

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 014 819**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**C07K 16/30** (2006.01)  
**C07K 16/32** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 47/68** (2007.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.11.2015** **PCT/CA2015/051238**  
87 Fecha y número de publicación internacional: **02.06.2016** **WO16082044**  
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.2015** **E 15862509 (5)**  
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2024** **EP 3223848**

54 Título: **Métodos de uso de constructos biespecíficos de unión a antígenos dirigidos a HER2**

30 Prioridad:

**27.11.2014 WO PCT/CA2014/051140**  
**27.05.2015 US 201562166844 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la  
traducción de la patente:  
**25.04.2025**

73 Titular/es:

**ZYMEWORKS BC INC. (100.00%)**  
**Suite 800 - 114 East 4th Avenue**  
**Vancouver, BC V5T 1G4, CA**

72 Inventor/es:

**WICKMAN, GRANT RAYMOND;**  
**NG, GORDON YIU KON y**  
**WEISSER, NINA E.**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o  
Bemerkungen) en el folleto original publicado por la  
Oficina Europea de Patentes

ES 3 014 819 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Métodos de uso de constructos biespecíficos de unión a antígenos dirigidos a HER2

## Antecedentes

La mayoría de los anticuerpos terapéuticos comercializados actualmente son anticuerpos monoespecíficos bivalentes optimizados y seleccionados por su alta afinidad de unión y avidéz conferidas por los dos dominios de unión a antígeno. La afucosilación o la mejora de la unión de FcγR mediante mutagénesis se han empleado para hacer que los anticuerpos sean más eficaces a través de mecanismos de citotoxicidad celular dependientes del anticuerpo Fc. Los anticuerpos afucosilados o los anticuerpos con unión mejorada a FcγR aún adolecen de una eficacia terapéutica incompleta en las pruebas clínicas y aún no se ha alcanzado el estatus de medicamento comercializado para ninguno de estos anticuerpos. Los anticuerpos bivalentes típicos conjugados con toxinas (conjugados anticuerpo-fármaco) son más eficaces, pero su utilidad clínica más amplia está limitada por la toxicidad limitante por la dosis.

Los anticuerpos terapéuticos idealmente poseerían ciertas características mínimas, incluyendo especificidad del objetivo, bioestabilidad, biodisponibilidad y biodistribución después de la administración a un paciente en particular, y suficiente afinidad de unión al objetivo y alta ocupación del objetivo para maximizar los efectos terapéuticos dependientes del anticuerpo. Normalmente los anticuerpos terapéuticos son monoespecíficos. Sin embargo, el direccionamiento monoespecífico no aborda otros epítomos objetivo que pueden ser relevantes en la señalización y la patogénesis de la enfermedad, lo que permite la resistencia a los fármacos y un mecanismo de escape. Algunos de los paradigmas terapéuticos actuales requieren el uso de una combinación de dos anticuerpos terapéuticos monoespecíficos dirigidos a dos epítomos diferentes del mismo antígeno objetivo. Un ejemplo es el uso de una combinación de Trastuzumab y Pertuzumab, ambos dirigidos a la proteína del receptor HER2 en la superficie de algunas células cancerosas, pero los pacientes aún progresan con la enfermedad mientras que otros con niveles más bajos del receptor HER2 (HER2 <3+ por la prueba de Hercept) no muestran ningún beneficio terapéutico. Se divulgan anticuerpos terapéuticos dirigidos a HER2 en el documento WO 2012/143523 de GenMab y en el documento WO 2009/154651 de Genentech. Por ejemplo, el documento WO 2012/143523 describe anticuerpos biespecíficos que comprenden regiones de unión a antígeno que se unen a dos epítomos diferentes de HER2, y composiciones y moléculas basadas en anticuerpos relacionados. También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos y métodos para preparar y utilizar los anticuerpos. Los anticuerpos también se describen en el documento WO 2009/068625 y el documento WO 2009/068631.

La publicación de la solicitud de patente de titularidad compartida número WO2015077891 describe los anticuerpos HER2. La solicitud de patente de titularidad compartida número PCT/US2014/037401 (documento WO 2014/182970) describe los anticuerpos HER2. La solicitud de patente de titularidad compartida número PCT/CA2013/050358 (documento WO 2013/166604) describe anticuerpos monovalentes de un solo brazo. La publicación de solicitudes de patente de propiedad compartida números WO2012/058768, presentada el 4 de noviembre de 2011, WO2013/063702, presentada el 2 de noviembre de 2012, WO2013/166594, presentada el 10 de mayo de 2013, y WO2013/166604, presentada el 8 de mayo de 2013 describen anticuerpos terapéuticos.

## Resumen

La invención se define mediante las reivindicaciones.

La invención proporciona un constructo de unión a antígeno para su uso en un método para inhibir el crecimiento tumoral en un sujeto humano, en donde al sujeto humano se le administran al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 dosis del constructo de unión a antígeno, y/o en donde cada dosis se administra al menos cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 días. El constructo de unión a antígeno proporcionado para su uso de acuerdo con la invención comprende un primer constructo de polipéptido de unión a antígeno que se une de forma monovalente y específica a un antígeno HER2 (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano) ECD2 (dominio extracelular 2) en una célula que expresa HER2 y un segundo constructo de polipéptido de unión a antígeno que se une de forma monovalente y específica a un antígeno ECD4 de HER2 (dominio extracelular 4) en una célula que expresa HER2, primer y segundo polipéptidos de enlace, en donde el primer polipéptido de enlace está unido operativamente al primer constructo de polipéptido de unión a antígeno, y el segundo polipéptido de enlace está unido operativamente al segundo constructo de polipéptido de unión a antígeno; en donde los polipéptidos de enlace están unidos covalentemente entre sí, y en donde los polipéptidos de enlace están unidos operativamente a una región de Fc de IgG1 humana. El constructo del polipéptido de unión a ECD2 es un Fab, en donde el Fc Fab-enlazador-IgG1 comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 97 y una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 69. El constructo del polipéptido de unión a ECD4 es un scFv, en donde el Fc scFv-enlazador-IgG1 comprende la SEQ ID NO: 295.

El constructo de unión a antígeno proporcionado para su uso de acuerdo con la invención se denomina a menudo en el presente documento constructo "v 10000". Las referencias a otros constructos son para referencia e ilustración y no forman parte de la invención reivindicada.

#### Breve descripción de los dibujos

- 5 La Figura 1A muestra la estructura de un anticuerpo biparatópico en formato Fab-Fab. Las Figuras 1B a 1E muestran la estructura de posibles versiones de un anticuerpo biparatópico en formato scFv-Fab. En la Figura 1B, el dominio de unión a antígeno 1 es un scFv, fusionado a la Cadena A, mientras que el dominio de unión a antígeno 2 es un Fab, fusionado a la Cadena B. En la Figura 1C, el dominio de unión a antígeno 1 es un Fab, fusionado a la Cadena A, mientras que el dominio de unión a antígeno 2 es un scFv, fusionado a la Cadena B.
- 10 En la Figura 1D, el dominio de unión a antígeno 2 es un Fab, fusionado a la Cadena A, mientras que el dominio de unión a antígeno 1 es un scFv, fusionado a la Cadena B. En la Figura 1E, el dominio de unión a antígeno 2 es un scFv, fusionado a la Cadena A, mientras que el dominio de unión a antígeno 1 es un Fab, fusionado a la Cadena B. En la Figura 1F, ambos dominios de unión a antígeno son scFv.
- 15 La Figura 2 muestra la caracterización de la expresión y purificación de anticuerpos biparatópicos anti-HER2 ejemplares. La Figura 2A y la Figura 2B muestran la cromatografía SEC del anticuerpo purificado de proteína A y el análisis SDS-PAGE no reductor de la expresión de 10 L y la purificación de v5019. La Figura 2C muestra el análisis SDS-PAGE de una expresión de 25L y purificación de v10000.
- 20 La Figura 3 muestra los resultados del análisis UPLC-SEC de anticuerpos biparatópicos anti-HER2 ejemplares purificados por proteína A y SEC. La Figura 3A muestra los resultados para v5019, donde el panel superior muestra los resultados de la purificación y el panel inferior muestra el mismo resultado con una escala expandida para el eje y. A continuación, se proporciona un resumen de los datos obtenidos con los resultados de UPLC-SEC. La Figura 3B muestra los resultados para v10000.
- 25 La Figura 4 muestra el análisis por LCMS de la pureza del heterodímero de anticuerpos biparatópicos anti-HER2 ejemplares. La Figura 4A muestra los resultados del análisis por LC-MS de las fracciones SEC agrupadas de v5019. La Figura 4B muestra los resultados del análisis por LC-MS de las fracciones de proteína A agrupadas de v10000.
- 30 La Figura 5 muestra el análisis de una preparación a escala de 25 L de un anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar. La Figura 5A muestra el perfil de SDS-PAGE de un biparatópico anti-HER2 ejemplar después de purificación por MabSelect™ y HiTrap™ SP FF. La Figura 5B muestra el análisis por LCMS del anticuerpo purificado.
- 35 La Figura 6 compara la capacidad de anticuerpos anti-HER2 biparatópicos ejemplares para unirse a células completas HER2+ que muestran una densidad de receptores HER2 diferente en comparación con los anticuerpos de control, de acuerdo con lo medido por FACS. La Figura 6A y la Figura 6E muestran la unión a las células SKOV3; la Figura 6B muestra la unión a las células JIMT1; la Figura 6C y la Figura 6F muestran la unión a las células MCF7; la Figura 6D muestra la unión a las células MDA-MB-231; y la Figura 6G muestra la unión a las células WI-38.
- 40 La Figura 7 muestra la capacidad de algunos anticuerpos anti-HER2 biparatópicos para inhibir el crecimiento de células HER2+. La Figura 7A y la Figura 7D muestran la inhibición del crecimiento en células SKOV3; la Figura 7B muestra la inhibición del crecimiento en células BT-474; la Figura 7C muestra la inhibición del crecimiento en células SKBR3 y la Figura 7E muestra la inhibición del crecimiento en células JIMT-1.
- 45 La Figura 8 muestra los datos de unión de SPR relacionados con los paratopos de un anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar. La Figura 8A ilustra los valores de  $K_D$  (nM) de un anticuerpo anti-Her2 monovalente (v1040; que representa el dominio de unión a antígeno en CH-B del anticuerpo biparatópico anti-Her2 ejemplar), para la unión al ECD de Her2 inmovilizado o al Her2-Fc dimérico. La Figura 8B ilustra los valores de  $K_D$  (nM) de un anticuerpo anti-Her2 monovalente (v4182; que representa el dominio de unión a antígeno en CH-A del anticuerpo biparatópico anti-Her2 ejemplar) para la unión al ECD de Her2 inmovilizado o al Her2-Fc dimérico.
- 50 La Figura 9 muestra la capacidad de un anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar para internalizarse en las células HER2+. La Figura 9A muestra la internalización en células BT-474, mientras que la Figura 9b muestra la internalización en células JIMT-1.
- 55 La Figura 10 muestra la unión superficial y la internalización de anticuerpos biparatópicos anti-HER2 ejemplares. La Figura 10A (v5019) muestra el resultado en células BT-474; la Figura 10B (v5019) y la Figura 10F (v5019 y v10000) muestran el resultado en células JIMT1; la Figura 10C (v5019) y la Figura 10E (v5019 y v10000) muestran el resultado en células SKOV3, y la Figura 10D (v5019) muestra el resultado en células MCF7.
- La Figura 11 muestra la capacidad de un anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar para mediar la ADCC en células SKOV3. En la Figura 11A, el ensayo se llevó a cabo utilizando una relación de células efectoras a

células objetivo de 5:1; en la Figura 11B, el ensayo se llevó a cabo utilizando una relación de células efectoras a células objetivo de 3:1; y en la Figura 11C, el ensayo se llevó a cabo utilizando una relación de células efectoras a células objetivo de 1:1.

5 La Figura 12 muestra la caracterización de la afinidad y la cinética de unión del anticuerpo anti-HER2 monovalente (v630 y v4182) y un anticuerpo anti-Her2 biparatópico ejemplar (v5019) al HER2 humano recombinante. La Figura 12A muestra la medición de  $k_a$  (1/Ms). La Figura 12B muestra la medición de  $k_d$  (1/s). La Figura 12C muestra la medición de  $K_D$  (M).

10 La Figura 13 muestra las características de afinidad y unión de un anticuerpo anti-HER2 biparatópico ejemplar al HER2 humano recombinante en un intervalo de niveles de captura de anticuerpos. La Figura 13A muestra la medición de  $k_d$  (1/s) para el ECD de HER2 determinado en un intervalo de niveles de captura de anticuerpos para el anticuerpo anti-Her2 biparatópico ejemplar (v5019). La Figura 13B muestra la medición de  $k_d$  (1/s) para el ECD de HER2 determinado en un intervalo de niveles de captura de anticuerpos para el anticuerpo anti-Her2 monovalente (v4182). La Figura 13C muestra la medición de  $k_d$  (1/s) para el ECD de HER2 determinado en un intervalo de niveles de captura de anticuerpos para el anticuerpo anti-Her2 monovalente (v630).

15 La Figura 14 muestra una comparación del mecanismo de unión de un anticuerpo HER2 anti-ECD4 monoespecífico (izquierda) y un anticuerpo anti-ECD2x ECD4 HER2 biparatópico Fab-scFv (derecha). El anticuerpo HER2 anti-ECD4 monoespecífico es capaz de unir una molécula de anticuerpo a dos moléculas de HER2; mientras que el anticuerpo HER2 anti-ECD2 x ECD4 biparatópico es capaz de unir un anticuerpo a dos moléculas de HER2, así como 2 anticuerpos a una molécula de HER2 y combinaciones de los mismos, lo que  
20 da como resultado el entrecruzamiento del receptor HER2 y la formación de una red seguida de efectos biológicos posteriores como la internalización y/o la inhibición del crecimiento, como lo indican las flechas. IEC representa "células efectoras inmunes". Los cuatro dominios extracelulares de HER2 están numerados como 1, 2, 3 o 4, donde 1 = ECD1, 2 = ECD2, 3 = ECD3 y 4 = ECD4.

25 La Figura 15 muestra el efecto de un anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar sobre la fosforilación de AKT en células BT-474.

La Figura 16 muestra el efecto de un anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar sobre la viabilidad de los cardiomiocitos. La Figura 16A muestra el efecto de v5019 y el ADC correspondiente v6363 sobre la viabilidad de los cardiomiocitos; la Figura 16B muestra el efecto de v5019, v7091 y v10000 y los ADC correspondientes v6363, 7148, 10553 sobre la viabilidad de los cardiomiocitos, y la Figura 16C muestra el efecto de v5019, v7091  
30 y v10000 y los ADC correspondientes v6363, 7148, 10553 sobre la viabilidad de los cardiomiocitos pretratados con doxorubicina.

La Figura 17 muestra la capacidad de conjugados de fármacos de anticuerpos biparatópicos anti-HER2 ejemplares para inhibir el crecimiento de células HER2+. La Figura 17A muestra la capacidad del ADC v6363 para inhibir el crecimiento de células JIMT1. La Figura 17B muestra la capacidad del ADC v6363 para inhibir el crecimiento de células SKOV3. La Figura 17C muestra la capacidad del ADC v6363 para inhibir el crecimiento de células MCF7. La Figura 17D muestra la capacidad del ADC v6363 para inhibir el crecimiento de células MDA-MB-231. La Figura 17E muestra la capacidad de los ADC v6363, v10553 y v1748 para inhibir el crecimiento de células SKOV3. La Figura 17F muestra la capacidad de los ADC v6363, v10553 y v1748 para inhibir el crecimiento de células JIMT-1. La Figura 17G muestra la capacidad de los ADC v6363, v10553 y  
40 v1748 para inhibir el crecimiento de células NCI-N87.

La Figura 18 muestra el efecto de un anticuerpo anti-HER2 biparatópico en un modelo de xenoinjerto de línea de cáncer de ovario humano (SKOV3). La Figura 18A muestra el efecto del anticuerpo sobre el volumen tumoral medio. La Figura 18B muestra el efecto del anticuerpo en el porcentaje de supervivencia de los animales.

45 La Figura 19 muestra el efecto de un conjugado de fármaco anticuerpo (ADC) anti-HER2 biparatópico en un modelo de xenoinjerto de línea de cáncer de ovario humano (SKOV3). La Figura 19A muestra el efecto del anticuerpo sobre el volumen tumoral medio. La Figura 19B muestra el efecto del anticuerpo en el porcentaje de supervivencia de los animales.

La Figura 20 muestra el efecto de un conjugado de fármaco anticuerpo (ADC) anti-HER2 biparatópico sobre el volumen tumoral medio en un modelo de xenoinjerto de células primarias de mama humana (HBCx-13b).

50 La Figura 21 muestra el efecto de un conjugado de fármaco anticuerpo (ADC) anti-HER2 biparatópico sobre el volumen tumoral medio en un modelo de xenoinjerto de células primarias de mama humana (T226).

La Figura 22 muestra el efecto de un conjugado de fármaco anticuerpo (ADC) anti-HER2 biparatópico sobre el volumen tumoral medio en un modelo de xenoinjerto de células primarias de mama humana (HBCx-5).

55 La Figura 23 muestra el efecto de un conjugado de fármaco anticuerpo (ADC) anti-HER2 biparatópico sobre tumores resistentes al tratamiento anti-HER2 en un modelo de xenoinjerto de línea celular humana (SKOV3).



La Figura 24 muestra el efecto de un conjugado de fármaco anticuerpo (ADC) anti-HER2 biparatópico sobre tumores resistentes al tratamiento anti-HER2 en un modelo de xenoinjerto de células primarias humanas (HBCx-13b).

- 5 La Figura 25 muestra la estabilidad térmica de anticuerpos biparatópicos anti-HER2 ejemplares. La Figura 25A muestra la estabilidad térmica de v5019. La Figura 25B muestra la estabilidad térmica de v10000. La Figura 25C muestra la estabilidad térmica de v7091.

La Figura 26 muestra la estabilidad térmica de conjugados de fármacos de anticuerpos biparatópicos anti-HER2 ejemplares. La Figura 26A muestra la estabilidad térmica de v6363. La Figura 26B muestra la estabilidad térmica de v10553. La Figura 26C muestra la estabilidad térmica de v7148.

- 10 La Figura 27 muestra la capacidad de los anticuerpos anti-HER2 biparatópicos para mediar la ADCC en células HER2+. La leyenda que se muestra en la Figura 27C se aplica a la Figura 27A y la Figura 27B. La Figura 27A muestra esta capacidad en células SKBR3; la Figura 27B muestra esta capacidad en células JIMT-1; la Figura 27C muestra esta capacidad en células MDA-MB-231; y la Figura 27D muestra esta capacidad en células WI-38.

- 15 La Figura 28 muestra el efecto de la afucosilación sobre la capacidad de los anticuerpos anti-HER2 biparatópicos para mediar la ADCC. La leyenda que se muestra en la Figura 28B se aplica también a la Figura 28A. La Figura 28A compara la capacidad de una versión afucosilada de v5019 para mediar ADCC con la de Herceptin™ en células SKOV3. La Figura 28B compara la capacidad de una versión afucosilada de v5019 para mediar ADCC con la de Herceptin™ en células MDA-MB-231. La Figura 28C compara la capacidad de v10000 y una versión afucosilada de v10000 para mediar ADCC contra la de Herceptin™ en células ZR-75-1.

La Figura 29 muestra la capacidad de v5019 para inhibir el crecimiento de células BT-474 en presencia o ausencia de ligandos estimuladores del crecimiento.

La Figura 30 muestra el efecto de una versión afucosilada de v5019 (v7187) sobre el volumen del tumor en un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama humano (HBCx13B).

- 25 La Figura 31 muestra la capacidad de los anticuerpos anti-HER2 biparatópicos y los ADC biparatópicos anti-HER2 para unirse a las células tumorales HER2+. La Figura 31A compara la unión de v6363 a un análogo de T-DM1, v6246, en células SKOV3. La Figura 31B compara la unión de v6363 a un análogo de T-DM1, v6246, en células JIMT-1. La Figura 31C compara la unión de varios anticuerpos biparatópicos anti-HER2 ejemplares y ADC biparatópicos anti-HER2 a controles, en células SKOV3. La Figura 31D compara la unión de varios anticuerpos biparatópicos anti-HER2 ejemplares y ADC biparatópicos anti-HER2 a controles, en células JIMT-1.

- 30 La Figura 32 muestra la inhibición del crecimiento tumoral dependiente de la dosis de un ADC biparatópico anti-HER2 ejemplar en un modelo de xenoinjerto derivado de paciente HER2 3+ (ER-PR negativo) (HBCx13b). La Figura 32A muestra el efecto de v6363 en el volumen del tumor, mientras que la Figura 32B muestra el efecto en el porcentaje de supervivencia.

La Figura 33 muestra el efecto del v6363 anti-HER2-ADC biparatópico en comparación con las combinaciones de atención estándar en un modelo de xenoinjerto PDX HBCx-13b resistente a trastuzumab. La Figura 33A muestra el efecto del tratamiento sobre el volumen del tumor, mientras que la Figura 33B muestra el efecto del tratamiento sobre la supervivencia.

- 40 La Figura 34 muestra la eficacia de un ADC anti-HER2 biparatópico en un modelo de xenoinjerto tumoral derivado de células de cáncer de mama resistente a HER2+ trastuzumab (JIMT-1).

- La Figura 35 muestra la eficacia de anticuerpos biparatópicos anti-HER2 ejemplares *in vivo* en un modelo de xenoinjerto tumoral derivado de células de cáncer de ovario sensible al trastuzumab (SKOV3). La Figura 35A muestra el efecto del tratamiento sobre el volumen del tumor, mientras que la Figura 35B muestra el efecto del tratamiento sobre la supervivencia.

La Figura 36 muestra la eficacia dependiente de la dosis de anticuerpos biparatópicos anti-HER2 ejemplares *in vivo* en un modelo de xenoinjerto tumoral derivado de células de cáncer de ovario sensible al trastuzumab (SKOV3).

- 50 La Figura 37 muestra la capacidad de un anticuerpo biparatópico anti-HER2 y un ADC biparatópico anti-HER2 para inhibir el crecimiento de líneas celulares que expresan HER2 y EGFR y/o HER3 en los niveles 3+, 2+ o 1+. La Figura 37A muestra la capacidad de v10000 para inhibir el crecimiento de líneas celulares seleccionadas. La Figura 37B muestra la capacidad de v10553 para inhibir el crecimiento de líneas celulares seleccionadas.

La Figura 38 muestra un resumen de la capacidad de v10000 y v10553 para inhibir el crecimiento en un panel de líneas celulares. Los valores con guion (p. ej., 1/2) indican niveles discrepantes del receptor erbb de acuerdo

con lo informado en la literatura; los valores IHC de Erbb se obtuvieron internamente o de la literatura. Cuando no se informa ningún valor, las cantidades del receptor son desconocidas y/o no se informan. \* Estimación del nivel de IHC basada en datos de expresión del gen erBb2 (Crown BioSciences). A continuación, se describen las referencias numeradas.

- 5 La Figura 39 muestra la capacidad de v10000 para mediar la ADCC en células HER2+. La Figura 39A muestra los resultados en células FaDu. La Figura 39B muestra los resultados en células A549. La Figura 39C muestra los resultados en células BxPC3. La Figura 39D muestra los resultados en células MiaPaca2.

- La Figura 40 muestra la capacidad de los anticuerpos anti-HER2 biparatópicos para mediar la ADCC en células HER2+. La Figura 40A muestra los resultados en células A549. La Figura 40B muestra los resultados en células NCI-N87. La Figura 40C muestra los resultados en células HCT-116.

- La Figura 41 muestra el efecto del formato de anticuerpo biparatópico anti-HER2 sobre la unión de las células HER2+. La Figura 41A muestra el efecto del formato en la unión a las células BT-474. La Figura 41B muestra el efecto del formato en la unión a las células JIMT-1. La Figura 41C muestra el efecto del formato en la unión a las células MCF7. La Figura 41D muestra el efecto del formato en la unión a las células MDA-MB-231.

- 15 La Figura 42 muestra el efecto del formato de anticuerpo biparatópico anti-HER2 sobre la internalización del anticuerpo en las células HER2+. La Figura 42A muestra el efecto sobre la internalización en células BT-474. La Figura 42B muestra el efecto sobre la internalización en células JIMT-1. La Figura 42C muestra el efecto sobre la internalización en células MCF7.

- La Figura 43 muestra el efecto del formato de anticuerpo biparatópico anti-HER2 sobre la capacidad de mediar ADCC en células HER2+. La Figura 43A muestra el efecto en las células JIMT-1. La Figura 43B muestra el efecto en las células MCF7. La Figura 43C muestra el efecto en las células tumorales de mama HER2 0/1+ MDA-MB-231.

- La Figura 44 muestra el efecto del formato de anticuerpo biparatópico anti-HER2 sobre la capacidad de los anticuerpos para inhibir el crecimiento de células tumorales HER2+ en células BT-474 en presencia o ausencia de ligandos estimulantes del crecimiento.

- La Figura 45 muestra el efecto del formato de anticuerpo biparatópico anti-HER2 sobre la capacidad de los anticuerpos para inhibir el crecimiento de células SKBR3.

- La Figura 46 muestra el efecto del formato de anticuerpo biparatópico anti-HER2 sobre la capacidad de los anticuerpos para inhibir el crecimiento de células tumorales HER2+. La Figura 46A muestra la inhibición del crecimiento en células SKOV3. La Figura 46B muestra la inhibición del crecimiento en células JIMT-1. La Figura 46C muestra la inhibición del crecimiento en células MCF7.

- La Figura 47 muestra una comparación de las características de unión de los anticuerpos anti-HER2 biparatópicos de diferente formato, medidas por SPR. La Figura 47A muestra la gráfica y el análisis de regresión lineal para la  $k_d$  (1/s) en diferentes niveles de captura de anticuerpos con v6903 y v7091. La Figura 47B muestra la gráfica y el análisis de regresión lineal para la  $KD$  (M) en diferentes niveles de captura de anticuerpos con v6903 y v7091.

- Las referencias que se encuentran en la Figura 38 son las siguientes: 1. Labouret et al. 2012, Neoplasia 14:121-130 ; 2. Ghasemi et al. 2014, Oncogenesis doi:10.1038/oncsis.2014.31; 3. Gaborit et al. 2011 J Bio Chem, 286:1133-11345; 4. Kimura et al. 2006, Clin Cancer Res; 12:4925-4932; 5. Komoto et al. 2009, Cane Sci; 101:468-473; 6. Cretella et al. 2014, Molecular Cancer 13:143-155; 7. Bunn et al. 2001, Clin Cancer Res; 7:3239-3250; 8. Lewis Phillips et al. 2013, Clin Cancer Res, 20:456-468; 9. McDonagh et al. 2012, 11:582-593; 10. Coldren et al. 2006, Mol Cancer Res:521-528; 11. Cavazzoni et al. 2012 Mol Cancer, 11:91-115; 12. Li et al. 2014, Mol Cancer Res, doi:10.1158/1541-7786.MCR-13-0396; 13. Chmielewski et al. 2004, Immunology, 173:7647-7653; 14. Kuwada et al. 2004, Int J Cancer, 109:291-301; 15. Fujimoto-Ouchi et al. 2007, Clin Chemother Pharmacol, 59:795-805; 16. Chavez-Blanco et al. 2004, BMC Cancer, 4:59; 17. Campiglio et al. 2004, J Cellular Physiology. 198:259-268; 18. Lehmann et al. 2011, J Clin Investigation, 121:2750-2767; 19. Collins et al. 2011, Annals Oncology, 23:1788-1795; 20. Takai et al. 2005, Cancer, 104:2701-2708; 21. Rusnack et al. 2007, Cell Prolif, 40:580-594; 22. Ma et al. 2013, PLOS ONE, 8:e73261-e73261; 23. Meira et al. 2009, British J Cancer, 101:782-791; 24. Hayashi MP28-14 poster; 25. Wang et al. 2005 J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 25:326-8; 26. Makhja et al. 2010. J Clin Oncol 28:1215-1223.

- La Figura 48A-B muestra el efecto de un anticuerpo anti-HER2 biparatópico en un modelo de xenoinjerto de cáncer de pulmón de células no pequeñas con HER2 bajo. La Figura 48A muestra el efecto del anticuerpo sobre el volumen del tumor. La Figura 48B muestra el efecto del anticuerpo en el porcentaje de supervivencia de los animales.

- La Figura 49A-B muestra el efecto de un anticuerpo anti-HER2 biparatópico en un modelo de xenoinjerto de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello con HER2 bajo. La Figura 49A muestra el efecto del

anticuerpo sobre el volumen del tumor. La Figura 49B muestra el efecto del anticuerpo en el porcentaje de supervivencia de los animales.

La Figura 50A-B muestra el efecto de un anticuerpo anti-HER2 biparatópico en un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama ER+ y HER2 bajo. La Figura 50A muestra el efecto del anticuerpo sobre el volumen del tumor. La Figura 50B muestra el efecto del anticuerpo en el porcentaje de supervivencia de los animales.

La Figura 51A-B muestra el volumen del tumor y la supervivencia en un modelo de xenoinjerto de cáncer de páncreas.

La Figura 52 muestra el volumen del tumor en un modelo de xenoinjerto de cáncer gástrico.

#### Descripción detallada

La invención es tal como se establece en las reivindicaciones.

Se describen en este documento métodos de uso de constructos de unión a antígeno biespecíficos que se unen a HER2.

#### Constructos de unión a antígeno

Se proporcionan en el presente documento constructos de unión a antígeno, por ejemplo, anticuerpos, que se unen a HER2. El constructo de unión a antígeno para uso de acuerdo con la invención incluye un primer constructo de polipéptido de unión a antígeno que se une a un antígeno ECD2 de HER2 y un segundo constructo de polipéptido de unión a antígeno que se une a un antígeno ECD4 de HER2. Como se establece con más detalle en la reivindicación 1, el primer constructo de polipéptido de unión a antígeno es un Fab (fragmento de unión a antígeno) y el segundo constructo de polipéptido de unión a antígeno es un scFv (Fv de cadena sencilla). Otro constructo de polipéptido de unión a antígeno que no ha sido reivindicado es un sdab (anticuerpo de dominio único). El constructo de unión a antígeno proporcionado para su uso de acuerdo con la invención incluye una estructura, que es una región de Fc de IgG1 humana.

El término "constructo de unión a antígeno" se refiere a cualquier agente, por ejemplo, polipéptido o complejo polipeptídico capaz de unirse a un antígeno. En algunos aspectos, un constructo de unión a antígeno es un polipéptido que se une específicamente a un antígeno de interés. Un constructo de unión a antígeno puede ser un monómero, un dímero, un multímero, una proteína, un péptido o un complejo de proteína o péptido; un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo; un scFv y similares. Un constructo de unión a antígeno puede ser monoespecífico, biespecífico o multiespecífico. Un constructo de unión a antígeno puede incluir, por ejemplo, uno o más constructos de polipéptidos de unión a antígeno (por ejemplo, Fab o scFv) unidos a uno o más Fc. A continuación, se describen y proporcionan en los Ejemplos otros ejemplos de constructos de unión a antígeno. El constructo de unión a antígeno proporcionado para su uso de acuerdo con la invención es como se define en la reivindicación 1.

Un constructo que se une a un antígeno puede ser monoespecífico, aunque esto no se reivindica. Un constructo de unión a antígeno monoespecífico se refiere a un constructo de unión a antígeno con una especificidad de unión. En otras palabras, el constructo del polipéptido de unión a antígeno se une al mismo epítipo en el mismo antígeno. Los ejemplos de constructos de unión a antígeno monoespecíficos incluyen trastuzumab y pertuzumab.

Un constructo de unión a antígeno biespecífico tiene dos constructos de polipéptidos de unión a antígeno, cada uno con una especificidad de unión única. Por ejemplo, un primer constructo de polipéptido de unión a antígeno se une a un epítipo de un primer antígeno, y un segundo constructo de polipéptido de unión a antígeno se une a un epítipo de un segundo antígeno. El término "biparatópico", como se utiliza en este documento, se refiere a un anticuerpo biespecífico donde la primera fracción de unión a antígeno y la segunda fracción de unión a antígeno se unen a diferentes epítopos en el mismo antígeno.

Un constructo de unión a antígeno puede ser un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo. Tal como se utiliza en este documento, un "anticuerpo" o "inmunoglobulina" se refiere a un polipéptido codificado sustancialmente por un gen de inmunoglobulina o genes de inmunoglobulina, o fragmentos de los mismos, que se unen específicamente y reconocen un analito (por ejemplo, antígeno). Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de la región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como una gran cantidad de genes de la región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican en kappa o lambda. La "clase" de un anticuerpo o inmunoglobulina se refiere al tipo de dominio constante o región constante que posee su cadena pesada. Hay cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden dividirse en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ , respectivamente.

Una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) ejemplar se compone de dos pares de cadenas polipeptídicas, cada par tiene una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kD) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kD). El dominio N-terminal de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos, principalmente responsables del reconocimiento del antígeno.

Los términos cadena ligera variable (VL) y cadena pesada variable (VH) se refieren a estos dominios de cadena ligera y pesada respectivamente. La cadena pesada de IgG1 está compuesta por los dominios VH, CH1, CH2 y CH3 respectivamente desde el N-terminal al C-terminal. La cadena ligera está formada por los dominios VL y CL desde el terminal N al C. La cadena pesada de IgG1 comprende una bisagra entre los dominios de CH1 y CH2.

El término "región hipervariable" o "HVR", como se utiliza en este documento, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles definidos estructuralmente ("bucles hipervariables"). Generalmente, los anticuerpos nativos de cuatro cadenas comprenden seis HVR; tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). Las HVR generalmente comprenden residuos de aminoácidos de los bucles hipervariables y/o de las regiones determinantes de complementariedad (CDR), siendo estas últimas las de mayor variabilidad de secuencia y/o involucradas en el reconocimiento de antígenos. Con la excepción de CDR1 en VH, las CDR generalmente comprenden los residuos de aminoácidos que forman los bucles hipervariables. Las regiones hipervariables (HVR) también se denominan "regiones determinantes de complementariedad" (CDR), y estos términos se utilizan en este documento indistintamente en referencia a porciones de la región variable que forman las regiones de unión a antígeno. Esta región en particular ha sido descrita por Kabat et al., Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, secuencias de proteínas de interés inmunológico (1983) y por Chothia et al., J Mol Biol 196:901-917 (1987), donde las definiciones incluyen superposición o subconjuntos de residuos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. Sin embargo, la aplicación de cualquiera de las definiciones para referirse a una CDR de un anticuerpo o variantes del mismo pretende estar dentro del alcance del término tal como se define y utiliza en este documento. Los números exactos de residuos que abarcan una CDR particular variarán dependiendo de la secuencia y el tamaño de la CDR. Los expertos en la materia pueden determinar de forma rutinaria qué residuos comprenden una CDR particular dada la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de roedores) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar aún más el rendimiento de los anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todos o sustancialmente todos los FR son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992).

Los anticuerpos HER2 humanizados incluyen huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 y huMAb4D5-8 o Trastuzumab (HERCEPTIN®) como se describe en la Tabla 3 de la patente de los Estados Unidos No. 5,821,337; los anticuerpos 520C9 humanizado (WO93/21319) y 2C4 humanizado como se describe en la publicación de patente de los Estados Unidos No. 2006/0018899.

#### Construido polipeptídico de unión a antígeno

Los constructos de unión a antígeno descritos en este documento comprenden un constructo de polipéptido de unión a antígeno que se une a un antígeno ECD2 de HER2. El constructo de unión a antígeno proporcionado para su uso de acuerdo con la invención es como se define en la reivindicación 1, e incluye un segundo constructo de polipéptido de unión a antígeno que se une a un antígeno ECD4 de HER2. El constructo de polipéptido de unión a antígeno de la invención comprende las secuencias divulgadas en los ejemplos siguientes para el constructo v10000.

El constructo del polipéptido de unión a antígeno es bivalente (se une a dos epítopos).

El constructo de unión a antígeno incluye dos constructos de polipéptidos de unión a antígeno. El formato del constructo de unión a antígeno es Fab-scFv (primer constructo de polipéptido de unión a antígeno-segundo polipéptido de unión a antígeno respectivamente).

Un Fab (también conocido como fragmento de unión a antígeno) contiene el dominio constante (CL) de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada junto con los dominios variables VL y VH en las cadenas ligera y pesada respectivamente. Los dominios variables comprenden los bucles determinantes de complementariedad (CDR, también denominados región hipervariable) que participan en la unión del antígeno. Los fragmentos Fab' se diferencian de los fragmentos Fab por la adición de algunos residuos en el terminal carboxilo del dominio de CH1 de la cadena pesada, incluidas una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo.

Un "Fv de cadena sencilla" o "scFv" incluye los dominios VH y VL de un anticuerpo, donde estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica. En una realización, el polipéptido de Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de scFv, consulte Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994). Los fragmentos scFv del anticuerpo HER2 se describen en el documento WO93/16185; patente de los Estados Unidos No. 5,571,894; y patente de los Estados Unidos No. 5,587,458.

Un formato de "anticuerpo de dominio único" o "sdAb", no reivindicado, es un dominio de inmunoglobulina individual. Los sdAb son bastante estables y fáciles de expresar como compañero de fusión con la cadena de Fc de un anticuerpo (Harmsen MM, De Haard HJ (2007). "Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments". *Appl. Microbiol Biotechnol.* 77(1): 13-22).

Otros constructos de polipéptidos de unión a antígeno que no se reivindican pueden derivarse de un anticuerpo, una fibronectina, un aficuerpo, anticalina, proteína de nudo de cisteína, DARPin, avímero, dominio Kunitz o variante o derivado del mismo.

Los constructos de polipéptidos de unión a antígeno descritos en este documento se pueden convertir a diferentes formatos. Por ejemplo, un Fab se puede convertir en un scFv o un scFv se puede convertir en un Fab. Se conocen en la técnica métodos de conversión entre tipos de dominios de unión a antígeno (véanse, por ejemplo, los métodos para convertir un scFv a un formato Fab descritos en, por ejemplo, Zhou et al. (2012) *Mol Cancer Ther* 11: 1167-1476).

Los constructos de unión a antígeno descritos en este documento se unen específicamente a HER2. "Se une específicamente", "unión específica" o "unión selectiva" significa que la unión es selectiva para el antígeno y puede discriminarse de interacciones no deseadas o no específicas. La capacidad de un constructo de unión a antígeno para unirse a un determinante antigénico específico se puede medir a través de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) u otras técnicas familiares para un experto en la materia, por ejemplo, la técnica de resonancia de plasmón superficial (SPR) (analizada en un instrumento BIAcore) (Liljeblad et al, *Glyco J* 17, 323-329 (2000)) y ensayos de unión tradicionales (Heeley, *Endocr Res* 28, 217-229 (2002)).

En una realización, el grado de unión de una fracción de unión a antígeno a una proteína no relacionada es menor que aproximadamente el 10 % de la unión del constructo de unión a antígeno al antígeno, medida, por ejemplo, mediante SPR.

## HER2

Los constructos de unión a antígeno descritos en este documento incluyen un constructo de polipéptido de unión a antígeno que se une al ECD2 de HER2.

Las expresiones "ErbB2" y "HER2" se utilizan indistintamente en el presente documento y se refieren a la proteína HER2 humana descrita, por ejemplo, en Semba et al., *PNAS* (EE. UU.) 82: 6497-6501 (1985) y Yamamoto et al. *Nature* 319: 230-234 (1986) (Número de acceso al GenBank X03363). El término "erbB2" y "neu" se refieren al gen que codifica la proteína humana ErbB2, p185 o p185neu se refieren al producto proteico del gen neu.

HER2 es un receptor HER. Un "receptor HER" es un receptor de proteína tirosina quinasa que pertenece a la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (HER) e incluye los receptores EGFR, HER2, HER3 y HER4. Un receptor HER generalmente comprenderá un dominio extracelular, que puede unirse a un ligando HER; un dominio transmembrana lipofílico; un dominio de tirosina quinasa intracelular conservado; y un dominio de señalización carboxilo-terminal que alberga varios residuos de tirosina que pueden fosforilarse. Por "ligando HER" se entiende un polipéptido que se une a y/o activa un receptor HER.

El dominio extracelular (ecto) de HER2 comprende cuatro dominios: Dominio I (ECD1, residuos de aminoácidos de aproximadamente 1-195), Dominio II (ECD2, residuos de aminoácidos de aproximadamente 196-319), Dominio III (ECD3, residuos de aminoácidos de aproximadamente 320-488) y Dominio IV (ECD4, residuos de aminoácidos de aproximadamente 489-630) (numeración de residuos sin péptido señal). Ver Garrett et al. *Mol. Cell.* 11: 495-505 (2003), Cho et al. *Nature* 421: 756-760 (2003), Franklin et al. *Cancer Cell* 5: 317-328 (2004), Tse et al. *Cancer Treat Rev.* 2012 Apr; 38(2): 133-42 (2012), o Arado et al. Plowman et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 1746-1750 (1993).

La secuencia de HER2 es la siguiente; los límites del ECD son el Dominio I: 1-165; Dominio II: 166-322; Dominio III: 323-488; Dominio IV: 489-607.

```

1  tqvctgtdmk lrlpaspeth ldmrlrhlyqg cqvvvggnlel tylptnasls flqdiqevqg
61  yvliahnqvr qvplqrlriv rgtqlfedny alavldngdp lnnttpvtga spggrlrelql
121 rslteilkkg vliqrnpqlc yqdtlwkdi fhknnqlalt lidtnrsrac hpcspmcckgs
181 rcwgessedc qsltrtvcag gcarckgplp tdccheqcaa gctgpkhsdc laclhfnhsg
241 icelhcpalv tyntdtfesm pnpetrytfg ascvtacpyn ylstdvgsct lvcplhnqev
301 taedgtqrce kcskpcarvc yglgmehire vravtsaniq etagckkitg slailpestid
361 gdpasntapl qpeqlqvfet leeitgylyi sawpdsldpl svfqnlqvir grilnhngays
421 ltlqglgisw lglrslrelg sglalihhnt hlcfvhtvpw dqlfrnphqa llhtanrped
481 ecvgeglach qlcarghchw pgptqcvncs cflrgqecve ecrvlqglpr eyvnrhclp
541 chpecqpqng svctfcpoad qcvacahykd ppcvvarcps gvkpdlssymp iwkfpdeega
601 cqpccpin {SEQ ID NO:349}

```

El "epítipo 2C4" es la región del dominio extracelular de HER2 a la que se une el anticuerpo 2C4. El epítipo 2C4 comprende residuos del dominio II en el dominio extracelular de HER2. 2C4 y Pertuzumab se unen al dominio extracelular de HER2 en la unión de los dominios I, II y III. Franklin et al. Cancer Cell 5: 317-328 (2004). Para detectar anticuerpos que se unen al epítipo 2C4, se realiza un ensayo de bloqueo cruzado de rutina como el descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Como alternativa, se puede realizar un mapeo de epítipos para evaluar si el anticuerpo se une al epítipo 2C4 de HER2 utilizando métodos conocidos en la técnica y/o se puede estudiar la estructura del anticuerpo-HER2 (Franklin et al. Cancer Cell 5: 317-328 (2004)) para ver qué dominio(s) de HER2 está(n) unido(s) por el anticuerpo.

El "epítipo 4D5" es la región del dominio extracelular de HER2 a la que se unen el anticuerpo 4D5 (ATCC CRL 10463) y Trastuzumab. Este epítipo está cerca del dominio transmembrana de HER2 y dentro del dominio IV de HER2. Para detectar anticuerpos que se unen al epítipo 4D5, se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado de rutina como el descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Como alternativa, se puede realizar un mapeo de epítipos para evaluar si el anticuerpo se une al epítipo 4D5 de HER2 (por ejemplo, uno o más residuos en la región desde aproximadamente el residuo 529 hasta aproximadamente el residuo 625, inclusive, véase la FIG. 1 de la publicación de patente de los Estados Unidos No. 2006/0018899).

#### Constructos ejemplares de unión a antígeno anti-HER2

En este documento se proporcionan anticuerpos anti-HER2 ejemplares (o constructos de unión a antígeno) y controles. En la Figura 1 se muestran formatos biparatómicos ejemplares. En todos los formatos que se muestran en la Figura 1, el Fc heterodimérico se presenta con una cadena (Cadena A) mostrada en negro y la otra (Cadena B) mostrada en gris, mientras que un dominio de unión a antígeno (1) se muestra en relleno rayado y el otro dominio de unión a antígeno (2) se muestra en blanco.

El constructo de la invención se establece en la reivindicación 1, que define el constructo v10000. Todos los demás constructos descritos en este documento y a continuación son para referencia y no son parte de la invención reivindicada.

La Figura 1A muestra la estructura de un anticuerpo biparatómico en formato Fab-Fab. Las Figuras 1B a 1E muestran la estructura de posibles versiones de un anticuerpo biparatómico en formato scFv-Fab. En la Figura 1B, el dominio de unión a antígeno 1 es un scFv, fusionado a la Cadena A, mientras que el dominio de unión a antígeno 2 es un Fab, fusionado a la Cadena B. En la Figura 1C, el dominio de unión a antígeno 1 es un Fab, fusionado a la Cadena A, mientras que el dominio de unión a antígeno 2 es un scFv, fusionado a la Cadena B. En la Figura 1D, el dominio de unión a antígeno 2 es un Fab, fusionado a la Cadena A, mientras que el dominio de unión a antígeno 1 es un scFv, fusionado a la Cadena B. En la Figura 1E, el dominio de unión a antígeno 2 es un scFv, fusionado a la Cadena A, mientras que el dominio de unión a antígeno 1 es un Fab, fusionado a la Cadena B. En la Figura 1F, ambos dominios de unión a antígeno son scFv.

Las secuencias de las siguientes variantes se proporcionan en la Tabla de secuencias que se encuentra después de los Ejemplos. Las regiones CDR se identificaron utilizando una combinación de los métodos de Kabat y Chothia. Las regiones pueden variar ligeramente de acuerdo con el método utilizado para la identificación.

## ES 3 014 819 T3

Anticuerpos biparatópicos anti-HER2 ejemplares

En la Tabla 1 se muestran ejemplos de anticuerpos anti-HER2 biparatópicos.

Tabla 1: Anticuerpos biparatópicos anti-HER2 ejemplares (nota: solo v10000 es de acuerdo con la invención)

Variante		Cadena A	Cadena B
5019	dominio que contiene el epítipo	ECD2	ECD4
	Formato	Fab	scFv
	Nombre del anticuerpo	Pertuzumab	Trastuzumab
	Sustituciones de secuencia de CH3	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T366I_N390R_K392M_T394W
5020	dominio que contiene el epítipo	ECD4	ECD2
	Formato	scFv	Fab
	Nombre del anticuerpo	Trastuzumab	Pertuzumab
	Sustituciones de secuencia de CH3	L351Y_S400E_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392L_T394W
7091	dominio que contiene el epítipo	ECD2	ECD4
	Formato	Fab	scFv
	Nombre del anticuerpo	Pertuzumab	Trastuzumab
	Sustituciones de secuencia de CH3	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392L_T394W
10000	dominio que contiene el epítipo	ECD2	ECD4
	Formato	Fab	scFv
	Sustituciones de secuencia de CH3 del nombre del anticuerpo	Pertuzumab - con Y96A en la región de VL y T30A/A49G/L69F en la región de VH T350V_L351Y_F405A_Y407V	Trastuzumab T350V_T366L_K392L_T394W
6902	dominio que contiene el epítipo	ECD2	ECD4
	Formato	Fab	Fab
	Nombre del anticuerpo	Trastuzumab	Pertuzumab
	Sustituciones de Fab	HC: L143E-K145T	HC: D146G Q179K
		LC: Q124R	LC: Q124E_Q160E_T180E
	Sustituciones de secuencia de CH3	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392L_T394W
6903	dominio que contiene el epítipo	ECD2	ECD4
	Formato	Fab	Fab

## ES 3 014 819 T3

	Sustituciones de Fab	HC: L143E_K145T	HC: D146G_Q179K
		LC: Q124R_Q1160K_T178R	LC: Q124E_Q160E_T180E
	Nombre del anticuerpo	Trastuzumab	Pertuzumab
	Sustituciones de secuencia de CH3	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392L_T394W
6717	dominio que contiene el epítipo	ECD4	ECD2
	Formato	scFv	scFv
	Nombre del anticuerpo	Pertuzumab	Trastuzumab
	Sustituciones de secuencia de CH3	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T366I_N390R_K392M_T394W
<p>Notas:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Numeración de CH3 de acuerdo con el índice de la UE como en Kabat en referencia a la numeración del anticuerpo de la UE (Edelman et al., 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63:78-85);</li> <li>• Numeración de dominios Fab o variables de acuerdo con Kabat (Kabat and Wu, 1991; Kabat et al, Sequences of proteins of immunological interest. 5th Edition - Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE. UU., publicación del NIH n.º 91-3242, pág. 647 (1991))</li> <li>• "dominio que contiene el epítipo" = dominio de HER2 al que se une la fracción de unión a antígeno;</li> <li>• "Nombre del anticuerpo" = anticuerpo del cual se deriva la fracción de unión a antígeno, incluye sustituciones en comparación con el tipo silvestre cuando está presente;</li> <li>• "Sustituciones de Fab" = sustituciones en Fab que promueven el emparejamiento correcto de la cadena ligera;</li> <li>• "Sustituciones de secuencia de CH3" = sustituciones en el dominio de CH3 que promueven la formación de Fc heterodimérico</li> </ul>			

Anticuerpos de control monovalentes anti-HER2 ejemplares - no forman parte de la invención reivindicada

- 5 v1040: un anticuerpo anti-HER2 monovalente, donde el dominio de unión de HER2 es un Fab derivado de trastuzumab en la cadena A, y la región de Fc es un heterodímero que tiene las mutaciones T350V\_L351Y\_F405A\_Y407V en la cadena A, T350V\_T366L\_K392L\_T394W en la cadena B, y la región bisagra de la cadena B que tiene la mutación C226S; el dominio de unión a antígeno se une al dominio 4 de HER2.
- 10 v630 - un anticuerpo anti-HER2 monovalente, donde el dominio de unión de HER2 es un scFv derivado de trastuzumab en la Cadena A, y la región de Fc es un heterodímero que tiene las mutaciones L351Y\_S400E\_F405A\_Y407V en la Cadena A, T366I\_N390R\_K392M\_T394W en la Cadena B; y la región bisagra que tiene la mutación C226S (numeración de la UE) en ambas cadenas; el dominio de unión a antígeno se une al dominio 4 de HER2.
- 15 v4182: un anticuerpo anti-HER2 monovalente, donde el dominio de unión de HER2 es un Fab derivado de pertuzumab en la cadena A, y la región de Fc es un heterodímero que tiene las mutaciones T350V\_L351Y\_F405A\_Y407V en la cadena A, T350V\_T366L\_K392L\_T394W en la cadena B, y la región bisagra de la cadena B que tiene la mutación C226S; el dominio de unión a antígeno se une al dominio 2 de HER2.
- 20 Controles ejemplares de anticuerpos bivalentes monoespecíficos anti-HER2 (anticuerpos de tamaño completo, FSA) - no forman parte de la invención reivindicada
- v506 es un anti HER2 de tipo silvestre producido internamente en células de ovario de hámster chino (CHO), como control. Ambos dominios de unión de HER2 se derivan de trastuzumab en el formato Fab y el Fc es un homodímero de tipo silvestre; el dominio de unión a antígeno se une al dominio 4 de HER2. Este anticuerpo también se conoce como análogo de trastuzumab.



- v792, es trastuzumab de tipo silvestre con una bisagra de IgG1, donde ambos dominios de unión de HER2 se derivan de trastuzumab en el formato Fab, y la región de Fc es un heterodímero que tiene las mutaciones T350V\_L351Y\_F405A\_Y407V en la Cadena A, y T350V\_T366L\_K392L\_T394W en la Cadena B; el dominio de unión a antígeno se une al dominio 4 de HER2. Este anticuerpo también se conoce como análogo de trastuzumab.
- v4184, un anticuerpo anti-HER2 bivalente, donde ambos dominios de unión de HER2 se derivan de pertuzumab en el formato Fab, y la región de Fc es un heterodímero que tiene las mutaciones T350V\_L351Y\_F405A\_Y407V en la Cadena A, y T350V\_T366L\_K392L\_T394W en la Cadena B. El dominio de unión a antígeno se une al dominio 2 de HER2. Este anticuerpo también se conoce como análogo de pertuzumab.
- 10 Conjugados de fármacos de anticuerpos (ADC) biparatópicos anti-HER2 ejemplares
- Los siguientes son ejemplos de conjugados de fármacos de anticuerpos anti-HER2 biparatópicos (ADC biparatópicos anti-HER2). Los ADC de las variantes 5019, 7091, 10000 y 506 se identifican de la siguiente manera, en donde solo los ADC de v 10000 forman parte de la invención reivindicada:
- v6363 (v5019 conjugado con DM1)
- 15 v7148 (v7091 conjugado con DM1)
- v10553 (v10000 conjugado con DM1)
- v6246 (v506 conjugado con DM1, análogo a T-DM1, trastuzumab-emtansina)
- v6249 (IgG humana conjugada con DM1)
- Fc de constructos de unión a antígeno.
- 20 Los constructos de unión a antígeno para uso de acuerdo con la invención comprenden un Fc dimérico. Un Fc dimérico puede ser homodimérico o heterodimérico. El Fc de acuerdo con la invención reivindicada es heterodimérico.
- El término "dominio de Fc" o "región de Fc" en este documento se utiliza para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. El término incluye regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. A menos que se especifique lo contrario en este documento, la numeración de los residuos de aminoácidos en la región de Fc o la región constante se realiza de acuerdo con el sistema de numeración de la UE, también llamado índice de la UE, como se describe en Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD, 1991. Un "polipéptido Fc" de un Fc dimérico como se utiliza en este documento se refiere a uno de los dos polipéptidos que forman el dominio de Fc dimérico, es decir, un polipéptido que comprende regiones constantes C-terminales de una cadena pesada de inmunoglobulina, capaz de autoasociarse de manera estable. Por ejemplo, un polipéptido Fc de un Fc de IgG dimérico comprende una secuencia de dominio constante CH2 de IgG y una secuencia de dominio constante CH3 de IgG.
- 25
- 30
- Un dominio de Fc comprende un dominio de CH3 o un dominio de CH3 y un dominio de CH2. El dominio de CH3 comprende dos secuencias de CH3, una de cada uno de los dos polipéptidos Fc del Fc dimérico. El dominio de CH2 comprende dos secuencias de CH2, una de cada uno de los dos polipéptidos Fc del Fc dimérico.
- 35
- El Fc de acuerdo con la invención comprende dos secuencias de CH3. Como se define en la reivindicación 1, el Fc está acoplado, con o sin uno o más enlazadores, a un primer constructo de unión a antígeno y a un segundo constructo de unión a antígeno. El Fc es un Fc de IgG1 humana. El Fc es un Fc heterodimérico. El Fc comprende dos secuencias de CH2.
- 40
- En algunos aspectos, un Fc es un polipéptido único. En algunos aspectos, un Fc son múltiples péptidos, por ejemplo, dos polipéptidos.
- Un Fc es un Fc descrito en las solicitudes de patente WO2012/058768, presentada el 4 de noviembre de 2011 o WO2013/063702, presentada el 2 de noviembre de 2012.
- 45
- Dominios de CH3 modificados
- El constructo de unión a antígeno proporcionado para su uso de acuerdo con la invención comprende un Fc heterodimérico que comprende un dominio de CH3 modificado que ha sido modificado asimétricamente. El Fc heterodimérico comprende dos polipéptidos de dominio constante de cadena pesada: un primer polipéptido Fc y un segundo polipéptido Fc.
- 50

Dos secuencias de CH3 que comprenden una o más modificaciones de aminoácidos introducidas de manera asimétrica generalmente dan como resultado un Fc heterodimérico, en lugar de un homodímero, cuando las dos secuencias de CH3 se dimerizan. Como se utiliza en este documento, "modificaciones asimétricas de aminoácidos" se refiere a cualquier modificación en la que un aminoácido en una posición específica en una primera secuencia de CH3 es diferente del aminoácido en una segunda secuencia de CH3 en la misma posición, y la primera y la segunda secuencia de CH3 se emparejan preferentemente para formar un heterodímero, en lugar de un homodímero. Esta heterodimerización puede ser el resultado de la modificación de sólo uno de los dos aminoácidos en la misma posición de aminoácido respectiva en cada secuencia; o de la modificación de ambos aminoácidos en cada secuencia en la misma posición respectiva en cada una de las primera y segunda secuencias de CH3. La primera y segunda secuencia de CH3 de un Fc heterodimérico pueden comprender una o más de una modificación de aminoácido asimétrica.

La Tabla A proporciona la secuencia de aminoácidos de la secuencia de Fc de IgG1 humana, correspondiente a los aminoácidos 231 a 447 de la cadena pesada de IgG1 humana de longitud completa. La secuencia de CH3 comprende los aminoácidos 341-447 de la cadena pesada de IgG1 humana de longitud completa.

Normalmente, un Fc puede incluir dos secuencias de cadena pesada contiguas (A y B) que son capaces de dimerizarse. Una o ambas secuencias de un Fc incluyen una o más mutaciones o modificaciones en las siguientes ubicaciones: L351, F405, Y407, T366, K392, T394, T350, S400 y/o N390, utilizando la numeración de la UE. De acuerdo con la invención reivindicada, la región de Fc de IgG1 humana que está operativamente unida al primer constructo del polipéptido de unión a antígeno comprende las mutaciones: T350V\_L351Y\_F405A\_Y407V. La región de Fc de IgG1 humana que está operativamente vinculada al segundo constructo del polipéptido de unión a antígeno comprende las mutaciones: T350V\_T366L\_K392L\_T394W. También se describe que un Fc incluye una secuencia mutante que se muestra en la Tabla X. Un Fc descrito incluye las mutaciones de la Variante 1 A-B. Un Fc descrito incluye las mutaciones de la Variante 2 A-B. Un Fc descrito incluye las mutaciones de la Variante 3 A-B. Un Fc descrito incluye las mutaciones de la Variante 4 A-B. Un Fc descrito incluye las mutaciones de la Variante 5 A-B. Solo se reivindican las mutaciones presentes en v10000, como se indicó anteriormente.

Tabla A: Secuencias de Fc de IgG1

Secuencia de Fc de IgG1 humana 231-447 (numeración de la UE)	<p>AFELLGGFSEVFLFPFKPKDTLNISPTFEVTEVVVDEVEDFEVKRWYV          DEVEVHNASTKPREEQYNSTYFVVSVLTVLHQDWLNGREYRCKVSNKAL          PAPIEKTISKANGQPEREPQVYTLFPSPDELTKNQVSLTCLVRGFYFSDI          AVEWESNGQPENNYKFTTPVLDSDGSFFLYSLSEIVDKSPWQQGNVVFCS          VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 350)</p>	
Secuencia variante de Fc de IgG1 (231-447)	Cadena	Mutaciones
1	A	L351Y_F405A_Y407V
1	B	T366L_K392M_T394W
2	A	L351Y_F405A_Y407V
2	B	T366L_K392L_T394W
3	A	T350V_L351Y_F405A_Y407V
3	B	T350V_T366L_K392L_T394W
4	A	T350V_L351Y_F405A_Y407V
4	B	T350V_T366L_K392M_T394W
5	A	T350V_L351Y_S400E_F405A_Y407V
5	B	T350V_T366L_N390R_K392M_T394W

A continuación, se describen con más detalle varias mutaciones de CH3, pero solo son parte de la invención reivindicada en la medida en que describen las mutaciones T350V\_L351Y\_F405A\_Y407V // T350V\_T366L\_K392L\_T394W presentes en el constructo v10000 reivindicado.

La primera y segunda secuencias de CH3 pueden comprender mutaciones de aminoácidos como se describe en este documento, con referencia a los aminoácidos 231 a 447 de la cadena pesada de IgG1 humana de longitud completa. En una realización, el Fc heterodimérico comprende un dominio de CH3 modificado con una primera secuencia de CH3 que tiene modificaciones de aminoácidos en las posiciones F405 y Y407, y una segunda secuencia de CH3 que tiene modificaciones de aminoácidos en la posición T394. En una realización, el Fc heterodimérico comprende un dominio de CH3 modificado con una primera secuencia de CH3 que tiene una o más modificaciones de aminoácidos seleccionadas entre L351Y, F405A y Y407V, y la segunda secuencia de CH3 que tiene una o más modificaciones de aminoácidos seleccionadas entre T366L, T366I, K392L, K392M y T394W.

En una realización, un Fc heterodimérico comprende un dominio de CH3 modificado con una primera secuencia de CH3 que tiene modificaciones de aminoácidos en las posiciones L351, F405 y Y407, y una segunda secuencia de CH3 que tiene modificaciones de aminoácidos en las posiciones T366, K392 y T394, y una de la primera o segunda secuencias de CH3 que comprende además modificaciones de aminoácidos en la posición Q347, y la otra secuencia de CH3 que comprende además una modificación de aminoácidos en la posición K360. En otra realización, un Fc heterodimérico comprende un dominio de CH3 modificado con una primera secuencia de CH3 que tiene modificaciones de aminoácidos en las posiciones L351, F405 y Y407, y una segunda secuencia de CH3 que tiene modificaciones de aminoácidos en las posiciones T366, K392 y T394, comprendiendo además una de la primera o segunda secuencias de CH3 modificaciones de aminoácidos en la posición Q347, y comprendiendo además la otra secuencia de CH3 una modificación de aminoácido en la posición K360, y comprendiendo además una o ambas de dichas secuencias de CH3 la modificación de aminoácidos T350V.

En una realización, un Fc heterodimérico comprende un dominio de CH3 modificado con una primera secuencia de CH3 que tiene modificaciones de aminoácidos en las posiciones L351, F405 y Y407, y una segunda secuencia de CH3 que tiene modificaciones de aminoácidos en las posiciones T366, K392 y T394 y una de dichas primera y segunda secuencias de CH3 que comprende además la modificación de aminoácidos de D399R o D399K y la otra secuencia de CH3 que comprende uno o más de T411E, T411D, K409E, K409D, K392E y K392D. En otra realización, un Fc heterodimérico comprende un dominio de CH3 modificado con una primera secuencia de CH3 que tiene modificaciones de aminoácidos en las posiciones L351, F405 y Y407, y una segunda secuencia de CH3 que tiene modificaciones de aminoácidos en las posiciones T366, K392 y T394, una de dichas primera y segunda secuencias de CH3 comprende además la modificación de aminoácidos de D399R o D399K y la otra secuencia de CH3 comprende una o más de T411E, T411D, K409E, K409D, K392E y K392D, y una o ambas de dichas secuencias de CH3 comprenden además la modificación de aminoácidos T350V.

En una realización, un Fc heterodimérico comprende un dominio de CH3 modificado con una primera secuencia de CH3 que tiene modificaciones de aminoácidos en las posiciones L351, F405 y Y407, y una segunda secuencia de CH3 que tiene modificaciones de aminoácidos en las posiciones T366, K392 y T394, en donde una o ambas de dichas secuencias de CH3 comprenden además la modificación de aminoácidos de T350V.

En una realización, un Fc heterodimérico comprende un dominio de CH3 modificado que comprende las siguientes modificaciones de aminoácidos, donde "A" representa las modificaciones de aminoácidos en la primera secuencia de CH3 y "B" representa las modificaciones de aminoácidos en la segunda secuencia de CH3: A: L351Y\_F405A\_Y407V, B: T366L\_K392M\_T394W, A: L351Y\_F405A\_Y407V, B: T366L\_K392L\_T394W, A: T350V\_L351Y\_F405A\_Y407V, B: T350V\_T366L\_K392L\_T394W, A: T350V\_L351Y\_F405A\_Y407V, B: T350V\_T366L\_K392M\_T394W, A: T350V\_L351Y\_S400E\_F405A\_Y407V, y/o B: T350V\_T366L\_N390R\_K392M\_T394W.

Una o más modificaciones asimétricas de aminoácidos pueden promover la formación de un Fc heterodimérico en el que el dominio de CH3 heterodimérico tiene una estabilidad comparable a la de un dominio de CH3 homodimérico de tipo silvestre. En una realización, las una o más modificaciones asimétricas de aminoácidos promueven la formación de un dominio de Fc heterodimérico en el que el dominio de Fc heterodimérico tiene una estabilidad que es comparable a un dominio de Fc homodimérico de tipo silvestre. En una realización, las una o más modificaciones asimétricas de aminoácidos promueven la formación de un dominio de Fc heterodimérico en el que el dominio de Fc heterodimérico tiene una estabilidad observada a través de la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) en un estudio de calorimetría de barrido diferencial, y donde la temperatura de fusión está dentro de los 4 °C de la observada para el dominio de Fc homodimérico de tipo silvestre simétrico correspondiente. En algunos aspectos, el Fc comprende una o más modificaciones en al menos una de las secuencias de CH<sub>3</sub> que promueven la formación de un Fc heterodimérico con una estabilidad comparable a la de un Fc homodimérico de tipo silvestre.

En una realización, la estabilidad del dominio de CH3 se puede evaluar midiendo la temperatura de fusión del dominio de CH3, por ejemplo, mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Por lo tanto, en una realización adicional, el dominio de CH3 tiene una temperatura de fusión de aproximadamente 68 °C o superior.

En otra realización, el dominio de CH3 tiene una temperatura de fusión de aproximadamente 70 °C o superior. En otra realización, el dominio de CH3 tiene una temperatura de fusión de aproximadamente 72 °C o superior.

En otra realización, el dominio de CH3 tiene una temperatura de fusión de aproximadamente 73 °C o superior.  
 En otra realización, el dominio de CH3 tiene una temperatura de fusión de aproximadamente 75 °C o superior.  
 En otra realización, el dominio de CH3 tiene una temperatura de fusión de aproximadamente 78 °C o superior.  
 En algunos aspectos, las secuencias de CH3 dimerizadas tienen una temperatura de fusión (Tm) de aproximadamente 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 77,5, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84 u 85 °C o superior.

En algunas realizaciones, se puede formar un Fc heterodimérico que comprende secuencias de CH3 modificadas con una pureza de al menos aproximadamente el 75 % en comparación con el Fc homodimérico en el producto expresado. En otra realización, el Fc heterodimérico se forma con una pureza superior a aproximadamente el 80 %. En otra realización, el Fc heterodimérico se forma con una pureza superior a aproximadamente el 85 %. En otra realización, el Fc heterodimérico se forma con una pureza superior a aproximadamente el 90 %. En otra realización, el Fc heterodimérico se forma con una pureza superior a aproximadamente el 95 %. En otra realización, el Fc heterodimérico se forma con una pureza superior a aproximadamente el 97 %. En algunos aspectos, el Fc es un heterodímero formado con una pureza mayor a aproximadamente 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % cuando se expresa. En algunos aspectos, el Fc es un heterodímero formado con una pureza mayor a aproximadamente 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % cuando se expresa a través de una sola célula.

Métodos adicionales para modificar polipéptidos Fc monoméricos para promover la formación de Fc heterodimérico se describen en la publicación de patente internacional N°. WO 96/027011 (botones en ojales), en Gunasekaran et al. (Gunasekaran K. et al. (2010) J Biol Chem. 285, 19637-46, electrostatic design to achieve selective heterodimerization), in Davis et al. (Davis, JH. et al. (2010) Prot Eng Des Sel ;23(4): 195-202, strand exchange engineered domain (SEED) technology), y en Labriijn et al. [Efficient generation of stable bispecific IgG1 by controlled Fab-arm exchange. Labriijn AF, Meesters JI, de Goeij BE, van den Bremer ET, Neijssen J, van Kampen MD, Strumane K, Verploegen S, Kundu A, Gramer MJ, van Berkel PH, van de Winkel JG, Schuurman J, Parren PW. Proc Natl Acad Sci USA. 2013 Mar 26; 110(13): 5145-50.

#### Dominios de CH2

El Fc del constructo de unión a antígeno proporcionado para su uso de acuerdo con la invención comprende un dominio de CH2. Varias funciones efectoras están mediadas por los receptores de Fc (FcR), que se unen al Fc de un anticuerpo.

Los términos "receptor de Fc" y "FcR" se utilizan para describir un receptor que se une a la región de Fc de un anticuerpo. Por ejemplo, un FcR puede ser un FcR humano de secuencia nativa. En general, un FcR es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluidas variantes alélicas y formas empalmadas alternativamente de estos receptores. Los receptores de FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplasmáticos. Las inmunoglobulinas de otros isotipos también pueden unirse a ciertos FcR (véase, por ejemplo, Janeway et al., *Immuno Biology: the immune system in health and disease*, (Elsevier Science Ltd., NY) (4th ed., 1999)). El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina del inmunorreceptor (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina del inmunorreceptor (ITIM) en su dominio citoplasmático (revisado en Daéron, *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9: 457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4: 25-34 (1994); y de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995). Otros FcR, incluidos aquellos que se identificarán en el futuro, quedan abarcados en el presente documento por el término "FcR". El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer et al., *J. Immunol.* 117: 587 (1976); y Kim et al., *J. Immunol.* 24: 249 (1994)).

Las modificaciones en el dominio de CH2 pueden afectar la unión de los FcR al Fc. En la técnica se conocen varias modificaciones de aminoácidos en la región de Fc para alterar selectivamente la afinidad del Fc por diferentes receptores de Fc-gamma. En algunos aspectos que se describen, pero no se reivindican, el Fc comprende una o más modificaciones para promover la unión selectiva de los receptores de Fc-gamma.

A continuación, se enumeran mutaciones ejemplares, que se describen, pero no se reivindican, que alteran la unión de los FcR al Fc:

S298A/E333A/K334A, S298A/E333A/K334A/K326A (Lu Y, Vernes JM, Chiang N, et al. *J Immunol. Methods.* 2011 Feb 28; 365(1-2): 132-41);

F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L, F243L/R292P/Y300L/L235V/P396L (Stavenhagen JB, Gorlatov S, Tuailon N, et al. *Cancer Res.* 2007 Sep 15; 67(18): 8882-90; Nordstrom JL, Gorlatov S, Zhang W, et al. *Breast Cancer Res.* 2011 Nov 30; 13(6): R123);

F243L (Stewart R, Thom G, Levens M, et al. *Protein Eng Des Sel.* 2011 Sep; 24(9): 671-8), S298A/E333A/K334A (Shields RL, Namenuk AK, Hong K, et al. *J Biol Chem.* 2001 Mar 2; 276(9): 6591-604);

S239D/I332E/A330L, S239D/I332E (Lazar GA, Dang W, Karki S, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2006 Mar 14; 103(11): 4005-10);

S239D/S267E, S267E/L328F (Chu SY, Vostiar I, Karki S, et al. Mol. Immunol. 2008 Sep; 45(15): 3926-33);

5 S239D/D265S/S298A/I332E, S239E/S298A/K326A/A327H, G237F/S298A/A330L/I332E, S239D/I332E/S298A, S239D/K326E/A330L/I332E/S298A, G236A/S239D/D270L/I332E, S239E/S267E/H268D, L234F/S267E/N325L, G237F/V266L/S267D y otras mutaciones enumeradas en los documentos WO2011/120134 y WO2011/120135. Therapeutic Antibody Engineering (por William R. Strohl and Lila M. Strohl, Woodhead Publishing series in Biomedicine No 11, ISBN 1 907568 37 9, Oct 2012) enumera mutaciones en la página 283.

10 En algunas realizaciones, un constructo de unión a antígeno descrito en este documento comprende un constructo de polipéptido de unión a antígeno que se une a un antígeno; y un Fc dimérico que tiene propiedades biofísicas superiores como estabilidad y facilidad de fabricación en relación con un constructo de unión a antígeno que no incluye el mismo Fc dimérico. En algunas realizaciones, un dominio de CH2 comprende una o más modificaciones de aminoácidos asimétricas. Se describen mutaciones asimétricas ejemplares en la  
15 publicación de solicitud de patente internacional N°. WO2014/190441.

Modificaciones adicionales para mejorar la función efectora.

Un constructo de unión a antígeno descrito en este documento puede incluir modificaciones para mejorar su capacidad para mediar la función efectora. Estas modificaciones son conocidas en la técnica e incluyen la afucosilación o modificación (descrita pero no reivindicada) de la afinidad del Fc hacia un receptor activador,  
20 principalmente FCGR3a para ADCC, y hacia C1q para CDC. La siguiente Tabla B resume varios diseños reportados en la literatura para modificar la función efectora.

Los métodos para producir constructos de unión a antígeno con poca o ninguna fucosa en el sitio de glicosilación de Fc (numeración de la UE de Asn 297) sin alterar la secuencia de aminoácidos son bien conocidos en la técnica. La tecnología GlymaX® (ProBioGen AG) se basa en la introducción de un gen para  
25 una enzima que desvía la vía celular de la biosíntesis de fucosa hacia las células utilizadas para la producción de constructos de unión a antígeno. Esto evita la adición del azúcar "fucosa" a la parte del carbohidrato del anticuerpo ligado a N por parte de las células productoras de constructos de unión a antígeno. (von Horsten et al. (2010) Glycobiology. 2010 Dec; 20 (12): 1607-18. Otro enfoque para obtener constructos de unión a antígeno con niveles reducidos de fucosilación se puede encontrar en la patente de los Estados Unidos 8,409,572, que  
30 enseña a seleccionar líneas celulares para la producción de constructos de unión a antígeno por su capacidad de producir niveles más bajos de fucosilación en constructos de unión a antígeno. Los constructos de unión a antígeno pueden estar completamente afucosilados (lo que significa que no contienen fucosa detectable) o pueden estar parcialmente afucosilados, lo que significa que el anticuerpo aislado contiene menos del 95 %, menos del 85 %, menos del 75 %, menos del 65 %, menos del 55 %, menos del 45 %, menos del 35 %, menos  
35 del 25 %, menos del 15 % o menos del 5 % de la cantidad de fucosa normalmente detectada para un anticuerpo similar producido por un sistema de expresión de mamífero.

Por lo tanto, un constructo de unión a antígeno descrito en este documento (pero no reivindicado) puede incluir un Fc dimérico que comprende una o más modificaciones de aminoácidos como se indica en la Tabla B que confieren una función efectora mejorada. En otra realización, el constructo de unión a antígeno se puede  
40 afucosilar para mejorar la función efectora.

Tabla B: modificación de dominios de CH2 y función efectora.

Referencia	Mutaciones	Efecto
45	regiones bisagra o CH2 del Fc. Por ejemplo, publicación de la patente de los Estados Unidos No. 2011/0212087 (Strohl), publicación de patente internacional No. WO 2006/105338 (Xencor), publicación de patente de los Estados Unidos No. 2012/0225058 (Xencor), publicación de patente de los Estados Unidos No. 2012/0251531 (Genentech), y Strop et al. ((2012) J. Mol. Biol. 420: 204-219) describen modificaciones específicas para reducir la unión de FcγR o del complemento al Fc.	

Ejemplos específicos, no limitativos, de modificaciones de aminoácidos conocidas para reducir la unión de FcγR o del complemento al Fc incluyen aquellos identificados en la siguiente tabla:

50 Tabla C: modificaciones para reducir la unión de FcγR o del complemento al Fc

Compañía	Mutaciones
----------	------------

digestión, aunque en el contexto de un constructo de unión a antígeno con 2 constructos de polipéptidos de unión a antígeno.

Los polipéptidos de enlace mantienen la conformación espacial relativa de los parátomos de un fragmento F(ab') y son capaces de formar un enlace covalente equivalente al enlace disulfuro en la bisagra central de la IgG. Los polipéptidos de enlace de acuerdo con la invención son regiones de bisagra de IgG de IgG1. Se conocen versiones modificadas de estos enlazadores ejemplares, pero no se reivindican. Por ejemplo, en la técnica se conocen modificaciones para mejorar la estabilidad de la bisagra de IgG4 (véase, por ejemplo, Labrijn et al. (2009) *Nature Biotechnology* 27, 767 - 771).

Los polipéptidos de enlace están unidos operativamente a una estructura como se describe en este documento, que es un IgG1Fc humano.

También se describe, pero no se reivindica, que los polipéptidos de enlace se pueden unir operativamente a estructuras distintas de un Fc. Se conocen en la técnica varios dominios proteicos o moleculares alternativos que pueden utilizarse para formar pares selectivos de dos polipéptidos de unión a antígeno diferentes. Un ejemplo son los dominios de cremallera de leucina, como Fos y Jun, que se emparejan selectivamente [S A Kostelny, M S Cole, and J Y Tso. Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers. *J Immunol* 1992 148:1547-53; Bernd J. Wranik, Erin L. Christensen, Gabriele Schaefer, Janet K. Jackman, Andrew C. Vendel, and Dan Eaton. LUZ-Y, a Novel Platform for the Mammalian Cell Production of Full-length IgG-bispecific Antibodies *J. Biol. Chem.* 2012 287: 43331-43339]. Alternativamente, otros pares moleculares de emparejamiento selectivo, como el par barnasa barstar [Deyev, S. M., Waibel, R., Lebedenko, E. N., Schubiger, A. P., and Plückthun, A. (2003). Design of multivalent complexes using the barnase\*barstar module. *Nat Biotechnol* 21, 1486-1492], pares de cadenas de ADN [Zahida N. Chaudri, Michael Bartlett-Jones, George Panayotou, Thomas Klonisch, Ivan M. Roitt, Torben Lund, Peter J. Delves, Dual specificity antibodies using a double-stranded oligonucleotide bridge, *FEBS Letters*, Volume 450, Issues 1-2, 30 April 1999, Páginas 23-26], division de pares de cadenas de ADN [Ulrich Brinkmann, Alexander Haas. Fluorescent antibody fusion protein, its production and use, WO 2011135040 A1] también se puede emplear.

#### Afinidad

En algunas realizaciones, la afinidad se determina mediante SPR (resonancia de plasmón superficial) y/o FACS (clasificación de células activada por fluorescencia). En algunas realizaciones, la afinidad se determina mediante SPR y/o FACS como se describe a continuación.

#### Constante de disociación ( $K_D$ ) y enlace máximo ( $B_{máx}$ )

En algunas realizaciones, un constructo de unión a antígeno se describe mediante características funcionales que incluyen, entre otras, una constante de disociación y una unión máxima.

El término "constante de disociación ( $K_D$ )" como se utiliza en este documento, pretende referirse a la constante de disociación de equilibrio de una interacción ligando-proteína particular. Tal como se utiliza en este documento, las interacciones ligando-proteína se refieren, pero no se limitan a, interacciones proteína-proteína o interacciones anticuerpo-antígeno. La  $K_D$  mide la propensión de dos proteínas (por ejemplo, AB) a disociarse reversiblemente en componentes más pequeños (A+B), y se define como la relación entre la tasa de disociación, también llamada "constante de disociación" ( $k_{disociación}$ ), y la tasa de asociación, o "constante de asociación" ( $k_{asociación}$ ). Por lo tanto,  $K_D$  es igual a  $k_{disociación}/k_{asociación}$  y se expresa como concentración molar (M). De ello se deduce que cuanto menor sea la  $K_D$ , tanto más fuerte la afinidad de unión. Por lo tanto, una  $K_D$  de 1 mM indica una afinidad de unión débil en comparación con una  $K_D$  de 1 nM. Los valores de  $K_D$  para constructos de unión a antígeno se pueden determinar utilizando métodos bien establecidos en la técnica. Un método para determinar la  $K_D$  de un constructo de unión a antígeno se realiza mediante resonancia de plasmón superficial (SPR), normalmente utilizando un sistema de biosensores tal como un sistema Biacore®. La calorimetría de titulación isotérmica (ITC) es otro método que se puede utilizar para la determinación.

Las características de unión de un constructo de unión a antígeno se pueden determinar mediante diversas técnicas. Una de ellas es la medición de la unión a las células diana que expresan el antígeno mediante citometría de flujo (FACS, clasificación de células activada por fluorescencia). Normalmente, en un experimento de este tipo, las células diana que expresan el antígeno de interés se incuban con constructos de unión a antígeno en diferentes concentraciones, se lavan, se incuban con un agente secundario para detectar el constructo de unión a antígeno, se lavan y se analizan en el citómetro de flujo para medir la intensidad de fluorescencia media (MFI) que muestra la fuerza de la señal de detección en las células, que a su vez está relacionada con la cantidad de constructos de unión a antígeno unidas a las células. Luego, la concentración del constructo de unión a antígeno frente a los datos de MFI se ajusta en una ecuación de unión de saturación para obtener dos parámetros de unión clave,  $B_{máx}$  y  $K_D$  aparente.

$K_D$  aparente, o constante de disociación de equilibrio aparente, muestra la concentración del constructo de unión a antígeno en la que se observa la mitad de la unión celular máxima. Evidentemente, cuanto menor sea el valor de  $K_D$ , menor será la concentración de constructo de unión a antígeno necesaria para alcanzar la unión celular máxima y, por lo tanto, mayor será la afinidad del constructo de unión a antígeno. La  $K_D$  aparente depende de las condiciones del experimento de unión celular, como los diferentes niveles de receptores

expresados en las células y las condiciones de incubación, y por lo tanto la  $K_D$  aparente es generalmente diferente de los valores de  $K_D$  determinados a partir de experimentos moleculares sin células tales como SPR e ITC. Sin embargo, en general existe un buen acuerdo entre los diferentes métodos.

- 5 El término "B<sub>máx</sub>", o unión máxima, se refiere al nivel máximo de unión del constructo de unión a antígeno en las células a concentraciones de saturación del constructo de unión a antígeno. Este parámetro puede expresarse en la unidad arbitraria MFI para comparación relativa, o convertirse en un valor absoluto correspondiente al número de constructos de unión a antígeno unidos a la célula con el uso de una curva estándar.

Prueba de constructos de unión a antígeno: unión de HER2

- 10 Los constructos de unión a antígeno o composiciones farmacéuticas descritas en este documento se prueban *in vitro* y luego *in vivo* para la actividad terapéutica o profiláctica deseada, antes de su uso en humanos. Por ejemplo, los ensayos *in vitro* para demostrar la utilidad terapéutica o profiláctica de un compuesto o composición farmacéutica incluyen el efecto de un compuesto sobre una línea celular o una muestra de tejido de un paciente.
- 15 El efecto del compuesto o composición sobre la línea celular y/o la muestra de tejido se puede determinar utilizando técnicas conocidas por los expertos en la materia, incluidos, entre otros, ensayos de formación de rosetas y ensayos de lisis celular. De acuerdo con la invención, los ensayos *in vitro* que pueden utilizarse para determinar si está indicada la administración de un constructo de unión a antígeno específico incluyen ensayos de cultivo celular *in vitro* o ensayos *in vitro* en los que una muestra de tejido de un paciente se cultiva y se expone o se administra de otro modo un constructo de unión a antígeno, y se observa el efecto de dicho
- 20 constructo de unión a antígeno sobre la muestra de tejido.

Los constructos de unión a antígeno candidatos se pueden analizar utilizando células, por ejemplo, líneas celulares de cáncer de mama, que expresan HER2. La siguiente Tabla D describe el nivel de expresión de HER2 en varias líneas de células cancerosas representativas.

Tabla D - Niveles de expresión relativa de HER2 en líneas celulares de interés.

Línea celular	Descripción	Puntuación IHC	Receptores HER2/célula
NCI-N87	Carcinoma gástrico humano	3+	No evaluado
A549	Carcinoma alveolar de pulmón humano (cáncer de pulmón de células no pequeñas)	0/1+	No evaluado
BxPC-3	Adenocarcinoma pancreático humano	1+	No evaluado
MIA PaCa-2	Adenocarcinoma ductal pancreático humano	2+	No evaluado
FaDu	Carcinoma de células escamosas faríngeo humano	2+	No evaluado
HCT-116	Carcinoma epitelial colorrectal humano	1+	No evaluado
WI-38	Pulmón fetal normal	0	1.0x10E4
MDA-MB-231	Adenocarcinoma epitelial de mama humano triple negativo	0/1+	1.7x10E4 - 2.3x10E4
MCF-7	Adenocarcinoma epitelial de mama con receptor de estrógeno humano positivo	1+	4x10E4 - 7x10E4
JIMT-1	Carcinoma epitelial de mama resistente a trastuzumab, oncogén HER2 amplificado, insensible a fármacos inhibidores de HER2 (es decir Herceptin™)	2+	2x10E5 - 8x10E5
ZR-75-1	Carcinoma ductal de mama con receptor de estrógeno positivo	2+	3x10E5
SKOV-3	Adenocarcinoma epitelial de ovario humano, gen HER2 amplificado	2/3+	5x10E5 - 1x10E6
SK-BR-3	Adenocarcinoma epitelial de mama humano	3+	> 1x10E6
BT-474	Carcinoma ductal epitelial de mama humano	3+	> 1x10E6

McDonagh et al. Mol Cancer Ther. 2012 Mar; 11(3): 582-93; Subik et al. (2010) Breast Cancer: Basic Clinical Research: 4; 35-41; Carter et al. PNAS, 1994: 89; 4285-4289; Yarden 2000, HER2: Basic Research, Prognosis and Therapy; Hendricks et al. Mol Cancer Ther 2013; 12: 1816-28.

5 Como se sabe en la técnica, se pueden emplear varios ensayos para identificar constructos de unión a antígeno adecuados para su uso en los métodos descritos en este documento. Estos ensayos pueden llevarse a cabo en células cancerosas que expresan HER2. En la Tabla A5 se identifican ejemplos de células cancerosas adecuadas. A continuación, se describen ejemplos de ensayos que pueden llevarse a cabo.

10 Por ejemplo, para identificar constructos candidatos de unión a antígenos inhibidores del crecimiento que se unen a HER2, se pueden buscar anticuerpos que inhiben el crecimiento de células cancerosas que expresan HER2. En una realización, el constructo candidato de unión a antígeno de elección es capaz de inhibir el crecimiento de células cancerosas en un cultivo celular en aproximadamente un 20-100 % y preferiblemente en aproximadamente un 50-100 % en comparación con un constructo de unión a antígeno de control.

15 Para seleccionar constructos candidatos de unión a antígenos que inducen la muerte celular, se puede evaluar la pérdida de integridad de la membrana, como lo indica, por ejemplo, la captación de PI (fosfatidilinositol), azul tripán o 7AAD, en relación con el control.

Para seleccionar constructos candidatos de unión a antígenos que induzcan apoptosis, se puede emplear un ensayo de unión de anexina. Además del ensayo de unión de anexina, también se puede utilizar un ensayo de tinción de ADN.

20 En una realización, el constructo candidato de unión a antígeno de interés puede bloquear la asociación dependiente de hereulina de ErbB2 con ErbB3 tanto en células MCF7 como SK-BR-3, como se determinó en un experimento de co-inmunoprecipitación, sustancialmente más efectivamente que el anticuerpo monoclonal 4D5, y preferiblemente sustancialmente más efectivamente que el anticuerpo monoclonal 7F3.

25 Para detectar constructos de unión a antígeno que se unen a un epítipo en ErbB2 unido por un anticuerpo de interés, se realiza un ensayo de bloqueo cruzado de rutina como el descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Como alternativa, o adicionalmente, el mapeo de epítipos se puede realizar mediante métodos conocidos en la técnica.

30 La competencia entre constructos de unión a antígeno se puede determinar mediante un ensayo en el que un constructo de unión a antígeno en prueba inhibe o bloquea la unión específica de un constructo de unión a antígeno de referencia a un antígeno común (véase, por ejemplo, Junghans et al., Cancer Res. 50: 1495, 1990; Fendly et al. Cancer Research 50: 1550-1558; US 6,949,245). Un constructo de prueba de unión a antígeno compite con un constructo de unión a antígeno de referencia si un exceso de un constructo de unión a antígeno de prueba (por ejemplo, al menos 2x, 5x, 10x, 20x o 100x) inhibe o bloquea la unión del constructo de unión a antígeno de referencia en, por ejemplo, al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 %, medido en un ensayo de unión competitiva. Los constructos de unión a antígeno identificados mediante ensayo de competición (constructo de unión a antígeno competitivo) incluyen constructos de unión a antígeno que se unen al mismo epítipo que el constructo de unión a antígeno de referencia y constructos de unión a antígeno que se unen a un epítipo adyacente suficientemente proximal al epítipo unido por el constructo de unión a antígeno de referencia para que se produzca un impedimento estérico. Por ejemplo, se puede identificar un

40 segundo constructo de unión a antígeno competitivo que compite por la unión a HER2 con un primer constructo de unión a antígeno descrito en este documento. En ciertos casos, el segundo constructo puede bloquear o inhibir la unión del primer constructo en, por ejemplo, al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 %, medido en un ensayo de unión competitiva. En ciertos casos, el segundo constructo puede desplazar al primer constructo en más del 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 %.

45 En algunas realizaciones, los constructos de unión a antígeno descritos en este documento se analizan para determinar su función *in vivo*, por ejemplo, en modelos animales. En algunas realizaciones, los modelos animales son los descritos en la Tabla E. En algunas realizaciones, los modelos animales son los descritos en los Ejemplos. En algunas realizaciones, los constructos de unión a antígeno muestran un aumento en la eficacia del tratamiento en un modelo animal en comparación con un constructo de unión a antígeno de referencia.

50 Tabla E: Modelos animales para probar constructos de unión a antígeno de unión a HER2

Modelo de xenoinjerto	Descripción	Referencia
-----------------------	-------------	------------



Cáncer de ovario humano SKOV3	HER2+/3+, gen amplificado, moderadamente sensible a trastuzumab	Rhodes et al. 2002. American Journal of Pathology 118: 408-417; Sims et al. 2012. British Journal of Cancer 106: 1779-1789
Cáncer de mama metastásico humano HBCx-13b	HER2 3+, receptor de estrógeno negativo, receptor de progesterona negativo; carcinoma de mama ductal invasivo; resistente a quimioterapia, resistente a trastuzumab	Marangoni et al. 2007. Clinical Cancer Research 13:3989-3998; Reyat et al. 2012. Breast Cancer Research 14: R11
Cáncer de mama humano T226	HER2 3+, receptor de estrógeno negativo, receptor de progesterona negativo; cáncer de mama inflamatorio; resistente a trastuzumab, moderadamente sensible a docetaxel y capecitabina, sensible a adriamicina /ciclofosfamida	
Cáncer de mama metastásico humano HBCx-5	HER2 3+, receptor de estrógeno negativo, receptor de progesterona negativo; carcinoma ductal invasivo, luminal B; resistente a trastuzumab, moderadamente sensible a docetaxel, sensible a capecitabina, adriamicina/ciclofosfamida	Marangoni et al. 2007. Clinical Cancer Research 13:3989-3998; Reyat et al. 2012. Breast Cancer Research 14: R11
Cáncer de mama humano JIMT-1	HER2 2+, gen HER2 amplificado, resistente a trastuzumab y pertuzumab	Tanner et al. 2004. Molecular Cancer Therapeutics 3: 1585-1592

#### Construido de unión a antígeno de referencia

- 5 En algunas realizaciones, las características funcionales de los constructos de unión a antígeno descritas en este documento se comparan con las de un constructo de unión a antígeno de referencia. La identidad del constructo de unión a antígeno de referencia depende de la característica funcional que se esté midiendo o de la distinción que se esté realizando. Por ejemplo, al comparar las características funcionales de los constructos de unión a antígeno descritas en este documento, el constructo de unión a antígeno de referencia puede ser un trastuzumab (por ejemplo, v6336), o un análogo del mismo, o puede ser una IgG de control, por ejemplo, un anticuerpo humano policlonal no específico.
- 10 Construcciones de unión a antígenos y conjugados anticuerpo fármaco (ADC)
- En ciertas realizaciones, un constructo de unión a antígeno se conjuga con un fármaco, por ejemplo, una toxina, un agente quimioterapéutico, un modulador inmunitario o un radioisótopo. Se conocen en la técnica varios métodos para preparar ADC (conjugados de anticuerpo fármaco o conjugados de fármaco constructo de unión a antígeno) y se describen a continuación.
- 15 En algunas realizaciones, el fármaco se selecciona entre una maitansina, auristatina, caliqueamicina o un derivado de las mismas. En otras realizaciones, el fármaco es una maitansina seleccionada entre DM1 y DM4. A continuación se describen más ejemplos.
- En algunas realizaciones, el fármaco se conjuga con el constructo de unión a antígeno aislado con un enlazador SMCC (DM1) o un enlazador SPDB (DM4). A continuación, se describen ejemplos adicionales. La relación fármaco-proteína de unión a antígeno (DAR) puede ser, por ejemplo, de 1.0 a 6.0 o de 3.0 a 5.0 o de 3.5-4.2.
- 20 En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno se conjuga con un agente citotóxico. El término "agente citotóxico" como se utiliza en este documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de las células y/o causa la destrucción de las células. El término pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32 y Lu177), agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluidos fragmentos y/o variantes de las mismas. A continuación, se describen más ejemplos.
- 25

## Fármacos

Los ejemplos no limitantes de fármacos o cargas útiles utilizados en diversas realizaciones de ADC incluyen DM1 (maitansina, N<sup>2</sup>'-desacetil-N<sup>2</sup>'-(3-mercapto-1-oxopropil)- o N<sup>2</sup>'-desacetil-N<sup>2</sup>'-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina), mc-MMAD (6-maleimidocaproil-monometilauristatina-D o N-metil-L-valil-N-[(1S,2R)-2-metoxi-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[[[(1S)-2-fenil-1-(2-tiazolil)etil]amino]propil]-1-pirrolidinil]-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil]-N-metil-(9CI)-L-valinamida), mc-MMAF (maleimidocaproil-monometilauristatina F o N-[6-(2,5-dihidro-2,5-dioxo-1H-pirrol-1-il)-1-oxohexil]-N-metil-L-valil-L-valil-(3R,4S,5S)-3-metoxi-5-metil-4 (metilamino)heptanoil-(αR, βR,2S)-β-metoxi-α-metil-2-pirrolidinapropanoil-L-fenilalanina) y mc-Val-Cit-PABA-MMAE (6-maleimidocaproil-ValCit-(p-aminobenciloxycarbonil)-monometilauristatina E o N-[[[4-[[N-[6-(2,5-dihidro-2,5-dioxo-1H-pirrol-1-il)-1-oxohexil]-L-valil-N5-(aminocarbonil)-L-ornitil]amino]fenil]metoxi]carbonil]-N-metil-L-valil-N-[(1S,2R)-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1R,2S)-2-hidroxi-1-metil-2-feniletil]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]-1-pirrolidinil]-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil]-N-metil-L-valinamida). DM1 es un derivado del inhibidor de tubulina maitansina, mientras que MMAD, MMAE y MMAF son derivados de auristatina.

## Fracciones de fármacos maitansinoides

Como se indicó anteriormente, en algunas realizaciones el fármaco es un maitansinoide. Los maitansinoides ejemplares incluyen DM1, DM3 (N<sup>2</sup>'-desacetil-N<sup>2</sup>'-(4-mercapto-1-oxopentil)maitansina) y DM4 (N<sup>2</sup>'-desacetil-N<sup>2</sup>'-(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)metilmaitansina) (véase el documento US20090202536).

Se sabe que muchas posiciones de los compuestos de maitansina son útiles como posición de enlace, dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, para formar un enlace éster, la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo son todas adecuadas.

Se contemplan todos los estereoisómeros de la fracción de fármaco maitansinoide para los ADC descritos en este documento, es decir, cualquier combinación de configuraciones R y S en los carbonos quirales de D.

## Auristatinas

En algunas realizaciones, el fármaco es una auristatina, como la auristatina E (también conocida en la técnica como un derivado de dolastatina-10) o un derivado de la misma. La auristatina puede ser, por ejemplo, un éster formado entre la auristatina E y un cetoácido. Por ejemplo, la auristatina E puede reaccionar con ácido paraacetilbenzoico o ácido benzoilvalérico para producir AEB y AEVB, respectivamente. Otras auristatinas típicas incluyen AFP, MMAF y MMAE. La síntesis y estructura de auristatinas ejemplares se describen en las patentes de los Estados Unidos Nos 6,884,869, 7,098,308, 7,256,257, 7,423,116, 7,498,298 y 7,745,394.

## Agentes quimioterapéuticos

En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno se conjuga con un agente quimioterapéutico. Los ejemplos incluyen, entre otros, cisplatino y lapatinib. Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer.

Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN<sup>™</sup>); sulfonatos de alquilo tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosfaoramida y trimetilolomelamina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiomicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina como fludarabina, 6-mercaptapurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitostano, testolactona; antiadrenales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reponedor de ácido fólico como ácido frolínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfomitina; acetato de eliptinio; etoglucido; nitrato de galio; hidroxiourea; lentinano; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK7; razoxano; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2''-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazona; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxanos, p. ej. paclitaxel (TAXOL<sup>®</sup>, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) y

doxetaxel (TAXOTERE®, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en esta definición los agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre los tumores, tales como los antiestrógenos, incluidos, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de la aromatasas, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston); y los antiandrógenos, tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

#### Enlazadores conjugados

En algunas realizaciones, el fármaco está unido al constructo de unión a antígeno, por ejemplo, el anticuerpo, mediante un enlazador. La unión de un enlazador a un anticuerpo se puede lograr de diversas maneras, como a través de lisinas de superficie, acoplamiento reductor a carbohidratos oxidados y a través de residuos de cisteína liberados mediante la reducción de enlaces disulfuro entre cadenas. En la técnica se conocen diversos sistemas de enlace ADC, incluidos enlaces basados en hidrazona, disulfuro y péptidos.

Los enlazadores adecuados incluyen, por ejemplo, enlazadores escindibles y no escindibles. Un enlazador escindible normalmente es susceptible de escisión en condiciones intracelulares. Los enlaces escindibles adecuados incluyen, por ejemplo, un enlace peptídico escindible por una proteasa intracelular, tal como una proteasa lisosomal o una proteasa endosómica. En realizaciones ejemplares, el enlazador puede ser un enlazador dipeptídico, tal como un enlazador valina-citrulina (val-cit), un enlazador fenilalanina-lisina (phe-lys) o un enlazador maleimidocaprónico-valina-citrulina-p-aminobenciloxicarbonilo (mc-Val-Cit-PABA). Otro enlazador es sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC). La conjugación sulfo-smcc ocurre a través de un grupo maleimida que reacciona con sulfhidrilos (tioles, -SH), mientras que su éster sulfo-NHS es reactivo hacia las aminas primarias (como las que se encuentran en la lisina y el N-terminal de la proteína o el péptido). Otro enlazador es el maleimidocaproilo (MC). Otros enlazadores adecuados incluyen enlazadores hidrolizables a un pH específico o a un intervalo de pH, como un enlazador de hidrazona. Los enlazadores escindibles adecuados adicionales incluyen enlazadores disulfuro. El enlazador puede estar unido covalentemente al anticuerpo hasta tal punto que el anticuerpo debe degradarse intracelularmente para que el fármaco se libere, por ejemplo, el enlazador MC y similares.

#### Preparación de ADC

El ADC se puede preparar mediante varias vías, empleando reacciones de química orgánica, condiciones y reactivos conocidos por los expertos en la materia, entre los que se incluyen: (1) reacción de un grupo nucleofílico o un grupo electrófilo de un anticuerpo con un reactivo enlazador bivalente, para formar un intermedio anticuerpo-enlazador Ab-L, a través de un enlace covalente, seguido de una reacción con una fracción de fármaco activada D; y (2) reacción de un grupo nucleofílico o un grupo electrófilo de una fracción de fármaco con un reactivo enlazador, para formar un intermedio fármaco-enlazador D-L, a través de un enlace covalente, seguido de una reacción con el grupo nucleofílico o un grupo electrófilo de un anticuerpo. Los métodos de conjugación (1) y (2) se pueden emplear con una variedad de anticuerpos, fracciones de fármacos y enlazadores para preparar los conjugados anticuerpo-fármaco descritos en este documento.

Se conocen en la técnica varios ejemplos específicos de métodos de preparación de ADC y se describen en las patentes de los Estados Unidos No. 8,624,003 (método de un recipiente), 8,163,888 (de una etapa), y 5,208,020 (método de dos etapas).

#### Métodos de preparación de constructos de unión a antígeno

Los constructos de unión a antígeno descritos en este documento se pueden producir utilizando métodos y composiciones recombinantes, por ejemplo, como se describe en la patente de los Estados Unidos No. 4,816,567.

En una realización, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un constructo de unión a antígeno descrito en este documento. Dicho ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende la VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del constructo de unión a antígeno (por ejemplo, las cadenas ligeras y/o pesadas del constructo de unión a antígeno). En una realización adicional, se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En una realización, el ácido nucleico se proporciona en un vector multicistrónico. En una realización adicional, se proporciona una célula huésped que comprende dicho ácido nucleico. En una de dichas realizaciones, una célula huésped comprende (por ejemplo, se ha transformado con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VL del constructo de unión a antígeno y una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del constructo de polipéptido de

unión a antígeno, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VL del constructo de polipéptido de unión a antígeno y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del constructo de polipéptido de unión a antígeno. En una realización, la célula huésped es eucariota, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO), o una célula de riñón embrionario humano (HEK), o una célula linfóide (por ejemplo, célula Y0, NS0, Sp20). En una realización, se proporciona un método para elaborar un constructo de unión a antígeno, en donde el método comprende cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica el constructo de unión a antígeno, como se proporcionó anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión del constructo de unión a antígeno, y opcionalmente recuperar el constructo de unión a antígeno de la célula huésped (o medio de cultivo de la célula huésped).

Para la producción recombinante del constructo de unión a antígeno, el ácido nucleico que codifica un constructo de unión a antígeno, por ejemplo, como se describió anteriormente, se aísla y se inserta en uno o más vectores para su posterior clonación y/o expresión en una célula huésped. Dicho ácido nucleico se puede aislar y secuenciar fácilmente utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del constructo de unión a antígeno).

El término "sustancialmente purificado" se refiere a un constructo descrito en este documento, o una variante del mismo, que puede estar sustancialmente o esencialmente libre de componentes que normalmente acompañan o interactúan con la proteína tal como se encuentra en su entorno natural, es decir, una célula nativa, o una célula huésped en el caso de un heteromultímero producido de forma recombinante que, en ciertas realizaciones, está sustancialmente libre de material celular, incluye preparaciones de proteína que tienen menos de aproximadamente un 30 %, menos de aproximadamente un 25 %, menos de aproximadamente un 20 %, menos de aproximadamente un 15 %, menos de aproximadamente un 10 %, menos de aproximadamente un 5 %, menos de aproximadamente un 4 %, menos de aproximadamente un 3 %, menos de aproximadamente un 2 % o menos de aproximadamente un 1 % (en peso seco) de proteína contaminante. Cuando el heteromultímero o variante del mismo es producido de forma recombinante por las células huésped, la proteína en ciertas realizaciones está presente en aproximadamente 30 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 4 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 2 % o aproximadamente 1 % o menos del peso seco de las células. Cuando el heteromultímero o variante del mismo se produce de forma recombinante por las células huésped, la proteína, en ciertas realizaciones, está presente en el medio de cultivo en aproximadamente 5 g/L, aproximadamente 4 g/L, aproximadamente 3 g/L, aproximadamente 2 g/L, aproximadamente 1 g/L, aproximadamente 750 mg/L, aproximadamente 500 mg/L, aproximadamente 250 mg/L, aproximadamente 100 mg/L, aproximadamente 50 mg/L, aproximadamente 10 mg/L, o aproximadamente 1 mg/L o menos del peso seco de las células. En ciertas realizaciones, el heteromultímero "sustancialmente purificado" producido por los métodos descritos en este documento, tiene un nivel de pureza de al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 35 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 45 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 55 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 65 %, al menos aproximadamente 70 %, específicamente, un nivel de pureza de al menos aproximadamente 75 %, 80 %, 85 % y, más específicamente, un nivel de pureza de al menos aproximadamente 90 %, un nivel de pureza de al menos aproximadamente 95 %, un nivel de pureza de al menos aproximadamente 99 % o mayor de acuerdo con lo determinado por métodos apropiados tales como análisis SDS/PAGE, RP-HPLC, SEC y electroforesis capilar.

Las células huésped adecuadas para la clonación o expresión de vectores que codifican constructos de unión a antígeno incluyen células procariotas o eucariotas descritas en este documento.

Una "célula huésped recombinante" o "célula huésped" se refiere a una célula que incluye un polinucleótido exógeno, independientemente del método utilizado para la inserción, por ejemplo, captación directa, transducción, apareamiento u otros métodos conocidos en la técnica para crear células huésped recombinantes. El polinucleótido exógeno puede mantenerse como un vector no integrado, por ejemplo, un plásmido, o alternativamente, puede integrarse en el genoma del huésped.

Tal como se utiliza en este documento, el término "eucariota" se refiere a organismos que pertenecen al dominio filogenético Eucarya, tales como animales (incluidos, entre otros, mamíferos, insectos, reptiles, aves, etc.), ciliados, plantas (incluidas, entre otras, monocotiledóneas, dicotiledóneas, algas, etc.), hongos, levaduras, flagelados, microsporidios, protistas, etc.

Tal como se utiliza en este documento, el término "procariota" se refiere a organismos procariotas. Por ejemplo, un organismo no eucariota puede pertenecer al dominio filogenético Eubacteria (incluyendo pero no limitado a, *Escherichia coli*, *Thermus thermophilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, etc.), o al dominio filogenético Archaea (incluyendo pero no limitado a, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium* como *Haloflex volcanii* y especie de *Halobacterium* NRC-1, *Archaeoglobus fulgidus*, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus horikoshii*, *Aeuropyrum permix*, etc.).

Por ejemplo, se puede producir un constructo de unión a antígeno en bacterias, en particular cuando no se necesitan la glicosilación y la función efectora Fc. Para la expresión de fragmentos de constructo de unión a antígeno y polipéptidos en bacterias, véase, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nos. 5,648,237, 5,789,199, y 5,840,523. (Véase también Charlton, *Methods in Molecular Biology*, vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), págs. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpos en *E. coli*). Después de la expresión, el constructo de unión a antígeno se puede aislar de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y se puede purificar aún más.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas como los hongos filamentosos o las levaduras son huéspedes adecuados para la clonación o expresión de vectores codificadores de constructos de unión a antígeno, incluidos hongos y cepas de levaduras cuyas vías de glicosilación han sido "humanizadas", lo que da como resultado la producción de un constructo de unión a antígenos con un patrón de glicosilación parcial o totalmente humano. Véase Gerngross, *Nat. Biotech.* 22: 1409-1414 (2004), y Li et al., *Nat. Biotech.* 24: 210-215 (2006).

Las células huésped adecuadas para la expresión de constructos de unión a antígeno glicosilados también se derivan de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrados incluyen las células de plantas y de insectos. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus que pueden utilizarse junto con células de insectos, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Los cultivos de células vegetales también pueden utilizarse como huéspedes. Véase, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nos. 5,959,177; 6,040,498; 6,420,548; 7,125,978 y 6,417,429 (que describen tecnología PLANTIBODIES™ para producir constructos de unión a antígeno en plantas transgénicas).

También pueden utilizarse células de vertebrados como huéspedes. Por ejemplo, pueden ser útiles las líneas de células de mamíferos que estén adaptadas para crecer en suspensión. Otros ejemplos de líneas de células huésped de mamíferos útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); la línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 como se describe, por ejemplo, en Graham et al., *J. Gen. Virol.* 36: 59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK); células de Sertoli de ratón (células TM4 como se describe, por ejemplo, en Mather, *Biol. Reprod.* 23: 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma cervical humano (HELA); células de riñón canino (MDCK); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); tumor mamario de ratón (MMT 060562); células TRI, como se describe, por ejemplo, en Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383: 44-68 (1982); células MRC 5; y células FS4. Otras líneas de células huésped de mamíferos útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluidas células CHO DHFR<sup>-</sup> (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216 (1980)); y líneas de células de mieloma como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una revisión de ciertas líneas de células huésped de mamíferos adecuadas para la producción de constructos de unión a antígeno, véase, por ejemplo, Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), págs. 255-268 (2003).

En una realización, los constructos de unión a antígeno descritos en este documento se producen en células de mamífero estables, mediante un método que comprende: transfectar al menos una célula de mamífero estable con: ácido nucleico que codifica el constructo de unión a antígeno, en una proporción predeterminada; y expresar el ácido nucleico en al menos una célula de mamífero. En algunas realizaciones, la proporción predeterminada de ácido nucleico se determina en experimentos de transfección transitoria para determinar la proporción relativa de ácidos nucleicos de entrada que da como resultado el porcentaje más alto del constructo de unión a antígeno en el producto expresado.

En algunas realizaciones, el método para producir un constructo de unión a antígeno en células de mamífero estables es como se describe en este documento, en donde el producto de expresión de la al menos una célula de mamífero estable comprende un porcentaje mayor del constructo de unión a antígeno glicosilado deseado en comparación con los polipéptidos de cadena pesada o ligera monoméricos u otros anticuerpos.

En algunas realizaciones se describe en este documento el método para producir un constructo de unión a antígeno glicosilado en células de mamífero estables, comprendiendo dicho método la identificación y purificación del constructo de unión a antígeno glicosilado deseado. En algunas realizaciones, dicha identificación se realiza mediante una o ambas de cromatografía líquida y espectrometría de masas.

Si es necesario, los constructos de unión a antígeno se pueden purificar o aislar después de la expresión. Las proteínas pueden aislarse o purificarse de diversas maneras conocidas por los expertos en la materia. Los métodos de purificación estándar incluyen técnicas cromatográficas, que incluyen intercambio iónico, interacción hidrofóbica, afinidad, filtración por tamaño o en gel y fase inversa, realizadas a presión atmosférica o a alta presión utilizando sistemas como FPLC y HPLC. Los métodos de purificación también incluyen técnicas electroforéticas, inmunológicas, de precipitación, de diálisis y de cromatofluorecencia. Las técnicas de ultrafiltración y diafiltración, junto con la concentración de proteína, también son útiles. Como es bien sabido en la técnica, una variedad de proteínas naturales se une a Fc y anticuerpos, y estas proteínas pueden encontrar uso en la presente invención para la purificación de constructos de unión a antígeno. Por ejemplo, las proteínas

bacterianas A y G se unen a la región de Fc. Asimismo, la proteína bacteriana L se une a la región Fab de algunos anticuerpos. La purificación a menudo puede ser posibilitada por un compañero de fusión en particular. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden purificar utilizando resina de glutatión si se emplea una fusión GST, cromatografía de afinidad  $\text{Ni}^{+2}$  si se emplea una etiqueta His, o anticuerpo anti-flag inmovilizado si se utiliza una etiqueta flag. Para obtener orientación general sobre técnicas de purificación adecuadas, véase, por ejemplo, Protein Purification: Principles and Practice, 3rd Ed., Scopes, Springer-Verlag, NY, 1994. El grado de purificación necesario variará dependiendo del uso de los constructos de unión a antígeno. En algunos casos no es necesaria ninguna purificación.

En ciertas realizaciones, los constructos de unión a antígeno se purifican utilizando cromatografía de intercambio aniónico que incluye, entre otras, cromatografía en columnas Q-sefarosa, DEAE sefarosa, poros HQ, poros DEAF, Toyopearl Q, Toyopearl QAE, Toyopearl DEAE, Resource/Source Q y DEAE, Fractogel Q y DEAE.

En realizaciones específicas, las proteínas descritas en este documento se purifican utilizando cromatografía de intercambio catiónico que incluye, entre otras, SP-sefarosa, CM sefarosa, poros HS, poros CM, Toyopearl SP, Toyopearl CM, Resource/Source S y CM, columnas Fractogel S y CM y sus equivalentes y comparables.

Además, los constructos de unión a antígeno descritos en este documento se pueden sintetizar químicamente utilizando técnicas conocidas en la materia (por ejemplo, véase Creighton, 1983, Proteins: Structures and Molecular Principles, W.H. Freeman & Co., NY y Hunkapiller et al., Nature, 310: 105-111 (1984)). Por ejemplo, un polipéptido correspondiente a un fragmento de un polipéptido puede sintetizarse mediante el uso de un sintetizador de péptidos. Además, si se desea, se pueden introducir aminoácidos no clásicos o análogos químicos de aminoácidos como sustitución o adición a la secuencia polipeptídica. Los aminoácidos no clásicos incluyen, pero no se limitan a, los D-isómeros de los aminoácidos comunes, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido alfa-amino isobutírico, ácido 4-aminobutírico, Abu, ácido 2-amino butírico, g-Abu, e-Ahx, ácido 6-amino hexanoico, Aib, ácido 2-amino isobutírico, ácido 3-amino propiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, homocitrulina, ácido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina,  $\beta$ -alanina, fluoroaminoácidos, aminoácidos de diseño tal como  $\beta$ -metilaminoácidos, CO-metilaminoácidos, N $\beta$ -metilaminoácidos y análogos de aminoácidos en general. Además, el aminoácido puede ser D (dextrógiro) o L (levógiro).

Modificaciones postraduccionales:

En ciertas realizaciones, los constructos de unión a antígeno descritos en este documento se modifican diferencialmente durante o después de la traducción.

El término "modificado", como se utiliza en este documento, se refiere a cualquier cambio realizado en un polipéptido determinado, como cambios en la longitud del polipéptido, la secuencia de aminoácidos, la estructura química, la modificación cotraduccional o la modificación postraduccionales de un polipéptido. El término de forma "(modificado)" significa que los polipéptidos en discusión están opcionalmente modificados, es decir, los polipéptidos en discusión pueden estar modificados o no modificados.

El término "modificado postraduccionales" se refiere a cualquier modificación de un aminoácido natural o no natural que se produce en dicho aminoácido después de haber sido incorporado a una cadena polipeptídica. El término abarca, sólo a modo de ejemplo, modificaciones cotraduccionales *in vivo*, modificaciones cotraduccionales *in vitro* (como en un sistema de traducción libre de células), modificaciones postraduccionales *in vivo* y modificaciones postraduccionales *in vitro*.

En algunas realizaciones, la modificación es al menos una de: glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica y unión a una molécula de anticuerpo o constructo de unión a antígeno u otro ligando celular. En algunas realizaciones, el constructo de unión a antígeno se modifica químicamente mediante técnicas conocidas, que incluyen, entre otras, escisión química específica por bromuro de cianógeno, tripsina, quimotripsina, papaína, proteasa V8,  $\text{NaBH}_4$ ; acetilación, formilación, oxidación, reducción; y síntesis metabólica en presencia de tunicamicina.

Las modificaciones postraduccionales adicionales de los constructos de unión a antígeno descritas en este documento incluyen, por ejemplo, cadenas de carbohidratos unidas a N o a O, procesamiento de extremos N-terminal o C-terminal, unión de fracciones químicas a la cadena principal de aminoácidos, modificaciones químicas de cadenas de carbohidratos unidas a N o a O, y adición o eliminación de un residuo de metionina N-terminal como resultado de la expresión de una célula huésped procariota. Los constructos de unión a antígeno descritos en este documento se modifican con una etiqueta detectable, tal como una etiqueta enzimática, fluorescente, isotópica o de afinidad para permitir la detección y el aislamiento de la proteína. En ciertas realizaciones, los ejemplos de etiquetas enzimáticas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina,

fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de material luminiscente incluye luminol; los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y los ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen yodo, carbono, azufre, tritio, indio, tecnecio, talio, galio, paladio, molibdeno, xenón y flúor.

5 En realizaciones específicas, los constructos de unión a antígeno descritos en este documento están unidos a quelantes macrocíclicos que se asocian con iones radiometálicos.

En algunas realizaciones, los constructos de unión a antígeno descritos en este documento se modifican mediante procesos naturales, como el procesamiento postraducciona, o mediante técnicas de modificación química que son bien conocidas en la técnica. En ciertas realizaciones, el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo grado o en grados variables en varios sitios de un polipéptido determinado. En 10 ciertas realizaciones, los polipéptidos de los constructos de unión a antígeno descritos en este documento están ramificados, por ejemplo, como resultado de la ubiquitinación, y en algunas realizaciones son cíclicos, con o sin ramificación. Los polipéptidos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados son resultado de procesos naturales postraduccionales o elaborados mediante métodos sintéticos. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de una fracción 15 hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, entrecruzamiento, ciclización, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de enlaces cruzados covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de anclaje GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, 20 selenoilación, sulfatación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas como arginilación y ubiquitinación. (Véase, por ejemplo, PROTEINS-STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993); POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pgs. 1-12 (1983); Seifter et al., Meth. Enzymol. 182: 626-646 (1990); Rattan et al., Ann. N.Y. Acad. 25 Sci. 663: 48-62 (1992)).

En ciertas realizaciones, los constructos de unión a antígeno descritos en este documento están unidos a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos o purificación de polipéptidos que están unidos por, que se unen a, o se asocian con proteínas descritas en este documento. Dichos soportes sólidos incluyen, entre otros, vidrio, celulosa, poliácridamida, nailon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

### 30 Composiciones farmacéuticas

También se proporcionan en este documento composiciones farmacéuticas que comprenden un constructo de unión a antígeno descrito en este documento. Las composiciones farmacéuticas comprenden el constructo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal 35 o estatal o incluido en la Farmacopea de los EE. UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el producto terapéutico. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, como agua y aceites, incluidos los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, como 40 aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. En algunos aspectos, el portador es un portador creado por el hombre que no se encuentra en la naturaleza. El agua se puede utilizar como vehículo cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. También se pueden emplear soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato 45 de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes amortiguadores de pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición se puede formular como un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales 50 como los triglicéridos. La formulación oral puede incluir portadores estándar como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Se describen ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma 55 para la administración adecuada al paciente. La formulación debe adaptarse al modo de administración.

En ciertas realizaciones, la composición que comprende el constructo se formula de acuerdo con procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Normalmente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en un tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente 60 solubilizante y un anestésico local como lignocaína para aliviar el dolor en el lugar de la inyección.

Generalmente, los ingredientes se suministran por separado o mezclados entre sí en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un concentrado sin agua en un recipiente herméticamente sellado, como una ampolla o un sobre que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición se va a administrar por infusión, se puede dispensar con un frasco de infusión que contenga agua o solución salina de calidad farmacéutica estéril. Cuando la composición se administra mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina para que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en este documento se formulan como formas neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con aniones tales como los derivados de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y aquellas formadas con cationes tales como los derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxido férrico, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc.

Tratamiento: Usos médicos

En esta sección y en todo el texto, las referencias a tratamientos y métodos de tratamiento se refieren al constructo para uso en ese tratamiento o método. No se reivindican métodos de tratamiento.

Se proporciona un método para tratar una enfermedad o trastorno que comprende administrar a un sujeto en el que se desea dicho tratamiento, prevención o mejora, un constructo de unión a antígeno descrito en este documento, en una cantidad eficaz para tratar, prevenir o mejorar la enfermedad o el trastorno.

La invención proporciona el constructo de unión a antígeno (es decir, V10000) para su uso en un método para inhibir el crecimiento de un tumor en un sujeto humano, en donde al sujeto humano se le administran al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 dosis del constructo de unión a antígeno, y/o en donde cada dosis se administra al menos cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 días. A continuación, se proporciona una descripción más general como referencia, pero los tratamientos distintos a los destinados a inhibir el crecimiento de un tumor en un sujeto humano con la administración de la dosis reivindicada no son parte de la invención reivindicada.

"Trastorno" se refiere a cualquier condición que podría beneficiarse del tratamiento con un método o constructo de unión a antígeno descrito en este documento. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas, incluidas aquellas condiciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. En algunas realizaciones, el trastorno es cáncer, como se describe con más detalle a continuación.

El término "sujeto" se refiere a un animal, en algunas realizaciones un mamífero, que es el objeto de tratamiento, observación o experimento. Un animal puede ser un ser humano, un primate no humano, un animal de compañía (por ejemplo, perros, gatos y similares), un animal de granja (por ejemplo, vacas, ovejas, cerdos, caballos y similares) o un animal de laboratorio (por ejemplo, ratas, ratones, conejillos de indias y similares).

El término "mamífero" tal como se utiliza en este documento incluye, entre otros, humanos, primates no humanos, caninos, felinos, murinos, bovinos, equinos y porcinos.

"Tratamiento" se refiere a una intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo o la célula que se está tratando, y puede realizarse ya sea como profilaxis o durante el curso de una patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen la prevención de la aparición o recurrencia de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, la prevención de la metástasis, la disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, la mejora o paliación del estado de la enfermedad y la remisión o mejora del pronóstico. En algunas realizaciones, los constructos de unión a antígeno descritos en este documento se utilizan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o trastorno. En una realización, los constructos y métodos de unión a antígeno descritos en este documento efectúan la regresión del tumor. En una realización, los constructos y métodos de unión a antígeno descritos en este documento efectúan la inhibición del crecimiento del tumor/cáncer.

Los efectos deseables del tratamiento incluyen, entre otros, la prevención de la aparición o recurrencia de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, la prevención de la metástasis, la disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, la mejora o paliación del estado de la enfermedad, la mejora de la supervivencia y la remisión o mejora del pronóstico. En algunas realizaciones, los constructos de unión a antígeno descritos en este documento se utilizan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para retardar la progresión de una enfermedad.

El término "cantidad efectiva" como se utiliza en este documento se refiere a la cantidad de constructo que se administra, lo que logrará el objetivo del método mencionado, por ejemplo, aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas de la enfermedad, afección o trastorno que se está tratando. La cantidad de la composición descrita en este documento que será eficaz en el tratamiento, inhibición y prevención de una enfermedad o trastorno asociado con la expresión y/o actividad aberrante de una proteína terapéutica se puede determinar mediante técnicas clínicas estándar. Además, opcionalmente se pueden emplear ensayos *in vitro* para ayudar



a identificar rangos de dosis óptimos. La dosis precisa para emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración y de la gravedad de la enfermedad o trastorno, y deberá decidirse de acuerdo con el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente. Las dosis efectivas se extrapolan a partir de curvas dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba *in vitro* o de modelos animales.

5 Se administra al sujeto el constructo de unión a antígeno. Se conocen varios sistemas de administración y se pueden utilizar para administrar una formulación de constructo de unión a antígeno descrita en este documento, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el compuesto, endocitosis mediada por receptores (véase, por ejemplo, Wu and Wu, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432 (1987)), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro, etc. Los  
10 métodos de introducción incluyen, entre otros, las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. Los compuestos o composiciones pueden administrarse 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 pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, en  
15 ciertas realizaciones, es deseable introducir las composiciones de constructos de unión a antígeno descritas en este documento en el sistema nervioso central mediante cualquier vía adecuada, incluida la inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular puede facilitarse mediante un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un reservorio, tal como un reservorio Ommaya. También se puede emplear la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador y una formulación con un  
20 agente formador de aerosol.

En una realización específica, es deseable administrar los constructos de unión a antígeno, o composiciones descritas en este documento localmente en el área que necesita tratamiento; esto se puede lograr, por ejemplo, y no a modo de limitación, mediante infusión local durante una cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, junto con un apósito para heridas después de la cirugía, mediante inyección, por medio de un catéter, por medio de un  
25 supositorio o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialísticas o fibras. Preferiblemente, al administrar una proteína, incluyendo un constructo de unión a antígeno, descrito en este documento, se debe tener cuidado de utilizar materiales en los que la proteína no se absorba.

En otra realización, los constructos o composiciones de unión a antígeno se pueden administrar en una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer, Science 249: 1527-1533 (1990); Treat et al., en Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, páginas 353-365 (1989); Lopez-Berestein, en el mismo lugar, páginas 317-327; véase generalmente allí mismo).

En otra realización más, los constructos o composiciones de unión a antígeno se pueden administrar en un sistema de liberación controlada. En una realización, se puede utilizar una bomba (véase Langer, citado más arriba; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201 (1987); Buchwald et al., Surgery 88: 507 (1980); Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321:574 (1989)). En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos (véase Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61 (1983); véase también Levy et al., Science 228:190 (1985); During et al., Ann. Neurol. 25:351 (1989; Howard et al., J. Neurosurg. 71: 105 (1989)). En otra realización más, se puede colocar un sistema de liberación controlada cerca del objetivo terapéutico, por ejemplo, el cerebro, requiriendo así solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, vol. 2, páginas 115-138 (1984)).

En una realización específica que comprende un ácido nucleico que codifica los constructos de unión a antígeno descritos en este documento, el ácido nucleico se puede administrar *in vivo* para promover la expresión de su proteína codificada, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolo de modo que se vuelva intracelular, por ejemplo, mediante el uso de un vector retroviral (véase la patente de los Estados Unidos No. 4,980,286), o por inyección directa, o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola genética; Biolistic, Dupont), o recubrimiento con lípidos o receptores  
50 de superficie celular o agentes transfectantes, o administrándolo en enlace con un péptido similar a homeobox que se sabe que ingresa al núcleo (véase, por ejemplo, Joliot et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1864-1868 (1991)), etc. Alternativamente, un ácido nucleico puede introducirse intracelularmente e incorporarse dentro del ADN de la célula huésped para su expresión, mediante recombinación homóloga.

En ciertas realizaciones, un constructo de unión a antígeno descrito en este documento se administra como una combinación con constructos de unión a antígeno con epítomos objetivo de unión no superpuestos.

La cantidad de constructo de unión a antígeno que será eficaz en el tratamiento, la inhibición y la prevención de una enfermedad o trastorno se puede determinar mediante técnicas clínicas estándar. Además, opcionalmente se pueden emplear ensayos *in vitro* para ayudar a identificar rangos de dosis óptimos. La dosis precisa para emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración y de la gravedad de la  
60 enfermedad o trastorno, y deberá decidirse de acuerdo con el criterio del médico y las circunstancias de cada

paciente. Las dosis efectivas se extrapolan a partir de curvas dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba *in vitro* o de modelos animales.

Los constructos de unión a antígeno descritos en este documento pueden administrarse solos o en combinación con otros tipos de tratamientos (por ejemplo, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal, inmunoterapia y agentes antitumorales). Generalmente, se prefiere la administración de productos originados en una especie o una reactividad de especie (en el caso de anticuerpos) que sea la misma especie que la del paciente. Por lo tanto, en una realización, se administran constructos de unión a antígeno humanos, fragmentos, derivados, análogos o ácidos nucleicos a un paciente humano para terapia o profilaxis.

#### Métodos de tratamiento de los cánceres

- 10 En este documento se describen métodos para tratar un cáncer o un tumor HER2+ en un sujeto, y métodos para inhibir el crecimiento de una célula tumoral HER2+ o matar una célula tumoral HER2+ utilizando los constructos de unión a antígeno descritos en este documento.

- 15 Por un cáncer HER2+ se entiende un cáncer que expresa HER2 de tal manera que los constructos de unión a antígeno descritos en este documento pueden unirse al cáncer. Como se sabe en la técnica, los cánceres HER2+ expresan HER2 en niveles variables. Para determinar la expresión de ErbB, por ejemplo, ErbB2 (HER2) en el cáncer, existen varios ensayos de diagnóstico/pronóstico disponibles. En una realización, la sobreexpresión de ErbB2 puede analizarse mediante IHC, por ejemplo, utilizando HERCEPTEST® (Dako). Las secciones de tejido incluidas en parafina de una biopsia de tumor pueden someterse al ensayo IHC y se les puede asignar un criterio de intensidad de tinción de proteína ErbB2 de la siguiente manera:

- 20 Puntuación 0, no se observa tinción o se observa tinción de membrana en menos del 10 % de las células tumorales.

Puntuación 1+, se detecta una tinción de membrana débil o apenas perceptible en más del 10 % de las células tumorales. Las células sólo están teñidas en parte de su membrana.

- 25 Puntuación 2+, se observa una tinción de membrana completa débil a moderada en más del 10 % de las células tumorales.

Puntuación 3+, se observa una tinción de membrana completa de moderada a fuerte en más del 10 % de las células tumorales.

- 30 Los tumores con puntuaciones de 0 o 1+ para la evaluación de la sobreexpresión de ErbB2 pueden caracterizarse como que no sobreexpresan ErbB2, mientras que los tumores con puntuaciones de 2+ o 3+ pueden caracterizarse como que sobreexpresan ErbB2.

- 35 Alternativamente, o adicionalmente, se pueden utilizar ensayos de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) como el INFORM™ (vendido por Ventana, Arizona) o PATHVISION™ (Vysis, Ill) se puede realizar en tejido tumoral fijado con formalina e incluido en parafina para determinar el grado (si lo hay) de sobreexpresión de ErbB2 en el tumor. En comparación con el ensayo IHC, el ensayo FISH, que mide la amplificación del gen HER2, parece correlacionarse mejor con la respuesta de los pacientes al tratamiento con HERCEPTIN®, y actualmente se considera el ensayo preferido para identificar a los pacientes que probablemente se beneficien del tratamiento con HERCEPTIN®.

- 40 La Tabla D describe el nivel de expresión de HER2 en varias líneas celulares de cáncer de mama representativas y otros cánceres (Subik et al. (2010) Breast Cancer: Basic Clinical Research: 4; 35-41; Prang et al. (2005) British Journal of Cancer Research: 92; 342-349). Como se muestra en la tabla, las células MCF-7 y MDA-MB-231 se consideran células con baja expresión de HER2; las células JIMT-1 y ZR-75-1 se consideran células con expresión media de HER2, y las células SKBR3 y BT-474 se consideran células con alta expresión de HER2. Las células SKOV3 (cáncer de ovario) se consideran células con expresión media de HER2.

- 45 Se describen en este documento métodos para tratar a un sujeto que tiene un cáncer o un tumor HER2+ que comprenden proporcionar al sujeto una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un constructo de unión a antígeno descrito en el presente documento.

- 50 También se describe en este documento el uso de un constructo de unión a antígeno HER2 descrito en este documento para la fabricación de un medicamento para tratar un cáncer o un tumor. También se describen en este documento constructos de unión a antígeno HER2 para su uso en el tratamiento del cáncer o de un tumor.

En algunas realizaciones, el sujeto que está siendo tratado tiene cáncer de páncreas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer renal, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de cerebro, cáncer de endometrio, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón de células no pequeñas o un cáncer de origen epidérmico. En algunas realizaciones, el tumor es metastásico.

En general, el tumor del sujeto en tratamiento expresa un promedio de 10,000 o más copias de HER2 por célula tumoral. En ciertas realizaciones, el tumor es HER2 0-1+, 1+, HER2 2+ o HER2 3+ de acuerdo con lo determinado por IHC. En algunas realizaciones, el tumor es HER2 2+ o inferior, o HER2 1+ o inferior. En algunas realizaciones, el tumor tiene un gen HER2 amplificado. En algunas realizaciones, el gen HER2 no está amplificado.

En algunas realizaciones, el tumor del sujeto que se está tratando con los constructos de unión a antígeno es un cáncer de mama. En algunas realizaciones, el cáncer de mama expresa HER2 en un nivel 3+. En algunas realizaciones, el cáncer de mama expresa HER2 en un nivel inferior a 3+. En una realización específica, el cáncer de mama expresa HER2 en un nivel 2+ o inferior. En una realización específica, el cáncer de mama expresa HER2 en un nivel de 1+ o inferior. En algunas realizaciones, el cáncer de mama expresa receptores de estrógeno (ER+) y/o receptores de progesterona (PR+). En algunas realizaciones, el cáncer de mama es ER- y o PR-. En algunas realizaciones, el cáncer de mama tiene un gen HER2 amplificado. En algunas realizaciones, el gen HER2 no está amplificado. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama ductal invasivo resistente a la quimioterapia y resistente al trastuzumab, negativo para el receptor de estrógeno HER2 3+ (ER-), negativo para el receptor de progesterona (PR-). En otra realización, el cáncer de mama es un cáncer de mama inflamatorio resistente a trastuzumab HER2 3+ ER-, PR-. En otra realización, el cáncer de mama es un carcinoma ductal invasivo HER2 3+, ER-, PR-. En otra realización, el cáncer de mama es un cáncer de mama resistente a trastuzumab y pertuzumab amplificado por el gen HER2 2+ HER2. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es triple negativo (que expresa ER-, PR- y bajo HER2). En algunas realizaciones, el cáncer de mama es resistente o refractario a trastuzumab, pertuzumab y/o trastuzumab conjugado con DM1 (ado-trastuzumab emtansina o T-DM1).

En una realización, el tumor es un adenocarcinoma epitelial de ovario HER2 2/3+ que tiene un gen HER2 amplificado.

En este documento se proporcionan métodos para tratar a un sujeto que tiene un tumor HER2+ que es resistente o se vuelve resistente a otras terapias estándar de atención que comprenden administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende los constructos de unión a antígeno descritos en este documento. En ciertas realizaciones, los constructos de unión a antígeno descritos en este documento se proporcionan a sujetos que no responden a las terapias actuales, opcionalmente en combinación con una o más terapias anti-HER2 actuales. En algunas realizaciones, las terapias anti-HER2 actuales incluyen, entre otras, anticuerpos bivalentes monoespecíficos anti-HER2 o anti-HER3, trastuzumab, pertuzumab, T-DM1, un scFv HER2/HER3 biespecífico o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el cáncer es resistente a diversos agentes quimioterapéuticos como los taxanos. En algunas realizaciones, el cáncer es resistente al trastuzumab. En algunas realizaciones, el cáncer es resistente al pertuzumab. En una realización, el cáncer es resistente o refractario a TDM1 (trastuzumab conjugado con DM1). En algunas realizaciones, el sujeto ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-HER2 como trastuzumab, pertuzumab o DM1. En algunas realizaciones, el sujeto no ha sido tratado previamente con un anticuerpo anti-HER2. En una realización, el constructo de unión a antígeno se proporciona a un sujeto para el tratamiento de cáncer metastásico cuando el paciente ha progresado con una terapia anti-HER2 previa.

En el presente documento se proporcionan métodos para tratar a un sujeto que tiene un tumor HER2+ que comprenden proporcionar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un constructo de unión a antígeno descrito en el presente documento junto con un agente antitumoral adicional. El agente antitumoral adicional puede ser un anticuerpo terapéutico como se indicó anteriormente, o un agente quimioterapéutico. Los agentes quimioterapéuticos útiles para usar en combinación con los constructos de unión a antígeno de la invención incluyen cisplatino, carboplatino, paclitaxel, paclitaxel unido a albúmina, nab-paclitaxel, docetaxel, gemcitabina, vinorelbina, irinotecano, etopósido, vinblastina, pemetrexed, 5-fluorouracilo (con o sin ácido folínico), capecitabina, carboplatino, epirrubicina, oxaliplatino, folfirinóx, abraxano, navelbina y ciclofosfamida, capecitabina, gemcitabina, navelbina, paclitaxel, nab-paclitaxel.

En algunas realizaciones, el tumor es cáncer de pulmón de células no pequeñas y el agente adicional es uno o más de cisplatino, carboplatino, paclitaxel, paclitaxel unido a albúmina, nab-paclitaxel, capecitabina, navelbina, docetaxel, gemcitabina, vinorelbina, irinotecano, etopósido, vinblastina o pemetrexed. En algunas realizaciones, el tumor es cáncer gástrico o de estómago, y el agente adicional es uno o más de 5-fluorouracilo (con o sin ácido folínico), capecitabina, carboplatino, cisplatino, docetaxel, epirrubicina, irinotecano, oxaliplatino, nab-paclitaxel o paclitaxel. En otras realizaciones, el tumor es cáncer de páncreas y el agente adicional es uno o más de nab-paclitaxel, capecitabina, navelbina, gemcitabina, folfirinóx, abraxano o 5-fluorouracilo. En otras realizaciones, el tumor es un cáncer de mama positivo para estrógeno y/o progesterona, y el agente adicional es uno o más de paclitaxel, capecitabina, navelbina, gemcitabina, paclitaxel o nab-paclitaxel o una combinación de (a) doxorrubicina y epirrubicina, (b) una combinación de paclitaxel y docetaxel, o (c) una combinación de 5-fluorouracilo, ciclofosfamida y carboplatino. En otras realizaciones, el tumor es cáncer de cabeza y cuello, y el agente adicional es uno o más de paclitaxel, capecitabina, navelbina, gemcitabina o nab-paclitaxel, carboplatino, doxorrubicina o cisplatino. En otras realizaciones, el tumor es cáncer de ovario y el agente adicional puede ser uno o más de capecitabina, navelbina, gemcitabina, nab-paclitaxel, cisplatino, carboplatino o un taxano como paclitaxel o docetaxel.

Los agentes adicionales pueden administrarse al sujeto que está siendo tratado simultáneamente con los constructos de unión a antígeno o secuencialmente.

El sujeto que se está tratando con los constructos de unión a antígeno puede ser un ser humano, un primate no humano u otro mamífero tal como un ratón.

- 5 En algunas realizaciones, el resultado de proporcionar una cantidad eficaz del constructo de unión a antígeno a un sujeto que tiene un tumor es reducir el tamaño del tumor, inhibir el crecimiento del tumor, aumentar el tiempo hasta la progresión del tumor, prolongar la supervivencia libre de enfermedad del sujeto, disminuir las metástasis, aumentar la supervivencia libre de progresión del sujeto o aumentar la supervivencia general del sujeto o aumentar la supervivencia general de un grupo de sujetos que reciben el tratamiento.
- 10 También se describen en este documento métodos para matar o inhibir el crecimiento de una célula tumoral que expresa HER2 que comprenden poner en contacto la célula con el constructo de unión a antígeno proporcionada en este documento.

- 15 En diversas realizaciones, una célula tumoral puede ser una célula de carcinoma pancreático humano HER2 1+ o 2+, una célula de carcinoma pulmonar humano HER2 3+, una célula de carcinoma bronquioalveolar caucásico humano HER2 2+, una célula de carcinoma faríngeo humano, una célula de carcinoma de células escamosas de lengua humano HER2 2+, una célula de carcinoma de células escamosas de faringe HER2 2+, una célula de carcinoma colorrectal humano HER2 1+ o 2+, una célula de carcinoma gástrico humano HER2 3+, una célula de carcinoma ER+ (receptor de estrógeno positivo), un ER+ humano HER2 2+/3+, una célula de carcinoma de mama amplificada por HER2, una célula de carcinoma de mama triple negativo humano HER2 0+/1+, una célula de carcinoma endometriode humano HER2 2+, una célula de melanoma maligno metastásico de pulmón HER2 1+, una célula de carcinoma de cuello uterino humano HER2 1+, una célula de carcinoma de células renales humanas HER2 1+ o una célula de carcinoma de ovario humano HER2 1+.
- 20

- 25 En realizaciones en las que los constructos de unión a antígeno se conjugan con DM1, la célula tumoral puede ser una célula de carcinoma pancreático humano HER2 1+ o 2+ o 3+, una célula de carcinoma pancreático metastásico HER2 2+, una célula de carcinoma pulmonar humano HER2 0+/1+, +3+, una célula de carcinoma bronquioalveolar caucásico humano HER2 2+, un carcinoma pulmonar anaplásico HER2 0+, una célula de carcinoma de pulmón de células no pequeñas humanas, una célula de carcinoma faríngeo humano, una célula de carcinoma de células escamosas de lengua humano HER2 2+, una célula de carcinoma de células escamosas de faringe HER2 2+, una célula de carcinoma colorrectal humano HER2 1+ o 2+, una célula de carcinoma gástrico humano HER2 0+, 1+ o 3+, una célula de carcinoma ER+ (receptor de estrógeno positivo) ductal de mama humano HER2 1+, un ER+ humano HER2 2+/3+, célula de carcinoma de mama amplificado HER2, una célula de carcinoma de mama triple negativo humano HER2 0+/1+, una célula de carcinoma ductal de mama humano HER2 0+ (basal B, triple negativo similar al mesenquimal), un carcinoma de mama ER+ HER2 2+, una célula de carcinoma de mama metastásico humano HER2 0+ (ER-, amplificado HER2, luminal A, TN), una célula de tumor mesodérmico de útero humano (grado III mixto), una célula de carcinoma endometriode humano 2+, una célula de carcinoma epidermoide de piel humana HER2 1+, una célula de melanoma maligno metastásico de pulmón HER2 1+, una célula de melanoma maligno HER2 1+, una célula de carcinoma epidermoide de cuello uterino humano, una célula de carcinoma de vejiga urinaria humana HER2 1+, una célula de carcinoma de cuello uterino humano HER2 1+, una célula de carcinoma de células renales humana Her2 1+ o una célula de carcinoma de ovario humano HER2 1+, 2+ o 3+.
- 30
- 35
- 40

- 45 En algunas realizaciones, la célula tumoral puede ser una o más de las siguientes líneas celulares: líneas celulares tumorales pancreáticas BxPC3, Capan-1, MiaPaca2; líneas celulares tumorales pulmonares Calu-3, NCI-H322; líneas celulares tumorales de cabeza y cuello Detroit 562, SCC-25, FaDu; líneas celulares tumorales colorrectales HT29, SNU-C2B; línea celular tumoral gástrica NCI-N87; líneas celulares tumorales de mama MCF-7, MDA-MB-175, MDA-MB-361, MDA-MB-231, BT-20, JIMT-1, SkBr3, BT-474; línea celular tumoral uterina TOV-112D; línea celular tumoral cutánea Malme-3M; líneas celulares tumorales de cuello uterino Caski, MS751; línea celular tumoral de vejiga T24, líneas celulares tumorales de ovario CaOV3 y SKOV3.

- 50 En algunas realizaciones en las que los constructos de unión a antígeno se conjugan con DM1, la célula tumoral puede ser una o más de las siguientes líneas celulares: líneas de células tumorales pancreáticas BxPC3, Capan-1, MiaPaca2, SW 1990, Panel; líneas de células tumorales pulmonares A549, Calu-3, Calu-6, NCI-H2126, NCI-H322; líneas de células tumorales de cabeza y cuello Detroit 562, SCC-15, SCC-25, FaDu; líneas de células tumorales colorrectales Colo201, DLD-1, HCT116, HT29, SNU-C2B; líneas de células tumorales gástricas SNU-1, SNU-16, NCI-N87; líneas celulares de tumores de mama SkBr3, MCF-7, MDA-MB-175, MDA-MB-361, MDA-MB-231, ZR-75-1, BT-20, BT549, BT-474, CAMA-1, MDA-MB-453, JIMT-1, T47D; líneas celulares de tumores uterinos SK-UT-1, TOV-112D; líneas celulares de tumores de piel A431, Malme-3M, SKEMEL28; líneas celulares de tumores cervicales Caski, MS751; línea celular de tumores de vejiga T24, línea celular de tumores renales ACHN; líneas celulares de tumores ováricos CaOV3, Ovar-3 y SKOV3.
- 55

También se describen en este documento métodos para tratar a un sujeto que tiene un tumor que expresa HER2 (HER2+), tal como un tumor de pulmón, cabeza y cuello o mama HER+2, mediante la administración de

- un constructo de unión a antígeno divulgado en este documento. En algunos aspectos, el volumen del tumor en el sujeto después de recibir al menos siete dosis del constructo de unión a antígeno es menor que el volumen del tumor de un sujeto de control que recibe una cantidad equivalente de trastuzumab. En algunos aspectos, la supervivencia del sujeto que recibe el constructo de unión a antígeno aumenta en comparación con un sujeto de control que recibe una cantidad equivalente de un anticuerpo de control no específico o en comparación con un sujeto de control que no recibe tratamiento.
- En algunos aspectos, el tumor es un tumor de pulmón, opcionalmente en donde el tumor es un tumor de pulmón de células no pequeñas no escamosas que es un gen amplificado bajo en HER2, sin HER2. En algunos aspectos, el tumor es HER3+. En algunos aspectos, el tumor tiene un nivel bajo de EGFR. En algunos aspectos, el tumor es moderadamente sensible al cisplatino en la MTD.
- En algunos aspectos, el tumor es un tumor de cabeza y cuello, opcionalmente en donde el tumor es un tumor de células escamosas de cabeza y cuello que es un gen amplificado bajo en HER2, sin HER2. En algunos aspectos, el tumor tiene HER3+ bajo. En algunos aspectos, el tumor es EGFR+. En algunos aspectos, el tumor es altamente sensible al cisplatino en la MTD.
- En algunos aspectos, el tumor es un tumor de mama, opcionalmente en donde el tumor es un cáncer de mama ER+/PR- con una clasificación molecular luminal B.
- De acuerdo con la invención reivindicada, al sujeto humano se le administran al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 dosis; y/o cada dosis se administra al menos cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 días.
- En algunos aspectos, la cantidad de al menos una de la pluralidad de dosis es al menos 0.3, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 mg/kg. En algunos aspectos, la cantidad de cada una de la pluralidad de dosis es al menos 0.3, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 mg/kg.
- En algunos aspectos, cada dosis se administra al menos diaria, semanal o mensualmente. En algunos aspectos, el tratamiento continúa durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o 31 días; al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 semanas; o al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 meses.
- En algunos aspectos, el volumen tumoral medio en el sujeto después de recibir al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 dosis es menor que el volumen tumoral medio de un sujeto de control que recibe una cantidad equivalente de trastuzumab.
- En algunos aspectos, la supervivencia general del sujeto aumenta significativamente en comparación con un sujeto de control que recibe una cantidad equivalente de un anticuerpo de control no específico o en comparación con un sujeto de control que no recibe tratamiento. En algunos aspectos, la significancia se mide mediante una prueba de intervalo logarítmico. En algunos aspectos, el valor p es menor que 0.5, 0.01 o 0.001.
- En algunos aspectos, la supervivencia general del sujeto aumenta significativamente más en comparación con un sujeto de control que recibe una cantidad equivalente de trastuzumab. En algunos aspectos, el valor p del constructo de unión a antígeno es menor que 0.001 y en donde el valor p de trastuzumab es mayor que 0.001.
- En algunos aspectos, el valor p de la significancia del aumento en relación con el sujeto de control que recibe una cantidad equivalente de un anticuerpo de control no específico es menor que el valor p de un aumento en la supervivencia de un segundo control que recibe una cantidad equivalente de trastuzumab en comparación con el sujeto de control que recibe una cantidad equivalente de un anticuerpo de control no específico. En algunos aspectos, el valor p del constructo de unión a antígeno es menor que 0.001 y en donde el valor p de trastuzumab es mayor que 0.001.
- En algunos aspectos, la supervivencia general del sujeto después de recibir una combinación del constructo de unión a antígeno y un agente adicional aumenta significativamente en comparación con un sujeto de control que recibe una cantidad equivalente de trastuzumab solo.
- En algunos aspectos, la supervivencia general del sujeto aumenta significativamente en comparación con un sujeto de control que recibe una cantidad menor de trastuzumab.
- Kits y artículos de fabricación - No reivindicados
- También se describen en este documento (pero no forman parte de la invención reivindicada) kits que comprenden uno o más constructos de unión a antígeno descritos en este documento. Los componentes individuales del kit se empaquetarían en recipientes separados y, asociado a dichos recipientes, puede haber un aviso en el formato prescrito por una agencia gubernamental que regule la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, aviso que refleja la aprobación por parte de la agencia de fabricación,

uso o venta. El kit puede contener opcionalmente instrucciones o indicaciones que describan el método de uso o el régimen de administración para el constructo de unión a antígeno.

Cuando uno o más componentes del kit se proporcionan como soluciones, por ejemplo, una solución acuosa o una solución acuosa estéril, el medio recipiente puede ser en sí mismo un inhalador, una jeringa, una pipeta, un gotero u otro aparato similar, desde el cual la solución puede administrarse a un sujeto o aplicarse y mezclarse con los otros componentes del kit.

Los componentes del kit también pueden proporcionarse en forma seca o liofilizada y el kit puede contener además un disolvente adecuado para la reconstitución de los componentes liofilizados. Independientemente del número o tipo de recipientes, los kits descritos en este documento también pueden comprender un instrumento para ayudar en la administración de la composición a un paciente. Dicho instrumento puede ser un inhalante, un dispositivo de atomización nasal, una jeringa, una pipeta, unas pinzas, una cuchara dosificadora, un gotero o un vehículo de administración similar aprobado desde el punto de vista médico.

En otro aspecto descrito en el presente documento, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo fabricado comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto sobre el recipiente o asociado con el mismo. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, bolsas de solución intravenosa, etc. Los recipientes pueden estar formados por una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que, por sí sola o combinada con otra composición, es eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tenga un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un constructo de unión a antígeno activador de células T descrito en este documento. La etiqueta o el prospecto indica que la composición se utiliza para tratar la enfermedad de elección. Además, el artículo fabricado puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en él, en donde la composición comprende un constructo de unión a antígeno descrito en este documento; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en él, en donde la composición comprende un agente citotóxico o terapéutico adicional. El artículo de fabricación en esta realización descrita en este documento puede comprender además un prospecto que indica que las composiciones se pueden usar para tratar una afección particular. Como alternativa, o adicionalmente, el artículo fabricado puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFJ), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluidos otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

#### Polipéptidos y polinucleótidos

Los constructos de unión a antígeno descritos en este documento comprenden al menos un polipéptido. También se describen polinucleótidos que codifican los polipéptidos descritos en este documento. Los constructos que se unen al antígeno normalmente están aislados.

Como se utiliza en este documento, "aislado" significa un agente (por ejemplo, un polipéptido o polinucleótido) que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno de cultivo celular natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que podrían interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos del constructo de unión a antígeno y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. Aislado también se refiere a un agente que ha sido producido sintéticamente, por ejemplo, mediante intervención humana.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en este documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Es decir, una descripción dirigida a un polipéptido se aplica igualmente a una descripción de un péptido y a una descripción de una proteína, y viceversa. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos de origen natural, así como a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son aminoácidos codificados de forma no natural. Tal como se utilizan en este documento, los términos abarcan cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, incluidas proteínas de longitud completa, en donde los residuos de aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos covalentes.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y no naturales, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos codificados naturalmente son los 20 aminoácidos comunes (alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina) y pirrolisina y selenocisteína. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural, es decir, un carbono unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, tal como homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metilsulfonio de metionina. Estos análogos tienen grupos R modificados (como la norleucina) o cadenas principales de péptidos modificados, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido natural. La referencia a un aminoácido incluye, por ejemplo, L-aminoácidos

proteogénicos de origen natural, D-aminoácidos, aminoácidos modificados químicamente tales como variantes y derivados de aminoácidos; aminoácidos no proteogénicos de origen natural tales como  $\beta$ -alanina, ornitina, etc.; y compuestos sintetizados químicamente que tienen propiedades conocidas en la técnica como características de los aminoácidos. Los ejemplos de aminoácidos que no se producen de forma natural incluyen, entre otros,  $\alpha$ -metil aminoácidos (por ejemplo,  $\alpha$ -metil-alanina), D-aminoácidos, aminoácidos similares a la histidina (por ejemplo, 2-amino-histidina,  $\beta$ -hidroxi-histidina, homohistidina), aminoácidos que tienen un metileno adicional en la cadena lateral (aminoácidos "homo") y aminoácidos en los que un grupo funcional de ácido carboxílico en la cadena lateral se reemplaza por un grupo de ácido sulfónico (por ejemplo, ácido cisteico). La incorporación de aminoácidos no naturales, incluidos aminoácidos sintéticos no nativos, aminoácidos sustituidos o uno o más D-aminoácidos en las proteínas de la presente invención puede ser ventajosa de varias maneras diferentes. Los péptidos que contienen D-aminoácidos, etc., exhiben una mayor estabilidad *in vitro* o *in vivo* en comparación con sus contrapartes que contienen L-aminoácidos. Por lo tanto, la construcción de péptidos, etc., que incorporen D-aminoácidos puede ser particularmente útil cuando se desea o requiere una mayor estabilidad intracelular. Más específicamente, los péptidos D, etc., son resistentes a las peptidasas y proteasas endógenas, lo que proporciona una biodisponibilidad mejorada de la molécula y vidas útiles prolongadas *in vivo* cuando tales propiedades son deseables. Además, los péptidos D, etc., no pueden procesarse de manera eficiente para la presentación restringida por el complejo mayor de histocompatibilidad clase II a las células T colaboradoras y, por lo tanto, es menos probable que induzcan respuestas inmunes humorales en todo el organismo.

Los aminoácidos pueden denominarse en el presente documento por sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB. Los nucleótidos también pueden denominarse por sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

También se incluyen en la invención polinucleótidos que codifican polipéptidos de los constructos de unión a antígeno. El término "polinucleótido" o "secuencia de nucleótidos" pretende indicar un tramo consecutivo de dos o más moléculas de nucleótidos. La secuencia de nucleótidos puede ser de origen genómico, ADNc, ARN, semisintético o sintético, o cualquier combinación de ellos.

El término "ácido nucleico" se refiere a desoxirribonucleótidos, desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma monocatenaria o bicatenaria. A menos que se limite específicamente, el término abarca los ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia y se metabolizan de una manera similar a los nucleótidos naturales. A menos que se limite específicamente lo contrario, el término también se refiere a análogos de oligonucleótidos, incluido PNA (ácido peptidonucleico), análogos de ADN utilizados en tecnología antisentido (fosforotioatos, fosforamidatos y similares). A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca implícitamente variantes modificadas de forma conservadora de la misma (incluidas, entre otras, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados se pueden lograr generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye con residuos de bases mixtas y/o desoxiinosina (Batzner et al., Nucleic Acid Res. 19: 5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260: 2605-2608 (1985); Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8: 91-98 (1994)).

"Variantes modificadas de forma conservadora" se aplica tanto a secuencias de aminoácidos como de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias de ácidos nucleicos particulares, "variantes modificadas de forma conservadora" se refiere a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, una gran cantidad de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína determinada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición donde una alanina está especificada por un codón, el codón puede alterarse a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Estas variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son un tipo de variaciones modificadas de forma conservadora. Cada secuencia de ácido nucleico presentada en el presente documento que codifica un polipéptido también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Un experto en la materia reconocerá que cada codón de un ácido nucleico (excepto AUG, que normalmente es el único codón para la metionina, y TGG, que normalmente es el único codón para el triptófano) puede modificarse para producir una molécula funcionalmente idéntica. En consecuencia, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

En cuanto a las secuencias de aminoácidos, un experto en la materia reconocerá que las sustituciones, eliminaciones o adiciones individuales a una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína que altera, agrega o elimina un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada de manera conservadora" donde la alteración da como resultado la eliminación de un aminoácido, la adición de un aminoácido o la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Los expertos en la materia conocen tablas de sustituciones conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Estas variantes modificadas de forma conservadora se

suman a, y no excluyen, las variantes polimórficas, los homólogos entre especies y los alelos descritos en este documento.

Los expertos en la materia conocen tablas de sustitución conservadora que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Los siguientes ocho grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W H Freeman & Co.; 2nd edition (December 1993)).

Los términos "idéntico" o "identidad" porcentual, en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales. Las secuencias son "sustancialmente idénticas" si tienen un porcentaje de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (es decir, aproximadamente 60 % de identidad, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 % o aproximadamente 95 % de identidad en una región específica), cuando se comparan y alinean para lograr la máxima correspondencia en una ventana de comparación o región designada, medida utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias (u otros algoritmos disponibles para personas con conocimientos ordinarios en la materia) o mediante alineación manual e inspección visual. Esta definición también se refiere al complemento de una secuencia de prueba. La identidad puede existir en una región que tenga al menos aproximadamente 50 aminoácidos o nucleótidos de longitud, o en una región que tenga 75-100 aminoácidos o nucleótidos de longitud, o, cuando no se especifica, en toda la secuencia de un polinucleótido o polipéptido. Un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención, incluyendo homólogos de especies distintas de la humana, se puede obtener mediante un proceso que comprende las etapas de examinar una biblioteca en condiciones de hibridación estrictas con una sonda marcada que tiene una secuencia de polinucleótidos descrita en este documento o un fragmento de la misma, y aislar ADNc de longitud completa y clones genómicos que contienen dicha secuencia de polinucleótidos. Estas técnicas de hibridación son bien conocidas por los expertos en la materia.

Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se ingresan en un ordenador, se designan las coordenadas de la subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencia. Se pueden utilizar parámetros de programa predeterminados o se pueden designar parámetros alternativos. Luego, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidades de secuencia para las secuencias de prueba en relación con la secuencia de referencia, de acuerdo con los parámetros del programa.

Una "ventana de comparación", como se utiliza en este documento, incluye una referencia a un segmento de cualquiera de las posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consiste en 20 a 600, habitualmente aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más habitualmente aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en las que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia de la misma cantidad de posiciones contiguas después de que las dos secuencias estén alineadas de manera óptima. Los expertos en la materia conocen métodos de alineación de secuencias para comparación. La alineación óptima de secuencias para comparación se puede realizar, entre otras cosas, mediante el algoritmo de homología local de Smith and Waterman (1970) *Adv. Appl. Math.* 2: 482c, mediante el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biology.* 48: 443, mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson and Lipman (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software genético de Wisconsin, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o mediante alineación manual e inspección visual (ver, por ejemplo, Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (suplemento de 1995)).

Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al. (1997) *Nuc. Acids Res.* 25: 3389-3402, y Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410, respectivamente. El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica, disponible en la World Wide Web en [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov). Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza como valores predeterminados una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza como valores predeterminados una longitud de palabra de 3, una expectativa (E) de 10 y las alineaciones de matriz de puntuación BLOSUM62 (ver Henikoff and Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915) (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas. El algoritmo BLAST normalmente se ejecuta con el filtro de "baja complejidad" desactivado.

El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5787). Una medida de similitud



proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña ( $P(N)$ ), que proporciona una indicación de la probabilidad con la que se produciría por casualidad una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es menor que aproximadamente 0.2, o menor que aproximadamente 0.01, o menor que aproximadamente 0.001.

La frase "se hibrida selectivamente (o específicamente) con" se refiere a la unión, duplicación o hibridación de una molécula solo con una secuencia de nucleótidos particular en condiciones de hibridación estrictas cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja (que incluye, entre otros, ADN o ARN celular total o de biblioteca).

La frase "condiciones de hibridación estrictas" se refiere a la hibridación de secuencias de ADN, ARN u otros ácidos nucleicos, o combinaciones de los mismos, en condiciones de baja fuerza iónica y alta temperatura como se conoce en la técnica. Normalmente, en condiciones estrictas, una sonda se hibridará con su subsecuencia objetivo en una mezcla compleja de ácido nucleico (que incluye, entre otros, ADN o ARN celular total o de biblioteca), pero no se hibridará con otras secuencias en la mezcla compleja. Las condiciones estrictas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Las secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas más altas. Una guía extensa sobre la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridization with Nucleic Probes*, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993).

Tal como se utilizan en el presente documento, se considera que los términos "modificación, modificado, que modifica" incluyen cualquier manipulación de la estructura principal del péptido o las modificaciones postraduccionales de un polipéptido natural o recombinante o de un fragmento del mismo. La modificación incluye modificaciones de la secuencia de aminoácidos, del patrón de glicosilación o del grupo de cadenas laterales de aminoácidos individuales, así como combinaciones de estos enfoques. Las proteínas modificadas se expresan y producen mediante técnicas estándar de biología molecular.

Por "molécula de ácido nucleico o polinucleótido aislado" se entiende una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que ha sido extraída de su entorno nativo. Por ejemplo, un polinucleótido recombinante que codifica un polipéptido contenido en un vector se considera aislado. Otros ejemplos de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en células huésped heterólogas o polinucleótidos purificados (parcial o sustancialmente) en solución. Un polinucleótido aislado incluye una molécula de polinucleótido contenida en células que normalmente contienen la molécula de polinucleótido, pero la molécula de polinucleótido está presente extracromosómicamente o en una ubicación cromosómica que es diferente de su ubicación cromosómica natural. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcripciones de ARN *in vivo* o *in vitro*, así como formas de cadena positiva y negativa y formas de doble cadena. Los polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados descritos en este documento incluyen además dichas moléculas producidas sintéticamente, por ejemplo, mediante PCR o síntesis química. Además, un polinucleótido o un ácido nucleico, en ciertas realizaciones, incluye un elemento regulador tal como un promotor, un sitio de unión de ribosoma o un terminador de transcripción.

El término "reacción en cadena de la polimerasa" o "PCR" generalmente se refiere a un método para la amplificación de una secuencia de nucleótidos deseada *in vitro*, como se describe, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos No. 4,683,195. En general, el método PCR implica ciclos repetidos de síntesis de extensión de cebadores, utilizando cebadores oligonucleotídicos capaces de hibridar preferentemente con un ácido nucleico plantilla.

Por un ácido nucleico o polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos al menos, por ejemplo, 95 % "idéntica" a una secuencia de nucleótidos de referencia de la presente invención, se pretende que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido sea idéntica a la secuencia de referencia excepto que la secuencia de polinucleótido puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tenga una secuencia de nucleótidos al menos 95 % idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta el 5 % de los nucleótidos en la secuencia de referencia se pueden eliminar o sustituir con otro nucleótido, o un número de nucleótidos de hasta el 5 % del total de nucleótidos en la secuencia de referencia se puede insertar en la secuencia de referencia. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden ocurrir en las posiciones terminales 5' o 3' de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier lugar entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre residuos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. En la práctica, si una secuencia de polinucleótidos particular es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de nucleótidos de la presente invención se puede determinar convencionalmente utilizando programas informáticos conocidos, tales como los analizados anteriormente para polipéptidos (por ejemplo, ALIGN-2).

Se dice que un derivado o una variante de un polipéptido comparte "homología" o es "homólogo" con el péptido si las secuencias de aminoácidos del derivado o la variante tienen al menos un 50 % de identidad con una

secuencia de 100 aminoácidos del péptido original. En ciertas realizaciones, el derivado o variante es al menos 75 % igual al del péptido o a un fragmento del péptido que tiene el mismo número de residuos de aminoácidos que el derivado. En ciertas realizaciones, el derivado o variante es al menos 85 % igual al del péptido o a un fragmento del péptido que tiene el mismo número de residuos de aminoácidos que el derivado. En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del derivado es al menos 90 % igual que el péptido o un fragmento del péptido que tiene el mismo número de residuos de aminoácidos que el derivado. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del derivado es al menos 95 % igual que el péptido o un fragmento del péptido que tiene el mismo número de residuos de aminoácidos que el derivado. En ciertas realizaciones, el derivado o variante es al menos 99 % igual al del péptido o a un fragmento del péptido que tiene el mismo número de residuos de aminoácidos que el derivado.

El término "modificado", como se utiliza en este documento, se refiere a cualquier cambio realizado en un polipéptido determinado, como cambios en la longitud del polipéptido, la secuencia de aminoácidos, la estructura química, la modificación cotraduccional o la modificación postraduccional de un polipéptido. El término de forma "(modificado)" significa que los polipéptidos en discusión están opcionalmente modificados, es decir, los polipéptidos en discusión pueden estar modificados o no modificados.

Las publicaciones analizadas en el presente documento se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada de lo expuesto en este documento debe interpretarse como una admisión de que los inventores no tienen derecho a anticipar dicha divulgación en virtud de una invención previa o por cualquier otra razón.

## Ejemplos

A continuación, se presentan ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen con fines ilustrativos. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero, por supuesto, se deben permitir algunos errores y desviaciones experimentales.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de química de proteínas, bioquímica, técnicas de ADN recombinante y farmacología, dentro de la habilidad de la técnica. Estas técnicas se explican detalladamente en la literatura. Véase, por ejemplo, T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., edición actual); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey and Sundberg *Advanced Organic Chemistry 3rd Ed.* (Plenum Press) Vols A and B(1992).

El constructo de unión a antígeno proporcionado para su uso de acuerdo con la invención se denomina en los Ejemplos siguientes como el constructo "v10000". Las referencias a otros constructos en los Ejemplos son para referencia e ilustración y no forman parte de la invención reivindicada.

### Ejemplo 1: Preparación de anticuerpos biespecíficos anti-HER2 ejemplares y controles

Se prepararon varios anticuerpos biparatópicos anti-HER2 ejemplares (o constructos de unión a antígeno) y controles como se describe a continuación. Los anticuerpos y controles se han preparado en diferentes formatos y en la Figura 1 se muestran formatos biparatópicos ejemplares. En todos los formatos que se muestran en la Figura 1, el Fc heterodimérico se muestra con una cadena (Cadena A) mostrada en negro y la otra (Cadena B) mostrada en gris, mientras que un dominio de unión a antígeno (1) se muestra en relleno rayado, mientras que el otro dominio de unión a antígeno (2) se muestra en blanco.

La Figura 1A muestra la estructura de un anticuerpo biparatópico en formato Fab-Fab. Las Figuras 1B a 1E muestran la estructura de posibles versiones de un anticuerpo biparatópico en formato scFv-Fab. En la Figura 1B, el dominio de unión a antígeno 1 es un scFv, fusionado a la Cadena A, mientras que el dominio de unión a antígeno 2 es un Fab, fusionado a la Cadena B. En la Figura 1C, el dominio de unión a antígeno 1 es un Fab, fusionado a la Cadena A, mientras que el dominio de unión a antígeno 2 es un scFv, fusionado a la Cadena B. En la Figura 1D, el dominio de unión a antígeno 2 es un Fab, fusionado a la Cadena A, mientras que el dominio de unión a antígeno 1 es un scFv, fusionado a la Cadena B. En la Figura 1E, el dominio de unión a antígeno 2 es un scFv, fusionado a la Cadena A, mientras que el dominio de unión a antígeno 1 es un Fab, fusionado a la Cadena B. En la Figura 1F, ambos dominios de unión a antígeno son scFv.

Las secuencias de las siguientes variantes se proporcionan en la Tabla de secuencias que se encuentra después de los Ejemplos. Las regiones CDR se identificaron utilizando una combinación de los métodos de Kabat y Chothia. Las regiones pueden variar ligeramente de acuerdo con el método utilizado para la identificación.

Anticuerpos biparatópicos anti-HER2 ejemplares

## ES 3 014 819 T3

Se prepararon anticuerpos biparatómicos anti-HER2 ejemplares como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1: Anticuerpos biparatómicos anti-HER2 ejemplares

Variante		Cadena A	Cadena B
5019	Dominio que contiene el epítipo	ECD2	ECD4
	Formato	Fab	scFv
	Nombre del anticuerpo	Pertuzumab	Trastuzumab
	Sustituciones de secuencia de CH3	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T366I_N390R_K392M_T394W
5020	Dominio que contiene el epítipo	ECD4	ECD2
	Formato	scFv	Fab
	Nombre del anticuerpo	Trastuzumab	Pertuzumab
	Sustituciones de secuencia de CH3	L351Y_S400E_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392L_T394W
7091	Dominio que contiene el epítipo	ECD2	ECD4
	Formato	Fab	scFv
	Nombre del anticuerpo	Pertuzumab	Trastuzumab
	Sustituciones de secuencia de CH3	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392L_T394W
10000	dominio que contiene el epítipo	ECD2	ECD4
	Formato	Fab	scFv
	Nombre del anticuerpo	Pertuzumab - con Y96A en la región de VL y T30A/A49G/L69F en la región de VH	Trastuzumab
	Sustituciones de secuencia de CH3	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392L_T394W
6902	Dominio que contiene el epítipo	ECD2	ECD4
	Formato	Fab	Fab
	Nombre del anticuerpo	Trastuzumab	Pertuzumab
	Sustituciones de Fab	HC: L143E_K145T LC: Q124R	HC: D146G_Q179K LC: Q124E_Q160E_T180E
	Sustituciones de secuencia de CH3	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392L_T394W
6903	Dominio que contiene el epítipo	ECD2	ECD4
	Formato	Fab	Fab

	Sustituciones de Fab	HC: L143E_K145T LC: Q124R_Q1160K_T178R	HC: D146G Q179K LC: Q124E_Q160E_T180E
	Nombre del anticuerpo	Trastuzumab	Pertuzumab
	Sustituciones de secuencia de CH3	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392L_T394W
6717	Dominio que contiene el epítipo	ECD4	ECD2
	Formato	scFv	scFv
	Nombre del anticuerpo	Pertuzumab	Trastuzumab
	Sustituciones de secuencia de CH3	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T366I_N390R_K392M_T394W
<p>Notas:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Numeración de CH3 de acuerdo con el índice de la UE como en Kabat en referencia a la numeración del anticuerpo de la UE (Edelman et al., 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63: 78-85);</li> <li>• Numeración de dominio Fab o variable de acuerdo con Kabat (Kabat and Wu, 1991; Kabat et al, Sequences of proteins of immunological interest. 5th Edition - Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, publicación del NIH n.º 91-3242, pág. 647 (1991))</li> <li>• "dominio que contiene el epítipo" = dominio de HER2 al que se une la fracción de unión a antígeno;</li> <li>• "Nombre del anticuerpo" = anticuerpo del cual se deriva la fracción de unión a antígeno, incluye sustituciones en comparación con el tipo silvestre cuando está presente;</li> <li>• "Sustituciones de Fab" = sustituciones en Fab que promueven el emparejamiento correcto de la cadena ligera;</li> <li>• "Sustituciones de secuencia de CH3" = sustituciones en el dominio de CH3 que promueven la formación de Fc heterodimérico</li> </ul>			

#### Anticuerpos de control monovalentes anti-HER2 ejemplares

- 5 v1040: un anticuerpo anti-HER2 monovalente, donde el dominio de unión de HER2 es un Fab derivado de trastuzumab en la cadena A, y la región de Fc es un heterodímero que tiene las mutaciones T350V\_L351Y\_F405A\_Y407V en la cadena A, T350V\_T366L\_K392L\_T394W en la cadena B, y la región bisagra de la cadena B que tiene la mutación C226S; el dominio de unión a antígeno se une al dominio 4 de HER2.
- 10 v630 - un anticuerpo anti-HER2 monovalente, donde el dominio de unión de HER2 es un scFv derivado de trastuzumab en la Cadena A, y la región de Fc es un heterodímero que tiene las mutaciones L351Y\_S400E\_F405A\_Y407V en la Cadena A, T366I\_N390R\_K392M\_T394W en la Cadena B; y la región bisagra tiene la mutación C226S (numeración de la UE) en ambas cadenas; el dominio de unión a antígeno se une al dominio 4 de HER2.
- 15 v4182: un anticuerpo anti-HER2 monovalente, donde el dominio de unión de HER2 es un Fab derivado de pertuzumab en la cadena A, y la región de Fc es un heterodímero que tiene las mutaciones T350V\_L351Y\_F405A\_Y407V en la cadena A, T350V\_T366L\_K392L\_T394W en la cadena B, y la región bisagra de la cadena B que tiene la mutación C226S; el dominio de unión a antígeno se une al dominio 2 de HER2.
- 20 Controles ejemplares de anticuerpos bivalentes monoespecíficos anti-HER2 (anticuerpos de tamaño completo, FSA)
- v506 es un anti HER2 de tipo silvestre producido internamente en células de ovario de hámster chino (CHO), como control. Ambos dominios de unión de HER2 se derivan de trastuzumab en el formato Fab y el Fc es un homodímero de tipo silvestre; el dominio de unión a antígeno se une al dominio 4 de HER2. Este anticuerpo también se conoce como análogo de trastuzumab.

v792, es trastuzumab de tipo silvestre con una bisagra de IgG1, donde ambos dominios de unión de HER2 se derivan de trastuzumab en el formato Fab, y la región de Fc es un heterodímero que tiene las mutaciones T350V\_L351Y\_F405A\_Y407V en la Cadena A, y T350V\_T366L\_K392L\_T394W en la Cadena B; el dominio de unión a antígeno se une al dominio 4 de HER2. Este anticuerpo también se conoce como análogo de trastuzumab.

v4184, un anticuerpo anti-HER2 bivalente, donde ambos dominios de unión a HER2 se derivan de pertuzumab en el formato Fab, y la región de Fc es un heterodímero que tiene las mutaciones T350V\_L351Y\_F405A\_Y407V en la Cadena A, y T350V\_T366L\_K392L\_T394W en la Cadena B. El dominio de unión a antígeno se une al dominio 2 de HER2. Este anticuerpo también se conoce como análogo de pertuzumab.

hIgG, es un control de anticuerpo policlonal no específico comercial (Jackson ImmunoResearch, # 009-000-003).

Estos anticuerpos y controles (distintos de la IgG humana) se clonaron y expresaron de la siguiente manera. Los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo se construyeron mediante síntesis genética utilizando codones optimizados para la expresión humana/mamífera. La secuencia Fab de Trastuzumab se generó a partir de un anticuerpo conocido que se une al dominio 4 de HER2/neu (Carter P. et al. (1992) Humanization of an anti p185 HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci* 89, 4285). Y el Fc era un isotipo IgG1. La secuencia de scFv se generó a partir de los dominios de VH y VL de Trastuzumab utilizando un enlazador de glicina-serina (Carter P. et al. (1992) Humanization of an anti p185 her2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci* 89, 4285). La secuencia Fab de Pertuzumab se generó a partir de un anticuerpo conocido que se une al dominio 2 de HER2/neu (Adams CW et al. (2006) Humanization of a recombinant monoclonal antibody to produce a therapeutic her dimerization inhibitor, Pertuzumab. *Cancer Immunol Immunother.* 2006; 55(6): 717-27).

Los productos génicos finales se subclonaron en el vector de expresión de mamíferos PTT5 (NRC-BRI, Canadá) y se expresaron en células CHO (Durocher, Y., Perret, S. y Kamen, A. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing CHO cells. *Nucleic acids research* 30, e9 (2002)).

Las células CHO se transfectaron en fase de crecimiento exponencial (1.5 a 2 millones de células/mL) con polietilenimina acuosa de 25 kDa (PEI, Polysciences) de 1 mg/mL en una relación PEI:ADN de 2.5:1. (Raymond C. et al. A simplified polyethylenimine-mediated transfection process for large-scale and high-throughput applications. *Methods.* 55(1): 44-51 (2011)). Para determinar el intervalo de concentración óptimo para la formación de heterodímeros, el ADN se transfectó en proporciones óptimas de ADN de la cadena pesada a (HC-A), cadena ligera (LC) y cadena pesada B (HC-B) que permiten la formación de heterodímeros (por ejemplo, proporciones HC-A/HC-B/LC = 30:30:40 (v5019). Las células transfectadas se recolectaron después de 5-6 días con el medio de cultivo recolectado después de la centrifugación a 4000 rpm y se clarificó utilizando un filtro de 0.45 µm.

El medio de cultivo clarificado se cargó en una columna de proteína A MabSelect SuRe (GE Healthcare) y se lavó con 10 volúmenes de columna de tampón PBS a pH 7.2. El anticuerpo se eluyó con 10 volúmenes de columna de tampón de citrato a pH 3.6 con las fracciones agrupadas que contenían el anticuerpo neutralizado con TRIS a pH 11.

El eluato del anticuerpo de proteína A se purificó aún más mediante filtración en gel (SEC). Para la filtración en gel, se concentraron 3.5 mg de la mezcla de anticuerpos hasta 1.5 mL y se cargaron en una columna Sephadex 200 HiLoad 16/600 200 pg (GE Healthcare) a través de un FPLC AKTA Express a un caudal de 1 mL/min. Se utilizó un tampón de PBS a pH 7.4 a un caudal de 1 mL/min. Se recogieron fracciones correspondientes al anticuerpo purificado y se concentraron hasta ~1 mg/mL.

Se clonaron, expresaron y purificaron anticuerpos anti-HER2 biparatópicos ECD2 x ECD4 ejemplares con diferentes formatos moleculares (por ejemplo, v6717, IgG1 scFv-scFv; IgG1 Fab-Fab v6903 y v6902 ; IgG1 Fab-scFv v5019, v7091 y v10000) como se describió anteriormente.

Para cuantificar la pureza del anticuerpo y determinar la cantidad de proteína heterodimérica objetivo y posible homodímero y/o medio anticuerpo y/o contaminante de cadena ligera mal apareada, se realizó un análisis de masa intacta LC-MS. El análisis de masa intacta LC-MS se realizó como se describe en el Ejemplo 2, excluyendo los cálculos de análisis DAR utilizados para las moléculas de ADC.

Los datos se muestran en la Tabla 2. La Tabla 2 muestra que la expresión y purificación de estos anticuerpos biparatópicos dieron como resultado el 100 % del producto deseado para v6717, el 91 % del producto heterodimérico deseado para v6903 y el 62 % del producto deseado para v6902. Los números entre paréntesis indican las cantidades del pico principal más un pico lateral de +81 Da. Este pico lateral generalmente se detecta con variantes que contienen etiquetas HA C-terminales (como v6903 y v6902). La suma de los picos principales y laterales produce purezas de heterodímero de aproximadamente el 98 % y el 67 % para v6903 y v6903. Basándose en la alta pureza del heterodímero, se identificó v6903 como la variante biparatópica Fab-

Fab anti-HER2 representativa para la comparación directa con los formatos scFv-scFv y Fab-scFv. v6903 se incluyó en todos los ensayos de comparación de formatos.

Tabla 2: Expresión y purificación de anticuerpos.

Variante	Especie de heterodímero deseada (+pico lateral)
6717	100.0
6903	90.9 (97.7)
6902	62.4 (67.4)

5 **Ejemplo 2:** Preparación de conjugados de fármaco anticuerpo (ADC) biparatópico anti-HER2 ejemplares

Se prepararon los siguientes conjugados de fármacos de anticuerpos anti-HER2 biparatópicos (ADC biparatópicos anti-HER2). Se prepararon ADC de las variantes 5019, 7091, 10000 y 506. Estos ADC se identifican de la siguiente manera:

v6363 (v5019 conjugado con DM1)

10 v7148 (v7091 conjugado con DM1)

v10553 (v10000 conjugado con DM1)

v6246 (v506 conjugado con DM1, análogo a T-DM1, trastuzumab-emtansina)

v6249 (IgG humana conjugada con DM1)

15 Los ADC se prepararon mediante acoplamiento directo a maitansina. Los anticuerpos purificados por proteína A y SEC, como se describe en el Ejemplo 1 (>95 % de pureza), se utilizaron en la preparación de las moléculas de ADC. Los ADC se conjugaron siguiendo el método descrito en Kovtun YV, Audette CA, Ye Y, et al. Antibody-drug conjugates designed to eradicate tumors with homogeneous and heterogeneous expression of the target antigen. Cancer Res 2006; 66: 3214-21. Los ADC tenían una relación molar promedio de 3.0 moléculas de maitansinoide por anticuerpo, de acuerdo con lo determinado por LC/MS y descrito a continuación.

20 Los detalles de los reactivos utilizados en la reacción de conjugación de ADC son los siguientes: Tampón de conjugación 1: 50 mM de fosfato de potasio/50 mM de cloruro de sodio, pH 6.5, 2 mM de EDTA. Tampón de conjugación 2: 50 mM de succinato de sodio, pH 5.0. Tampón de formulación de ADC: 20 mM de succinato de sodio, 6 % (p/v) de trehalosa, 0.02 % de polisorbato 20, pH 5.0. Dimetilacetamida (DMA); 10 mM de SMCC en DMA (preparado antes de la conjugación), 10 mM de DM1-SH en DMA (preparado antes de la conjugación), 1 mM de DTNB en PBS, 1 mM de cisteína en tampón, 20 mM de succinato de sodio, pH 5.0. Espectrofotómetro UV-VIS (Nano drop 100 de Fisher Scientific), columnas PD-10 (GE Healthcare).

30 Los ADC se prepararon de la siguiente manera. La solución de anticuerpo de partida se cargó en la columna PD-10, previamente equilibrada con 25 mL de tampón de conjugación 1, seguido de 0.5 mL de tampón de conjugación 1. Se recogió el eluato de anticuerpos y se midió la concentración a  $A_{280}$  y la concentración se ajustó a 20 mg/mL. Se preparó la solución 10 mM de SMCC-DM1 en DMA. Se añadió un equivalente de 7.5 molar de SMCC-DM1 al anticuerpo a la solución de anticuerpo y se añadió DMA hasta un volumen final de DMA del 10 % v/v. La reacción se mezcló brevemente y se incubó a temperatura ambiente durante 2 h. Se equilibró una segunda columna PD-10 con 25 mL de tampón de conjugación 1 y se añadió la solución de anticuerpo-MCC-DM1 a la columna seguida de 0.5 mL de tampón 1. Se recogió el eluato de anticuerpo-MCC-DM1 y se midió  $A_{252}$  y  $A_{280}$  de la solución de anticuerpos. Se calculó la concentración del anticuerpo-MCC-DM1 ( $\square = 1.45 \text{ mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , o  $217500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Los ADC se analizaron en una columna SEC-HPLC para análisis de alto peso molecular (columna TOSOH de SEC-HPLC, G3000-SWXL, 7.8 mm x 30 cm, tampón, 100 mM de fosfato de sodio, 300 mM de cloruro de sodio, pH 7.0, caudal: 1 mL/minuto).

40 La relación fármaco-anticuerpo (DAR) del ADC se analizó mediante HIC-HPLC utilizando la columna Tosoh TSK gel Butil-NPR (4.6 mm x 3.5 mm x 2.5 mm). La elución se realizó a 1 mL/min utilizando un gradiente de 10-90 % de tampón B durante 25 min seguido de 100 % de tampón B durante 4 min. El tampón A comprende 20 mM de fosfato de sodio, 1.5 M de sulfato de amonio, pH 7.0. El tampón B comprende 20 mM de fosfato de sodio, 25 % v/v de isopropanol, pH 7.0.

45 La relación fármaco-anticuerpo (DAR) del ADC se determinó mediante LC-MS mediante el siguiente método. Los anticuerpos se desglucosilaron con PNGasa F antes de cargarlos en el LC-MS. La cromatografía líquida se llevó a cabo en un HPLC Agilent Serie 1100 en las siguientes condiciones:

Caudal: Columna posterior dividida de 1 mL/min a 100  $\mu$ L/min para MS. Disolventes: A = 0.1 % de ácido fórmico en ddH<sub>2</sub>O, B = 65 % de acetonitrilo, 25 % de THF, 9.9 % de ddH<sub>2</sub>O, 0.1 % de ácido fórmico. Columna: 2.1  $\times$  30 mm PorosR2. Temperatura de la columna: 80  $^{\circ}$ C; disolvente también precalentado. Gradiente: 20 % de B (0-3 min), 20-90 % de B (3-6 min), 90-20 % de B (6-7 min), 20 % de B (7-9 min).

- 5 Posteriormente se realizó espectrometría de masas (MS) en un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap XL en las siguientes condiciones: Método de ionización mediante electroaspersión Ion Max. Método de calibración y ajuste: se infunde una solución de 2 mg/mL de Csl a un caudal de 10  $\mu$ L/min. El Orbitrap se ajustó en m/z 2211 utilizando la función de ajuste automático (intervalo general de iones Csl observado: 1690 a 2800). Voltaje del cono: 40 V; lente del tubo: 115 V; resolución de FT: 7,500; rango de escaneo m/z 400-4000; retardo de escaneo: 1.5 min. Se generó un perfil de peso molecular de los datos utilizando el software de deconvolución Promass de Thermo. La DAR promedio de la muestra se determinó como una función de la DAR observada en cada pico fraccional (utilizando el cálculo:  $\Sigma$  (DAR  $\times$  intensidad de pico fraccional)).

La Tabla 3 resume la DAR promedio para las moléculas de ADC. La DAR promedio para el anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar y el control fue de aproximadamente 3.

15 Tabla 3: DAR promedio para ADC

	DAR (LC-MS)	DAR (HIC)	n
v6246	2.9	3.0	5
v6363	2.6	3.3	5
v7148	3.4	3.9	1
v10553	4.0	4.0	1

### Ejemplo 3: Expresión y purificación a escala de laboratorio del anticuerpo biparatópico anti-HER2

- 20 Los anticuerpos anti-HER2 biparatópicos (v5019, v7091 y v10000) descritos en el Ejemplo 1 se expresaron en volúmenes de 10 y/o 25 L y se purificaron mediante proteína A y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) de la siguiente manera.

El medio de cultivo clarificado se cargó en una columna de proteína A MabSelect SuRe (GE Healthcare) y se lavó con 10 volúmenes de columna de tampón PBS a pH 7.2. El anticuerpo se eluyó con 10 volúmenes de columna de tampón de citrato a pH 3.6 y las fracciones agrupadas que contenían el anticuerpo se neutralizaron con Tris a pH 11.

- 25 El eluato del anticuerpo de proteína A se purificó aún más mediante filtración en gel (SEC). Para la filtración en gel, se concentraron 3.5 mg de la mezcla de anticuerpos a 1.5 mL y se cargaron en una columna Sephadex 200 HiLoad 16/600 200 pg (GE Healthcare) a través de un FPLC AKTA Express a un caudal de 1 mL/min. Se utilizó un tampón de PBS a pH 7.4 a un caudal de 1 mL/min. Se recogieron fracciones correspondientes al anticuerpo purificado y se concentraron a  $\sim$ 1 mg/mL. Las proteínas purificadas se analizaron mediante LC-MS como se describe en el Ejemplo 2.

- 35 Los resultados de la expresión de 10 L y la purificación con proteína A y SEC a escala de laboratorio se muestran en las Figuras 2A y 2B. La Figura 2A muestra la cromatografía SEC del v5019 purificado con proteína A y la Figura 2B muestra el gel SDS-PAGE no reductor que compara la pureza relativa de una fracción agrupada de proteína A, así como las fracciones SEC 15 y 19 y las fracciones SEC agrupadas 16-18. Estos resultados muestran que se expresó el anticuerpo biparatópico anti-HER2 y que la purificación mediante proteína A y SEC produjo una muestra de proteína pura. Se realizó una cuantificación adicional mediante análisis UPLC-SEC y LC-MS y se describe en el Ejemplo 4.

- 40 Los resultados de la expresión de 25 L y la purificación de la proteína A a escala de laboratorio se muestran en la Figura 2C. La Figura 2C muestra un gel SDS-PAGE que compara la pureza relativa de v10000 purificado con proteína A. El carril M contiene: marcador de proteína; el carril 1 contiene: v10000 en condiciones reductoras; el carril 2 contiene v10000 en condiciones no reductoras. El gel SDS-PAGE muestra que v10000 es puro y se mueve al peso molecular predicho correcto de aproximadamente 125 kDa en condiciones no reductoras. En condiciones reductoras, son visibles dos bandas de cadenas pesadas correspondientes a la cadena pesada CH-A (aproximadamente 49 kDa) y la cadena pesada CH-B (aproximadamente 52.5 kDa); la cadena ligera CH-A es visible y se mueve a la masa predicha correcta de aproximadamente 23.5 kDa. Estos resultados muestran que se expresó el anticuerpo biparatópico anti-HER2 y que la purificación en una sola etapa con proteína A produjo una muestra de proteína pura. Se realizó una cuantificación adicional mediante análisis por UPLC-SEC y LC-MS y se describe en el Ejemplo 4.

**Ejemplo 4:** Análisis de la pureza del anticuerpo anti-HER2 biparatópico mediante UPLC-SEC y LC-MS

La pureza y el porcentaje de agregación de la proteína A ejemplar y de los heteromultímeros anti-HER2 biparatópicos purificados por SEC se determinaron mediante UPLC-SEC mediante el método descrito.

El análisis por UPLC-SEC se realizó utilizando una columna Waters BEH200 SEC ajustada a 30 °C (2.5 mL, 4.6 × 150 mm, acero inoxidable, partículas de 1.7 µm) a 0.4 mL/min. Los tiempos de proceso consistieron en 7 minutos y un volumen total por inyección de 2.8 mL con tampones de proceso de 25 mM de fosfato de sodio, 150 mM de acetato de sodio, pH 7.1; y 150 mM de fosfato de sodio, pH 6.4-7.1. La detección por absorbancia se facilitó a 190-400 nm y por fluorescencia con excitación a 280 nm y emisión recogida de 300-360 nm. La integración de picos se analizó mediante el software Empower 3.

Los resultados de UPLC-SEC de las fracciones SEC v5019 agrupadas se muestran en la Figura 3A. Estos resultados indican que el anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar se purificó hasta una pureza >99 % con menos de 1 % de especies de alto peso molecular mediante cromatografía con proteína A y SEC.

Los resultados de UPLC-SEC de las fracciones de v10000 agrupadas con proteína A se muestran en la Figura 3B. Estos resultados indican que el anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar se purificó hasta una pureza de >96 % con menos de 1 % de especies de alto peso molecular mediante cromatografía con proteína A.

La pureza de los anticuerpos anti-HER2 biparatópicos ejemplares se determinó utilizando LC-MS en condiciones estándar mediante el método descrito en el Ejemplo 2. Los resultados del análisis por LC-MS de las fracciones SEC agrupadas de v5019 se muestran en la Figura 4A. Estos datos muestran que el heterodímero anti-HER2 biparatópico ejemplar tiene una pureza de heterodímero del 100 %. Los resultados del análisis por LC-MS de las fracciones de v10000 agrupadas con proteína A se muestran en la Figura 4B. Estos datos muestran que el heterodímero anti-HER2 biparatópico ejemplar tiene una pureza de heterodímero del 98 % después de una purificación con proteína A en una sola etapa.

Se utilizaron anticuerpos purificados por cromatografía con proteína A y/o proteína A y SEC para los ensayos descritos en los siguientes Ejemplos.

**Ejemplo 5.** Evaluación de la expresión y la capacidad de fabricación a gran escala del anticuerpo anti-HER2 biparatópico purificado mediante cromatografía ECX con proteína A.

El anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar v5019 descrito en el Ejemplo 1 se expresó en una escala de 25 L y se purificó de la siguiente manera.

El anticuerpo se obtuvo del sobrenadante seguido de un método de purificación de dos etapas que consistió en la purificación con proteína A (resina MabSelect™; GE Healthcare) seguido de cromatografía de intercambio catiónico (resina HiTrap™ SP FF; GE Healthcare) de acuerdo con el protocolo descrito.

Las células CHO-3E7 se mantuvieron en medio de expresión Freestyle CHO sin suero (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) en matraces Erlenmeyer a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> (Corning Inc., Acton, MA) en un agitador orbital (VWR Scientific, Chester, PA). Dos días antes de la transfección, las células se sembraron a una densidad adecuada en un CellBag de 50 L con un volumen de 25 L utilizando el sistema Wave Bioreactor 20/50 (GE Healthcare Bio-Science Corp). El día de la transfección, el ADN y el PEI (Polysciences, Eppelheim, Alemania) se mezclaron en una proporción óptima y se agregaron a las células utilizando el método descrito en el Ejemplo 1. Los sobrenadantes celulares recolectados el día 6 se utilizaron para una purificación adicional.

El caldo de cultivo celular se centrifugó y se filtró antes de cargarlo en 30 mL de resina MabSelect™ empacada en XK26/20 (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) a razón de 10.0 mL/min. Después del lavado y la elución con el tampón apropiado, las fracciones se recogieron y se neutralizaron con 1 M de Tris-HCl, pH 9.0. La proteína objetivo se purificó aún más a través de 20 mL de resina SP FF empacada en XK16/20 (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). La muestra purificada por MabSelect™ se diluyó con 20 mM de NaAC, pH 5.5 para ajustar la conductividad a < 5 ms/cm y se añadió 50 mM de citrato ácido (pH 3.0) para ajustar el valor de pH de la muestra a 5.5. La muestra se cargó a 1 mL/min en la resina HiTrap™ SP FF (GE Healthcare) y se lavó con 20 mM de NaAC. La proteína se eluyó utilizando un gradiente de elución de 0-100 % de 20 mM de NaAC, 1 M de NaCl, pH 5.5, 10 CV a razón de 1 mL/min.

La proteína purificada se analizó mediante SDS-PAGE como se describe en el Ejemplo 1, y LC-MS para la pureza del heterodímero mediante el método descrito en el ejemplo 4. Los resultados se muestran en las Figuras 5A y 5B. La Figura 5A muestra los resultados de SDS-PAGE de v5019 después de purificación por MabSelect™ y HiTrap™ SP FF; el carril M contiene: marcador de proteína; carril 1: v5019 en condiciones reductoras (3 µg); carril 2: v5019 en condiciones no reductoras (2.5 µg). El gel SDS-PAGE muestra que v5019 es relativamente puro después de purificación por MabSelect™ y HiTrap™ SP FF y, en condiciones no reductoras, se mueve al peso molecular previsto correcto de aproximadamente 125 kDa. En condiciones reductoras, son visibles dos bandas de cadenas pesadas correspondientes a la cadena pesada CH-A



(aproximadamente 49 kDa) y la cadena pesada CH-B (aproximadamente 52.5 kDa); la cadena ligera CH-A es visible y se mueve a la masa predicha correcta de aproximadamente 23.5 kDa.

- 5 El análisis por LC-MS de v5019 predicho purificado por MabSelect™ y HiTrap™ SP FF se realizó para determinar la pureza del heterodímero utilizando el método descrito en el Ejemplo 4. Los resultados del análisis por LC-MS se muestran en la Figura 5B. Estos resultados muestran que la purificación de v5019 utilizando MabSelect™ y HiTrap™ SP FF produce proteínas con una pureza de heterodímero > 99 % y con poca (<1 %) o indetectable contaminación de homodímero o mitad de anticuerpo.

**Ejemplo 6:** Comparación de B<sub>máx</sub> de un anticuerpo anti-HER2 biparatópico contra B<sub>máx</sub> de controles en líneas celulares que expresan niveles bajos a altos de HER2

- 10 El siguiente experimento se realizó para medir la capacidad de un anticuerpo anti-HER2 biparatópico ejemplar para unirse a células que expresan niveles variables de HER2 en comparación con los controles. Las líneas celulares utilizadas fueron SKOV3 (HER2 2+/3+), JIMT-1 (HER2 2+), MDA-MB-231 (HER2 0/1+) y MCF7 (HER2 1+). Los anticuerpos anti-HER2 biparatópicos probados incluyen v5019, v7091 y v10000. La capacidad de los anticuerpos anti-HER2 biparatópicos para unirse a las células que expresan HER2 (HER2+) se determinó como se describe a continuación, con medición específica de B<sub>máx</sub> y K<sub>D</sub> aparente (constante de disociación de equilibrio).

- 20 La unión de los anticuerpos de prueba a la superficie de las células HER2+ se determinó mediante citometría de flujo. Las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en DMEM a razón de 1×10<sup>5</sup> células/100 µL. Se agregaron 100 µL de suspensión celular a cada tubo de microcentrifuga, seguido de 10 µL/tubo de las variantes de anticuerpos. Los tubos se incubaron durante 2 horas a 4 °C en un rotador. Los tubos de microcentrifuga se centrifugaron durante 2 minutos a 2000 RPM a temperatura ambiente y los sedimentos celulares se lavaron con 500 µL de medio. Cada sedimento celular se resuspendió en 100 µL de anticuerpo secundario marcado con fluorocromo diluido en medio a razón de 2 µg/muestra. Luego las muestras se incubaron durante 1 hora a 4 °C en un rotador. Después de la incubación, las células se centrifugaron durante 2 minutos a 2000 rpm y se lavaron en medio. Las células se resuspendieron en 500 µL de medio, se filtraron en un tubo que contenía 5 µL de yoduro de propidio (PI) y se analizaron en un citómetro de flujo BD LSR II de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se evaluaron la K<sub>D</sub> del anticuerpo heterodímero anti-HER2 biparatópico ejemplar y los anticuerpos de control mediante FACS con análisis de datos y ajuste de curvas realizados en GraphPad Prism.

- 30 Los resultados se muestran en las Figuras 6A-6G. Estos resultados demuestran que los anticuerpos biparatópicos anti-HER2 ejemplares (v5019, v7091 y v10000) pueden unirse a las células HER2+ con un B<sub>máx</sub> aproximadamente 1.5 veces mayor en comparación con un FSA anti-HER2 (v506). Los resultados de las Figuras 6A-6G también muestran que los anticuerpos anti-HER2 biparatópicos (v5019, v7091 y v10000) pueden unirse a las células HER2+ con un B<sub>máx</sub> similar en comparación con una combinación de dos FSA anti-HER2 (v506 + v4184).

- 35 Los resultados de la unión de las células SKOV3 HER2+ (HER2 2/3+) se muestran en las Figuras 6A, 6E y la Tabla 4 y la Tabla 5. Los resultados de la Figura 6A y la Tabla 4 muestran que el anticuerpo anti-HER2 biparatópico ejemplar (v5019) muestra un B<sub>máx</sub> aproximadamente 1.5 veces mayor en la unión a las células SKOV3 en comparación con dos FSA anti-HER2 diferentes (v506 o v4184). Los resultados también muestran que el anticuerpo anti-HER2 biparatópico ejemplar (v5019) muestra B<sub>máx</sub> equivalente en comparación con la combinación de dos FSA anti-HER2 (v506 + v4184). La K<sub>D</sub> aparente de v5019 para unirse a SKOV3 fue aproximadamente 2 a 4 veces mayor en comparación con FSA anti-HER2 solo (v506 o v4184) o la combinación de dos FSA anti-HER2 (v506 + v4184).

Tabla 4: Unión a células SKOV3

Variante de anticuerpo	K <sub>D</sub> (nM)	B <sub>máx</sub>
v506	2.713	29190
v4184	4.108	29204
v5019	8.084	47401
v506 + v4184	4.414	49062

- 45 Los resultados de la Figura 6E y la Tabla 5 muestran que los anticuerpos anti-HER2 biparatópicos ejemplares (v5019, 7091 y v10000) muestran un B<sub>máx</sub> aproximadamente 1.5 a 1.6 veces mayor en la unión a las células SKOV3 en comparación con dos FSA anti-HER2 diferentes (v506 o v4184). Los resultados también muestran que los anticuerpos anti-HER2 biparatópicos ejemplares (v5019, 7091 y v10000) muestran B<sub>máx</sub> equivalente en comparación con la combinación de dos FSA anti-HER2 (v506 + v4184). La K<sub>D</sub> aparente de v5019, v7091,

v10000 y la combinación de dos FSA anti-HER2 (v506 + v4184) para la unión a SKOV3 fue aproximadamente de 2 a 3 veces mayor en comparación con cualquiera de los FSA anti-HER2 solos (v506 o v4184).

Tabla 5: Unión a SKOV3

Variante de anticuerpo	K <sub>D</sub> (nM)	B <sub>máx</sub>
v506	4.8	30007
v4184	5.6	27628
v506 + v4184	10.0	49014
v5019	13.6	47693
V7091	14.5	44737
V10000	10.3	48054

- 5 Las curvas de unión en la línea celular JIMT-1 (HER2 2+) se muestran en la Figura 6B y la Tabla 6. Estos resultados muestran que el anticuerpo anti-HER2 biparatópico ejemplar (v5019) muestra un B<sub>máx</sub> aproximadamente 1.5 veces mayor en la unión a las células JIMT-1 en comparación con un FSA anti-HER2 (v506). Los resultados también muestran que el anticuerpo anti-HER2 biparatópico ejemplar (v5019) muestra B<sub>máx</sub> equivalente en comparación con la combinación de dos FSA anti-HER2 (v506 + v4184). La K<sub>D</sub> aparente de v5019 para unión a JIMT-1 fue aproximadamente 2 veces mayor en comparación con el FSA anti-HER2 (v506), y fue similar (aproximadamente 1.2 veces mayor) en comparación con la combinación de dos FSA anti-HER2 (v506 + v4184).

Tabla 6: Unión a células JIMT-1

Variante de anticuerpo	K <sub>D</sub> (nM)	B <sub>máx</sub>
v506	1.875	4905
V5019	4.317	7203
v506 + v4184	5.057	7200

- 15 Las curvas de unión en la línea celular MCF7 (HER2 1+) se muestran en la Figura 6C, 6F y las Tablas 7 y 8. Estos resultados muestran que los anticuerpos anti-HER2 biparatópicos ejemplares (v5019, 7091 y v10000) muestran un B<sub>máx</sub> aproximadamente 1.5 veces mayor en la unión a las células MCF7 en comparación con los FSA anti-HER2 (v506). Los resultados de la Figura 6C también muestran que el anticuerpo anti-HER2 biparatópico ejemplar (v5019) muestra un B<sub>máx</sub> equivalente en comparación con la combinación de dos FSA anti-HER2 (v506 + v4184). La K<sub>D</sub> aparente de v5019 para unión a MCF7 fue similar a la del FSA anti-HER2 (v506) y a la combinación de dos FSA anti-HER2 (v506 + v4184).

Tabla 7: Unión a células MCF7

Variante de anticuerpo	K <sub>D</sub> (nM)	B <sub>máx</sub>
v506	1.301	542
V5019	1.506	872
v506 + v4184	2.095	903

- 25 Los resultados de la Figura 6F y la Tabla 8 muestran que los anticuerpos anti-HER2 biparatópicos ejemplares (v5019, v7091 y v10000) muestran un B<sub>máx</sub> aproximadamente 1.6 a 1.7 veces mayor en comparación con el FSA monoespecífico v506. La K<sub>D</sub> aparente de v5019, v7091 y v10000 fue similar al FSA anti-HER2 (v506).

Tabla 8: Unión a células MCF7

Variante de anticuerpo	K <sub>D</sub> (nM)	B <sub>máx</sub>
------------------------	---------------------	------------------

v506	3.5	571
V5019	5.6	968
V7091	6.5	918
V10000	3.7	915

Las curvas de unión en la línea celular MDA-MB-231 (HER2 0/1+) se muestran en la Figura 6D y la Tabla 9. Estos resultados muestran que el anticuerpo anti-HER2 biparatópico ejemplar (v5019) muestra un B<sub>máx</sub> aproximadamente 1.5 veces mayor en la unión a las células MDA-MB-231 en comparación con un FSA anti-HER2 (v506). Los resultados también muestran que el anticuerpo anti-HER2 biparatópico ejemplar (v5019) muestra B<sub>máx</sub> equivalente en comparación con la combinación de dos FSA anti-HER2 (v506 + v4184). La K<sub>D</sub> aparente de v5019 para unión a MDA-MB-231 fue aproximadamente 2.4 veces menor en comparación con el FSA anti-HER2 (v506) y fue aproximadamente 1.7 veces mayor en comparación con la combinación de dos FSA anti-HER2 (v506 + v4184).

Tabla 9: Unión a células MDA-MB-231

Variante de anticuerpo	K <sub>D</sub> (nM)	B <sub>máx</sub>
v506	8.364	0.9521
V5019	3.543	1.411
v506 + v4184	2.040	1.542

Las curvas de unión en la línea celular de fibroblastos pulmonares WI-38 se muestran en la Figura 6G y la Tabla 10. La línea celular WI-38 es un epitelio pulmonar normal que expresa niveles basales (HER2 0+, ~10,000 receptores/célula) de HER2 (Carter et al. 1992, PNAS, 89:4285-4289; Yarden 2000, HER2: Basic Research, Prognosis and Therapy). Estos resultados muestran que los anticuerpos anti-HER2 biparatópicos ejemplares (v5019, v7091, v10000) muestran una decoración de superficie celular equivalente (B<sub>máx</sub>) en la unión a células WI-38 en comparación con los FSA anti-HER2 (v506); sin embargo, tenga en cuenta que la unión para v506 no pareció alcanzar la saturación y, por lo tanto, no se pudo determinar la K<sub>D</sub>. La K<sub>D</sub> aparente entre los anticuerpos anti-HER2 biparatópicos ejemplares fue equivalente.

Tabla 10: Unión a células WI-38

Variante de anticuerpos	K <sub>D</sub> (nM)	B <sub>máx.</sub>
v506	No determinada	~366
v5019	7.0	380
v7091	8.3	371
v10000	8.4	418

Estos resultados muestran que un anticuerpo anti-HER2 biparatópico ejemplar puede unirse a células tumorales HER2 1+, 2+ y 3+ a niveles que son aproximadamente 1.5 a 1.6 veces mayores que un FSA monoespecífico anti-HER2, y que los anticuerpos anti-HER2 biparatópicos ejemplares pueden unirse a células tumorales HER2 1+, 2+ y 3+ a niveles equivalentes en comparación con la combinación de dos FSA anti-HER2 monoespecíficos únicos con diferentes especificidades de epítipo. Estos resultados también muestran que los anticuerpos anti-HER2 biparatópicos no muestran una mayor unión (es decir, en comparación con el anticuerpo anti-HER2 monoespecífico, v506) a las células que expresan HER2 basal que expresan aproximadamente 10,000 receptores HER2/célula o menos, y que un umbral para una mayor unión de la superficie celular a los anticuerpos anti-HER2 biparatópicos ocurre cuando el nivel del receptor HER2 es aproximadamente >10,000 receptores/célula. Con base en estos datos, sería de esperar que los anticuerpos anti-HER2 biparatópicos ejemplares hubieran aumentado la unión de la superficie celular a las células tumorales HER2 3+, 2+ y 1+, pero no hubieran aumentado la unión de la superficie celular a las células no tumorales que expresan niveles basales del receptor HER2 en aproximadamente 10,000 receptores o menos.

**Ejemplo 7:** Capacidad del anticuerpo anti-HER2 biparatópico para inhibir el crecimiento de células HER2+

Se midió la capacidad de un anticuerpo anti-HER2 biparatópico ejemplar para inhibir el crecimiento de células que expresan HER2 en el nivel 3+ y 2+. El experimento se llevó a cabo en las líneas celulares HER2 3+ BT-474, SKBr3, SKOV3 y JIMT-1 HER2 2+. Se probaron los anticuerpos anti-HER2 biparatópicos v5019, v7091 y v10000. La capacidad de los anticuerpos anti-HER2 biparatópicos para inhibir el crecimiento de las células BT-474 (200 nM de anticuerpo); células SKOV3, SKBr3 y JIMT-1 (300 nM de anticuerpo) se midió como se describe a continuación.

Los anticuerpos de prueba se diluyeron en medio y se agregaron a las células a razón de 10 µL/pocillo por triplicado. Las placas se incubaron durante 3 días a 37 °C. La viabilidad celular se midió utilizando AlamarBlue™ (Biosource # dal1 100) o CellTiter-Glo® y lectura de absorbancia de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los datos se normalizaron respecto al control no tratado y el análisis se realizó en GraphPad Prism.

Los resultados de inhibición del crecimiento se muestran en la Figura 7A-E. En las tablas 11A y 11B se ofrece un resumen de los resultados. Los resultados de las Figuras 7A-B y la Tabla 11A indican que el biparatópico anti-HER2 ejemplar (v5019) es capaz de inhibir el crecimiento de las líneas celulares HER2+ SKOV3 y BT-474. La Figura 10A muestra que el anticuerpo biparatópico anti-HER2 medió la mayor inhibición del crecimiento de SKOV3 en comparación con el FSA anti-HER2 (v506) y en comparación con la combinación de dos anticuerpos FSA anti-HER2 (v506 + v4184).

Tabla 11A: Inhibición del crecimiento de células cancerosas HER2 3+

Tratamiento	% de Supervivencia	
	SKOV3 HER2 2+/3+	BT-474 HER2 3+
v506	88	37
v506 + v4184	96	32
v5019	77	43

Los resultados de las Figuras 7C-E y la Tabla 11B indican que los anticuerpos biparatópicos anti-HER2 ejemplares (v5019, v7091 y v10000) pueden inhibir el crecimiento de las líneas de células tumorales SKBr3 HER2 3+, SKOV3 HER2 2+/3+ y JIMT-1 HER2 2+. La Figura 7C muestra que los anticuerpos biparatópicos anti-HER2 v7091 y v10000 mediaron la mayor inhibición del crecimiento de las células tumorales de mama SKBr3 HER2 3+. La Figura 7D muestra que los anticuerpos biparatópicos anti-HER2 (v7091 y v10000) mediaron la mayor inhibición del crecimiento de las células tumorales de ovario SKOV3 HER2 3+. La Figura 7E muestra que los anticuerpos biparatópicos anti-HER2 (v7091 y v10000) mediaron la mayor inhibición del crecimiento de las células tumorales JIMT-1 resistentes a Herceptina HER2 2+. En todas las líneas celulares analizadas, los anticuerpos biparatópicos anti-HER2 ejemplares (v7091 y v10000) mediaron una mayor inhibición del crecimiento en comparación con el anticuerpo monoespecífico FSA anti-HER2 (v506).

Tabla 11B: Inhibición del crecimiento de células cancerosas HER2 3+

Tratamiento	% de Supervivencia		
	SKBr3 HER2 3+	SKOV3 HER2 2+/3+	JIMT-1 HER2 2+
v506	52	107	107
v5019	59	83	106
v7091	35	79	85
v10000	34	73	84

Estos resultados muestran que concentraciones saturantes ejemplares de anticuerpos anti-HER2 biparatópicos pueden inhibir el crecimiento de células tumorales de mama y de ovario HER2 3+ y 2+, y resistentes a trastuzumab HER2 2+ aproximadamente un 20 % más que un anticuerpo monoespecífico FSA anti-HER2.

**Ejemplo 8:** Unión preferencial de los parátomos de los anticuerpos anti-HER2 biparatópicos al HER2 dimérico en comparación con el ECD de HER2

Este experimento se realizó para determinar la capacidad de los parátomos individuales de anticuerpos anti-HER2 biparatópicos ejemplares para unirse a HER2 dimérico y al ECD de HER2 como un sustituto de la unión

diferencial entre ECD de HER2 unido a la membrana (HER2-Fc) y HER2 desprendido. El experimento se llevó a cabo de la siguiente manera:

Análisis de resonancia de plasmón superficial (SPR): se midió la afinidad de los anticuerpos anti-HER2 monovalentes (v1040 o v4182) para la unión al dominio extracelular de HER2 (sHER-2, Ebioscience BMS362, que codifica el aminoácido 23 - 652 de la proteína de longitud completa) y HER2-Fc (fusión dimérica HER2-Fc que codifica el aminoácido 1 - 652 del dominio extracelular; Sino Biological Inc., 10004-H02H) mediante SPR utilizando el sistema T200 de Biacore (GE Healthcare). La unión al ECD de HER2 se determinó mediante el siguiente método. El ECD de HER2 en 10 mM de Hepes, pH 6.8, se inmovilizó en el chip CM5 mediante acoplamiento de amina a un nivel de 44 RU (unidades de respuesta). Los anticuerpos anti-HER2 monovalentes se pasaron sobre la superficie del chip inmovilizado con HER2 en concentraciones que oscilaron entre 0.76 - 60 nM. La unión a HER2-Fc se determinó mediante el siguiente método. HER2-Fc en 10 mM de Hepes pH 6.8, se inmovilizó en el chip CM5 mediante acoplamiento de amina a un nivel de 43 RU. Los anticuerpos anti-HER2 monovalentes se pasaron sobre la superficie del chip inmovilizado con HER2 en concentraciones que oscilaron entre 0.76 - 60 nM. Las concentraciones de anticuerpos se analizaron para determinar la unión por triplicado. Las constantes de enlace de disociación de equilibrio ( $K_D$ ) y la cinética ( $k_a$  y  $k_d$ ) se determinaron utilizando el método de cinética de ciclo único. Los sensogramas se ajustaron globalmente a un modelo de unión de Langmuir 1:1. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente.

Los resultados se muestran en la Figura 8A, Figura 8B, Tabla 11C y Tabla 11D. Los resultados de la Figura 8A y la Tabla 11C muestran datos de unión de SPR del anticuerpo anti-HER2 monovalente (v1040; que representa el dominio de unión a antígeno en CH-B del anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar). La Figura 8A ilustra los valores de  $K_D$  (nM) de unión de v1040 al ECD de HER2 inmovilizado o HER2-Fc y muestra que el anticuerpo anti-HER2 monovalente tiene una  $K_D$  más baja para la unión al HER2-Fc en comparación con el ECD de HER2. La Tabla 11C muestra los valores de  $k_a$  (1/M s) y  $k_d$  (1/s) del anticuerpo anti-HER2 monovalente (OA) en comparación con el anticuerpo anti-HER2 de tamaño completo (FSA) en la unión al ECD de HER2 y al HER2-Fc ('HER2 mem'). Estos datos muestran constantes de asociación ( $k_a$ ) y disociación ( $k_d$ ) comparables de OA y FSA para la unión al ECD de HER2 y al HER2-Fc.

Tabla 11C: Valores de  $k_a$  (1/M s) y  $k_d$  (1/s) del anticuerpo anti-HER2 monovalente (OA) comparado con el anticuerpo anti-HER2 de tamaño completo (FSA) en la unión al ECD de HER2 y HER2-FC ('HER2 mem')

	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)
OA vs ECD de HER2	2.00E+05	6.15E-05
FSA vs ECD de HER2	4.14E+05	2.01E-05
OA vs HER2 mem	1.88E+05	4.38E-05
FSA vs HER2 mem	3.41E+05	4.94E-06*

Los resultados en la Figura 8B y la Tabla 11D muestran los datos de unión de SPR del anticuerpo anti-HER2 monovalente (v4182; que representa el dominio de unión a antígeno en CH-A del anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar). La Figura 8B ilustra los valores de  $K_D$  (nM) de unión de v4182 al ECD de HER2 inmovilizado o HER2-Fc y muestra que el anticuerpo anti-HER2 monovalente tiene una  $K_D$  más baja para la unión al HER2-Fc en comparación con el ECD de HER2. La Tabla 11D muestra los valores de  $k_a$  (1/M s) y  $k_d$  (1/s) del anticuerpo anti-HER2 monovalente (OA) en comparación con el anticuerpo anti-HER2 de tamaño completo (FSA) en la unión al ECD de HER2 y al HER2-FC ('HER2 mem'). Estos datos muestran constantes de asociación ( $k_a$ ) y disociación ( $k_d$ ) comparables de OA y FSA para la unión al ECD de HER2 y HER2-Fc.

Tabla 11D:

	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)
OA vs ECD de HER2	9.08E+04	6.17E-04
FSA vs ECD de HER2	9.55E+04	3.93E-04
OA vs HER2 mem	1.39E+05	2.04E-04
FSA vs HER2 mem	1.77E+05	6.84E-05

Estos datos muestran que cada uno de los parátomos del anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar tiene valores de  $K_D$  menores de unión a antígeno dímérico HER2, un representante de HER2 unido a la membrana,

en comparación con el ECD de HER2. Con base en estos datos, se esperaría que el anticuerpo anti-HER2 ejemplar tuviera una mayor afinidad de unión por el antígeno HER2 unido a la membrana en comparación con el ECD de HER2 desprendido que está presente en el suero de pacientes enfermos y puede actuar como un sumidero para el anticuerpo terapéutico (Brodowicz T, et al. Soluble HER-2/neu neutralizes biologic effects of anti-HER-2/neu antibody on breast cancer cells *in vitro*. Int J Cancer. 1997; 73: 875-879). Por ejemplo, los niveles basales de ECD de HER2 son  $\leq 15$  ng/mL; mientras que los pacientes con enfermedad progresiva tienen ECD de HER2  $\geq 38$  ng/mL.

**Ejemplo 9:** Carga de células enteras e internalización del anticuerpo anti-HER2 biparatópico en células HER2+

Este experimento se realizó para evaluar la capacidad de un anticuerpo anti-HER2 biparatópico ejemplar para internalizarse en células HER2 2+. Se siguió el método de internalización directa de acuerdo con el protocolo detallado en Schmidt, M. et al., Kinetics of anti-carcinoembryonic antigen antibody internalization: effects of affinity, bivalency, and stability. Cancer Immunol Immunother (2008) 57: 1879-1890. Específicamente, los anticuerpos se etiquetaron directamente utilizando el kit de etiquetado de proteínas AlexaFluor® 488 (Invitrogen, cat. n.º A10235), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para el ensayo de internalización, se sembraron placas de 12 pocillos con  $1 \times 10^5$  células/pocillo y se incubaron durante la noche a  $37^\circ\text{C} + 5\%$  de  $\text{CO}_2$ . Al día siguiente, se añadieron los anticuerpos marcados a 200 nM en DMEM + 10 % de FBS y se incubaron 24 horas a  $37^\circ\text{C} + 5\%$  de  $\text{CO}_2$ . En condiciones de oscuridad, se aspiró el medio y se lavaron los pocillos con  $2 \times 500$   $\mu\text{L}$  de PBS. Para recolectar células, se agregó tampón de disociación celular (250  $\mu\text{L}$ ) a  $37^\circ\text{C}$ . Las células se sedimentaron y se resuspendieron en 100  $\mu\text{L}$  de DMEM + 10 % de FBS sin o con anti-Alexa Fluor 488, fracción de IgG de conejo (Molecular Probes, A11094) a 50  $\mu\text{g/mL}$ , y se incubaron en hielo durante 30 min. Antes del análisis, se filtraron 300  $\mu\text{L}$  de DMEM + 10 % de FBS y se agregaron 4  $\mu\text{L}$  de yoduro de propidio. Las muestras se analizaron utilizando el citómetro de flujo LSRII.

La capacidad de un anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar para internalizarse en células HER2+ se muestra en la Figura 9A y la Figura 9B. La Figura 9A muestra los resultados de anticuerpos internos y de superficie detectables en células BT-474 después de 24 h de incubación con el anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar y el control de FSA anti-HER2. Estos resultados muestran que la incubación con un anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar (v5019) da como resultado aproximadamente el doble de anticuerpos internalizados en las células BT-474 en comparación con el control de FSA anti-HER2. La Figura 9B muestra los resultados de anticuerpos internos y de superficie detectables en células JIMT-1 después de 24 h de incubación con el anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar y el control de FSA anti-HER2. Estos resultados muestran que la incubación con un anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar (v5019) da como resultado aproximadamente el doble de anticuerpos internalizados en las células JIMT-1 en comparación con el control de FSA anti-HER2. La cantidad de tinción de superficie después de 24 h fue comparable entre el FSA anti-HER2 biparatópico y anti-HER2 tanto en las células BT-474 como JIMT-1.

Los resultados de la Figura 10A-F muestran una comparación del anticuerpo detectable unido a la superficie de células enteras después de 2 h a  $4^\circ\text{C}$ , en comparación con el anticuerpo unido a la superficie después de la incubación durante 24 h a  $37^\circ\text{C}$ ; además de la cantidad de anticuerpo internalizado después de 24 h a  $37^\circ\text{C}$ . La Figura 10A muestra los resultados en células BT-474 después de la incubación con el anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar y el control de FSA anti-HER2. Estos resultados muestran que la incubación de un anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar con células BT-474 durante 24 h da como resultado una reducción de aproximadamente el 15 % del anticuerpo detectado en la superficie de las células completas. La Figura 10A también muestra que la incubación con un anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar (v5019) da como resultado aproximadamente el doble de anticuerpos internalizados en las células BT-474 en comparación con el control de FSA anti-HER2.

La Figura 10B muestra los resultados en células JIMT-1 después de la incubación con el anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar y el control de FSA anti-HER2. La Figura 10B es una repetición del experimento que se muestra en la Figura 9B con la adición de tinción de superficie después de 2 h a  $4^\circ\text{C}$ . Estos resultados muestran que la incubación de un anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar con células JIMT-1 durante 24 h da como resultado una reducción de aproximadamente el 57 % del anticuerpo detectado en la superficie de las células completas. La Figura 10B también muestra que la incubación con un anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar (v5019) da como resultado más anticuerpos internalizados en las células BT-474 después de 24 h de incubación a  $37^\circ\text{C}$ , en comparación con el control de FSA anti-HER2.

La Figura 10C muestra los resultados en células SKOV3 después de la incubación con el anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar. Estos resultados muestran que la incubación de un anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar con células SKOV3 durante 24 h da como resultado una reducción de aproximadamente el 32 % del anticuerpo detectado en la superficie de las células completas.

La Figura 10D muestra los resultados en células MCF7 después de la incubación con el anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar. Estos resultados muestran que la incubación de un anticuerpo biparatópico anti-HER2

ejemplar con células MCF7 durante 24 h da como resultado una reducción de aproximadamente el 45 % del anticuerpo detectado en la superficie de las células completas.

La Figura 10E muestra los resultados en células SKOV3 después de la incubación con los anticuerpos biparatópicos anti-HER2 ejemplares, v5019, v7091 y v10000. Estos resultados muestran que la incubación de anticuerpos biparatópicos anti-HER2 ejemplares da como resultado entre 1.5 y 1.8 veces más anticuerpos internalizados con células SKOV3 en comparación con el control de FSA anti-HER2. La incubación con el control de FSA anti-HER2 durante 24 h resultó en la mayor reducción (-77 %) de anticuerpos detectados en la superficie de las células completas.

La Figura 10F muestra los resultados en células JIMT-1 después de la incubación con los anticuerpos biparatópicos anti-HER2 ejemplares, v5019, v7091 y v10000. Estos resultados muestran que la incubación de anticuerpos biparatópicos anti-HER2 ejemplares da como resultado entre 1.4 y 1.8 veces más anticuerpos internalizados con células JIMT-1 en comparación con el control de FSA anti-HER2. La incubación con los anticuerpos biparatópicos anti-HER2 (v5019 y v10000) durante 24 h resultó en la mayor reducción (-64 %) de anticuerpos detectados en la superficie de las células completas.

Estos resultados muestran que los anticuerpos biparatópicos anti-HER2 ejemplares tienen propiedades de internalización superiores en células HER2+ en comparación con un FSA anti-HER2 monoespecífico. La reducción del anticuerpo de superficie detectada después de 24 h de incubación a 37 °C muestra que un anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar es capaz de reducir la cantidad de receptor de HER2 de la superficie celular después de la incubación en células HER2+ y que la reducción del HER2 de la superficie posterior a la incubación es mayor en las células tumorales HER2 2+.

**Ejemplo 10:** Tinción celular y localización de un anticuerpo biparatópico anti-HER2 tras la incubación con células HER2+ a las 1, 3 y 16 horas

Este experimento se realizó para analizar la internalización del anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar en células JIMT-1 HER2+ en diferentes puntos de tiempo y como un método ortogonal al presentado en el Ejemplo 9 para analizar la carga y la internalización de células completas.

Las células JIMT-1 se incubaron con el anticuerpo (v506, v4184, v5019 o una combinación de v506 y v4184) a 200 nM en DMEM sin suero, 37 °C + 5 % de CO<sub>2</sub> durante 1 h, 3 h y 16 h. Las células se lavaron suavemente dos veces con PBS estéril calentado (500 mL/pocillo). Las células se fijaron con 250 mL de solución de formalina al 10 %/PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células fijadas se lavaron tres veces con PBS (500 µL/pocillo), se permeabilizaron con 250 µL/pocillo de PBS que contenía 0.2 % de Triton X-100 durante 5 minutos y se lavaron tres veces con 500 µL/pocillo de PBS. Las células se bloquearon con 500 µL/pocillo de PBS + 5 % de suero de cabra durante 1 hora a temperatura ambiente. Se eliminó el tampón de bloqueo y se incubaron 300 µL/pocillo de anticuerpo secundario (IgG anti-Human de cabra del fragmento Fab AffiniPure conjugado con Alexa Fluor 488 (H+L); Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.; 109-547-003) durante 1 h a temperatura ambiente. Las células se lavaron tres veces con 500 µL/pocillo de PBS y luego los cubreobjetos que contenían las células fijadas se montaron en un portaobjetos usando Prolong gold antidesvanecimiento con DAPI (Life Technologies; #P36931). Se adquirieron imágenes individuales de 60X utilizando el microscopio confocal Olympus FV1000.

Los resultados indicaron que el anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar (v5019) se internalizó en las células JIMT-1 a las 3 h y se localizó principalmente cerca de los núcleos. La comparación de imágenes en la incubación de 3 horas mostró una mayor cantidad de tinción interna asociada con el anticuerpo biparatópico anti-HER2 en comparación con la combinación de dos FSA anti-HER2 (v506 + v4184) y se comparó con el FSA anti-HER2 individual (v506 o v4184). Se observaron diferencias en la ubicación celular de la tinción del anticuerpo cuando se compararon los resultados del anticuerpo biparatópico anti-HER2 (v5019) con el FSA anti-HER2 (v4184); donde el FSA anti-HER2 (v4184) mostró una tinción pronunciada de la membrana plasmática en los puntos de tiempo de 1, 3 y 16 h. La cantidad de anticuerpos detectables se redujo a las 16 h para el FSA anti-HER2 (v506), la combinación de dos FSA anti-HER2 (v506 + v4184) y los tratamientos con anticuerpos biparatópicos anti-HER2 (datos no mostrados).

Estos resultados muestran que el anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar v5019 se internalizó en las células HER2+ y el anticuerpo internalizado fue detectable después de 3 h de incubación. Estos resultados son consistentes con los resultados presentados en el Ejemplo 9 que muestran que un anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar puede internalizarse en mayores cantidades en células HER2+ en comparación con un FSA anti-HER2.

**Ejemplo 11:** ADCC de células HER2+ mediada por anticuerpo anti-HER2 biparatópico en comparación con controles

Este experimento se realizó para medir la capacidad de un anticuerpo anti-HER2 biparatópico ejemplar para mediar la ADCC en células SKOV3 (cáncer de ovario, HER2 2+/3+).

Las células diana se preincubaron con anticuerpos de prueba (concentraciones descendentes de 10 veces desde 45 µg/mL) durante 30 minutos, seguido de la adición de células efectoras con una relación célula efectora/diana de 5:1 y la incubación continuó durante 6 horas a 37 °C + 5 % de CO<sub>2</sub>. Las muestras se analizaron con 8 concentraciones, 10 veces descendentes desde 45 µg/mL. La liberación de LDH se midió utilizando el kit de ensayo de LDH.

Se realizaron estudios de dosis-respuesta con diversas concentraciones de las muestras con una relación efector/objetivo (E/T) de 5:1, 3:1 y 1:1. Se analizaron los valores de concentración efectiva máxima media (EC<sub>50</sub>) con el ajuste de regresión no lineal de dosis-respuesta sigmoidea utilizando GraphPad prism.

Las células se mantuvieron en medio completo 5a de McCoy a 37 °C/ 5 % de CO<sub>2</sub> y subcultivadas regularmente con un medio adecuado suplementado con 10 % de FBS de acuerdo con el protocolo de la ATCC. En los ensayos se utilizaron células con un número de pase menor que p10. Las muestras se diluyeron a concentraciones entre 0.3-300 nM con medio DMEM sin rojo fenol suplementado con 1 % de FBS y 1 % de penicilina/estreptomicina antes de su uso en el ensayo.

Los resultados de ADCC en células SKOV3 HER2+ en una proporción de células efectoras a células diana de 5:1 se muestran en la Figura 11A y la Tabla 12. Estos resultados muestran que el anticuerpo anti-HER2 biparatópico ejemplar (v5019) medió el mayor porcentaje de lisis máxima de células diana por ADCC en comparación con el FSA anti-HER2 (v792) y la combinación de dos FSA anti-HER2 diferentes (v792 + v4184). La diferencia en la lisis celular máxima mediada por el anticuerpo anti-HER2 biparatópico ejemplar fue aproximadamente 1.6 veces mayor en comparación con el FSA anti-HER2, y aproximadamente 1.2 veces mayor en comparación con una combinación de dos FSA anti-HER2 diferentes (v792 + v4184).

Tabla 12:

Variante de anticuerpo	EC <sub>50</sub> (nM)	% de Lisis celular máxima
v792	~0.032	17.82
v5019	~0.164	28.57
v792 + v4184	~0.042	23.85

Los resultados de ADCC en células SKOV3 HER2+ en una proporción de células efectoras a células diana de 3:1 se muestran en la Figura 11B y la Tabla 13. Estos resultados muestran que el anticuerpo anti-HER2 biparatópico ejemplar (v5019) medió el mayor porcentaje de lisis máxima de células diana por ADCC en comparación con el FSA anti-HER2 (v792) y la combinación de dos FSA anti-HER2 diferentes (v792 + v4184). La diferencia en la lisis celular máxima mediada por el anticuerpo anti-HER2 biparatópico ejemplar fue aproximadamente 1.3 veces mayor en comparación con el FSA anti-HER2, y aproximadamente 1.8 veces mayor en comparación con una combinación de dos FSA anti-HER2 diferentes (v792 + v4184).

Tabla 13

Variante de anticuerpo	EC <sub>50</sub> (nM)	% de Lisis celular máxima
v792	1.064	16.9
v5019	~0.4608	22.3
v792 + v4184	~1.078	12.3

Los resultados de ADCC en células SKOV3 HER2+ en una proporción de células efectoras a células diana de 1:1 se muestran en la Figura 11C y la Tabla 14. Estos resultados muestran que el anticuerpo anti-HER2 biparatópico ejemplar (v5019) medió el mayor porcentaje de lisis máxima de células diana por ADCC en comparación con el FSA anti-HER2 (v792) y la combinación de dos FSA anti-HER2 diferentes (v792 + v4184). La diferencia en la lisis celular máxima mediada por el anticuerpo anti-HER2 biparatópico ejemplar fue aproximadamente 1.8 veces mayor en comparación con el FSA anti-HER2, y aproximadamente 1.13 veces mayor en comparación con una combinación de dos FSA anti-HER2 diferentes (v792 + v4184).

Tabla 14

Variante de anticuerpo	EC <sub>50</sub> (nM)	% de Lisis celular máxima
------------------------	-----------------------	---------------------------



v792	1.429	7.529
v5019	~1.075	13.29
v792 + v4184	~0.1121	11.73

Los resultados de la Figura 11 y las Tablas 12-14 muestran que el anticuerpo HER2 biparatópico ejemplar media la mayor ADCC de células SKOV3 en diferentes proporciones E:T en comparación con un FSA anti-HER2 y una combinación de dos FSA anti-HER2. Sería de esperar la observación de un aumento de ADCC mediado por el anticuerpo biparatópico anti-HER2 en pacientes con enfermedad de HER2+ que expresan células efectoras circulantes variables y/o reducidas después de la quimioterapia (Suzuki E. et al. Clin Cancer Res. 2007;13: 1875-1882). Las observaciones en la Figura 11 son consistentes con los datos de Bmáx de unión a células completas presentados en el Ejemplo 6, que muestra un aumento aproximado de 1.5 veces en la unión celular al anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar en comparación con el FSA anti-HER2.

#### **Ejemplo 12:** Capacidad de un anticuerpo anti-HER2 ejemplar para unirse al ECD de HER2

Se utilizó un ensayo de SPR para evaluar el mecanismo por el cual un anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar se une al ECD de HER2; específicamente, para comprender si ambos parátomos de una molécula de anticuerpo biparatópico pueden unirse a un ECD de HER2 (unión Cis; anticuerpo a moléculas de HER2 1:1) o si cada parátomo de un anticuerpo biparatópico puede unirse a dos ECD de HER2 diferentes (unión Trans; anticuerpo a moléculas de HER2 1:2). En la Figura 14 se ilustra una representación de la unión cis vs. trans. La correlación entre una constante de disociación reducida (más lenta) con niveles crecientes de captura de anticuerpos (densidad de superficie) es una indicación de unión Trans (es decir, una molécula de anticuerpo que se une a dos moléculas de HER2).

Se midieron la afinidad y la cinética de unión del anticuerpo anti-HER2 biparatópico ejemplar (v5019) al HER2 humano recombinante y se compararon con las de los anticuerpos anti-HER2 monovalentes (v630 o v4182; que comprenden los parátomos individuales de v5019) que se midieron mediante SPR utilizando el sistema T200 de Biacore (GE Healthcare). Entre 2000 y 4000 RU de Fc antihumano inyectados en una concentración entre 5 y 10 µg/mL se inmovilizaron en un chip CM5 utilizando acoplamiento de amina estándar. El anticuerpo anti-HER2 monovalente (v630 o v4182) y el anticuerpo anti-HER2 biparatópico ejemplar (v5019) se capturaron en el Fc antihumano (inyectado a una concentración que oscilaba entre 0.08 y 8 µg/mL en PBST, 1 minuto a 10 µL/min) en niveles de respuesta que oscilaban entre 350 - 15 RU. El HER2 humano recombinante se diluyó en PBST y se inyectó a una concentración inicial de 120 nM, 200 nM o 300 nM con diluciones de 3 veces y se inyectó a una velocidad de flujo de 50 µL/min durante 3 minutos, seguido de disociación durante otros 30 minutos al final de la última inyección. Las diluciones de HER2 se analizaron por duplicado. Los sensogramas se ajustaron globalmente a un modelo de unión de Langmuir de 1:1. Todos los experimentos se realizaron a 25 °C.

Los resultados se muestran en la Figura 12 y la Figura 13.

Los resultados de la Figura 12A muestran la  $k_a$  (1/Ms) del anticuerpo anti-HER2 monovalente (v630 y v4182) y del anticuerpo anti-HER2 biparatópico ejemplar (v5019) para la unión a HER2 humano recombinante en un intervalo de concentraciones de anticuerpos inyectados y capturados en la superficie del chip. Estos resultados muestran que  $k_a$  no cambia cuando v630, v4182 y v5019 están en diferentes niveles de captura de anticuerpos.

Los resultados de la Figura 12B muestran la  $k_d$  (1/s) del anticuerpo anti-HER2 monovalente (v630 y v4182) y del anticuerpo anti-HER2 biparatópico ejemplar (v5019) para la unión a HER2 humano recombinante en un intervalo de concentraciones de anticuerpos inyectados y capturados en la superficie del chip. Estos resultados muestran que  $k_d$  disminuyó solo para el anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar (v5019) a niveles crecientes de captura de anticuerpos.

Los resultados de la Figura 12C muestran la  $K_D$  (M) de anti-HER2 monovalente (v630 y v4182) y anticuerpo anti-HER2 biparatópico ejemplar (v5019) para la unión a HER2 humano recombinante en un intervalo de concentraciones de anticuerpos inyectados y capturados en la superficie del chip. Estos resultados muestran que  $K_D$  disminuyó solo para el anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar (v5019) a niveles crecientes de captura de anticuerpos. Este resultado se correlacionó con los valores de  $k_d$  decrecientes que se muestran en la Figura 15B.

Los resultados de la Figura 13A muestran la  $k_d$  (1/s) del anticuerpo anti-HER2 biparatópico ejemplar (v5019) para la unión a HER2 humano recombinante en un intervalo de niveles de captura de anticuerpos. Estos resultados muestran que los valores de  $k_d$  son inversamente proporcionales a mayores RU de anticuerpos capturados en la superficie del chip (es decir, constantes de disociación más lentas a niveles de captura de anticuerpos más altos). Los resultados indican que el anticuerpo anti-HER2 biparatópico ejemplar (v5019) es capaz de unirse a ECD2 de HER2 y ECD4 de HER2 en dos moléculas de HER2 separadas (es decir, unión

trans), como lo demuestra la reducción en la constante de disociación a niveles más altos de captura de anticuerpos. Estos datos están respaldados por un experimento similar presentado en la Figura 47 y analizado en el Ejemplo 43, donde el FSA anti-HER2 monoespecífico bivalente (v506) demostró unión Cis (anticuerpo contra HER2 1:1) donde los valores de  $k_d$  (1/s) y  $K_D$  (M) se mantuvieron constantes a medida que aumentaban los niveles de captura de anticuerpos, como se esperaba para esta molécula.

Los resultados de la Figura 13B muestran la  $k_d$  (1/s) del anticuerpo anti-HER2 monovalente (v4182) para la unión a HER2 humano recombinante en un intervalo de niveles de captura de anticuerpos. Estos resultados no muestran cambios en los valores de  $k_d$  en el intervalo de diferentes RU de anticuerpos capturados en la superficie del chip. Estos resultados muestran que el anticuerpo anti-HER2 monovalente (v4182) se une de forma monovalente 1:1 (unión cis).

Los resultados de la Figura 13C muestran la  $k_d$  (1/s) del anticuerpo anti-HER2 monovalente (v630) para la unión a HER2 humano recombinante en un intervalo de niveles de captura de anticuerpos. Estos resultados no muestran cambios en los valores de  $k_d$  en el intervalo de diferentes RU de anticuerpos capturados en la superficie del chip. Estos resultados muestran que el anticuerpo anti-HER2 monovalente (v630) se une de forma monovalente 1:1 (unión cis). Estos datos están respaldados por el experimento presentado en la Figura 47 y analizado en el Ejemplo 43X, donde el FSA anti-HER2 monoespecífico bivalente (v506) no mostró cambios en  $k_d$  (1/s).

Los resultados de las Figuras 12 y 13 indican que el anticuerpo anti-HER2 biparatópico ejemplar (v5019) es capaz de unirse simultáneamente a dos moléculas de HER2 en trans (relación de anticuerpo contra HER2 1:2). El mecanismo trans de unión detectado por SPR es consistente con los datos de unión de saturación de superficie celular más alta ( $B_{máx}$ ), presentados en el Ejemplo 6, en combinación con los datos de internalización presentados en los Ejemplos 9 y 10.

**Ejemplo 13:** Efecto de la incubación del anticuerpo anti-HER2 biparatópico ejemplar sobre la fosforilación de AKT en células BT-474

Se probó la capacidad de un anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar para reducir la señalización de pAKT en células BT-474 utilizando el kit de ELISA AKT Colorimetric In-Cell (Thermo Scientific; cat n.º 62215) de acuerdo con las instrucciones del fabricante con las siguientes modificaciones. Las células se sembraron a razón de  $5 \times 10^3$ /pocillo y se incubó 24 h a  $37^\circ\text{C} + 5\%$  de  $\text{CO}_2$ . Las células se incubaron con 100 nM de anticuerpo durante 30 minutos, seguido de una incubación de 15 minutos con rHRG- $\beta 1$ . Las células se lavaron, fijaron y permeabilizaron de acuerdo con las instrucciones. Se agregaron anticuerpos secundarios (1:5000; Jackson Immuno Research, IgG antirratón de asno-HRP, JIR, Cat#715-036-150, IgG anticonejo de asno-HRP, JIR, Cat#711-036-452) y el ensayo se procesó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los resultados de la Figura 15 muestran que la incubación con un anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar medió una reducción aproximada de 1.2 veces en los niveles de p-Akt en presencia de HRG $\beta 1$  en relación con el control de IgG humano (CTL). La combinación de dos FSA anti-HER2 (v506 + v4184) mediaba la mayor reducción en los niveles de p-Akt en presencia de HRG $\beta 1$  que fue aproximadamente 1.5 veces menor en comparación con el control de IgG humano. Se detectó una reducción modesta en p-Akt con el anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar en ausencia de ligando (HRG $\beta 1$ ) en comparación con el anticuerpo de control de IgG humano.

Estos datos muestran que un anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar puede bloquear la señalización activada por ligando en las células HER2+.

**Ejemplo 14:** Efecto del anticuerpo anti-HER2 biparatópico sobre la viabilidad de los cardiomiocitos

Se midió el efecto de anticuerpos anti-HER2 biparatópicos ejemplares y ADC sobre la viabilidad de los cardiomiocitos para obtener una indicación preliminar de efectos potencialmente cardiotoxicos.

Los cardiomiocitos iCell (Cellular Dynamics International, CMC-100-010), que expresan niveles basales del receptor HER2, se cultivaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se utilizaron como células objetivo para evaluar la salud de los cardiomiocitos después del tratamiento con anticuerpos. El ensayo se realizó de la siguiente manera. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos (15,000 células/pocillo) y se mantuvieron durante 48 h. El medio celular se reemplazó con medio de mantenimiento y las células se mantuvieron durante 72 h. Para acceder a los efectos de la cardiotoxicidad inducida por anticuerpos, las células se trataron durante 72 h con 10 y 100 nM de variantes solas o en combinaciones. Para evaluar los efectos de la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas (sola o en combinación con los anticuerpos anti-HER2 biparatópicos ejemplares), las células se trataron con 3  $\mu\text{M}$  ( $\sim\text{IC}_{20}$ ) de doxorubicina durante 1 hora, seguido de 72 horas con 10 y 100 nM de variantes de anticuerpos solos o en combinaciones. La viabilidad celular se evaluó cuantificando los niveles de ATP celular con el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (Promega, G7570) y/o sulforodamina (Sigma 230162-5G) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los resultados se muestran en la Figura 16A-C. Los resultados en la Figura 16A muestran que la incubación de los cardiomiocitos con concentraciones terapéuticamente relevantes de anticuerpo biparatópico anti-HER2 ejemplar (v5019) y ADC biparatópico anti-HER2 ejemplar (v6363), no afectó la viabilidad de los cardiomiocitos en relación con el control no tratado ('simulado').

- 5 Los resultados de la Figura 16B muestran que la incubación de los cardiomiocitos con concentraciones terapéuticamente relevantes de anticuerpos biparatópicos anti-HER2 ejemplares (v5019, v7091 y v10000), y ADC biparatópicos anti-HER2 ejemplares (v6363, v7148 y v10553), no tuvieron efecto sobre la viabilidad de los cardiomiocitos en relación con el control no tratado ('simulado'). Con base en los resultados de las Figuras 16A y 16B, se espera que los anticuerpos biparatópicos anti-HER2 ejemplares y los ADC biparatópicos anti-HER2 ejemplares no induzcan miocardiopatía, por ejemplo, a través de disfunción mitocondrial, como se informa con otros anticuerpos dirigidos a anti-HER2 (Grazette L.P. et al. Inhibition of ErbB2 Causes Mitochondrial Dysfunction in Cardiomyocytes; Journal of the American College of Cardiology: 2004; 44: 11).

- 15 Los resultados de la Figura 16C muestran que el pretratamiento de los cardiomiocitos con doxorubicina seguido de incubación con concentraciones terapéuticamente relevantes de anticuerpos biparatópicos anti-HER2 ejemplares (v5019, v7091 y v10000) y ADC biparatópicos anti-HER2 ejemplares (v6363, v7148 y v10553), no tuvo efecto sobre la viabilidad de los cardiomiocitos en relación con el control no tratado + doxorubicina ("Simulado + Dox"). Con base en los resultados de la Figura 16C, se espera que los anticuerpos biparatópicos anti-HER2 ejemplares y los ADC biparatópicos anti-HER2 ejemplares no resulten en un mayor riesgo de disfunción cardíaca en pacientes que reciben tratamiento concurrente con antraciclinas (Seidman A, Hudis C, Pierri MK, et al. Cardiac dysfunction in the trastuzumab clinical trials experience. J Clin Oncol (2002) 20: 1215-1221).

- 20 Las Figuras 16A-C muestran que la incubación de cardiomiocitos con anticuerpos biparatópicos anti-HER2 y ADC tuvo efectos equivalentes en comparación con el anticuerpo FSA anti-HER2 monoespecífico (v506), la combinación FSA anti-HER2 (v506 + v4184) y el ADC (v6246) cuando se trataron solos o en combinación con doxorubicina. Con base en estos resultados, se espera que los anticuerpos biparatópicos anti-HER2 ejemplares y los ADC no tengan mayores efectos cardiotóxicos en comparación con el FSA anti-HER2 anti-monoespecífico, trastuzumab o ADC, T-DM1.

#### **Ejemplo 15: Citotoxicidad de anti-HER2-ADC biparatópicos ejemplares en células HER2+**

- 30 Se midió la capacidad de anticuerpos anti-HER2-ADC biparatópicos ejemplares (v6363, v7148 y v10553) para mediar la citotoxicidad celular en células HER2+. En algunos casos se utilizó IgG humana conjugada con DM1 (v6249) como control. El experimento se llevó a cabo en las líneas de células tumorales de mama JIMT-1, MCF7, MDA-MB-231 HER2+, la línea de células tumorales de ovario SKOV3 HER2+ y la línea de células gástricas NCI-N87 HER2+. Se evaluó la citotoxicidad de anticuerpos anti-HER2-ADC biparatópicos ejemplares en células HER2+ y se comparó con los controles FSA-ADC anti-HER2 monoespecíficos (v6246) y anti-HER2-FSA-ADC + anti-HER2-FSA (v6246 + v4184). El método se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 7 con las siguientes modificaciones. Los ADC anti-HER2 se incubaron con las células diana SKOV3 y JIMT-1 (Figura 17A y B) durante 24 h, las células se lavaron, el medio se reemplazó y la supervivencia celular se evaluó después de 5 días de incubación a 37 °C. Los ADC anti-HER2 se incubaron con las células diana MCF7 y MDA-MB-231 durante 6 h (Figura 17C y D), las células se lavaron, el medio se reemplazó y la supervivencia celular se evaluó a los 5 días de incubación a 37 °C. En la Figura 17E-G, los ADC anti-HER2 se incubaron continuamente con células diana SKOV3, JIMT-1, NCI-N87 durante 5 días. La viabilidad celular se midió como se describe en el Ejemplo 7 utilizando AlamarBlue™ (Figuras 17A-D) o CellTiter-Glo® (Figuras 17E-G).

Los resultados se muestran en la Figura 17A-G y los datos se resumen en las Tablas 15 y 16.

- 45 Los resultados de la Figura 17A y las Tablas 15 y 16 muestran que el ADC-anti-HER2 biparatópico ejemplar (v6363) es más citotóxico en JIMT-1 en comparación con el anti-HER2-FSA-ADC (v6246) y la combinación de anti-HER2-FSA-ADC + FSA anti-HER2 (v6246 + v4184). El ADC biparatópico anti-HER2 ejemplar tuvo una EC<sub>50</sub> superior que fue aproximadamente 13 veces menor en comparación con el control de FSA-ADC anti-HER2.

- 50 Los resultados de la Figura 17B y la Tabla 15 muestran que el ADC biparatópico anti-HER2 ejemplar (v6363) es más citotóxico en SKOV3 en comparación con el anti-HER2-FSA-ADC (v6246) y la combinación de anti-HER2-FSA-ADC + FSA anti-HER2 (v6246 + v4184). El ADC biparatópico anti-HER2 ejemplar tuvo una EC<sub>50</sub> superior que fue aproximadamente 5 veces menor en comparación con el control de FSA-ADC anti-HER2.

- 55 Los resultados de la Figura 17C y la Tabla 15 muestran que el ADC biparatópico anti-HER2 ejemplar (v6363) es más citotóxico en MCF7 en comparación con el anti-HER2-FSA-ADC (v6246) y la combinación de anti-HER2-FSA-ADC + FSA anti-HER2 (v6246 + v4184). El ADC biparatópico anti-HER2 ejemplar tuvo una EC<sub>50</sub> superior que fue aproximadamente 2 veces menor en comparación con el control de FSA-ADC anti-HER2.

Los resultados de la Figura 17D y la Tabla 15 muestran que el ADC biparatópico anti-HER2 ejemplar (v6363) es más citotóxico en MDA-MB-231 en comparación con el anti-HER2-FSA-ADC (v6246) y la combinación de

anti-HER2-FSA-ADC + FSA anti-HER2 (v6246 + v4184). El ADC biparatópico anti-HER2 ejemplar tuvo una EC<sub>50</sub> superior que fue aproximadamente 2 veces menor en comparación con el control de FSA-ADC anti-HER2.

Tabla 15

Variante de anticuerpo	EC <sub>50</sub> (nM)			
	SKOV3	JIMT-1	MCF7	MDA-MB-231
v6246	0.9225	5.942	122.0	~1075
v6246 + 4184	3.146	12.68	~24432	136.4
v6363	0.1776	0.4443	58.55	141.0

- 5 Los resultados de la Figura 17E y la Tabla 16 muestran que los ADC biparatópicos anti-HER2 ejemplares (v6363, v7148 y v10553) son más citotóxicos en las células tumorales de ovario SKOV3 en comparación con el anti-HER2-FSA-ADC (v6246). Los ADC biparatópicos anti-HER2 ejemplares tuvieron valores de EC<sub>50</sub> superiores que fueron aproximadamente de 2 a 7 veces más bajos en comparación con el control de FSA-ADC anti-HER2.
- 10 Los resultados de la Figura 17F y la Tabla 16 muestran que los ADC biparatópicos anti-HER2 ejemplares (v6363, v7148 y v10553) son más citotóxicos en las células tumorales de mama JIMT-1 en comparación con el anti-HER2-FSA-ADC (v6246). Los ADC biparatópicos anti-HER2 ejemplares tuvieron valores superiores de EC<sub>50</sub> que eran aproximadamente de 6 a 9 veces más bajos en comparación con el control de FSA-ADC anti-HER2.
- 15 Los resultados de la Figura 17G y la Tabla 16 muestran que los ADC biparatópicos anti-HER2 ejemplares (v6363, v7148 y v10553) son citotóxicos en las células tumorales gástricas NCI-N87. Los ADC biparatópicos anti-HER2 ejemplares tenían valores de EC<sub>50</sub> aproximadamente equivalentes comparados con el control de FSA-ADC anti-HER2.

Tabla 16

Variante de anticuerpo	EC <sub>50</sub> (nM)		
	SKVO3	JIMT-1	NCI-N87
v6246	0.22	3.52	1.04
v6363	0.03	0.56	1.33
v7148	0.06	0.56	2.74
v10553	0.09	0.39	1.69

20

Estos resultados muestran que los ADC biparatópicos anti-HER2 ejemplares (v6363, v7148 y v10553) son más citotóxicos en comparación con el control de anti-HER-FSA-ADC en células tumorales de mama HER2 3+, 2+ y 1+. Estos resultados también muestran que los ADC biparatópicos anti-HER2 ejemplares (v6363, v7148 y v10553) son citotóxicos en las células tumorales gástricas HER2 2/3+. Estos resultados son consistentes con los resultados de internalización presentados en el Ejemplo 9.

25

**Ejemplo 16:** Efecto de un anticuerpo anti-HER2 biparatópico en un modelo de xenoinjerto de células de cáncer de ovario humano

El modelo establecido de xenoinjerto derivado de células de cáncer de ovario humano SKOV3 se utilizó para evaluar la eficacia antitumoral de un anticuerpo anti-HER2 biparatópico ejemplar.

30

A los ratones desnudos atímicos hembra se les inoculó el tumor mediante la inserción por vía subcutánea de un fragmento de tumor de 1 mm<sup>3</sup>. Los tumores fueron monitoreados hasta que alcanzaron un volumen promedio de 220 mm<sup>3</sup>; luego los animales fueron distribuidos aleatoriamente en tres grupos de tratamiento: control de IgG, FSA anti-HER2 (v506) y anticuerpo anti-HER2 biparatópico (v5019).

Se incluyeron quince animales en cada grupo. La dosificación para cada grupo es la siguiente:

A) El control de IgG se administró por vía intravenosa con una dosis de carga de 30 mg/kg el día 1 del estudio y luego con dosis de mantenimiento de 20 mg/kg dos veces por semana hasta el día 39 del estudio.

B) Se administró FSA anti-HER2 (v506) por vía intravenosa con una dosis de carga de 15 mg/kg el día 1 del estudio y luego con dosis de mantenimiento de 10 mg/kg dos veces por semana hasta el día 18 del estudio. Del día 22 al 39 se administró una dosis intravenosa de 5 mg/kg de FSA anti-HER2 dos veces por semana. Se administró simultáneamente FSA anti-HER2 (v4184) a razón de 5 mg/kg por vía intraperitoneal dos veces por semana.

C) Se administró por vía intravenosa el anticuerpo anti-HER2 biparatópico con una dosis de carga de 15 mg/kg el día 1 del estudio y luego con dosis de mantenimiento de 10 mg/kg dos veces por semana hasta el día 39 del estudio.

El volumen del tumor se midió dos veces por semana durante el transcurso del estudio, el número de pacientes que respondieron y la supervivencia media se evaluó el día 22. Los resultados se muestran en la Figura 18 y la Tabla 17.

El anti-HER2 biparatópico y el FSA anti-HER2 demostraron una inhibición del crecimiento tumoral superior en comparación con el control de IgG. El anticuerpo anti-HER2 biparatópico indujo una inhibición del crecimiento tumoral superior en comparación con la combinación de FSA anti-HER2 (Figura 18A). El anticuerpo anti-HER2 biparatópico se asoció con un aumento en el número de tumores que respondieron en comparación con el FSA anti-HER2 v506 en el día 22 (11 y 5, respectivamente) (Tabla 17). El anticuerpo anti-HER2 biparatópico ejemplar y el FSA anti-HER2 demostraron una supervivencia superior en comparación con el control de IgG. El anticuerpo anti-HER2 biparatópico tuvo una supervivencia media superior (61 días) en comparación con el FSA anti-HER2 (36 días) (Figura 18B y Tabla 17). El día 22 del estudio se añadió un segundo FSA anti-HER2 (v4184) en combinación con el FSA anti-HER2 (v506). La combinación de dos FSA anti-HER2 indujo una mayor inhibición del crecimiento tumoral en comparación con el FSA anti-HER2 (v506) solo.

Tabla 17:

n = 15, Día 22	IgG	v506	v5019
TV media (mm <sup>3</sup> ) ( % de cambio respecto al valor inicial)	1908 (+766 %)	1291 (+486 %)	697 (+217 %)
% de TGI	0	32	63
Respondedores (TV <50 % del control)	0/15	5/15	11/15
Supervivencia media (días)	22	36	61

**Ejemplo 17:** Efecto de un conjugado de fármaco anticuerpo (ADC) anti-HER2 biparatópico en un modelo de xenoinjerto de una línea celular de cáncer de ovario humano

El modelo establecido de xenoinjerto derivado de células de cáncer de ovario humano SKOV3 se utilizó para evaluar la eficacia antitumoral de un anticuerpo anti-HER2 biparatópico ejemplar conjugado con DM1 (v6363).

A los ratones desnudos atímicos hembra se les inoculó el tumor mediante la inserción por vía subcutánea de un fragmento de tumor de 1 mm<sup>3</sup>. Los tumores fueron monitoreados hasta que alcanzaron un volumen promedio de 220 mm<sup>3</sup>; luego los animales fueron distribuidos aleatoriamente en tres grupos de tratamiento: control de IgG, FSA-ADC anti-HER2 y un anti-HER2-ADC biparatópico.

Se incluyeron quince animales en cada grupo. La dosificación para cada grupo es la siguiente:

A) El control de IgG se administró por vía intravenosa con una dosis de carga de 30 mg/kg el día 1 del estudio y luego con dosis de mantenimiento de 20 mg/kg dos veces por semana hasta el día 39 del estudio.

B) Se administró por vía intravenosa FSA-ADC anti-HER2 (v6246) con una dosis de carga de 10 mg/kg el día 1 del estudio y luego con una dosis de mantenimiento de 5 mg/kg el día 15 y 29.

C) Se administró por vía intravenosa el anticuerpo anti-HER2 biparatópico-ADC (v6363) con una dosis de carga de 10 mg/kg el día 1 del estudio y luego con una dosis de mantenimiento de 5 mg/kg el día 15 y 29.

Se midió el volumen del tumor durante todo el estudio y se evaluó el número de pacientes que responden y la supervivencia media el día 22. Los resultados se muestran en la Figura 19. Un resumen de los resultados se muestra en la Tabla 18.

El anti-HER2-ADC biparatópico y el FSA-ADC anti-HER2 inhibieron el crecimiento del tumor mejor que el control de IgG (Figura 19A y Tabla 18). El anti-HER2-ADC biparatópico inhibió el crecimiento del tumor en mayor grado que el FSA-ADC anti-HER2. El grupo anti-HER2-ADC biparatópico se asoció con un aumento en el número de tumores que respondieron en comparación con el FSA-ADC anti-HER2 (11 y 9, respectivamente). Los grupos anti-HER2-ADC biparatópico y FSA-ADC anti-HER2 demostraron una supervivencia superior en comparación con el control de IgG (Figura 19B y Tabla 18). El grupo de anticuerpos anti-HER2 biparatópicos demostró una supervivencia media de 61 días en comparación con el FSA-ADC anti-HER2 que tuvo una supervivencia media de 36 días (Figura 19B y Tabla 18).

Tabla 18:

n = 15, Día 22	IgG	v6246	v6363
TV media (mm <sup>3</sup> ) ( % de cambio respecto al valor inicial)	1908 (+766 %)	873 (+297 %)	632 (+187 %)
% de TGI	0	54 %	67 %
Respondedores (TV <50 % del control)	0/15	9/15	11/15
Supervivencia media (días)	22	36	61

**Ejemplo 18:** Efecto de un conjugado de fármaco anticuerpo (ADC) anti-HER2 biparatópico en un modelo de xenoinjerto de células primarias humanas (HBCx-13b)

El modelo de xenoinjerto derivado de paciente resistente al trastuzumab de cáncer de mama humano, HBCx-13B, se utilizó para evaluar la eficacia antitumoral de un anticuerpo anti-HER2 biparatópico ejemplar conjugado con DM1.

A los ratones desnudos atímicos hembra se les inoculó el tumor mediante la inserción de un fragmento de tumor por vía subcutánea de 20 mm<sup>3</sup>. Los tumores fueron monitoreados hasta que alcanzaron un volumen promedio de 100 mm<sup>3</sup>; luego, los animales fueron asignados aleatoriamente a tres grupos de tratamiento: FSA anti-HER2 (v506), FSA-ADC anti-HER2 (v6246) y anti-HER2-ADC biparatópico (v6363). Se incluyeron siete animales en cada grupo. La dosificación para cada grupo fue la siguiente:

A) Se administró FSA anti-HER2 por vía intravenosa con una dosis de carga de 15 mg/kg el día 1 del estudio y dosis de mantenimiento de 10 mg/kg administradas los días 4, 8, 11, 15, 18, 22 y 25 del estudio.

B) Se administró por vía intravenosa FSA-ADC anti-HER2 con una dosis de carga de 10 mg/kg el día 1 del estudio y luego con una dosis de mantenimiento de 5 mg/kg el día 22.

C) Se administró por vía intravenosa el anticuerpo anti-HER2 biparatópico-ADC con una dosis de carga de 10 mg/kg el día 1 del estudio y luego con una dosis de mantenimiento de 5 mg/kg el día 22.

Se midió el volumen del tumor durante todo el estudio y se evaluaron los parámetros de volumen tumoral medio, respuesta completa y enfermedad residual cero en el día 50. Los resultados se muestran en la Figura 20. Un resumen de los resultados se muestra en la Tabla 19.

El anti-HER2-ADC biparatópico y el FSA-ADC anti-HER2 demostraron una mayor inhibición del crecimiento tumoral en comparación con un FSA anti-HER2 (v506). El anti-HER2-ADC biparatópico inhibió el crecimiento del tumor mejor que el FSA-ADC anti-HER2. El grupo anti-HER2-ADC biparatópico en comparación con el grupo FSA-ADC anti-HER2 se asoció con un aumento en el número de tumores que mostraron respuestas completas (más de una disminución del 10 % por debajo del valor inicial), 7 y 4 respectivamente, y que mostraron cero enfermedad residual, 5 y 2 respectivamente.

Tabla 19:

n = 7, Día 50	v506	v6246	v6363
TV media (mm <sup>3</sup> ) ( % de cambio respecto al valor inicial)	1149 (+1018 %)	262 (+153 %)	26 (-75 %)
% de TGI	0 %	77 %	98 %
Respuesta completa (>10 % de regresión inicial)	0	4/7	7/7
Enfermedad residual cero (TV<20 mm <sup>3</sup> )	0	2/7	5/7

**Ejemplo 19:** Efecto de un conjugado de fármaco anticuerpo (ADC) anti-HER2 biparatópico en un modelo de xenoinjerto de células primarias humanas (T226)

El modelo de xenoinjerto resistente al trastuzumab derivado de pacientes de cáncer de mama humano, T226, se utilizó para evaluar la eficacia antitumoral de un ADC anti-HER2 biparatópico ejemplar.

A los ratones desnudos atímicos hembra se les inoculó el tumor mediante la inserción de un fragmento de tumor de 20 mm<sup>3</sup> por vía subcutánea. Los tumores fueron monitoreados hasta que alcanzaron un volumen promedio de 100 mm<sup>3</sup>; luego los animales fueron distribuidos aleatoriamente en cuatro grupos de tratamiento: control de IgG (n = 15), FSA anti-HER2 (v506; n = 15), FSA-ADC anti-HER2 (v6246; n = 16) y el conjugado anti-HER2-ADC biparatópico (v6363; n = 16). La dosificación para cada grupo fue la siguiente:

A) El control de IgG se administró por vía intravenosa con una dosis de carga de 15 mg/kg el día 1 del estudio y dosis de mantenimiento de 10 mg/kg administradas los días 4, 8, 11, 15, 18, 22 y 25 del estudio.

B) Se administró FSA anti-HER2 por vía intravenosa con una dosis de carga de 15 mg/kg el día 1 del estudio y dosis de mantenimiento de 10 mg/kg administradas los días 4, 8, 11, 15, 18, 22 y 25 del estudio.

C) Se administró FSA-ADC anti-HER2 por vía intravenosa con 5 mg/kg los días 1 y 15 del estudio.

D) El conjugado anti-HER2-ADC biparatópico se administró por vía intravenosa con 5 mg/kg los días 1 y 15 del estudio.

El volumen del tumor se midió durante todo el curso del estudio y el volumen tumoral medio y los parámetros de respuesta completa se evaluaron el día 31. Los resultados se muestran en la Figura 21. Un resumen de los resultados se muestra en la Tabla 20.

El anti-HER2-ADC biparatópico y el FSA-ADC anti-HER2 demostraron una mejor inhibición del crecimiento tumoral en comparación con el FSA anti-HER2 (v506) y el control de IgG. El anti-HER2-ADC biparatópico ejemplar indujo una inhibición del crecimiento tumoral equivalente y una regresión respecto al valor inicial completa en comparación con el FSA-ADC anti-HER2 (Figura 21 y Tabla 20) en este modelo.

Tabla 20:

Día 31	IgG (n = 13)	v506 (n = 13)	v6246 (n = 16)	v6363 (n = 16)
TV media (mm <sup>3</sup> ) ( % de cambio respecto al valor inicial)	1797 (+1728 %)	1611 (+1573)	422 (+332 %)	572 (+483 %)
% TGI (vs hlgG)	0 %	11 %	77 %	68 %
Respuesta completa (>10 % de regresión inicial)	0/13	0/14	1/16	1/16

**Ejemplo 20:** Efecto de un conjugado de fármaco anticuerpo (ADC) anti-HER2 biparatópico en un modelo de xenoinjerto de células primarias humanas (HBCx-5)

El modelo de xenoinjerto resistente a trastuzumab derivado del paciente de cáncer de mama humano, HBCx-5 (carcinoma ductal invasivo, luminal B), se utilizó para evaluar la eficacia antitumoral de un ADC anti-HER2 biparatópico ejemplar.

A los ratones desnudos atímicos hembra se les inoculó el tumor mediante la inserción de un fragmento de tumor de 20 mm<sup>3</sup> por vía subcutánea. Los tumores fueron monitoreados hasta que alcanzaron un volumen promedio de 100 mm<sup>3</sup>; luego los animales fueron distribuidos aleatoriamente en cuatro grupos de tratamiento: control de IgG (n = 15), FSA anti-HER2 (v506; n = 15), FSA-ADC anti-HER2 (v6246; n = 16) y el anti-HER2-ADC biparatópico (v6363; n = 16). La dosificación para cada grupo fue la siguiente:

A) El control de IgG se administró por vía intravenosa con una dosis de carga de 15 mg/kg el día 1 del estudio y dosis de mantenimiento de 10 mg/kg administradas los días 4, 8, 11, 15, 18, 22 y 25 del estudio.

B) Se administró FSA anti-HER2 por vía intravenosa con una dosis de carga de 15 mg/kg el día 1 del estudio y dosis de mantenimiento de 10 mg/kg administradas los días 4, 8, 11, 15, 18, 22 y 25 del estudio.

C) Se administró FSA-ADC anti-HER2 por vía intravenosa con 10 mg/kg los días 1 y 15, 22, 29 y 36 del estudio.

D) Se administró anti-HER2-ADC biparatópico por vía intravenosa con 10 mg/kg los días 1 y 15, 22, 29 y 36 del estudio.

Se midió el volumen del tumor durante todo el estudio y el día 43 se evaluaron el volumen tumoral medio, la relación T/C, el número de pacientes que responden, la respuesta completa y los parámetros de enfermedad residual cero. Los resultados se muestran en la Figura 22. Un resumen de los resultados se muestra en la Tabla 21.

El anti-HER2-ADC biparatópico y el FSA-ADC anti-HER2 demostraron una mejor inhibición del crecimiento tumoral en comparación con un FSA anti-HER2 (v506) y un control de IgG. El anti-HER2-ADC biparatópico ejemplar indujo una inhibición equivalente del crecimiento tumoral y tuvo un mayor número de respondedores en comparación con el FSA-ADC anti-HER2 (Figura 22 y Tabla 21) en el modelo de xenoinjerto de cáncer de mama humano HBCx-5 resistente a trastuzumab.

Tabla 21:

Día 43	IgG (n = 4)	Herceptina (n = 5)	T-DM1 (n = 7)	6363 (n = 7)
TV media (mm <sup>3</sup> ) ( % de cambio respecto al valor inicial)	922 (+693 %)	815 (+598 %)	193 (+65 %)	241 (+106 %)
Relación T/C (IgG)	1	0.88	0.21	0.26
Respondedores (TV<50 % del control)	0/4	1/5	6/7	7/7
Respuesta completa (>10 % de regresión respecto al valor inicial)	0/4	0/5	1/7	0/7
Enfermedad residual cero (TV<20mm <sup>3</sup> )	0/4	0/5	0/7	0/7

**Ejemplo 21:** Efecto de un conjugado de fármaco anticuerpo (ADC) anti-HER2 biparatópico sobre tumores resistentes al tratamiento anti-HER2 en un modelo de xenoinjerto de línea celular humana (SKOV3)

El modelo de xenoinjerto derivado de células de cáncer de ovario humano establecido SKOV3, descrito en el Ejemplo 17, se utilizó para evaluar la eficacia antitumoral de un ADC anti-HER2 biparatópico ejemplar en tumores resistentes al tratamiento anti-HER2.

Se siguieron los métodos descritos en el Ejemplo 17 con las siguientes modificaciones. A una cohorte de animales se le administró un anticuerpo anti-HER2 por vía intravenosa a razón de 15 mg/kg el día 1 del estudio y con 10 mg/kg los días 4, 8 y 15; sin embargo, este tratamiento no demostró una respuesta eficaz el día 15 en este modelo. Este grupo de tratamiento luego se convirtió al tratamiento con el conjugado de fármaco anticuerpo anti-HER2 biparatópico ejemplar (v6363) y se le administró una dosis de 5 mg/kg los días 19 y 27 del estudio y de 15 mg/kg los días 34, 41 y 48 del estudio.

El volumen del tumor se midió dos veces por semana durante el transcurso del experimento.

Los resultados se muestran en la Figura 23 e indican que el grupo tratado con anti-HER2-ADC biparatópico ejemplar (v6363) mostró regresión tumoral a un volumen tumoral medio menor que el volumen inicial medio de partida 220 mm<sup>3</sup>.

**Ejemplo 22:** Efecto de un conjugado de fármaco anticuerpo (ADC) anti-HER2 biparatópico sobre tumores resistentes al tratamiento anti-HER2 en un modelo de xenoinjerto de células primarias humanas (HBCx-13b)

El modelo de xenoinjerto derivado de paciente resistente al trastuzumab de cáncer de mama humano, HBCx-13B, se utilizó para evaluar la eficacia antitumoral de un anticuerpo anti-HER2 biparatópico ejemplar conjugado con DM1.

Se siguieron los métodos descritos en el Ejemplo 18 con las siguientes modificaciones. A una cohorte de animales se le administró un anticuerpo anti-familia ErbB biespecífico por vía intravenosa a razón de 15 mg/kg el día 1 del estudio y con 10 mg/kg los días 4, 8, 15, 18, 22 y 25; sin embargo, este tratamiento no demostró una respuesta eficaz. Este grupo de tratamiento luego se convirtió al tratamiento con el conjugado de fármaco anticuerpo anti-HER2 biparatópico ejemplar (v6363) y se le administró una dosis de 10 mg/kg los días 31 y 52 y de 5 mg/kg el día 45. El volumen del tumor se midió durante toda la duración del estudio.



Los resultados se muestran en la Figura 24. Estos resultados muestran que el anti-HER2-ADC biparatópico ejemplar (v6363) previno la progresión del tumor. Desde la primera dosis hasta el día 57, el volumen del tumor del grupo tratado con v6363 aumentó menos del 2 %, mientras que en el mismo intervalo el grupo tratado con v506 creció más del 110 %.

#### 5 **Ejemplo 23:** Análisis del contenido de fucosa de un anticuerpo anti-HER2 biparatópico ejemplar

Se realizó un análisis de glicopéptidos para cuantificar el contenido de fucosa del glicano ligado a N de los anticuerpos anti-HER2 biparatópicos ejemplares (v5019, v7091 y v10000).

El análisis de glicopéptidos se realizó de la siguiente manera. Las muestras de anticuerpos se redujeron con 10 mM de DTT a 56 °C durante 1 hora y se alquilaron con 55 mM de yodoacetamida a temperatura ambiente durante 1 hora y se digirieron en solución con tripsina en 50 mM de bicarbonato de amonio durante la noche a 37 °C. Las digestiones tripsínicas se analizaron mediante nanoLC-MS/MS en un QToF-Ultima. Se realizó una búsqueda en la base de datos del NCBI con Mascot para identificar secuencias de proteínas. Se utilizó MaxEnt3 (MassLynx) para deconvolucionar los iones de glicopéptidos y cuantificar las diferentes glicoformas.

Un resumen de los resultados del análisis de glicopéptidos se muestra en la Tabla 22. Los glicanos ligados a N de los anticuerpos anti-HER2 biparatópicos ejemplares (v5019, v7091 y v10000) están, aproximadamente, en un 90 % fucosilados (10 % de glicanos ligados a N sin fucosa). Los glicanos ligados a N del FSA anti-HER2 monoespecífico (v506) están fucosilados en un 96 % aproximadamente (4 % de glicanos ligados a N sin fucosa) y Herceptin® está aproximadamente en un 87 % fucosilado (4 % de glicanos ligados a N sin fucosa).

Tabla 22: Análisis de glicopéptidos ligados a N de Fc

Variante de anticuerpo	% medio de glicopéptidos observados con fucosa	% medio de glicopéptidos observados sin fucosa	n
v506	96.4	3.6	5
Herceptin®	86.5	13.4	4
v5019	90.5	9.4	6
v7091	89.9	26.9	3
v10000	89.2	10.7	5

Estos resultados muestran que los anticuerpos anti-HER2 biparatópicos (con un Fc heterodimérico), expresados transitoriamente en células CHO, tienen aproximadamente un 3 % más de contenido de fucosa en el N-glicano en comparación con Herceptin® comercial. El FSA anti-HER2 homodimérico (v506), expresado transitoriamente en células CHO, tiene el mayor contenido de fucosa de aproximadamente el 96 %.

#### 25 **Ejemplo 24:** Estabilidad térmica de un anticuerpo anti-HER2 biparatópico ejemplar

La estabilidad térmica de los anticuerpos anti-HER2 biparatópicos ejemplares (v5019, v7091 y v10000) y ADC (v6363, v7148 y v10533) se midió mediante DSC como se describe a continuación.

La DSC se realizó en la DSC MicroCai™ VP-Capillary (GE Healthcare) utilizando una muestra de proteína purificada (anticuerpos biparatópicos anti-HER2 y ADC biparatópicos anti-HER2) ajustados a aproximadamente 0.3 mg/mL en PBS. La muestra se escaneó de 20 a 100 °C a una velocidad de 60 °C/h, con baja retroalimentación, filtro de 8 segundos, pre-Tstat de 5 minutos y presión de nitrógeno de 70 psi. El termograma resultante se analizó utilizando el software Origin 7.

Los resultados de estabilidad térmica de los anticuerpos anti-HER2 biparatópicos ejemplares (v5019, v7091 y v10000) se muestran en la Figura 25A-C. La Figura 25A muestra el termograma para v5019; el Fc y la cadena A del Fab de cada uno tienen una T<sub>m</sub> de 75° Celsius y la cadena B del scFv de 5019 tiene una T<sub>m</sub> de 69° Celsius. La Figura 25B muestra el termograma para v10000; el dominio CH3 de Fc tiene una T<sub>m</sub> de 82° Celsius, la cadena A del Fab tiene una T<sub>m</sub> de 76.5° Celsius y la cadena B del scFv tiene una T<sub>m</sub> de 69.5° Celsius. La Figura 25C muestra el termograma para v7091; el dominio CH3 de Fc tiene una T<sub>m</sub> de 82° Celsius, la cadena A del Fab tiene una T<sub>m</sub> de 76.7° Celsius y la cadena B del scFv tiene una T<sub>m</sub> de 69.5° Celsius.

Los resultados de estabilidad térmica de los ADC anti-HER2 biparatópicos ejemplares (v6363, v7148 y v10533) se muestran en la Figura 26A-C. La Figura 26A muestra el termograma para v6363; el Fc tiene una T<sub>m</sub> de 75° Celsius y la cadena A del Fab y el dominio CH3 de Fc tienen una T<sub>m</sub> de 75° Celsius. La cadena B del scFv de 6363 tiene una T<sub>m</sub> de 69° Celsius. La Figura 26B muestra el termograma para v10553; el dominio CH3 de Fc tiene una T<sub>m</sub> de 83° Celsius, la cadena A del Fab tiene una T<sub>m</sub> de 75.7° Celsius y la cadena B del scFv tiene

una  $T_m$  de 66.2° Celsius. La Figura 26C muestra el termograma para v7148; el dominio CH3 de Fc tiene una  $T_m$  de 82.6° Celsius, la cadena A del Fab tiene una  $T_m$  de 74.8° Celsius y la cadena B del scFv tiene una  $T_m$  de 66.6° Celsius.

5 Los anticuerpos biparatómicos y ADC ejemplares tienen una estabilidad térmica comparable a la IgG de tipo silvestre.

**Ejemplo 25:** Capacidad de un anticuerpo anti-HER2 biparatómico ejemplar para provocar ADCC de células tumorales de mama que expresan niveles variables de HER2

10 Se examinó la capacidad del anticuerpo biparatómico ejemplar (v5019) para provocar ADCC dependiente de la dosis de líneas celulares de cáncer de mama que expresan HER2 positivo 3+, 2+ y 0/1+ (triple negativo). Los experimentos de ADCC se realizaron como se describe en el Ejemplo 11 con la excepción de que la relación entre células efectoras NK y células diana se mantuvo constante en 5:1.

15 Los resultados del ADCC se muestran en la Figura 27 y la Tabla 23. Los resultados de la Figura 27A-C muestran que el anticuerpo biparatómico ejemplar (v5019) provoca aproximadamente entre 1.2 y 1.3 veces mayor lisis celular máxima de células de cáncer de mama que expresan HER2 HER2 positivo 3+, 2+ y 0/1+ en comparación con Herceptin®. Los resultados también muestran que v5019 (90 % de N-glicanos con fucosa) media de manera más efectiva la ADCC del cáncer de mama que expresa HER2 HER2 positivo 3+, 2+ y 0/1+ a pesar de tener aproximadamente un 4 % más de contenido de fucosa en el N-glicano (lo que resulta en una menor afinidad de unión a CD16 en las células NK) en comparación con Herceptin® (86 % de N-glicanos con fucosa; Ejemplo 23). La mayor destrucción de células diana provocada por v5019 se debe presumiblemente a una mayor decoración de células tumorales como se describe en el Ejemplo 6.

Tabla 23: ADCC de células de cáncer de mama que expresan HER2 HER2 3+, 2+ y 0/1+

Tratamiento	SKBr3 HER2 3+		JIMT-1 HER2 2+		MDA-MB-231 HER2 0/1+	
	% máximo de lisis de células objetivo	EC <sub>50</sub> (nM)	% máximo de lisis de células objetivo	EC <sub>50</sub> (nM)	% máximo de lisis de células objetivo	EC <sub>50</sub> (nM)
v5019	30	~0.9	60	0.001	53	0.9
Herceptin®	23	~0.9	51	0.002	44	0.9

25 Los resultados de ADCC en la Figura 27D muestran que los anticuerpos biparatómicos ejemplares (v7091 y v10000) provocan una lisis celular máxima similar en comparación con Herceptin® en la línea celular WI-38 que expresa HER2 basal. Los resultados de ADCC respaldan los datos de unión celular (Ejemplo 6), mostrando que un umbral para el aumento de la unión y ADCC ocurre cuando los niveles del receptor HER2 son mayores a 10,000 HER2/célula. Con base en estos datos, se esperaría que los anticuerpos biparatómicos anti-HER2 ejemplares hubieran aumentado la unión a la superficie celular y la ADCC de las células tumorales HER2 3+, 2+ y 1+, pero no hubieran aumentado la unión a la superficie celular y la ADCC de las células no tumorales que expresan niveles basales del receptor HER2 en aproximadamente 10,000 receptores o menos.

**Ejemplo 26:** Efecto de la afucosilación de anticuerpos sobre ADCC

35 Se examinó la capacidad de los anticuerpos biparatómicos ejemplares afucosilados (v5019-afuco, 10000-afuco) para provocar ADCC dependiente de la dosis de líneas celulares de cáncer de mama que expresan HER2 HER2 positivas 2/3+, 2+ y 0/1+ (triple negativas). Los experimentos de ADCC se realizaron como se describe en el Ejemplo 11, en células SKOV3, células MDA-MB-231 y células ZR75-1 con la excepción de que se utilizó una relación constante de células efectoras NK o células efectoras PBMC a células objetivo (E:T) de 5:1. Los anticuerpos biparatómicos ejemplares afucosilados se produjeron transitoriamente en células CHO como se describe en el Ejemplo 1, utilizando la enzima RMD expresada transitoriamente como se describe en von Horsten et al. 2010 Glycobiology 20: 1607-1618. El contenido de fucosa de v5019-afuco y v10000-afuco se midió como se describe en el Ejemplo 23 y se determinó que era menos del 2 % fucosilado (datos no mostrados). Los datos que utilizan células efectoras NK se muestran en la Figura 28A-B, mientras que los datos que utilizan PBMC se muestran en la Figura 28C.

45 La Figura 28A, la Figura 28B y la Tabla 24 muestran que el v5019 afucosilado (v5019-afuco) provoca ADCC de células de cáncer de mama que expresan HER2 HER 2/3+ y 0/1+ con una lisis celular máxima aproximadamente de 1.5 a 1.7 veces mayor que la de Herceptin®.

Tabla 24: ADCC de células de cáncer de mama que expresan HER2 2/3+ y HER2 basal (triple negativo)

Tratamiento	SKOV3 HER2 2+/3+	MDA-MD-231 HER2 0/1+
-------------	------------------	----------------------

	% máximo de lisis de células objetivo	EC <sub>50</sub> (nM)	% máximo de lisis de células objetivo	EC <sub>50</sub> (nM)
v5019-afucosilado	24	~0.6	58	-0.6
Herceptin®	14	~0.6	40	-0.3

Los resultados de la Figura 28C y la Tabla 25 muestran que v10000 provoca ADCC de células de cáncer de mama ZR-75-1 HER2 2+ con una lisis celular máxima aproximadamente 1.3 veces mayor que Herceptin®, y v10000-afuco provoca una lisis celular máxima aproximadamente 1.5 veces mayor que Herceptin®.

5 Tabla 25: ADCC de células de cáncer de mama HER2 2/3+

Tratamiento	ZR-751 HER2 2+	
	% máximo de lisis de células objetivo	EC <sub>50</sub> (nM)
v10000	28	~0.06
v10000-afucosilado	32	~0.7
Herceptin®	21	~0.5

Los resultados de ADCC muestran que los anticuerpos biparatópicos afucosilados ejemplares (v5019-afuco, v10000-afuco) provocan aproximadamente un 15-25 % más de lisis celular máxima en comparación con los anticuerpos fucosilados (v5019 Ejemplo 25, v10000) cuando se utiliza Herceptin® como punto de referencia. Estos resultados muestran que la reducción del contenido de fucosa del N-glicano de Fc da como resultado un aumento de la lisis celular máxima por ADCC.

**Ejemplo 27:** Capacidad de un anticuerpo anti-HER2 biparatópico ejemplar para inhibir el crecimiento de células de cáncer de mama HER2 3+ en presencia de ligandos exógenos estimulantes del crecimiento (EGF y HRG)

Se examinó la capacidad de 5019 para inhibir el crecimiento de células de cáncer de mama HER2 3+ en presencia de ligandos estimulantes del crecimiento exógenos (EGF y HRG).

Se añadieron anticuerpos de prueba y ligando exógeno (10 ng/mL de HRG o 50 ng/mL de EGF) a las células diana BT-474 HER2 3+ por triplicado y se incubaron durante 5 días a 37 °C. La viabilidad celular se midió utilizando AlamarBlue™ (37°C durante 2 horas), absorbancia leída a 530/580 nm. Los datos se normalizaron respecto al control no tratado y el análisis se realizó utilizando GraphPad Prism.

Los resultados se muestran en la Figura 29 y la Tabla 26. Los resultados muestran que el anticuerpo biparatópico ejemplar v5019 inhibe el crecimiento de células de cáncer de mama HER2 3+ en ausencia de ligando estimulador del crecimiento (inhibición del 70 %), así como en presencia de EGF (inhibición del 40 %) o HRG (inhibición de ~10 %). El FSA monoespecífico anti-HER2 (v506) no bloquea el crecimiento de células tumorales inducido por EGF o HRG a través de otros receptores erbB EGFR y HER3. v5019 es superior a v506 en la inhibición de HER2 y la dimerización y el crecimiento dependientes de ligando a través de otros receptores erbB acompañantes.

Tabla 26: Inhibición del crecimiento de células cancerosas HER2 3+

Tratamiento	% de supervivencia		
	Solo anticuerpos	+ EGF	+ HRG
Imitar	100	122	110
v506	41	114	129
v5019	31	56	92

Estos resultados muestran que un anticuerpo biparatópico ejemplar es capaz de reducir el crecimiento dependiente de ligando de las células HER2+, presumiblemente debido a la unión del brazo de la cadena A del

Fab anti-ECD2 y al bloqueo posterior de la homo- y heterodimerización del receptor estimulada por ligando y la señalización de erbB.

**Ejemplo 28:** Efecto de un anticuerpo anti-HER2 biparatópico en un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama metastásico derivado de un paciente con HER2 3+ resistente a trastuzumab y resistente a quimioterapia (PDX) de carcinoma de mama ductal invasivo

El modelo de xenoinjerto derivado de paciente HER2 3+ (ER-PR negativo) de cáncer de mama humano ductal invasivo, HBCx-13B, se utilizó para evaluar la eficacia antitumoral de un anticuerpo anti-HER2 biparatópico ejemplar, v7187. v7187 es una versión afucosilada de v5019. El modelo es resistente al agente único trastuzumab, a la combinación de trastuzumab y pertuzumab (ver ejemplo 31), a capecitabina, docetaxel y adriamicina/ciclofosfamida.

Se inocularon ratones desnudos atímicos hembra por vía subcutánea con un fragmento de tumor de 20 mm<sup>3</sup>. Posteriormente se realizó un seguimiento de los tumores hasta alcanzar un volumen promedio de 140 mm<sup>3</sup>. Luego, los animales fueron asignados aleatoriamente a dos grupos de tratamiento: control del vehículo y v7187 con ocho animales en cada grupo. La dosificación intravenosa fue la siguiente. El control del vehículo se administró por vía intravenosa con 5 mL/kg de tampón de formulación dos veces por semana hasta el día 43 del estudio. v7187 se administró por vía intravenosa con 10 mg/kg dos veces por semana hasta el día 43 del estudio. El volumen del tumor se midió durante todo el estudio, y otros parámetros se evaluaron el día 43 como se muestra en la Tabla 27.

Los resultados se muestran en la Figura 30 y la Tabla 27. Los resultados muestran que los tumores tratados con control del vehículo mostraron una progresión continua y superaron los 1600 mm<sup>3</sup> para el día 43 del estudio. Los ratones tratados con v7187 mostraron una inhibición del crecimiento tumoral significativamente mayor (T/C = 0.44) con un volumen tumoral medio de 740 mm<sup>3</sup> el día 43. v7187 indujo respuestas en 5/8 tumores y un solo tumor mostró regresión completa con cero enfermedad residual el día 43 del estudio. Los animales tratados con v7187 tuvieron una tasa de respuesta superior con 5/8 tumores que respondieron a la terapia en comparación con 0/8 ratones tratados con el control del vehículo. Además, el tratamiento con v7187 retrasó significativamente la progresión del tumor en comparación con el control del vehículo, con tiempos de duplicación de 19 y 11 días respectivamente.

Tabla 27

Respuesta tumoral		Vehículo	V7087
Día 43	TV media (mm <sup>3</sup> ) (% de cambio respecto al valor inicial)	1683 (+1079 %)	740 (+422 %)
	Relación T/C	1	0.44
	Respondedores (TV < 50 % del control)	0/8	5/8
	PR (regresión respecto al valor inicial > 10 %)	0/8	1/8
	ZRD (TV < 20 mm <sup>3</sup> )	0/8	1/8
Tiempo de progresión	Tiempo de duplicación (días)	11	19

Estos datos muestran que el biparatópico anti-HER2 ejemplar (v7187) es eficaz en un modelo de xenoinjerto de tumor de cáncer de mama metastásico HER2 3+ resistente a Trastuzumab + Pertuzumab. El tratamiento con V7187 tiene una alta tasa de respuesta y puede perjudicar significativamente la progresión tumoral de los cánceres de mama HER2 3+ resistentes al tratamiento estándar.

**Ejemplo 29:** Evaluación de la unión de ADC anti-HER2 biparatópico a líneas de células tumorales HER2+

Se analizó la capacidad de los ADC anti-HER2 biparatópicos ejemplares para unirse y saturar las líneas de células tumorales de mama y ovario HER2 positivas 3+, 2+ mediante FACS como se describe en el Ejemplo 6.

Los datos se muestran en la Figura 31. La Figura 31A muestra la unión de v6363 a las líneas de células tumorales SKOV3 con un B<sub>máx</sub> (MFI) aproximadamente 2.0 veces mayor que T-DM1 (v6246) en concentraciones de saturación. La Figura 31B muestra que v6363 se une a las líneas de células tumorales JIMT-1 con un B<sub>máx</sub> (MFI) aproximadamente 1.6 veces mayor que T-DM1 (v6246) en concentraciones de saturación. Estos datos muestran que v6363 (ADC) tiene propiedades de unión a células tumorales similares de mayor unión a la superficie celular en comparación con el anticuerpo v5019 no conjugado original (Ejemplo 6). La conjugación de v5019 con SMCC-DM1 (v6363) no altera las propiedades de unión a antígeno del anticuerpo.

Se repitió el ensayo de unión mediante FACS para incluir una comparación directa con los anticuerpos biparatópicos ejemplares (v5019, v7091 y v10000) y ADC (v6363, v7148 y v10553). Los datos se muestran en la Figura 31C y la Figura 31D. Los ADC anti-HER2 biparatópicos ejemplares (v6363, v7148 y v10553) tienen una saturación de superficie celular equivalente ( $B_{\max}$ ) en comparación con los anticuerpos biparatópicos no marcados (v5019, v7091 y v10000).

Estos datos muestran que la conjugación de anticuerpos biparatópicos ejemplares (v5019, v7091 y v10000) con SMCC-DM1 no altera las propiedades de unión. Los ADC anti-HER2 biparatópicos anti-HER2 ejemplares (v6363, v7148 y v10553) tienen una unión a la superficie celular aproximadamente 1.5 veces (o más) mayor en comparación con un ADC anti-HER2 monoespecífico (v6246, T-DM1).

**Ejemplo 30:** Inhibición del crecimiento tumoral dependiente de la dosis de un ADC biparatópico anti-HER2 ejemplar en un modelo de xenoinjerto derivado de paciente HER2 3+ (ER-PR negativo)

El modelo de xenoinjerto derivado de paciente HER2 3+ (ER-PR negativo) de cáncer de mama humano ductal invasivo, HBCx-13B, se utilizó para evaluar la eficacia antitumoral de un ADC anti-HER2 biparatópico ejemplar, v6363. El modelo es resistente al agente único trastuzumab, a la combinación de trastuzumab y pertuzumab (ver ejemplo 31), a capecitabina, docetaxel y adriamicina/ciclofosfamida.

A los ratones desnudos atímicos hembra se les inoculó el tumor mediante la inserción subcutánea de un fragmento de tumor de 20 mm<sup>3</sup>. Los tumores fueron monitoreados hasta que alcanzaron un volumen promedio de 160 mm<sup>3</sup>; luego, los animales fueron distribuidos aleatoriamente en cinco grupos de tratamiento: control con IgG humana no específica y cuatro dosis crecientes de v6363. Se incluyeron de 8-10 animales en cada grupo. La dosificación para cada grupo fue la siguiente. El control de IgG se administró por vía intravenosa con 10 mg/kg dos veces por semana hasta el día 29 del estudio. v6363 se administró por vía intravenosa con 0.3, 1, 3 o 10 mg/kg los días 1, 15 y 29 del estudio. El volumen del tumor se evaluó durante todo el estudio y los parámetros se evaluaron como se indica en la Tabla 29.

Los resultados se muestran en la Figura 32 y la Tabla 28. Estos resultados muestran que el ADC biparatópico anti-HER2 ejemplar (v6363) media la inhibición del crecimiento tumoral dependiente de la dosis en el modelo PDX HBCx-13b resistente a Trastuzumab (Figura 32A). Además, v6363 mejoró la supervivencia general de manera dependiente de la dosis, con un tiempo de supervivencia medio de más de 63 días para dosis de 3 mg/kg y 10 mg/kg en comparación con 43 días para el control de IgG (Figura 32B y Tabla 28). La dosis de 3 mg/kg se asoció con una mayor tasa de respuesta (5/10) en comparación con el control (0/8). Todos los ratones tratados con v6363 en dosis de 10 mg/kg no sólo respondieron a la terapia (9/9) sino que también mostraron prevención de la progresión del tumor. Además, la mayoría de los tumores presentaron respuestas parciales objetivas (7/9) y, al final del estudio, muchos tenían cero enfermedad residual (6/9). v6363 fue bien tolerado en todas las dosis, no se observaron eventos adversos y no se observó pérdida de peso corporal.

Tabla 28:

Respuesta tumoral		IgG	6363 0.3 mg/kg	6363 1 mg/kg	6363 3 mg/kg	6363 10 mg/kg
Día 43	TV media (mm <sup>3</sup> ) ( % de cambio respecto al valor inicial)	1963 (+1119 %)	1916 (+1073 %)	1613 (+895 %)	1268 (+682 %)	84 (-49 %)
	Relación T/C (IgG)	1	0.97	0.82	0.64	0.04
	Respondedores (TV<50 % del control)	0/8	0/10	2/10	5/10	9/9
	PR (>10 % de regresión con respecto al valor inicial)	0/8	0/10	0/10	0/10	7/9
	ZRD (TV < 20 mm <sup>3</sup> )	0/8	0/10	0/10	0/10	6/9
Tiempo de progresión	Tiempo de duplicación del tumor (días)	9	9	14	17	52
Respuesta de supervivencia	Supervivencia media (días)	43	41	50	>63	>63

Peso corporal	% de cambio con respecto al valor inicial	+10 %	+10 %	+9 %	+5 %	+0 %
---------------	---	-------	-------	------	------	------

Estos datos muestran que el ADC biparatópico anti-HER2 ejemplar (v6363) es eficaz en un modelo de xenoinjerto de tumor de cáncer de mama metastásico HER2 3+ resistente a Trastuzumab + Pertuzumab. El tratamiento con v6363 se asocia con una alta tasa de respuesta, altera significativamente la progresión del tumor y prolonga la supervivencia en cánceres de mama HER2 3+ resistentes al tratamiento estándar.

**Ejemplo 31:** ADC anti-HER2 biparatópico comparado con las combinaciones de tratamiento estándar en el PDX HBCx-13b resistente al trastuzumab

Se evaluó la eficacia de v6363 en un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama derivado de paciente resistente a Trastuzumab, HER2 3+, ER-PR negativo (HBCx-13b), y se comparó con la combinación de: Herceptin™ + Perjeta™, y Herceptin™ + Docetaxel.

Se inocularon ratones desnudos atímicos hembra con el tumor mediante la inserción subcutánea de un fragmento de tumor de 20 mm<sup>3</sup>. Los tumores fueron monitoreados hasta que alcanzaron un volumen promedio de 100 mm<sup>3</sup>; luego los animales se dividieron aleatoriamente en 4 grupos de tratamiento (8-10 animales/grupo): control de IgG humana no específica, Herceptin™ + Docetaxel, Herceptin™ + Perjeta™, y v6363. La dosificación para cada grupo fue la siguiente. El control de IgG se administró por vía intravenosa con 10 mg/kg dos veces por semana hasta el día 29 del estudio. La combinación de Herceptin™ + Docetaxel y Herceptin™ se administró por vía intravenosa con 10 mg/kg IV dos veces por semana hasta el día 29 del estudio y se administró docetaxel por vía intraperitoneal con 20 mg/kg los días 1 y 22 del estudio. La combinación de Herceptin™ + Perjeta™ y Herceptin se administró por vía intravenosa con 5 mg/kg dos veces por semana hasta el día 29 del estudio y se le administró Perjeta™ en forma intravenosa con 5 mg/kg dos veces por semana hasta el día 29 del estudio. La dosificación de Herceptin™ y Perjeta™ se hizo al mismo tiempo. Se administró v6363 por vía intravenosa con 10 mg/kg los días 1, 15 y 29 del estudio.

Los resultados se muestran en la Figura 33 y la Tabla 29. La Figura 33A muestra el volumen del tumor a lo largo del tiempo y la Figura 33B muestra un gráfico de supervivencia. Estos resultados muestran que la combinación de Herceptin™ + Perjeta™ no produjo ninguna inhibición del crecimiento tumoral en comparación con IgG de control y superó los 1800 mm<sup>3</sup> el día 39. La combinación de Herceptin™ + Docetaxel no redujo significativamente el crecimiento del tumor, pero sí prolongó la supervivencia media a 53 días en comparación con los 43 días para el control de IgG. v6363 produjo una inhibición significativa del crecimiento del tumor (T/C – 0.04), donde todos los tumores respondieron a la terapia y 7/10 tumores experimentaron regresiones completas (enfermedad residual cero). v6363 prolongó significativamente la supervivencia en comparación con ambas terapias combinadas. Los pesos corporales entre las cohortes no se vieron afectados significativamente por los tratamientos.

Tabla 29:

Respuesta tumoral		IgG	Herceptin™ + Perjeta™	Herceptin™ + Docetaxel	v6363 10 mg/kg
Día 39	TV media (mm <sup>3</sup> ) (% de cambio respecto al valor inicial)	1809 (+1023 %)	1975 (+1085 %)	1328 (+714 %)	76 (-54 %)
	Relación T/C (IgG)	1.0	1.10	0.73	0.04
	Respondedores (TV<50 % del control)	0/8	0/8	1/10	9/9
	PR (regresión respecto al valor inicial >10 %)	0/8	0/8	0/10	8/9
	ZRD (TV < 20 mm <sup>3</sup> )	0/8	0/8	0/10	6/9
Respuesta de supervivencia	Supervivencia media (días)	43	39	53	>63
Peso corporal	% de Cambio con respecto al valor inicial	+10 %	+7 %	+3 %	-2 %

Estos resultados muestran que el ADC biparatópico anti-HER2 ejemplar (v6363) es superior a las combinaciones de tratamiento estándar con respecto a todos los parámetros evaluados en este modelo de xenoinjerto.

5 **Ejemplo 32:** Eficacia de un ADC anti-HER2 biparatópico en un modelo de xenoinjerto tumoral derivado de células de cáncer de mama resistentes a HER2+ trastuzumab

Se evaluó la eficacia de v6363 en un modelo de xenoinjerto derivado de células de cáncer de mama resistentes a HER2 3+ Trastuzumab (JIMT-1, HER2 2+) (Tanner et al. 2004. Molecular Cancer Therapeutics 3: 1585-1592).

10 A los ratones hembra RAG2 se les inoculó el tumor por vía subcutánea. Los tumores fueron monitoreados hasta que alcanzaron un volumen promedio de 115 mm<sup>3</sup>; luego los animales fueron distribuidos aleatoriamente en dos grupos de tratamiento: Trastuzumab (n = 10) y v6363. La dosificación para cada grupo fue la siguiente. Se administró trastuzumab por vía intravenosa a razón de 15 mg/kg el día 1 del estudio y 10 mg/kg dos veces por semana hasta el día 26 del estudio. Se administró v6363 por vía intravenosa a razón de 5 mg/kg los días 1 y 15 del estudio y a razón de 10 mg/kg los días 23 y 30 y a razón de 9 mg/kg los días 37 y 44.

15 Los resultados se muestran en la Figura 34 y la Tabla 30. Estos resultados muestran que v6363 inhibió significativamente el crecimiento del tumor (T/C - 0.74) en comparación con Trastuzumab el día 36 del estudio. El tratamiento con v6363 y Trastuzumab no cambió significativamente el peso corporal. La exposición en suero a v6363 fue de 17.9 µg/mL 7 días después de la primera dosis de 10 mg/kg.

Tabla 30:

Respuesta tumoral		Trastuzumab	6363
Día 36	TV media (mm <sup>3</sup> ) (% de cambio respecto al valor inicial)	718 (+541)	532 (+335 %)
	T/C (Tras) ratio	1	0.74
	Respondedores (TV<50 % del control)	1/10	2/13
	PR (regresión respecto al valor inicial >10 %)	0/10	0/13
	ZRD (TV < 20 mm <sup>3</sup> )	0/10	0/13
Peso corporal	% de Cambio con respecto al valor inicial	+5.8 %	+3.1 %
Exposición al fármaco (día 7)	Concentración en suero media (µg/mL)	187.2	17.9

20 Estos resultados muestran que el ADC biparatópico anti-HER2 ejemplar (v6363) es eficaz en un cáncer de mama resistente a Trastuzumab y tiene una utilidad potencial en el tratamiento de cánceres de mama que son resistentes a los estándares de atención actuales.

**Ejemplo 33:** Unión de FcγR a Fc heterodimérico de anticuerpos biparatópicos anti-HER2 y ADC biparatópicos anti-HER2

25 Se evaluó la unión del anticuerpo biparatópico anti-HER2 (v5019, v7019 v10000) y el ADC (v6363, v7148 y v10553) que tienen un Fc heterodimérico a los FcγR humanos y se comparó con el FSA anti-HER2 (v506) y el ADC (v6246) que tienen un Fc homodimérico.

30 La afinidad de FcγR a la región de Fc del anticuerpo se midió mediante SPR utilizando un ProteOn XPR36 (BIO-RAD). HER2 se inmovilizó (3000 RU) en el chip CM5 mediante acoplamiento de amina estándar. Los anticuerpos fueron antígenos capturados en la superficie de HER2. Se inyectó FcγR purificado en diversas concentraciones (20-30 µL/min) durante 2 minutos, seguido de una disociación de 4 minutos. Los sensogramas se ajustaron globalmente a un modelo de unión de Langmuir 1:1. Los experimentos se realizaron a 25 °C.

35 Los resultados se muestran en la Tabla 31. Los anticuerpos biparatópicos anti-HER2 heterodiméricos ejemplares y los ADC se unieron a CD16aF, CD16aV158, CD32aH, CD32aR131, CD32bY163 y CD64A con afinidades comparables. La conjugación de los anticuerpos con SMCC-DM1 no afecta negativamente la unión de FcγR. Los anticuerpos biparatópicos anti-HER2 heterodiméricos tienen una afinidad aproximadamente 1.3 a 2 veces mayor por CD16aF, CD32aR131, CD32aH en comparación con los FSA anti-HER2 homodiméricos (v506) y ADC (v6246). Estos resultados muestran que los anticuerpos biparatópicos anti-HER2 heterodiméricos

y los ADC se unen a diferentes formas polimórficas de FcγR en las células efectoras inmunes con una afinidad similar o mayor que una IgG1 homodimérica WT.

Tabla 31: Unión del FcγR humano por SPR

Variante	10 μM de CD16a v158		10 μM de CD16aF		11 μM de CD32aR131		10 μM de CD32aH		10 μM de CD32b-Y163		100 nM de CD64A	
	KD promedio	DE	KD promedio	DE	KD promedio	DE	KD promedio	DE	KD promedio	DE	KD promedio	DE
v506	1.5E-07	2E-08	7.1E-07	1.E-08	7.6E-07	1.E-07	6.3E-07	2E-08	2.4E-06	1.E-07	8.64E-10	4.33E-10
v6246	1.6E-07	2E-08	7.0E-07	9.E-09	7.4E-07	7.E-08	6.3E-07	2E-08	2.1E-06	7.E-08	1.08E-09	5.13E-10
v10000	1.2E-07	1E-08	4.8E-07	2.E-08	5.1E-07	9.E-08	4.6E-07	2E-08	1.5E-06	7.E-08	8.41E-10	4.74E-10
v10553	1.2E-07	2E-08	4.9E-07	2.E-07	3.5E-07	1.E-07	3.6E-07	4E-09	1.2E-06	7E-08	4.95E-10	1.41E-10
v7091	1.2E-07	1E-08	5.1E-07	2.E-08	5.6E-07	9.E-08	5.0E-07	3E-08	1.7E-06	8E-08	9.68E-10	5.05E-10
v7148	1.2E-07	2E-08	5.4E-07	2.E-07	3.7E-07	1.E-07	4.2E-07	1E-08	1.5E-06	1.E-07	5.77E-10	2.02E-10
v6019	1.3E-07	1E-08	5.2E-07	1.E-08	5.6E-07	6.E-08	4.7E-07	2E-08	1.6E-06	2.E-07	8.44E-10	4.68E-10
v6363	1.2E-07	2E-08	4.5E-07	1.E-07	3.5E-07	1.E-07	3.4E-07	1E-08	1.2E-06	5.E-08	4.58E-10	1.13E-10



**Ejemplo 34:** Eficacia de anticuerpos biparatópicos anti-HER2 ejemplares *in vivo* en un modelo de xenoinjerto tumoral derivado de células de cáncer de ovario sensibles al trastuzumab

El modelo de xenoinjerto derivado de células de cáncer de ovario humano establecido SKOV3, descrito en el Ejemplo 17, se utilizó para evaluar la eficacia antitumoral de los anticuerpos anti-HER2 biparatópicos ejemplares, v5019, v7091 y v10000.

Se inocularon ratones desnudos atímicos hembra con una suspensión tumoral de 325,000 células en HBSS por vía subcutánea en el flanco izquierdo. Los tumores fueron monitoreados hasta que alcanzaron un volumen promedio de 190 mm<sup>3</sup> y se inscribieron de forma aleatoria y escalonada en cuatro grupos de tratamiento: control de IgG humana no específica, v5019, v7091 y v10000. La dosificación para cada grupo fue la siguiente. Se administró IgG humana no específica por vía intravenosa a razón de 10 mg/kg a partir del día 1 del estudio dos veces por semana hasta el día 26 del estudio. Se administraron por vía intravenosa V5019, v7091 y v10000 a razón de 3 mg/kg a partir del día 1 del estudio dos veces por semana hasta el día 26 del estudio. Se midió el volumen del tumor durante todo el estudio y los parámetros enumerados en la Tabla 32 se midieron el día 29.

Los datos se presentan en la Figura 35A (crecimiento del tumor), la Figura 35B (gráfico de supervivencia) y la Tabla 32 y muestran que el tratamiento con v5019, v7091 y v10000 resultó en una inhibición del crecimiento del tumor comparable (T/C: 0.53-0.71), número de tumores que respondieron, tiempo hasta la progresión y supervivencia el día 29 del estudio en comparación con el control de IgG. La exposición en suero de v5019, v7091 y v10000 fue similar (31-41 µg/mL) el día 7 del estudio.

Tabla 32:

Respuesta tumoral		IgG (n = 8)	v5019 (n = 11)	V7091 (n = 11)	V10000 (n = 11)
Día 29	TV media (mm <sup>3</sup> ) (% de cambio respecto al valor inicial)	1903 (+899 %)	1001 (+416 %)	1354 (+618 %)	1114 (+503 %)
	Relación T/C (Tras)	1	0.53	0.71	0.58
	Respondedores (TV<50 % del control)	1/8	5/11	4/11	6/11
	PR (>10 % de regresión respecto al valor inicial)	0/8	1/11	0/11	0/11
	ZRD (TV< 20 mm <sup>3</sup> )	0/8	0/11	0/11	0/11
Tiempo de progresión	Tiempo de duplicación del tumor (días)	12	15	16	15
Supervivencia	Supervivencia media (días)	29	Na	37	41
Exposición a fármacos (día 7)	Concentración en suero media (µg/mL)	na	31.2	41.0	31.2

Estos resultados muestran que los anticuerpos biparatópicos anti-HER2 ejemplares, v5019, v7091 y v10000 tienen una utilidad potencial en el tratamiento de cánceres de ovario con sobreexpresión de HER2 moderadamente sensibles al Trastuzumab.

**Ejemplo 35:** Los anticuerpos biparatópicos anti-HER2 ejemplares inhiben de forma dependiente de la dosis el crecimiento tumoral en el xenoinjerto tumoral derivado de células de cáncer de ovario sensible al trastuzumab

El modelo de xenoinjerto derivado de células de cáncer de ovario humano establecido SKOV3, descrito en el Ejemplo 17, se utilizó para evaluar la eficacia dependiente de la dosis de un anticuerpo anti-HER2 biparatópico ejemplar, v10000.

Se inocularon ratones desnudos atímicos hembra con una suspensión tumoral de 325,000 células en HBSS por vía subcutánea en el flanco izquierdo. Los tumores fueron monitoreados hasta que alcanzaron un volumen promedio de 190 mm<sup>3</sup> y se inscribieron de forma aleatoria y escalonada en 6 grupos de tratamiento: control de IgG humana no específica y 5 dosis crecientes de v10000. Se incluyeron 9-13 animales en cada grupo. La dosificación para cada grupo fue la siguiente. El control de IgG se administró por vía intravenosa con 10 mg/kg

dos veces por semana hasta el día 26 del estudio. V10000 se administró por vía intravenosa a dosis de 0.1, 0.3, 1, 3 o 10 mg/kg dos veces por semana.

Los datos se presentan en la Figura 36 y la Tabla 33 y muestran que el tratamiento con v10000 induce de forma dependiente de la dosis una inhibición del crecimiento tumoral (T/C: 0.28-0.73) en comparación con el control de IgG. Además, v10000 se asoció de forma dependiente de la dosis con tumores que respondieron (7/9 a razón de 10 mg/kg y 3/11 a razón de 0.1 mg/kg) y aumentaron el tiempo hasta la progresión (24 días a razón de 10 mg/kg y 12 días a razón de 0.1 mg/kg) el día 29 del estudio. La exposición en suero de v10000 el día 7 dependió de la dosis y aumentó de 0.46 µg/mL con una dosis de 0.1 mg/kg a 79.3 µg/mL con una dosis de 10 mg/kg.

Tabla 33

Respuesta tumoral		IgG (n = 8)	V10000, 10 mg/kg (n = 9)	V10000, 3 mg/kg (n = 11)	V10000, 1 mg/kg (n = 11)	V10000, 0.3 mg/kg (n = 13)	V10000, 0.1 mg/kg (n = 11)
Día 29	TV media (mm <sup>3</sup> ) ( % de cambio respecto al valor inicial)	1903 (+899 %)	543 (+281 %)	1114 (+503 %)	1534 (+688 %)	1535 (+694 %)	1385 (+643 %)
	Relación T/C	1	0.28	0.58	0.81	0.81	0.73
	Respondedores (TV<50 % del control)	1/8	7/9	6/11	2/11	3/13	3/11
	PR (>10 % de regresión respecto al valor inicial)	0/8	1/9	0/11	0/11	0/13	0/11
	ZRD (TV < 20 mm <sup>3</sup> )	0/8	0/9	0/11	0/11	0/13	0/11
Tiempo de progresión	Tiempo de duplicación del tumor (días)	12	24	15	14	12	12
Exposición a fármacos (día 7)	Concentración en suero media (µg/mL)	na	79.3	31.2	4.7	1.5	0.46

Estos resultados muestran que el anticuerpo biparatómico anti-HER2 ejemplar, V10000, inhibe la progresión tumoral de una manera dependiente de la dosis.

**Ejemplo 36:** Capacidad del anticuerpo biparatómico anti-HER2 y del ADC biparatómico anti-HER2 para inhibir el crecimiento de líneas celulares que expresan HER2 y EGFR y/o HER3 en los niveles 3+, 2+ o 1+

El siguiente experimento se realizó para medir la capacidad de un anticuerpo anti-HER2 biparatómico ejemplar (v10000) y un ADC anti-HER2 biparatómico correspondiente (v10553) para inhibir el crecimiento de una selección de líneas celulares tumorales de mama, colorrectal, gástrico, pulmón, piel, ovario, renal, páncreas, cabeza y cuello, útero y vejiga que expresan HER2 y EGFR y/o HER3 en el nivel 3+, 2+, 1+ o 0+ de acuerdo con lo definido por IHC.

El experimento se llevó a cabo de la siguiente manera. La densidad de siembra óptima para cada línea celular se determinó de forma única para identificar una densidad de siembra que produjera aproximadamente un 60-90 % de confluencia después de las 72 horas de duración del ensayo. Cada línea celular se sembró a la densidad de siembra óptima, en el medio de crecimiento apropiado por línea celular, en una placa de 96 pocillos y se incubó durante 24 h a 36 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Se agregaron anticuerpos en tres concentraciones (v10000 a 300, 30 y 0.3 nM; v10553 a 300, 1, 0.1 nM), junto con los controles positivos y del vehículo. La combinación de fármacos del cóctel quimioterapéutico de control positivo consistió en 5-FU (5-fluorouracilo), paclitaxel, cisplatino, etopósido (25 µM), el control del vehículo consistió en PBS. Los tratamientos con anticuerpos y los

controles se incubaron con las células durante 72 h en una incubadora de cultivo celular a 36 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Las placas se centrifugaron a 1200 RPM durante 10 minutos y el medio de cultivo se eliminó completamente por aspiración. Se añadió medio RPMI SFM (200 µL) y MTS (20 µL) a cada pocillo y se incubó a 36 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> durante 3 h. Se leyó la densidad óptica a 490 nM y se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento en relación con el control del vehículo.

Los resultados se muestran en la Figura 37 y un resumen de todos los resultados de las pruebas se muestra en la Figura 38. La Figura 37A muestra los resultados de inhibición del crecimiento de v10000. Estos resultados muestran que v10000 puede inhibir el crecimiento de líneas celulares tumorales de mama, colorrectal, gástrico, pulmonar, cutáneo, ovárico, renal, pancreático, de cabeza y cuello, uterino y endometrial que expresan HER2 y coexpresan EGFR y/o HER3 en el nivel 3+, 2+, 1+ o 0+. La actividad de v10000 y v10553 a 300 nM se resume en la Figura 38, donde '+' indica líneas celulares que mostraron una reducción en la viabilidad celular a 300 nM que fue > 5 % del control del vehículo, y '-' indica ≤ 5 % de viabilidad del control del vehículo.

La Figura 37B muestra los resultados de la inhibición del crecimiento de v10553. Estos resultados muestran que v10553 puede inhibir el crecimiento de líneas celulares tumorales de mama, colorrectal, gástrico, pulmonar, cutáneo, ovárico, renal, pancreático, de cabeza y cuello, uterino y de vejiga que expresan HER2 y coexpresan EGFR y/o HER3 en el nivel 3+, 2+, 1+ o 0+ (ver también la Figura 38). Los resultados graficados en la Figura 37B están definidos por líneas celulares que mostraron un mínimo de inhibición del crecimiento dependiente de la dosis a 300 y 1 nM, y donde la inhibición del crecimiento a 1 nM es igual o mayor al 5 % (Figura 37B).

Estos resultados muestran que el anticuerpo biparatópico ejemplar v10000 y el ADC v10553 pueden inhibir el crecimiento de células tumorales originadas en histologías de mama, colorrectal, gástrica, pulmonar, cutánea, ovárica, renal, pancreática, de cabeza y cuello, uterina y de vejiga que expresan HER2 en los niveles 3+, 2/3+, 2+, 1+ y 0/1+ y que coexpresan EGFR y/o HER3 en los niveles 2+, 1+.

**Ejemplo 37:** Capacidad de los anticuerpos biparatópicos anti-HER2 para mediar la ADCC de las células cancerosas HER2 2+, 1+ y 0/1+

El siguiente experimento se realizó para determinar la capacidad de los anticuerpos biparatópicos anti-HER2 para mediar la ADCC de células tumorales que expresan HER2 en los niveles 2+, 1+ y/o 0/1+ y que coexpresan EGFR y/o HER3 en el nivel 2+ o 1+. Los anticuerpos biparatópicos anti-HER2 analizados fueron 5019, 10000 y 10154 (una versión afucosilada de v10000), con Herceptin™ y v506 como controles.

El experimento de ADCC se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 11 y el Ejemplo 25 con E/T: 5:1 con células efectoras NK-92 (Figura 39), y como se describe en el Ejemplo 26 con E/T 30:1 con células efectoras PBMC.

Los resultados se muestran en la Figura 39 (células efectoras NK-92) y la Figura 40 (células efectoras PBMC). La Figura 39A muestra los resultados de ADCC de la línea celular de tumor de cabeza y cuello HER2 2+ (carcinoma hipofaríngeo), FaDu, donde el biparatópico anti-HER2 provoca aproximadamente un 15 % de lisis celular máxima. La Figura 39C muestra los resultados de ADCC de la línea de células tumorales pancreáticas BxPC3 HER2 1+, y la Figura 39D los resultados de la línea de células tumorales pancreáticas MiaPaca2 HER2 2+. La Figura 39B muestra los resultados de ADCC de la línea de células tumorales de NSCLC (cáncer de pulmón de células no pequeñas) A549 HER2 0/1+. En las líneas de células tumorales BxPC3, MiaPaca2 y A549, v10000 mediaba aproximadamente el 5 % de la lisis máxima de células tumorales.

La Figura 40 muestra los resultados de ADCC en células A549, NCI-N87 y HCT-116, donde se utilizaron PBMC como células efectoras. La Figura 40A muestra los resultados de ADCC de la línea celular tumoral NSCLC A549 HER2 0/1+, donde v10000 provocó una lisis celular máxima de aproximadamente el 28 % y esto fue comparable a Herceptin™ que tiene un nivel equivalente de contenido de fucosa en el glicano ligado a N. El v10154 biparatópico 100 % afucosilado (0 % fucosa) ejemplar muestra un aumento en la lisis celular máxima (40 % de lisis celular máxima) y una mayor potencia en comparación con v10000 y Herceptina que tienen aproximadamente 88 % de fucosa en el glicano ligado a N.

La Figura 40B muestra los resultados de ADCC de la línea de células tumorales gástricas HER2 3+, NCI-N87. La Figura 40B muestra que el v5019 biparatópico ejemplar (aproximadamente 88 % fucosilado) media aproximadamente el 23 % de la lisis celular máxima y tiene un EC50 más bajo en comparación con Trastuzumab v506 (aproximadamente 98 % fucosilado).

La Figura 40C muestra los resultados de ADCC de la línea de células tumorales colorrectales HCT-116 HER2 1+. La Figura 40C muestra que el v5019 biparatópico ejemplar (aproximadamente 88 % fucosilado) media aproximadamente el 25 % de la lisis celular máxima y es más potente en comparación con Trastuzumab v506 (aproximadamente 98 % fucosilado).

Estos resultados muestran que los anticuerpos biparatópicos anti-HER2 ejemplares pueden provocar ADCC de células tumorales HER2 0/1+, 2+ y 3+ que se originan en histologías de tumores de cabeza y cuello, gástricos, de NSCLC y pancreáticos. La ADCC en presencia de células NK-92 como células efectoras tenía un

requerimiento aparente de nivel de receptor HER2 2+ (es decir, 2+ o superior) para mostrar un porcentaje más alto (> 5 %) de lisis celular máxima. Sin embargo, cuando se utilizaron células PBMC como células efectoras se alcanzaron niveles más altos de lisis celular máxima (>5 % y hasta 28 % o 40 %; v10000 y v10154, respectivamente) y fueron independientes de la densidad del receptor HER2, ya que se observó ADCC >5 % en los niveles de densidad del receptor HER2 0/1+, 1+ y 3+.

**Ejemplo 38:** Afinidad y cinética de unión de HER2 medidas mediante SPR

Como se indica en el Ejemplo 1, se construyeron anticuerpos biparatópicos anti-HER2 que tienen diferentes formatos de fracciones de unión a antígeno, como se describe en la Tabla 1. Los formatos incluían el formato scFv-scFv (v6717), el formato Fab-Fab (v6902 y v6903), junto con el formato Fab-scFv (v5019, v7091 y v10000). El siguiente experimento se realizó para comparar la afinidad de unión de HER2 y la cinética de estos formatos de anticuerpos biparatópicos anti-HER2 ejemplares.

La afinidad y la cinética de unión al ECD de HER2 murino (Sino Biological 50714-M08H) se midieron mediante cinética de ciclo único con el sistema de SPR T200 de Biacore (GE Healthcare). Se inmovilizaron entre 2000-4000 RU de Fc antihumano en un chip CM5 utilizando acoplamiento de amina estándar. 5019 fue capturado en la superficie Fc antihumana a 50 RU. Se inyectó ECD de HER2 recombinante (1.8-120 nM) a razón de 50 µL/min durante 3 minutos, seguido de una disociación de 30 minutos después de la última inyección. Las diluciones de HER2 se analizaron por duplicado. Los sensogramas se ajustaron globalmente a un modelo de enlace de Langmuir 1:1. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente, 25 °C.

Los resultados de la Tabla 34 muestran que los anticuerpos biparatópicos Fab-scFv (v5019 y v7091), las variantes Fab-Fab (v6902 y v6903) y la variante scFv-scFv (v6717) tienen una afinidad de unión comparable (1-4 nM). La variante Fab-scFv v10000 tuvo una mayor afinidad de unión (menor KD) de aproximadamente 0.6 nM. El anticuerpo ECD4 anti-HER2 monoespecífico (v506) y el anticuerpo ECD2 anti-HER2 (v4184) se incluyeron en el ensayo como controles. Estos resultados indican que los formatos moleculares que incluyen v6717, v6902, v6903, v5019 y/o v7091 tienen afinidades de unión equivalentes y, por lo tanto, las diferencias de función entre estos anticuerpos pueden considerarse resultado de diferencias en el formato.

Tabla 34

Variante de anticuerpo	Promedio			Desviación estándar		
	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
v506	7.34E+04	4.08E-05	5.56E-10	1.13.E+03	3.04E-06	3.28E-11
v4184	3.61E+04	5.46E-04	1.56E-08	7.78.E+03	2.80E-05	4.12E-09
v5019	6.01E+04	7.77E-05	1.29E-09	1.30.E+03	8.56E-07	4.24E-11
v7091	5.17E+04	1.19E-04	2.31E-09	2.70.E+03	1.49E-05	4.09E-10
v10000	6.44E+04	3.69E-05	5.79E-10	6.18.E+03	6.72.E-06	1.42.E-10
v6902	6.83E+04	1.72E-04	2.72E-09	1.93E+04	4.49E-05	1.43E-09
v6903	7.10E+04	1.71E-05	2.75E-09	3.60E+04	3.96E-06	134E-09
v6717	1.50E+05	5.33E-04	4.45E-09	1.28E+05	2.54E-04	2.11E-09

**Ejemplo 39:** Efecto del formato de anticuerpo biparatóptico anti-HER2 sobre la unión a células tumorales HER2+

Se realizó el siguiente experimento para comparar las propiedades de unión de células completas (B<sub>máx</sub> y K<sub>D</sub> aparente) de anticuerpos biparatópicos ECD2 × ECD4 anti-HER2 ejemplares que tienen diferentes formatos moleculares (por ejemplo, v6717, IgG1 scFv-scFv; IgG1 Fab-Fab v6903 y v6902; IgG1 Fab-scFv v5019, v7091 y v10000).

El experimento se realizó como se describe en el Ejemplo 6. Los resultados se muestran en la Figura 41 y las Tablas 35-38. La Figura 41A y la Tabla 35 muestran los resultados de la unión mediante FACS de los anticuerpos biparatópicos ejemplares a la línea de células de tumor de mama BT474 HER2 3+. Los resultados muestran que todos los anticuerpos anti-HER2 tienen un B<sub>máx</sub> más alto (1.5 a 1.7 veces mayor) en comparación con el anticuerpo anti-HER2 bivalente monoespecífico v506. Los formatos Fab-scFv (v5019, v7091 y v10000) y Fab-Fab (v6903) tuvieron un B<sub>máx</sub> aproximadamente 1.7 veces mayor y el formato scFv-scFv (v6717) tuvo un B<sub>máx</sub>

1.5 veces mayor en comparación con v506. Una combinación equimolar de FSA v506 y v4184 resultó en un aumento de 1.7 veces en B<sub>máx</sub>. La K<sub>D</sub> aparente de los anticuerpos biparatópicos anti-HER2 ejemplares fue aproximadamente de 2 a 3 veces mayor en comparación con el v506 monoespecífico.

Tabla 35: BT-474 que se unen mediante FACS

Variante de anticuerpos	K <sub>D</sub> (nM)	B <sub>máx</sub>
v506	9.0	23536
v10000	16	39665
v506 + v4184	16	40320
v5019	21	39727
v7091	22	36718
v6717	30	36392
v6903	31	40321

5

La Figura 41B y la Tabla 36 muestran los resultados de la unión mediante FACS a la línea de células tumorales de mama JIMT-1 HER2 2+. Los resultados muestran que todos los anticuerpos anti-HER2 tienen un B<sub>máx</sub> más alto (1.5 a 1.8 veces mayor) en comparación con el anticuerpo anti-HER2 bivalente monoespecífico v506. Los formatos Fab-scFv (v7091 y v10000) y Fab-Fab (v6903) tuvieron un B<sub>máx</sub> aumentado aproximadamente 1.7 veces, el formato scFv-scFv (v6717) tuvo un B<sub>máx</sub> aumentado 1.5 veces y la combinación Fab-scFv (v5019) y FSA (v506 + v4184) tuvo un B<sub>máx</sub> aumentado 1.8 veces en comparación con v506. La K<sub>D</sub> aparente de los anticuerpos Fab-scFv biparatópicos anti-HER2 ejemplares fue aproximadamente de 2 a 4 veces superior en comparación con el v506 monoespecífico; mientras que la K<sub>D</sub> del Fab-Fab (v6903) y scFv-scFv (v6717) fueron aproximadamente 8 veces mayores en comparación con v506.

10

15

Tabla 36: JIMT-1 que se unen mediante FACS

Variante de anticuerpos	K <sub>D</sub> (nM)	B <sub>máx</sub> .
v506	3.5	2574
v10000	7.6	4435
v506 + v4184	8.0	4617
v5019	12	4690
v7091	14	4456
v6717	26	3769
v6903	28	4452

La Figura 41C y la Tabla 37 muestran los resultados de la unión mediante FACS de los anticuerpos biparatópicos ejemplares a la línea de células tumorales de mama MCF7 HER2 1+. Los resultados muestran que la combinación del anticuerpo anti-HER2 v10000 y FSA (v506 + v4184) tiene un B<sub>máx</sub> 1.6 veces mayor en comparación con el anticuerpo anti-HER2 bivalente monoespecífico v506. El Fab-scFv (v5019, v7091) tuvo un aumento de aproximadamente 1.4 veces; el formato scFv-scFv (v6717) un aumento de 1.3 veces, y el formato Fab-Fab (v6903) tuvo un B<sub>máx</sub> 1.2 veces mayor en comparación con v506. La K<sub>D</sub> aparente del Fab-scFv biparatópico anti-HER2, Fab-Fab (v6903) y la combinación FSA (v506 + v4184) fue aproximadamente de 2 a 3 veces menor en comparación con v506; mientras que la K<sub>D</sub> del scFv-scFv (v6717) fue aproximadamente 3 veces mayor en comparación con v506.

20

25

Tabla 37: MCF7 que se unen mediante FACS

Variante de anticuerpos	K <sub>D</sub> (nM)	B <sub>máx</sub>
-------------------------	---------------------	------------------

v506 + v4184	4.5	1410
v7091	6.1	1216
v5019	6.3	1201
v10000	6.8	1381
v6903	7.1	1105
v506	12	889
v6717	32	1167

La Figura 41D y la Tabla 38 muestran los resultados de la unión mediante FACS de los anticuerpos biparatópicos ejemplares a la línea de células de tumor de mama MDA-MD-231 HER2 0/1+. Los resultados muestran que los anticuerpos anti-HER2 biparatópicos ejemplares tuvieron un B<sub>máx</sub> aproximadamente entre 1.3 y 1.4 veces mayor en comparación con el anticuerpo anti-HER2 bivalente monoespecífico v506. La combinación de FSA (v506 + v4184) tuvo una B<sub>máx</sub> 1.7 veces mayor. La K<sub>D</sub> aparente de los anticuerpos Fab-scFv biparatópicos anti-HER2 ejemplares (v5019, v7091, v10000) y la combinación de FSA (v506 + v4184) tuvieron una K<sub>D</sub> aproximadamente equivalente en comparación con v506; mientras que Fab-Fab (v6903) y scFv-scFv (v6717) tuvieron una K<sub>D</sub> aproximadamente 4 y 16 veces mayor respectivamente, en comparación con v506.

Tabla 38: MDA-MB-231 que se unen mediante FACS

Variante de anticuerpos	K <sub>D</sub> (nM)	B <sub>máx</sub>
v506	4.8	395
v10000	5.6	558
v506 + v4184	7.3	662
v7091	7.9	525
v5019	8.7	548
v6903	17	534
v6717	77	524

Los resultados de la unión de células tumorales muestran que los anticuerpos biparatópicos anti-HER2 con diferentes formatos moleculares tienen un B<sub>máx</sub> aumentado en las células tumorales HER2 3+, 2+, 1+ y 0/1+ en comparación con un anticuerpo anti-HER2 monoespecífico bivalente. De los diferentes anticuerpos biparatópicos anti-HER2, el formato scFv-scFv tuvo la ganancia de B<sub>máx</sub> más baja en relación con v506 en células tumorales HER2 3+, 2+, 1+ y 0/1+. Estos resultados también muestran que los formatos scFv-scFv y Fab-Fab tienen el mayor aumento en K<sub>D</sub> en células tumorales HER2 3+, 2+, 1+ y 0/1+ en comparación con v506 monoespecífico (aumento de 3 a 16 veces) y los formatos Fab-scFv biparatópicos (aproximadamente 2 veces o más). El aumento de K<sub>D</sub> es una indicación de una reducción en la unión ávida y sugiere que diferentes formatos biparatópicos tienen mecanismos únicos de unión a HER2 en la superficie celular.

**Ejemplo 40:** Efecto del formato de anticuerpo biparatóptico anti-HER2 sobre la internalización en células HER2+

El siguiente experimento se realizó para comparar la capacidad de anticuerpos biparatópicos ECD2 x ECD4 anti-HER2 ejemplares que tienen diferentes formatos moleculares (por ejemplo, v6717, IgG1 scFv-scFv; IgG1 Fab-Fab v6903 y v6902; IgG1 Fab-scFv v5019, v7091 y v10000) para internalizarse en células HER2+ que expresan HER2 en niveles variables.

El experimento se llevó a cabo como se detalla en el Ejemplo 9. Los resultados se muestran en la Figura 42 y las Tablas 39-41. La Figura 42A y la Tabla 39 muestran los resultados de internalización en BT-474 HER2 3+. Estos resultados muestran que el formato Fab-scFv (v10000) y la combinación de FSA (v506 + v4184) tienen cantidades 2.2 veces mayores de anticuerpos intracelulares, en comparación con el anti-HER2 monoespecífico v506. El formato scFv-scFv (v6717) tuvo 1.9 veces mayor; los formatos Fab-scFv (v5019 y v7091) tuvieron 1.5

## ES 3 014 819 T3

a 1.7 veces mayor; y los formatos Fab-Fab (v6902 y v6903) tuvieron 1.2 a 1.3 veces mayor cantidad de acumulación de anticuerpos intracelulares en comparación con v506.

Tabla 39: Internalización de BT-474

Variante de anticuerpos	Superficie 4 °C	Superficie 37 °C	Interior 37 °C
v506	2156	1590	3453
v6902	2407	2077	4035
v6903	2717	986	4573
v7091	2759	2227	5111
v5019	2867	2675	5710
v6717	2006	1212	6498
v10000	3355	2851	7528
v506 + v4184	3998	2326	7569

- 5 La Figura 42B y la Tabla 40 muestran los resultados de internalización en JIMT-1 HER2 2+. Estos resultados muestran que el formato Fab-scFv (v10000) y la combinación de FSA (v506 + v4184) tienen respectivamente 1.8 y 1.9 veces más cantidades de anticuerpo intracelular que el anti-HER2 monoespecífico v506. Los formatos scFv-scFv (v6717) y Fab-scFv (v5019) tienen cantidades 1.4 veces mayores; y los formatos Fab-scFv (v7091) y Fab-Fab (v6902 y v6903) tuvieron 1.2 veces mayor cantidad de acumulación de anticuerpos intracelulares en comparación con v506
- 10

Tabla 40: Internalización de JIMT-1

Variante de anticuerpos	Superficie 4 °C	Superficie 37 °C	Interior 37 °C
v506	337	-7.1	759
v6902	389	152	926
v7091	426	102	935
v6903	392	130	945
v5019	437	5.2	1035
v6717	247	31	1082
v10000	474	103	1375
v506 + v4184	583	89	1449

- 15 La Figura 42C y la Tabla 41 muestran los resultados de internalización en MCF7 HER2 1+. Estos resultados muestran que el formato scFv-scFv y los formatos Fab-scFv tienen cantidades 3.0 y 2.8 veces mayores de anticuerpos intracelulares, en comparación con el anti-HER2 monoespecífico v506. El formato Fab-scFv (v10000) y la combinación de FSA (v506 + v4184) tienen aproximadamente 2.0 veces mayor cantidad; los formatos Fab-scFv (v7091) y Fab-Fab (v6903) tienen cantidades 1.8 veces mayores de acumulación de anticuerpos intracelulares en comparación con v506.

Tabla 41: Internalización de MCF7

Variante de anticuerpos	Superficie 4 °C	Superficie 37 °C	Interior 37 °C
v506	48	10	48
v7091	77	27	87

v6903	81	35	89
v10000	78	20	96
v506 + v4184	87	19	103
v5019	81	17	134
v6717	48	31	145

Estos resultados muestran que los anticuerpos anti-HER2 biparatópicos con diferentes formatos moleculares tienen grados únicos de internalización en las células tumorales HER2 3+, 2+ y 1+ que varían con respecto a la estructura y el formato de los dominios de unión a antígeno. En general, la combinación monoespecífica de FSA de v506 y v4184, los formatos biparatópicos Fab-scFv (v10000, v7091 y v5019) y scFv-scFv (v6717) tuvieron valores de internalización más altos en las células tumorales HER2 3+, 2+ y 1+. Mientras que, los formatos biparatópicos Fab-Fab (v6902 y v6903) tuvieron los valores de internalización más bajos en las células tumorales HER2 3+, 2+ y 1+. Estos datos sugieren que el formato molecular y el espaciado geométrico de los dominios de unión a antígeno tienen una influencia sobre la capacidad de los anticuerpos biparatópicos de unirse en forma cruzada a los receptores HER2 y, posteriormente, internalizarse en las células tumorales HER2+. El formato biparatópico Fab-Fab, que tiene la mayor distancia entre los dos dominios de unión a antígeno, resultó en el menor grado de internalización, mientras que los formatos Fab-scFv y scFv-scFv, que tienen distancias más cortas entre los dominios de unión a antígeno, tuvieron una mayor internalización en las células HER2+. Esto es coherente con la correlación de potencia y longitud de enlace más corta como se describe en Jost et al. 2013, Structure 21, 1979-1991).

#### **Ejemplo 41:** Efecto del formato de anticuerpo biparatópico anti-HER2 sobre ADCC en células HER2+

El siguiente experimento se realizó para comparar la capacidad de anticuerpos biparatópicos ECD2 x ECD4 anti-HER2 ejemplares que tienen diferentes formatos moleculares (por ejemplo, v6717, IgG1 scFv-scFv; IgG1 Fab-Fab v6903 y v6902; IgG1 Fab-scFv v5019, v7091 y v10000) para mediar ADCC en células HER2+ que expresan HER2 en niveles variables.

Antes de realizar el ensayo ADCC, se realizó un análisis de glicopéptidos en las muestras de anticuerpos para cuantificar el contenido de fucosa en el glicopéptido ligado a N. Se siguió el método descrito en el Ejemplo 23. Los resultados se muestran en la Tabla 42; los datos muestran que las variantes biparatópicas ejemplares v5019, v6717, v6903 tienen un contenido de fucosa equivalente en el glicano ligado a N (91-93 %). Se seleccionaron muestras de anticuerpos con niveles equivalentes de fucosa en el N-glicano para el ensayo de ADCC para normalizar el contenido de fucosa en la interpretación de los resultados del ensayo de ADCC.

Tabla 42: Análisis de péptidos tripsidicos mediante LC-MS

Variante	Porcentaje de glicopéptidos observados CON fucosa	Porcentaje de glicopéptidos observados SIN fucosa
v6903	90.7	9.3
v6717	92.8	7.2
v5019	91.3	8.7

El experimento de ADCC se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 11 con E/T: 5:1 con células efectoras NK-92. Los resultados del ADCC se muestran en la Figura 43 y las Tablas 43-45. La Figura 43A y la Tabla 43 muestran los resultados de ADCC en células tumorales de mama JIMT-1 HER2 2+. Estos datos muestran que v5019, v6717 y v6903 provocan niveles similares de lisis celular máxima y que el formato scFv-scFv (v6717) es menos potente en comparación con v5019 y v6903 cuando las células tumorales HER2 2+ son el objetivo.

Tabla 43: ADCC de JIMT-1

Variante de anticuerpos	EC <sub>50</sub> (nM)	% de Lisis celular máxima
v6903	~ 0.03	48
v5019	~ 0.16	47



v6717	~ 0.72	51
-------	--------	----

La Figura 43B y la Tabla 44 muestran los resultados de ADCC en células tumorales de mama MCF7 HER2 1+. Estos datos muestran que v5019 y v6717 tienen una lisis celular máxima ligeramente mayor (27-30 %) en comparación con v6903 (24 %). Estos datos también muestran que v6717 es el menos potente, seguido de v6903 y v5019, que tienen valores de EC<sub>50</sub> más bajos.

Tabla 44: ADCC de MCF7

Variante de anticuerpos	EC <sub>50</sub> (nM)	% de Lisis celular máxima
v5019	~ 0.69	27
v6717	109	30
v6903	0.94	24

La Figura 43C y la Tabla 45 muestran los resultados de ADCC en células de tumor de mama MDA-MB-231 HER2 0/1+. Estos datos muestran que v5019 muestra una lisis celular máxima ligeramente superior (77 %) en comparación con v6903 (62 %) y v6717 (63 %). Estos datos también muestran que el v6717 es el menos potente, seguido del v6903 y el v5019, que tienen valores de EC<sub>50</sub> más bajos.

Tabla 45: ADCC de MDA-MB-231

Variante de anticuerpos	de EC <sub>50</sub> (nM)	% de Lisis celular máxima (solo en la parte superior)
v5019	0.20	71
v6717	10	63
v6903	0.79	62

Estos datos muestran que los anticuerpos biparatópicos ECD2 x ECD4 anti-HER2 ejemplares provocan niveles similares de lisis celular máxima por ADCC en células tumorales HER2 2+ y 1+. A pesar de las similitudes en la lisis celular máxima, estos datos también muestran que los diferentes formatos moleculares tienen potencias de ADCC únicas. El scFv-scFv fue el menos potente (los valores de EC<sub>50</sub> mayores) en HER2 2+ y HER2 1+. Se observaron potencias diferenciales entre los tres formatos en los datos de ADCC dirigidos a las células HER2 1+, donde los valores de EC<sub>50</sub> para v6717 > v6903 > v5019. Estos datos son consistentes con las observaciones presentadas en el Ejemplo 40 (unión mediante FACS), donde un aumento en K<sub>D</sub> (afinidad reducida) se observó con los formatos Fab-Fab y scFv-scFv.

**Ejemplo 42:** Efecto del formato de anticuerpo biparatópico anti-HER2 sobre el crecimiento de células tumorales HER2

El siguiente experimento se realizó para comparar el efecto del formato de anticuerpo biparatópico anti-HER2 sobre el crecimiento de células tumorales HER2 3+, 2+ y 1+, ya sea crecimiento basal o estimulado por ligando. El crecimiento basal se midió como se describe en el Ejemplo 15, mientras que el crecimiento estimulado por ligando se midió como se describe en el Ejemplo 27. En ambos tipos de experimentos, el crecimiento se midió como % de supervivencia con respecto al tratamiento de control.

La Figura 44 y la Tabla 46 muestran el efecto de anticuerpos biparatópicos ECD2 x ECD4 anti-HER2 ejemplares sobre el crecimiento de células de cáncer de mama HER2 3+ (BT-474) en presencia de ligandos estimuladores del crecimiento exógeno (EGF y HRG). En ausencia de EGF o HRG, los anticuerpos biparatópicos anti-HER2 pudieron inhibir el crecimiento de las células BT-474, donde el % de supervivencia de cada grupo de tratamiento se clasificó de la siguiente manera: v6903 < v506 + v4184 < 506 < v7091 < v5019 < v10000 < v6717. En presencia de HRG, la inhibición del crecimiento en relación con el control simulado se logró solo con la combinación de FSA de v506 + v4184. En presencia de EGF, se logró una inhibición del crecimiento en relación con el control simulado, donde el % de supervivencia de cada grupo de tratamiento se clasificó de la siguiente manera: v6903 < v506 + v4184 < 7091 < v10000 < 5019.

Tabla 46

Tratamiento	% de supervivencia		
	Solo anticuerpo	+ HRG	+ EGF
Simulado	100	143	131
v6717	113	126	129
v10000	70	118	78
v5019	67	133	81
v7091	61	119	61
v506	53	141	118
v506 + v4184	43	89	45
v6903	32	120	39

La Figura 45 muestra el efecto dependiente de la dosis de los formatos de anticuerpos biparatómicos anti-HER2 sobre la inhibición del crecimiento de la línea celular SKBr3 HER2 3+. Los datos son consistentes con los resultados presentados en la Figura 44, donde el orden de intervalo de potencia/eficacia de los formatos biparatómicos es el siguiente: Fab-Fab > Fab-scFv > scFv-scFv en células tumorales HER2 3+.

El efecto de los formatos de anticuerpos biparatómicos anti-HER2 sobre la supervivencia de las células HER2+ se muestra en la Figura 46, donde la Figura 46A muestra el resultado en la línea celular SKOV3 HER2 2+/3+ sensible a Trastuzumab a 300 nM; la Figura 46B muestra el resultado en células JIMT-1 HER2 2+ (resistentes a Trastuzumab) a 300 nM, y la Figura 46C muestra el resultado en la línea celular MCF7 HER2 1+ a 300 nM. En la línea celular SKOV3, se observó poca diferencia entre los formatos biparatómicos en el grado de inhibición del crecimiento, y no se observó inhibición del crecimiento por ninguno de los anticuerpos de prueba en las células JIMT-1 y MCF7.

Los datos de la Figura 44 y la Figura 45 muestran que los anticuerpos biparatómicos ECD2 x ECD4 anti-HER2 con los formatos Fab-scFv y Fab-Fab (v5019, v7091, v10000, v6903) son capaces de inhibir el crecimiento de células tumorales HER2 3+ en ausencia y presencia de EGF o HRG. En las líneas celulares HER2 3+ BT-474 y SKBR3, la inhibición del crecimiento en relación con el control simulado se ordenó de la siguiente manera, donde v506 + v4184 > v6903 > v7091 > v10000 > v5019 > v506 > v6717. La distancia entre los dominios de unión a antígeno (Fab-Fab > Fab-scFv > scFv-scFv) se correlaciona con el orden de clasificación de la inhibición del crecimiento en las células tumorales HER2 3+. Con base en los datos de las células tumorales sensibles al trastuzumab, BT-474 y SKBR3, se puede esperar que la diferencia de inhibición del crecimiento entre formatos sea significativa en el nivel de HER2 3+, pero menos en los niveles de HER2 2+ o HER2 1+.

**Ejemplo 43:** Evaluación de la afinidad de unión y la cinética de HER2 a distintos niveles de captura de anticuerpos

El siguiente experimento se realizó para comparar la cinética de unión de HER2 (kd, constante de disociación) de anticuerpos biparatómicos ECD2 x ECD4 anti-HER2 ejemplares cuando se capturan en diferentes densidades de superficie mediante SPR. La correlación entre una constante de disociación reducida (más lenta) con niveles crecientes de captura de anticuerpos (densidad de superficie) es una indicación de unión Trans (es decir, una molécula de anticuerpo que se une a dos moléculas de HER2, descrita en el Ejemplo 12). En este experimento, se comparó el formato Fab-Fab (v6903) con el formato Fab-scFv (v7091) para determinar la diferencia potencial en la unión Trans entre las variantes. Debido a la mayor distancia espacial entre los dominios de unión a antígeno, se plantea la hipótesis de que el formato Fab-Fab puede ser capaz de unirse en Cis (activando ECD 2 y 4 en una molécula HER2); mientras que Fab-scFv no sería capaz de unirse en Cis debido a la distancia más corta entre sus dominios de unión a antígeno. Se incluyó el anti-HER2 monoespecífico v506 como control.

El experimento se realizó mediante SPR como se describe en el Ejemplo 12. Los datos se muestran en la Figura 47. La Figura 47A muestra la gráfica y el análisis de regresión lineal para la kd (1/s) en diferentes niveles de captura de anticuerpos con v6903 y v7091. Tanto v7091 como v6903 muestran una tendencia a la disminución de la constante de disociación a medida que aumentan los niveles de captura de superficie; sin embargo, la correlación es significativa con la variante Fab-scFv (v7091; valor P = 0.023) pero no con el formato Fab-Fab (v6903; valor P = 0.053). La constante de disociación se mantuvo sin cambios con diferentes niveles de captura de anticuerpos para el control monoespecífico anti-HER2, v506.

La Figura 47B muestra el gráfico y el análisis de regresión lineal para la  $K_D$  (M) en diferentes niveles de captura de anticuerpos con v6903 y v7091. De manera similar a la comparación de la constante de disociación, tanto v7091 como v6093 muestran una tendencia hacia una mayor afinidad (menor valor de  $K_D$ ) con niveles crecientes de captura de superficie. Sin embargo, la correlación es significativa con la variante Fab-scFv (v7091; valor  $P = 0.04$ ) pero no con el formato Fab-Fab (v6093; valor  $P = 0.51$ ). La  $K_D$  se mantuvo sin cambios con diferentes niveles de captura de anticuerpos para el control monoespecífico anti-HER2, v506. Los datos de la Figura 47 muestran que los formatos de anticuerpos biparatómicos anti-HER2 Fab-Fab y Fab-scFv muestran tendencias de disminución de las constantes de disociación a medida que aumentan los niveles de captura de superficie del anticuerpo; estas tendencias son únicas en comparación con un anticuerpo anti-Her2 monoespecífico.

#### **Ejemplo 44:** Modificación de la afinidad y estabilidad del Fab Pertuzumab

Como se indica en la Tabla 1, una variante (v10000) contiene mutaciones en el Fab Pertuzumab. Este Fab se derivó de esfuerzos *in silico* de modificación de la afinidad y estabilidad, que se midieron experimentalmente como anticuerpos monovalentes o de un solo brazo (OAA).

Variante 9996: un anticuerpo anti-HER2 monovalente, donde el dominio de unión de HER2 es un Fab derivado de pertuzumab en la cadena A, con Y96A en la región de VL y T30A/A49G/L69F en la región de VH (numeración de Kabat) y la región de Fc es un heterodímero que tiene las mutaciones T350V\_L351Y\_F405A\_Y407V (numeración de la UE) en la Cadena A, T350V\_T366L\_K392L\_T394W (numeración de la UE) en la Cadena B, y la región bisagra de la Cadena B que tiene la mutación C226S; el dominio de unión a antígeno se une al dominio 4 de HER2.

Variante 10014: un anticuerpo anti-HER2 monovalente, donde el dominio de unión de HER2 es un Fab derivado de pertuzumab en la cadena A, con Y96A en la región de VL y T30A en la región de VH (numeración de Kabat) y la región de Fc es un heterodímero que tiene las mutaciones T350V\_L351Y\_F405A\_Y407V (numeración de la UE) en la Cadena A, T350V\_T366L\_K392L\_T394W (numeración de la UE) en la Cadena B, y la región bisagra de la Cadena B que tiene la mutación C226S; el dominio de unión a antígeno se une al dominio 4 de HER2.

Variante 10013: un anticuerpo anti-HER2 monovalente, donde el dominio de unión de HER2 es un Fab derivado de pertuzumab de tipo silvestre en la cadena A, y la región de Fc es un heterodímero que tiene las mutaciones T350V\_L351Y\_F405A\_Y407V (numeración de la UE) en la Cadena A, T350V\_T366L\_K392L\_T394W (numeración de la UE) en la Cadena B, y la región de bisagra de la Cadena B que tiene la mutación C226S; el dominio de unión a antígeno se une al dominio 4 de HER2.

Los siguientes experimentos se realizaron para comparar la afinidad de unión de HER2 y la estabilidad de las variantes de Pertuzumab modificadas.

Las variantes de OAA se clonaron y expresaron como se describe en el Ejemplo 1.

Los OAA se purificaron mediante cromatografía con proteína A y cromatografía de exclusión por tamaño, como se describe en el Ejemplo 1.

La pureza del heterodímero (es decir, la cantidad de OAA con un Fc heterodimérico) se evaluó mediante un ensayo de expresión de proteínas de alto rendimiento no reductor utilizando Caliper LabChip GXII (Perkin Elmer n.º 760499). Los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con el manual del usuario de LabChip GXII de HT Protein Express versión 2, con las siguientes modificaciones. Se agregaron muestras de heterodímeros, a 2  $\mu$ L o 5  $\mu$ L (intervalo de concentración 5-2000 ng/ $\mu$ L), a pocillos separados en placas de 96 pocillos (BioRad n.º HSP9601) junto con 7  $\mu$ L de tampón de muestra HT Protein Express (Perkin Elmer n.º 760328). Luego, las muestras de heterodímero se desnaturalizaron a 70 °C durante 15 minutos. El instrumento LabChip funciona utilizando el chip HT Protein Express (Perkin Elmer n.º 760499) y la configuración de ensayo Ab-200. Después de su uso, el chip se limpió con agua MilliQ y se almacenó a 4 °C.

La estabilidad de las muestras se evaluó midiendo la temperatura de fusión o  $T_m$ , determinada por DSC con el protocolo que se muestra en el ejemplo 24. La DSC se midió antes y después de la purificación por SEC.

La afinidad hacia ECD de HER2 de las muestras se midió mediante SPR siguiendo el protocolo del ejemplo 12. La SPR se midió antes y después de la purificación por SEC. Como se resume en la Tabla 47A y 47B, las mutaciones en el dominio variable han aumentado la afinidad de Fab por HER2 en comparación con el pertuzumab de tipo silvestre, manteniendo al mismo tiempo la estabilidad de WT. (<sup>1</sup> Pureza determinada por Caliper LabChip; <sup>2</sup> KD(WT)/KD(mut)

Tabla 47A:

Variante de los OAA	Mutaciones de HC de Fab	Mutaciones de LC	Rendimiento de Pr-A (mg/L)	SPR pre-SEC				Pureza Het post-SEC <sup>1</sup>	SPR después de la SEC			
				KD PROMEDIO (nM)	KD DESVIACIÓN ESTÁNDAR (nM)	n	Veces con respecto a WT <sup>2</sup>		KD PROMEDIO (nM)	KD DESVIACIÓN ESTÁNDAR (nM)	n	Veces con respecto a WT
v9996	T30A/A49G /L69F	Y98A	22	1.7E-09	1.7E-10	5	9.6	93 %	1.8E-09	1.6E-11	2	8.4
v10014	T30A	Y98A	20	2.0E-09	3.1E-10	4	8.1	81 %	2.1E-09	5.2E-10	3	7.0
v10013	WT	WT	18	1.6E-08	5.1E-09	16	1.0	91 %	1.5E-08	3.5E-09	4	1.0

Tabla 47B:

Variante de los OAA	DSC pre-SEC		DSC post-SEC	
	Tm (C)	$\Delta Tm$ con respecto al WT (C)	Tm (C)	$\Delta Tm$ con respecto al WT (C)
v9996	77.2	-0.2	77.2	-0.7
v10014	75.5	-1.9	75.5	-2.4
v10013	77.4	0.0	77.9	0.0

**Ejemplo 45:** Efecto de v10000 sobre la supervivencia y el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) con bajo nivel de HER2

- 5 Este experimento se realizó para evaluar la eficacia de v10000 en comparación con el IgG de control (v6908) en un modelo de xenoinjerto A549 de cáncer de pulmón. Las células A549 se derivan de cáncer de pulmón de células no pequeñas no escamosas que tiene HER2 bajo, gen HER2 no amplificado, HER3, EGFR bajo y es moderadamente sensible al cisplatino a la MTD (dosis máxima tolerada). El estudio se llevó a cabo como se describe a continuación.
- 10 Se implantaron suspensiones de células tumorales por vía subcutánea en ratones desnudos atímicos. Cuando los tumores alcanzaron los 158 mm<sup>3</sup> los animales fueron asignados aleatoriamente a grupos como se muestra en la Tabla A1, y el tratamiento comenzó en un estudio ciego y controlado. Los animales fueron tratados de acuerdo con el Régimen 1 el día 1, seguido del tratamiento de acuerdo con el Régimen 2 en los días posteriores como se indica en la Tabla A1.

Tabla A1. Diseño del estudio

Grupo (n)	Régimen 1				Régimen 2			
	Agente	Dosis (mg/kg)	Ruta	Cronograma	Agente	Dosis (mg/kg)	Ruta	Cronograma
1 (20)	v6908	15	iv	Día 1	v6908	10	iv	Días 4, 8, 11, 15, 18, 22 y 25
2 (20)	v10000	15	iv	Día 1	v10000	10	iv	Días 4, 8, 11, 15, 18, 22 y 25

- 15 El volumen del tumor se midió con calibradores dos veces por semana. La duración del estudio fue de 66 días y la supervivencia fue el criterio principal de valoración. Se midieron criterios adicionales de respuesta tumoral y se muestran en la Tabla A2. Los ratones fueron sacrificados cuando el volumen del tumor superó los 800 mm<sup>3</sup>, el porcentaje de supervivencia versus el día del estudio se graficó en un Kaplan-Meier y se evaluó estadísticamente utilizando una prueba de intervalo logarítmico. La concentración en suero de v10000 se determinó mediante ELISA de HER2 el día 7 del estudio.
- 20

- 25 Los resultados se muestran en la Figura 48A (volumen del tumor) y la Figura 48B (supervivencia de Kaplan-Meier). La variante 10000 redujo el crecimiento del tumor en comparación con los controles tratados con v6908 y prolongó significativamente la supervivencia mediante la prueba de intervalo logarítmico (Figura 48B y Tabla A3). Los animales tratados con v10000 tuvieron una supervivencia media de más de 66 días, mientras que los tratados con v6908 tuvieron una supervivencia media de 25.78 días (Fig. 48B y Tabla A2). El volumen del tumor en el día 30 del estudio fue de 461 mm<sup>3</sup> y 810 mm<sup>3</sup> para los grupos tratados con v10000 y v6908 respectivamente (Fig. 48A y Tabla A2). La exposición en suero fue de 140.9 µg/mL el día 7 del estudio, lo que indica que se alcanzó la concentración en suero predicha.

- 30 Estos resultados muestran que el tratamiento con v10000 fue capaz de reducir el crecimiento del tumor y prolongar la supervivencia en comparación con el tratamiento con un hlgG de control en este modelo de NSCLC sin amplificación genética y con bajo nivel de HER2.

Tabla A2: Perfil de respuesta tumoral de A549

	6908	10000
Respuesta tumoral el día 30		

TV media (mm <sup>3</sup> )(% de $\Delta$ con respecto al valor inicial)	810 (413 %)	461(191 %)
Relación tratamiento/control	1.00	0.57
Puntuaciones RECIST		
CR (TV<20 mm <sup>3</sup> )	0/20	0/20
PR (>30 % de regresión con respecto al valor inicial)	0/20	1/20
PD (>20 % de crecimiento respecto al valor inicial)	20/20	19/20
SD (ni PD ni PR)	0/20	0/20
Tiempo medio hasta la progresión (días)	3.30	2.31
Respuesta de supervivencia		
Supervivencia media (días)	25.78	>66
CR-Respuesta completa		
PR-Respuesta parcial		
PD-Enfermedad progresiva		
SD-Enfermedad estable		

Tabla A3: Resumen de intervalo logarítmico

Grupo	6908
6908	-
10000	★★★
Leyenda: ns = no significativo, ★ = P<0.05. ★★ = P<0.01, ★★★ = P<0.001	

**Ejemplo 46:** Efecto de v10000 sobre la supervivencia y el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello con bajo nivel de HER2

Este experimento se realizó para evaluar la eficacia de v10000 en comparación con Herceptin™ (v6336) e IgG humana de control (v6908) en el modelo de xenoinjerto FaDu de cáncer de cabeza y cuello. Las células FaDu se derivan del cáncer de células escamosas de cabeza y cuello que tiene un bajo nivel de HER2, un gen HER2 no amplificado, HER3+, EGFR+ y es altamente sensible al cisplatino en la MTD. El estudio se llevó a cabo como se describe a continuación.

Se implantaron suspensiones de células tumorales por vía subcutánea en ratones desnudos atímicos. Cuando los tumores alcanzaron los 121 mm<sup>3</sup> los animales fueron asignados aleatoriamente a grupos como se muestra en la Tabla A4, y el tratamiento comenzó en un estudio ciego y controlado. El cisplatino fue adquirido y proporcionado para el estudio por Charles River Laboratories (Morrisville, NC). Los animales fueron tratados de acuerdo con el Régimen 1 el día 1, seguido del Régimen 2 en los días posteriores como se indica en la Tabla A4.

Tabla A4. Diseño del estudio

Grupo (n)	Régimen 1				Régimen 2			
	Agente	Dosis (mg/kg)	Ruta	Cronograma	Agente	Dosis (mg/kg)	Ruta	Cronograma
1 (15)	v6908	15	iv	Día 1	v6908	10	iv	Días 4, 8, 11, 15, 18, 22 y 25

### ES 3 014 819 T3

2 (15)	v6336	15	iv	Día 1	v6336	10	iv	Días 4, 8, 11, 15, 18, 22 y 25
3 (15)	v10000	15	iv	Día 1	v10000	10	iv	Días 4, 8, 11, 15, 18, 22 y 25
4 (15)	Cisplatino	2	ip	Día 1, 3, 5, 7, 9, 11				

Estos resultados muestran que el tratamiento con v10000 como monoterapia fue capaz de disminuir el volumen del tumor y prolongar la supervivencia, en comparación con el tratamiento con IgG de control en este modelo de cáncer de cabeza y cuello no amplificado por el gen bajo en HER2. En general, v10000 mostró una tendencia hacia la disminución del volumen del tumor en comparación con v6336 (Herceptin™).

5

La variante 10000 también se probó en combinación con cisplatino. La combinación de v10000 y cisplatino prolongó significativamente la supervivencia en comparación con v6908, v6336 y cisplatino como agente único (Tabla A5). La supervivencia media de la combinación de v10000 y cisplatino fue de 53 días, mientras que la supervivencia media de v6908, v6336 y cisplatino como agente único fue de 25, 40 y 40 días, respectivamente.

10

Estos resultados demuestran que el tratamiento con v10000 en combinación con cisplatino fue capaz de disminuir el crecimiento del tumor y prolongar la supervivencia en comparación con v6908 y v6336, en este modelo de cáncer de cabeza y cuello.

Tabla A5: Perfil de respuesta tumoral de FaDu

	6908	6336	10000	cisplatino	10000+ cisplatino
Respuesta tumoral el día 25					
TV media (mm <sup>3</sup> )(% de $\Delta$ desde la línea base)	1979 (1532 %)	1257 (929 %)	1025 (782 %)	1070 (782 %)	816 (573 %)
Relación tratamiento/control	1.00	0.63	0.52	0.54	0.41
Puntuaciones RECIST					
CR (TV<20 mm <sup>3</sup> )	0/15	0/14			0/15
PR (>30 % regresión con respecto al valor inicial)	0/15	0/14	0/15	0/15	0/15
PD (>20 % de crecimiento respecto al valor inicial)	15/15	14/14	15/15	15/15	15/15
SD (ni PD ni PR)	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
Tiempo medio hasta la progresión (días)	5.9	7.6	7.8	8.4	10.8
Respuesta de supervivencia					
Supervivencia media (días)	25	40	46	40	53
CR-Respuesta Completa					
PR-Respuesta parcial					
PD-Enfermedad progresiva					
SD-Enfermedad estable					

Tabla A6: Resumen de intervalo logarítmico

Grupo	6908	6336	10000	Cisplatino
-------	------	------	-------	------------

6908	-	-	-	-
6336	**	-	-	-
10000	***	n/s	-	-
Cisplatino	***	n/s	★	-
10000 + Cisplatino	***	★	n/s	***
Leyenda: ns = no significativo, ★ = P<0.05, ** = P<0.01, *** = P<0.001				

**Ejemplo 47:** Efecto de v10000 sobre la supervivencia y la inhibición del crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama HER2 1+, ER+

Este experimento se realizó para evaluar la eficacia de v10000 en comparación con un IgG de control (v6908) o Herceptin™ (v6336) en el modelo de xenoinjerto ST1337B de cáncer de mama. ST1337B es un xenoinjerto derivado de paciente (PDX) establecido en ratones desnudos a partir de un cáncer de mama ER+/PR- con una clasificación molecular luminal B. ST1337 es HER2 1+ de acuerdo con lo medido por IHC. El estudio se llevó a cabo como se describe a continuación.

Se implantaron fragmentos de tumores por vía subcutánea en ratones desnudos atímicos. Cuando los tumores alcanzaron los 180 mm<sup>3</sup> los animales fueron asignados aleatoriamente a grupos como se muestra en la Tabla A7 y el tratamiento comenzó en un estudio ciego y controlado. Los animales fueron tratados de acuerdo con el Régimen 1 como se muestra en la Tabla A7.

Tabla A7. Diseño del estudio

Grupo (n)	Régimen 1			
	Agente	Dosis (mg/kg)	Ruta	Cronograma
1 (15)	v6908	30	iv	Días 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25, 28 y 32
2 (15)	V6336	10	iv	Días 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25, 28 y 32
3 (15)	v10000	3	iv	Días 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25, 28 y 32
4 (15)	v10000	10	iv	Días 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25, 28 y 32
5 (15)	v10000	30	iv	Días 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25, 28 y 32

El volumen del tumor se midió con calibradores dos veces por semana. La duración del estudio fue de 63 días y la supervivencia fue el criterio principal de valoración. Se midieron criterios de respuesta tumoral adicionales y se muestran en la Tabla A8. Los ratones fueron sacrificados cuando el volumen del tumor superó los 2000 mm<sup>3</sup>, el porcentaje de supervivencia versus el día del estudio se graficó en un Kaplan-Meier y se evaluó estadísticamente utilizando una prueba de intervalo logarítmico. La concentración en suero de v10000 y v6336 se determinó mediante ELISA de HER2 el día 7 del estudio y el día 36, 4 días después de la última dosis el día 32.

Los resultados se muestran en la Figura 50A (volumen del tumor) y la Figura 50B (supervivencia de Kaplan-Meier). El tratamiento con la variante 10000 en todas las dosis probadas redujo el crecimiento del tumor en comparación con el tratamiento con v6908 y prolongó significativamente la supervivencia mediante la prueba de intervalo logarítmico en comparación con v6908 (Figura 50B y Tabla A9). Además, el tratamiento con v10000 a razón de 30 mg/kg prolongó significativamente la supervivencia en comparación con el tratamiento con v6336 a razón de 10 mg/kg (Fig. 50B y Tabla A8). Los animales tratados con v10000 tuvieron supervivencias medias de 49, 59 y 59 días para las dosis de 3, 10 y 30 mg/kg respectivamente (Fig. 50B y Tabla A8). El volumen del tumor en el día 29 del estudio para el tratamiento con v10000 a 3, 10 y 30 mg/kg fue de 1010, 1016 y 931 mm<sup>3</sup>, respectivamente. Los volúmenes tumorales de v6908 y v6336 en el día 29 del estudio fueron 1898 y 1264 mm<sup>3</sup> respectivamente (Fig. 50A y Tabla A8). La exposición en suero de v6336 y v10000 se muestra en la Tabla A10. Estos resultados confirman que aumentar la dosis de v10000 produce un aumento en la concentración en suero



## ES 3 014 819 T3

de v10000, y que dosis similares de v10000 y v6336 producen concentraciones en sueros similares de anticuerpos.

Estos resultados indican que el tratamiento con v10000 es capaz de disminuir el volumen tumoral y prolongar la supervivencia en este modelo de cáncer de mama ER+ bajo en HER2, en comparación con el control de IgG y con Herceptin™.

5

Tabla A8: Perfil de respuesta tumoral de ST1337b

	6908, 30 mg/kg	6336, 10 mg/kg	10000, 3 mg/kg	10000, 10 mg/kg	10000, 30 mg/kg
Respuesta tumoral el día 29					
TV media (mm <sup>3</sup> )(% de $\Delta$ con respecto al valor inicial)	1898 (953 %)	1264 (601 %)	1010 (460 %)	1016 (457 %)	931 (411 %)
Relación tratamiento/control	1.00	0.66	0.53	0.53	0.49
Puntuaciones RECIST					
CR (TV<20 mm <sup>3</sup> )	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
PR (>30 % regresión con respecto al valor inicial)	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
PD (>20 % de crecimiento con respecto al valor inicial)	15/15	15/15	15/15	15/15	15/15
SD (ni PD ni PR)	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
Tiempo medio hasta la progresión (días)	11	10	14	26	13
Respuesta de supervivencia					
Supervivencia media	29	43	49	59	59
CR-Respuesta completa					
PR-Respuesta parcial					
PD-Enfermedad progresiva					
SD-Enfermedad estable					

Tabla A9: Resumen de intervalo logarítmico

Grupo	6908, 30 mg/kg	6336, 10 mg/kg	10000, 3 mg/kg	10000, 10 mg/kg	10000, 30 mg/kg
6908, 30 mg/kg	-	-	-	-	
6336, 10 mg/kg	★★	-	-	-	-
10000, 3 mg/kg	★★	n/s	-	-	-
10000, 10 mg/kg	★★★	n/s	n/s	-	-
10000, 30 mg/kg	★★★	★	n/s	n/s	-
Leyenda: ns = no significativo, ★ = P<0.05, ★★ = P<0.01, ★★★ = P<0.001					

Tabla A10: Resumen de exposición al suero

Día de muestra	6336, 10 mg/kg	10000, 3 mg/kg	10000, 10 mg/kg	10000, 30 mg/kg
7	133.0	30.7	101.7	286.6
36	135.2	46.0	186.3	279.7

**Ejemplo 48:** Efecto de v10000 sobre la supervivencia y la inhibición del crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto de cáncer de páncreas HER2 negativo

- 5 Este experimento se realizó para evaluar la eficacia de v10000 en comparación con IgG de control (v12470), Herceptin™ (v6336) y nab-paclitaxel como agentes únicos y v10000 en combinación con nab-paclitaxel (Abraxane™ Celgene) en el modelo de xenoinjerto ST803 de cáncer de páncreas. ST803 es un xenoinjerto derivado del paciente (PDX) de cáncer de páncreas (South Texas Accelerated Research Therapeutics, San Antonio, TX 78229) que es HER2 negativo de acuerdo con lo medido por IHC. El estudio se llevó a cabo como se describe a continuación.
- 10 Se implantaron fragmentos de tumores por vía subcutánea en ratones desnudos atímicos. Cuando los tumores alcanzaron los 170 mm<sup>3</sup> los animales fueron asignados aleatoriamente a grupos como se muestra en la Tabla A11 y el tratamiento comenzó en un estudio ciego y controlado. Los animales fueron tratados de acuerdo con el régimen 1 y 2 como se muestra en la Tabla A11. Todos los tratamientos se administraron por vía intravenosa.

Tabla A11. Diseño del estudio

Grupo (n)	Régimen 1			Régimen 2		
	Agente	Dosis (mg/kg)	Cronograma	Agente	Dosis (mg/kg)	Cronograma
1 (20)	v12470	30	Dos veces por semana durante cuatro semanas			

15

Tabla A12: Perfil de respuesta tumoral de ST803

	12470	6336	10000	12470+nab-pac*	12470+nab-pac*
Respuesta tumoral el día 54					
TV media (mm <sup>3</sup> )(% de $\Delta$ con respecto al valor inicial)	1663 (888 %)	1494 (806 %)	1305 (659 %)	1365 (693 %)	1073 (522 %)
Relación tratamiento/control	1.00	0.90	0.78	0.82	0.64
Puntuaciones RECIST					
CR (TV<20 mm <sup>3</sup> )	0/18	0/17	0/20	0/16	0/19
PR (>30 % regresión con respecto al valor inicial)	0/18	0/17	0/20	0/16	0/19
PD (>20 % de crecimiento respecto al valor inicial)	18/18	17/17	20/20	16/16	19/19
SD (ni PD ni PR)	0/18	0/17	0/20	0/16	0/19
Tiempo medio hasta la progresión (días)	4.4	3.6	3.6	4.4	5.6

Respuesta de supervivencia					
Supervivencia media (días)	58.8	65.9	69.3	60.6	>71
CR- Respuesta Completa					
PR-Respuesta parcial					
PD-Enfermedad progresiva					
SD-Enfermedad estable					
*nab-paclitaxel					

Tabla A13: Resumen de intervalo logarítmico

Grupo	12470	6336	10000	12470 nab-pac*	10000 nab-pac*
12470	-	-	-	-	
6336	ns	-	-	-	-
10000	ns	ns	-	-	-
12470 + nab-pac	ns	-	Ns	-	-
10000, + nab-pac	★★	-	Ns	★★	-
Leyenda: ns = no significativo, ★ = P<0,05, ★★ = P<0,01, ★★★ = P<0.001					
*nab-paclitaxel					

Tabla A14: Resumen de exposición al suero

Día de muestra	6336 (µg/mL)	10000 (µg/mL)	10000 (µg/mL) + nab-paclitaxel
14	426.7	279	391

- 5 **Ejemplo 49:** Efecto de v10000 sobre la inhibición del crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto de cáncer gástrico HER2 3+

Este experimento se realizó para evaluar la eficacia de v10000 en comparación con un IgG de control (v12470) y Herceptin™ (v6336) como agentes únicos en el modelo de xenoinjerto GXA3054 de cáncer gástrico. GXA3054 es un xenoinjerto derivado de paciente (PDX) de cáncer gástrico que es HER2 3+ (Oncotest GmbH, Am Flughafen 12-14, 79108 Friburgo, Alemania). El estudio se llevó a cabo como se describe a continuación.

10

Se implantaron fragmentos de tumores por vía subcutánea en ratones desnudos atímicos. Cuando los tumores alcanzaron los 144 mm<sup>3</sup> los animales fueron asignados aleatoriamente a grupos como se muestra en la Tabla A15 y el tratamiento comenzó en un estudio ciego y controlado. Los animales fueron tratados de acuerdo con el Régimen 1 como se muestra en la Tabla A15.

15

Tabla A15. Diseño del estudio

Grupo (n)	Régimen 1			
	Agente	Dosis (mg/kg)	Ruta	Cronograma
1 (10)	v12470	30	IV	Dos veces por semana durante cinco semanas
2 (10)	V6336	30	IV	Dos veces por semana durante cinco semanas

3 (10)	v10000	30	IV	Dos veces por semana durante cinco semanas
--------	--------	----	----	--

El volumen del tumor se midió con calibradores dos veces por semana. La duración del estudio fue de 59 días y el objetivo principal fue la inhibición del crecimiento tumoral. Se midieron criterios de respuesta tumoral adicionales y se muestran en la Tabla A16. Los ratones fueron sacrificados cuando el volumen del tumor superó los 2000 mm<sup>3</sup>.

Los resultados se muestran en la Figura 52 (volumen del tumor). El tratamiento con la variante 10000 y v6336 redujo el crecimiento del tumor en comparación con el tratamiento con IgG de control (v12470) (Figura 52 y Tabla A16). Además, el tratamiento con v10000 redujo el crecimiento del tumor en comparación con el tratamiento con v6336 (Fig. 52 y Tabla A16). El volumen tumoral medio en el día 35 del estudio para el tratamiento con IgG de control, v10000 y v6336 fue de 1340, 236 y 7.8 mm<sup>3</sup>, respectivamente. La inhibición del crecimiento tumoral el día 35 para v10000 y v6336 fue del 111 y el 92 %, respectivamente (Tabla A16). El día 35 los tumores tratados con v10000 mostraron mayores respuestas (7/10 respuestas completas y 3/10 respuestas parciales) en comparación con los tumores tratados con v6336 (0/10 respuestas completas y 1/10 respuestas parciales) (Tabla A16). Al finalizar el estudio, el día 59, 9/10 tumores tratados con v10000 tuvieron respuestas completas sin evidencia de tumor recurrente, mientras que para los tumores tratados con v6336 solo 1/10 tumores tuvieron una respuesta completa.

Estos resultados indican que el tratamiento con v10000 puede hacer retroceder los tumores en este modelo de cáncer gástrico HER2 3+. La inhibición del crecimiento tumoral de v10000 fue superior al control de IgG y Herceptin<sup>™</sup>.

Tabla A16: Perfil de respuesta tumoral de GXA3054

	12470	6336	10000
Respuesta tumoral el día 35	Na	92	111
Inhibición del crecimiento tumoral (%)			
Puntuaciones RECIST			
CR ( $\leq -95$ %)	0/10	0/10	7/10
PR ( $> -95$ % y $< -66$ %)	0/10	1/10	3/10
SD ( $\geq -66$ % y $\leq +73$ %)	0/10	5/10	0/10
PD ( $> +73$ %)	10/10	4/10	0/10
CR-Respuesta Completa			
PR-Respuesta parcial			
PD-Enfermedad progresiva			
SD-Enfermedad estable			

Los reactivos empleados en los ejemplos están generalmente disponibles comercialmente o pueden prepararse utilizando instrumentación, métodos o reactivos disponibles comercialmente conocidos en la técnica. Los ejemplos anteriores ilustran diversos aspectos descritos en este documento y la práctica de los métodos descritos en este documento. Los ejemplos no tienen por objeto proporcionar una descripción exhaustiva de las muchas realizaciones diferentes de la invención.

Tabla de secuencias

Variante	Nombre del clon H1	Nombre del clon H2	Nombre del clon L1	Nombre del clon L2
792	1011	1015	-2	-2
5019	3057	720	1811	NA
5020	719	3041	NA	1811

# ES 3 014 819 T3

7091	3057	5244	1811	NA
10000	6586	5244	3382	NA
6903	5065	3468	5037	3904
6902	5065	3468	5034	3904
6717	3317	720	NA	NA
1040	4560	4553	NA	4561
630	719	716	NA	NA
4182	4560	3057	NA	1811
506	642	642	-2	-2
4184	3057	3041	1811	1811
9996	4372	6586	ESO	3382

[illegible]









**CONCLUSIONS**

[illegible]







[illegible][illegible]



15-00000

[illegible]











**Abstract**

[illegible]













1000

[illegible]



XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

[illegible]

{continuación}

SEQ ID NO.	Clon	Desc	Secuencia (aminoácido o
174	720	L1	CAGGACGTTACACCGCT
173	720	L3	QGHYTPPT
176	720	L3	CAACAGCATTACACTACGCCACCCACT
177	720	L2	SAS
178	720	L2	TCTGCATCC
179	720	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLLECAASGPMISTDTYIMRYGAPKQKSLRVARLISITRWQTNQALSVLSGRFTLSAQT SRRTATLQWISLEPAEDTAVYKCSRWGHSGETFMEDYWGAGGCIIVTVSS
180	720	VH	QAASTGDAEETGSGTGAALSTCFQGGKGGAGKCTTGGSTACAKMTGAGKSGSTCYDTGAAACCTGSCNKGKAKCTTC YQDAITCAACATPRLAARPGACTSIAITACCACTCGGCTCYCGGAGCTTCACGGAAADGGCCCGGAGCTGGGCTGCGCTGCGC GATTTTAAVYCCACAAAGSTTSGACAAAGGAGAGCTVAGCTGTGTGAAGAGGCGGATTCACAGATCTCCGCGCGAGCAAT SCAAAGAAACGCGGCAATGCGGCAATGAAAGATCTGAGAGCTGAGAGGAGAGAGGCTTAAATATATGATGAGATG CGGCGAGAGAGGCTTACTACGATATGATGATGAGGCTGAAGGAGAGCTTGGTAAAGCTCTCTCTCA
181	720	H1	GFNIKDTY
182	720	H1	GGATTCAACATTAAAGATACTTAT
183	720	H3	SRWGGDGFYAMDY
184	720	H3	TCAAGATGGGGCGGAGACGGTTTCTACGGCTATGGACTAC
185	720	H2	IYPTNGYT
186	720	H2	ATTATCCGACAAATGGTTACACA
187	720	CH2	APELLGGPSVFLPPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEDYNSTYRWS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
188	720	CH2	SCCTCGAGAACTGCTTSGAGAGAGCTTAAAGTGTTCCTGCTTCCCGCTAGAGCAAGACACTCTGATGAATTCCTCGAG GACTCTCGAGGGTGGAGCTTGGGCTGGTGGAGAGTGTCTCTACAGAGAGCTCGAGAGTGAAGATTCAGACTGGTAGGCTGG AGGGGDTTGGAGTTCNTTAAATGCTTAAAGCAAAACCAAGAGAGGAAACAATACACTCTCACTTAATCGGCTGTGTAAC CTGCTGAACTCTGCTGGAATGGAGGCTGGAGTGAAGGAAAGAGGATTAACAGTGAAGAGTCTAGGTAATAAGAGGCTGGCT CTGCTCAAGCTGAAAGAAATCATCTCTCAAGGCTGAA

**00000000**

[illegible]

(continuación)

SEQ ID NO.	Clon	Desc.	Secuencia (aminácido o)
196	4561	L1	CACGATGT GAACACC GCA
197	4561	L3	QQHYPPT
198	4561	L3	CAGCAGCACTATACCACCCCCCTACT
199	4561	L2	SAS
200	4561	L2	AGTGCATCA
201	4561	CL	KTVAAQSVTLPPFSDDELGGGTASVCLLDHPTFRRARVQWAVDRALSSQSSVESVLRQDQKDETVSLSSITL SKADYERHVVAGVTVNGQLSAPVPTSSINSSSC
202	4561	CL	CGAACRSTGGCDSOTQDAQTGCTTCAITPTTCACGTCGAGCGACACAGTGAATCTGGCACAGSTTCSTSP GHTCTGVCTGCTSAKCAACTTCTAATCCGAGKAGKNCMAAETGCAHTGGAGAGTCTAATACTCTACAGAGTTS GCTAAGGCTCAGTACAGGCTTGACAGACAGGCTCTCAAGATCTTACTTATAGCTCTGTTCATAGCAGCTCTGACAGTTS AGCAGAGGACACTACGAAAAGTCAAGAGGCTATGCTCTGAGAGTGGCTCAACAGGCTCTGCTCTCTCTCTCTGAGC GTAAGTCTTCAACAGAGGCTGAATG?
203	3041	Toda	SVQAVSSGGRLLQPSGSLRLSGRAAGPTTCDSTMDQVQAGKGLSRVADVYRNSRSTENGRRRRTLLAYDR SSSTLTLQNNGLKASQDAVTVCAKSLGQSVEDYWGQGLVTVSSAGTGGKQVPLAPSSSTSGDTAALSCLV KDTFDEPTVYSRHSGLSGTHTCTHVLDSGLVELSAPVCTGSSSLQVYLDHNSHSESTVTVDSKVEPSG STWNCPTCPAPFLGGPSVTLSPHPEKUTLMSSSSPTCVVGVDSHSDPSVSSNNYCGQGVHMAKSSPRSS QNNSTRTVSVLVTVRSGNLHRSKTKQKVDNHALZAPLSSTYLSKAKSPPRSPQVYLPFQKSLDNNQVSLDL VSGPTVSDLAVERDSNGQPSRRITLWPPVLSGNGSEFTLSGLTVUKSNGQSNVTCQSNHSEALHNNHTQKSLG LSPS



Continued

[illegible]

**CONCLUSIONS**

SEQ ID NO.	Clon	Desc.	Secuencia (aminoácido o
209	3041	H3	ARNLGPSFYFDY
210	3041	H3	GCCCGGAATCTGGGGCCCTCTTCTACTTGACTAT
211	3041	H2	VNPNSGGS
212	3041	H2	GTGAACCCAAATAGCGAGGCTCC
213	3041	CH1	AAKGGKPVVPLAASSKSTGGGTAALDGLVDFYFVVSNNSCALTSQVHSFPAVLQSSGLYSLSEVTVVSS SLGSGYICVHSHZPNTVYKSV
214	3041	CH1	GCCKCACUAAWAAKSTFQVSTGATDUALDGLTQKTCVKGDAALDUALVTVGGGAAACLVKAAKCCY GGGCGCTGGTGAAGAGACACTCTCCAGAGCCGTCAGAGTGTCTTGAACAGTGGGCTCTGACTCTGGAG TODACCTCTCTGTGATGGTTCGASTGMAACGGGCTGTACAGCTCAGCCCTGTGTGTACCCGATGAAATGAA AGCTTGGAAACAGACAGCTGATATGTCGACGCTTGAATGCAAAAGCTCATCTAAACAGAAAGTCGACAGAAAGTG AFELLGGKPVVPLFSPKSTLMLSPSTFVTVVGVVSHEDPSEVPRVVDGTVHMASTPKEGCMSTFVTVVS VLTVLHVSMLHGGVYGVVSHALPAPIETVTSKAK
215	3041	CH2	GCACACAGAGTGTGGAGAGACCAAGCTGTCTCTGTCTCCACACACACCAAGACACAGATGATACAG GATCCCAAGATGACATGCTGGCTGGAGCTGAGCAGAGGAGAGCTCGAACTGAACTTAACTGGGACGTGS ACGGCTCGAGGTTCATTAATGTCAAGACTTAACCTAGGGGAGAGAGTACACATATACCTATGCTGTCTGTA GCTGTGACAGTGTGCAATGAGGATTTGGCTGACCTGGAAAGAGTATGAACTGGAGGTGAGCAATTAAGGCTCTCC CGGATCTATGAGAAAGAAATTTTCGAAAGCCAAA
217	3041	CH3	GGTFFQVTVLPPSHSLTTPQKSLCLVGGFESDLAVRSENGQVHMLVLTWTPVLDSDGSESLYSSSLTVGS SRRAGGNFVSCSWHSHALBHHTQKSLSLSPG
218	3041	CH3	GGAGAGCTGAGAGACACACAGATGTGATGATCTCTGCTCCATCAAGAGGATGACCTGACAAAGACACAGAGAGTGGAGCT GCTGTGCTCTGTGTAAGAGGATCTCACTCTCTCTGACACTGTGTGTGAGATGGGAGAGTAAATGGACACTCGGAGACAA AGTAACTCGAATCGAGCTCCCTGGTGGCTGAGACTGAGAATGGAGCTCTCTGTGTGATAGAGAGCTGACCTGGACAA TCCGATGGAGAGAGAGAGATCTGTGTGATTTGATTTGTCGATGTACACAGAGCACTGCAACACATTAACACTCAGAA GTGACCTGTGCTGTGCTGAGG







Continued

[illegible]

**CONCLUSIONS**

[illegible]

20

[illegible]



[illegible]



(continuación)

SEQ ID NO.	Clon	Desc.	Secuencia (aminoácido o
276	3317	CH2	<p>           GGTTCAGAGCTTCCCTGGGAGACCTACGCTGTCTCTGTTCCACCCGACGCTCAGACAGACATCTGTGATGATTTTCAG            AAGCTCTGGAGTGACATCTGTGCTGTGTGAGCTGTAGTTCACGAGGAGCTCCGAGAGCTCAAAATTCGACTGTGAGCTGAG            ATGAGCTTCAGGCTGCAATGATCCAGAGACGAAATCCGAGAGGAGACAGTACAACTCAACCTTATCTGGGTCGCTGAGC            GTCTTGACATGTTCTGACATGAGACTGCTGAGAGGCTCAAGGATTAAGATTCGACATGAGTAAACAGAGCTCTGCTC            TGCACCAATCCAGAGAGCACTATTCGAGGCTGAAA         </p>
277	3317	CH3	<p>           GQPHKQVTVVYPPSRHSELTHGQSHLYCLVKGPTTSELIATVETSTNGQPHHNSKSTPVVLDSDSHALVSELTYSR            SHSTQMIYTSQVNHSAIMHPTTVKSLSLSPG         </p>
278	3317	CH3	<p>           GGGGAGCCGCGGAACTCGAGGCTACGCTGATCCGAGGCTGAGATGAGCTGACAAAGAAAGACAGGTCCTCCCT            GACTTGCSTGTCGAGAGGATTTCACTCAGCTGACATGAGTGAATGAGTGGGAAATGAAATGCGAGCCGGAAGAA            ATTATAGGACGCACTCTCTCTGCTGAGCTGATGAGGAGTTCTGCACTGGCTCTGCAACTGAGCTGAGCTGAGCAG            TCCGAGTTACAGAGAGGAGAACSTTTTATGTTTCTGCTGATGAGAGAGAGGCTGAGACAAATCAATTACACACAGAA            AATCTCGAGGCTCTCTCAGCTCCG         </p>
279	1015	Toda	<p>           EVQLVESGGSLYCPKPSLIRLSGASGSHFADTTIMHTKAPKAGLBNVARIPTTNGTTTNAQSVGGRTTIAATP            GINTATLQHHSIAAEETPAVYCSNKGDSFTANQTMQDPIIVTVGSAFTKQPSVPLAPSGNTSGSTNALPCL            VNSATPEPTVEMNSGALTSGVHTPAVCSGQLFSLRSVTVTPESLTPQDTICNVNKKPSKSTGKSVKPKS            CDTHNCPCPAPELLAGPSVLLPSESPIQVLMQKSESVYCVVGVSHESPPVHINNVGVGVYHKKKCHKEK            KQKNSYPPSVVLYLVNQMIMKSTKCVKSNALPAFLKDTLBNAGQPKSPQVYVLPSSSELTPKQVSLAC            LVKSTTPESLAVERKSGQPKMYSNTPVLDSSSTFLYSLKTVKSRKQSNVTSQVHNSALHHHTTQKSL            SLSPK         </p>













**Abstract**

[illegible]

**CONCLUSIONS**

[illegible]

### ES 3 014 819 T3

SEQ ID NO:	Pertuzumab WT COR	secuencias
335	CDR-H2	VNPNSGGS
336	CDR-H3	ARNLGPSFYFDY
337	CDR-H1	GFFTDYT
338	CDR-L2	SAS
339	CDR-L3	QQYYIYPYT
340	CDR-L1	QDVSIG
SEQ ID NO:	Trastuzumab WT CDR	secuencias
341	CDR-H2	IYPTNGYT
342	CDR-H3	SRWGGDGFYAMDY
343	CDR-H1	GFNIKDTY
344	CDR-L2	SAS
345	CDR-L3	QQHYTTPPT
346	CDR-L1	QDVNTA

Variante CDR-L3 de pertuzumab: QQYYIYPAT

Clon 3382, variante 10000 (SEQ ID NO: 347)

Variante CDR-H1 de pertuzumab: GFTFADDYT

5 Clon 6586, variante 10000 (SEQ ID NO: 348)

## REIVINDICACIONES

1. Un constructo de unión a antígeno para su uso en un método de inhibición del crecimiento tumoral en un sujeto humano.

5 en donde el constructo de unión a antígeno comprende un primer constructo de polipéptido de unión a antígeno que se une de forma monovalente y específica a un antígeno HER2 (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano) ECD2 (dominio extracelular 2) en una célula que expresa HER2 y un segundo constructo de polipéptido de unión a antígeno que se une de forma monovalente y específica a un antígeno ECD4 de HER2 (dominio extracelular 4) en una célula que expresa HER2,

10 en donde el primer constructo de polipéptido de unión a antígeno está unido operativamente a un primer polipéptido enlazador y el segundo constructo de polipéptido de unión a antígeno está unido operativamente a un segundo polipéptido enlazador, en donde el primer y el segundo polipéptidos enlazadores están unidos covalentemente entre sí, y en donde los polipéptidos enlazadores están unidos operativamente a una región de Fc de IgG1 humana,

15 en donde el primer constructo de polipéptido de unión a antígeno es un Fab, en donde el Fc Fab-enlazador-IgG1 comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:97 y una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO:69, y

en donde el segundo constructo de polipéptido de unión a antígeno es un scFv, en donde el Fc scFv-enlazador-IgG1 comprende la SEQ ID NO: 295, y

20 en donde al sujeto humano se le administran al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 dosis del constructo de unión a antígeno, y/o en donde cada dosis se administra al menos cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 días.

2. El constructo de unión a antígeno para su uso en un método para inhibir el crecimiento tumoral de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el constructo de unión a antígeno se administra al sujeto humano en una dosis de al menos 0.3, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 mg/kg.

25 3. El constructo de unión a antígeno para su uso en un método para inhibir el crecimiento tumoral de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en un sujeto humano, en donde el tumor es un tumor de pulmón, opcionalmente un cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) no escamoso con bajo nivel de HER2 y sin amplificación del gen HER2, un tumor de cabeza y cuello, opcionalmente un carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello con bajo nivel de HER2 y sin amplificación del gen HER2, un tumor de mama, 30 opcionalmente un cáncer de mama HER2 1+, ER+/PR- con una clasificación molecular luminal B, un tumor de páncreas, opcionalmente un cáncer de páncreas HER2 negativo como se determina por inmunohistoquímica, o un cáncer gástrico, opcionalmente un cáncer gástrico HER2 3+.

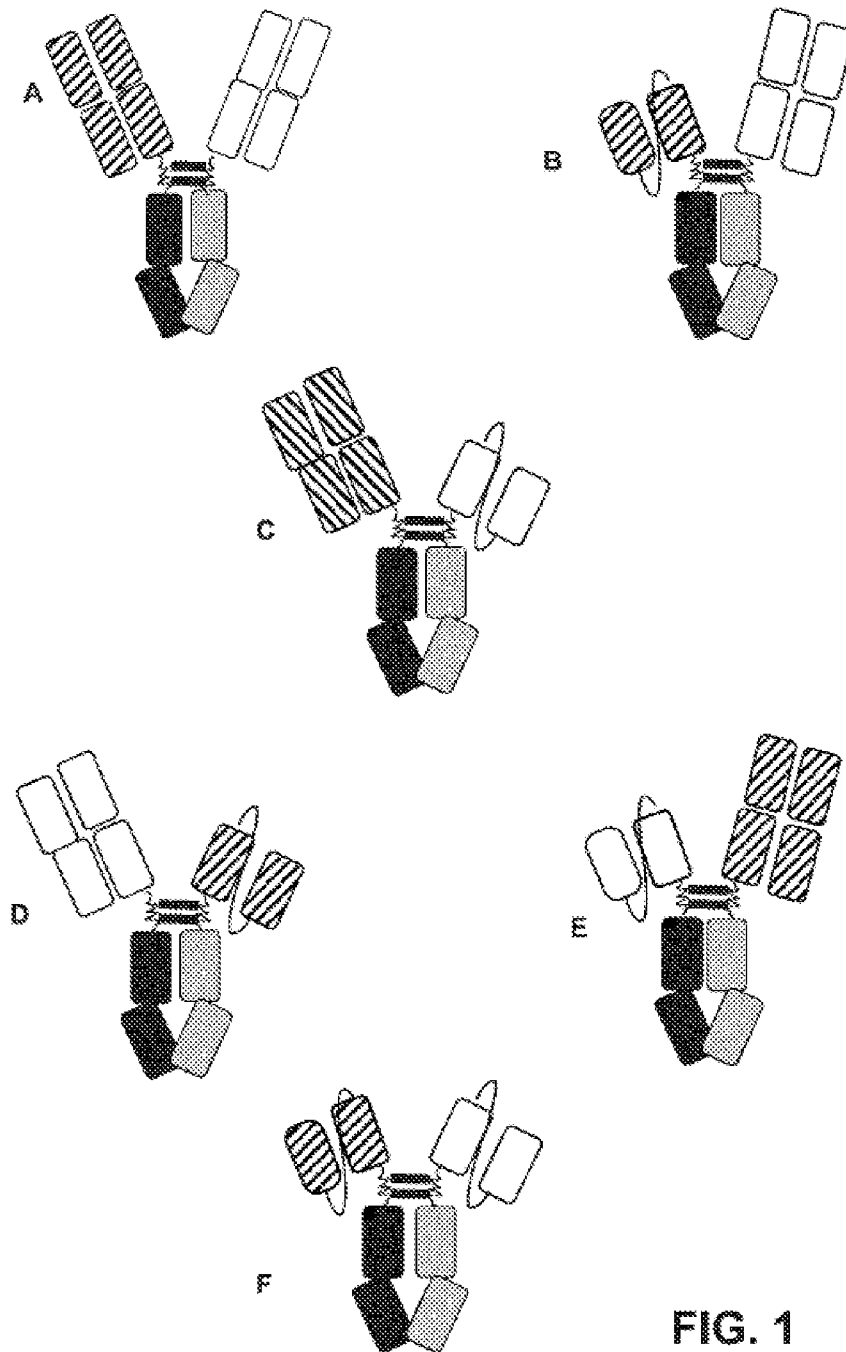
35 4. El constructo de unión a antígeno para su uso en un método de inhibición del crecimiento tumoral de acuerdo con la reivindicación 1 en un sujeto humano, en el que el tumor es un cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) no escamoso, con bajo contenido de HER2 y sin amplificación del gen HER2, en el que el constructo de unión a antígeno se administra por vía intravenosa al sujeto humano en una dosis de 15 mg/kg el día 1 seguido de una dosis de 10 mg/kg los días 4, 8, 11, 15, 18, 22 y 25.

40 5. El constructo de unión a antígeno para su uso en un método para inhibir el crecimiento tumoral de acuerdo con la reivindicación 1 en un sujeto humano, en el que el tumor es un carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello con bajo contenido de HER2 y sin amplificación del gen HER2, en donde el constructo de unión a antígeno se administra por vía intravenosa al sujeto humano una vez a razón de 15 mg/kg el día 1, seguida de una dosis de 10 mg/kg los días 4, 8, 11, 15, 18, 22 y 25, opcionalmente en el que el cisplatino se administra por vía intraperitoneal al sujeto humano a razón de 2 mg/kg los días 1, 3, 5, 7, 9 y 11.

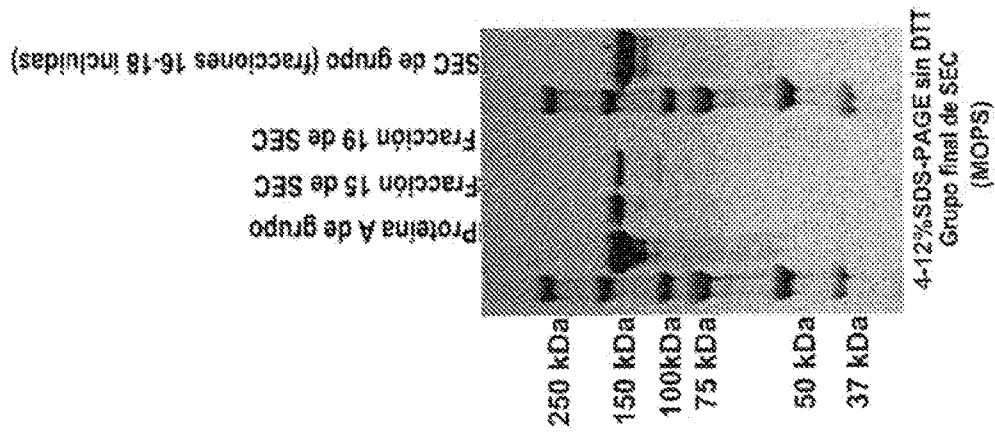
45 6. El constructo de unión a antígeno para su uso en un método para inhibir el crecimiento de un tumor de acuerdo con la reivindicación 1 en un sujeto humano, en donde el tumor es un cáncer de mama HER2 1+, ER++/PR- con una clasificación molecular luminal B, en donde el constructo de unión a antígeno se administra por vía intravenosa al sujeto humano en una dosis de 3 mg/kg o 10 mg/kg o 30 mg/kg los días 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25, 28 y 32.

50 7. El constructo de unión a antígeno para su uso en un método para inhibir el crecimiento de un tumor de acuerdo con la reivindicación 1 en un sujeto humano, en donde el tumor es un cáncer de páncreas HER2 negativo según se determina por inmunohistoquímica, en donde el constructo de unión a antígeno se administra por vía intravenosa al sujeto humano en una dosis de 30 mg/kg, dos veces por semana durante cuatro semanas, opcionalmente en donde nab-paclitaxel se administra por vía intravenosa al sujeto humano en una dosis de 30 mg/kg los días 2, 9 y 16.

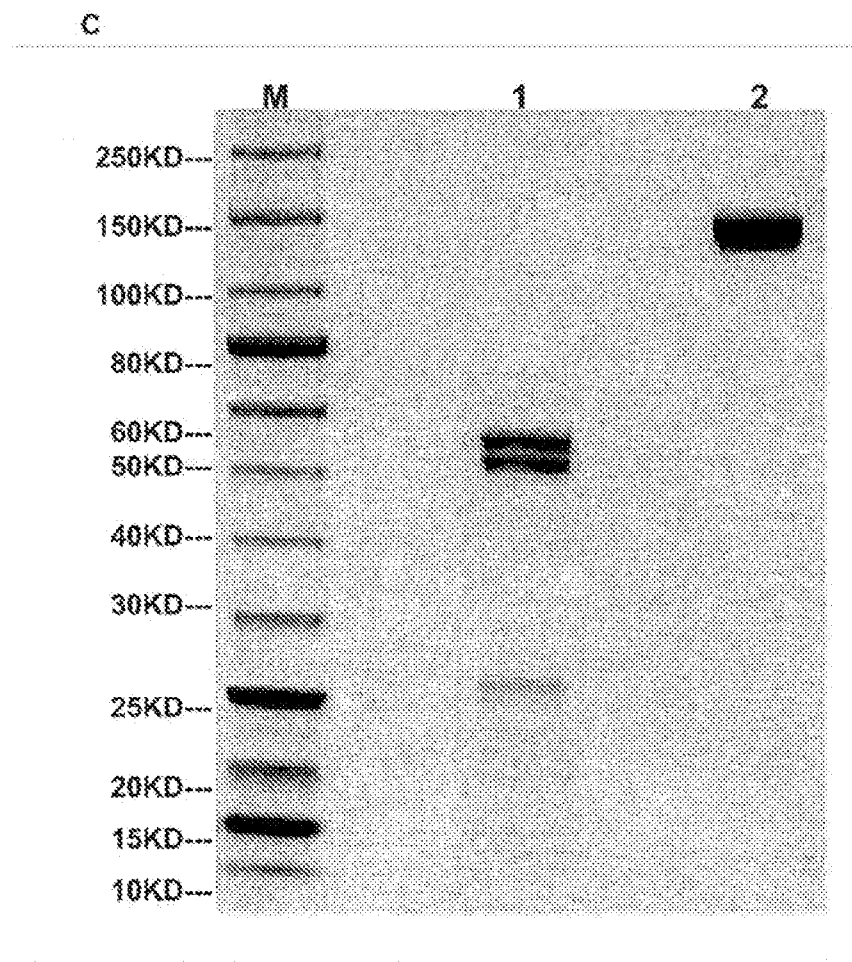
8. El constructo de unión a antígeno para su uso en un método para inhibir el crecimiento de un tumor de acuerdo con la reivindicación 1 en un sujeto humano, en donde el tumor es un cáncer gástrico HER2 3+, en donde el constructo de unión a antígeno se administra por vía intravenosa al sujeto humano en una dosis de 30 mg/kg, dos veces por semana durante cinco semanas.
- 5 9. El constructo de unión a antígeno para su uso en un método para inhibir el crecimiento tumoral de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el constructo de unión a antígeno está conjugado con un fármaco.
10. El constructo de unión a antígeno para su uso en un método de inhibición del crecimiento tumoral de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el fármaco es maitansina (DM1).
- 10 11. El constructo de unión a antígeno para su uso en un método de inhibición del crecimiento tumoral de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el constructo está conjugado con DM1 a través de un enlazador SMCC.
12. El constructo de unión a antígeno para su uso en un método para inhibir el crecimiento tumoral de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el constructo de unión a antígeno se formula en una composición farmacéutica con un vehículo farmacéutico, opcionalmente en donde el vehículo farmacéutico comprende un tampón, un antioxidante, una molécula de bajo peso molecular, un fármaco, una proteína, un aminoácido, un carbohidrato, un lípido, un agente quelante, un estabilizador o un excipiente.
- 15 13. El constructo de unión a antígeno para uso en un método para inhibir el crecimiento tumoral de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o 9-12, en donde el constructo de unión a antígeno se administra mediante inyección o infusión, opcionalmente en donde la administración es intravenosa.
- 20 14. El constructo de unión a antígeno para su uso en un método para inhibir el crecimiento tumoral de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que comprende además administrar al sujeto humano un agente adicional, opcionalmente un agente quimioterapéutico, opcionalmente en donde el agente adicional es uno o más de bleomicina, carboplatino, cisplatino, nab-paclitaxel, docetaxel, doxorubicina, erlotinib, fluorouracilo, gemcitabina, metotrexato, pemetrexed, topotecano, vinorelbina, capecitabina, navelbina o paclitaxel.



**FIG. 1**



**FIG. 2**



**FIG. 2 (Continuación)**



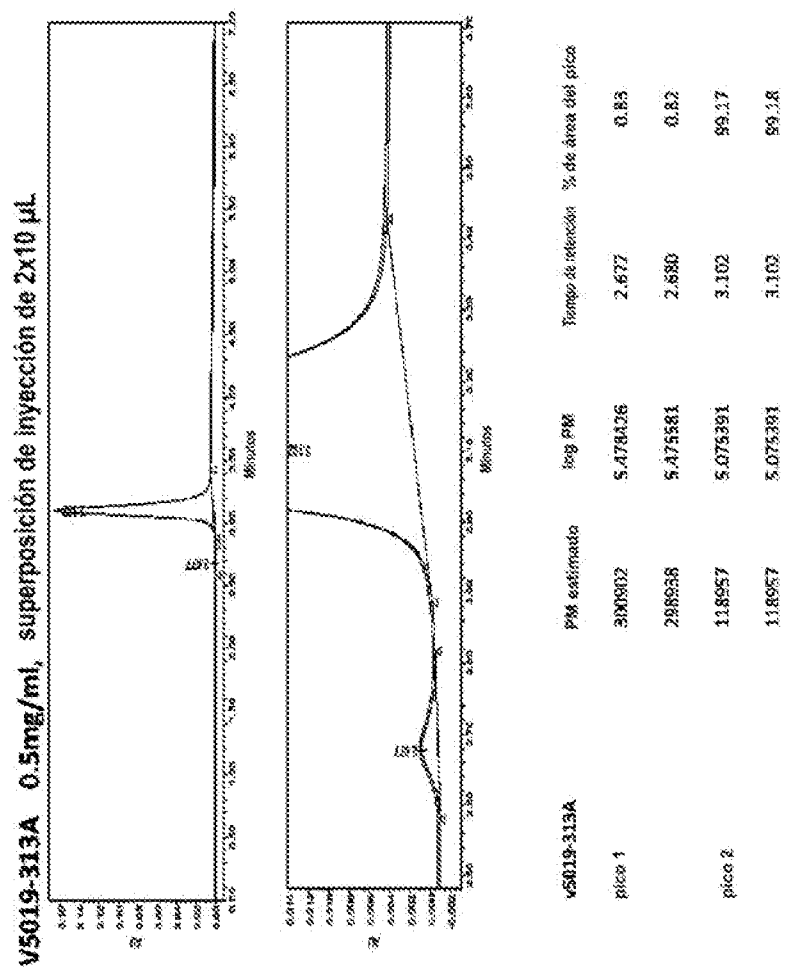
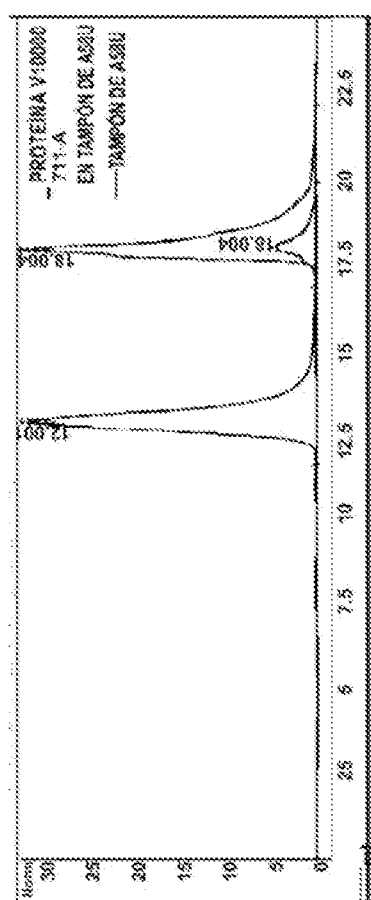


FIG. 3A

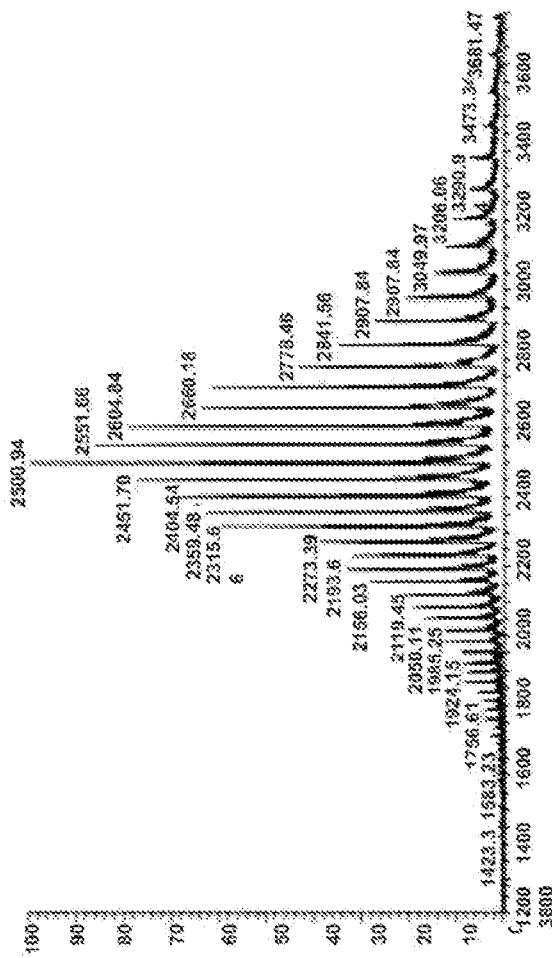


Pico #	TR (min)	Tipo	Altura	Área	% de Área
1	8.022	MFR	0.183	22.103	1.508
2	11.059	MFR	0.179	9.708	0.662
3	12.961	MFR	30.701	1416.498	96.619
4	15.419	FMR	0.299	17.759	1.211

FIG. 3B

# Espectro de Masa de 5019-313-A

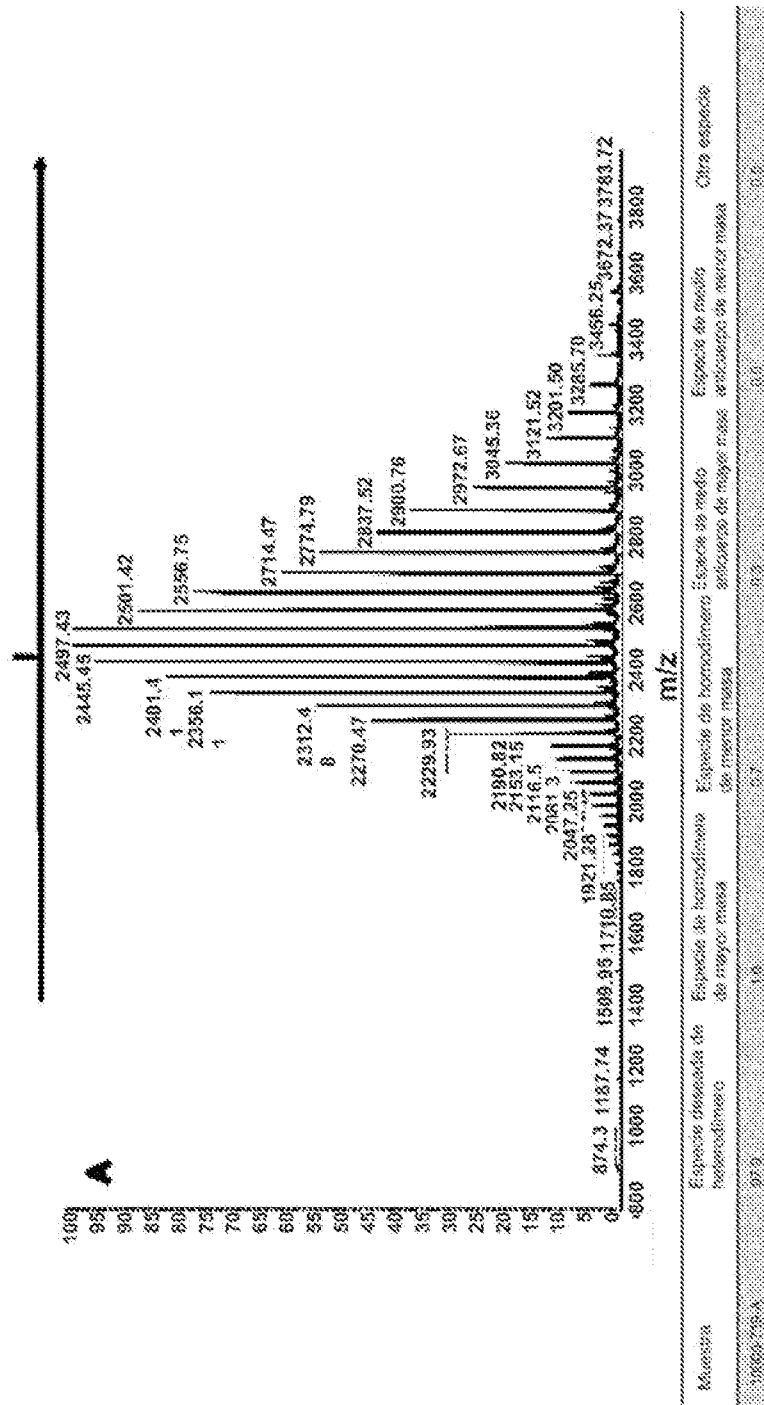
A



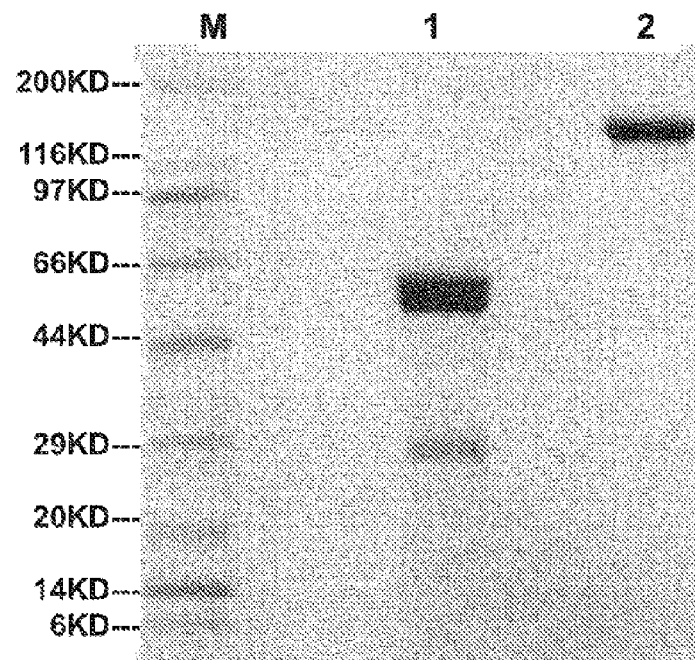
Muestra	Especie derivada de hidrocarburo	Especie de hidrocarburo de mayor masa	Especie de hidrocarburo de menor masa	Especie de medio ambiente de mayor masa	Especie de medio ambiente de menor masa	Otra especie
5019-313-A	100	59	17	25	25	25

FIG. 4A

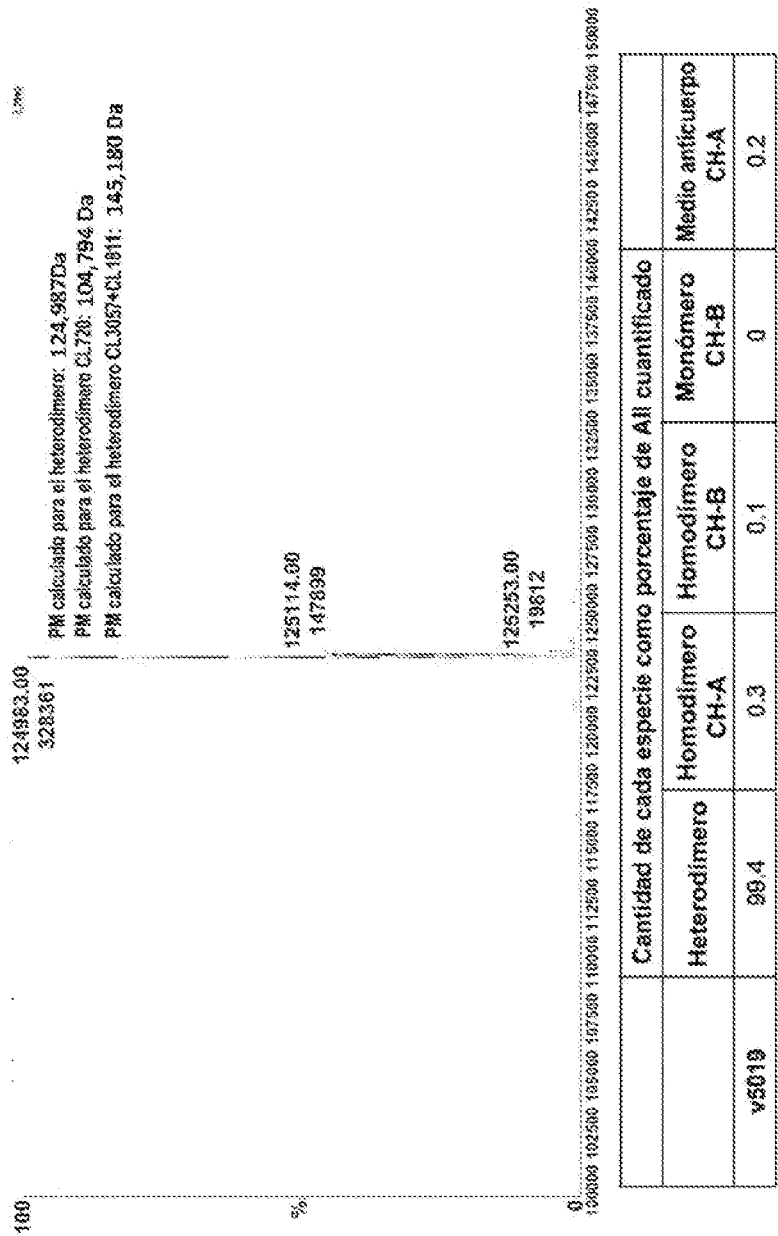
# Espectro de Masa de 10000-719-A



**FIG. 4B**

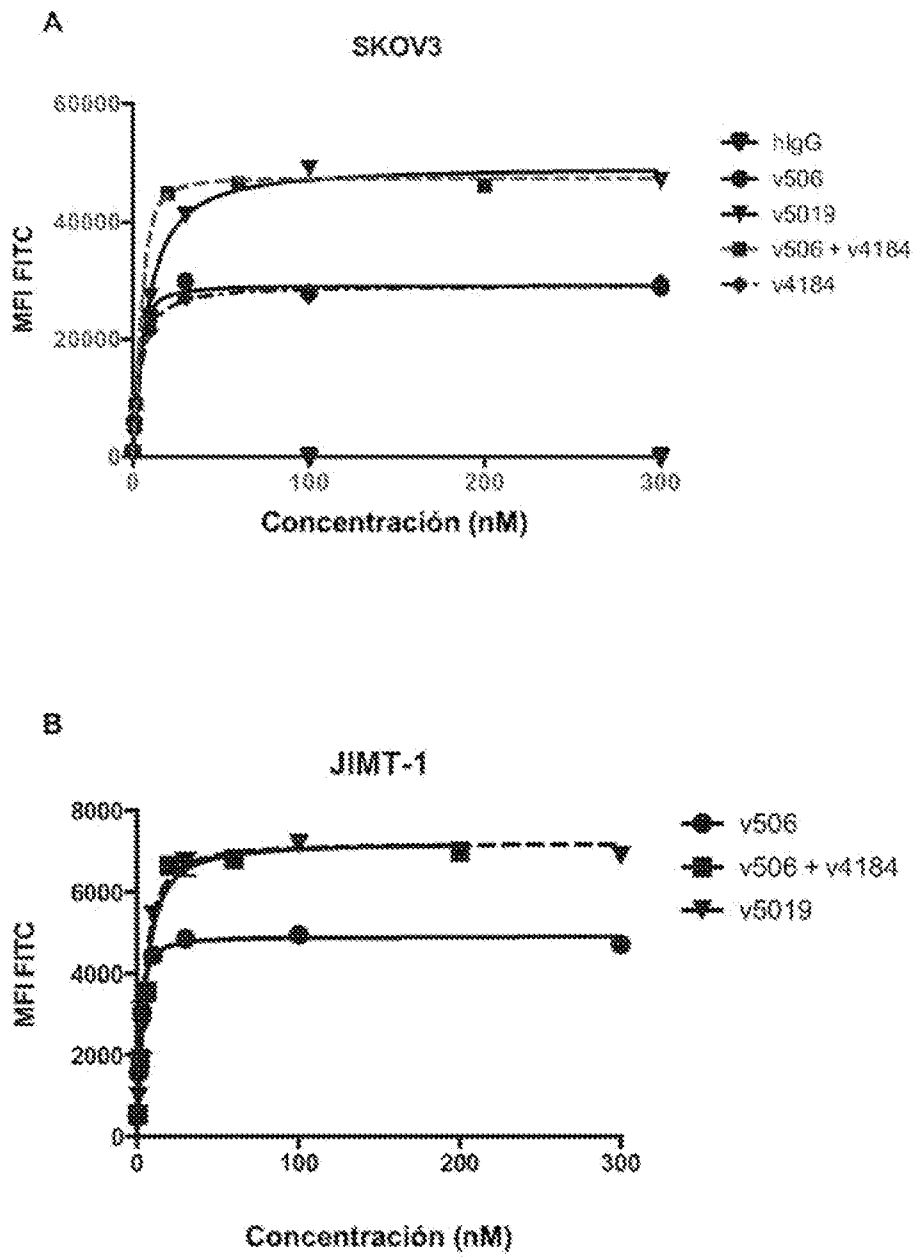


**FIG. 5A**



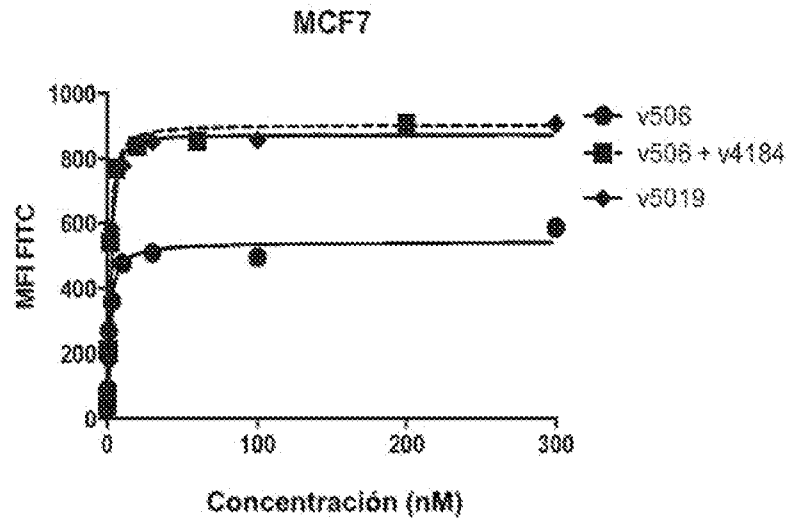
\*: Los picos laterales de Lisina y O-glicano no fueron incluidos en este cálculo

FIG. 5B

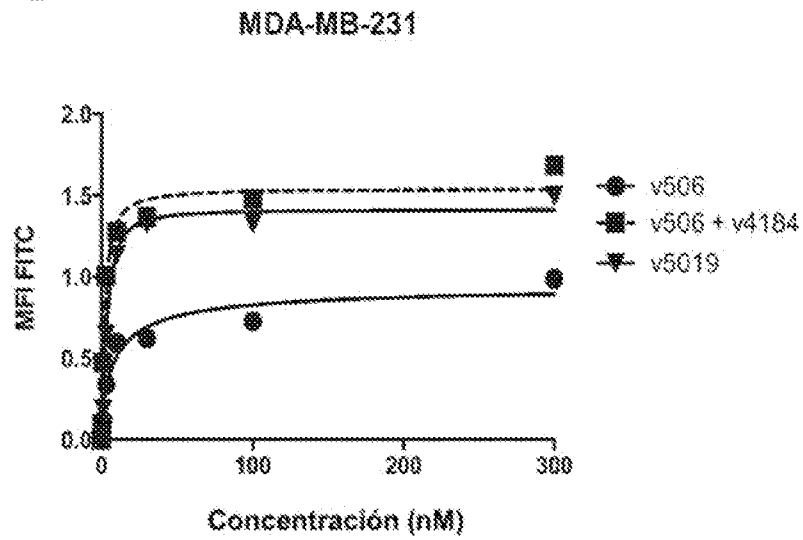


**FIG. 6**

C



D



**FIG. 6 (Continuación)**



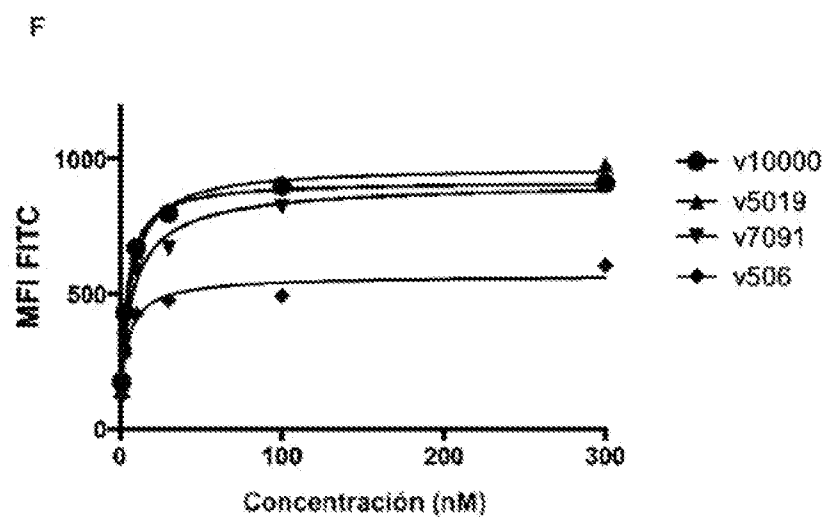
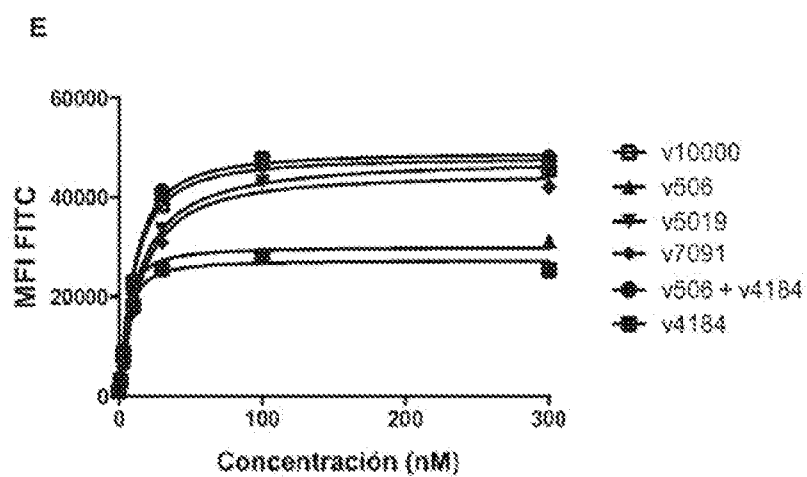
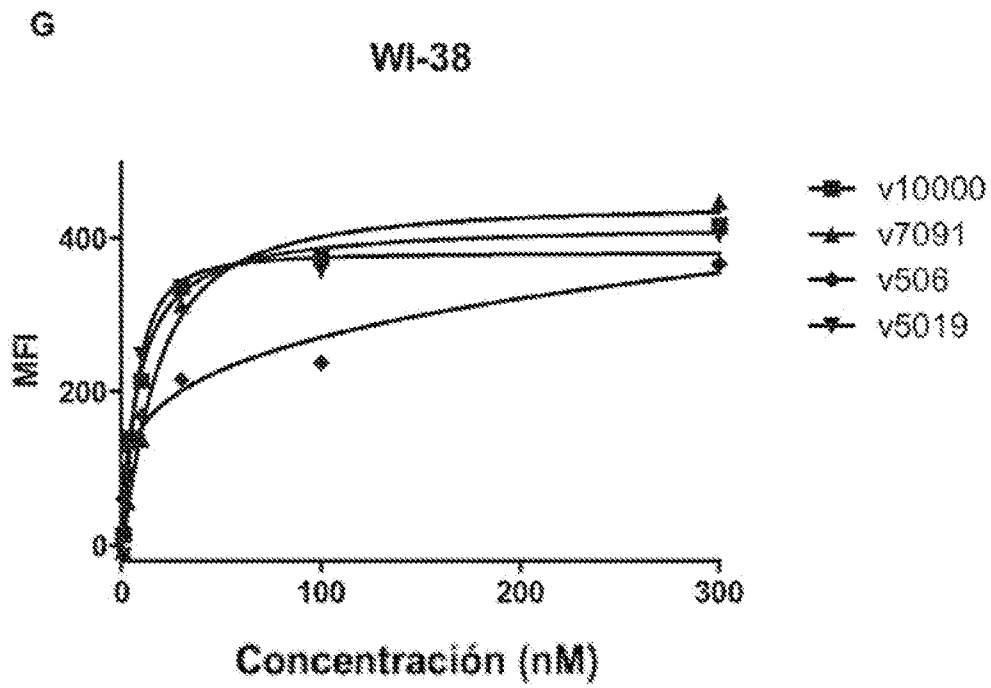
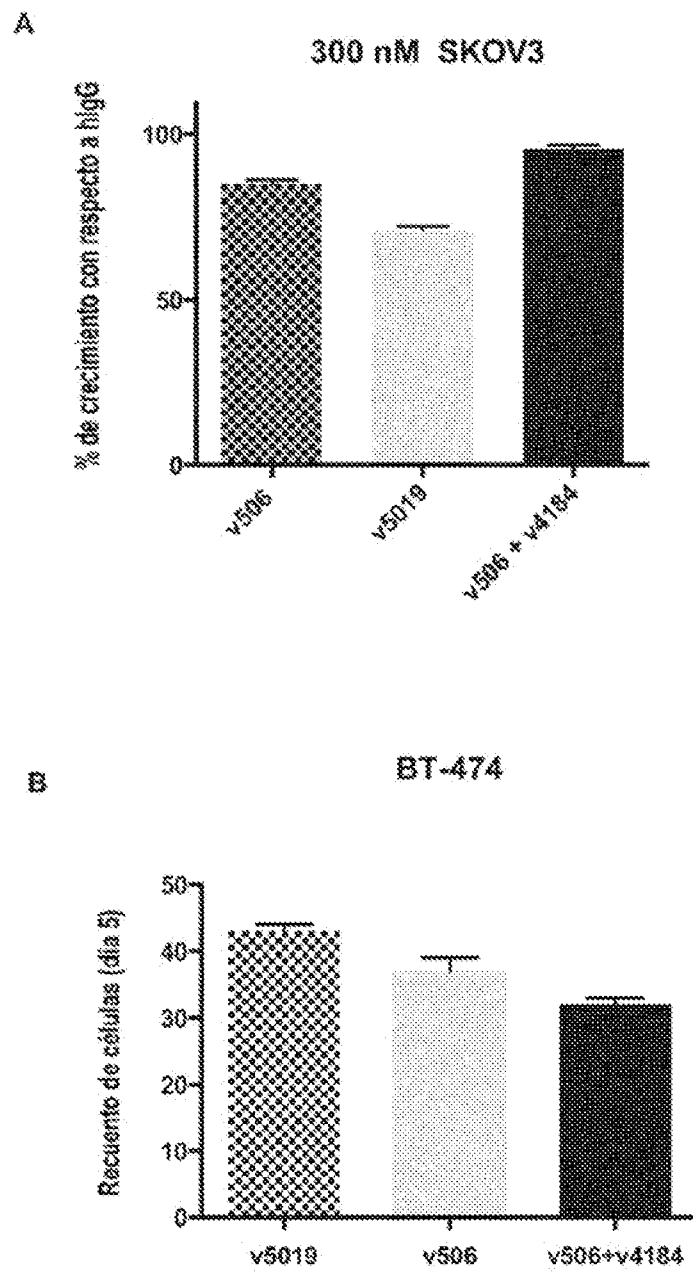


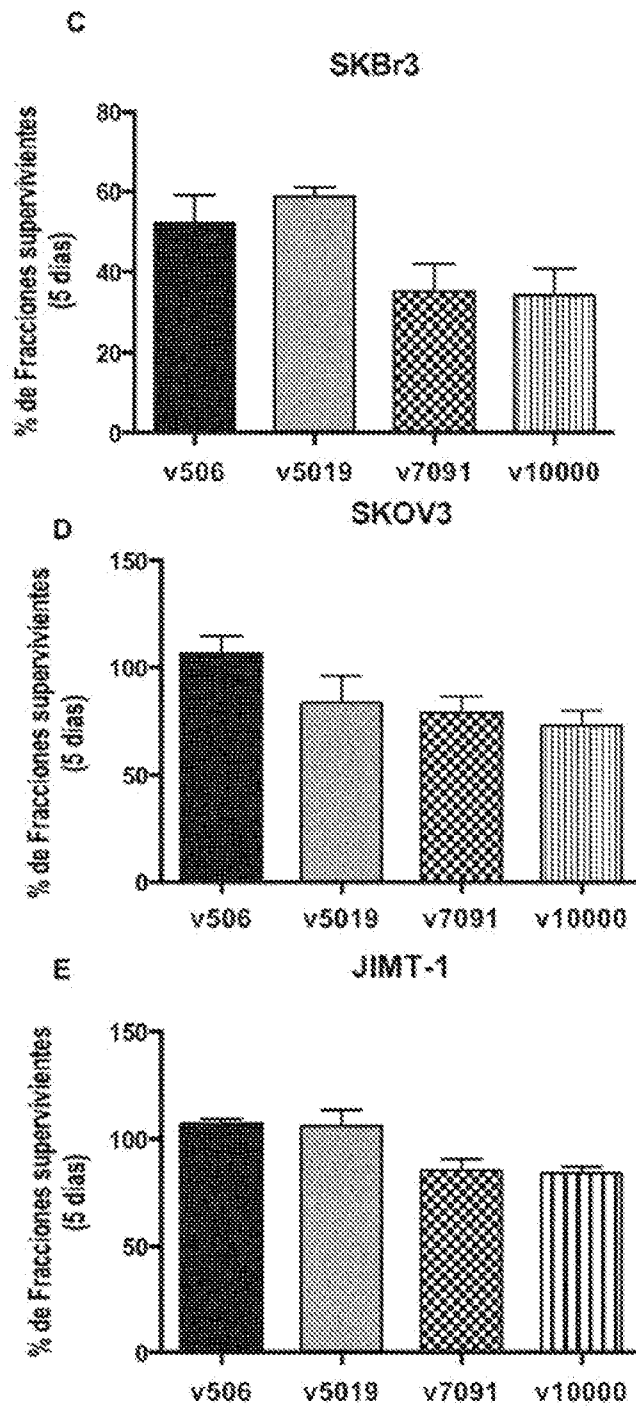
FIG. 6 (Continuación)



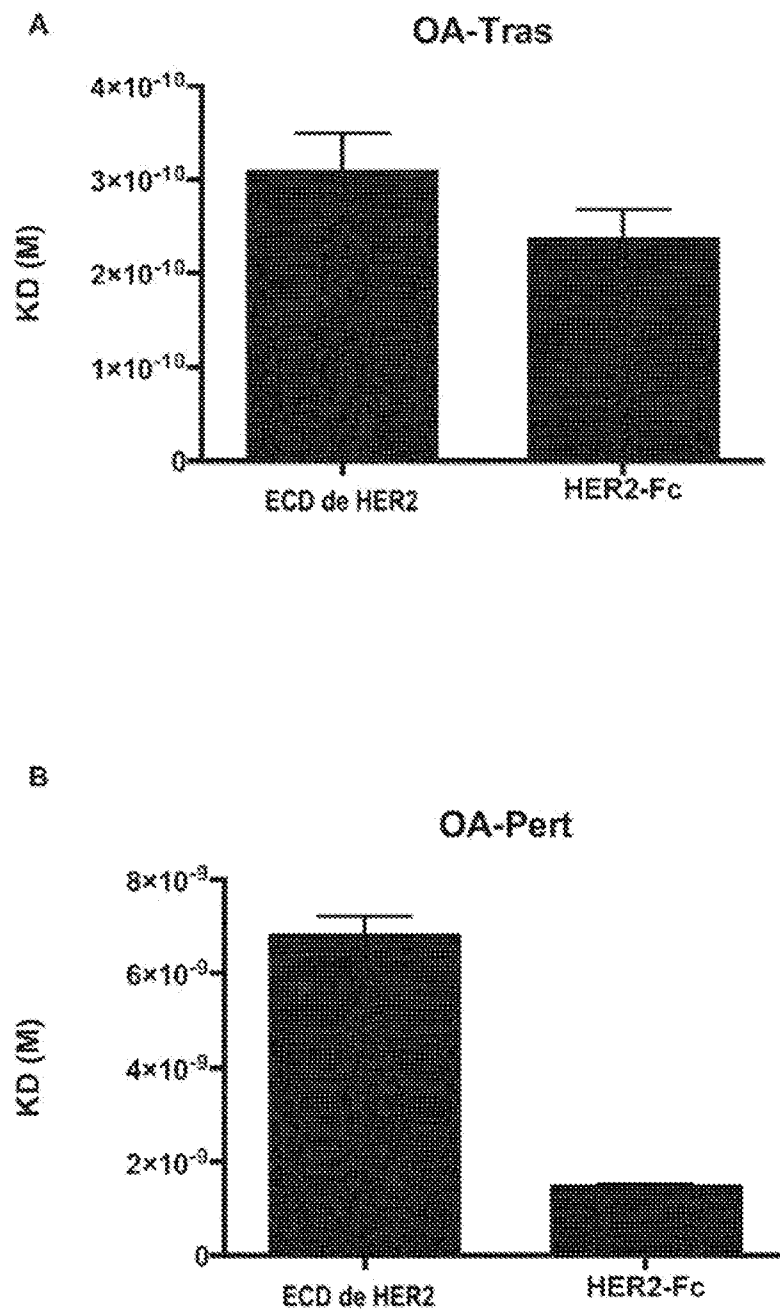
**FIG. 6 (Continuación)**



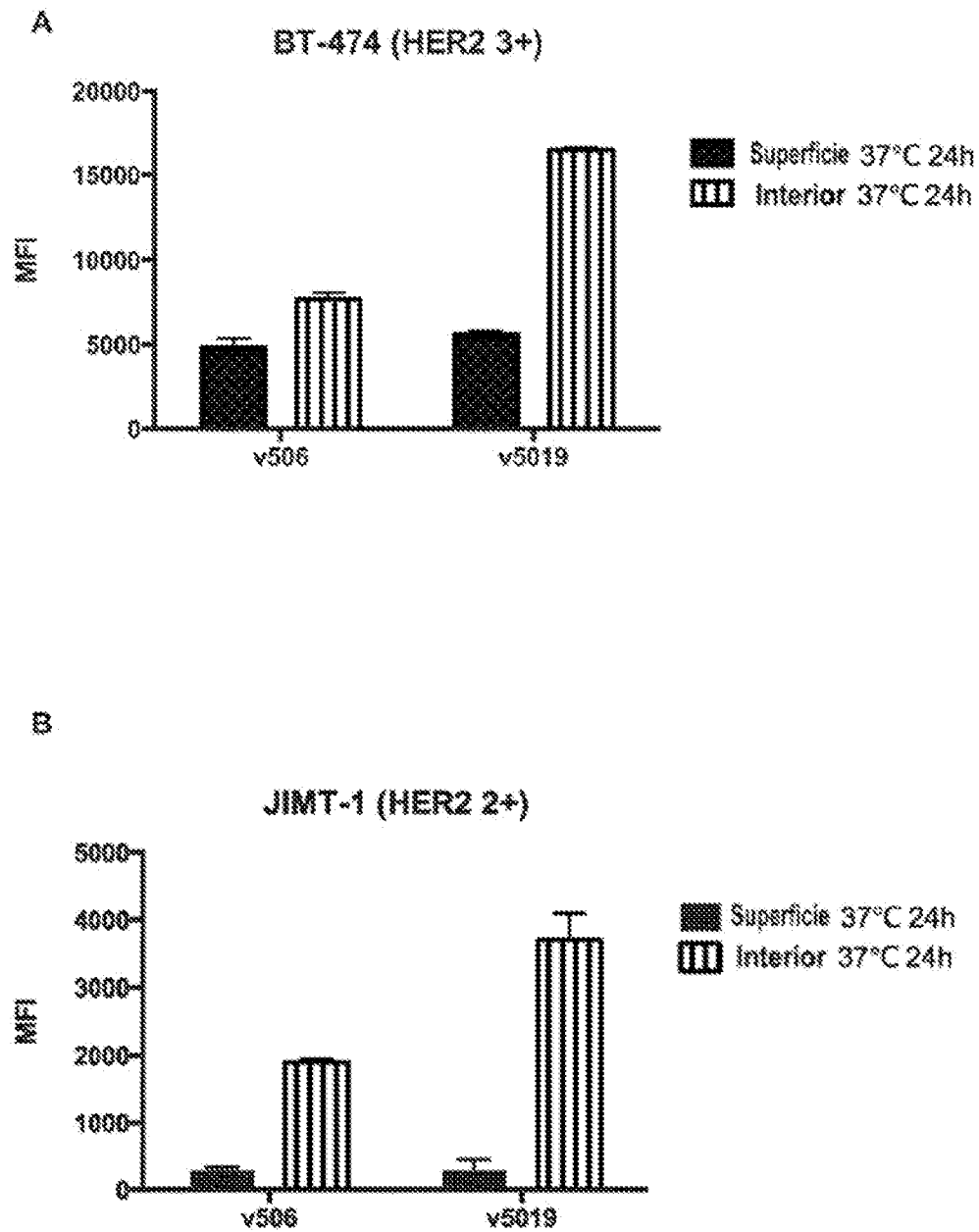
**FIG. 7**



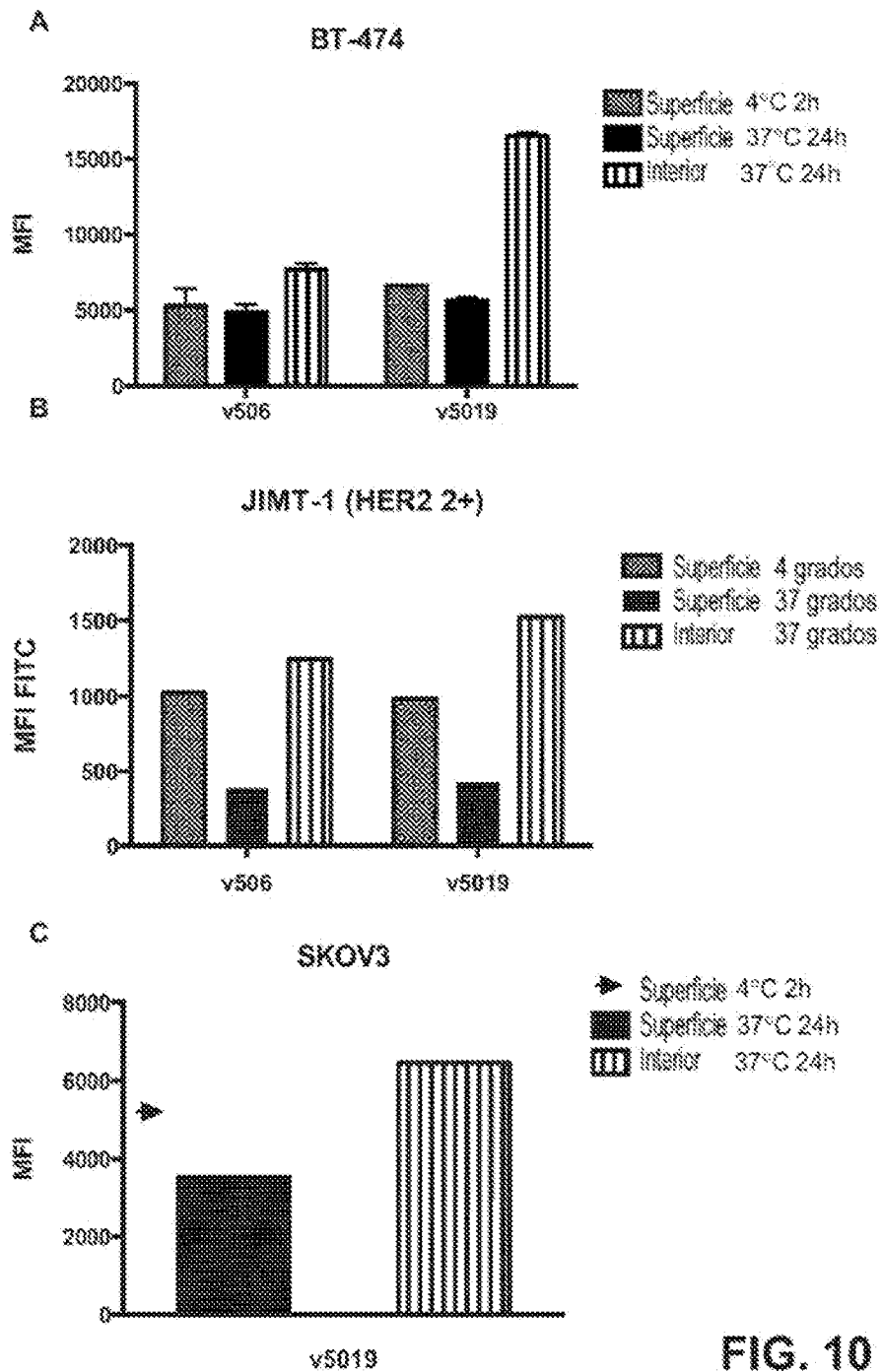
**FIG. 7**  
**(Continuación)**



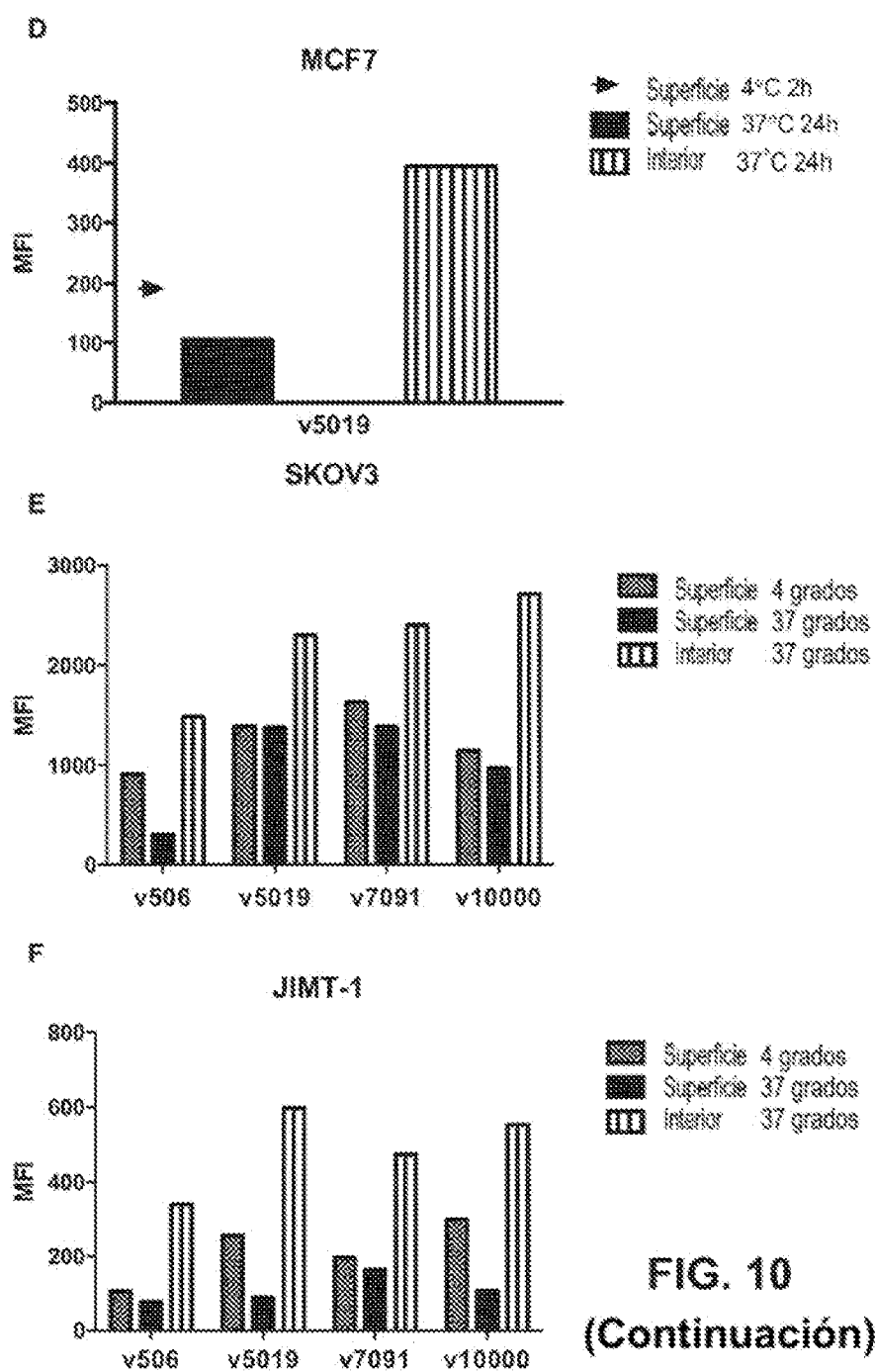
**FIG. 8**



**FIG. 9**



**FIG. 10**



**FIG. 10**  
(Continuación)



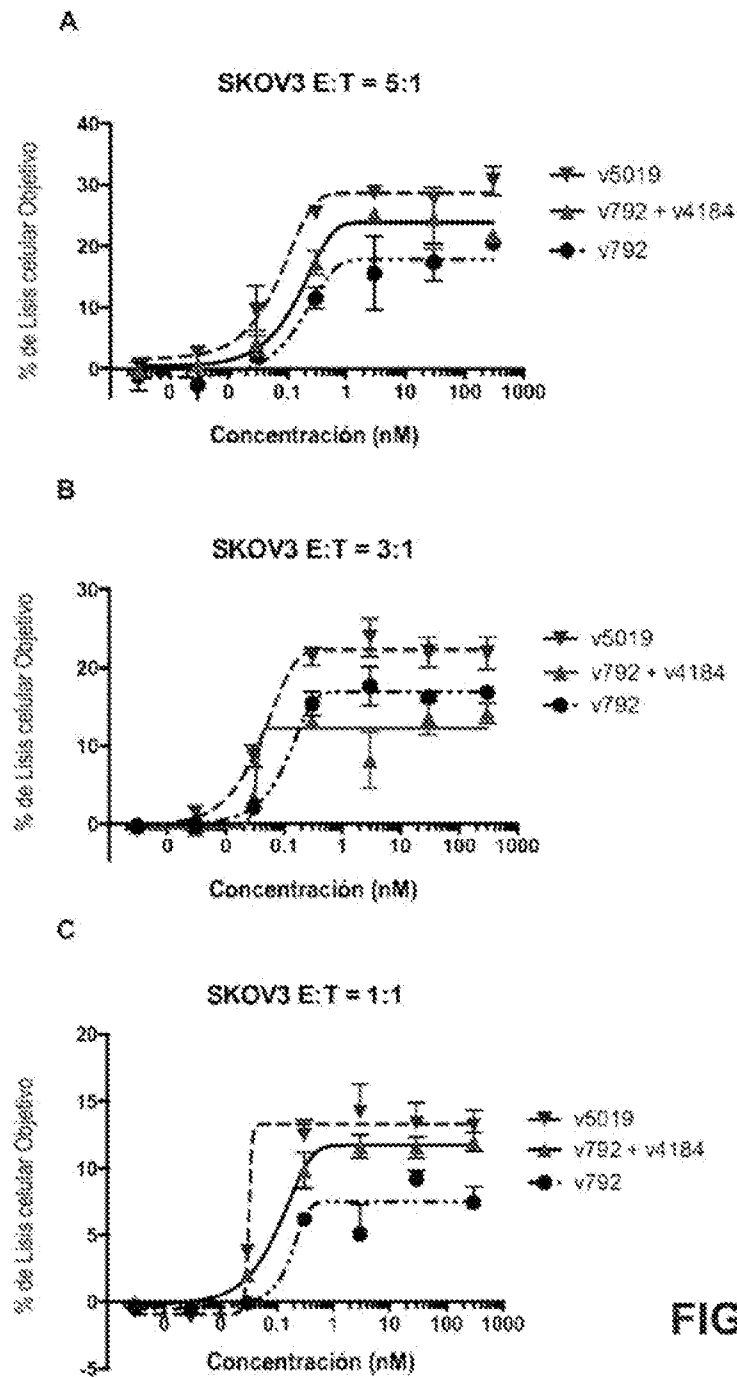
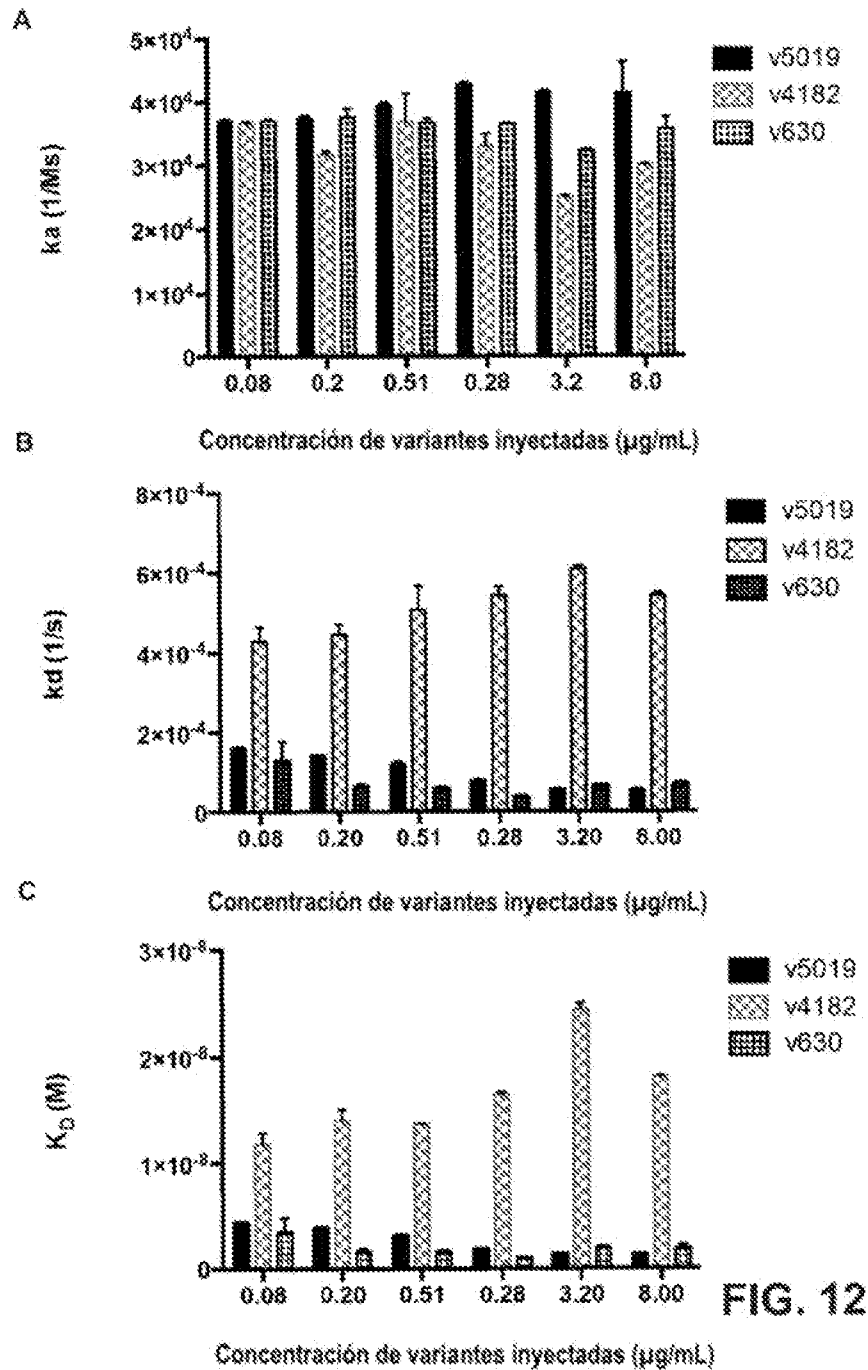
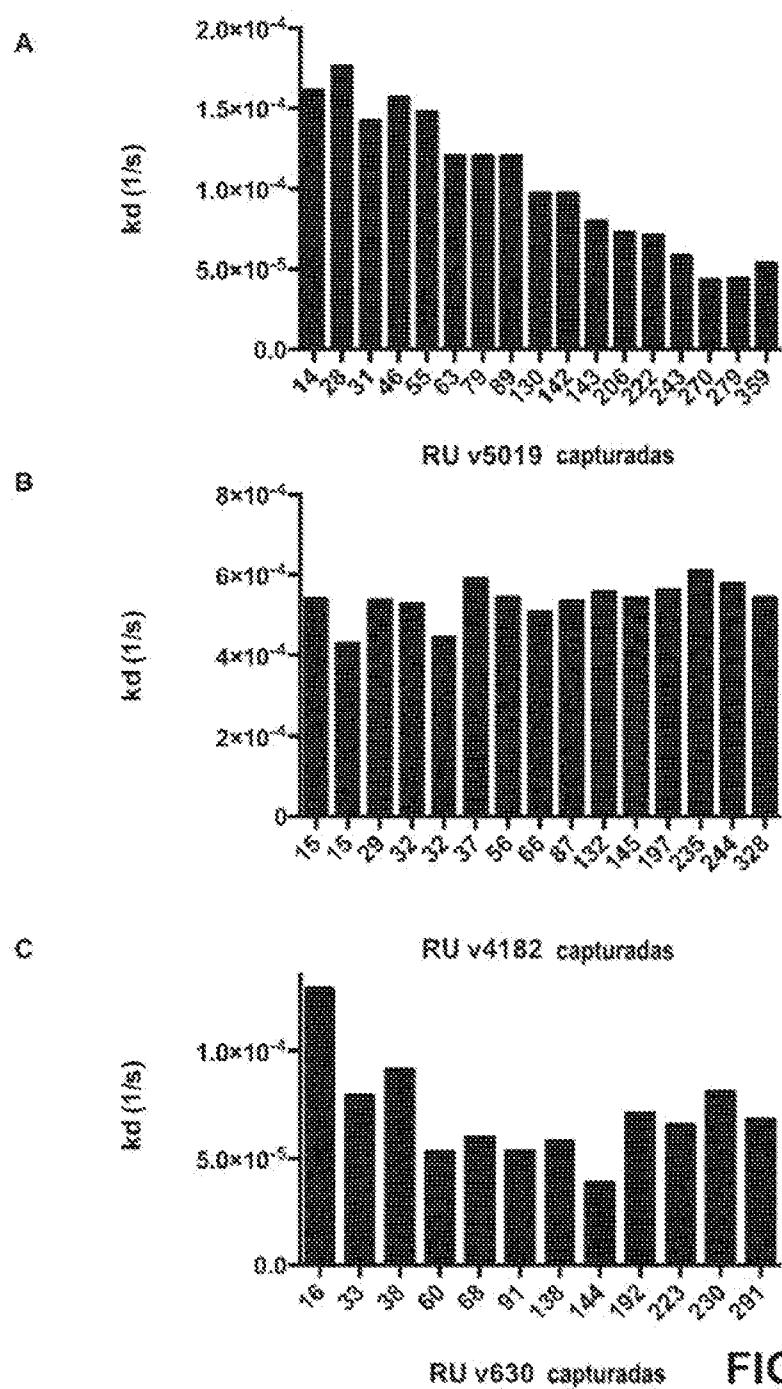


FIG. 11





**FIG. 13**

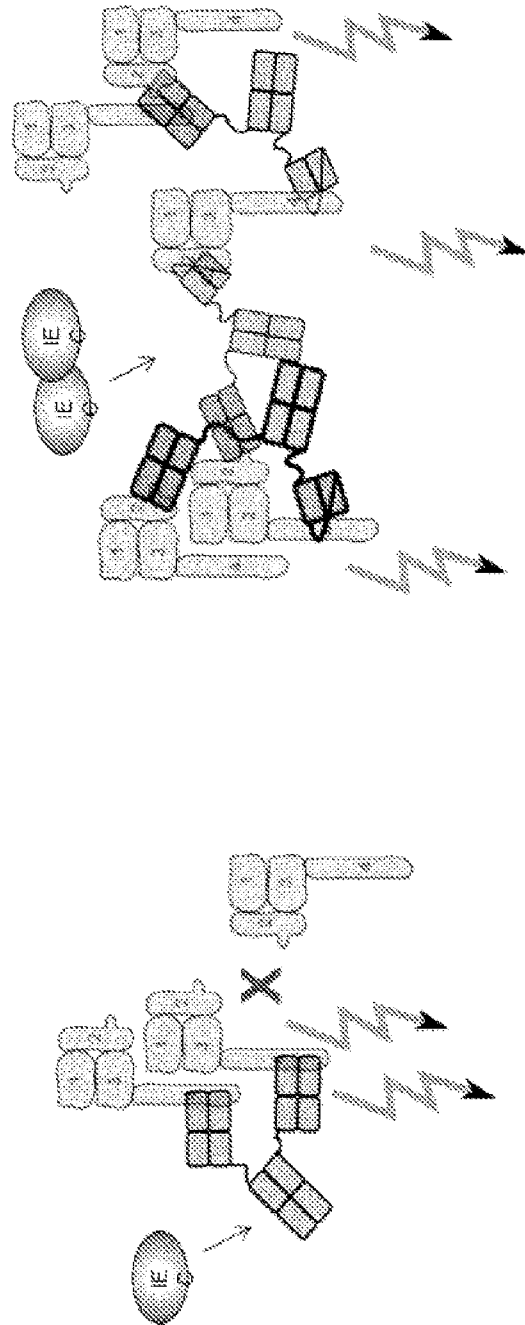
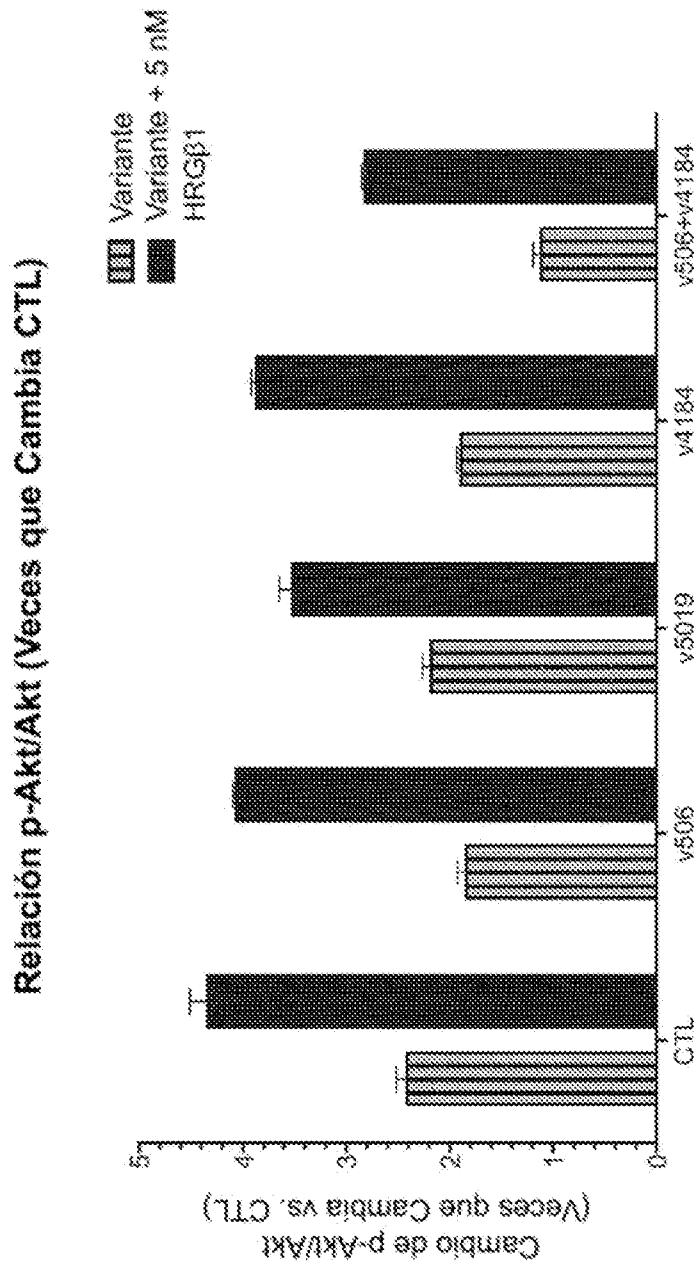


FIG. 14



**FIG. 15**

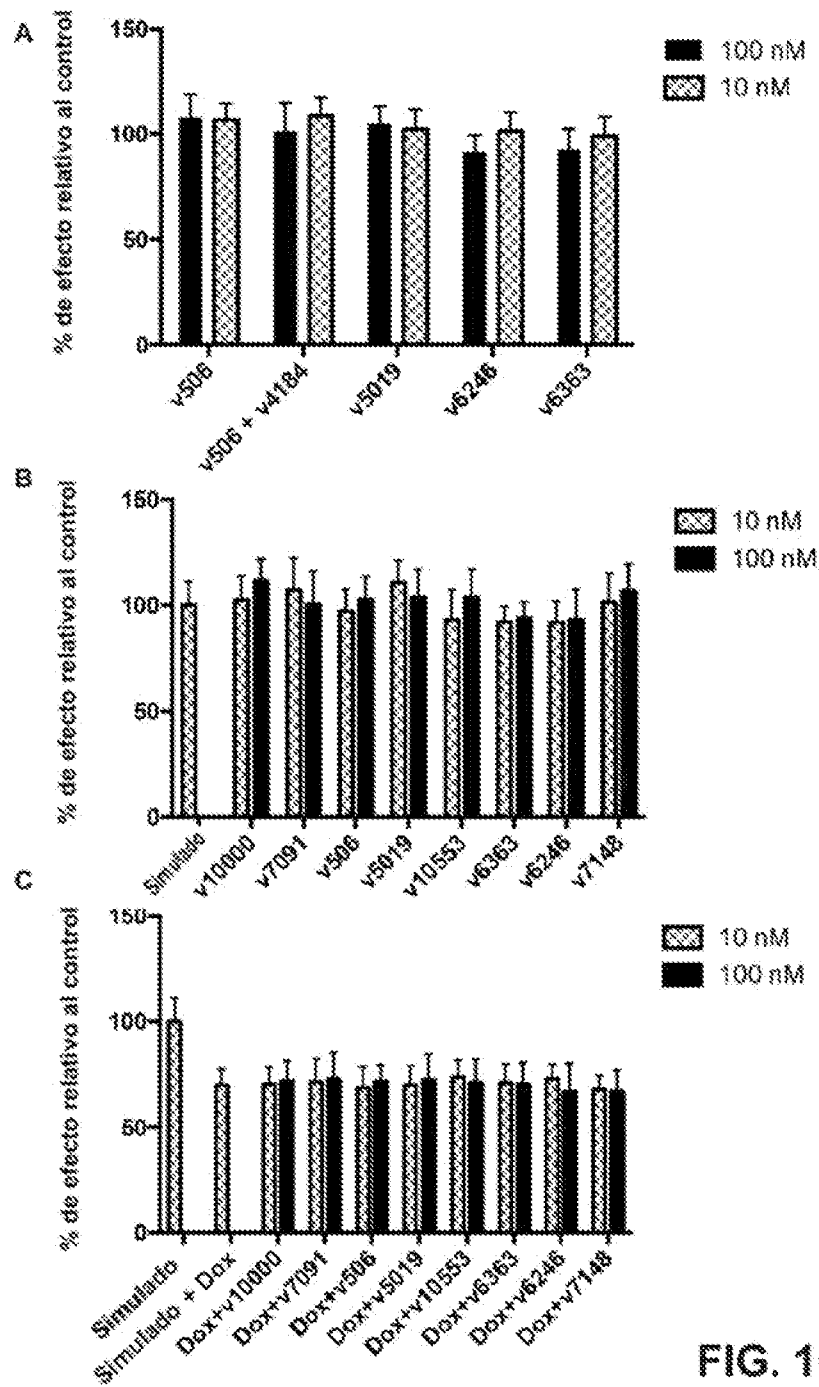
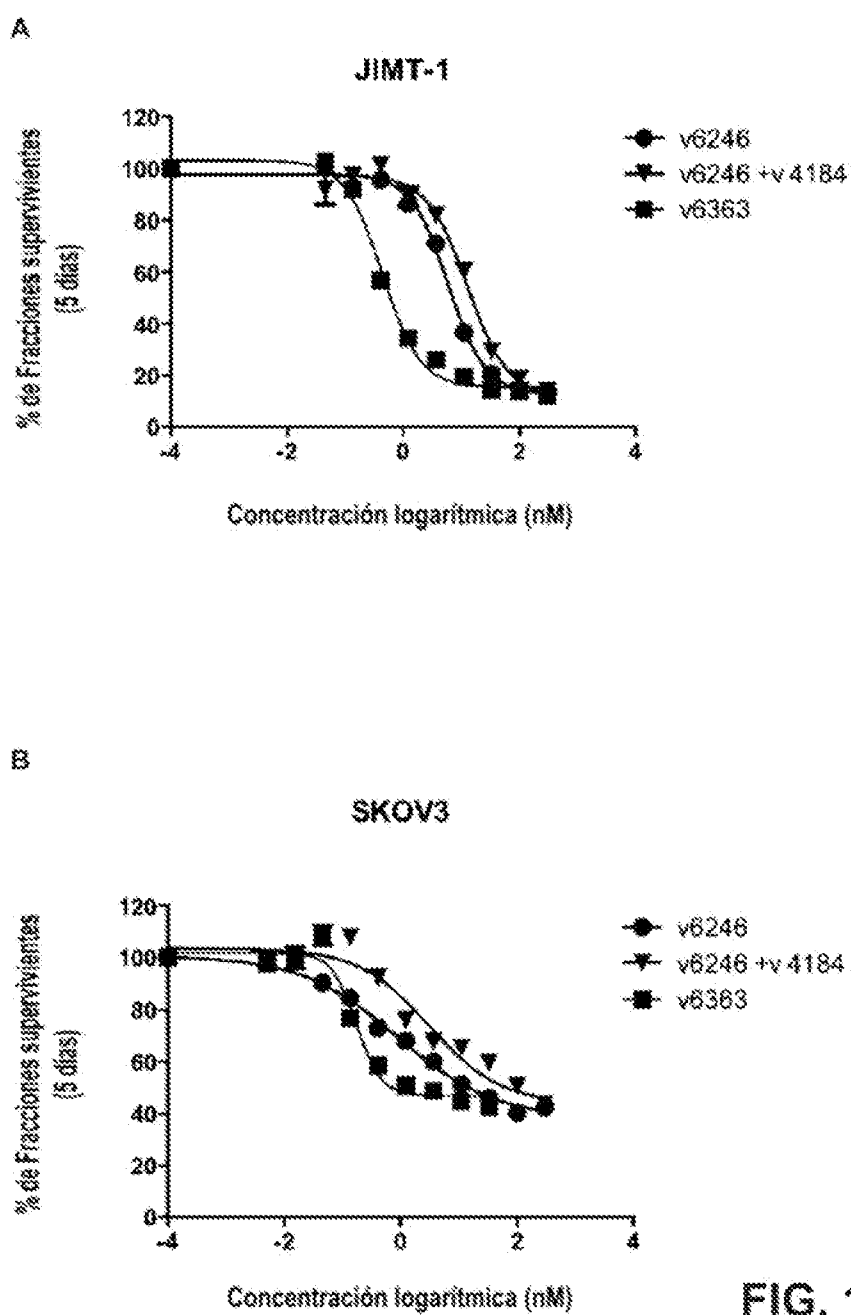
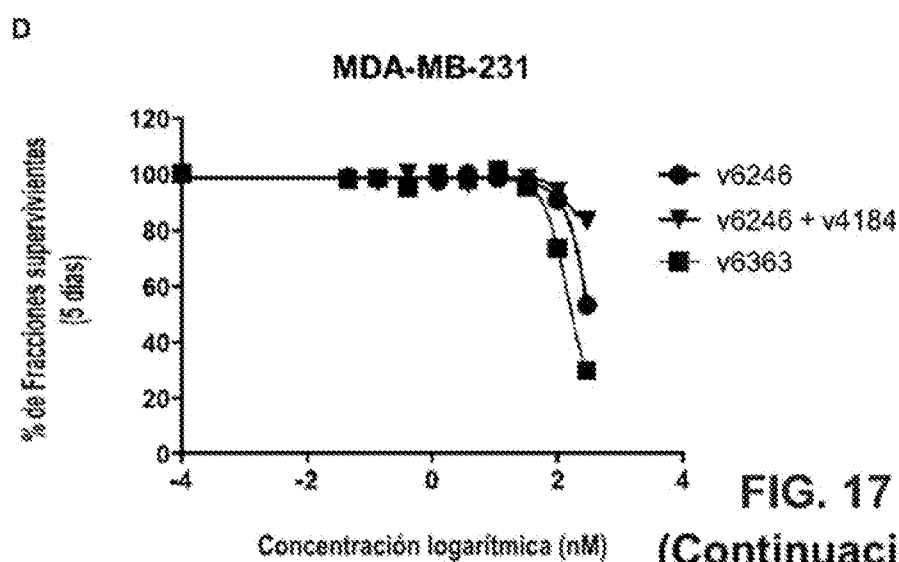
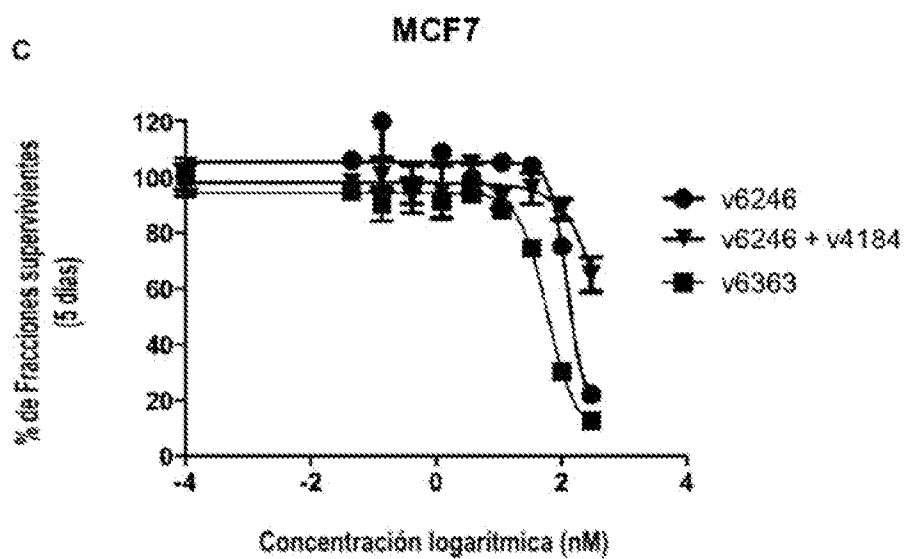


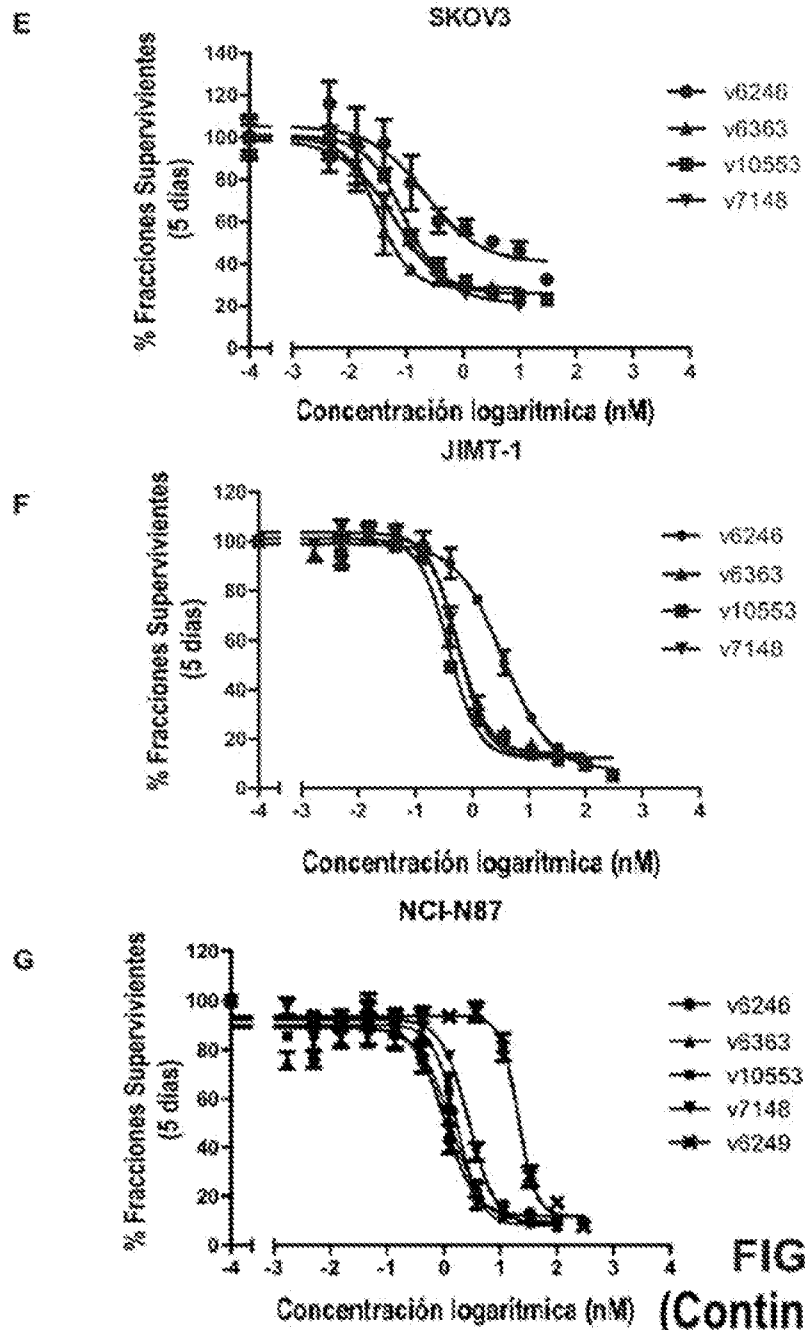
FIG. 16





**FIG. 17**  
**(Continuación)**





**FIG. 17**  
**(Continuación)**

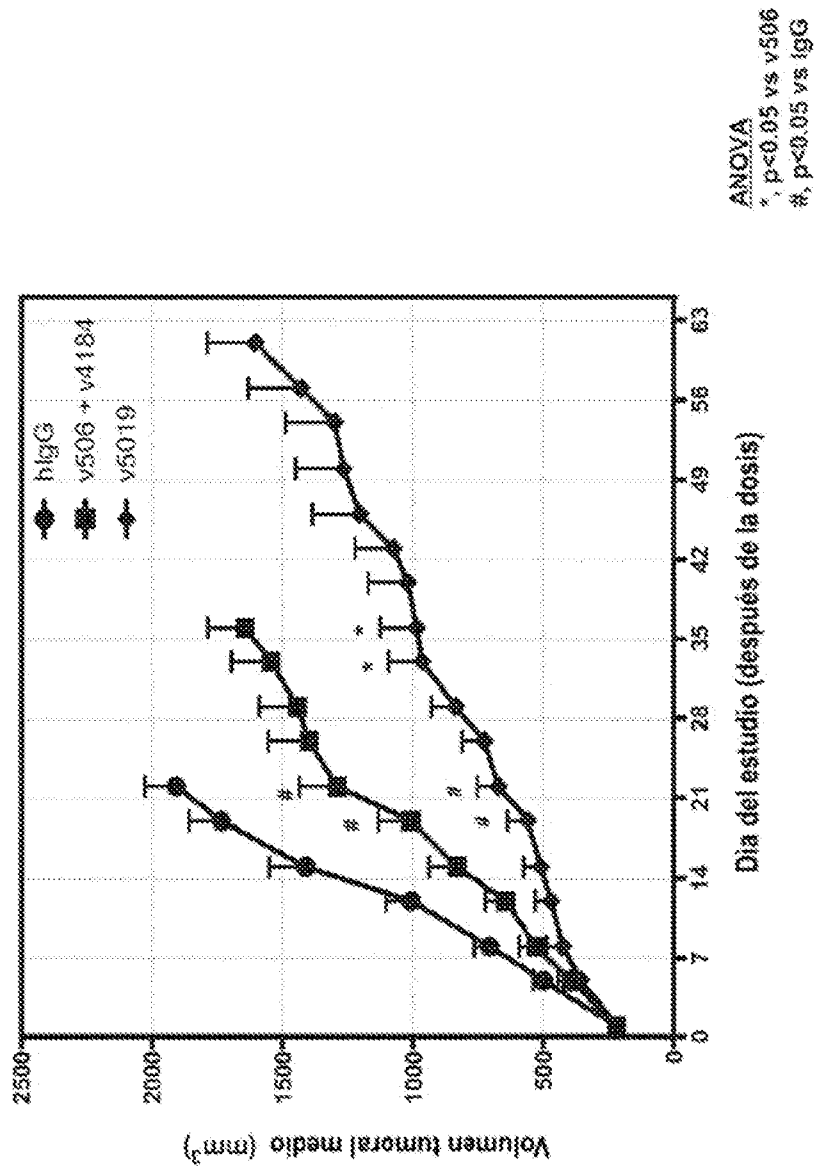


FIG. 18A

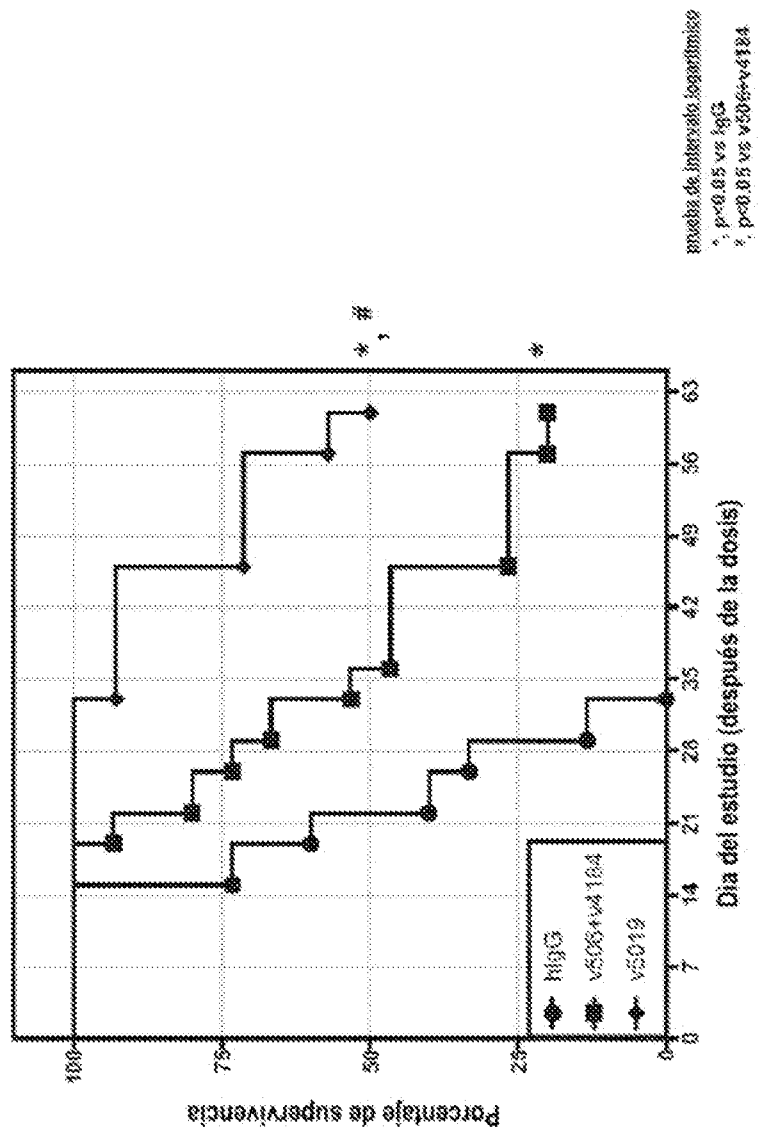


FIG. 18B

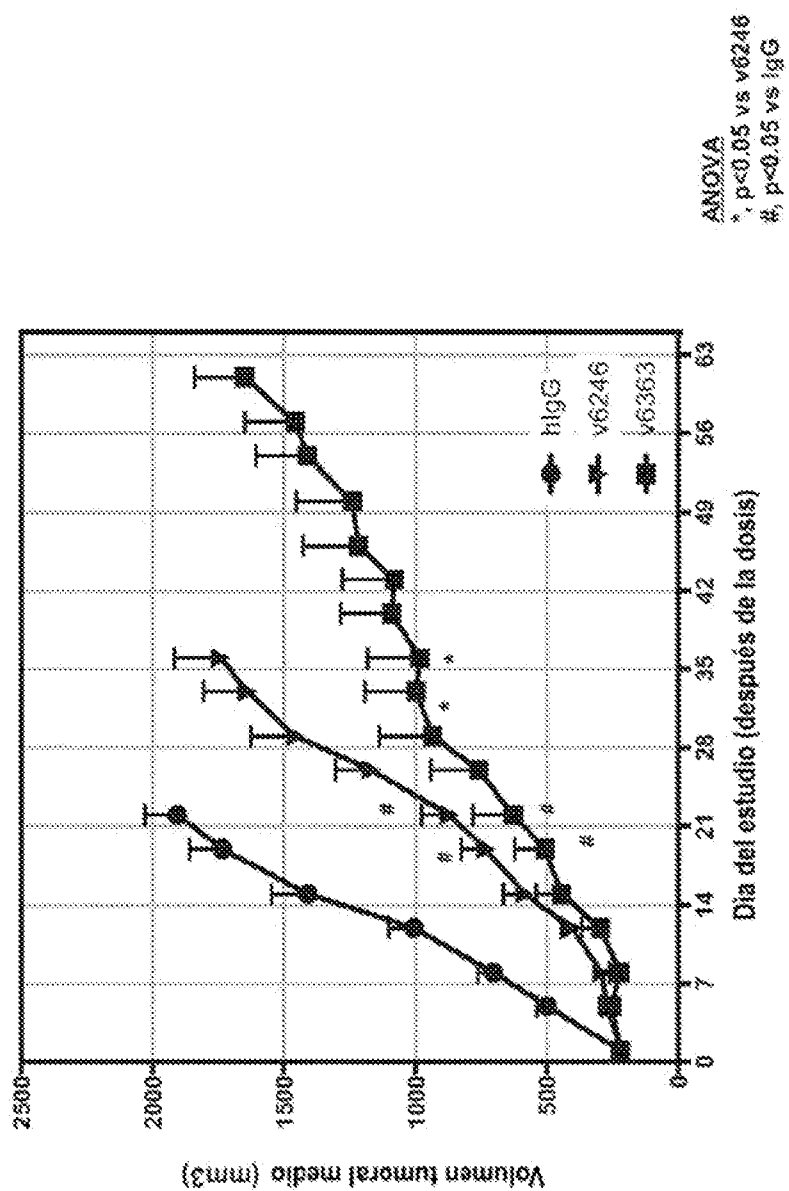
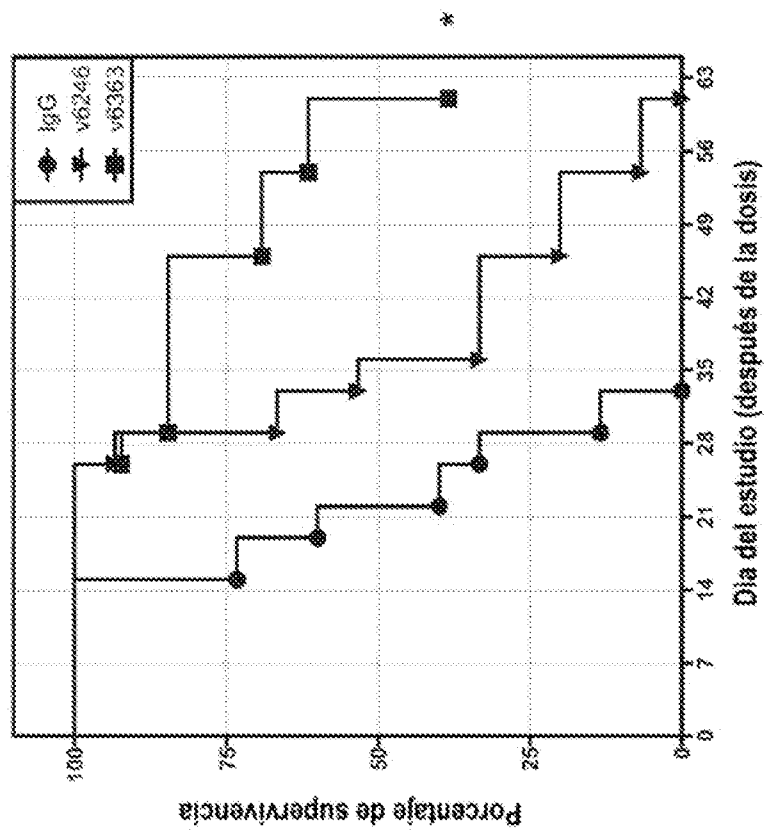


FIG. 19A



prueba de intervalo logarítmico  
\*,  $p < 0.05$  vs v6246

FIG. 19B

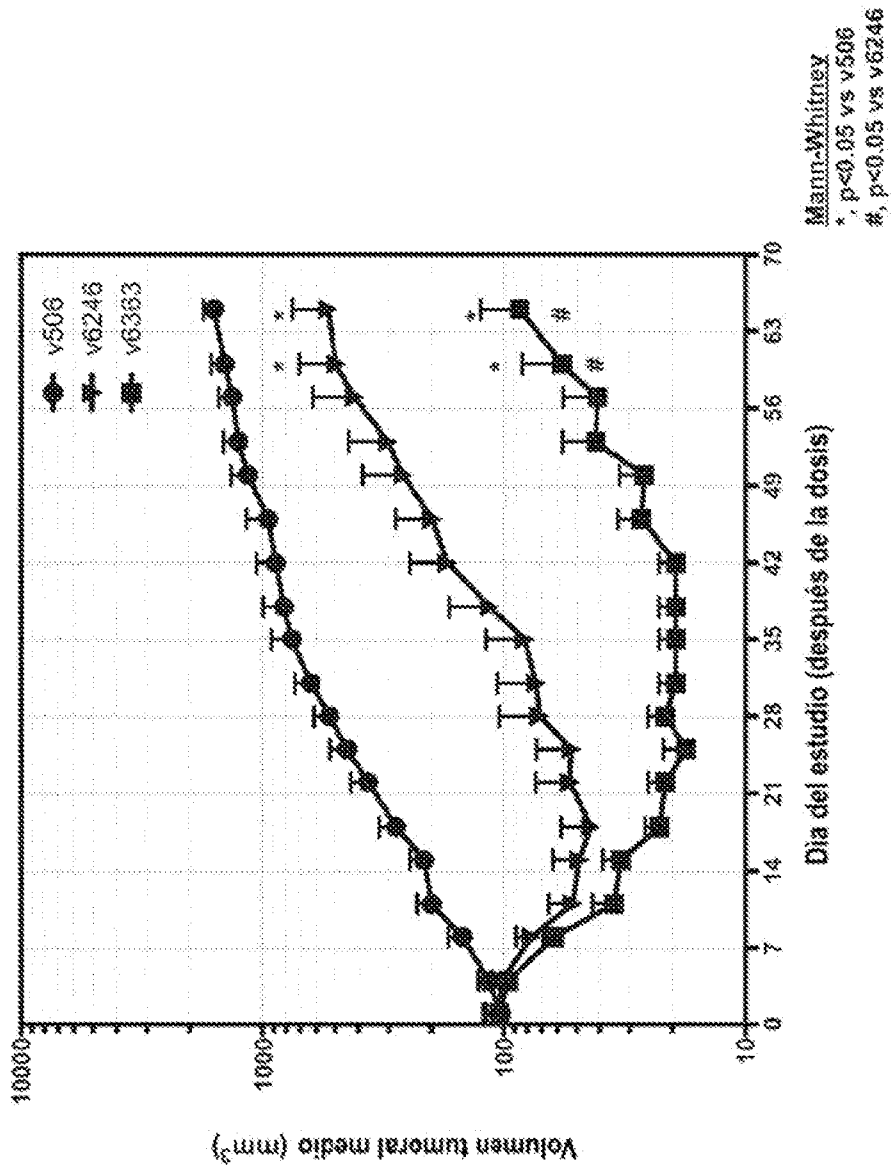


FIG. 20

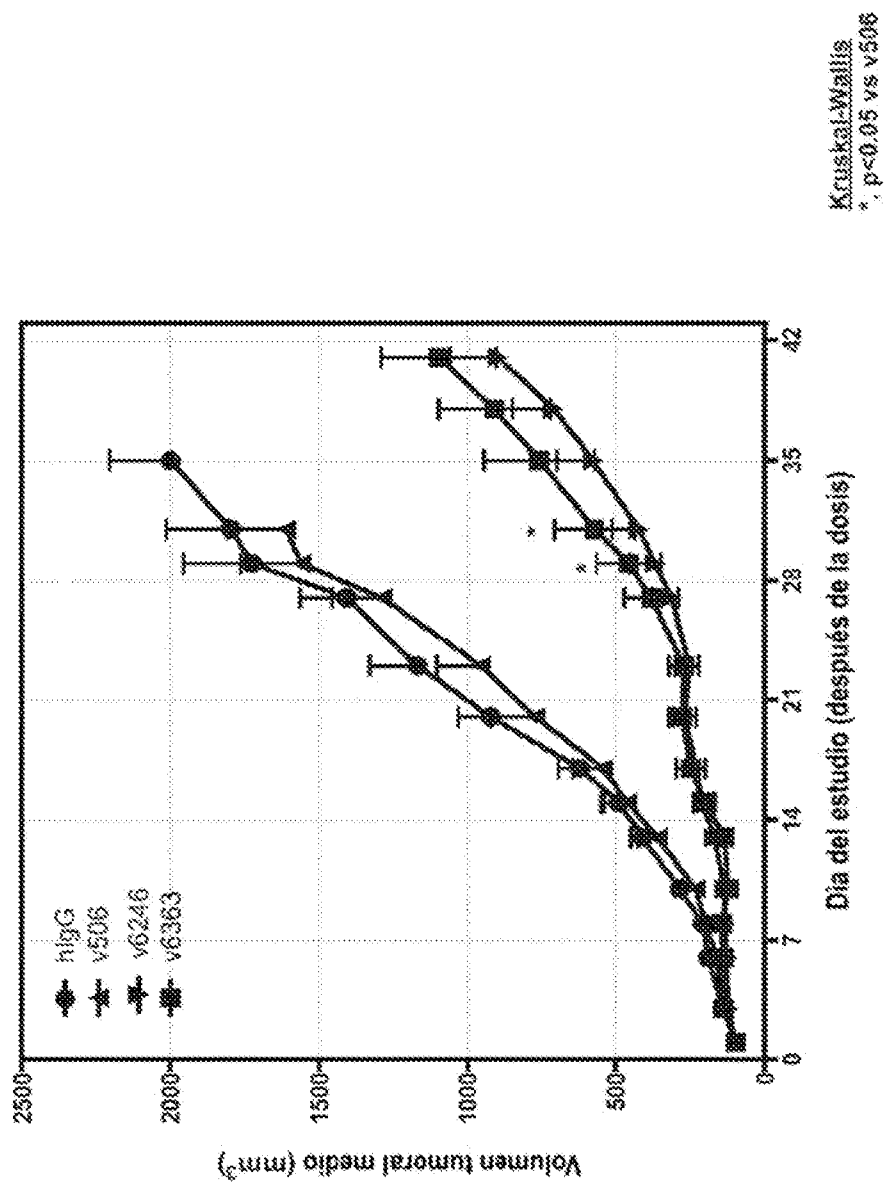
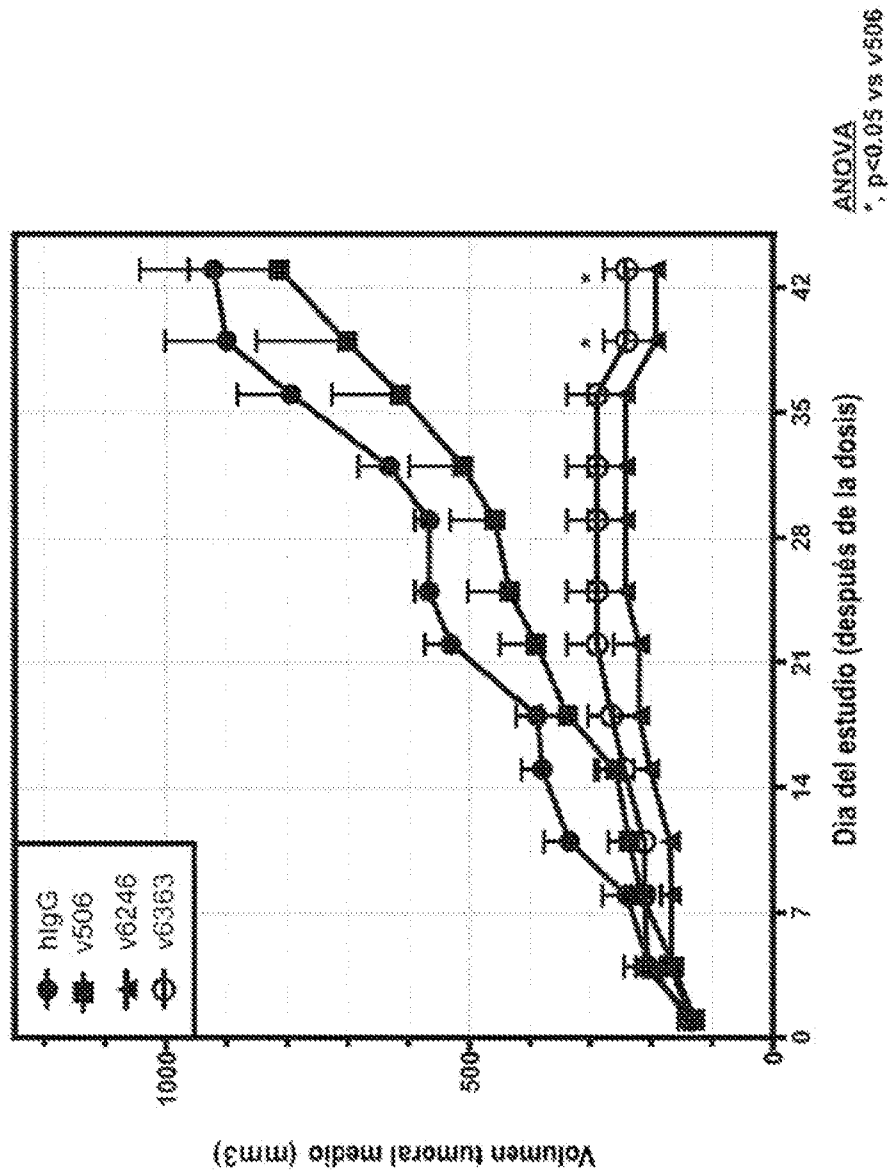
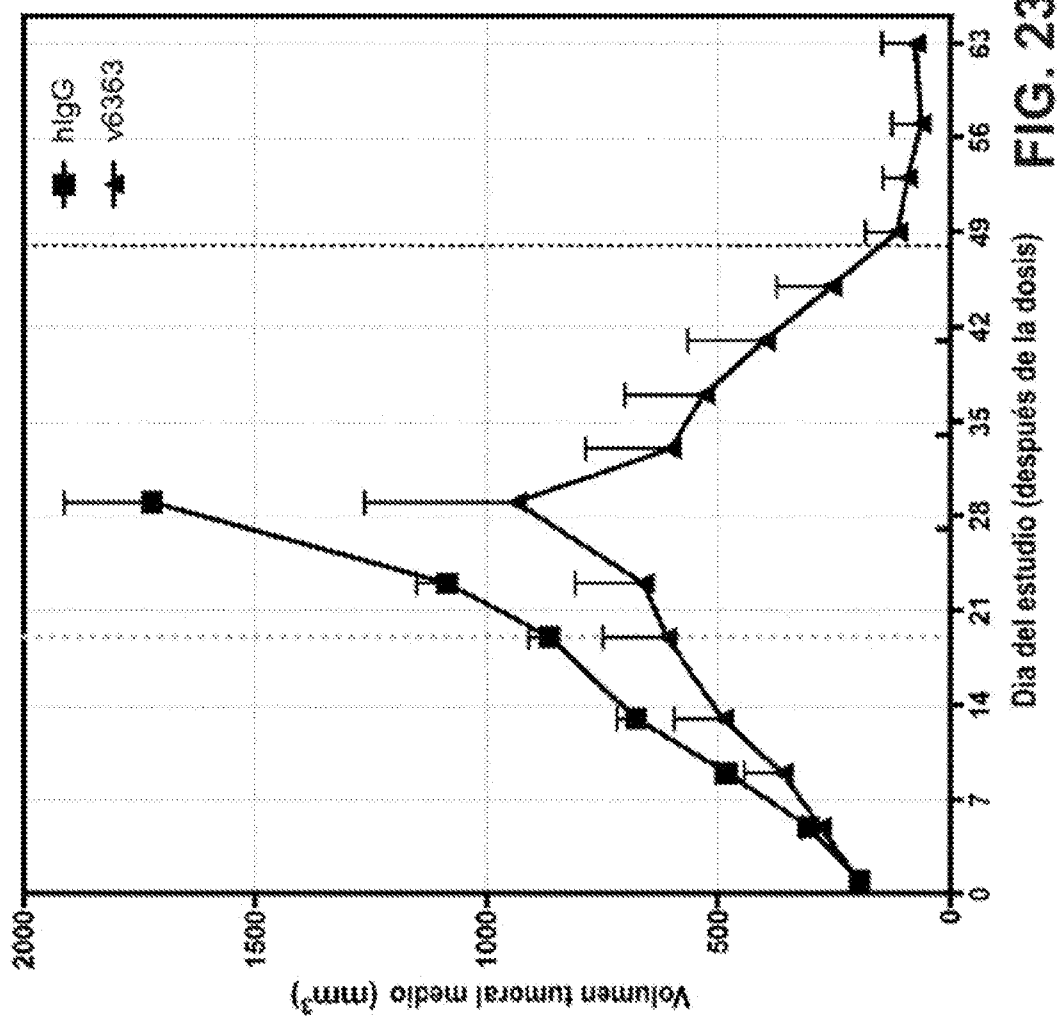


FIG. 21



**FIG. 22**





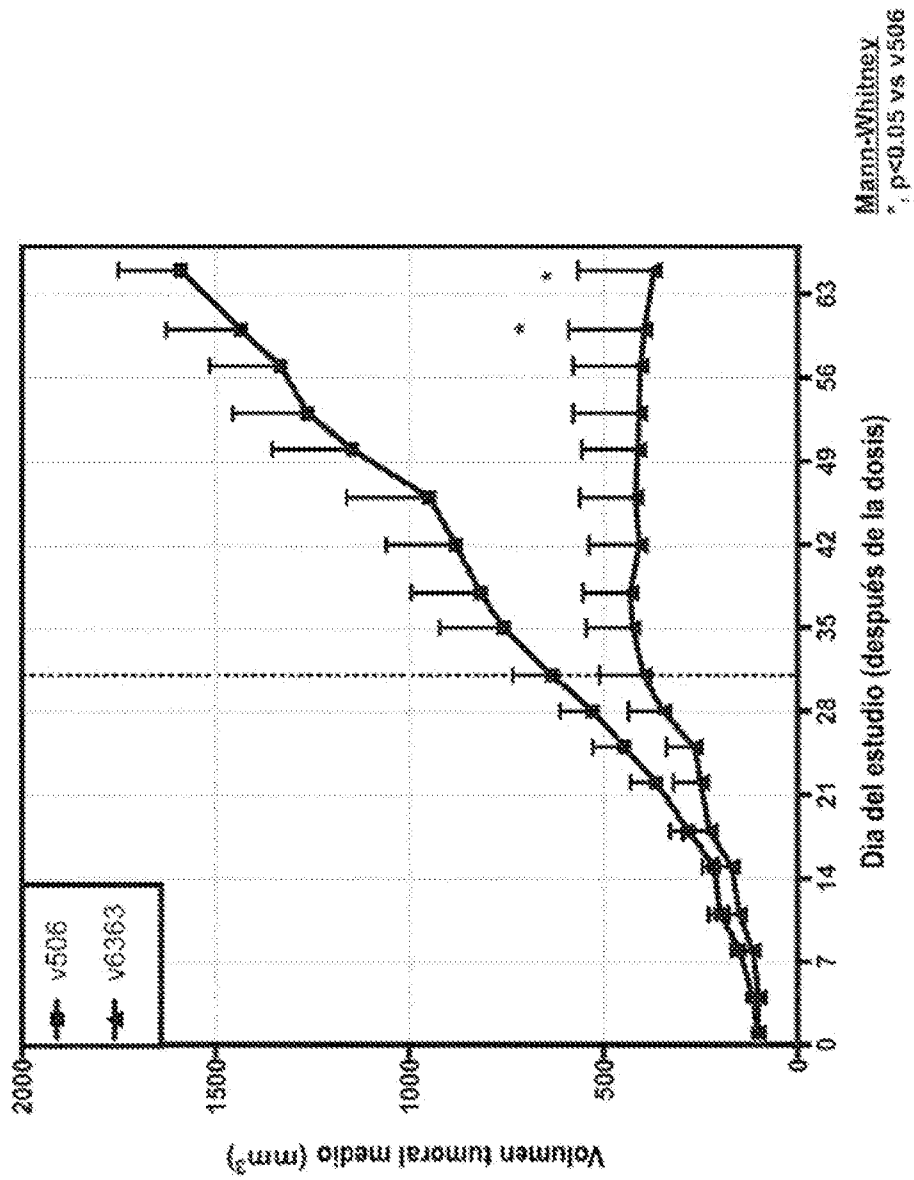


FIG. 24

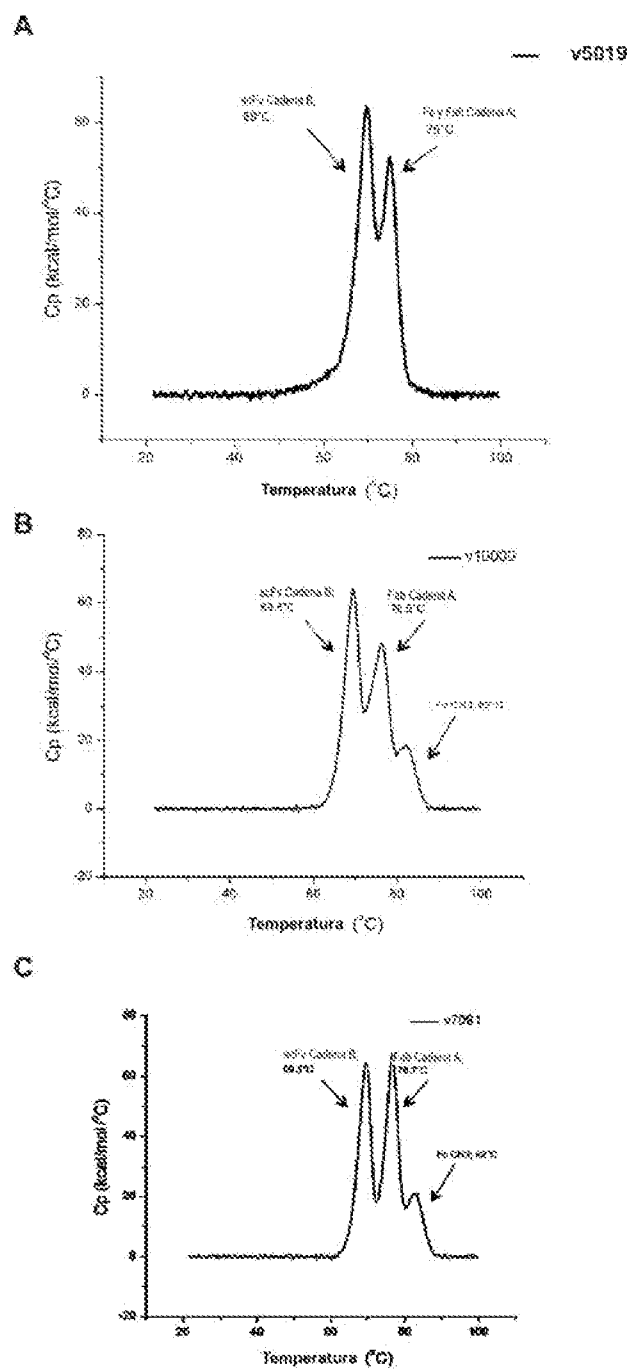
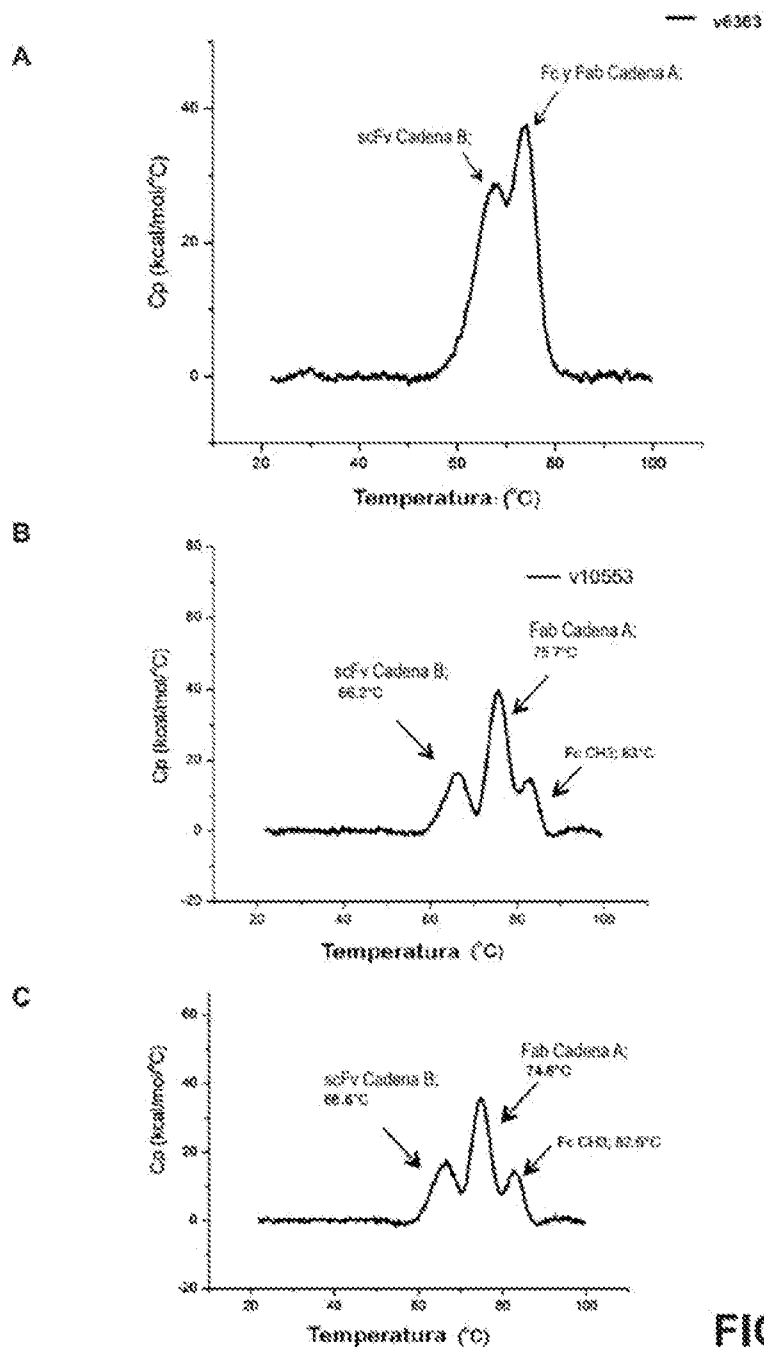


FIG. 25



**FIG. 26**

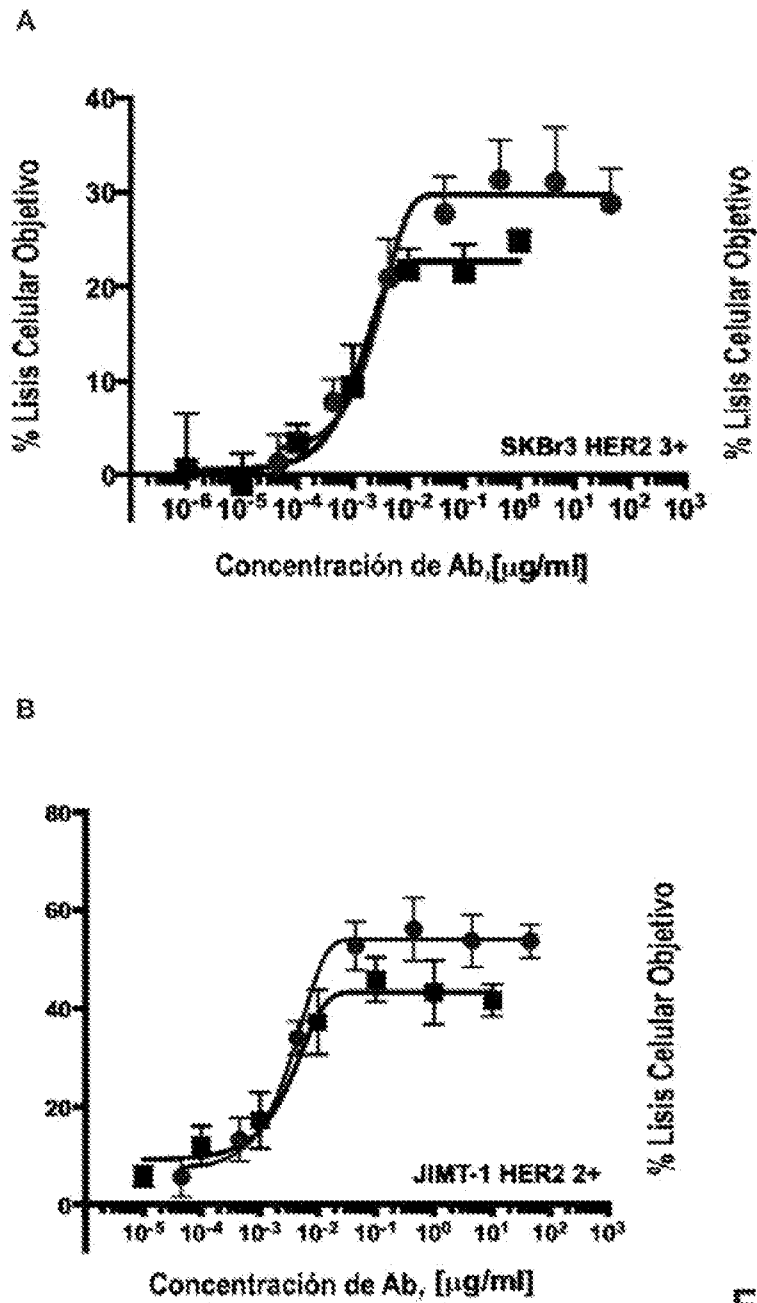
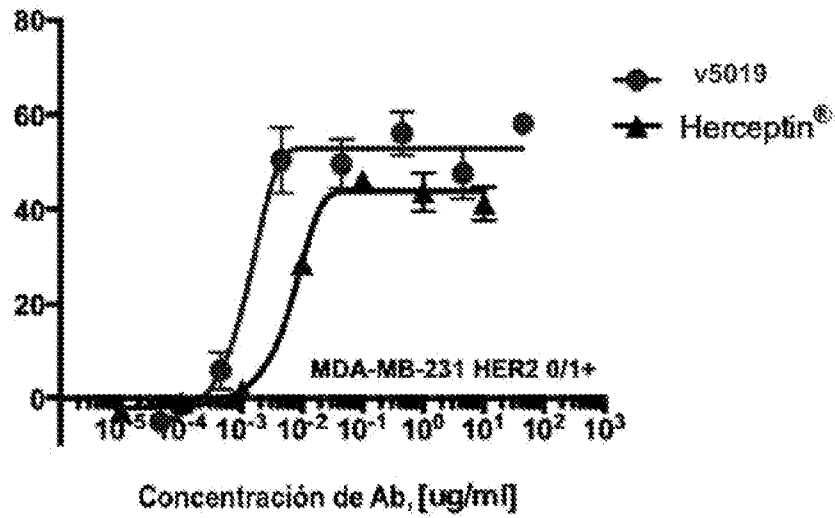
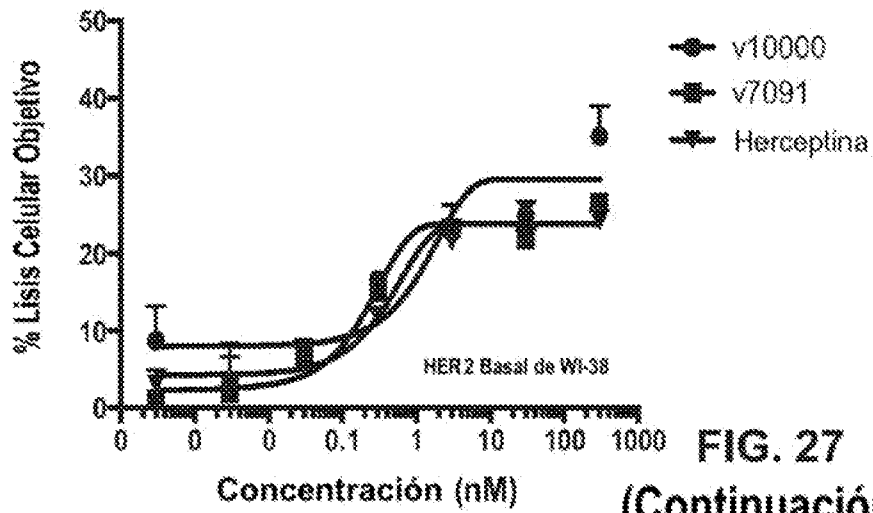


FIG. 27

C

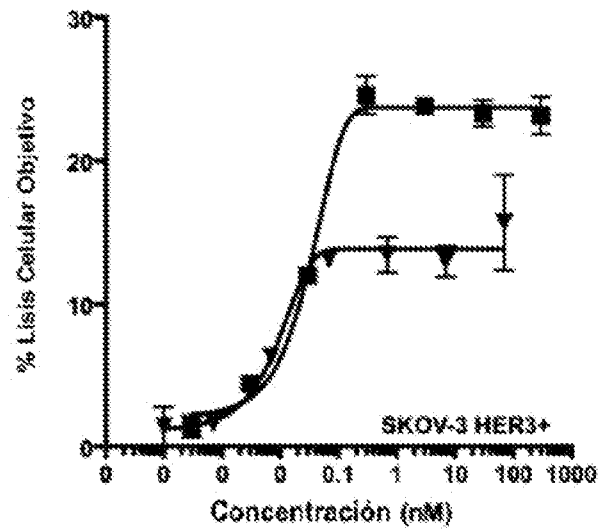


D



**FIG. 27**  
**(Continuación)**

A



B

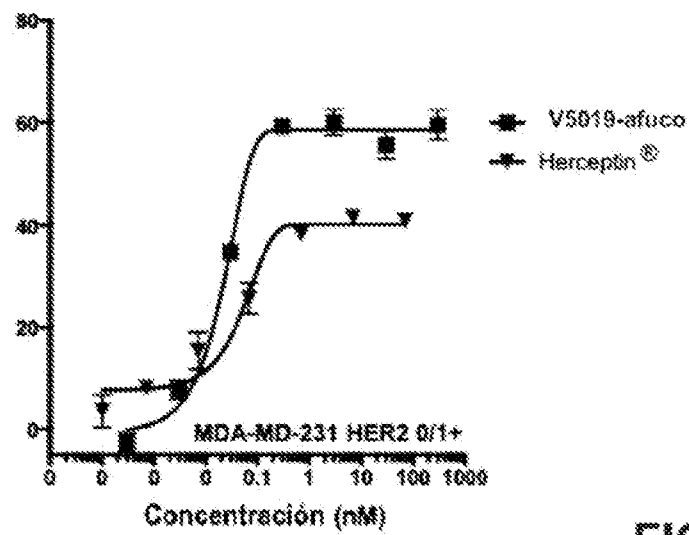


FIG. 28

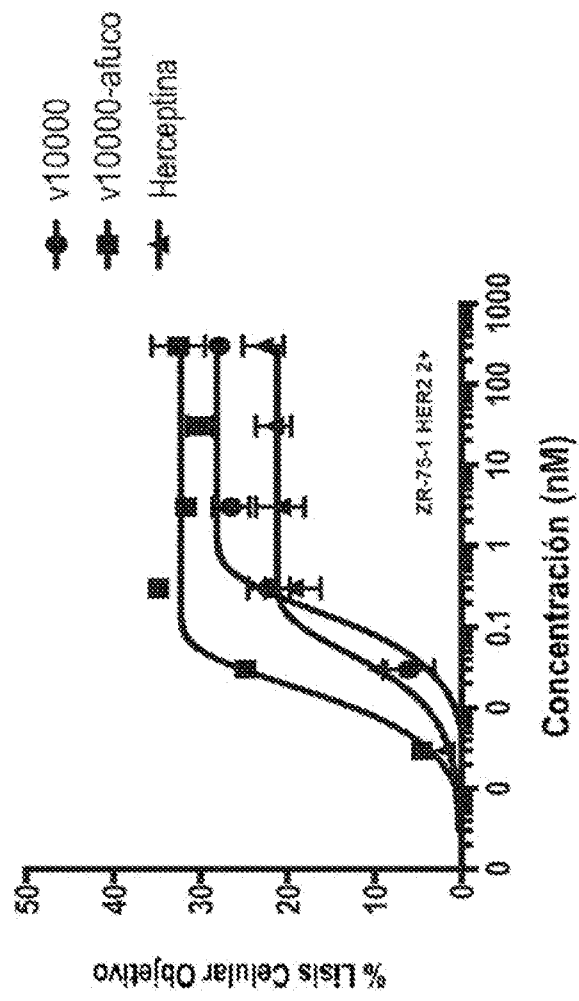


FIG. 28C



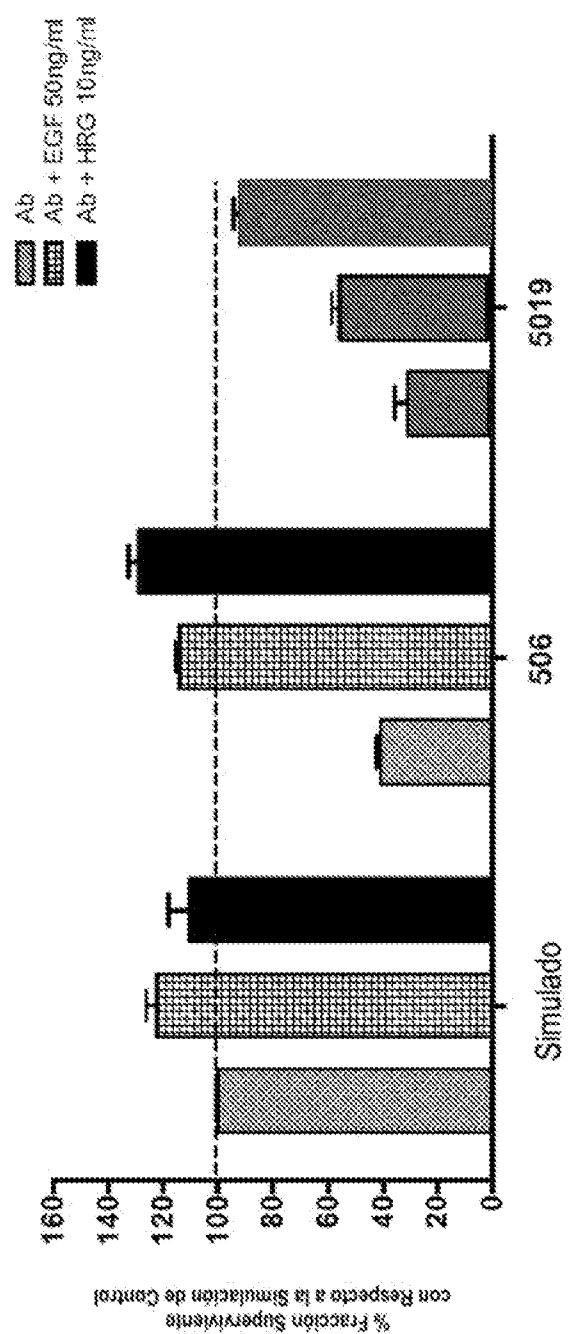
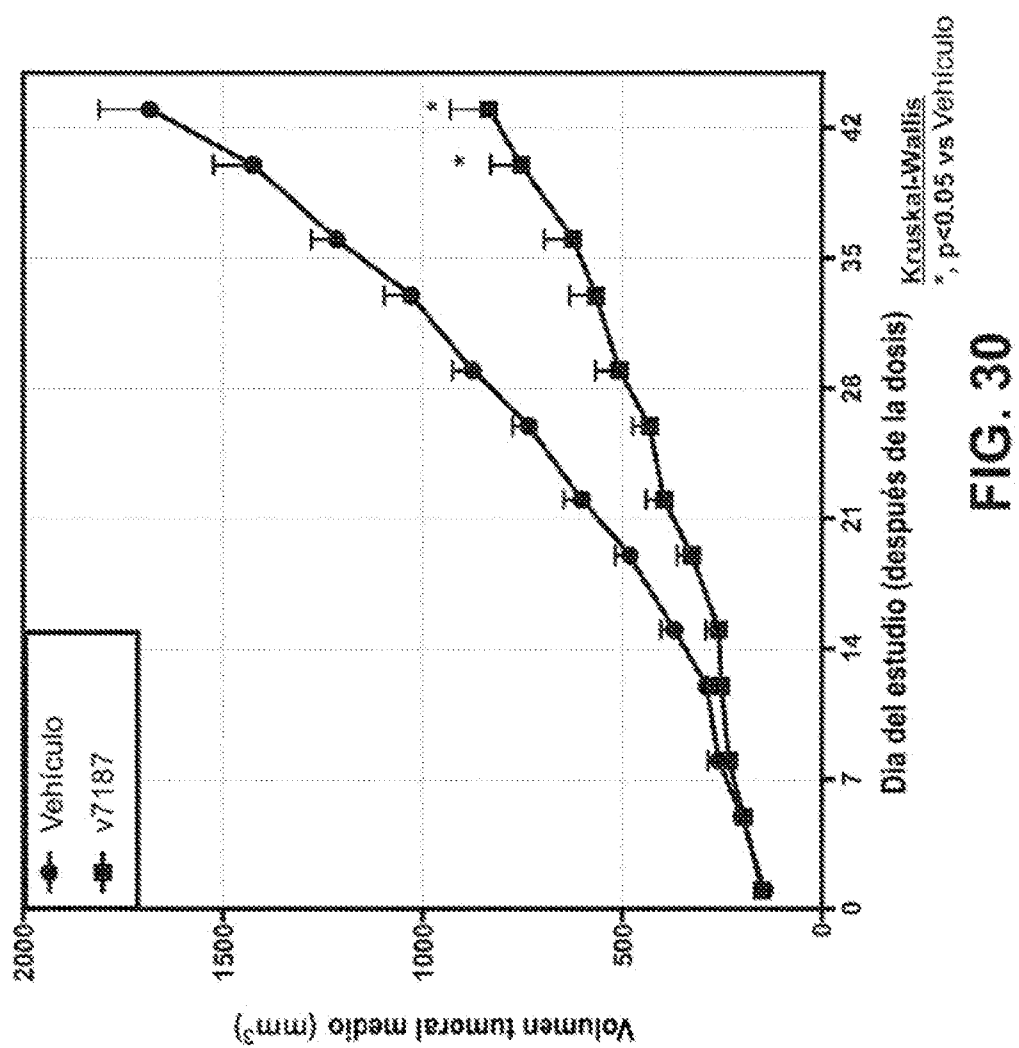
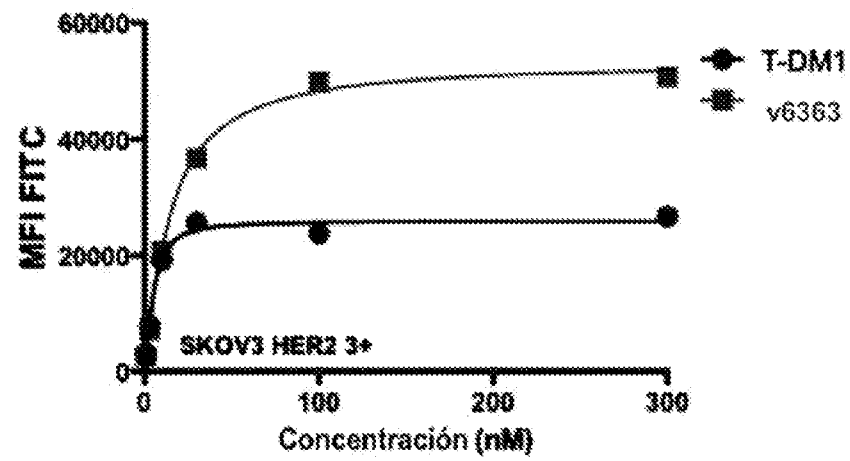


FIG. 29



A



B

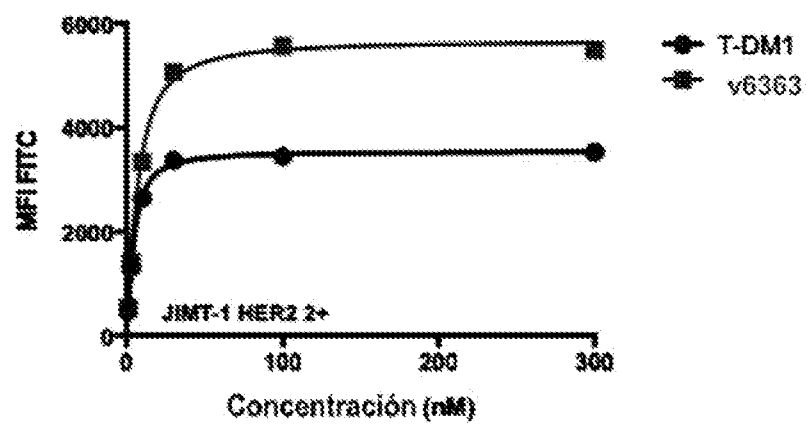
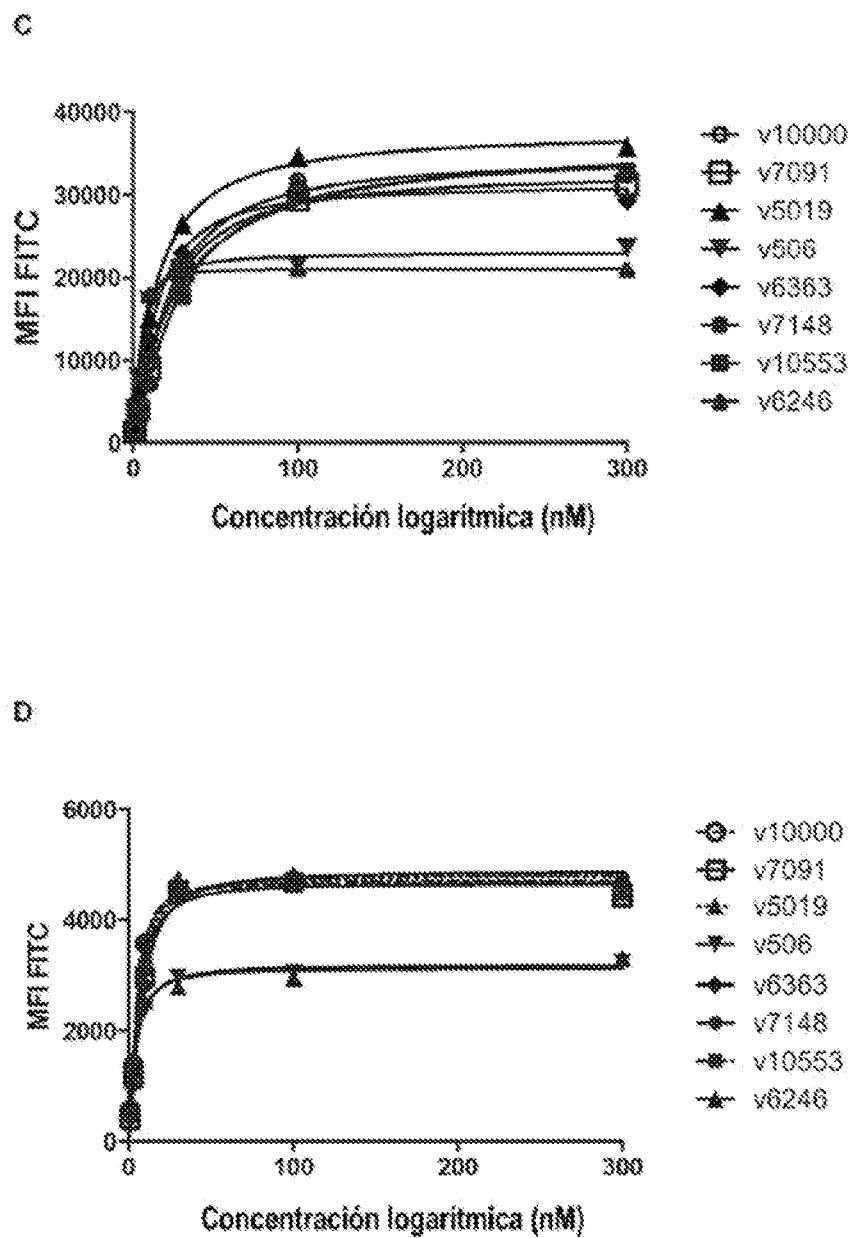
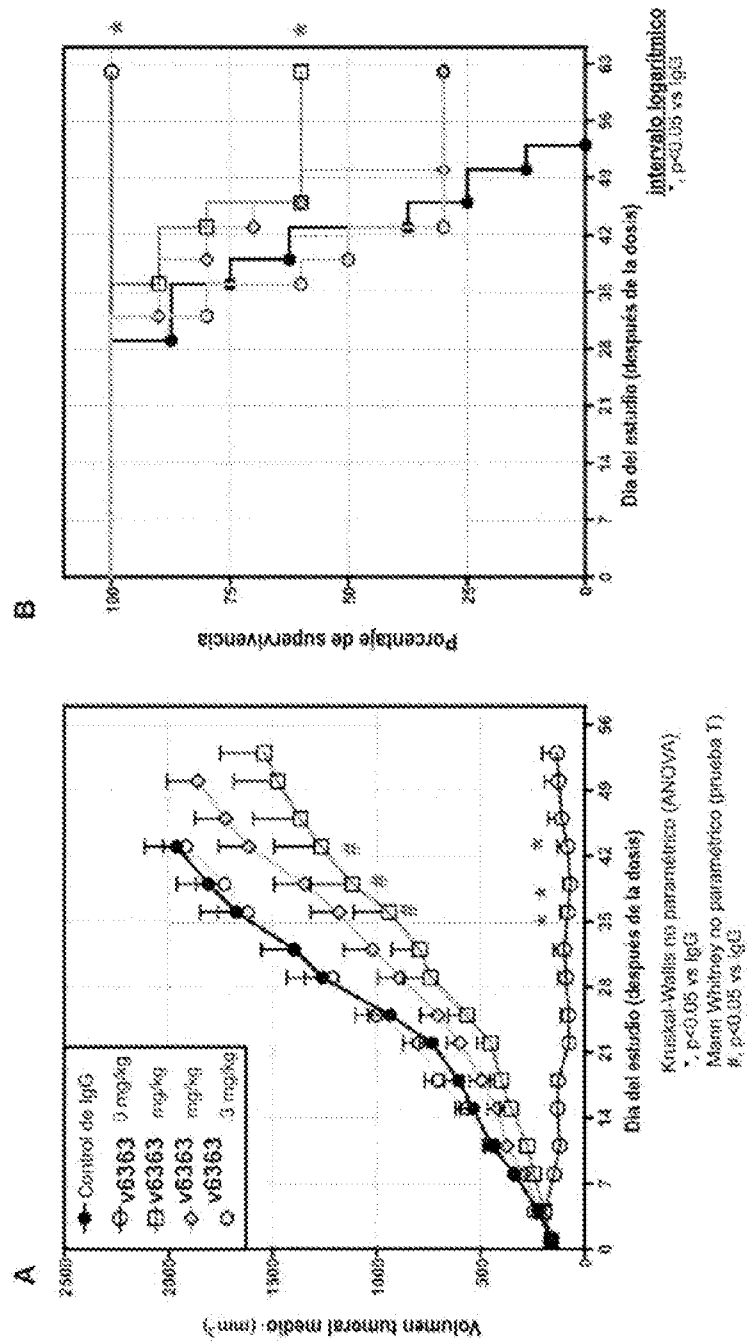


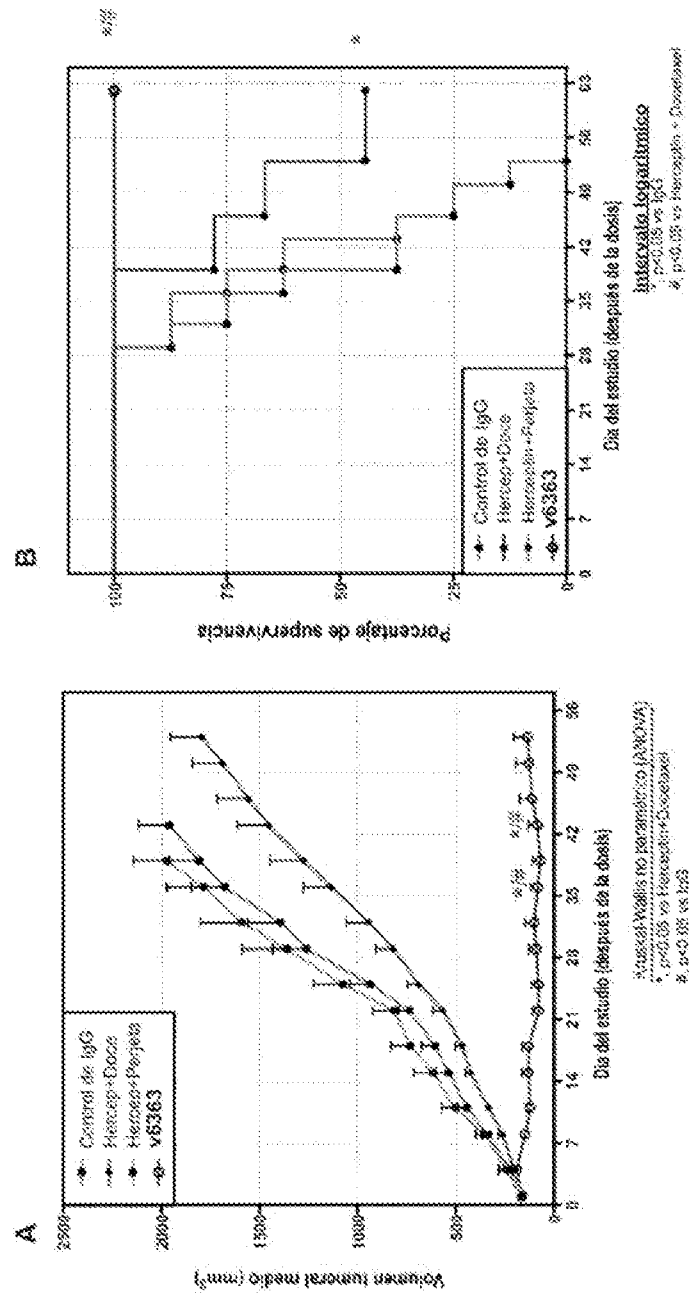
FIG. 31



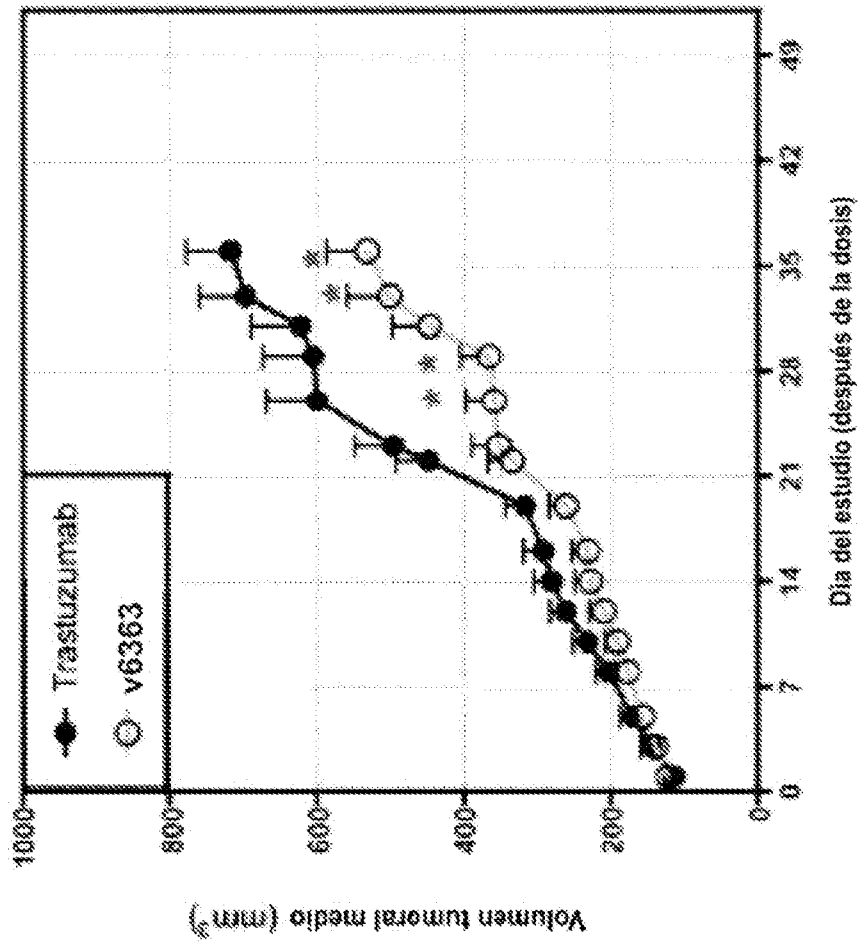
**FIG. 31 (Continuación)**



**FIG. 32**



**FIG. 33**



Mann-Whitney no paramétrico  
#,  $p < 0.05$  vs Trast

**FIG. 34**

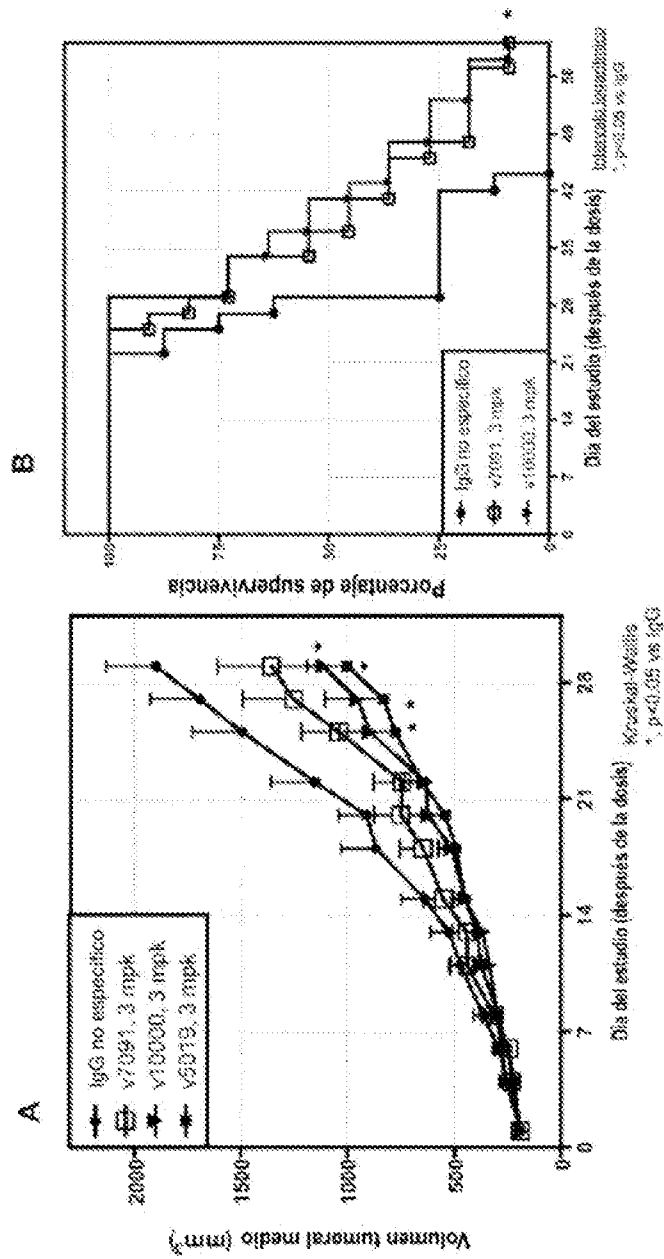


FIG. 35



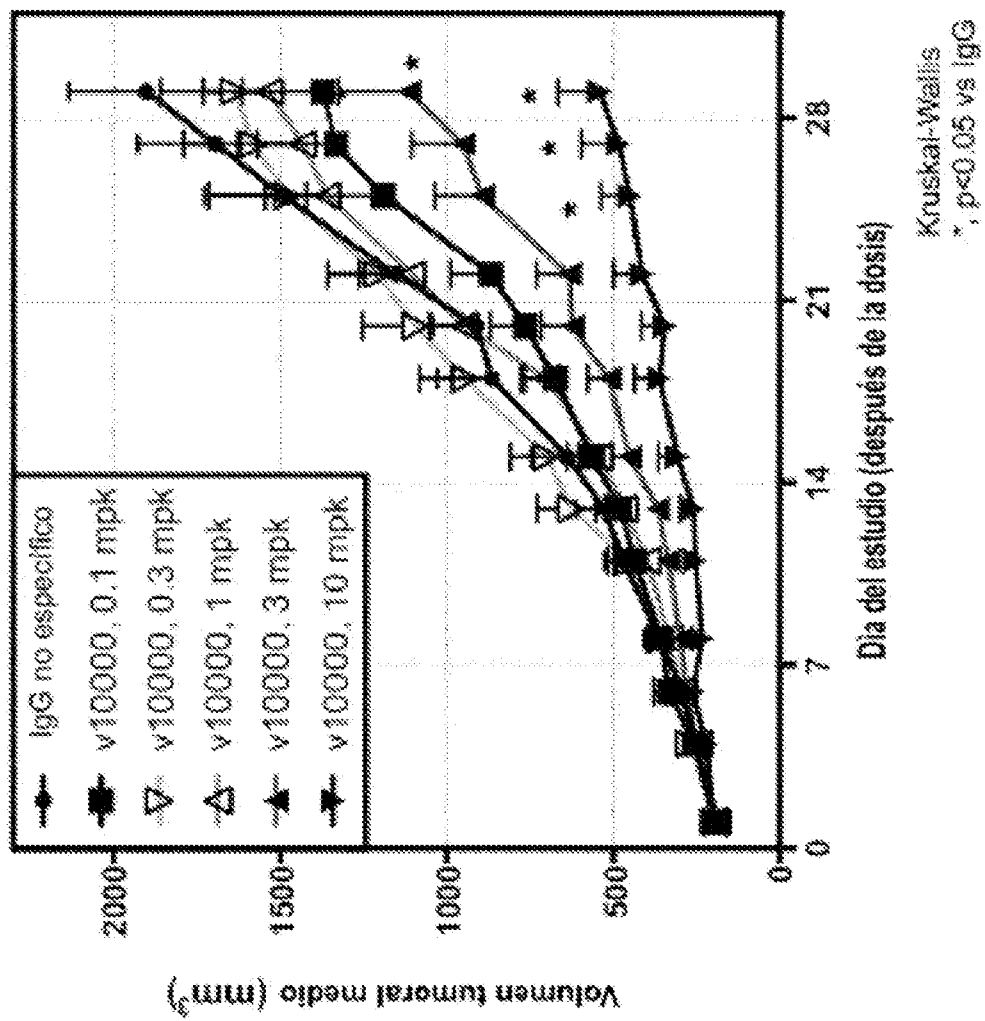


FIG. 36

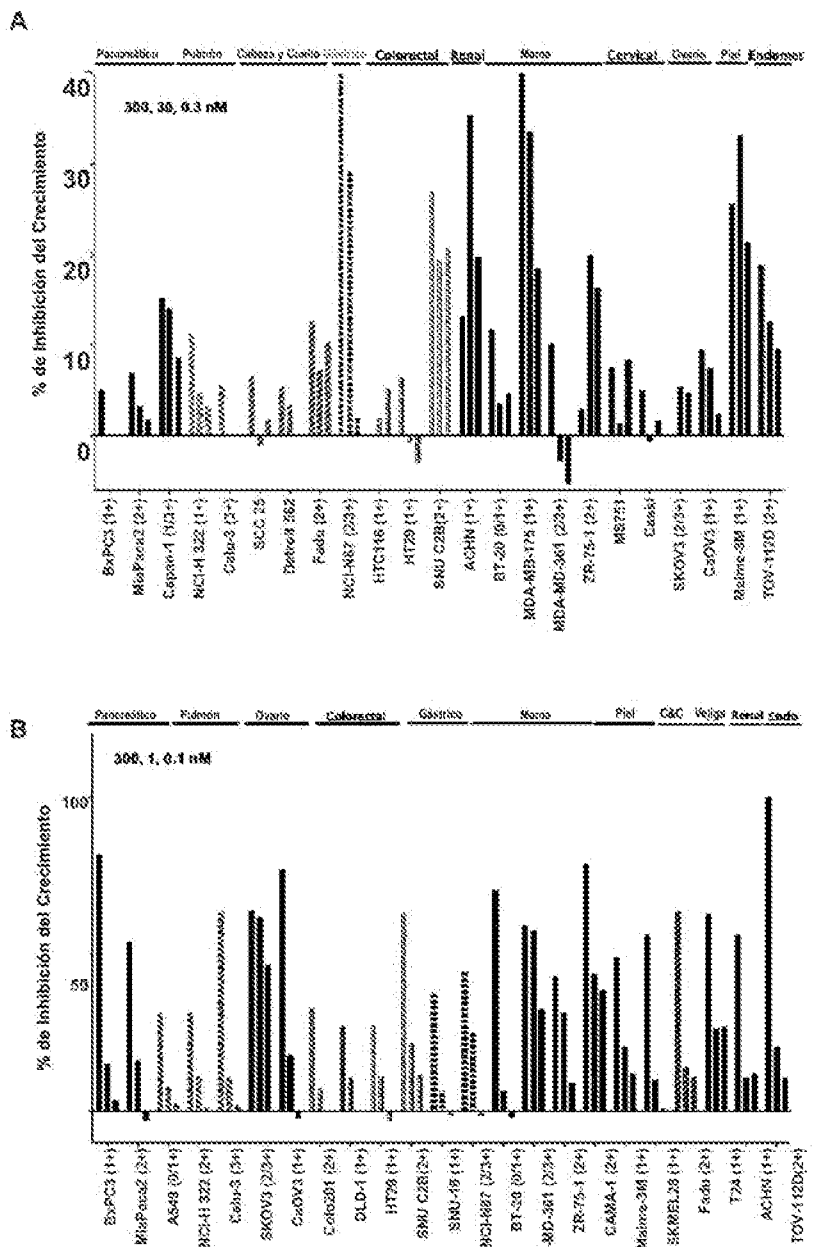


FIG. 37

Línea Celular	Descripción de la Línea Celular	Receptor de BIC			V1000	V10553	Ref
		HER2	EGFR	HER3	actividad	actividad	
BxPC-3	adenocarcinoma de páncreas humano	1	2	1	+	+	1,2,3
Capan-1	adenocarcinoma pancreático humano	1/3	1	0	+	+	1,4,5
MiaPaCa2	carcinoma de páncreas humano	2	1/2	0	+	+	3,4
SW 1999	adenocarcinoma de páncreas humano, metastático	2	1	0	+	+	2,4
Panc1	carcinoma de páncreas humano	1	1/2		+	+	4
A549	carcinoma de pulmón humano	0/1	1		+	+	6,7
Calu-3	adenocarcinoma de pulmón humano	3	2	1	+	+	6,8,9
Calu-6	carcinoma anaplásico de pulmón humano	0			+	+	6
NCI-H1272	adenocarcinoma humano; cáncer de pulmón de células no pequeñas				+	+	10
NCI-H1373	carcinoma broncoalveolar de caudex humano	2	2		+	+	6,7,11
Detm1507	carcinoma faríngeo humano				+	+	12
REC-15	carcinoma de células escamosas de lengua humano		2		+	+	12
REC-23	carcinoma de células escamosas de lengua humano		2		+	+	12
PaCa	carcinoma de células escamosas, faringe	2	2		+	+	
Colo201	adenocarcinoma colorectal humano	2	1		+	+	13
HCT-8	adenocarcinoma colorectal humano, tipo C de Duke	1	0/1		+	+	14
HCT116	carcinoma colorectal humano	1	0/1		+	+	14
HCT29	adenocarcinoma colorectal humano	1	0		+	+	14
SW620	carcinoma colorectal de sigmoid humano	2*			+	+	
SGC-7	carcinoma gástrico humano	0			+	+	15
SGC-16	carcinoma gástrico humano	1			+	+	15
NCI-N87	carcinoma gástrico humano	3	2	1	+	+	15
MDAMB157	carcinoma ductal de mama humano, ER+	1	1	0/1	+	+	8,16
MDAMB134	adenocarcinoma de mama humano, ER+, HER2 amp	2/3	1	1	+	+	9,15,17
ZR75-1	carcinoma ductal epitelial ductal de mama humano, ER+ luminal A	2	1	1	+	+	9
BT-20	carcinoma de mama humano, TNBC, basal A	0/1	2	1	+	+	18
BT549	carcinoma ductal de mama humano, Basal B, TNBC tipo mesenquimal, ER-	0	0/1	0	+	+	18
CAMA-1	adenocarcinoma de mama humano, ER+	2	0	1	+	+	
MDAMB453	carcinoma metastático de mama humano, ER+, HER2amp TNBC luminal A	0	0/1	0	+	+	18
T47D	carcinoma ductal de mama humano, ER+	1	0	1	+	+	19
NCI-H1151	humer mesodérmico de idero humano (mixo) grado III				+	+	
NCI-H120	adenocarcinoma maligno primario humano, carcinoma endometrial	2	1	2	+	+	20
A431	carcinoma epiteloidal de piel humano	1	3		+	+	21
Melan-A	melanoma maligno humano, de pulmón metastático	1	1	1	+	+	9, 22
SK-MEL-28	melanoma maligno humano	1	0		+	+	22
Caski	carcinoma de cuello uterino humano	1			+	+	23
A48751	carcinoma epidermoide de cuello uterino humano				+	+	
T24	carcinoma de vejiga uréter humano	1	0		+	+	19,21,2
ACHN	adenocarcinoma de células renales humano	1	2	0/1	+	+	9, 25
COV3	adenocarcinoma de ovario humano	1	1		+	+	26
OVC43	adenocarcinoma de ovario humano	1/2	2	2	+	+	26, 26
SKOV3	adenocarcinoma de ovario humano	2/3	2	0/1	+	+	

FIG. 38

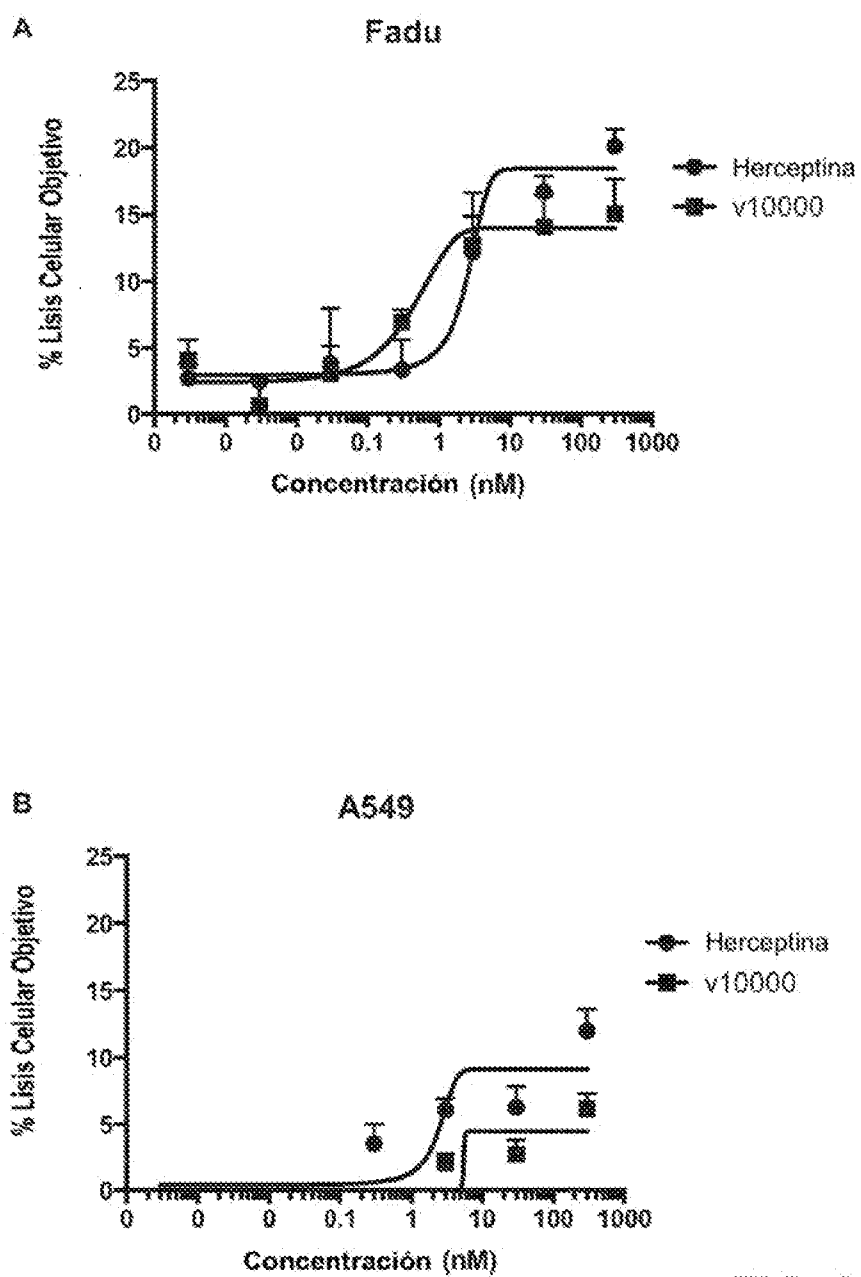
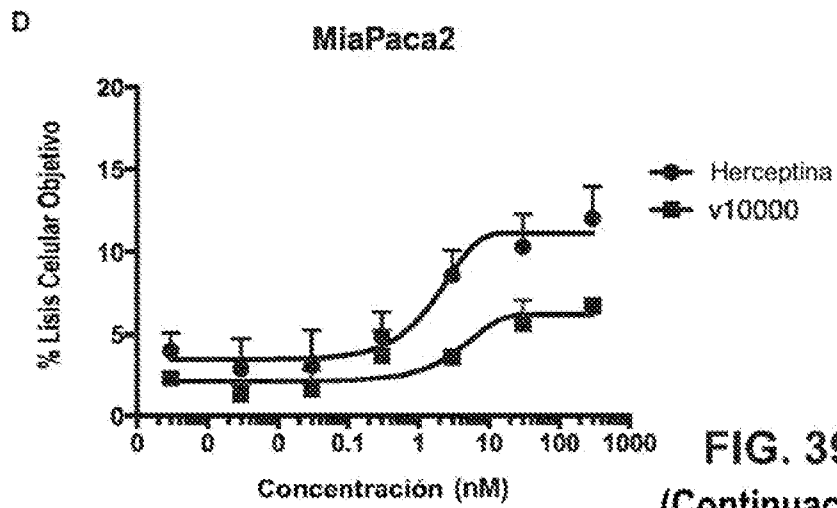
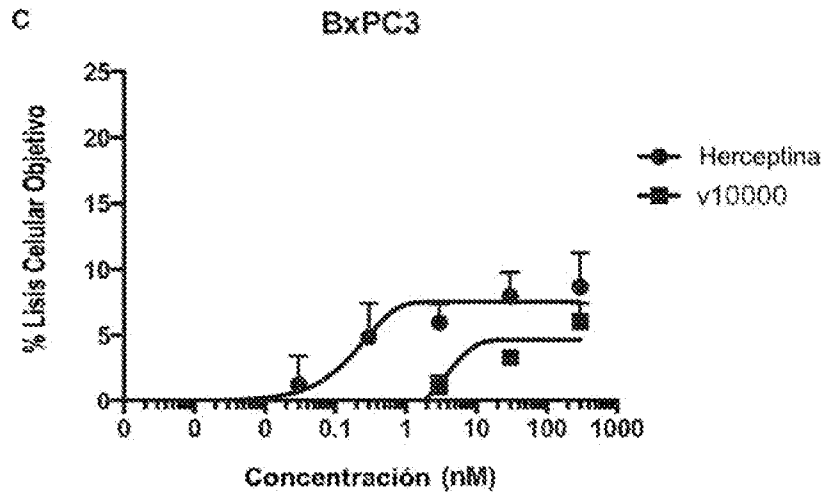


FIG. 39



**FIG. 39**  
(Continuación)

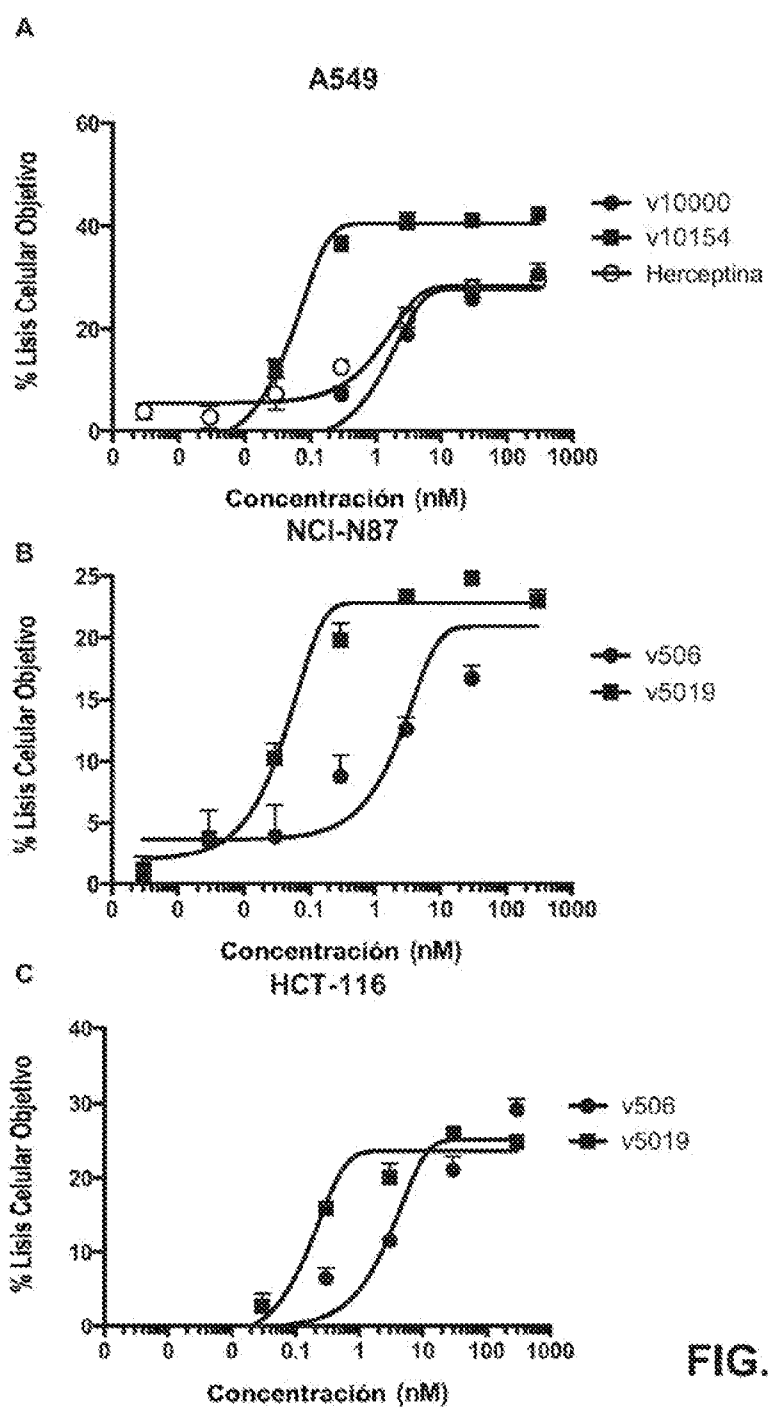


FIG. 40

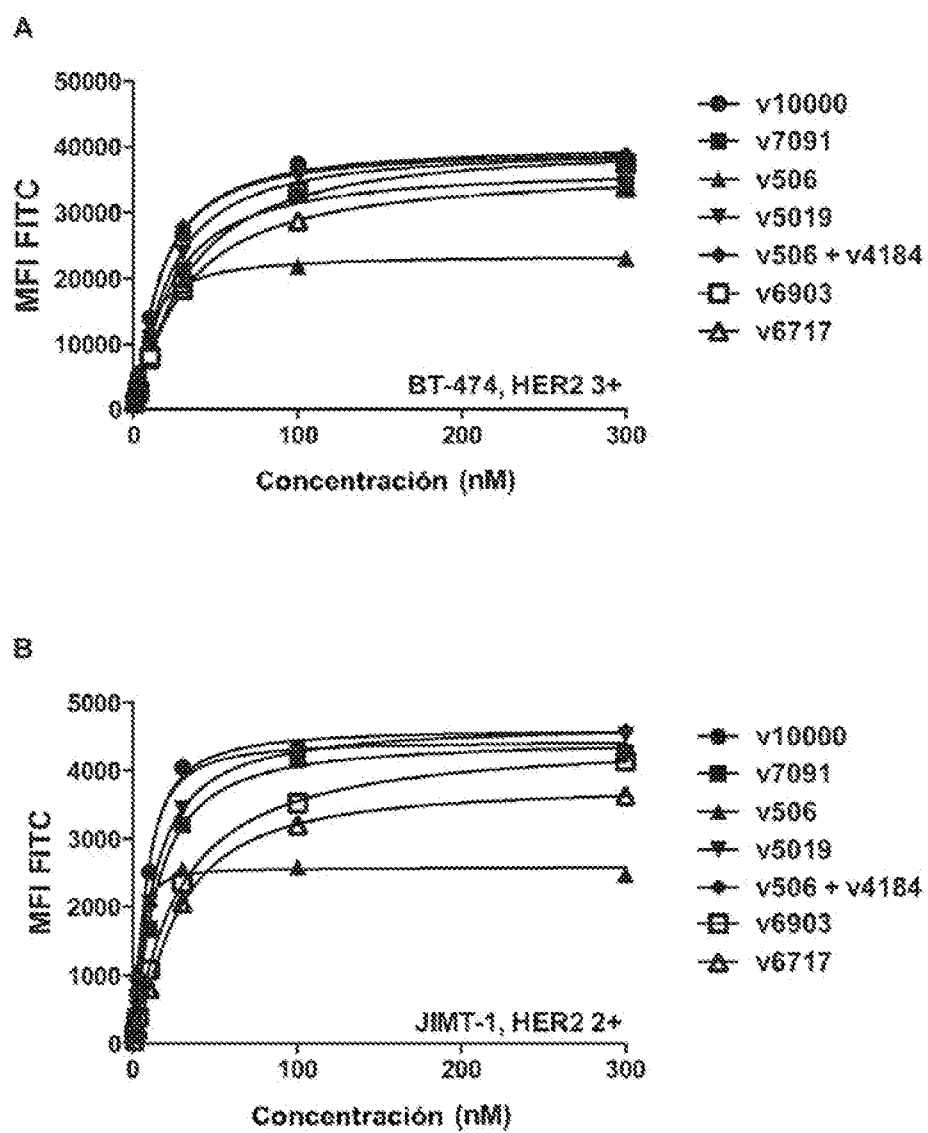


FIG. 41

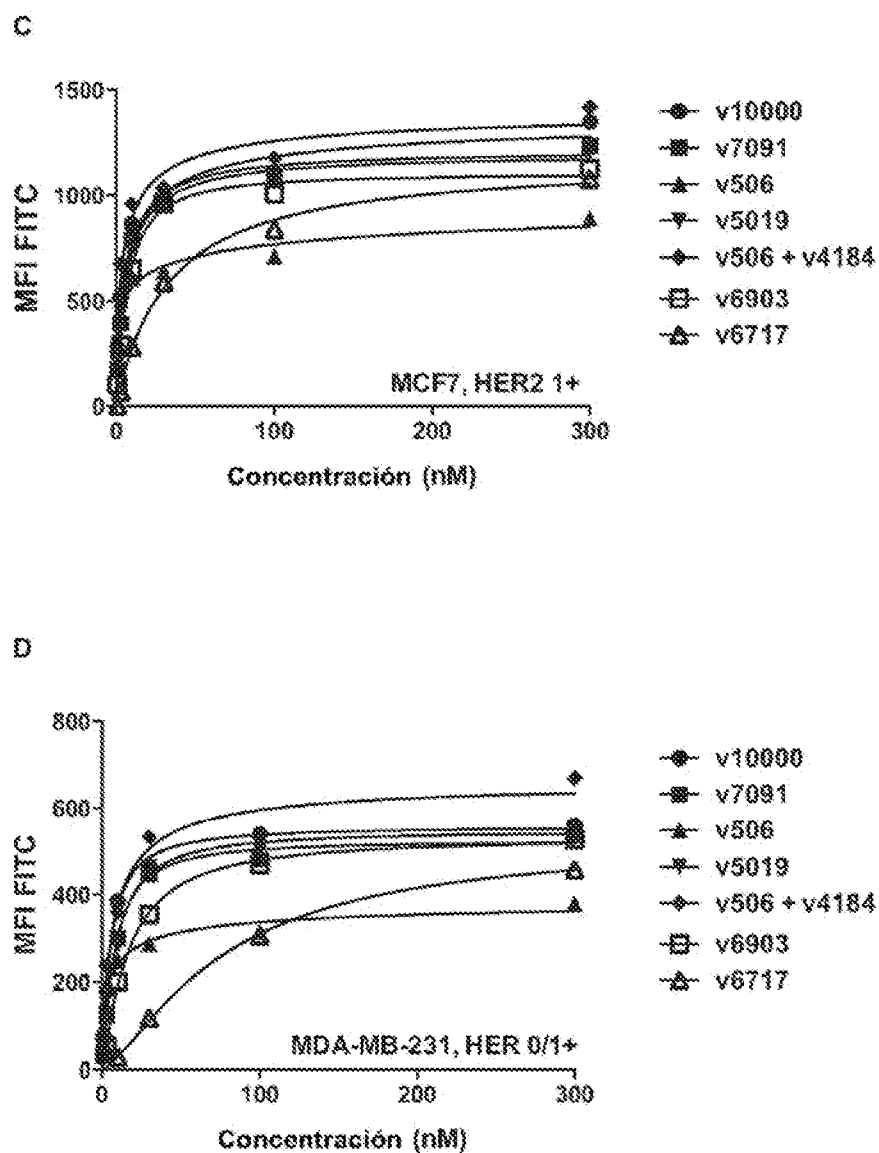
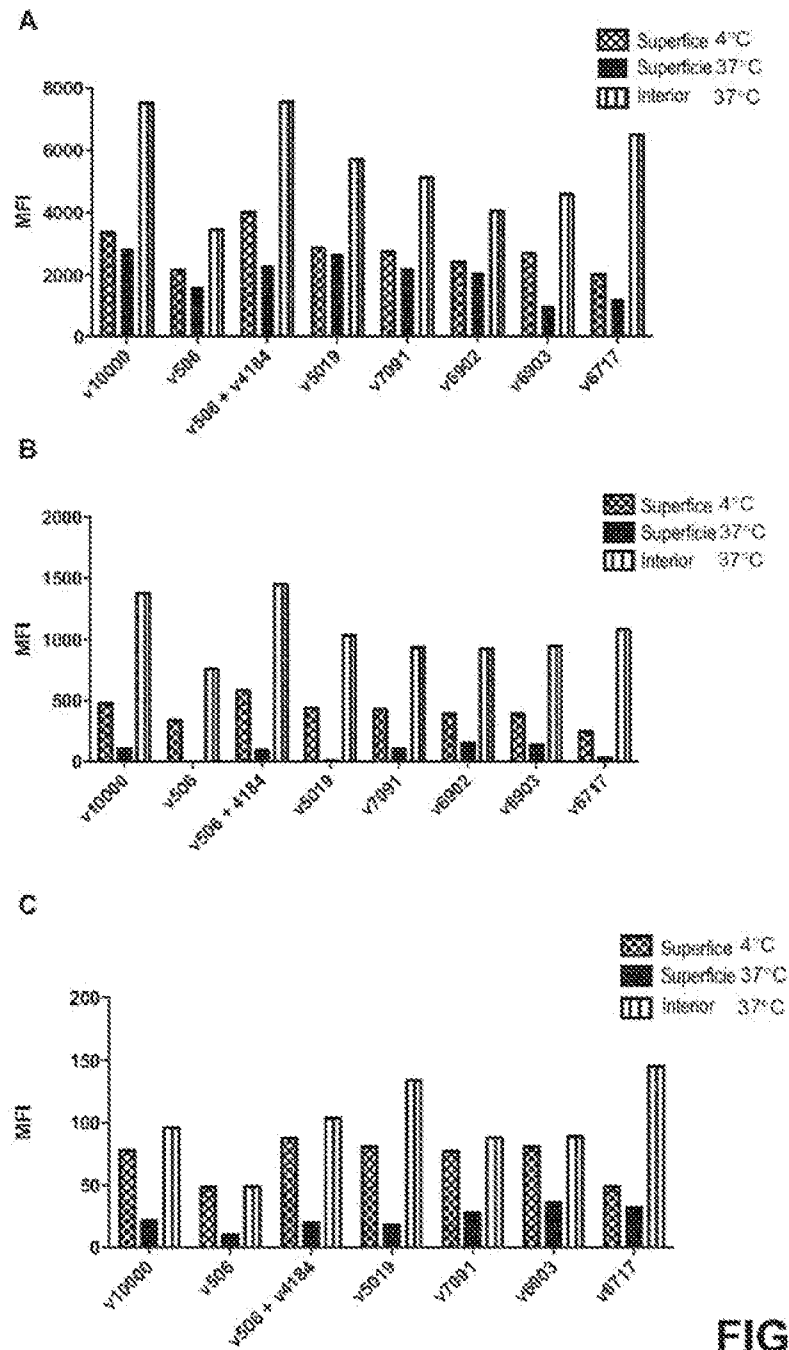


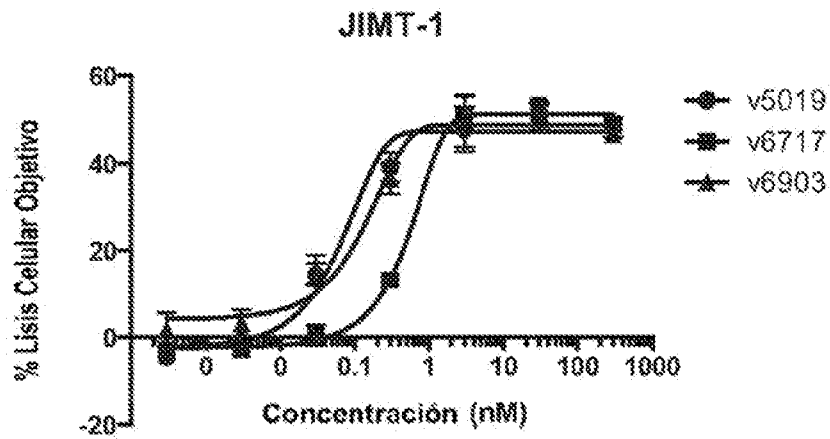
FIG. 41 (Continuación)



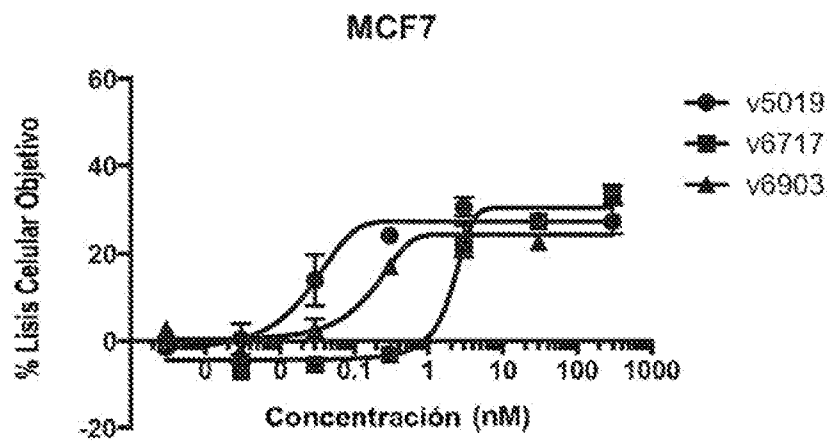


**FIG. 42**

A



B



**FIG. 43**

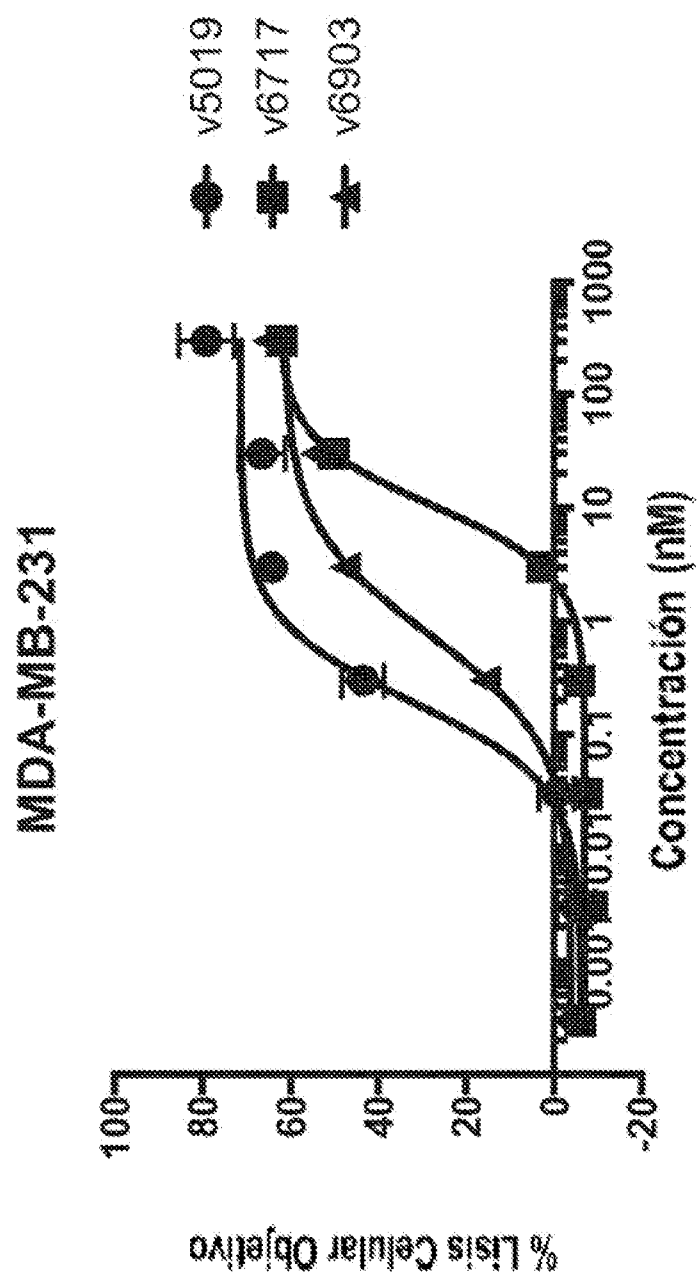


FIG. 43C

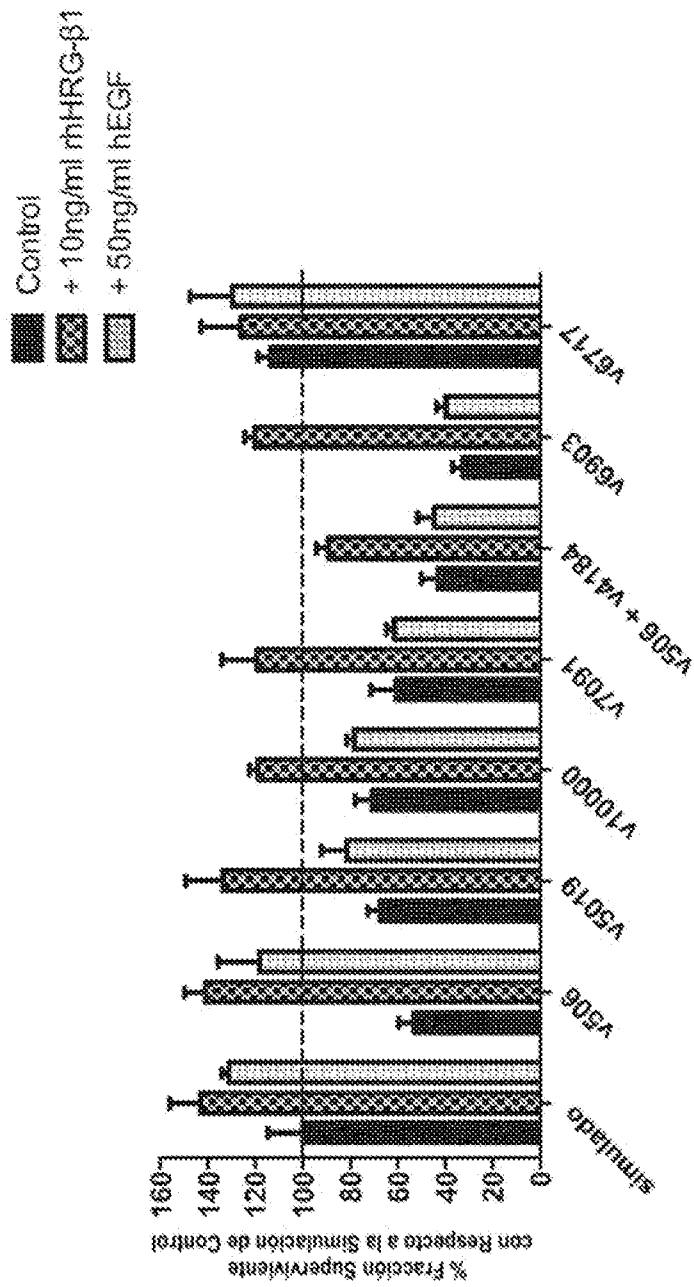


FIG. 44

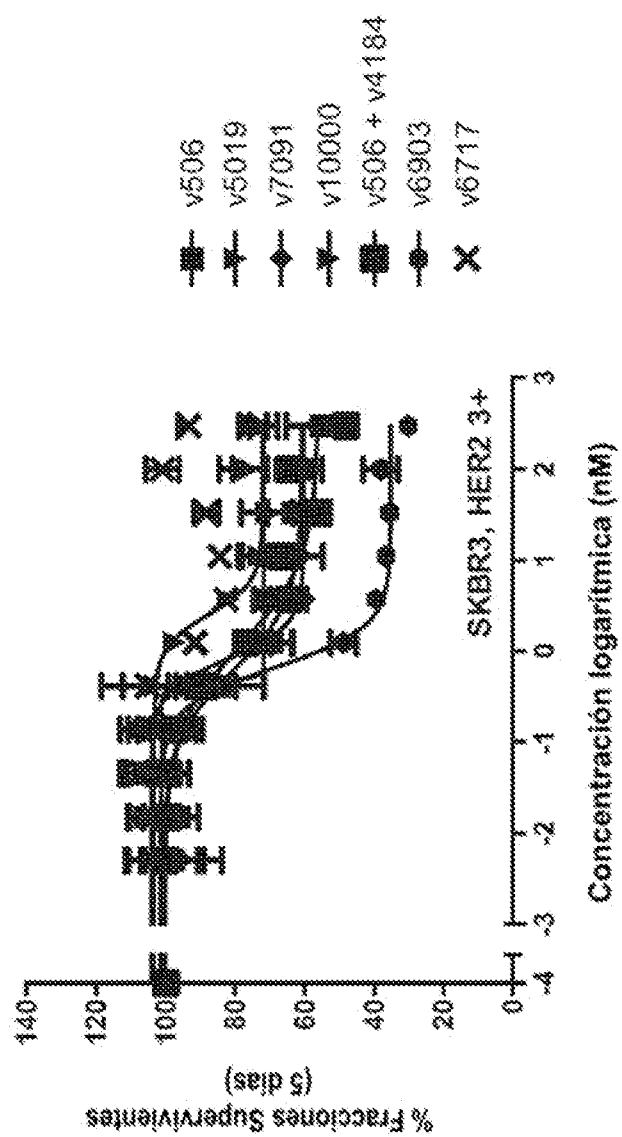
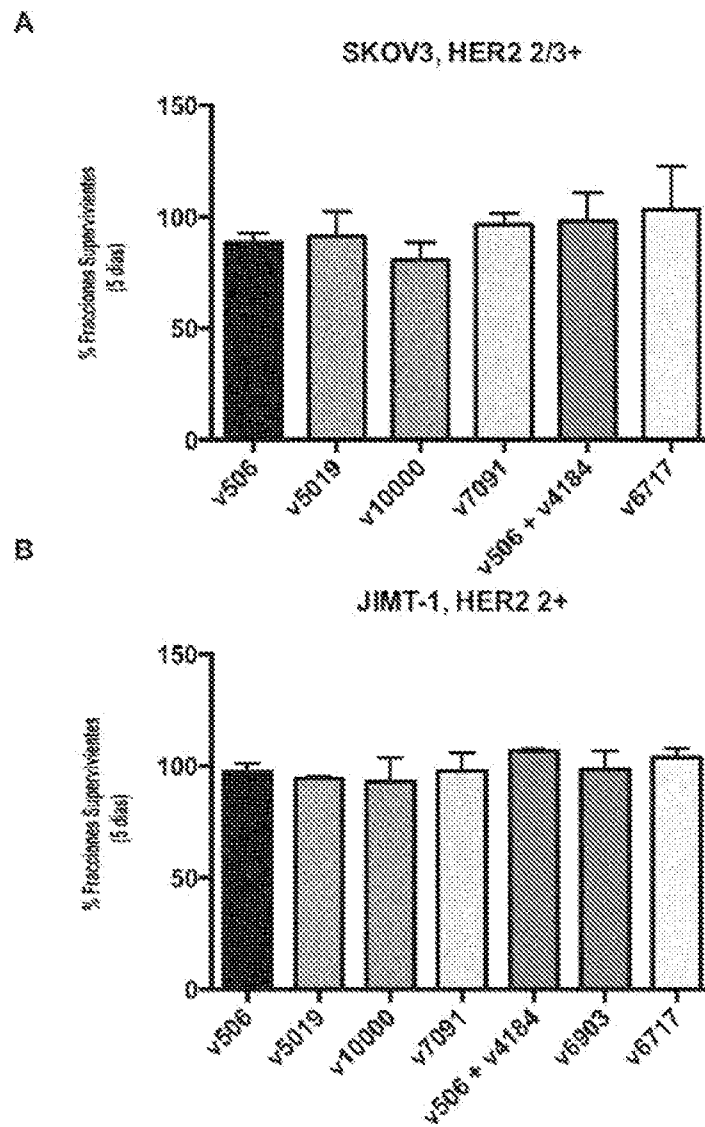
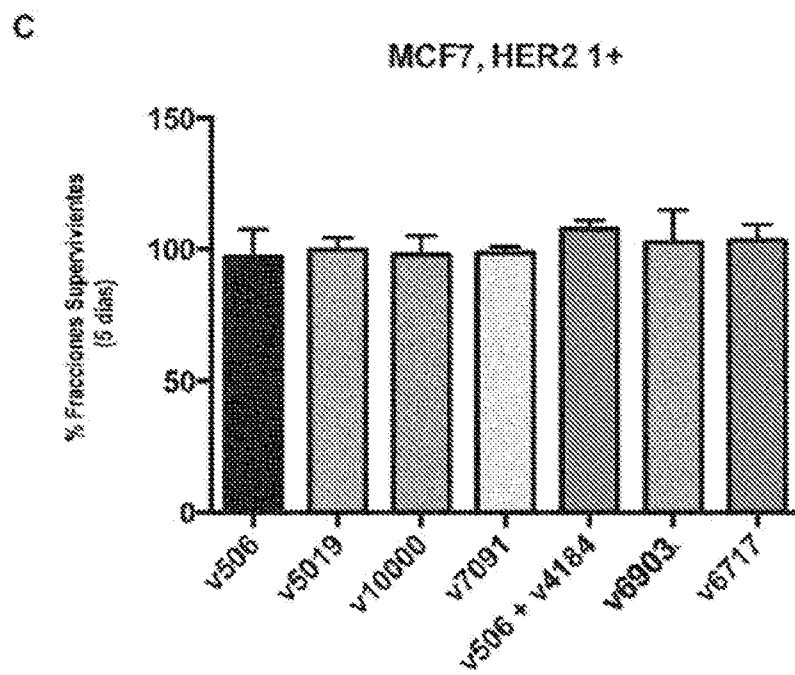


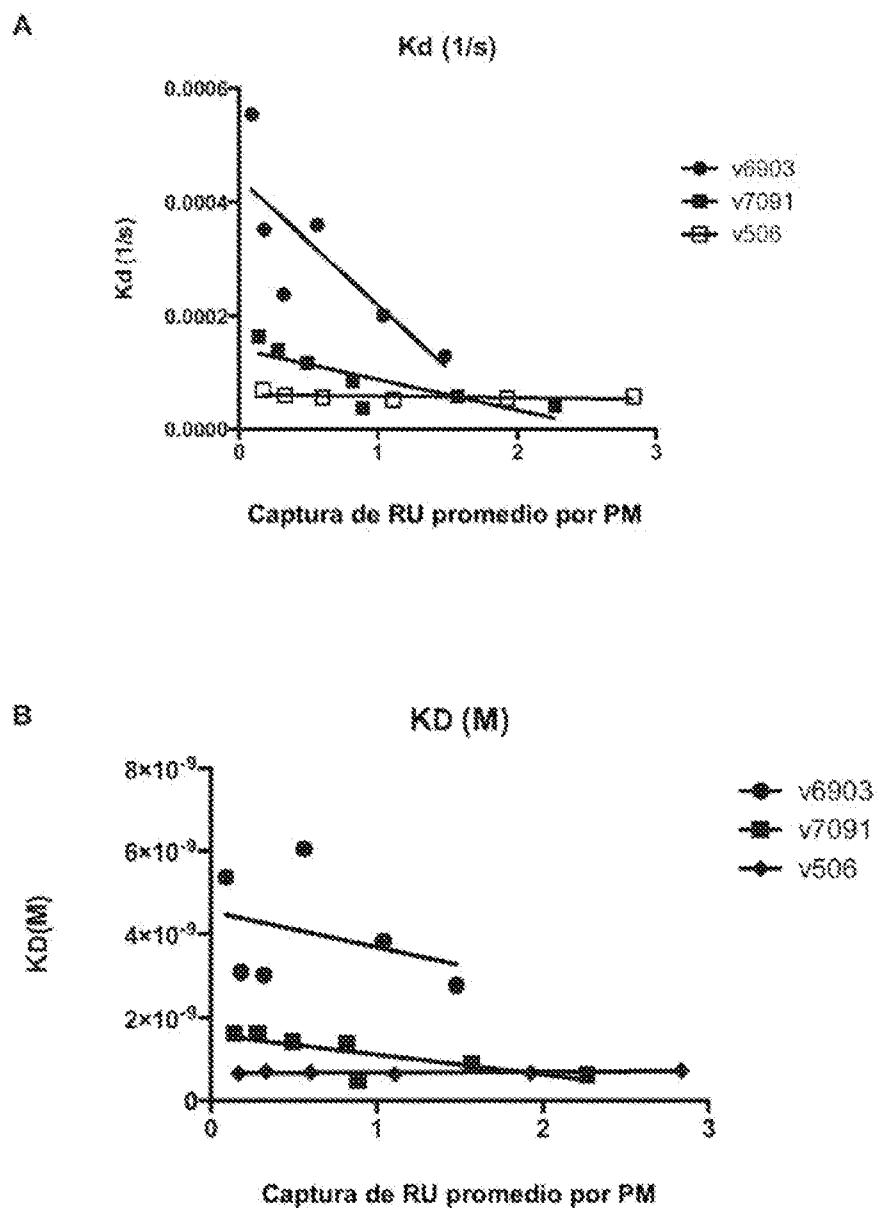
FIG. 45



**FIG. 46**



**FIG. 46 (Continuación)**



**FIG. 47**



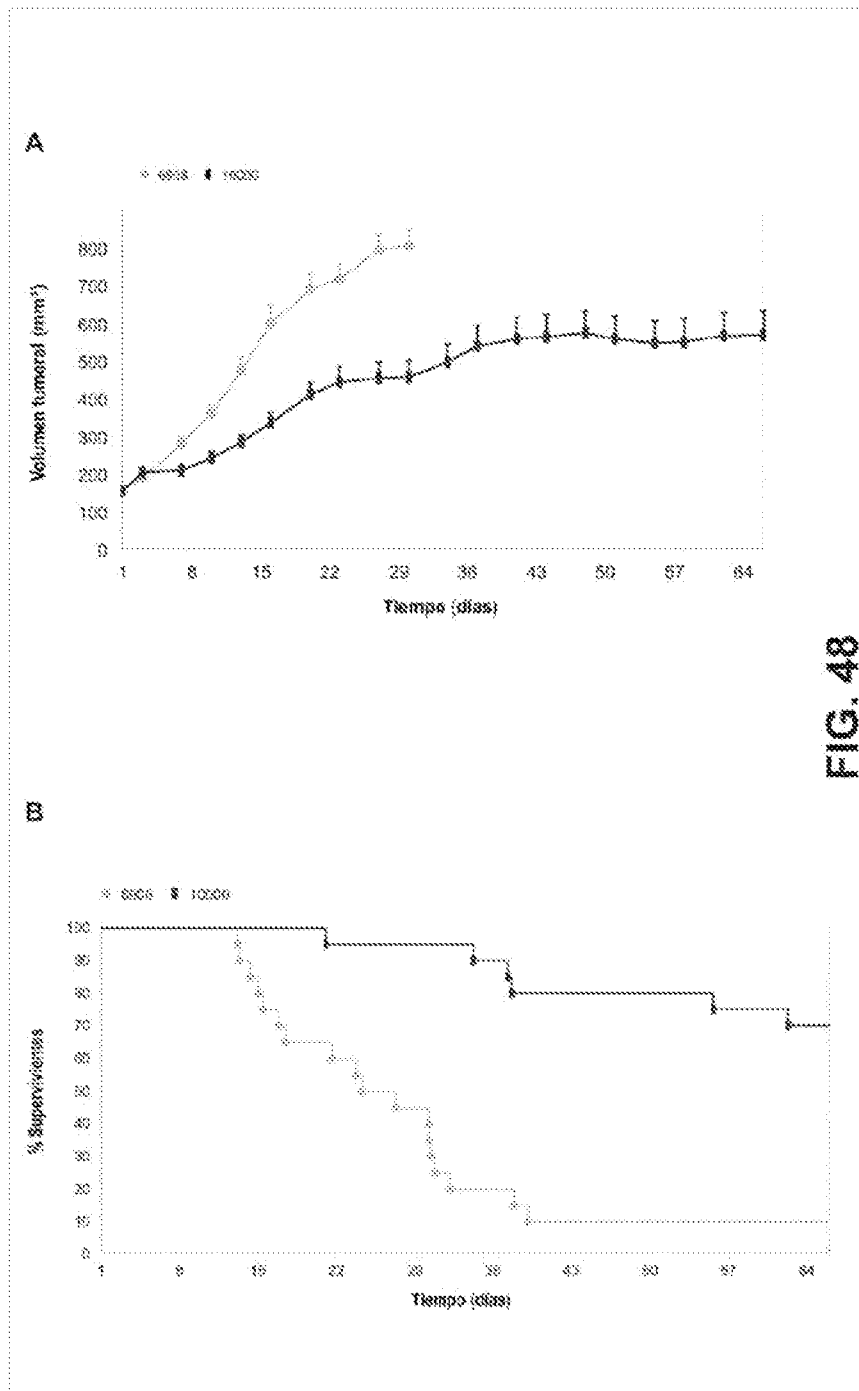


FIG. 48

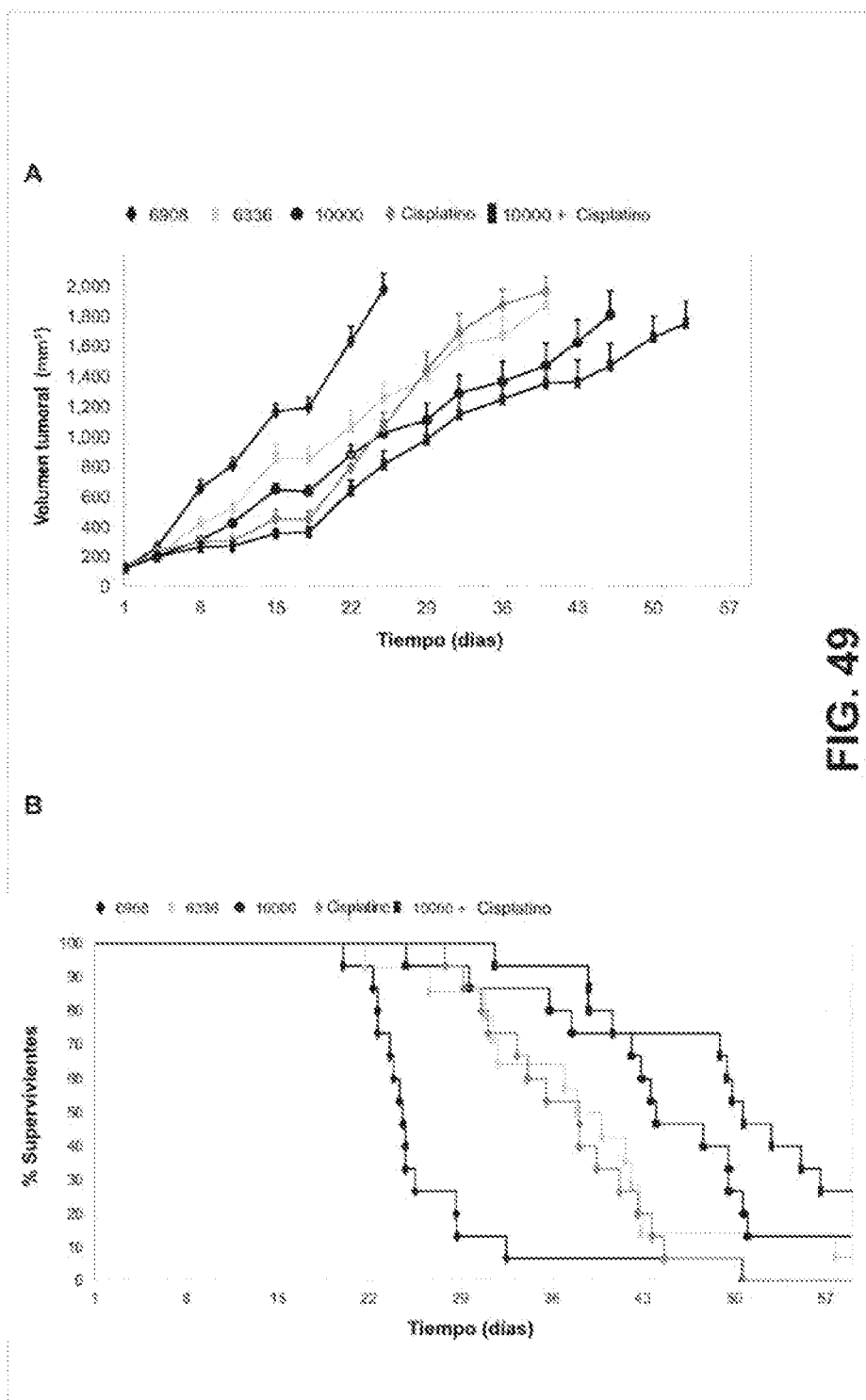
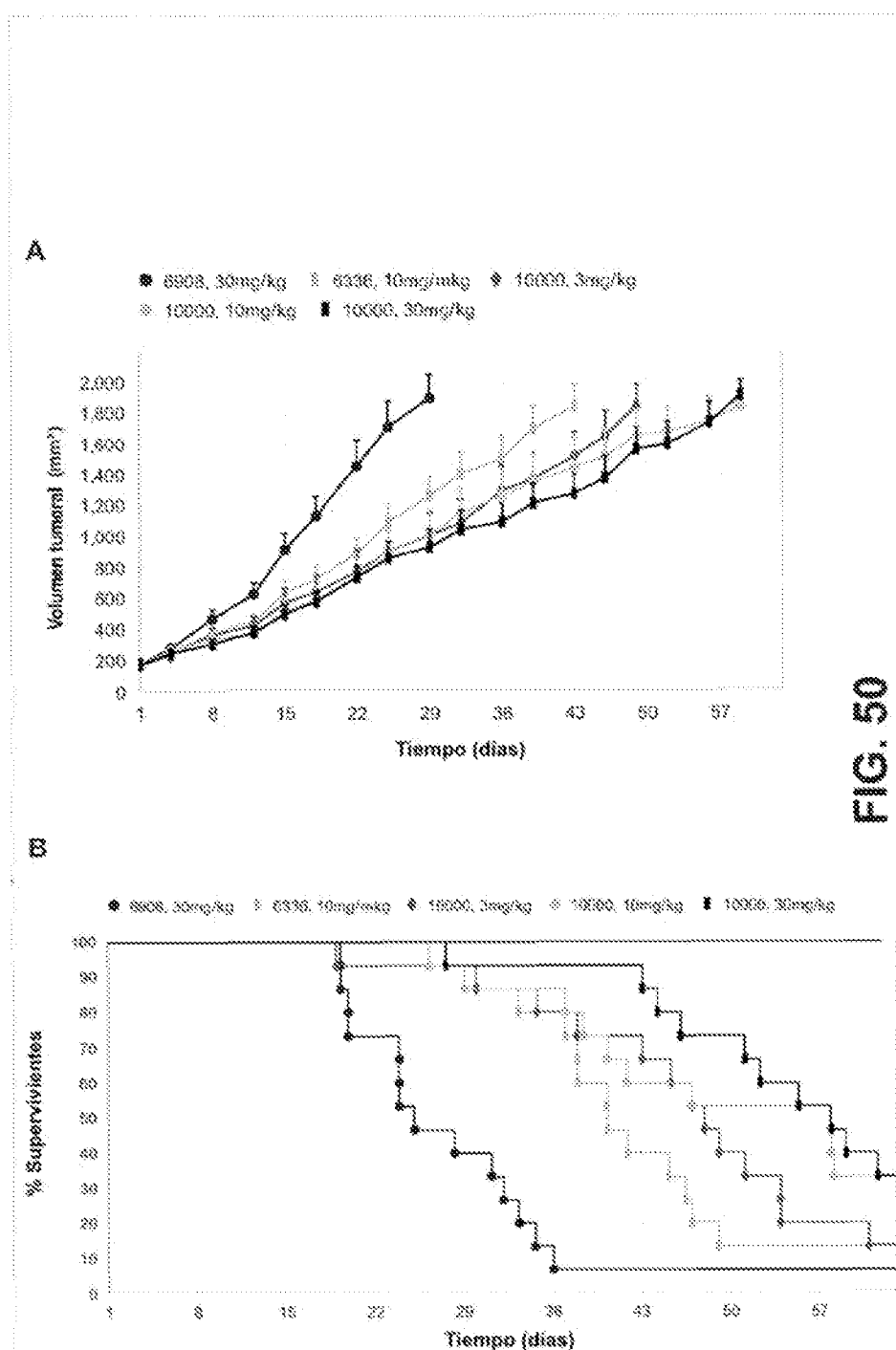


FIG. 49



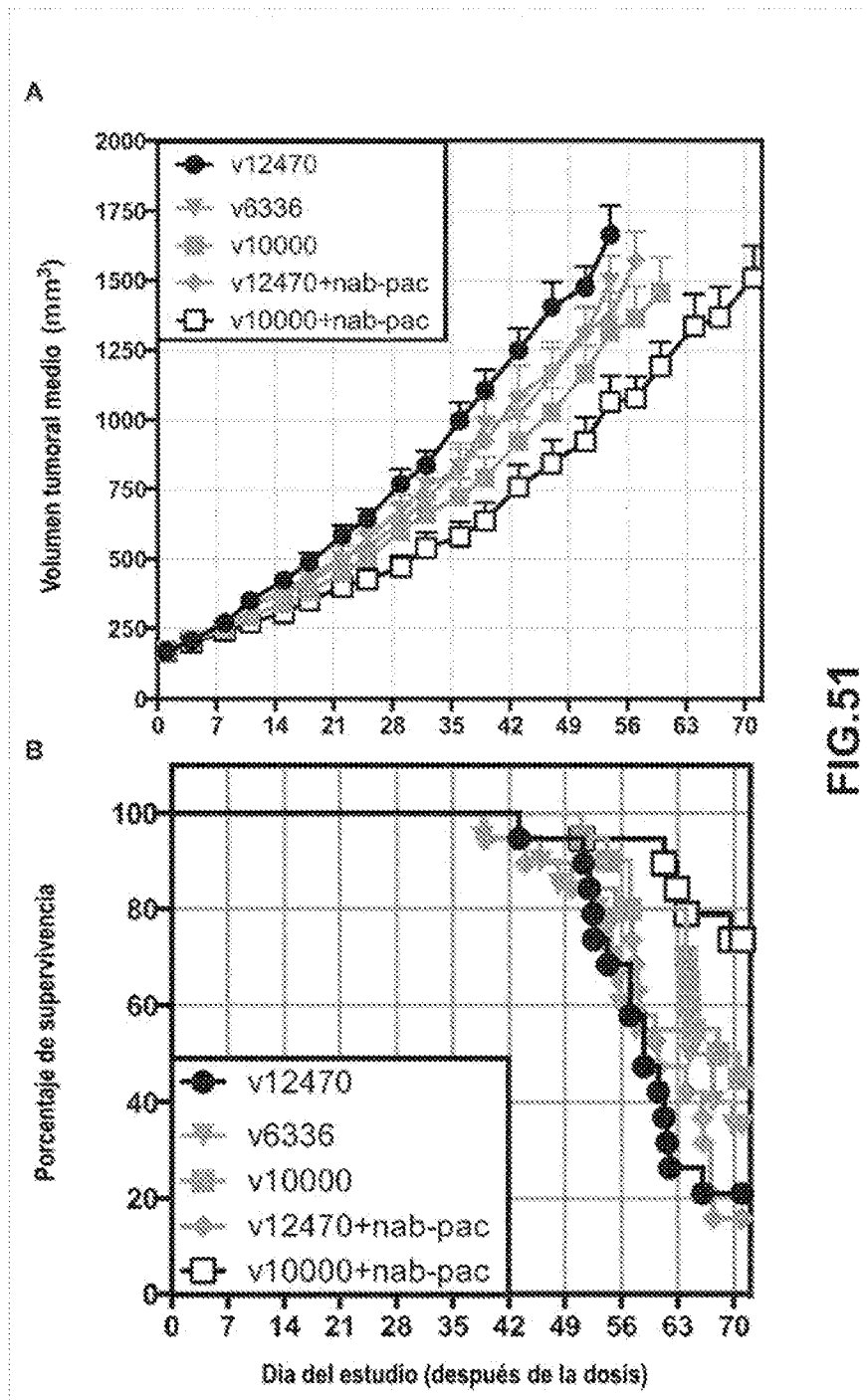


FIG.51

A

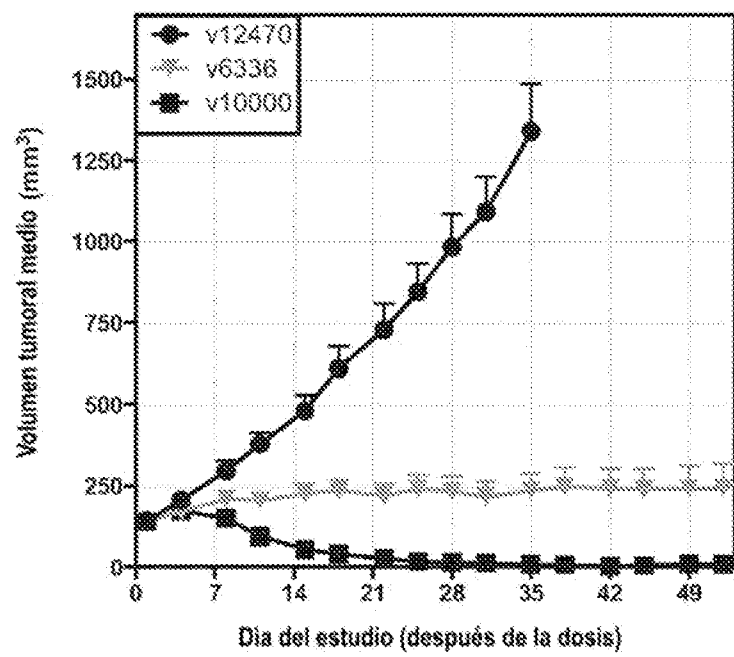


FIG. 52