron en una línea de células indicadora de receptor de andrógenos (AR) para determinar si estos conjugados de anticuerpo pueden activar específicamente el AR en células que expresan CACNG1 *in vitro*.

Para valorar la señalización a mediante el AR, las células LNCaP se transfectaron con lentivirus (Qiagen; ARE.Luc Signal Lenti) para generar una línea de células estable que expresara el indicador de AR-luciferasa (AR.Luc). Un subconjunto de estas células seleccionadas se transdujo para expresar CACNG1 humano y se seleccionó adicionalmente, con esta línea de células que se refiere como hCACNG1.AR.Luc.

Para el bioensayo, las células AR.Luc o hCACNG1.AR.Luc se colocaron en placas a 5,000 células/pozo en OptiMEM y FBS despojado de carbón al 0,5 % en placas de 96 pozos recubiertas con PDL. Las células se incubaron entonces durante 24, 48 o 27 horas con anticuerpos CACNG1 o anticuerpo de control de isotipo conjugado con DHT a través de un enlazador, o DHT de carga útil sola. Todos los anticuerpos se conjugaron con DHT a una relación fármaco-anticuerpo (DAR) de ~4. Después de los puntos de tiempo respectivos, las células se lisaron e incubaron con amortiguador One-GLO, y la luminiscencia se leyó en un lector de placas Envision. Las unidades de luminiscencia relativa (RLU) se graficaron contra la concentración logarítmica en mol/L, ajustada para DAR.

Resumen de resultados y conclusiones

La DHT no conjugada activó AR en ambas líneas de células AR.Luc y hCACNG1.AR.Luc, mientras que la DHT conjugada con un anticuerpo de control de isotipo Ab 1 no activó AR en ninguna de estas líneas celulares. Varios conjugados de anticuerpo CACNG1-DHT activaron AR solo en la línea de células hCACNG1.AR.Luc, pero no en la línea de células AR.Luc. En tanto que la eficacia y potencia de la activación de AR de conjugados de anticuerpo CACNG1-DHT fue menor que la de DHT no conjugada a 24 horas después del tratamiento, la activación de AR se mantuvo a 48 y 72 horas con estos conjugados, mientras que la señal de AR no conjugada disminuyó sustancialmente en estos puntos de tiempo. En general, estos datos demuestran que la conjugación de DHT a anticuerpos de CACNG1 permite la activación específica del AR en células que expresan hCACNG1, y que DHT conjugada a anticuerpos de CACNG1 mantiene la señalización de AR sostenida durante varios días en células que expresan hCACNG1 *in vitro*.

Ejemplo 10D: Ensayo libre de células para afinidad de unión de DHT a AR

DHT tiene IC₅₀ de 1,43 nM en el ensayo de AR realizado por el Servicio de Perfiles SelectScreen™ de Thermo Fisher Scientific.

AR (receptor de andrógenos) - Examen de antagonistas, activado por R1881
5 (metribolona o metiltrienolona, un agonista de AR)

Las células AR-UAS-bla GripTite™ 293 se descongelan y se preparan como se describió anteriormente para el cribado de agonistas (ver Ejemplo 5). Se adicionan 4 µL de una dilución en serie 10X de acetato de ciproterona (concentración inicial de antagonista de control, 3,160 nM) o compuestos a los pozos apropiados de una placa de ensayo de poli-D-
10 lisina. Se adicionan 32 µL de suspensión celular a los pozos y se preincuban a 37°C/5 % de CO₂ en una incubadora humidificada con compuestos y titulación de antagonista de control durante 30 minutos. Se adicionan 4 µL del agonista de control 10X R1881 a la concentración de EC₈₀ predeterminada a los pocillos que contienen el antagonista de control o los
15 compuestos. La placa se incuba durante 16-24 horas a 37 °C/CO₂ al 5 % en una incubadora humidificada. Se adicionan 8 µL de solución de carga de sustrato 1 µM a cada pozo y la placa se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente. La placa se lee en un lector de placas de fluorescencia. Los resultados de la pantalla se muestran en la **FIGURA 12**.

Ejemplo 10E: Estabilidad plasmática de aCACNG1DHT-ADC

Para determinar la estabilidad plasmática de CACNG1-DHT ncADC anti-hCACNG1 Ab
20 5-L3 y anti-hCACNG1 Ab 5- [L2] que lleva carga útil de DHT, se incubaron ncADC *in vitro* con el plasma de diferentes especies y se evaluó la relación de fármaco a anticuerpo (DAR).

La solución de ncADC se adicionó por separado en plasma humano de ratón, rata, mono cynomolgus o IgG agotado combinado (Bipoint) a una concentración final de 50 µg/ml, y posteriormente se incubó a 37 °C en ThermoMixer C (Eppendorf, Cat# 2231000574). Se
25 removió una alícuota de 100-µL en el tiempo 0, 24, 48, 72 y 168 horas, y entonces se almacenó inmediatamente congelada a -80° C hasta el análisis.

Para el análisis DAR, se purificó ncADC de muestras de plasma por captura de inmunoafinidad usando un procesador automatizado KingFisher Apex (Thermo Scientific, Cat#5400930). En primer lugar, el anticuerpo Fc anti-humano biotinilado (reactivo generado
30 por Regeneron) se inmovilizó en perlas de estreptavidina Dynabeads M280 (Invitrogen, Cat#60210). Cada muestra de plasma que contenía la ncADC se mezcló a 950 rpm con 0,5

mg de las perlas (perla acoplada a reactivo generada por Regeneron) a temperatura ambiente durante 1,5 horas con agitación suave. Las perlas entonces se lavaron tres veces con 500 µL de amortiguador HBS-EP pH 7,4 (GE Healthcare, Cat#BR100188), una vez con 500 µL de agua y una vez con 500 µL de acetonitrilo al 10 % (VWR Chemicals, Cat # BDH83640,100E) en agua. Después de los lavados, las ncADC se eluyeron al incubar las perlas con 70 µL de ácido fórmico al 1 % en acetonitrilo:agua 30:70 (v/v) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las muestras eluidas de 50 µL se redujeron adicionalmente al agregar 50 µL de TCEP 10 mM (Sigma, Cat 646547-10X1ML) y se incubaron a 37 °C durante 20 min en ThermoMixer C.

Las muestras de ncADC reducidas se inyectaron en una columna BEH300 C4 de 1x50 mm 1,7 µm (Waters, Cat# 186005589) para la separación y luego se detectaron mediante el espectrómetro de masas Synapt G2-Si (Waters, Milford, MA). La velocidad de flujo fue 80 µL/min (fase móvil A: ácido fórmico al 0,1 % en agua; fase móvil B: ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo). El gradiente de HPLC eluyó ncADC entre 2,0-6,5 minutos correspondiente al 25-40 % de la fase móvil B. Los espectros adquiridos se deconvolucionaron usando el software MaxEnt1 con los siguientes parámetros: Intervalo de masa: 20-60 kDa; intervalo m/z: 800-2500 Da; Resolución: 1,0 Da/canal; Ancho a media altura: 0,7 Da; Relaciones de intensidad mínima: 33 %; Iteración máx.: 12.

Resumen de resultados y conclusiones:

No se observó ningún cambio significativo en DAR para ambas ncADC después de la incubación de 168 horas en plasma humano de rata, mono cynomolgus o IgG agotada. Se observó una pérdida de DAR de aproximadamente 65 % y 15 % en plasma de ratón para Ab 5-HCACNG1 y Ab 5-HCACNG1, respectivamente.

El resumen de datos tabulados se presenta en la tabla 7, a continuación, y en las **FIGURAS 13-17**. La **FIGURA 16** muestra el nivel de activación de receptor de andrógenos (AR) en términos de unidades de luz relativas (RLU; eje y) después de una incubación de 24 horas de una línea de células LNCaP modificada para expresar luciferasa tras la activación de receptor de andrógenos (AR.Luc) con: dihidrotestosterona (DHT) sola (DHT no conjugada); un anticuerpo anti-hCACNG1 (Ab 6 anti-hCACNG1, Ab 7 anti-hCACNG1, Ab 8 anti-hCACNG1, Ab 9 anti-hCACNG1, Ab 10 anti-hCACNG1 o Ab 5 anti-hCACNG1) conjugado mediante un enlazador VC-PAB a DHT (L2); o un anticuerpo de control de isotipo anti-FcD (Ab 1 de control de isotipo) conjugado mediante un enlazador VC-PAB a DHT (L2); a concentraciones variables (Log[Conc. (M)]; eje x). La **FIGURA 17** muestra el nivel de

activación de receptor de andrógenos (AR) en términos de unidades de luz relativas (RLU; eje y) después de una incubación de 24 horas, 48 horas o 72 horas de una línea de células LNCaP modificada que expresa CACNG1 para expresar también luciferasa tras la activación de receptor de andrógenos (hCACNG1.AR.Luc) con: dihidrotestosterona (DHT) sola (DHT no conjugada); un anticuerpo anti-hCACNG1 (Ab 6 anti-hCACNG1, Ab 7 anti-hCACNG1, Ab 8 anti-hCACNG1, Ab 9 anti-hCACNG1, Ab 10 anti-hCACNG1 o Ab 5 anti-hCACNG1) conjugado mediante un enlazador VC-PAB a DHT (L2); o un anticuerpo de control de isotipo anti-FelD (Ab 1 de control de isotipo) conjugado mediante un enlazador VC-PAB a DHT (L2); a concentraciones variables (Log[Conc. (M)]; eje x).

Tabla 7. Valor DAR anti-hCACNG1 Ab 5-L2 y anti-hCACNG1 Ab 5-L3 después de la incubación en plasma

	Ab 5 anti-hCACNG1-L2				Ab 5 anti-hCACNG1-L3			
Tiempo (día)	Ratón	Rata	Mono	Humano	Ratón	Rata	Mono	Humano
0	3,95	3,94	3,94	3,94	3,83	3,83	3,88	3,84
1	3,24	3,94	3,95	3,95	3,69	3,82	3,84	3,84
2	2,81	3,95	3,95	3,95	3,56	3,81	3,84	3,84
3	2,39	3,95	3,94	3,94	3,47	3,79	3,83	3,84
7	1,74	3,95	3,93	3,94	3,27	3,74	3,85	3,85

Puesto que se pueden realizar varios cambios en la presente materia descrita anteriormente sin desviarse del alcance y espíritu de la presente invención, se propone que toda la presente materia contenida en la descripción anterior, o definida en las reivindicaciones anexas, se interprete como descriptiva e ilustrativa de la presente invención. Son posibles muchas modificaciones y variaciones de la presente invención en vista de las enseñanzas anteriores. Por consiguiente, se propone que la presente descripción abarque todas estas alternativas, modificaciones, y variaciones que caen dentro del alcance de las reivindicaciones anexas.

Todas las patentes, solicitudes, publicaciones, métodos de prueba, literatura, y otros materiales citados en la presente se incorporan como referencia en su totalidad como si estuvieran físicamente presentes en esta especificación.