

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 952 951**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.04.2017** **PCT/EP2017/060280**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.11.2017** **WO17186950**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2017** **E 17724504 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2023** **EP 3448890**

54 Título: **Anticuerpos biespecíficos dirigidos a EGFR y HER2**

30 Prioridad:

28.04.2016 EP 16305496

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

07.11.2023

73 Titular/es:

BIOMUNEX PHARMACEUTICALS (25.0%)
29 rue du Faubourg Saint Jacques

75014 Paris, FR;

INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET

DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (25.0%);

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER (25.0%) y

INSTITUT RÉGIONAL DU CANCER DE

MONTPELLIER (ICM) (25.0%)

72 Inventor/es:

ZHUKOVSKY, EUGENE;

LEGER, OLIVIER;

GERARD, PIERRE-EMMANUEL;

PELEGRIN, ANDRÉ y

LARBOURET, CHRISTEL

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 952 951 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

Anticuerpos biespecíficos dirigidos a EGFR y HER2

La presente invención se refiere a anticuerpos biespecíficos dirigidos a EGFR y HER2, métodos para la producción de estos anticuerpos, composiciones y usos de los mismos.

5 Antecedentes de la invención

La familia HER, que incluye 4 receptores de tirosina quinasa (EGFR/HER1, HER2, HER3 y HER4), activa múltiples cascadas de señalización interconectadas posteriormente, parcialmente redundantes, por ejemplo vías MAPK y PI3K/AKT, que están implicadas en la proliferación celular. Se ha observado una señalización anormal de HER en un gran número de tumores sólidos (pulmón, colorrectal, páncreas, etc.). EGFR y HER2 son receptores de tirosina quinazas (TKs) de la superficie celular que transducen señales de crecimiento a través de la homodimerización y heterodimerización con receptores de la familia HER. Los heterodímeros de EGFR con HER2 inducen una activación más potente de la señalización de TK que la homodimerización de EGFR o HER2. Cuando las células tumorales sobreexpresan tanto EGFR como HER2, muestran un crecimiento agresivo de células tumorales, debido al mayor potencial de heterodimerización y señalización de EGFR/HER2.

- 15 Los cánceres de páncreas son un ejemplo de tumores sólidos que expresan receptores EGFR y HER2 con un pronóstico muy pobre. En los tumores de páncreas, EGFR se expresa en el 45-95 % de los cánceres de páncreas, y la expresión generalmente se correlaciona con un peor resultado en los cánceres de páncreas extirpados. La sobreexpresión de HER2 también se ha descrito en el 7-58 % de los cánceres de páncreas y los cánceres de páncreas amplificados con HER2 muestran un patrón metastásico atípico, lo que sugiere que es probable que HER2 también sea un importante impulsor de la tumorigénesis en el cáncer de páncreas. Además, se ha reportado que aproximadamente una cuarta parte de los carcinomas de páncreas que son EGFR+ también son adicionalmente HER2+. (Dancer et al (2007) *Oncology Reports* 18, p.151), haciéndolos de fenotipo doble positivo EGFR+/HER2.

- 25 El cáncer de páncreas es la cuarta causa más común de muerte por cáncer en Europa, con un número creciente de casos cada año (+ 2 % en hombres, + 10 % en mujeres). Tiene un pronóstico muy pobre, incluso cuando se diagnostica a tiempo. Es uno de los únicos cánceres para los que la tasa de supervivencia casi no ha mejorado en los últimos 40 años: la supervivencia es inferior al 20% y al 5% después de 1 y 5 años respectivamente. Aunque incluso el cáncer de páncreas fue responsable de más de 230000 muertes en el mundo en 2012, sigue siendo una enfermedad rara, con tantas muertes como pacientes recién diagnosticados, debido a la falta de tratamientos efectivos. En la actualidad, el adenocarcinoma de páncreas (90 % de los cánceres de páncreas) se trata quirúrgicamente, con quimioterapia o con una combinación de radiación y quimioterapia con resultados limitados. El lanzamiento de gemcitabina en 1996 como tratamiento de primera línea mejoró la supervivencia sin recaídas en una media de 1,3 meses y la supervivencia general (OS) al año del 2 % al 18 %. Desde 2005, solo dos fármacos, Tarceva® (erlotinib) y Abraxane® (nab-paclitaxel), se han autorizado para el cáncer de páncreas, a pesar de varios ensayos clínicos, que implican principalmente combinaciones pero pocas innovaciones. Erlotinib, que fue la primera terapia dirigida, mejoró la supervivencia sin recaídas en solo 1 mes en media en asociación con gemcitabina.

El tratamiento por medio de agentes terapéuticos que se dirigen a los receptores HER directamente o a las quinazas posteriormente a menudo se enfrenta a una resistencia adquirida o está limitado por la solidez intrínseca de la red de transducción de señales.

- 40 En estos casos, las terapias combinadas han surgido como contramedidas naturales, aunque su diseño óptimo no es sencillo y puede depender del tumor o sus subtipos, por lo que es necesario estratificar previamente a los pacientes (Fitzgerald JB, Schoeberl B, Nielsen UB, Sorger PK. *Systems biology and combination therapy in the quest for clinical efficacy*. *Nat Chem Biol*. 2006; 2:458-66.). El arsenal actual disponible para inhibir la señalización de HER se comprende de inhibidores de tirosina quinasa (TKI) de molécula pequeña, por ejemplo, lapatinib o erlotinib, y anticuerpos terapéuticos, por ejemplo, cetuximab o trastuzumab. De hecho, los anticuerpos representan un enfoque poderoso que induce efectos inmunológicos además de la reducción de la señalización para ayudar a eliminar los tumores a diferencia de los TKIs que se limitan a la modulación de la señalización.

Varios autores han propuesto terapias basadas en anticuerpos combinados. Se demostró que dirigirse a los dímeros de HER, en particular los heterodímeros EGFR/HER2, mediante combinaciones de mAb es ventajoso para inhibir el crecimiento del tumor pancreático (Assenat (2015); *Oncotarget* 6(14):470-482).

- 50 Además, se han diseñado anticuerpos biespecíficos (BsAb), que combinan los objetivos de dos mAbs. Se han descrito más particularmente algunos anticuerpos anti-EGFR/anti-HER2 biespecíficos. Sin embargo, sufren de diseños complicados que generalmente dan como resultado una capacidad de fabricación y una estabilidad inferiores, y la eficacia de estos anticuerpos aún podría mejorarse, ya que en *in vivo* los tumores de modelos de cáncer de páncreas continuaron creciendo incluso mientras estaban bajo tratamiento con anticuerpos biespecíficos.

- 55 Por ejemplo, Liu y colaboradores (Liu et al. A Novel Antibody Engineering Strategy for Making Monovalent Bispecific Heterodimeric IgG Antibodies by Electrostatic Steering Mechanism. *J Biol. Chem* 2015; 290(12):7535-62) han descrito la construcción y caracterización de un anticuerpo biespecífico anti-EGFR y anti-HER2, en el que se utilizaron las

secuencias de panitumumab y trastuzumab, respectivamente. El anticuerpo demostró una actividad mejorada contra las líneas celulares EGFR+/HER2+ *in vitro* e *in vivo*, sin embargo, la actividad de este anticuerpo aún debe mejorarse. Lewis y colaboradores (Lewis et al. Generation of bispecific IgG antibodies by structure-based design of an orthogonal Fab interface. Nature Biotechnology. 2014; 32; 191-198) también describieron un anticuerpo biespecífico anti-EGFR y anti-HER2, sin embargo, en este caso se utilizaron diferentes secuencias de anticuerpos, secuencias de matuzumab y pertuzumab, respectivamente, y un diseño de ingeniería diferente.

La solicitud de Patente Internacional WO2014/001324 reporta un método para seleccionar y producir entidades multiespecíficas mediante el uso de una transpeptidasa, tal como Sortasa A, y el uso de este método para la generación de nuevos anticuerpos multiespecíficos hechos a medida. Se ejemplifica un anticuerpo biespecífico que contiene pertuzumab y trastuzumab. La solicitud de Patente Internacional WO2014/124326 describe los constructos de anticuerpos multiespecíficos, que contienen, por ejemplo, trastuzumab y cetuximab, y conjugados de fármacos de anticuerpos multiespecíficos.

Los anticuerpos biespecíficos HER2/EGFR también se describen en la solicitud de Patente Europea EP2727940, en donde los anticuerpos llevan seis mutaciones en las cadenas pesadas para lograr el apareamiento heterodimérico, así como en la solicitud de Patente Europea EP2035456. Sin embargo, la estructura de estos anticuerpos puede dar como resultado desestabilización e inmunogenicidad.

Wang S et al. (Cancer Lett, 2012 Dec 28; 325(2):214-9) diseñaron un anticuerpo biespecífico anti-EGFR/HER2 usando trastuzumab y cetuximab. Sin embargo, la unión a ambos antígenos fue monovalente y no bivalente como en los anticuerpos naturales y, por lo tanto, es posible que no se haya alcanzado todo el potencial de inhibición de EGFR y HER2.

En vista de lo anterior, todavía existe la necesidad de constructos de anticuerpos biespecíficos mejorados para el tratamiento de tumores.

Compendio de la invención

Los inventores ahora han diseñado nuevos anticuerpos biespecíficos dirigidos a EGFR y HER2, útiles en el tratamiento de una variedad de cánceres.

La presente invención es tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

La invención proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende dos cadenas pesadas y cuatro cadenas ligeras, en donde cada cadena pesada comprende

a. una región Fc de una inmunoglobulina que comprende los dominios Bisagra-CH2-CH3,

b. cuya región Fc se une a la cadena pesada CH1-VH de Fab del anticuerpo 1 (Ab1) por dicho dominio bisagra,

c. que a su vez se une a la cadena pesada CH1-VH de Fab del anticuerpo 2 (Ab2), mediante una secuencia del enlazador polipeptídico, en la que el extremo N-terminal de cada brazo de la cadena pesada de Fab de Ab1 se une mediante un enlazador polipeptídico al extremo C-terminal de CH1-VH de Ab2,

y las cuatro cadenas ligeras comprenden cadenas ligeras de Fab de Ab1 y cadenas ligeras de Fab de Ab2 asociadas con sus dominios de cadena pesada afines;

en donde Ab1 y Ab2, siendo diferentes, se seleccionan independientemente del grupo que consiste en cetuximab o un derivado mutado del mismo, por un lado, y trastuzumab, o un derivado mutado del mismo, por otro lado, en donde el derivado mutado comprende una cadena VH que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos un 80 % a la secuencia de cetuximab o trastuzumab, respectivamente, y una cadena VL que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos un 80 % a cetuximab o trastuzumab, respectivamente, y es capaz de unirse a EGFR y HER2, respectivamente.

En una primera realización, Ab1 es cetuximab o un derivado mutado del mismo, y Ab2 es trastuzumab o un derivado mutado del mismo.

En otra realización, Ab1 es trastuzumab o un derivado mutado del mismo, y Ab2 es cetuximab o un derivado mutado del mismo.

Se describen más particularmente anticuerpos biespecíficos, en los que Ab1 o Ab2 es cetuximab o un derivado mutado del mismo, que comprende

- un dominio VH que consiste en SEQ ID NO: 4,

- un dominio CH1 seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 20,

SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22,

- un dominio VL que consiste en SEQ ID NO: 13,
- un dominio CL seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25,

5 en donde los dominios CH1 y CL se asocian de la siguiente manera

- SEQ ID NO: 2 con SEQ ID NO: 11,
- SEQ ID NO: 5 con SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 23,
- SEQ ID NO: 20 con SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 23,
- SEQ ID NO: 21 con SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 25,

10 - SEQ ID NO: 22 con SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 25.

En otra realización, se describen anticuerpos biespecíficos, en los que Ab1 o Ab2 es trastuzumab o un derivado mutado del mismo, que comprende

- un dominio VH que consiste en la secuencia SEQ ID NO:1
- 15 • un dominio CH1 seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22
- un dominio VL que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 10,
- un dominio CL seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25,

en donde los dominios CH1 y CL se asocian de la siguiente manera

- 20 - SEQ ID NO: 2 con SEQ ID NO: 11
- SEQ ID NO: 5 con SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 23
- SEQ ID NO: 20 con SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 23
- SEQ ID NO: 21 con SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 25
- SEQ ID NO: 22 con SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 25

25 Preferiblemente, los dominios CH1 y CL de Ab1 tienen una combinación de secuencias diferente de los dominios CH1 y CL de Ab2.

En una realización ventajosa, la secuencia del enlazador polipeptídico consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 34.

Se proporciona un anticuerpo particular que consiste en

- 30 a) dos cadenas pesadas, cada una de las cuales consiste en una secuencia continua que comprende, en orden de términos de N a C:
 - una cadena pesada VH de trastuzumab que consiste en SEQ ID NO: 1,
 - un dominio CH1 que consiste en SEQ ID NO: 2,
 - un enlazador polipeptídico que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 34,
- 35 - una cadena pesada VH de cetuximab que consiste en SEQ ID NO: 4,
- un dominio CH1 que consiste en SEQ ID NO: 5,
- un dominio bisagra que consiste en SEQ ID NO: 6,
- un dominio CH2 que consiste en SEQ ID NO: 7,
- un dominio CH3 que consiste en SEQ ID NO: 8,

b) dos cadenas ligeras de trastuzumab, cada una de las cuales comprende

- un dominio VL que consiste en SEQ ID NO: 10,
- un dominio CL que consiste en SEQ ID NO: 11,

c) dos cadenas ligeras de cetuximab, cada una de las cuales comprende:

- 5
- un dominio VL que consiste en SEQ ID NO: 13,
 - un dominio CL que consiste en SEQ ID NO: 14.

Se proporciona otro anticuerpo particular que consiste en

a) dos cadenas pesadas, cada una de las cuales consiste en una secuencia continua que comprende, en orden de términos de N a C:

- 10
- una cadena pesada VH de cetuximab que consiste en SEQ ID NO: 4,
 - un dominio CH1 que consiste en SEQ ID NO: 5,
 - un enlazador polipeptídico que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 34,
 - una cadena pesada VH de trastuzumab que consiste en SEQ ID NO: 1,
 - un dominio CH1 que consiste en SEQ ID NO: 2,
- 15
- un dominio bisagra que consiste en SEQ ID NO: 6,
 - un dominio CH2 que consiste en SEQ ID NO: 7,
 - un dominio CH3 que consiste en SEQ ID NO: 8,

b) dos cadenas ligeras de trastuzumab, cada una de las cuales comprende SEQ ID NO: 12

c) dos cadenas ligeras de cetuximab, cada una de las cuales comprende SEQ ID NO: 15

- 20
- Los anticuerpos biespecíficos preferidos de la invención son anticuerpos con secuencias VH de cetuximab que consisten en secuencias SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27.

La invención abarca además anticuerpos biespecíficos que contienen una versión humanizada de cadenas ligeras y/o cadenas pesadas de cetuximab.

- 25
- En una realización particular, los anticuerpos biespecíficos de la invención contienen secuencias VH y VL mutadas de trastuzumab.

También se describe en la presente memoria un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una cadena proteica de la invención. Dicho polinucleótido también puede comprender secuencias adicionales: en particular, puede comprender de manera ventajosa una secuencia que codifica una secuencia líder o un péptido señal que permite la secreción de dicha cadena proteica.

- 30
- La presente invención también abarca células huésped transformadas con dicho polinucleótido.

Todavía otro objetivo de la invención es un método para preparar los anticuerpos biespecíficos de la invención.

- 35
- Por lo tanto, se proporciona un método para producir el anticuerpo biespecífico de la invención, comprendiendo dicho método las siguientes etapas: a) cultivar en un medio y condiciones de cultivo adecuados una célula huésped que expresa una cadena pesada de anticuerpo como se definió anteriormente y cadenas ligeras de anticuerpo como se definió anteriormente; y b) recuperar dichos anticuerpos producidos del medio de cultivo o de dichas células cultivadas.

Leyendas de las figuras

La Figura 1 es un dibujo esquemático de un anticuerpo biespecífico de la invención.

La Figura 2A muestra una electroforesis en gel de poliacrilamida SDS de los anticuerpos biespecíficos BiXAb-3732SS y BiXAb-3489 en condiciones reductoras y no reductoras.

- 40
- La Figura 2B muestra una electroforesis en gel de poliacrilamida SDS del anticuerpo biespecífico BiXAb-3486 en condiciones reductoras y no reductoras.

La Figura 2C muestra una electroforesis en gel de poliacrilamida SDS del anticuerpo biespecífico BiXAb-E06528

en condiciones reductoras y no reductoras.

La Figura 3A muestra el análisis de cromatografía de exclusión por tamaño de BiXAb-3489.

La Figura 3B muestra el análisis de cromatografía de exclusión por tamaño de BiXAb-3732SS.

La Figura 3C muestra el análisis de cromatografía de exclusión por tamaño de BiXAb-E06528.

5 La Figura 4 muestra los perfiles de fusión de los dos anticuerpos originales (anti-HER2 y anti-EGFR) y BiXAb-3489 determinados por calorimetría diferencial de barrido.

La Figura 5 muestra el perfil de unión de BiXAb-3486 y BiXAb-3489 en un ELISA de unión a antígeno dual (HER2 y EGFR).

10 La Figura 6A muestra los perfiles de actividad citotóxica de los dos anticuerpos originales (anti-HER2 y anti-EGFR), su mezcla 1:1, BiXAb-3486, BiXAb-3489, BiXAb-3732SS, BiXAb-E06528 y un anticuerpo de control negativo, anti-CD20, en un ensayo ADCC que emplea una línea celular de cáncer de páncreas humano, BxPC-3, como células diana y células mononucleares no preactivadas no fraccionadas como células efectoras.

15 La Figura 6B muestra los perfiles de actividad citotóxica de los dos anticuerpos originales (anti-HER2 y anti-EGFR), su mezcla 1:1, BiXAb-3486, BiXAb-3489, BiXAb-3732SS, BiXAb-E06528 y un anticuerpo de control negativo, anti-CD20, en un ensayo ADCC que emplea una línea celular de carcinoma escamoso de piel humana, A431, como células diana y células mononucleares no preactivadas no fraccionadas como células efectoras.

20 La Figura 6C muestra los perfiles de actividad citotóxica de los dos anticuerpos originales (anti-HER2 y anti-EGFR), su mezcla 1:1, BiXAb-3486, BiXAb-3489, BiXAb-3732SS, BiXAb-E06528 y un anticuerpo de control negativo, anti-CD20, en un ensayo ADCC que emplea una línea celular de cáncer de ovario humano, SKOV3, como células diana y células mononucleares no preactivadas no fraccionadas como células efectoras.

La Figura 7A muestra el efecto de BiXAb-3486, BiXAb-3489 a diferentes dosis (2 mg/kg y 10 mg/kg), y la combinación de anti-EGFR y anti-HER2 originales con una concentración total de 4 mg/kg, y control en ratones nude portadores de BxPC-3 (escala lineal).

25 La Figura 7B muestra la inhibición del crecimiento tumoral (% T/C) de seis cohortes diferentes de ratones que recibieron diferentes dosis (2 mg/kg y 10 mg/kg) de BiXAb-3486 y BiXAb-3489, la combinación de los anticuerpos anti-HER2 y anti-EGFR con una concentración total de 4 mg/kg, o control. La inhibición del crecimiento tumoral (% T/C) se define como la proporción del volumen tumoral medio para el grupo tratado frente al grupo de control y se calculó como $\% T/C = [(volumen\ tumoral\ medio\ del\ grupo\ tratado\ en\ el\ día\ X) / (volumen\ tumoral\ medio\ del\ grupo\ de\ control\ en\ el\ día\ X)] \times 100$.

30 La Figura 7C muestra las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier que comparan ratones tratados con diferentes dosis (2 mg/kg y 10 mg/kg) de BiXAb-3486 y BiXAb-3489, la combinación de anticuerpos anti-HER2 y anti-EGFR con una concentración total de 4 mg/kg, y control.

35 La Figura 7D muestra el beneficio terapéutico observado en ratones que recibieron tratamiento con BiXAbs o la combinación de anti-HER2 y anti-EGFR originales en relación con ratones que no recibieron tratamiento (control). El beneficio terapéutico se define como la supervivencia media de los grupos tratados - supervivencia media del grupo de control.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

40 La estructura básica de una molécula de anticuerpo que se produce de forma natural es una estructura cuaternaria tetramérica en forma de Y que consiste en dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas, unidas entre sí mediante interacciones no covalentes y mediante enlaces disulfuro entre cadenas.

En las especies de mamíferos, existen cinco tipos de cadenas pesadas: α , δ , ϵ , γ y μ , que determinan la clase (isotipo) de inmunoglobulina: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente. El dominio variable N-terminal (VH) de la cadena pesada va seguido de una región constante que contiene tres dominios (numerados CH1, CH2 y CH3 desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal) en las cadenas pesadas γ , α y δ , mientras que la región constante de las cadenas pesadas μ y ϵ está compuesta por cuatro dominios (numerados CH1, CH2, CH3 y CH4 desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal). Los dominios CH1 y CH2 de IgA, IgG e IgD están separados por una bisagra flexible, que varía en longitud entre las diferentes clases y en el caso de IgA e IgG, entre los diferentes subtipos: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 tienen bisagras de 15, 12, 62 (o 77) y 12 aminoácidos, respectivamente, e IgA1 e IgA2 tienen 50 bisagras de 20 y 7 aminoácidos, respectivamente.

Hay dos tipos de cadenas ligeras: λ y κ , que pueden asociarse con uno cualquiera de los isotipos de cadenas pesadas, pero ambas son del mismo tipo en una molécula de anticuerpo determinada. Ambas cadenas ligeras parecen ser

funcionalmente idénticas. Su dominio variable N-terminal (VL) va seguido por una región constante que consiste en un solo dominio denominado CL.

Las cadenas pesada y ligera se emparejan mediante interacciones proteína/proteína entre los dominios CH1 y CL, y mediante interacciones VH/VL y las dos cadenas pesadas se asocian mediante interacciones proteína/proteína entre sus dominios CH3. La estructura de la molécula de inmunoglobulina generalmente se estabiliza mediante enlaces disulfuro intercatenarios entre los dominios CH1 y CL y entre las bisagras.

Las regiones de unión a antígeno corresponden a los brazos de la estructura en forma de Y, que consisten en la cadena ligera completa emparejada con los dominios VH y CH1 de la cadena pesada, y se denominan Fragmentos Fab (para el fragmento de unión a antígeno). Los fragmentos Fab se generaron primero a partir de moléculas de inmunoglobulina nativa mediante digestión con papaína, que escinde la molécula de anticuerpo en la región bisagra, en el lado amino-terminal de los enlaces disulfuro entre cadenas, liberando así dos brazos de unión a antígeno idénticos. Otras proteasas, tales como la pepsina, también escinden la molécula de anticuerpo en la región bisagra, pero en el lado carboxi-terminal de los enlaces disulfuro entre cadenas, liberando fragmentos que consisten en dos fragmentos Fab idénticos y que permanecen unidos a través de enlaces disulfuro; la reducción de enlaces disulfuro en los fragmentos F(ab')₂ genera fragmentos Fab'.

La parte de la región de unión al antígeno que corresponde a los dominios VH y VL se denomina fragmento Fv (para el Fragmento variable); contiene las CDRs (regiones determinantes de la complementariedad), que forman el sitio de unión al antígeno (también denominado parátipo).

La región efectora del anticuerpo que es responsable de su unión a las moléculas o células efectoras, corresponde al tallo de la estructura en forma de Y y contiene los dominios CH2 y CH3 emparejados de la cadena pesada (o los dominios CH2, CH3 y CH4, dependiendo de la clase de anticuerpo), y se denomina región Fc (para Fragmento cristizable). Debido a la identidad de las dos cadenas pesadas y las dos cadenas ligeras, las moléculas de anticuerpos que se producen de forma natural tienen dos sitios de unión a antígeno idénticos y, por lo tanto, se unen simultáneamente a dos epítopos idénticos.

Un anticuerpo "se une específicamente" a un antígeno diana si se une con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración que a otras sustancias. La "unión específica" o la "unión preferencial" no requiere necesariamente (aunque puede incluir) una unión exclusiva. En general, pero no necesariamente, la referencia a la unión significa unión preferencial.

Cetuximab (Erbix[®]); ImClone/Lilly, Merck-Serono) es un anticuerpo monoclonal ratón-humano quimérico (ATCC HB-9764 & ATCC-97-63) que se dirige al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Véanse también los documentos de Patente EP0359282, EP0667165, y US6217866. Cetuximab está aprobado para su uso como un tratamiento para el cáncer colorrectal y el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello.

Trastuzumab (Herceptina[®]; Genentech/Roche) es una IgG1 humanizada que interfiere con el receptor HER2/neu. Véanse también los documentos de Patente EP0590058, US5821337, US8075890, US6407213, US6054297, US5772997, US6165464, US6399063 y US6639055. Sus indicaciones son el tratamiento del cáncer de mama adyuvante y metastásico y cáncer gástrico metastásico.

En el contexto de la presente invención, el término "secuencia del enlazador polipeptídico" es un polipéptido de aproximadamente 20 a 80 aminoácidos, preferiblemente entre 30 y 60 aminoácidos, aún más preferiblemente entre 30 y 40 aminoácidos. De manera ventajosa, la secuencia del enlazador es "derivada de bisagra", lo que significa que el enlazador polipeptídico comprende toda o parte de la secuencia de la región bisagra de una o más inmunoglobulinas seleccionadas entre IgA, IgG e IgD, preferiblemente de origen humano. Dicho enlazador polipeptídico puede comprender toda o parte de la secuencia de la región bisagra de una sola inmunoglobulina. En este caso, dicha inmunoglobulina puede pertenecer al mismo isotipo y subclase que la inmunoglobulina de la que deriva el dominio CH1 adyacente, o a un isotipo o subclase diferente.

Alternativamente, dicho enlazador polipeptídico puede comprender toda o parte de las secuencias de las regiones bisagra de al menos dos inmunoglobulinas de isotipos o subclases diferentes. En este caso, la porción N-terminal del enlazador polipeptídico, que sigue directamente al dominio CH1, consiste preferiblemente en toda o parte de la región bisagra de una inmunoglobulina que pertenece al mismo isotipo y subclase que la inmunoglobulina de la que se deriva dicho dominio CH1. Opcionalmente, dicho enlazador polipeptídico puede comprender además una secuencia de 2 a 15, preferiblemente de 5 a 10 aminoácidos N-terminales del dominio CH2 de una inmunoglobulina. En algunos casos, pueden usarse secuencias de regiones bisagra nativas; en otros casos, se pueden llevar mutaciones puntuales a estas secuencias, en particular, la sustitución de uno o más residuos de cisteína en las secuencias bisagra de IgG1, IgG2 o IgG3 nativas por alanina o serina, para evitar enlaces disulfuro dentro de la cadena o entre cadenas no deseados.

Un ejemplo no limitativo de un enlazador polipeptídico que se puede usar en un anticuerpo biespecífico de la invención es un polipéptido que tiene la siguiente secuencia:

EPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSTPPTSPSGG (SEQ ID NO: 3).

Dicho polipéptido consiste en la secuencia de longitud completa de la bisagra de IgG1 humana, seguida de los 9 aminoácidos N-terminales del CH2 de IgG1 humana (APELLGGPS (SEQ ID NO: 28)), de una parte de la secuencia de la bisagra de IgA1 humana (TPPTSPSPS (SEQ ID NO:29)), y del dipéptido GG, añadido para proporcionar flexibilidad suplementaria al enlazador. En otra realización preferida, la secuencia del enlazador polipeptídico derivado de bisagra es SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:34.

Los términos "sujeto", "individuo", y "paciente" se usan indistintamente en la presente memoria y se refieren a un mamífero que está siendo evaluado para el tratamiento y/o que está siendo tratado. Los sujetos pueden ser humanos, pero también pueden incluir otros mamíferos, particularmente aquellos mamíferos útiles como modelos de laboratorio para enfermedades humanas, por ejemplo, ratón, rata, conejo, perro, etc.

- 10 El término "tratamiento" o "que trata" se refiere a una acción, aplicación o terapia, en la que un sujeto, incluyendo un ser humano, se somete a asistencia médica con el propósito de mejorar la afección del sujeto, directa o indirectamente. Particularmente, el término se refiere a reducir la incidencia o aliviar los síntomas, eliminar la recurrencia, prevenir la recurrencia, prevenir la incidencia, mejorar los síntomas, mejorar el pronóstico o una combinación de los mismos en algunas realizaciones. El experto en la materia entendería que el tratamiento no da como resultado necesariamente
- 15 la ausencia total o la eliminación de los síntomas. Por ejemplo, con respecto al cáncer, "tratamiento" o "que trata" puede referirse a la desaceleración del crecimiento, la proliferación o la metástasis de células neoplásicas o malignas, la prevención o el retraso del crecimiento, la proliferación o la metástasis de células neoplásicas o malignas, o alguna combinación de los mismos.

Diseño de los anticuerpos biespecíficos

- 20 Los inventores ahora proporcionan anticuerpos tetravalentes biespecíficos, que comprenden dos sitios de unión a cada uno de sus objetivos y un dominio Fc funcional que permite la activación de funciones efectoras tales como la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), la fagocitosis y la citotoxicidad dependiente del complemento. (CDC).

- La invención se refiere específicamente a anticuerpos biespecíficos contruidos usando las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada (VH) y cadena ligera (VL) de dos anticuerpos monoclonales dirigidos a EGFR y HER2, a saber, cetuximab y trastuzumab, respectivamente.
- 25

Los anticuerpos de la invención son anticuerpos de longitud completa. Comprenden preferiblemente cadenas pesadas y cadenas ligeras de inmunoglobulinas humanas, preferiblemente IgG, aún más preferiblemente IgG1.

Las cadenas ligeras son preferiblemente cadenas ligeras Kappa.

- 30 Un ejemplo de los anticuerpos de la invención, que tienen una estructura similar a IgG, se muestra en la Figura 1.

Los anticuerpos biespecíficos de la invención típicamente comprenden

- una cadena pesada continua contruida de una Fc (Bisagra-CH2-CH3)
- seguido por la cadena pesada de Fab del anticuerpo 1 (CH1-VH) y la cadena pesada de Fab sucesiva (CH1-VH) del anticuerpo 2, esta última unida por una secuencia del enlazador polipeptídico derivada de bisagra,
- 35 • y durante la expresión de la proteína, la cadena pesada resultante se ensambla en dímeros, mientras que las cadenas ligeras del anticuerpo 1 y el anticuerpo 2 coexpresadas (VL-CL) se asocian con sus cadenas pesadas afines para formar la molécula final en tándem F(ab)'2-Fc ,

siendo el anticuerpo 1 (Ab1) y el anticuerpo 2 (Ab2) diferentes y seleccionados del grupo que consiste en cetuximab, trastuzumab y sus derivados mutados o humanizados.

- 40 En una realización de la invención, los anticuerpos biespecíficos comprenden

- una cadena pesada continua contruida de una Fc (Bisagra-CH2-CH3)
- seguido de la cadena pesada de Fab de trastuzumab (CH1-VH) y la sucesiva cadena pesada de Fab (CH1-VH) de cetuximab, esta última unida por una secuencia del enlazador polipeptídico derivada de bisagra,
- y durante la expresión de la proteína, la cadena pesada resultante se ensambla en dímeros mientras que las cadenas ligeras coexpresadas (VL-CL) de trastuzumab de tipo nativo o mutado y cetuximab de tipo nativo o mutado o humanizado se asocian con sus cadenas pesadas afines para formar la molécula final en tándem F(ab)'2-Fc.
- 45

En otra realización de la invención, los anticuerpos biespecíficos comprenden

- una cadena pesada continua contruida de una Fc (Bisagra-CH2-CH3)

- seguido de la cadena pesada de Fab de cetuximab (CH1-VH) y la sucesiva cadena pesada de Fab (CH1-VH) de trastuzumab, esta última unida por una secuencia del enlazador polipeptídico derivado de bisagra,
- y durante la expresión de la proteína, la cadena pesada resultante se ensambla en dímeros mientras que las cadenas ligeras coexpresadas (VL-CL) de cetuximab de tipo nativo o mutado y trastuzumab de tipo nativo o mutado se asocian con sus cadenas pesadas afines para formar la molécula final en tándem F(ab)²-Fc.

En una realización preferida, se describen anticuerpos biespecíficos que comprenden

- dos fragmentos Fab con diferentes dominios CH1 y CL que consisten en
 - a) el fragmento Fab que tiene los dominios CH1 y C-Kappa derivados de una IgG1/Kappa humana, y los dominios VH y VL de Ab1,
 - b) el fragmento Fab que tiene los dominios CH1 y C-Kappa derivados de una IgG1/Kappa humana y los dominios VH y VL de Ab2,
 - c) un dominio constante de cadena ligera mutado que se deriva del dominio constante kappa humano,

los fragmentos Fab se disponen en tándem en el siguiente orden

- el extremo C-terminal del dominio CH1 del fragmento Fab de Ab1 está unido al extremo N-terminal del dominio VH del fragmento Fab de Ab2 a través de un enlazador polipeptídico,
- la región bisagra de una IgG1 humana que une los extremos C-terminales del dominio CH1 del fragmento de Ab2 con el extremo N-terminal del dominio CH2,
- los dominios CH2 y CH3 dimerizados de una IgG1 humana.

Todavía en una realización preferida,

- Ab1 es trastuzumab que tiene
 - una región VH correspondiente a las secuencias SEQ ID NO:1
 - una región CH1 correspondiente a una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22
 - una región VL correspondiente a las secuencias SEQ ID NO: 10,
 - una región C-Kappa correspondiente a una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25,
 - las regiones CH1 y C-Kappa que solo pueden asociarse en las siguientes combinaciones:
 - SEQ ID NO: 2 con SEQ ID NO: 11
 - SEQ ID NO: 5 con SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 23
 - SEQ ID NO: 20 con SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 23
 - SEQ ID NO: 21 con SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 25
 - SEQ ID NO: 22 con SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 25
- Ab2 es cetuximab que tiene
 - una región VH correspondiente a las secuencias SEQ ID NO:4
 - una región CH1 correspondiente a una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22,
 - una región VL correspondiente a las secuencias SEQ ID NO: 13,
 - una región C-Kappa correspondiente a una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25,
 - las regiones CH1 y C-Kappa que solo pueden asociarse en las siguientes combinaciones:
 - SEQ ID NO: 2 con SEQ ID NO: 11,

- SEQ ID NO: 5 con SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 23,
- SEQ ID NO: 20 con SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 23,
- SEQ ID NO: 21 con SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 25,
- SEQ ID NO: 22 con SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 25,

- 5 • Ab1 y Ab2 tienen cada uno una combinación diferente de secuencias CH1 y C-Kappa.

En otro aspecto,

Ab1 es cetuximab que tiene

- o una región VH correspondiente a las secuencias SEQ ID NO: 4,
- 10 o una región CH1 correspondiente a una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22,
- o una región VL correspondiente a las secuencias SEQ ID NO: 13,
- o una región C-Kappa correspondiente a una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25,
- o las regiones CH1 y C-Kappa que solo pueden asociarse en las siguientes combinaciones:
- 15 - SEQ ID NO: 2 con SEQ ID NO: 11,
- SEQ ID NO: 5 con SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 23,
- SEQ ID NO: 20 con SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 23,
- SEQ ID NO: 21 con SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 25,
- SEQ ID NO: 22 con SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 25,

20 Y Ab2 es trastuzumab que tiene

- o una región VH correspondiente a las secuencias SEQ ID NO:1,
- o una región CH1 correspondiente a una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22,
- o una región VL correspondiente a las secuencias SEQ ID NO: 10,
- 25 o una región C-Kappa correspondiente a una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25,
- o las regiones CH1 y C-Kappa que solo pueden asociarse en las siguientes combinaciones:
- SEQ ID NO: 2 con SEQ ID NO: 11,
- SEQ ID NO: 5 con SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 23,
- 30 - SEQ ID NO: 20 con SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 23,
- SEQ ID NO: 21 con SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 25
- SEQ ID NO: 22 con SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 25

Ab1 y Ab2 tienen cada uno una combinación diferente de secuencias CH1 y C-Kappa.

35 A lo largo de la presente descripción, las secuencias de aminoácidos se definen según Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991).

En una realización particular, los anticuerpos biespecíficos tienen la siguiente estructura:

a) una cadena pesada continua que consiste en:

- una región variable de cadena pesada (VH) de trastuzumab correspondiente a SEQ ID NO: 1,
- un dominio constante CH1 de tipo nativo (el residuo en la posición 192 de Kabat es treonina, T) de IgG1

humana correspondiente a SEQ ID NO: 2,

- un enlazador polipeptídico que une las cadenas pesadas 2 Fab correspondientes a SEQ ID NO: 3,
- una región variable de cadena pesada (VH) de cetuximab correspondiente a SEQ ID NO: 4,
- un dominio constante CH1 mutado (el residuo en la posición 192 de Kabat se ha mutado de treonina a ácido glutámico, E,) de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 5,
- una región bisagra de tipo nativo de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 6,
- un dominio CH2 de tipo nativo de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 7,
- un dominio CH3 de tipo nativo del alotipo G1m(3) de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 8,

b) una cadena ligera de trastuzumab que consiste en:

- una región variable de tipo nativo (VL) correspondiente a SEQ ID NO: 10,
- un dominio constante Kappa humano de tipo nativo (el residuo en las posiciones 114 y 137 de Kabat son serina (S) y asparagina (N), respectivamente) correspondiente a SEQ ID NO: 11,

c) una cadena ligera de cetuximab que consiste en:

- una región variable de tipo nativo (VL) correspondiente a SEQ ID NO: 13,
- un dominio constante kappa humano mutado (los residuos en las posiciones 114 y 137 de Kabat son alanina (A) y lisina (K), respectivamente) correspondientes a SEQ ID NO: 14.

En otra realización, los anticuerpos biespecíficos tienen la siguiente estructura:

a) una cadena pesada continua que consiste en

- una región variable de cadena pesada (VH) de trastuzumab correspondiente a SEQ ID NO: 1,
- un dominio constante CH1 de tipo nativo (el residuo en la posición 192 de Kabat es treonina, T) de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 2,
- un enlazador polipeptídico que une las cadenas pesadas 2 Fab correspondientes a SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 34,
- una región variable de cadena pesada (VH) de cetuximab correspondiente a SEQ ID NO: 4,
- un dominio constante CH1 mutado (el residuo en la posición 192 de Kabat se ha mutado de treonina a ácido glutámico, E,) de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 5,
- una región bisagra de tipo nativo de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 6,
- un dominio CH2 de tipo nativo de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 7,
- un dominio CH3 de tipo nativo del alotipo G1m(3) de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 8

b) una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de trastuzumab de tipo nativo correspondiente a SEQ ID NO: 12

c) una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de cetuximab mutada correspondiente a SEQ ID NO: 15.

En otro aspecto, los anticuerpos biespecíficos pueden tener la siguiente estructura:

a) una cadena pesada continua que consiste en

- una región variable de cadena pesada (VH) de cetuximab correspondiente a SEQ ID NO: 4,
- un dominio constante CH1 mutado (el residuo en la posición de Kabat 192 se ha mutado de treonina a ácido glutámico, E) de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 5,
- un enlazador polipeptídico que une las cadenas pesadas de 2 Fab correspondientes a SEQ ID NO: 3,
- una región variable de cadena pesada (VH) de trastuzumab correspondiente a SEQ ID NO: 1,

- un dominio constante CH1 de tipo nativo (el residuo en la posición de Kabat 192 es treonina, T) de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 2,
- una región bisagra de tipo nativo de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 6,
- un dominio CH2 de tipo nativo de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 7,
- 5 • un dominio CH3 de tipo nativo del alotipo G1m(3) de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 8,

b) una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de trastuzumab de tipo nativo correspondiente a SEQ ID NO: 12

c) una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de cetuximab mutada correspondiente a SEQ ID NO: 15

En otro aspecto más, los anticuerpos biespecíficos pueden tener la siguiente estructura:

- 10 a) una cadena pesada continua que consiste en
- una región variable de cadena pesada (VH) de cetuximab correspondiente a SEQ ID NO: 4,
 - un dominio constante CH1 mutado (el residuo en la posición de Kabat 192 se ha mutado de treonina a ácido glutámico, E) de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 5,
 - un enlazador polipeptídico que une las cadenas pesadas de 2 Fab correspondientes a SEQ ID NO: 16,
 - 15 • una región variable de cadena pesada (VH) de trastuzumab correspondiente a SEQ ID NO: 1,
 - un dominio constante CH1 de tipo nativo (el residuo en la posición de Kabat 192 es treonina, T) de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 2,
 - una región bisagra de tipo nativo de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 6,
 - un dominio CH2 de tipo nativo de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 7,
 - 20 • un dominio CH3 de tipo nativo del alotipo G1m(3) de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 8,
- b) una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de trastuzumab de tipo nativo correspondiente a SEQ ID NO: 12,
- c) una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de cetuximab mutada correspondiente a SEQ ID NO: 15.

Los anticuerpos biespecíficos pueden contener al menos una de las siguientes mutaciones:

- 25 - un dominio constante CH1 mutado de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 20,
- un dominio constante CH1 mutado de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 21,
- un dominio constante CH1 mutado de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 22,
- una constante kappa humana mutada correspondiente a SEQ ID NO: 23,
- una constante kappa humana mutada correspondiente a SEQ ID NO: 24,
- 30 - un dominio constante kappa humano mutado correspondiente a SEQ ID NO: 25.

En aspectos adicionales, los anticuerpos biespecíficos tienen una región VH, un dominio CH1, una región VL y un dominio C-Kappa según las combinaciones enumeradas en la Tabla 1 y la Tabla 2, que muestran varios formatos posibles para los anticuerpos de la invención.

- 35 Los anticuerpos biespecíficos muestran preferiblemente una mayor afinidad de unión a EGFR y/o a HER2. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden mostrar una Kd inferior a 1×10^{-7} M, 10^{-8} M, preferiblemente inferior a 1×10^{-9} o 1×10^{-10} M, con respecto a EGFR y/o HER2.

TABLA 1

Fab 1				Fab 2			
trastuzumab				cetuximab			
VH	CH1	VL	C-Kappa	VH	CH1	VL	C-Kappa
SEQ No1	SEQ No5	SEQ No 10	SEQ No 14	SEQ No4	SEQ No21	SEQ No 13	SEQ No24
SEQ No1	SEQ No5	SEQ No 10	SEQ No 14	SEQ No4	SEQ No21	SEQ No 13	SEQ No25
SEQ No1	SEQ No5	SEQ No 10	SEQ No 14	SEQ No4	SEQ No22	SEQ No 13	SEQ No24
SEQ No1	SEQ No5	SEQ No 10	SEQ No 14	SEQ No4	SEQ No22	SEQ No 13	SEQ No25
SEQ No1	SEQ No5	SEQ No 10	SEQ No23	SEQ No4	SEQ No21	SEQ No 13	SEQ No24
SEQ No1	SEQ No5	SEQ No 10	SEQ No23	SEQ No4	SEQ No21	SEQ No 13	SEQ No25
SEQ No1	SEQ No5	SEQ No 10	SEQ No23	SEQ No4	SEQ No22	SEQ No 13	SEQ No24
SEQ No1	SEQ No5	SEQ No 10	SEQ No23	SEQ No4	SEQ No22	SEQ No 13	SEQ No25
SEQ No1	SEQ No20	SEQ No 10	SEQ No 14	SEQ No4	SEQ No21	SEQ No 13	SEQ No24
SEQ No1	SEQ No20	SEQ No 10	SEQ No 14	SEQ No4	SEQ No21	SEQ No 13	SEQ No25
SEQ No1	SEQ No20	SEQ No 10	SEQ No 14	SEQ No4	SEQ No22	SEQ No 13	SEQ No24
SEQ No1	SEQ No20	SEQ No 10	SEQ No 14	SEQ No4	SEQ No22	SEQ No 13	SEQ No25
SEQ No1	SEQ No20	SEQ No 10	SEQ No23	SEQ No4	SEQ No21	SEQ No 13	SEQ No24
SEQ No1	SEQ No20	SEQ No 10	SEQ No23	SEQ No4	SEQ No21	SEQ No 13	SEQ No25
SEQ No1	SEQ No20	SEQ No 10	SEQ No23	SEQ No4	SEQ No22	SEQ No 13	SEQ No24
SEQ No1	SEQ No20	SEQ No 10	SEQ No23	SEQ No4	SEQ No22	SEQ No 13	SEQ No25
SEQ No1	SEQ No2	SEQ No 12		SEQ No 4	SEQ No21	SEQ NO 13	SEQ No24
SEQ No1	SEQ No2	SEQ No 12		SEQ No 4	SEQ No21	SEQ NO 13	SEQ No25
SEQ No1	SEQ No2	SEQ No 12		SEQ No 4	SEQ No22	SEQ NO 13	SEQ No24
SEQ No1	SEQ No2	SEQ No 12		SEQ No 4	SEQ No22	SEQ NO 13	SEQ No25
<u>SEQ No1</u>	<u>SEQ No2</u>	<u>SEQ No 12</u>		<u>SEQ No 4</u>	<u>SEQ No 5</u>	<u>SEQ No 15</u>	
SEQ No1	SEQ No2	SEQ No 12		SEQ No 4	SEQ No 5	SEQ NO 13	SEQ No23
SEQ No1	SEQ No2	SEQ No 12		SEQ No 4	SEQ No20	SEQ No 15	
SEQ No1	SEQ No2	SEQ No 12		SEQ No 4	SEQ No20	SEQ NO 13	SEQ No23
SEQ No1	SEQ No21	SEQ No 10	SEQ No24	SEQ No 4	SEQ No 2	SEQ NO 13	SEQ No 11
SEQ No1	SEQ No21	SEQ No 10	SEQ No25	SEQ No 4	SEQ No 2	SEQ NO 13	SEQ No 11
SEQ No1	SEQ No22	SEQ No 10	SEQ No24	SEQ No 4	SEQ No 2	SEQ NO 13	SEQ No 11
SEQ No1	SEQ No22	SEQ No 10	SEQ No25	SEQ No 4	SEQ No 2	SEQ NO 13	SEQ No 11
SEQ No1	SEQ No5	SEQ No 10	SEQ No 14	SEQ No 4	SEQ No 2	SEQ NO 13	SEQ No 11
SEQ No1	SEQ No5	SEQ No 10	SEQ No23	SEQ No 4	SEQ No 2	SEQ NO 13	SEQ No 11
SEQ No1	SEQ No20	SEQ No 10	SEQ No 14	SEQ No 4	SEQ No 2	SEQ NO 13	SEQ No 11
SEQ No1	SEQ No20	SEQ No 10	SEQ No23	SEQ No 4	SEQ No 2	SEQ NO 13	SEQ No 11

TABLA 2

Fab 1				Fab 2			
cetuximab				trastuzumab			
VH	CH1	VL	C-Kappa	VH	CH1	VL	C-Kappa
SEQ No4	SEQ No21	SEQ No 13	SEQ No24	SEQ No1	SEQ No5	SEQ No 10	SEQ No 14
SEQ No4	SEQ No21	SEQ No 13	SEQ No25	SEQ No1	SEQ No5	SEQ No 10	SEQ No 14
SEQ No4	SEQ No22	SEQ No 13	SEQ No24	SEQ No1	SEQ No5	SEQ No 10	SEQ No 14
SEQ No4	SEQ No22	SEQ No 13	SEQ No25	SEQ No1	SEQ No5	SEQ No 10	SEQ No 14
SEQ No4	SEQ No21	SEQ No 13	SEQ No24	SEQ No1	SEQ No5	SEQ No 10	SEQ No23
SEQ No4	SEQ No21	SEQ No 13	SEQ No25	SEQ No1	SEQ No5	SEQ No 10	SEQ No23
SEQ No4	SEQ No22	SEQ No 13	SEQ No24	SEQ No1	SEQ No5	SEQ No 10	SEQ No23
SEQ No4	SEQ No22	SEQ No 13	SEQ No25	SEQ No1	SEQ No5	SEQ No 10	SEQ No23
SEQ No4	SEQ No21	SEQ No 13	SEQ No24	SEQ No1	SEQ No20	SEQ No 10	SEQ No 14
SEQ No4	SEQ No21	SEQ No 13	SEQ No25	SEQ No1	SEQ No20	SEQ No 10	SEQ No 14
SEQ No4	SEQ No22	SEQ No 13	SEQ No24	SEQ No1	SEQ No20	SEQ No 10	SEQ No 14
SEQ No4	SEQ No22	SEQ No 13	SEQ No25	SEQ No1	SEQ No20	SEQ No 10	SEQ No 14
SEQ No4	SEQ No21	SEQ No 13	SEQ No24	SEQ No1	SEQ No20	SEQ No 10	SEQ No23
SEQ No4	SEQ No21	SEQ No 13	SEQ No25	SEQ No1	SEQ No20	SEQ No 10	SEQ No23
SEQ No4	SEQ No22	SEQ No 13	SEQ No24	SEQ No1	SEQ No20	SEQ No 10	SEQ No23
SEQ No4	SEQ No22	SEQ No 13	SEQ No25	SEQ No1	SEQ No20	SEQ No 10	SEQ No23
SEQ No 4	SEQ No21	SEQ NO 13	SEQ No24	SEQ No1	SEQ No2	SEQ No 12	
SEQ No 4	SEQ No21	SEQ NO 13	SEQ No25	SEQ No1	SEQ No2	SEQ No 12	
SEQ No 4	SEQ No22	SEQ NO 13	SEQ No24	SEQ No1	SEQ No2	SEQ No 12	
SEQ No 4	SEQ No22	SEQ NO 13	SEQ No25	SEQ No1	SEQ No2	SEQ No 12	
<u>SEQ No 4</u>	<u>SEQ No 5</u>	<u>SEQ No 15</u>		<u>SEQ No1</u>	<u>SEQ No2</u>	<u>SEQ No 12</u>	
SEQ No 4	SEQ No 5	SEQ NO 13	SEQ No23	SEQ No1	SEQ No2	SEQ No 12	
SEQ No 4	SEQ No20	SEQ No 15		SEQ No1	SEQ No2	SEQ No 12	
SEQ No 4	SEQ No20	SEQ NO 13	SEQ No23	SEQ No1	SEQ No2	SEQ No 12	
SEQ No 4	SEQ No 2	SEQ NO 13	SEQ No 11	SEQ No1	SEQ No21	SEQ No 10	SEQ No24
SEQ No 4	SEQ No 2	SEQ NO 13	SEQ No 11	SEQ No1	SEQ No21	SEQ No 10	SEQ No25
SEQ No 4	SEQ No 2	SEQ NO 13	SEQ No 11	SEQ No1	SEQ No22	SEQ No 10	SEQ No24
SEQ No 4	SEQ No 2	SEQ NO 13	SEQ No 11	SEQ No1	SEQ No22	SEQ No 10	SEQ No25
SEQ No 4	SEQ No 2	SEQ NO 13	SEQ No 11	SEQ No1	SEQ No5	SEQ No 10	SEQ No 14
SEQ No 4	SEQ No 2	SEQ NO 13	SEQ No 11	SEQ No1	SEQ No5	SEQ No 10	SEQ No23
SEQ No 4	SEQ No 2	SEQ NO 13	SEQ No 11	SEQ No1	SEQ No20	SEQ No 10	SEQ No 14
SEQ No 4	SEQ No 2	SEQ NO 13	SEQ No 11	SEQ No1	SEQ No20	SEQ No 10	SEQ No23

Diseño de los enlazadores

- El enlazador polipeptídico, también denominado "secuencia del enlazador polipeptídico derivado de la bisagra" o "enlazador de pseudo bisagra", comprende toda o parte de la secuencia de la región bisagra de una o más inmunoglobulinas seleccionadas entre IgA, IgG e IgD, preferiblemente de origen humano. Dicho enlazador polipeptídico puede comprender toda o parte de la secuencia de la región bisagra de una sola inmunoglobulina. En este caso, dicha inmunoglobulina puede pertenecer al mismo isotipo y subclase que la inmunoglobulina de la que deriva el dominio CH1 adyacente, o a un isotipo o subclase diferente. Alternativamente, dicho enlazador polipeptídico puede comprender toda o parte de las secuencias de las regiones bisagra de al menos dos inmunoglobulinas de diferentes isotipos o subclases. En este caso, la porción N-terminal del enlazador polipeptídico, que sigue directamente al dominio CH1, consiste preferiblemente en toda o parte de la región bisagra de una inmunoglobulina que pertenece al mismo isotipo y subclase que la inmunoglobulina de la que se deriva dicho dominio CH1.

Opcionalmente, dicho enlazador polipeptídico puede comprender además una secuencia de 2 a 15, preferiblemente de 5 a 10 aminoácidos N-terminales del dominio CH2 de una inmunoglobulina.

- La secuencia del enlazador polipeptídico normalmente consiste en menos de 80 aminoácidos, preferiblemente menos de 60 aminoácidos, aún más preferiblemente menos de 40 aminoácidos.

En algunos casos, pueden usarse secuencias de regiones bisagra nativas; en otros casos, se pueden llevar

mutaciones puntuales a estas secuencias, en particular, la sustitución de uno o más residuos de cisteína en las secuencias bisagra de IgG1, IgG2 o IgG3 nativas por alanina o serina, para evitar enlaces disulfuro dentro de la cadena o entre cadenas no deseados.

En una realización particular, la secuencia del enlazador polipeptídico comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos EPKX₁CDKX₂HX₃X₄PPX₅PAPELLGGPX₆X₇PPX₈PX₉PX₁₀GG (SEQ ID NO: 36), en donde X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆, X₇, X₈, X₉, X₁₀, idénticos o diferentes, son cualquier aminoácido. En particular, la secuencia del enlazador polipeptídico puede comprender o consistir en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en

EPKSCDKTHTSPAPAPPELLGGPGGPPGPGPGGG (SEQ ID NO: 37);

EPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSTPPTPSPSGG (SEQ ID NO: 3)

10 EPKSCDKTHTSPSPAPPELLGGPSTPPTPSPSGG (SEQ ID NO: 16).

EPKSCDKTHTSPAPAPPELLGGPAAPPAPAPAGG (SEQ ID NO: 34);

EPKSCDKTHTSPAPAPPELLGGPAAPPGPAPGGG (SEQ ID NO: 38);

Un ejemplo no limitativo de un enlazador polipeptídico derivado de la bisagra que se puede usar en un fragmento de unión a antígenos multiespecífico de la invención es un polipéptido que tiene SEQ ID NO: 3. Dicho polipéptido consiste en la secuencia de longitud completa de la bisagra de IgG1 humana, seguida por los 9 aminoácidos N-terminales de CH2 de la IgG1 humana (APPELLGGPS, SEQ ID NO: 28), por una porción de la secuencia de la bisagra de IgA1 humana (TPPTSPSP, SEQ ID NO: 29), y por el dipéptido GG, añadido para proporcionar flexibilidad suplementaria al enlazador. En otra realización preferida, la secuencia del enlazador polipeptídico derivado de la bisagra es SEQ ID NO: 34 o SEQ ID NO: 16.

20 En una realización particular, X₁, X₂ y X₃, idénticos o diferentes, son Treonina (T) o Serina (S).

En otra realización particular, X₁, X₂ y X₃, idénticos o diferentes, se seleccionan del grupo que consiste en Ala (A), Gly (G), Val (V), Asn (N), Asp (D) e Ile (I), aún más preferiblemente X₁, X₂ y X₃, idénticos o diferentes, puede ser Ala (A) o Gly (G).

Alternativamente, X₁, X₂ y X₃, idénticos o diferentes, pueden ser Leu (L), Glu (E), Gln (Q), Met (M), Lys (K), Arg (R), Phe (F), Tyr (T), His (H), Trp (W), preferiblemente Leu (L), Glu (E) o Gln (Q).

25 En una realización particular, X₄ y X₅, idénticos o diferentes, son cualquier aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Serina (S), Cisteína (C), Alanina (A) y Glicina (G).

En una realización preferida, X₄ es Serina (S) o Cisteína (C).

En un aspecto preferido, X₅ es Alanina (A) o Cisteína (C).

30 En una realización particular, X₆, X₇, X₈, X₉, X₁₀, idénticos o diferentes, son cualquier aminoácido distinto de Treonina (T) o Serina (S). Preferiblemente X₆, X₇, X₈, X₉, X₁₀, idénticos o diferentes, se seleccionan del grupo que consiste en Ala (A), Gly (G), Val (V), Asn (N), Asp (D) e Ile (I).

Alternativamente, X₆, X₇, X₈, X₉, X₁₀, idénticos o diferentes, pueden ser Leu (L), Glu (E), Gln (Q), Met (M), Lys (K), Arg (R), Phe (F), Tyr (T), His (H), Trp (W), preferiblemente Leu (L), Glu (E) o Gln (Q).

35 En una realización preferida, X₆, X₇, X₈, X₉, X₁₀, idénticos o diferentes, se seleccionan del grupo que consiste en Ala (A) y Gly (G).

Todavía en una realización preferida, X₆ y X₇ son idénticos y se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en Ala (A) y Gly (G).

40 En una realización preferida, la secuencia del enlazador polipeptídico comprende o consiste en la secuencia SEQ ID NO: 36, en la que

X₁, X₂ y X₃, idénticos o diferentes, son Treonina (T), Serina (S);

X₄ es Serina (S) o Cisteína (C);

X₅ es Alanina (A) o Cisteína (C);

X₆, X₇, X₈, X₉, X₁₀, idénticos o diferentes, se seleccionan del grupo que consiste en Ala (A) y Gly (G).

45 En otra realización preferida, la secuencia del enlazador polipeptídico comprende o consiste en la secuencia SEQ ID NO: 36, en la que

X₁, X₂ y X₃, idénticos o diferentes, son Ala (A) o Gly (G);

X₄ es Serina (S) o Cisteína (C);

X₅ es Alanina (A) o Cisteína (C);

X₆, X₇, X₈, X₉, X₁₀, idénticos o diferentes, se seleccionan del grupo que consiste en Ala (A) y Gly (G).

5 **Anticuerpos biespecíficos preferidos**

En los ejemplos se describe una preparación de varios anticuerpos biespecíficos (denominados BiXAb-3486, BiXAb-3489, BiXAb-3732SS y BiXAb-E06528).

Un anticuerpo biespecífico preferido de la invención (BiXAb-3486) tiene la siguiente estructura:

i) una cadena pesada continua que comprende

- 10
 - una región variable de cadena pesada (VH) de trastuzumab correspondiente a SEQ ID NO: 1
 - un dominio constante CH1 de tipo nativo (el residuo en la posición de Kabat 192 es treonina, T) de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 2
 - un enlazador polipeptídico que une las cadenas pesadas 2 Fab correspondientes a SEQ ID NO: 3
 - una región variable de cadena pesada (VH) de cetuximab correspondiente a SEQ ID NO: 4
- 15
 - un dominio constante CH1 mutado (el residuo en la posición de Kabat 192 ha sido mutado de treonina a ácido glutámico, E,) de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 5
 - una región bisagra de tipo nativo de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 6
 - un dominio CH2 de tipo nativo de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 7
 - un dominio CH3 de tipo nativo del alotipo G1m(3) de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 8.

20 Por lo tanto, el anticuerpo biespecífico de la invención tiene una cadena pesada continua (701 residuos) de SEQ ID NO: 9

ii) una cadena ligera de trastuzumab de tipo nativo que comprende

- una región variable de tipo nativo (VL) correspondiente a SEQ ID NO: 10
 - un dominio constante Kappa humano de tipo nativo (los residuos en las posiciones de Kabat 114 y 137 son Serina (S) y Asparagina (N), respectivamente) correspondiente a SEQ ID NO: 11
- 25

Por lo tanto, la cadena ligera de Trastuzumab corresponde a SEQ ID NO: 12.

iii) una cadena ligera de cetuximab que comprende

- una región variable de tipo nativo (VL) correspondiente a SEQ ID NO: 13
 - un dominio constante kappa humano mutado (los residuos en las posiciones de Kabat 114 y 137 son Alanina (A) y Lisina (K), respectivamente) correspondientes a SEQ ID NO: 14
- 30

Por lo tanto, la cadena ligera de Cetuximab corresponde a SEQ ID NO: 15.

Otro anticuerpo biespecífico preferido de la invención (BiXAb-3489) es el anticuerpo que tiene la siguiente estructura:

i) una cadena pesada continua que comprende

- Una región variable de cadena pesada (VH) de trastuzumab correspondiente a SEQ ID NO: 1
 - 35
 - Un dominio constante CH1 de tipo nativo (el residuo en la posición de Kabat 192 es treonina, T) de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 2
 - Un enlazador polipeptídico que une las cadenas pesadas 2 Fab correspondientes a SEQ ID NO: 16
 - Una región variable de cadena pesada (VH) de cetuximab correspondiente a SEQ ID NO: 4
 - Un dominio constante CH1 mutado (el residuo en la posición de Kabat 192 se ha mutado de treonina a ácido glutámico, E,) de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 5
- 40

- Una región bisagra de tipo nativo de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 6
- Un dominio CH2 de tipo nativo de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 7
- Un dominio CH3 de tipo nativo del alotipo G1 m(3) de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 8.

5 Por lo tanto, el anticuerpo biespecífico de la invención tiene una cadena pesada continua (701 residuos) de SEQ ID NO: 17

ii) una cadena ligera de trastuzumab de tipo nativo que consiste en SEQ ID NO: 12

iii) una cadena ligera de cetuximab que consiste en SEQ ID NO: 15

Otro anticuerpo biespecífico preferido de la invención (BiXAb-E06528) es el anticuerpo que tiene la siguiente estructura:

10 i) una cadena pesada continua que comprende

- una región variable de cadena pesada (VH) de trastuzumab correspondiente a SEQ ID NO: 1
- un dominio constante CH1 de tipo nativo (el residuo en la posición de Kabat 192 es Treonina, T) de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 2
- un enlazador polipeptídico que une las cadenas pesadas 2 Fab correspondientes a SEQ ID NO: 34

15 • una región variable de cadena pesada (VH) de cetuximab correspondiente a SEQ ID NO: 4

- un dominio constante CH1 mutado (el residuo en la posición de Kabat 192 se ha mutado de treonina a ácido glutámico, E,) de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 5

- una región bisagra de tipo nativo de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 6

- un dominio CH2 de tipo nativo de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 7

20 • un dominio CH3 de tipo nativo del alotipo G1 m(3) de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 8.

Por lo tanto, el anticuerpo biespecífico de la invención tiene una cadena pesada continua (701 residuos) de SEQ ID NO: 35

ii) una cadena ligera de trastuzumab de tipo nativo que consiste en SEQ ID NO: 12

iii) una cadena ligera de cetuximab que consiste en SEQ ID NO: 15

25 Otro anticuerpo biespecífico preferido de la invención tiene la siguiente estructura:

i) una cadena pesada continua que comprende

- una región variable de cadena pesada (VH) de cetuximab correspondiente a SEQ ID NO: 4
- un dominio constante CH1 mutado (el residuo en la posición de Kabat 192 se ha mutado de treonina a ácido glutámico, E) de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 5

30 • un enlazador polipeptídico que une las cadenas pesadas 2 Fab correspondientes a SEQ ID NO: 3

- una región variable de cadena pesada (VH) de trastuzumab correspondiente a SEQ ID NO: 1

- un dominio constante CH1 de tipo nativo (el residuo en la posición de Kabat 192 es Treonina, T) de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 2

- una región bisagra de tipo nativo de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 6

35 • un dominio CH2 de tipo nativo de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 7

- un dominio CH3 de tipo nativo del alotipo G1m(3) de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 8.

Por lo tanto, el anticuerpo biespecífico de la invención tiene una cadena pesada continua (701 residuos) de SEQ ID NO: 18

ii) una cadena ligera de trastuzumab de tipo nativo que consiste en SEQ ID NO: 12

40 iii) una cadena ligera de cetuximab que consiste en SEQ ID NO: 15

Otro anticuerpo biespecífico preferido de la invención (BiXab 3732SS) tiene la siguiente estructura:

i) una cadena pesada continua que comprende

- una región variable de cadena pesada (VH) de cetuximab correspondiente a SEQ ID NO: 4
- un dominio constante CH1 mutado (el residuo en la posición de Kabat 192 se ha mutado de treonina a ácido glutámico, E) de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 5
- un enlazador polipeptídico que une las cadenas pesadas 2 Fab correspondientes a SEQ ID NO: 16
- una región variable de cadena pesada (VH) de trastuzumab correspondiente a SEQ ID NO: 1
- un dominio constante CH1 de tipo nativo (el residuo en la posición de Kabat 192 es Treonina, T) de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 2
- una región bisagra de tipo nativo de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 6
- un dominio CH2 de tipo nativo de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 7
- un dominio CH3 de tipo nativo del alotipo G1m(3) de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 8.

Por lo tanto, el anticuerpo biespecífico de la invención tiene una cadena pesada continua (701 residuos) de SEQ ID NO: 19

ii) una cadena ligera de trastuzumab de tipo nativo que consiste en SEQ ID NO: 12

iii) una cadena ligera de cetuximab que consiste en SEQ ID NO: 15

Derivados mutados

La invención hace uso de secuencias de tipo nativo (de cetuximab o trastuzumab), o derivados mutados de las mismas.

El término "derivado mutado", "mutante", o "variante funcional" designa una secuencia que difiere de la secuencia original a la que se refiere por delección, sustitución o inserción de uno o varios aminoácidos. Los mutantes muestran al menos un 80%, preferiblemente al menos un 85%, todavía más preferiblemente al menos un 90% de homología de secuencia con la secuencia nativa. En una realización particular, las mutaciones no afectan sustancialmente a la función del anticuerpo.

Los derivados mutados, o variantes funcionales, pueden comprender una cadena VH que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 85 % (por ejemplo, 90 %, 92 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) idéntica a una cualquiera de las secuencias de referencia enumeradas en la presente memoria, una cadena VL que tiene una secuencia de aminoácidos al menos el 85 % (por ejemplo, 90 %, 92 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) idéntica a una cualquiera de las secuencias de referencia enumeradas en la presente memoria, o ambas. Estas variantes son capaces de unirse a EGFR y HER2. En algunos ejemplos, las variantes poseen una afinidad de unión a antígeno similar en relación con los anticuerpos de referencia descritos anteriormente (por ejemplo, que tienen una Kd inferior a 1×10^{-8} , preferiblemente inferior a 1×10^{-9} o 1×10^{-10} M).

La afinidad de la unión se define mediante los términos k_a (constante de velocidad asociada), k_d (constante de velocidad de disociación) o KD (disociación en equilibrio). Por lo general, la unión específica cuando se usa con respecto a un anticuerpo se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a ("reconoce") su(s) objetivo(s) con un valor de afinidad (KD) inferior a 10^{-8} M, por ejemplo, inferior a 10^{-9} M o 10^{-10} M. Un valor de KD más bajo representa una afinidad de unión más alta (es decir, una unión más fuerte), por lo que un valor de KD de 10^{-9} indica una mayor afinidad de unión que un valor de KD de 10^{-8} .

El "porcentaje de identidad" de dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Karlin y Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, 1990, modificado como en Karlin y Altschul. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77, 1993. Dicho algoritmo está incorporado en los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, et al. J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990. Las búsquedas de proteínas BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteína de interés. Cuando existen espacios entre dos secuencias, Gapped BLAST se puede utilizar como se describe en Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402, 1997. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden utilizar los parámetros predeterminados de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST).

En otras realizaciones, las variantes funcionales descritas en la presente memoria pueden contener una o más mutaciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras) que preferiblemente no se producen en los residuos que se prevé que interactúen con una o más de las CDRs.

En la presente memoria se describen derivados mutados, o variantes funcionales, que son sustancialmente idénticos

al anticuerpo de referencia.

El término "sustancialmente idéntico" o "insustancial" significa que las secuencias de aminoácidos relevantes (por ejemplo, en las regiones marco (FRs), CDRs, dominio VH o VL) de una variante difieren de manera insustancial (por ejemplo, incluyendo las sustituciones conservativas de aminoácidos) como en comparación con un anticuerpo de referencia de modo que la variante tenga actividades de unión sustancialmente similares (por ejemplo, afinidad, especificidad o ambas) y bioactividades en relación con el anticuerpo de referencia. Dicha variante puede incluir cambios menores de aminoácidos, por ejemplo, 1 o 2 sustituciones en una secuencia de 5 aminoácidos de una región específica. En general, se pueden realizar más sustituciones en las regiones FR, en contraste con las regiones CDR, siempre que no afecten de manera adversa a la función de unión del anticuerpo (tal como reducir la afinidad de unión en más del 50 % en comparación con el anticuerpo original). En alguna realización, la identidad de secuencia puede ser de aproximadamente el 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o superior, entre el anticuerpo original y el modificado. En algunas realizaciones, el anticuerpo modificado tiene la misma especificidad de unión y tiene al menos el 50 % de la afinidad del anticuerpo original.

Las sustituciones conservativas producirán moléculas que tengan características funcionales y químicas similares a las de la molécula a partir de la cual se realizan dichas modificaciones. Por ejemplo, una "sustitución conservativa de aminoácidos" puede implicar una sustitución de un residuo de aminoácido nativo con otro residuo de manera que haya poco o ningún efecto sobre la polaridad o carga del residuo de aminoácido en esa posición. Las sustituciones de aminoácidos deseadas (ya sean conservativas o no conservativas) pueden ser determinadas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar sustituciones de aminoácidos para identificar residuos importantes de la secuencia de la molécula, o para aumentar o disminuir la afinidad de las moléculas descritas en la presente memoria. Las variantes que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos conservativas se pueden preparar según los métodos para alterar la secuencia polipeptídica conocidos por los expertos en la materia, tal como se encuentran en las referencias que recopilan dichos métodos, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, o Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York. Las sustituciones conservativas de aminoácidos incluyen sustituciones realizadas entre aminoácidos dentro de los siguientes grupos: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; y (g) E, D.

La presente descripción también proporciona variantes de anticuerpos con propiedades biológicas mejoradas del anticuerpo, tal como una afinidad de unión mayor o menor, o con propiedades de ADCC alteradas, o con efectos alterados de inhibición de la viabilidad de células que expresan EGFR y/o HER2.

Las variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se pueden preparar introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo o mediante la síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, delecciones y/o inserciones y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se realiza cualquier combinación de delección, inserción y sustitución para lograr el constructo final, siempre que el constructo final posea las características deseadas. Las moléculas de ácido nucleico que codifican las variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo pueden prepararse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), mutagénesis por PCR y mutagénesis de casete de una variante preparada anteriormente o una versión no variante (natural) del anticuerpo. En una realización, el valor de la constante de disociación en equilibrio (KD) de los anticuerpos de la invención es inferior a 10^{-8} M, particularmente inferior a 10^{-9} M o 10^{-10} M. La afinidad de unión se puede determinar utilizando técnicas conocidas en la técnica, tal como ELISA o análisis de interacción bioespecífica, u otras técnicas conocidas en la técnica.

Cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente memoria puede examinarse para determinar sus propiedades, tal como la actividad de unión a antígeno, la especificidad de unión a antígeno y las funciones biológicas, siguiendo métodos de rutina.

Cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente memoria puede modificarse para que contenga fracciones adicionales no protéicas que se conocen en la técnica y están fácilmente disponibles, por ejemplo, mediante PEGilación, hiperglucosilación, conjugación de toxinas, marcadores radiactivos y similares. Las modificaciones que pueden mejorar la vida media en suero son de interés.

A continuación se describen ejemplos de derivados mutados.

Según la invención, se describen anticuerpos biespecíficos que comprenden

- un dominio constante CH1 mutado (el residuo en la posición de Kabat 192 se ha mutado de treonina a ácido aspártico, D) de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 20
- un dominio constante CH1 mutado (el residuo en la posición de Kabat 192 se ha mutado de treonina a lisina, K de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 21
- un dominio constante CH1 mutado (el residuo en la posición de Kabat 192 se ha mutado de treonina a

arginina, R,) de IgG1 humana correspondiente a SEQ ID NO: 22

- un dominio constante kappa humano mutado (los residuos en las posiciones de Kabat 114 y 137 son alanina (A) y arginina (R), respectivamente) correspondientes a SEQ ID NO: 23
- 5 • un dominio constante kappa humano mutado (los residuos en las posiciones de Kabat 114 y 137 son alanina (A) y ácido glutámico (E), respectivamente) correspondientes a SEQ ID NO: 24
- o un dominio constante kappa humano mutado (los residuos en las posiciones de Kabat 114 y 137 son alanina (A) y ácido aspártico (D), respectivamente) correspondientes a SEQ ID NO: 25.

En otra realización, los residuos en las siguientes posiciones de Kabat se podrían mutar en las secuencias de VH y VL de trastuzumab:

- 10 En la posición 31 de Kabat en VH, Asp a Glu o Ser
- En la posición 32 de Kabat en VH, Thr a Ser, Asn o Tyr
- En la posición 54 de Kabat en VH, Asn a Gin, His, Lys, Arg, Gly o Ser
- En la posición 55 de Kabat en VH, Gly a Pro, Ala y Ser
- En la posición 61 de Kabat en VH, Asp a Glu
- 15 En la posición 62 de Kabat en VH, Ser a Thr
- En la posición 95 de Kabat en VH, Trp a Tyr o Phe
- En la posición 98 de Kabat en VH, Asp a Glu
- En la posición 99 de Kabat en VH, Gly a Pro o Ala
- En la posición 28 de Kabat en VL, Asp a Glu o Gly
- 20 En la posición 29 de Kabat en VL, Val a Ile o Leu
- En la posición 30 de Kabat en VL, Asn a Gin, His, Lys, Arg o Ser
- En la posición 31 de Kabat en VL, Thr a Ser.

- 25 Los anticuerpos de la invención pueden estar glicosilados o no, o pueden mostrar una variedad de perfiles de glicosilación. En una realización preferida, los anticuerpos no están glicosilados en la región variable de las cadenas pesada y ligera, pero están glicosilados en la región Fc.

Por ejemplo, para eliminar el sitio de N-glicosilación en el dominio VH de cetuximab, la Asn en la posición de Kabat H85 se muta a ácido aspártico (D) según la secuencia SEQ ID NO: 26, o la Asn en la posición de Kabat H85 se muta a glutámico ácido (E) según la secuencia SEQ ID NO:27.

- 30 Ciertos derivados mutados pueden usar formas humanizadas del anticuerpo de cetuximab de referencia, que, en su forma original, es un anticuerpo quimérico con regiones variables de cadena ligera y pesada de origen murino. En un enfoque de humanización, las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) y ciertos otros aminoácidos de las regiones variables del ratón donante se injertan en las regiones aceptoras variables humanas y después se unen a las regiones constantes humanas. Véase, por ejemplo, Riechmann et al., Nature 332:323-327 (1988); documento de Patente U.S. Pat. No. 5,225,539.

- 35 En algunos ejemplos, se describen anticuerpos biespecíficos que comprenden
- una versión humanizada de cadena ligera de cetuximab basada en el alelo 02 de la variable kappa 6-11 del gen de la inmunoglobulina humana (IGKV6-11*02) como se define en la base de datos IMGT/Gene,

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTNIHWYQQKPDQSPKLLIKYASESISGVPSRFS
GSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQNNNWPTTFGQGTEKLEIK (SEQ ID NO:30)

Donde en las siguientes posiciones de Kabat los residuos de aminoácidos son:

- 40 Posición de Kabat L31 una Thr o Ser
- Posición de Kabat L32 una Asn o Ser

Posición de Kabat L33 una Ile o Leu

Posición de Kabat L53 un Glu o Gln

Posición de Kabat L89 una Gln o His

Posición de Kabat L91 una Asn, Ser, His, Lys o Arg

5 Posición de Kabat L92 una Asn, Ser, His, Lys o Arg

Posición de Kabat L93 una Asn, Ser, His, Lys o Arg

Posición de Kabat L94 un Trp, Tyr o Phe

Posición de Kabat L96 una Thr o Tyr.

- 10 • una versión humanizada de la cadena ligera de cetuximab basada en el alelo 01 de la variable kappa 3-11 del gen de la inmunoglobulina humana (IGKV3-11*01) como se define en la base de datos IMGT/Gene,

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSIGTNIHWYQQKPGQAPRLLIKYASESISGIPARFSG
SGSGTDFTLTISLPEPDAFVYYCQQNNNWPTTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:31)

Donde en las siguientes posiciones de Kabat los residuos de aminoácidos son:

Posición de Kabat L29 una Ile o Val

Posición de Kabat L30 una Gly o Ser

15 Posición de Kabat L31 una Thr o Ser

Posición de Kabat L32 una Asn o Tyr

Posición de Kabat L33 una Ile o Leu

Posición de Kabat L34 una His o Ala

Posición de Kabat L49 una Lys o Tyr

20 Posición de Kabat L50 una Tyr o Asp

Posición de Kabat L53 un Glu o Asn

Posición de Kabat L54 una Ser o Arg

Posición de Kabat L55 una Ile o Ala

Posición de Kabat L56 una Ser o Thr

25 Posición de Kabat L91 una Asn, Arg, His o Lys

Posición de Kabat L92 una Asn, Ser, His, Lys o Arg

Posición de Kabat L94 un Trp, Tyr o Phe

Posición de Kabat L96 una Thr o Tyr.

- 30 • una versión humanizada de cadena pesada de mAb de cetuximab basada en el alelo 01 de la variable pesada 4-59 del gen de la inmunoglobulina humana (IGHV4-59*01) como se define en la base de datos IMGT/Gene,

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGVHWVRQPPGKGLEWLGVIWSSGNTDYN
TPLTSRLTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARALTYDYEFAYWGQGTLLTVSS
(SEQ ID NO:32)

Donde en las siguientes posiciones de Kabat los residuos de aminoácidos son:

Posición de Kabat H29 una Leu o Ile

Posición de Kabat H30 una Thr o Ser

Posición de Kabat H31 una Asn o Ser

Posición de Kabat H33 una Gly o Tyr

Posición de Kabat H35 una His o Ser

Posición de Kabat H37 una Val o Ile

5 Posición de Kabat H48 una Leu o Ile

Posición de Kabat H50 una Val o Tyr

Posición de Kabat H52 una Trp, Tyr o Phe

Posición de Kabat H53 una Ser o Tyr

Posición de Kabat H54 una Gly o Ser

10 Posición de Kabat H56 una Asn o Ser

Posición de Kabat H58 un Asp o Asn

Posición de Kabat H61 una Thr o Pro

Posición de Kabat H62 una Pro o Ser

Posición de Kabat H64 una Thr o Lys

15 Posición de Kabat H67 una Leu o Val

Posición de Kabat H73 una Asn o Thr

Posición de Kabat H78 una Val o Phe.

- una versión humanizada de cadena pesada de mAb de cetuximab basada en el alelo 01 de la variable pesada 3-33 del gen de la inmunoglobulina humana (IGHV3-33*01) como se define en la base de datos IMGT/Gene,

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAVSGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWLGVIWSSGGNTDY

NTPVTSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARALTYDYEFAYWGQGTLVTVSS

20 (SEQ ID NO:33)

Donde en las siguientes posiciones de Kabat los residuos de aminoácidos son:

Posición de Kabat H28 una Ser o Thr

Posición de Kabat H30 una Thr o Ser

Posición de Kabat H48 una Leu o Val

25 Posición de Kabat H49 una Gly o Ala

Posición de Kabat H53 una Ser o Asp

Posición de Kabat H55 una Gly o Ser

Posición de Kabat H57 una Lys o Thr

Posición de Kabat H58 un Asp o Tyr

30 Posición de Kabat H60 una Asn o Ala

Posición de Kabat H61 una Thr o Asp

Posición de Kabat H62 una Pro o Ser

Posición de Kabat H64 una Thr o Lys

Posición de Kabat H65 una Ser o Gly

35 Posición de Kabat H78 una Val o Leu.

Producción de los anticuerpos

Los ácidos nucleicos que codifican cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos de la invención se insertan en vectores de expresión. Las cadenas ligera y pesada se pueden clonar en los mismos o diferentes vectores de expresión. Los segmentos de DNA que codifican las cadenas de inmunoglobulina se unen operativamente a secuencias de control en los vectores de expresión que aseguran la expresión de polipéptidos de inmunoglobulina. Dichas secuencias de control incluyen una secuencia señal, un promotor, un potenciador y una secuencia de terminación de la transcripción. Los vectores de expresión son típicamente replicables en los organismos huéspedes como episomas o como una parte integral del DNA cromosómico del huésped. Comúnmente, los vectores de expresión contendrán marcadores de selección, por ejemplo, tetraciclina o neomicina, para permitir la detección de aquellas células transformadas con las secuencias de DNA deseadas.

En un ejemplo, se incluyen las secuencias codificantes tanto de cadena pesada como ligera (por ejemplo, secuencias que codifican una VH y una VL, una VH-CH1 y una VL-CL, o una cadena pesada de longitud completa y una cadena ligera de longitud completa) en un vector de expresión. En otro ejemplo, cada una de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo se clona en un vector individual. En el último caso, los vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera se pueden co-transfectar en una célula huésped para la expresión de ambas cadenas, que se pueden ensamblar para formar anticuerpos intactos *in vivo* o *in vitro*. Alternativamente, el vector de expresión que codifica la cadena pesada y aquéllos que codifican las cadenas ligeras pueden introducirse en diferentes células huésped para la expresión de cada una de las cadenas pesada y ligera, que después pueden purificarse y ensamblarse para formar anticuerpos intactos *in vitro*.

En una realización particular, una célula huésped se co-transfecta con tres vectores de expresión independientes, tales como plásmidos, lo que lleva a la coproducción de las tres cadenas (a saber, la cadena pesada HC y dos cadenas ligeras LC1 y LC2, respectivamente) y a la secreción del anticuerpo biespecífico.

Más especialmente, los tres vectores pueden usarse de manera ventajosa en la siguiente proporción molecular de 2:1:1 (HC: LC1: LC2).

Los vectores recombinantes para la expresión de los anticuerpos descritos en la presente memoria normalmente contienen un ácido nucleico que codifica las secuencias de aminoácidos del anticuerpo unidas operativamente a un promotor, ya sea constitutivo o inducible. Los vectores pueden ser adecuados para la replicación e integración en procariotas, eucariotas o ambos. Los vectores típicos contienen terminadores de transcripción y traducción, secuencias de iniciación y promotores útiles para la regulación de la expresión del ácido nucleico que codifica el anticuerpo. Los vectores contienen opcionalmente casetes de expresión genérica que contienen al menos una secuencia terminadora independiente, secuencias que permiten la replicación del casete tanto en eucariotas como en procariotas, es decir, vectores lanzadera y marcadores de selección para sistemas tanto procariotas como eucariotas.

Los anticuerpos biespecíficos como se describe en la presente memoria pueden producirse en sistemas de expresión procarióticos o eucarióticos, tales como bacterias, levaduras, hongos filamentosos, insectos y células de mamíferos. No es necesario que los anticuerpos recombinantes de la invención estén glicosilados o expresados en células eucariotas; sin embargo, generalmente se prefiere la expresión en células de mamífero. Ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son la línea de riñón embrionario humano (293 células), células de riñón de hámster bebé (células BHK), células de ovario de hámster chino/- o + DHFR (CHO, CHO-S, CHO-DG44, Flp-in células CHO), células de riñón de mono verde africano (células VERO) y células hepáticas humanas (células Hep G2).

Se prefiere el cultivo de células de tejido de mamífero para expresar y producir los polipéptidos porque se han desarrollado en la técnica varias líneas de células huésped adecuadas capaces de secretar inmunoglobulinas intactas, e incluyen las líneas de células CHO, varias líneas de células Cos, células HeLa, preferiblemente líneas de células de mieloma, o células B transformadas o hibridomas.

En una realización más preferida, los anticuerpos biespecíficos de la invención se producen utilizando una línea de células CHO, más ventajosamente líneas de células CHO-S o CHO-DG-44 o sus derivados.

Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de la expresión, tal como un origen de replicación, un promotor y un potenciador, y sitios de información de procesamiento necesarios, tal como sitios de unión a ribosomas, sitios de empalme de RNA, sitios de poliadenilación y secuencias de terminación transcripcional. Las secuencias de control de la expresión preferidas son promotores derivados de genes de inmunoglobulina, SV40, adenovirus, virus del papiloma bovino, citomegalovirus y similares.

Los vectores que contienen las secuencias de polinucleótidos de interés (por ejemplo, las secuencias codificantes de cadena pesada y ligera y las secuencias de control de la expresión) pueden transferirse en la célula huésped mediante métodos bien conocidos, que varían dependiendo del tipo de huésped celular. Por ejemplo, se puede usar el tratamiento con fosfato de calcio o la electroporación para otros huéspedes celulares. (Véase, en general, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, 2.^a ed., 1989). Cuando las cadenas pesada y ligera se clonan en vectores de expresión separados, los vectores se co-transfectan para obtener la expresión y el ensamblaje de inmunoglobulinas intactas.

Las células huésped se transforman o transfectan con los vectores (por ejemplo, mediante métodos de transfección química o de electroporación) y se cultivan en medios nutritivos convencionales (o se modifican según corresponda) para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

La expresión de los anticuerpos puede ser transitoria o estable.

- 5 Preferiblemente, los anticuerpos biespecíficos se producen mediante métodos de expresión estable, en los que las líneas celulares transfectadas de forma estable con el DNA que codifica todas las cadenas polipeptídicas de un anticuerpo biespecífico, tal como BiXAb-3486, BiXAb-3489, BiXAb-3732SS y BiXAb-E06528, son capaces de una expresión sostenida, lo que permite la fabricación de productos terapéuticos. Por ejemplo, la expresión estable en una línea de células CHO es particularmente ventajosa.
- 10 Una vez expresados, los anticuerpos completos, sus dímeros, cadenas ligeras y pesadas individuales u otras formas de inmunoglobulina de la presente invención pueden aislarse o purificarse adicionalmente para obtener preparaciones sustancialmente homogéneas para ensayos y aplicaciones adicionales. Pueden usarse métodos estándar de purificación de proteínas conocidos en la técnica. Por ejemplo, los procedimientos de purificación adecuados pueden incluir fraccionamiento en columnas de inmunoafinidad o de intercambio iónico, precipitación con etanol, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), precipitación con sulfato de amonio y filtración en gel (véase, en general, Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., 1982). Se prefieren inmunoglobulinas sustancialmente puras de al menos aproximadamente 90 a 95% de homogeneidad, y son más preferidas de 98 a 99% o mayor homogeneidad, para usos farmacéuticos.

- 20 La producción *in vitro* permite aumentar la escala para proporcionar grandes cantidades de los anticuerpos biespecíficos deseados de la invención. Dichos métodos pueden emplear cultivos de suspensión homogénea, por ejemplo, en un reactor airlift o en un reactor de agitación continua, o cultivo celular inmovilizado o atrapado, por ejemplo, en fibras huecas, microcápsulas, en microperlas de agarosa o cartuchos cerámicos.

Usos terapéuticos

- 25 Se ha demostrado que los anticuerpos biespecíficos de la invención inducen la inhibición del crecimiento tumoral. El anticuerpo biespecífico de la invención es útil como un medicamento, en particular en el tratamiento del cáncer.

El término "cáncer", tal y como se usa en la presente memoria, incluye cualquier cáncer, especialmente cáncer de páncreas y cualquier otro cáncer caracterizado por la expresión o sobreexpresión de EGFR o HER2, y especialmente aquellos cánceres caracterizados por la co-expresión tanto de EGFR como de HER2.

En algunas realizaciones, el cáncer comprende células con un gen KRAS de tipo nativo.

- 30 Ejemplos de cánceres son tumores sólidos tales como cáncer de páncreas, cáncer de cabeza y cuello, incluyendo carcinoma de células escamosas, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de ovario.

- 35 Se describe así un método de tratamiento de un paciente que padece cáncer mediante la administración de un anticuerpo según la invención a dicho paciente que necesita dicho tratamiento. Otro aspecto de la invención es por tanto el uso de los anticuerpos biespecíficos según la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

- 40 Un aspecto de la descripción es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según la invención. Otro aspecto de la descripción es el uso de un anticuerpo según la invención para la fabricación de una composición farmacéutica. Un aspecto adicional de la descripción es un método para la fabricación de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según la invención.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene un anticuerpo como se define en la presente memoria, formulada junto con un vehículo farmacéutico.

- 45 Tal y como se usa en la presente memoria, "vehículo farmacéutico" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares que sean fisiológicamente compatibles. Preferiblemente, el vehículo es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión).

Una composición de la presente invención se puede administrar mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. La vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados.

- 50 Para administrar el anticuerpo biespecífico de la invención mediante determinadas vías de administración, puede ser necesario recubrir el anticuerpo biespecífico de la invención o co-administrar el anticuerpo biespecífico de la invención con un material para evitar su inactivación. Por ejemplo, el anticuerpo biespecífico de la invención se puede administrar a un sujeto en un vehículo apropiado, por ejemplo, liposomas o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones tampón salinas y acuosas. Los vehículos farmacéuticos incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones

inyectables estériles. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica.

- Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos se puede asegurar tanto mediante procedimientos de esterilización como mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como cloruro de sodio en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede producirse mediante la inclusión de agentes que retrasen la absorción.

- Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden variar así como para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, una composición y un modo de administración en particular, sin ser tóxico para el paciente.

- El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente descripción empleadas, la vía de administración, el tiempo de administración, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, la afección, la salud general y el historial médico previo del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, el anticuerpo biespecífico de la invención se puede administrar a una dosis de 0,2-20 mg/kg de 3 veces por semana a 1 vez por mes.

- La presente invención, así descrita en general anteriormente, se entenderá más fácilmente con referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden limitar la presente invención como se define en las reivindicaciones adjuntas. Los ejemplos no pretenden representar que los experimentos a continuación son todos o los únicos experimentos realizados.

Ejemplos

- Ejemplo 1. Preparación de los anticuerpos biespecíficos de la invención BiXAb-3486, BiXAb-3489 y BiXAb-3732SS**

Síntesis de genes

- Las secuencias de aminoácidos de anti-HER2 (trastuzumab, clon humAb4D5-8) ((Carter P., Presta L., Gorman C.M., Ridgway J.B., Henner D., Wong W.L., Rowland A.M., Kotts C., Carver M.E., Shepard H.M. (1992) Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. Proc Natl Acad Sci USA 15, 4285-4289) y anti-EGFR (cetuximab) ((Humblet Y. (2004). Cetuximab: an IgG1 monoclonal antibody for the treatment of epidermal growth factor receptor expressing tumors. Expert Opin Pharmacother 5: 1621-1633.) se usaron para diseñar las secuencias de DNA después de la optimización de codones para la expresión en mamíferos usando el programa GeneScript. Para la cadena pesada, los DNAs que codifican los péptidos señal, la región variable y el dominio CH1 constante de Fab1 siguieron al enlazador de pseudobisagra y la región variable y el dominio CH1 constante de Fab2 con secuencias flanqueantes para la digestión con enzimas de restricción se sintetizaron por GeneScript. Para la cadena ligera, GeneScript sintetizó los DNAs que codifican los péptidos señal y las regiones Kappa variables y constantes.

- Se llevaron a cabo reacciones de PCR usando PfuTurbo Hot Start para amplificar los insertos que fueron digeridos después por NotI + Apal y NotI + HindIII para las cadenas pesada y ligera, respectivamente. Los fragmentos de cadena pesada digeridos doblemente se unieron con el vector de expresión pcDNA3.1 tratado con NotI + Apal (Invitrogen) en el que ya estaban insertados los dominios CH1 + bisagra + CH2 + CH3 de IgG1 humana. Los fragmentos de cadena ligera doblemente digeridos se unieron con el vector de expresión pcDNA3.1 tratado con NotI + HindIII (Invitrogen). Los DNAs plasmídicos se verificaron mediante secuenciación de DNA bicatenario.

Expresión y Purificación de variantes

- Los anticuerpos biespecíficos de la invención (también denominados moléculas "BiXAb") se produjeron mediante expresión génica transitoria mediante cotransfección de 3 genes codificados en vectores separados en una relación molecular 2:1:1 = HC:LC1:LC2 (1 cadena pesada continua (HC) y 2 cadenas ligeras (LC)) en células CHO-S adaptadas a un medio en suspensión sin suero (medio CHO SFM-II de Life Technologies™). Por lo general, para pruebas de expresión a escala media de 50 ml, se mezclaron un total de 50 µg de DNAs plasmídico (25 µg de cadena pesada 1, 12,5 µg de cadena ligera de trastuzumab (anti-HER2) y 12,5 µg de cadena ligera de cetuximab (anti-EGFR) en un Tubo Eppendorf de 1,5 mL, se añadió 1 mL de medio CHO SFM que contenía 25 µL de reactivo de transfección PEI de 3 mg/mL (Polyplus) pH 7,0, se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. La mezcla de DNA-PEI se cargó en 49 mL de células CHO-S de Life Technologies' Invitrogen FreeStyle™ a $1\sim 2 \times 10^6$ /mL en un matraz de agitación de 125 mL. Las células se agitaron durante 6 días más. El sobrenadante se recogió centrifugando las células a 3000 rpm durante 15 min. El título de expresión de los BiXAbs en el sobrenadante se determinó utilizando biosensores de proteína A de FortéBio (Octet® Systems). A continuación, el anticuerpo monoclonal biespecífico (BiXAb) se purificó en un medio de afinidad de proteína A usando MabSelect SuRe (GE Healthcare Life Sciences). El anticuerpo se eluyó de

la proteína A utilizando glicina 0,1 M pH 3,5 con neutralización en TRIS 1 M. El anticuerpo purificado en PBS de Dulbecco (Lonza BE17-512Q) se filtró de forma estéril (filtros estériles de 0,2 µm de Techno Plastic Products AG) y la concentración final se determinó mediante la lectura de la OD a 280 nm con Eppendorf BioSpectrometer®.

Análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida SDS

- 5 El análisis de SDS-PAGE de los anticuerpos BiXAb-3486, BiXAb-3489 y BiXAb-3732SS purificados se realizó utilizando el sistema de electroforesis automatizado Experion™ de BioRad. En presencia de laurilsulfato de sodio (SDS) en el tampón, la velocidad a la que el anticuerpo migra en el gel depende principalmente de su tamaño, lo que permite la determinación del peso molecular.

- 10 El perfil de SDS-PAGE se presenta en la Figura 2A y 2B. Los carriles 1 y 2 de la Figura 2A muestran el perfil obtenido en condiciones no reductoras (izquierda) y reductoras (derecha) para BiXAb-3732SS y BiXAb-3489, respectivamente. La Figura 2B muestra el perfil de SDS-PAGE (reductor y no reductor) para BiXAb-3486.

En condiciones no reductoras, la estructura cuaternaria del anticuerpo se mantiene y la masa molecular observada debería representar la suma de los pesos moleculares de las diferentes cadenas pesadas y ligeras.

- 15 El formato de anticuerpo biespecífico de la invención consiste en seis cadenas: 2 cadenas pesadas y 4 cadenas ligeras. La masa molecular teórica, sin tener en cuenta las modificaciones postraduccionales (PTM), por ejemplo, la N-glicosilación es de 245,50, 245,44 y 245,451 kDa para BiXAb-3486, BiXAb-3489 y BiXAb-3732SS, respectivamente. Los geles no reductores (Figura 2A y 2B) se calibraron usando estándares de masa molecular conocida. Los perfiles obtenidos en el carril 1 y 2 (Figura 2A) y el carril 1 (Figura 2B) muestran una banda ancha principal en y por encima del peso molecular estándar de 260 kDa, que está de acuerdo con el peso molecular calculado de 245 kDa sin PTM.
- 20 BiXAb-3489, BiXAb-3732SS y BiXAb-3486 tienen cuatro sitios de N-glicosilación en sus cadenas pesadas, dos en la región Fc (uno en cada cadena pesada) como se encuentra en todos los anticuerpos monoclonales convencionales en N297, y dos en cada Fabs (uno en cada cadena pesada en la región variable de cetuximab en N88).

En condiciones reductoras, un agente reductor ditioneitol (DTT) desnaturaliza aún más las proteínas BiXAb al reducir los enlaces disulfuro y rompe la estructura cuaternaria de las moléculas BiXAb.

- 25 Las 6 cadenas polipeptídicas migran por separado en el gel según su masa molecular relativa; las dos cadenas pesadas que tienen exactamente la misma masa molecular y los 2 pares de cadenas ligeras de los dominios de Fab de anti-EGFR y anti-HER2.

- 30 Los perfiles obtenidos en gel reducido muestran la presencia de 2 grupos de bandas principales, uno alrededor de 75 kDa y el segundo alrededor de 25 kDa basado en la movilidad de los estándar de peso molecular. Como se discutió en la sección anterior, cada cadena pesada posee 2 sitios de N-glicosilación, lo que explica la amplitud de la banda, marca típica de una proteína glicosilada y su masa molecular aparente, que es superior a la masa calculada.

Aunque las masas moleculares calculadas de las cadenas ligeras de anti-EGFR (23,425 kDa) y anti-HER2 (23,443 kDa) son similares, permiten la separación en el gel probablemente debido a la diferencia en las propiedades hidrodinámicas de cada cadena ligera.

- 35 Todas las moléculas, BiXAb-3486, BiXAb-3489 y BiXAb-3732SS, tienen un buen nivel de expresión (~ 200 mg/L) mediante la expresión transitoria en células CHO. Este nivel de expresión es comparable al nivel de expresión observado con anticuerpos monoclonales convencionales como el de uno de los anticuerpos originales, anti-EGFR.

- 40 En conclusión, el perfil obtenido por el análisis de SDS-PAGE para BiXAb-3486, BiXAb-3489 y BiXAb-3732SS es muy similar y está de acuerdo con los pesos moleculares teóricos calculados. Las diferencias en la masa molecular probablemente se deban a la presencia de PTM, y especialmente a la presencia de 4 sitios de N-glicosilación en dos cadenas pesadas.

Análisis de cromatografía de exclusión por tamaño

- La agregación de proteínas se observa con frecuencia en moléculas de proteínas manipuladas genéticamente. Realizamos una cromatografía de exclusión por tamaño analítica (SEC) para analizar el contenido de especies de alto peso molecular de la preparación de BiXAb-3489 y BiXAb-3732SS purificada por afinidad en una sola etapa.
- 45 Empleamos una columna SEC-s3000 (300x 7,8 mm) (BioSep) y un sistema Aktapurifier 10 (GE Healthcare); el ensayo se realizó a un caudal de 1 mL/min usando tampón PBS pH 7,4. Los cromatogramas de SEC presentados en la Figura 3A y 3B mostraron que el pico principal en ambos cromatogramas correspondía al tamaño esperado de BiXAb-3489 y BiXAb-3732SS monoméricos que representan el 96,4 % y el 97,4 %, respectivamente, del total de muestras.
- 50 Además, se observó un pequeño pico correspondiente a especies de mayor peso molecular (posiblemente dímeros) para BiXAb-3489 y BiXAb-3732SS; este pico representó el 3,6% y el 2,6%, respectivamente, del total de la muestra. Por lo tanto, concluimos que el contenido porcentual de las especies de mayor peso molecular es menor y es similar a los anticuerpos monoclonales convencionales producidos en sistemas de expresión de CHO. La forma estrecha y simétrica del pico monomérico sugirió que tanto BiXAb-3489 como BiXAb-3732SS estaban correctamente ensamblados y representados por una sola especie.
- 55

Ejemplo 2. Preparación del anticuerpo biespecífico de la invención BiXAb-E06528**Síntesis de genes**

Las secuencias de aminoácidos de anti-EGFR (cetuximab) y anti-HER2 (trastuzumab) se utilizaron para diseñar las secuencias de DNA, después de la optimización de codones para la expresión en mamíferos, utilizando el programa

5 GeneScript. Estos anticuerpos se denominan mAbs de anti-EGFR "original" y anti-HER2 "original".

El constructo de DNA de la cadena pesada se diseñó como tal: péptido señal seguido de una secuencia que consiste en la región variable, seguido del dominio CH1 constante de Fab1 (anti-HER2) seguido del enlazador AP, seguido de la región variable, seguido del dominio CH1 constante de Fab2 (anti-EGFR), en el que se introdujo la mutación de Thr a Glu en la posición de Kabat 192; se introdujeron secuencias flanqueantes para la digestión con enzimas de restricción

10 en ambos extremos del constructo de DNA de cadena pesada. El constructo de DNA para la cadena ligera se diseñó como tal: péptido señal, seguido de la región variable, seguido de la región Kappa constante. Para la cadena ligera de anti-EGFR, se introdujeron mutaciones en las posiciones de Kabat 137 (Asn a Lys) y 114 (Ser a Ala) en el dominio Kappa constante. Todos los constructos de DNA fueron sintetizadas por Gene Art.

Se llevaron a cabo reacciones de PCR, utilizando PfuTurbo Hot Start, para amplificar los insertos, que después se digirieron con NotI y Apal, y NotI y HindIII para las cadenas pesada y ligera, respectivamente. Los fragmentos de

15 cadena pesada digeridos doblemente se unieron con el vector de expresión pcDNA3.1 tratado con NotI y Apal (Invitrogen) en el que ya se habían insertado la bisagra de IgG1 humana seguida de los dominios CH2-CH3. Los fragmentos de cadena ligera doblemente digeridos se unieron con el vector de expresión pcDNA3.1 tratado con NotI y HindIII (Invitrogen). Los DNAs plasmídicos se verificaron mediante secuenciación de DNA bicatenario.

20 Expresión y Purificación

El anticuerpo biespecífico BiXAb-E06528 se produjo empleando la expresión génica transitoria mediante co-transfección de 3 genes codificados en vectores separados en una relación molecular 2:1:1 = HC:LC1:LC2 (1 cadena pesada continua (HC) y 2 cadenas ligeras (LC)) en células CHO-S adaptadas a un medio en suspensión sin suero (medio CHO SFM-II, Life Technologies™). Normalmente, para la expresión a escala de 50 mL, se mezclaron un total

25 de 50 µg de DNA plasmídico (25 µg de cadena pesada, 12,5 µg de cadena ligera de anti-HER2 y 12,5 µg de cadena ligera de anti-EGFR) en un tubo Eppendorf de 1,5 mL, después se añadió 1 mL de medio CHO SFM que contenía 25 µL de reactivo de transfección PEI de 3 mg/mL pH 7,0 (Polyplus) y la reacción se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. La mezcla de ADN-PEI se añadió posteriormente a 49 mL de células CHO-S de Invitrogen Freestyle™ de Life Technologies: a $1 \sim 2 \times 10^6$ /mL en un matraz de agitación de 125 mL. Las células se agitaron durante 6 días. El sobrenadante se recogió por centrifugación a 3000 rpm durante 15 min. El título de expresión de BiXAb-E06528 en el sobrenadante se determinó utilizando biosensores de proteína A de ForteBio (Octet® Systems). A continuación, se purificó BiXAb-E06528 en resina de afinidad de proteína A (MabSelect SuRe, GE Healthcare Life Sciences). El anticuerpo se eluyó de la proteína A usando glicina 0,1 M, pH 3,5, y el eluado se neutralizó con TRIS 1 M. El anticuerpo purificado, en PBS de Dulbecco (Lonza), se filtró de forma estéril (filtros estériles de 0,2 µm, Techno Plastic Products

35 AG) y la concentración final se determinó leyendo la densidad óptica (OD) a 280 nm (Eppendorf BioSpectrometer®).

BiXAb-E06528 mostró normalmente un buen título de expresión (> 180 mg/litro) en la expresión transitoria de CHO. Este nivel de expresión es comparable al nivel de expresión observado con los anticuerpos monoclonales convencionales.

Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS

40 Para evaluar la calidad del BiXAb-E06528 purificado, realizamos una SDS-PAGE. En presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS) en el tampón de ejecución, la velocidad a la que un anticuerpo migra en el gel depende principalmente de su tamaño, lo que permite la determinación del peso molecular. Este ensayo se realizó en condiciones no reductoras y en condiciones reductoras; este último permite la ruptura de los enlaces disulfuro y, por lo tanto, la visualización de cadenas polipeptídicas individuales (las cadenas ligeras y la cadena pesada).

45 Los datos de SDS-PAGE se presentan en Figura 2C. En condiciones no reductoras, se mantiene la estructura cuaternaria del anticuerpo y el peso molecular observado debería representar la suma de los pesos moleculares de las diferentes cadenas pesadas y ligeras. El anticuerpo biespecífico de la invención (BiXAb-E06528) consiste en seis cadenas: dos cadenas pesadas y cuatro cadenas ligeras. El peso molecular teórico de BiXAb-E06528 es 245,139 kDa, sin tener en cuenta las modificaciones postraduccionales (PTM), por ejemplo, la N-glicosilación en la Fc en asparagina

50 297. El gel se calibró utilizando una mezcla de estándares de peso molecular conocido. Los datos no reductores muestran una banda principal cercana al peso molecular estándar de 250 kDa, que está de acuerdo con el peso molecular calculado y la glicosilación esperada de dos asparaginas en la posición 297 en el dominio Fc. En condiciones reductoras, el ditiotreitól (DTT) desnatura aún más BiXAb-E06528 al reducir los enlaces disulfuro y romper la estructura cuaternaria y, por lo tanto, las seis cadenas polipeptídicas deberían migrar por separado en el gel según su

55 peso molecular. Las dos cadenas pesadas idénticas de BiXAb-E06528 co-migraron como una sola banda, y los dos pares de cadenas ligeras, debido a su peso molecular casi idéntico, comigraron como la segunda banda. Por lo tanto, los datos muestran dos grupos principales de bandas, a aproximadamente 75 kDa y 25 kDa, basándose en la movilidad de los estándares de peso molecular. Cada cadena pesada poseía un sitio de N-glicosilación en la asparagina 297, lo

que explica la amplitud de la banda de mayor peso molecular y el peso molecular observado ligeramente superior al calculado (75,701 kDa); este ensanchamiento es típico de las proteínas glicosiladas. Aunque los pesos moleculares calculados de las cadenas ligeras de anti-HER2 (23,443 kDa) y anti-EGFR (23,425 kDa) son similares, permiten la separación en el gel probablemente debido a la diferencia en las propiedades hidrodinámicas de cada cadena ligera.

- 5 En conclusión, la SDS-PAGE de BiXAb-E06528 mostró los perfiles esperados, tanto en condiciones no reductoras como reductoras, y estuvo de acuerdo con los pesos moleculares teóricos calculados, al tener en cuenta la existencia de un sitio de N-glicosilación en la cadena pesada.

Análisis de cromatografía de exclusión por tamaño

La agregación de proteínas se observa con frecuencia en moléculas de proteínas manipuladas genéticamente.

- 10 Realizamos una cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) analítica para analizar el contenido de especies de alto peso molecular de la preparación de BiXAb-6567 purificada por afinidad en una sola etapa (véase la expresión y purificación de variantes). Empleamos una columna SEC-s3000 (300x 7,8 mm) (BioSep) y un sistema Akta purifier 10 (GE Healthcare); el ensayo se realizó a un caudal de 1 mL/min usando tampón de PBS pH 7,4.

- 15 El cromatograma SEC presentado en Figura 3C mostró que el pico principal correspondía al tamaño esperado del BiXAb-E06528 monomérico; este pico representó el 99,9% del total de la muestra. Por lo tanto, BiXAb-E06528 no muestra agregados ni especies de mayor peso molecular y podría producirse como un anticuerpo homogéneo después de una cromatografía de afinidad de una sola etapa. La forma estrecha y simétrica del pico monomérico sugirió que BiXAb-E06528 estaba correctamente ensamblado y representado por una sola especie.

Ejemplo 3. Caracterización por Calorimetría Diferencial de Barrido

- 20 Se usó calorimetría diferencial de barrido (DSC) para comparar la estabilidad térmica de BiXAb-3489, el mAb de anti-HER2 original y el mAb de anti-EGFR original. Se usó un sistema Microcal™ VP-Capillary DSC (Malvern Instruments) para realizar experimentos de calorimetría diferencial de barrido.

- 25 Todas las muestras se centrifugaron (20000x g, 5 min, 4°C) y se cuantificó su contenido de proteínas antes del análisis de DSC utilizando un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific) que emplea el programa de análisis de IgG. Para el ensayo, todas las muestras se diluyeron en PBS hasta una concentración final de 1 mg/mL.

- 30 El tiempo de pre-equilibrado fue de 3 min y los termogramas resultantes se adquirieron entre 20 y 110°C a una velocidad de barrido de 60°C/h, un período de filtrado de 25 s y retroalimentación media. Antes del análisis de la muestra, se midieron 5 escaneos de tampón/tampón para estabilizar el instrumento, y se realizó un escaneo de tampón/tampón entre cada escaneo de proteína/tampón. Los datos se ajustaron a un modelo de despliegue sin 2 estados, con la transición previa y posterior ajustada mediante la sustracción de la línea base.

- 35 Las curvas de DSC presentadas en la Figura 4 (que cubre el intervalo de 50 a 100°C) mostraron la manera en que las regiones Fv individuales pueden conducir a diferentes perfiles de despliegue de Fab; este experimento también mostró que las regiones Fv dictan las estabilidades aparentes de las Fabs. El perfil de DSC del mAb de anti-HER2 mostró dos transiciones: un pico pequeño que tiene una Cp max de 27 Kcal/mol/°C y una Tm1 de 70,4°C, correspondiente al despliegue del dominio CH2, y un pico grande que tiene una Cp max de 152 Kcal/mol/°C y una Tm2 de 80,4°C, correspondientes al despliegue de los dominios CH3 y Fab. El perfil de DSC del mAb de anti-EGFR mostró dos transiciones: un pico grande que tiene una Cp max de 95 Kcal/mol/°C y una Tm1 de 71,9 °C, correspondiente al despliegue de los dominios tanto CH2 como Fab, y un pico pequeño que tiene una Cp max de 22 Kcal/mol/°C y una Tm2 de 82,4°C, correspondiente al despliegue del dominio CH3.

- 40 El perfil de DSC de BiXAb-3489 también mostró dos transiciones con dos picos grandes. El primer pico tuvo una Cp max de 70 Kcal/mol/°C y una Tm1 de 71,7°C, y correspondía al despliegue de los dominios CH2 y Fab del mAb de anti-EGFR; el segundo pico tenía una Cp max de 161 Kcal/mol/°C y una Tm2 de 80,9°C, y correspondía al despliegue de los dominios CH3 y Fab del mAb de anti-HER2. Por lo tanto, el perfil de DSC de BiXAb-3489 se parecía a la superposición de los dos perfiles de DSC de los dos mAbs originales y mostraba el excelente ensamblaje y estabilidad de BiXAb-3489. El Tonset de BiXAb-3489 (60,0°C) fue similar al de los mAbs originales (Tonset de anti-HER2 = 63,1°C y Tonset de anti-EGFR = 61,5°C), lo que indica que BiXAb-3489 poseía propiedades de estabilidad similares a las de los anticuerpos originales.

Definiciones:

- 50 Tm o temperatura de desnaturalización/fusión es el punto en el que la concentración de las especies plegadas y desplegadas es igual, y es el punto medio de la transición de despliegue.

Como un parámetro, describe la susceptibilidad de la proteína a la desnaturalización térmica y, por lo tanto, se refiere a la estabilidad de la proteína. Cuanto mayor sea la Tm, más estable será la proteína.

Tonset es la temperatura a la que comienza la transición de despliegue. Los valores para este parámetro son normalmente de 5 a 10°C inferiores a la Tm. También es un parámetro que describe la estabilidad de la proteína, pero

con relevancia a la resistencia a la desnaturalización térmica.

Ejemplo 4. Propiedades de unión sin células

Ensayo ELISA de unión a antígeno dual

- 100 µl de HER2 recombinante humano etiquetado con Fc (Bio-technie), a 2 µg/mL preparado por dilución con 1x PBS
- 5 pH 7,4, se utilizaron para recubrir placas Maxisorp a 4°C durante la noche. Las placas se lavaron 5 veces con 1x PBST y después se bloquearon con 200 µl/pocillo de BSA al 1 % en PBS 1x a temperatura ambiente durante 2 horas. Las placas se lavaron 5 veces con 1x PBST. Se preparó una serie de diluciones triples de ocho puntos en 1x PBS de BiXAb-3486 y BiXAb-3489 (a partir de 2 µg/mL) y se añadieron 100 µL de cada etapa de dilución por pocillo de ensayo. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora y posteriormente se lavaron 5 veces con 1x PBST.
- 10 Se añadieron 100 µL/pocillo de EGFR humano biotinilado de 1 µg/mL (AcroBiosystems) en 1x PBS y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. Después de 5 lavados con 1x PBST, se añadieron 100 µL/pocillo de 0,1 µg/mL de HRP conjugada con estreptavidina (Bio-technie) preparada por dilución con 1x PBS. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. Después de 5 lavados con 1x PBST, se añadieron 100 µL/pocillo de sustrato TMB en 1x PBS para la lectura colorimétrica y las placas se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente para el desarrollo del color. Los datos del ensayo se recogieron empleando un lector de microplacas Victor2 (Perkin Elmer) a 650 nm.

- BiXAb-3486 y BiXAb-3489 mostraron curvas de unión dependientes de la dosis superpuestas en el formato de ELISA dual, lo que sugiere que poseían dominios Fab de anti-HER2 y anti-EGFR ensamblados correctamente (Figura 5). Esto demostró que tanto BiXAb-3486 como BiXAb-3489 son anticuerpos biespecíficos capaces de unirse a HER2 y
- 20 EGFR simultáneamente con EC50 de 100 ng/mL y 106 ng/mL, respectivamente. El anti-HER2 original no mostró unión en este formato de ELISA dual, como se esperaba.

Ejemplo 5. Determinación de parámetros de unión mediante SPR.

- La espectroscopia SPR se realizó en un instrumento T200GxP (Biacore, GE Healthcare). Como tampón de ejecución se utilizó HBS-EP+ pH 7,4 (diluido de 10x HBS-EP+ suministrado por GE Healthcare). Las mediciones se realizaron a
- 25 25°C como lo recomendaba el fabricante. Todos los experimentos se realizaron a un caudal de 30 µL/min. Dado que la captura de proteína A puede conducir a una afinidad de unión de ligando deteriorada en el caso de Trastuzumab, se eligió una captura específica de Fab humano. Por lo tanto, se empleó un chip sensor CM5-S-Series (GE Healthcare) para la captura de anticuerpos usando el Human Fab Capture Kit (GE Healthcare) según las instrucciones del fabricante (Rimmob ~ 10 000 RU) mediante química EDC-NHS usando el Amine Coupling Kit (GE Healthcare). La
- 30 celda de flujo uno (Fc 1) se activó y desactivó para usarse como referencia para la sustracción del blanco. La superficie se regeneró entre los ciclos de medición por pulsación durante 45 segundos con el tampón de regeneración recomendado (glicina-HCl 10 mM, pH 2,1, suministrado dentro del Human Fab Capture Kit). Se utilizaron inyecciones de tampón para la doble referencia.

- Para la determinación de los parámetros de unión de BiXAb-3489 y BiXAb-3732SS, y sus mAbs de anti-EGFR y anti-HER2 originales, a hEGFR (EGR-H5222, Acro Biosystems) y hHER2 (HE2-H5225, Acro Biosystems),
- 35 aproximadamente 100RU de analito (un mAb o un BiXAb) se capturó mediante la inyección de una dilución adecuada de cada molécula respectiva en el tampón de ejecución durante 180 s, seguido de una inyección de hEGFR (20 nM) o hHER2 (20 nM) durante 180 s, seguido de una fase de disociación de 300 s. Las constantes de afinidad se determinaron ajustando los sensogramas resultantes con el software BiacoreEval 3.0 después de realizar una doble
- 40 referencia usando el software de evaluación Biacore T200. Se usó un modelo de unión 1:1 junto con RMax determinado experimentalmente como parámetro fijo para determinar la constante de la tasa de asociación (ka), la constante de tasa de disociación (kd) y la constante de disociación de equilibrio (KD).

- Las constantes de afinidad para la interacción de mAbs de anti-EGFR y anti-HER2 originales y BiXAb-3489 y BiXAb-3732SS con ligandos afines, EGFR y HER2, se determinaron ajustando curvas de concentración únicas usando un
- 45 modelo de interacción 1:1. En general se observaron valores de KD muy similares en el intervalo nanomolar bajo (Tabla 3). Se esperan desviaciones del doble al medir afinidades altas, por lo que las diferencias de hasta el 50 % no deben considerarse relevantes. Es concebible que los Fabs de anti-HER2 en BiXAb-3732SS muestren una kd ligeramente más rápida para la serie "inversa"; sin embargo, esto es inconsistente con el impedimento estérico de los dominios Fab interiores ya que en ese caso kon se habría reducido.

- 50 En conclusión, las propiedades de los dominios Fab de anti-HER2 y anti-EGFR fueron muy similares tanto en BiXAb-3489 como en BiXAb-3732SS, independientemente de si estaban colocados proximales o distales al dominio Fc, y fueron similares a los correspondientes anticuerpos originales (anti-EGFR y anti-HER2). Por lo tanto, la unión de Fab de antígenos afines, EGFR y HER2, en la molécula de BiXAb no se ve impedida estéricamente.

Tabla 3. Parámetros de unión determinados por análisis SPR.

Anticuerpo	Ka 10 ⁵ [M ⁻¹ s ⁻¹]	kd 10 ⁻⁴ [s ⁻¹]	KD [nM]
Anti-EGFR (original)	5,40	16,61	3,08
BiXAb-3489	5,97	14,17	2,37
BiXAb-3732SS	8,45	16,84	1,99
Anti-HER2 (original)	2,02	3,53	1,75
BiXAb-3489	1,88	2,95	1,57
BiXAb-3732SS	1,42	7,76	5,48

Ejemplo 6. Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) con células mononucleares no preactivadas no fraccionadas (MNC)

- 5 Se cultivaron células de cáncer de páncreas BxPC3, carcinoma escamoso de piel A431, células de cáncer de ovario SKOV-3 en medio RPMI 1640-Glutamax-I, suplementado con 100 µg/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y suero fetal de ternera al 10 %.

Para la preparación de MNC se empleó el siguiente procedimiento. La sangre periférica recién extraída se anticoaguló con citrato. Posteriormente, se estratificaron 5 mL de solución de Ficoll-Paque PLUS con 6 mL de sangre total
 10 anticoagulada. Las muestras se centrifugaron durante 20 min a 2500 rpm a temperatura ambiente sin ruptura posterior de la centrifuga. Las MNC se recogieron de la interfaz plasma/Ficoll. La suspensión de células MNC se diluyó 1:10 en PBS y se centrifugó durante 5 minutos a 1800 rpm a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y se lisaron los eritrocitos mediante la adición de 45 mL de agua destilada helada a la suspensión celular durante 30 segundos, después de lo cual se añadieron 5 mL de 10x PBS. Las células se centrifugaron durante 5 min a 1800 rpm a
 15 temperatura ambiente y se lavaron con 1x PBS tres veces para eliminar las plaquetas. Finalmente, las células se resuspendieron en 5 mL de medio de cultivo celular. Los números de células se ajustaron para lograr una relación de células efectoras:células tumorales de 40:1 en los ensayos de ADCC, que correspondía a una relación de células NK:células tumorales de 8:1, cuando se calculaba en base a la fracción de células NK en MNC. Para el ensayo de ADCC de liberación de ⁵¹cromo, 1×10⁶ células objetivo (BxPC-3, A541, A431) se incubaron con 100 µCi de cromo 51 en 200 µL de PBS durante 2 horas a 37°C y CO₂ al 5 %. Después de 2 horas de incubación, las células se lavaron tres
 20 veces con 7 mL de medio y finalmente se resuspendieron a una concentración de 0,1 × 10⁶ células/mL. Se incubaron células objetivo (5000 células/pocillo) y MNC en presencia de anticuerpos en una placa de microtitulación de 96 pocillos (200 µL de volumen de ensayo) durante 4 horas a 37°C y CO₂ al 5 %. Para la determinación de la lisis máxima de células objetivo (= cpm máxima) se añadió Triton X-100. Para determinar la liberación de ⁵¹cromo basal (= cpm basal) las células objetivo no se manipularon más. Después de 4 h de incubación, las placas de microtitulación se
 25 centrifugaron durante 5 min a 2000 rpm y se mezclaron 25 µL de sobrenadante con 125 µL de Optiphase Supermix (Perkin Elmer) y se incubaron en una incubadora con agitación durante 1 min. Las muestras se analizaron en un instrumento de contador beta MicroBeta TriLux (Perkin Elmer). La lisis de células objetivo se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$30 \quad \text{Lisis (\%)} = (\text{cpm experimental} - \text{cpm basal}) / (\text{cpm máxima} - \text{cpm basal}) \times 100$$

Todas las mediciones se realizaron por triplicado. Los ensayos de ADCC se realizaron empleando MNC no preactivadas como células efectoras.

En la Figura 6A se presenta el ensayo de ADCC con BiXAb-3486, BiXAb-3489, BiXAb-3732SS y BiXAb-E06528 en células BxPC-3. Se observó una potente citotoxicidad para BiXAb-E06528 (EC₅₀=1,8 nM) y BiXAb-3489 (EC₅₀=2,2
 35 nM), que fue similar a la de la combinación de ambos anticuerpos originales, anti-EGFR+anti-HER2 (EC₅₀=1,5 nM); la lisis máxima fue casi idéntica para los tres grupos de anticuerpos ~ 20%. BiXAb-3486 mostró una potencia de destrucción similar (EC₅₀ = 2,0 nM), aunque con una lisis total muy reducida de <10 %. BiXAb-3732SS casi no mostró lisis, similar a la del anticuerpo anti-EGFR original. El anticuerpo anti-EGFR original mostró una potencia alta (EC₅₀ = 0,8 nM), sin embargo, la lisis total se redujo (15 %) en relación con BiXAb-E06528, BiXAb-3489 y la combinación de
 40 ambos anticuerpos originales, anti-EGFR+anti-HER2. De manera similar, BiXAb-E06528 (EC₅₀ = 0,12 nM) y BiXAb-3489 (EC₅₀ = 0,12 nM) mostraron una lisis máxima similar y una potencia muy alta contra las células A431 como la combinación de anti-EGFR+anti-HER2 originales (EC₅₀ = 0,09 nM) y anti-EGFR solo (EC₅₀=0,05 nM) (Figura 6B). BiXAb-3486 y BiXAb-3732SS mostraron nuevamente una potencia reducida (EC₅₀ = 0,26 nM y EC₅₀ = 0,24 nM, respectivamente) y una lisis máxima reducida. El ADCC en células SKOV-3 mostró que BiXAb-E06528 (EC₅₀ = 0,87
 45 nM) y BiXAb-3489 (EC₅₀ = 0,87 nM) y la combinación de anti-EGFR+anti-HER2 originales (EC₅₀ = 0,83 nM) y anti-HER2 (EC₅₀ = 1,2 nM) mataban potentemente las células cancerosas (Figura 6C), sin embargo, la lisis máxima de ambas moléculas de BiXAb se redujo ligeramente en relación con la combinación o el anti-HER2 solo. BiXAb-3486 y

BiXAb-3732SS mostraron una potencia citotóxica ligeramente reducida ($EC_{50} = 1,2 \text{ nM}$ y $EC_{50} = 2,1 \text{ nM}$) y lisis máxima. En conclusión, todos los BiXAb mostraron actividad citotóxica contra varios tipos diferentes de células cancerosas de EGFR+/HER2+, y BiXAb-E06528 y BiXAb-3489 mostraron la potencia citotóxica más alta y la lisis máxima contra estas líneas de células cancerosas.

5 Ejemplo 7. Evaluación de los efectos sobre la viabilidad de las líneas de células cancerosas.

Las líneas celulares de carcinoma gástrico humano NCI-N87 y carcinoma de células escamosas de lengua humana CAL27 se cultivaron como monocapa a 37°C en una atmósfera humidificada (CO₂ al 5 %, 95 % de aire) en sus medios de cultivo (RPMI1640+10 % de FBS y DMEM+10 % de FBS, respectivamente). Para uso experimental, las células tumorales se separaron del matraz de cultivo mediante un tratamiento de 5 minutos con tripsina-verseno y se neutralizaron mediante la adición de medio de cultivo completo. Las células se contaron en un hemocitómetro (portaobjetos KOVA) siguiendo las instrucciones del proveedor y se evaluó su viabilidad mediante exclusión con azul de tripano al 0,25%.

Para evaluar los efectos de los anticuerpos sobre la viabilidad de las líneas de células cancerosas, se utilizó una densidad de línea celular óptima de 111000 células/mL en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos. Se incubaron a 37°C durante 24 horas antes del tratamiento en medio RPMI 1640 sin fármaco suplementado con FBS al 10 %. Los volúmenes para la siembra fueron de 90 µL. Los compuestos se probaron por triplicado en un experimento independiente.

Al comienzo del tratamiento, se añadió a los pocillos un volumen de 10 µL de las diluciones de la sustancia de prueba y de control para alcanzar las siguientes concentraciones finales:

- 20 • Para las sustancias de prueba y de control, las concentraciones fueron iguales a 190; 100; 50; 25 y 10 µg/mL
- Para la combinación de anticuerpos anti-HER2+anti-EGFR, las concentraciones tanto de anti-EGFR como de anti-HER2 fueron iguales a 140; 100; 50; 25 y 10 µg/mL.

Las células se incubaron por triplicado durante 96 horas en un volumen final de 100 µL de medio de cultivo que contenía sustancias de prueba a 37°C bajo CO₂ al 5%.

25 El efecto de los compuestos sobre la viabilidad de las células cancerosas se reveló mediante el kit de ensayo luminiscente CellTiter-Glo (Promega) según las instrucciones del fabricante después de 96 horas de incubación del compuesto. Brevemente, se prepararon 100 µL de reactivo CellTiter Glo y se añadieron en cada pocillo. Después, las placas se agitaron para inducir la lisis celular antes de registrar la luminiscencia.

La inhibición de la respuesta a la dosis de la supervivencia (IC) se expresó de la siguiente manera:

$$30 \quad IC = 100 \times (OD_{\text{pocillos expuestos a fármacos}} / OD_{\text{pocillos expuestos al vehículo}})$$

Los valores de OD fueron la media de 3 mediciones experimentales.

BiXAb-E06528 y BiXAb-3489 inhibieron potentemente la viabilidad de NCI-N87 con IC₅₀ de 102,6 µg/mL y 50,2 µg/mL, respectivamente. La combinación de anticuerpos anti-EGFR+anti-HER2 no alcanzó el nivel de inhibición de viabilidad del 50 % y se estimó que la IC₅₀ era >140 µg/mL. Las preparaciones individuales de anti-EGFR o anti-HER2 originales fueron mínimamente activas en el intervalo de concentración probado y tampoco alcanzaron el nivel de inhibición de viabilidad del 50 %; por lo tanto, ambas IC₅₀ se estimaron que eran >190 µg/mL.

CAL27 también fue inhibido eficientemente por BiXAb-E06528 y BiXAb-3489, que inhibieron su viabilidad a la concentración más baja en ~ 60% y, por lo tanto, se estimó que la IC₅₀ para ambas moléculas era <10 µg/mL. La combinación de dos anticuerpos originales, anti-EGFR+anti-HER2, inhibieron la viabilidad con IC₅₀ = 10,5 µg/mL. La preparación individual de mAb de anti-EGFR original mostró un grado de inhibición mucho menor con IC₅₀ = 93,1 µg/mL; la preparación individual de mAb de anti-HER2 original no demostró inhibición en el intervalo de concentraciones probado.

45 En conclusión, tanto BiXAb-E06528 como BiXAb-3489 mostraron una potente inhibición de la viabilidad de los carcinomas gástrico y de células escamosas de lengua, que fue más potente que la de cualquiera de los dos anticuerpos originales o su combinación.

Ejemplo 8: Evaluación de las propiedades biológicas de los anticuerpos de la invención

Los anticuerpos tetravalentes biespecíficos originales de la invención, que se dirigen simultáneamente al receptor de EGFR y HER2 de forma original, se evaluaron en ratones portadores del tumor pancreático BxPC-3 y se compararon con la combinación de anticuerpos de anti-EGFR y anti-HER2 originales.

50 Los anticuerpos tetravalentes biespecíficos de la invención BiXAb-3486 y BiXAb-3489 se usaron para los ensayos.

Programa de tratamiento

La línea de células BxPC-3 se obtuvo de la ATCC (Rockville, MD) y se cultivó en RPMI 1640 que contenía suero de ternero fetal al 10 %, 50 U/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomycin.

- 5 Todos los experimentos *in vivo* se realizaron de conformidad con las normas y directrices éticas francesas para estudios con animales de experimentación en un establecimiento acreditado.

Ratones nude atímicos hembra, obtenidos de Harlan (Le Malcourlet, France) se inyectaron por vía subcutánea en el flanco derecho con células BxPC-3 ($3,5 \times 10^6$).

- 10 Después, se distribuyeron los tumores en crecimiento detectables que portaban tumores en varios grupos. Los animales se trataron con inyecciones intraperitoneales (ip) según los siguientes programas después de que los tumores alcanzaran el volumen predefinido de 100 mm³:

- Los ratones de control recibieron un anticuerpo irrelevante desde el día en que los animales se aleatorizaron y se inscribieron en 6 cohortes (día 0), dos veces por semana, hasta el día 28.
- Los ratones C+T recibieron los anticuerpos anti-EGFR + anti-HER2, cada uno a 2 mg/kg desde el día 0, dos veces por semana, hasta el día 28.
- 15 • Los ratones BiXAb recibieron los anticuerpos biespecíficos según los siguientes protocolos:
 - BiXAb-3486 a 2 mg/kg desde el día 0, dos veces por semana hasta el día 28
 - BiXAb-3486 a 10 mg/kg desde el día 0, dos veces por semana hasta el día 28
 - BiXAb-3489 a 2 mg/kg desde el día 0, dos veces por semana hasta el día 28
 - BiXAb-3489 a 10 mg/kg desde el día 0, dos veces por semana hasta el día 28

20 Criterios para evaluar la actividad antitumoral

La seguridad (peso corporal, supervivencia, signos clínicos y comportamiento) y el crecimiento tumoral como un biomarcador para la eficacia se tomaron como puntos finales principales para el seguimiento y se registraron para todos los ratones dos veces por semana durante el transcurso del experimento. Los gráficos y análisis se realizaron con el software Newlab Oncology.

25 Volumen tumoral

Las dimensiones del tumor se midieron con un calibrador y el volumen se calculó mediante la fórmula $D_1 \times D_2 \times D_3/2$, y se evaluaron varios puntos finales para evaluar la eficacia de los tratamientos.

Inhibición del crecimiento tumoral

- 30 La inhibición del crecimiento tumoral (T/C %), definida como la relación del volumen tumoral medio para el grupo tratado frente al grupo de control, se calculó como $T/C \% = [(volumen\ tumoral\ medio\ del\ grupo\ tratado\ en\ el\ día\ X)/(volumen\ tumoral\ medio\ del\ grupo\ de\ control\ en\ el\ día\ X)] \times 100$. El valor óptimo es la relación mínima T/C % que refleja la inhibición máxima del crecimiento tumoral lograda.

- Los criterios efectivos para la relación T/C % según el estándar del National Cancer Institute (Bissery MC and Chabot GG History and new development of screening and evaluation methods of anticancer drugs used in vivo and in vitro. 35 1991. Bull Cancer 78: 587-602) es <42%. T/C <10% se considera actividad muy alta que amerita estudio clínico (B. A. Teicher. Tumor models in cancer research. Science & Business media 2010).

En este experimento se evaluó T/C a lo largo del experimento, desde el día 1 hasta el día 49.

ΔT/ΔC

- 40 Los cambios desde la línea base del volumen tumoral en los grupos tratados y de control se usaron para calcular la media en los grupos tratados (ΔT) y control (ΔC). T/C (%) es la relación de la media en cualquier día elegido.

Cuando los valores de ΔT/ΔC son negativos, indica regresiones de tumores.

Regresión parcial, regresión completa y sobrevivientes sin tumor

- 45 La regresión parcial (PR) se definió como una disminución en el volumen del tumor $\geq 50\%$, cualquiera que sea el día de la evaluación. La regresión completa (CR) se define como una disminución del volumen tumoral por debajo del límite de palpación ($T=30\text{ mm}^3$), cualquiera que sea el día de la evaluación. Al final del estudio (día 105), se determinó el número de sobrevivientes sin tumor (TFS), que corresponden a ratones sin ningún tumor palpable (Vrignaud P,

Sémiond D, Lejeune P, Bouchard H, Calvet L, Combeau C, Riou JF, Commerçon A, Lavelle F, Bissery MC. Preclinical antitumor activity of cabazitaxel, a semisynthetic taxane active in taxane-resistant tumors. Clin Cancer Res. 2013; 19 (11):2973-83).

Logaritmo de muerte celular (LCK)

- 5 El logaritmo de muerte celular bruto se calculó utilizando la fórmula $(T-C)/(3,32 \times T_d)$. En esta fórmula, el retraso del crecimiento tumoral (T-C) se definió como la diferencia entre los tumores en los grupos T y C en la media de tiempo (días) para alcanzar un volumen predeterminado (750-1000 mm³).

- El tiempo de duplicación del tumor (Td) se estimó en el grupo de control, donde el logaritmo del volumen tumoral en función del día (en la fase de crecimiento exponencial, es decir, en el intervalo de 100 a 1000 mm³) sigue un modelo lineal con pendiente "a", como $T_d = \log 2/a$.

Utilizando estos criterios, la actividad antitumoral se define como un valor logarítmico de muerte celular $> 0,7$.

Se utilizó la puntuación del Southern Research Institute (Birmingham, AL, USA) para categorizar la actividad antitumoral basado en los valores logarítmicos de muerte celular de la siguiente manera: $<0,7 = -$ (inactivo); $0,7-1,2 = +$; $1,3-1,9 = ++$; $2,0-2,8 = +++$; $>2,8 = ++++$ (muy activo) (Schabel FM, Griswold DP, Laster WR, Corbett TH, Lloyd HH.

- 15 Quantitative evaluation of anticancer agent activity in experimental animals. Pharmacol. Ther 1977; 1:411 - 35).

También se evaluó el LCK neto según la siguiente fórmula: $n-LCK = [(T-C) - \text{duración del período de tratamiento}]/(3,32 \times T_d)$. Si los valores de n-LCK-neto son positivos, hay menos células presentes al final de la terapia que al principio. Si, por el contrario, el valor es negativo, el tumor crece bajo tratamiento.

Media de supervivencia y beneficio terapéutico

- 20 Los resultados también se expresaron mediante una curva de supervivencia de Kaplan-Meier adaptada, utilizando el tiempo que tarda el tumor en alcanzar un volumen determinado de 2000 mm³. Una retraso medio se definió como el tiempo en el que el 50% de los ratones tenían un tumor que alcanzaba el volumen determinado.

Prueba en U de Mann-Whitney

- La prueba de Mann-Whitney es una prueba no paramétrica que permite comparar dos grupos o afecciones o tratamientos sin asumir que los valores se distribuyen normalmente. En medicina, se utiliza para determinar el efecto de dos medicamentos y si son iguales o no. La prueba en U de Mann-Whitney se ha evaluado con el software Newlab Oncology® (NewLab, 11 rue d'Amsterdam 54500 Vandœuvre-Lès-Nancy FRANCE).

Toxicidad de fármacos

- 30 También se determinaron las muertes relacionadas tanto con los fármacos como con el porcentaje máximo relativo de pérdida de peso corporal neto medio. Se consideró que un nadir de pérdida de peso corporal (media del grupo) $> 20\%$ o 10% de muerte por fármaco indicaba una dosis tóxica excesiva.

- Ya se observó que el tumor de páncreas BxPC-3 expresaba un alto nivel de receptores de EGFR y, en este tumor, se observó que el Cetuximab de Ab monoclonal anti-EGFR era significativamente activo. Por el contrario, este tumor expresa niveles muy bajos de Her2 (Larbouret C, et al. In pancreatic carcinoma, dual EGFR/HER2 targeting with cetuximab/trastuzumab is more effective than treatment with trastuzumab/erlotinib or lapatinib alone: implication of receptors' down-regulation and dimers' disruption. Neoplasia. 2012 Feb; 14(2): 121-130) y como consecuencia, el anticuerpo monoclonal anti HER2 Trastuzumab, no fue significativamente activo.

Curiosamente, la combinación de ambos Abs crea una actividad significativamente mayor que la detectada con cetuximab.

- 40 En este experimento se comparó la actividad de los anticuerpos tetravalentes biespecíficos de la invención, BiXAb-3486 y BiXAb-3489, con la combinación de anticuerpos anti-EGFR y anti-HER2 originales en ratones portadores del tumor BxPC-3 y no se detectó efecto tóxico a lo largo del estudio.

- Los ratones portadores de células BxPC-3 se trataron dos veces por semana con anticuerpos de anti-EGFR y anti-HER2 IP, desde el día 0, el día de la aleatorización, hasta el día 28 para cada anticuerpo a 2 mg/kg/inyección. Se eligió una dosis de 2 mg/kg en base a experimentos previos. Los dos anticuerpos biespecíficos de la invención también se administraron bajo el mismo programa de tratamiento a 2 o a 10 mg/kg/inyección (Figura 7a).

- Los tumores crecieron en los ratones tratados con vehículo con un tiempo de duplicación de 9 días y alcanzaron un valor medio de 1859 ± 459 mm³ el día 28, último día de tratamiento. Ese día, el volumen medio del tumor fue de 634 mm³ para el grupo de ratones tratados con la combinación de anticuerpos anti-EGFR y anti-HER2 a dosis de 2 mg/kg. Para los grupos tratados con BiXAb-3486 a 2 o 10 mg/kg, los volúmenes medios de los tumores fueron solo de 214 mm³ y 111 mm³, y 223 mm³ y 200 mm³ para los grupos tratados con BiXAb-3489 a 2 o 10 mg/kg.

Las evaluaciones de T/C y $\Delta T/\Delta C$ (Figura 7b) indican que:

- Todos los tratamientos fueron activos con T/C < 42% según los criterios del NCI.
- Solo los grupos de ratones tratados con BiXAb-3486 o BiXAb-3489 mostraron una actividad muy alta (T/C < 10 %), mientras que los ratones tratados con anticuerpos anti-EGFR y anti-HER2 experimentaron una actividad moderada.

- 5 • La actividad muy alta se mantiene después del final del tratamiento (después del día 28)

Las regresiones parciales o totales (definidas como una disminución en el volumen tumoral $\geq 50\%$ o disminución del volumen tumoral por debajo del límite de palpación) y las curaciones se controlaron durante todo el experimento (Tabla 4). Un total de 6/10 y 3/10 animales experimentaron respectivamente regresiones completas y curaciones en el grupo de ratones tratados con BiXAb-3486 a 10 mg/kg, lo que indica una potente actividad.

10

Tabla 4: Regresiones y curaciones

Grupos	regresiones parciales	Regresiones completas	Regresiones totales (%)	Supervivientes sin tumor el día 1010
BiXAb-3486 a 2 mg/kg	2/10	3/10	50%	0/10
BiXAb-3486 a 10 mg/kg	2/10	6/10	80%	3/10
BiXAb-3489 a 2 mg/kg	1/9	3/9	44%	0/10
BiXAb-3489 a 10 mg/kg	2/9	3/9	56%	0/10
anticuerpos anti-EGFR + anti-HER2 a 2mg/Kg	0/9	0/9	0%	0/9
Control	0/8	0/8	0%	0/8

El crecimiento exponencial y su concepto asociado del tiempo de duplicación son clínicamente relevantes (Frei E III. Models and the clinical dilemma. In: Fidler IJ, White RJ, editors. Design of models for testing therapeutic agents. New York: Van Nostrand Reinhold; 1982. p. 248-59). Los diferentes tipos histológicos de cáncer muestran una gran variedad de tiempos de duplicación dentro del intervalo observable de tamaños tumorales (Shackney SE, McCormack GW, Guchural GJ Jr. Growth rate patterns of solid tumors and their relation to responsiveness to therapy. An analytical review. Ann Intern Med. 1978;89:107).

15

Los cánceres humanos con mayor respuesta terapéutica, tal como el cáncer de testículo y el coriocarcinoma, tienden a tener tiempos de duplicación de < 1 mes. Los cánceres con menos respuesta, tal como el cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, parecen duplicarse en aproximadamente 2 meses. Los cánceres relativamente sin respuesta, tal como el adenocarcinoma de colon, tienden a duplicarse cada 3 meses. Claramente, esta observación clínica puede relacionarse con la mayor quimiosensibilidad de las células en proliferación (véase más abajo), es decir, si un tumor tiene una fracción alta de células en división, tenderá a crecer más rápido y también tenderá a responder mejor a los fármacos que matan las células en división. Alternativamente, los tumores con una tasa más alta de pérdida de células tienden a tener una tasa de crecimiento relativamente más lenta y también una tasa más alta de mutaciones hacia la resistencia a los fármacos.

20

El modelo logarítmico de muerte celular propone que los fármacos anticancerosos actúan con una cinética de primer orden y, por tanto, suponiendo una sensibilidad homogénea al fármaco, eliminarán una proporción constante en lugar de un número constante de células tumorales, independientemente del tamaño inicial del tumor. En otras palabras, si un tratamiento con fármaco reduce 10^6 células a 10^5 , la misma terapia reduciría 10^4 células a 10^3 .

30

En el experimento observamos que el tiempo de duplicación de los tumores en el grupo de control fue de 7 días (Figura 7a).

Según el cálculo del logaritmo de muerte celular bruto $[(T-C)/(3,32 \times T_d)]$ y el cálculo del logaritmo de muerte celular neto $[(T-C) - \text{duración del período de tratamiento}]/(3,32 \times T_d)$ (Tabla 5), parece que la combinación de anticuerpos anti-EGFR y anti-HER2 globalmente no era activa y que los tumores crecían bajo tratamiento.

35

Por el contrario, los ratones tratados con BiXAb-3486 o BiXAb-3489 experimentaron una actividad significativa (++ o +++) y hasta 2 log (99%) de la masa tumoral inicial fueron eliminados por los compuestos BiXAb. El cálculo del logaritmo de muerte celular neto, que es positivo, indica que los tratamientos con compuestos BiXAb fueron eficaces y que hay menos células tumorales al final del tratamiento (día 28) en comparación con antes del tratamiento (día 0).

40

Tabla 5: Evaluación del logaritmo de la muerte celular bruto y neto

Tratamientos	Dosificación (mg/kg/inyección)	Logaritmo de la muerte celular bruto	Logaritmo de la muerte celular neto	Actividad antitumoral	Comentarios generales	
Control						
C+T		0,7	<0	+	actividad modesta	Crecimiento bajo tratamiento
BiXAb-3486	2	1,32	0,13	++	compuestos activos	
	10	2,00	0,77	+++		
BiXAb-3489	2	1,33	0,13	++		
	10	1,55	0,34	++		

La supervivencia media, los días posteriores al injerto, cuando el 50% de los ratones poseen tumores con el volumen de 2000 mm³ y beneficio terapéutico (media de los grupos tratados - media del grupo control) (Figura 7C y 7D), indican una clara ventaja terapéutica de la terapia con BiXAb en relación con la terapia con la combinación de dos anticuerpos monoclonales.

Finalmente, se realizó un ensayo de la prueba en U de Mann Whitney para comparar los cuatro grupos de animales tratados con los compuestos BiXAb con el grupo tratado con la combinación de anticuerpos anti-EGFR y anti-HER2 (Tabla 6).

Tabla 6: Prueba en U de Mann-Whitney (grupos BiXAb vs. grupo anti-EGFR + anti-HER2)

Grupos Vs anti-EGFR + anti-HER2 (valor de <i>p</i> de la prueba en U de Mann-Whitney)									
Días	1	7	10	14	21	28	35	42	49
BiXAb-3486 a 2 mg/kg	0,5	0,1844	0,2838	0,035	0,0045	0,0057	0,0035	0,0137	0,0362
BiXAb-3486 a 10 mg/kg	0,4191	0,0826	0,0652	0,0035	0,0009	0,001	0,003	0,001	0,005
BiXAb-3489 a 2 mg/kg	0,4299	0,4475	0,2829	0,0425	0,0121	0,0122	0,0096	0,019	0,0153
BiXAb-3489 a 10 mg/kg	0,3619	0,4824	0,3619	0,0425	0,019	0,0153	0,0005	0,0002	0,005
Período de tratamiento									

Una vez más, parece claro que los grupos tratados con los compuestos BiXAb experimentaron una mayor actividad que el grupo tratado con la combinación de anticuerpos anti-EGFR y anti-HER2. Esta diferencia también fue observable 21 días después del final de los tratamientos.

- 15 De hecho, se utilizaron varios puntos finales que se utilizan clásicamente para la evaluación antitumoral de compuestos citotóxicos. Parecía que los dos anticuerpos biespecíficos de la invención son más potentes que la combinación de los anticuerpos anti-EGFR y anti-HER2.

1) T/C <10% solo se obtiene con los dos anticuerpos biespecíficos de la invención un parámetro que es requerido por el NCI para la clasificación en compuestos altamente activos, que amerita un estudio clínico;

- 20 2) Los parámetros del logaritmo de muerte celular (Bruto y Neto) y sus traducciones en índice de actividad también confirman que los dos anticuerpos biespecíficos de la invención fueron más activos que la combinación de anticuerpos anti-EGFR y anti-HER2;

3) La regresión, que es el sello distintivo de la potente actividad, solo se observó en los grupos tratados con los dos anticuerpos biespecíficos de la invención.

- 25 Conclusión: En los Ejemplos 6 y 7 evaluamos los mecanismos de acción individuales (MOA) que se asocian frecuentemente con la actividad terapéutica de los anticuerpos. En el Ejemplo 6, probamos la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) en tres líneas celulares diferentes. Las dos moléculas de BiXAb, BiXAb-E06528 y BiXAb-3489, mostraron una citotoxicidad mediada por las células similar a la de la combinación de los dos anticuerpos originales, anti-EGFR+anti-HER2. Cierta variabilidad observada en los ensayos puede deberse a la diferente relación de EGFR/HER2 en las células cancerosas objetivo. En el Ejemplo 7, probamos los efectos "directos" de los anticuerpos, es decir, su capacidad para bloquear la señalización pro-proliferativa a través de EGFR, HER2 y heterodímeros asociados con estos receptores, lo que tiene el efecto de reducir la viabilidad de las líneas de células cancerosas. Estos experimentos demostraron que BiXAb-E06528 y BiXAb-3489 muestran una actividad

antiproliferativa sustancialmente mayor que la asociada con cada uno de los anticuerpos originales individualmente (anti-EGFR, anti-HER2) o su combinación (anti-EGFR+anti-HER2). Esto significa que ambos BiXAbs muestran una capacidad mucho más fuerte para inhibir la proliferación y el crecimiento que la asociada con los anticuerpos originales. En el Ejemplo 8, probamos BiXAb-3489 y BiXAb-3486 *in vivo* en un modelo de xenoinjerto de cáncer de páncreas.

- 5 Este modelo mostró un aumento sorprendente en la inhibición del crecimiento tumoral asociado con los BiXAbs en comparación con la combinación de los 2 anticuerpos originales.

En el modelo *in vivo* fuimos capaces de evaluar la suma de todos los MOA que son relevantes para la actividad de un fármaco; en este caso, esto significa que tanto la citotoxicidad mediada por células inmunitarias como el efecto directo de la inhibición de la proliferación están contribuyendo al resultado del modelo de xenoinjerto. Los anticuerpos

- 10 biespecíficos de la invención mostraron potencia, que rara vez se observa con tumores de páncreas.

Dado que el modelo *in vivo* reflejó una actividad sustancialmente mejorada de BiXAbs en relación con la combinación de ambos anticuerpos originales, concluimos que la inhibición directa de la señalización pro-proliferativa en tumores proporciona una contribución importante a la actividad de los BiXAbs al inhibir el crecimiento de tumores y extender la supervivencia de los animales (Ejemplo 8).

15

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo biespecífico que comprende dos cadenas pesadas y cuatro cadenas ligeras,
 en donde cada cadena pesada comprende
 - a. una región Fc de una inmunoglobulina que comprende los dominios bisagra-CH2-CH3,
 - 5 b. cuya región Fc está unida a la cadena pesada de Fab CH1-VH del anticuerpo 1 (Ab1) por dicho dominio bisagra,
 - c. que a su vez está unido a la cadena pesada de Fab CH1-VH del anticuerpo 2 (Ab2), mediante una secuencia del enlazador polipeptídico, en la que el extremo N-terminal de cada brazo de la cadena pesada de Fab de Ab1 está unido mediante un enlazador polipeptídico al extremo C-terminal de CH1-VH de Ab2,
- 10 y las cuatro cadenas ligeras comprenden cadenas ligeras de Fab de Ab1 y cadenas ligeras de Fab de Ab2 asociadas con sus dominios de cadena pesada afines;
 en donde Ab1 y Ab2, siendo diferentes, se seleccionan independientemente del grupo que consiste en cetuximab o un derivado mutado del mismo, por un lado, y trastuzumab, o un derivado mutado del mismo, por otro lado, en donde el derivado mutado comprende una cadena VH que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos un 80 % a la secuencia de cetuximab o trastuzumab, respectivamente, y una cadena VL que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos un 80 % a cetuximab o trastuzumab, respectivamente, y es capaz de unirse a EGFR y HER2, respectivamente.
- 15 2. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 1, en el que Ab1 o Ab2 es cetuximab o un derivado mutado del mismo, que comprende
 - 20 • un dominio VH que comprende, preferiblemente que consiste en, SEQ ID NO: 4,
 - un dominio CH1 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22,
 - un dominio VL que comprende, preferiblemente que consiste en, SEQ ID NO: 13,
 - 25 • un dominio CL que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25,
 en donde los dominios CH1 y CL se asocian de la siguiente manera
 - SEQ ID NO: 2 con SEQ ID NO: 11,
 - SEQ ID NO: 5 con SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 23,
 - SEQ ID NO: 20 con SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 23,
 - 30 - SEQ ID NO: 21 con SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 25,
 - SEQ ID NO: 22 con SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 25.
3. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 1, en el que Ab1 o Ab2 es trastuzumab o un derivado mutado del mismo, que comprende
 - un dominio VH que comprende, preferiblemente que consiste en, la secuencia SEQ ID NO:1
 - 35 • un dominio CH1 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22
 - un dominio VL que comprende una secuencia que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 10,
 - un dominio CL que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25,
 - 40 en donde los dominios CH1 y CL se asocian de la siguiente manera
 - SEQ ID NO: 2 con SEQ ID NO: 11
 - SEQ ID NO: 5 con SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 23
 - SEQ ID NO: 20 con SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 23

- SEQ ID NO: 21 con SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 25

- SEQ ID NO: 22 con SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 25.

4. El anticuerpo biespecífico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que los dominios CH1 y CL de Ab1 tienen una combinación de secuencias diferentes de los dominios CH1 y CL de Ab2.

5. El anticuerpo biespecífico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la secuencia del enlazador polipeptídico comprende, preferiblemente consiste en, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 34.

6. El anticuerpo biespecífico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende, preferiblemente consiste en,

10 a) dos cadenas pesadas, cada una de las cuales comprende, preferiblemente consiste en, una secuencia continua que comprende, en orden de términos de N a C:

- un VH de cadena pesada de trastuzumab que comprende, preferiblemente consiste en, SEQ ID NO: 1,
- un dominio CH1 que comprende, preferiblemente que consiste en, SEQ ID NO: 2,
- un enlazador polipeptídico que comprende, preferiblemente que consiste en, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 34,

15 • un VH de cadena pesada de cetuximab que comprende, preferiblemente que consiste en, SEQ ID NO: 4,
 • un dominio CH1 que comprende, preferiblemente que consiste en, SEQ ID NO: 5,
 • un dominio bisagra que comprende, preferiblemente que consiste en, SEQ ID NO: 6,
 • un dominio CH2 que comprende, preferiblemente que consiste en, SEQ ID NO: 7,
 • un dominio CH3 que comprende, preferiblemente que consiste en, SEQ ID NO: 8,

20 b) dos cadenas ligeras de trastuzumab, cada una de las cuales comprende

- un dominio VL que comprende, preferiblemente que consiste en, SEQ ID NO: 10,
- un dominio CL que comprende, preferiblemente que consiste en, SEQ ID NO: 11,

c) dos cadenas ligeras de cetuximab, cada una de las cuales comprende:

25 • un dominio VL que comprende, preferiblemente que consiste en, SEQ ID NO: 13,
 • un dominio CL que comprende, preferiblemente que consiste en, SEQ ID NO: 14.

7. El anticuerpo biespecífico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende, preferiblemente que consiste en,

a) dos cadenas pesadas, cada una de las cuales comprende, preferiblemente que consiste en, una secuencia continua que comprende, en orden de términos de N a C:

30 • un VH de cadena pesada de cetuximab que comprende, preferiblemente que consiste en, SEQ ID NO: 4,
 • un dominio CH1 que comprende, preferiblemente que consiste en, SEQ ID NO: 5,
 • un enlazador polipeptídico que comprende, preferiblemente que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 34,

35 • un VH de cadena pesada de trastuzumab que comprende, preferiblemente que consiste en, SEQ ID NO: 1,
 • un dominio CH1 que comprende, preferiblemente que consiste en SEQ ID NO: 2,
 • un dominio bisagra que comprende, preferiblemente que consiste en SEQ ID NO: 6,
 • un dominio CH2 que comprende, preferiblemente que consiste en SEQ ID NO: 7,
 • un dominio CH3 que comprende, preferiblemente que consiste en SEQ ID NO: 8,

b) dos cadenas ligeras de trastuzumab, cada una de las cuales comprende SEQ ID NO: 12

c) dos cadenas ligeras de cetuximab, cada una de las cuales comprende SEQ ID NO: 15.

8. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 1, que contiene al menos una de las siguientes mutaciones:

- un dominio constante CH1 mutado de IgG1 humana que comprende, preferiblemente que consiste en, SEQ ID NO: 20,

5 - un dominio constante CH1 mutado de IgG1 humana que comprende, preferiblemente que consiste en, SEQ ID NO: 21,

- un dominio constante CH1 mutado de IgG1 humana que comprende, preferiblemente que consiste en, SEQ ID NO: 22,

- un dominio constante kappa humano mutado que comprende, preferiblemente que consiste en, SEQ ID NO: 23,

10 - un dominio constante kappa humano mutado que comprende, preferiblemente que consiste en, SEQ ID NO: 24,

- un dominio constante kappa humano mutado que comprende, preferiblemente que consiste en, SEQ ID NO: 25.

9. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 1, en el que el dominio VH de cadena pesada de cetuximab consiste en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 27.

10. Un método para producir el anticuerpo biespecífico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, comprendiendo dicho método las siguientes etapas: a) cultivar en un medio y condiciones de cultivo adecuados una célula huésped que expresa una cadena pesada de anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, y una cadena ligera de anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9; y b) recuperar dichos anticuerpos producidos del medio de cultivo o de dichas células cultivadas.

11. El anticuerpo biespecífico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para su uso como un medicamento.

20 12. El anticuerpo biespecífico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para su uso en el tratamiento de un cáncer.

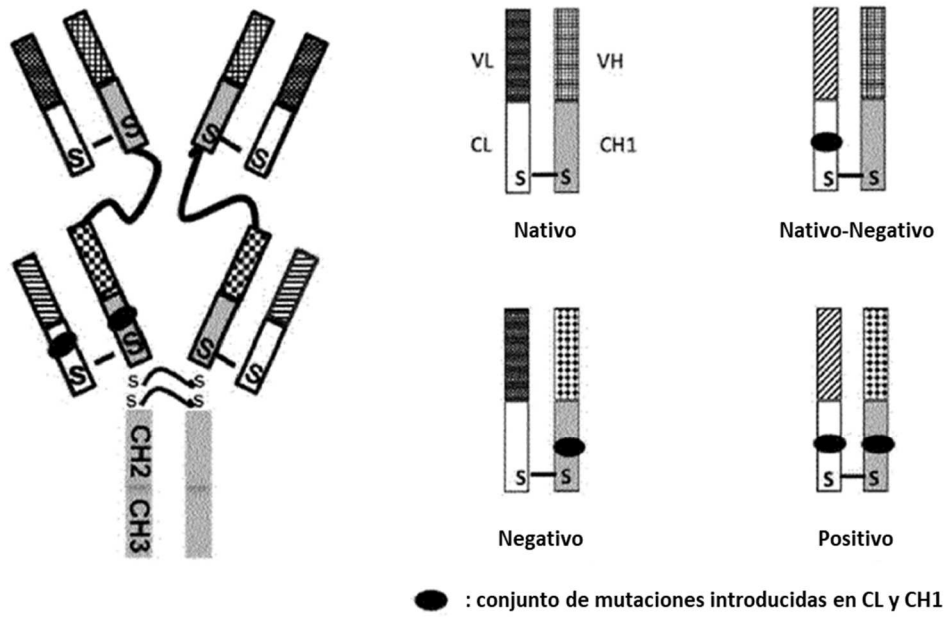


FIGURA 1

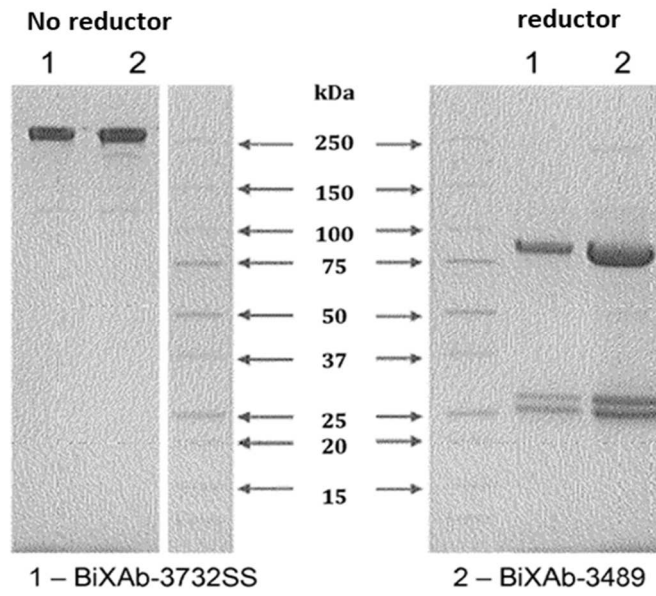


FIGURA 2A

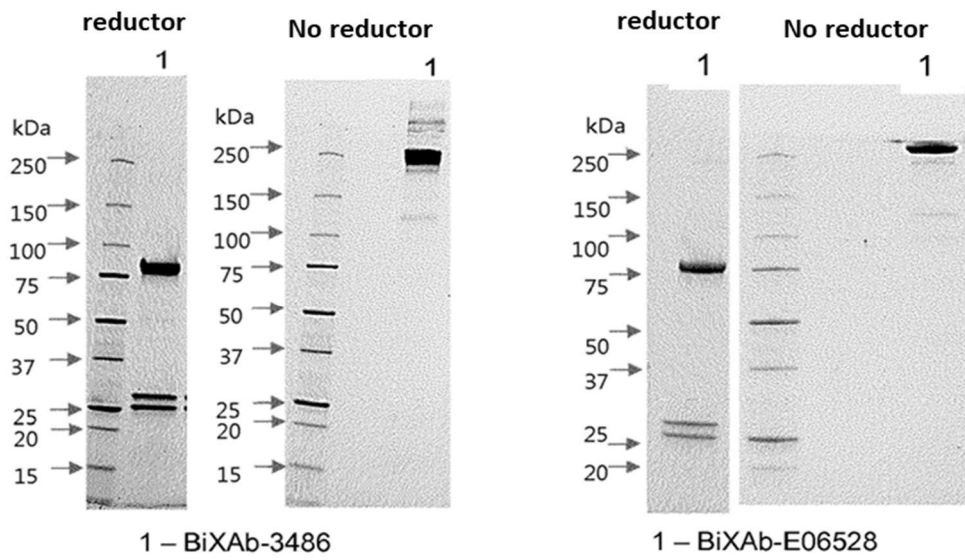


FIGURA 2B

FIGURA 2C

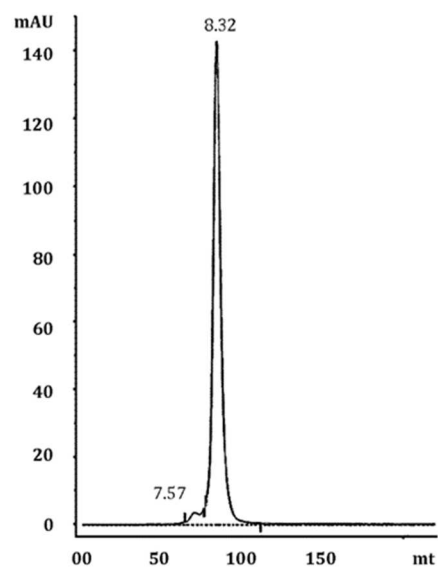


FIGURA 3A

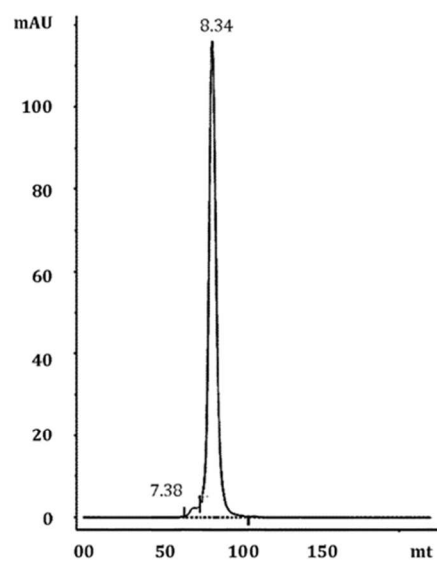


FIGURA 3B

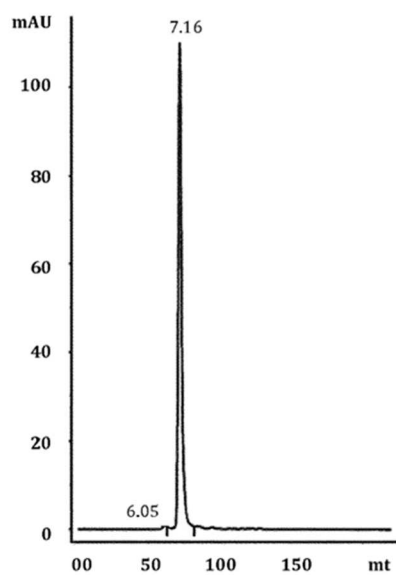


FIGURA 3C

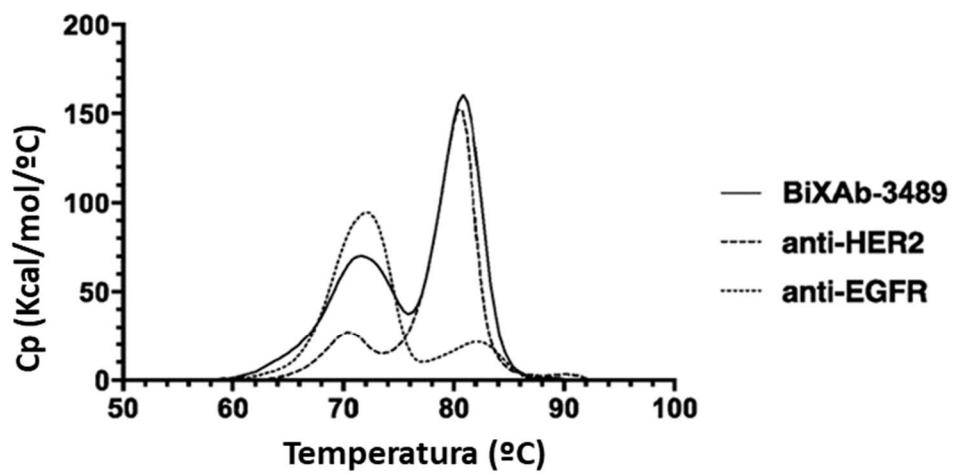


FIGURA 4

ELISA dual de BiXAb-3486 y BiXAb-3489

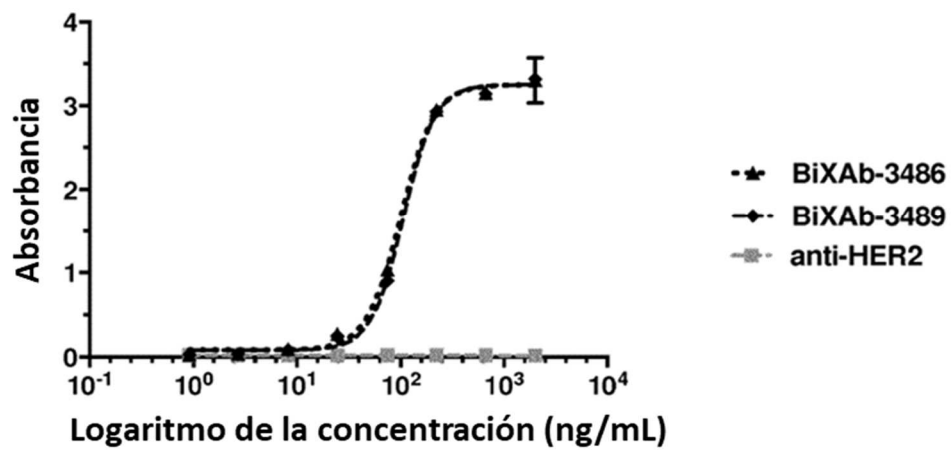


FIGURA 5

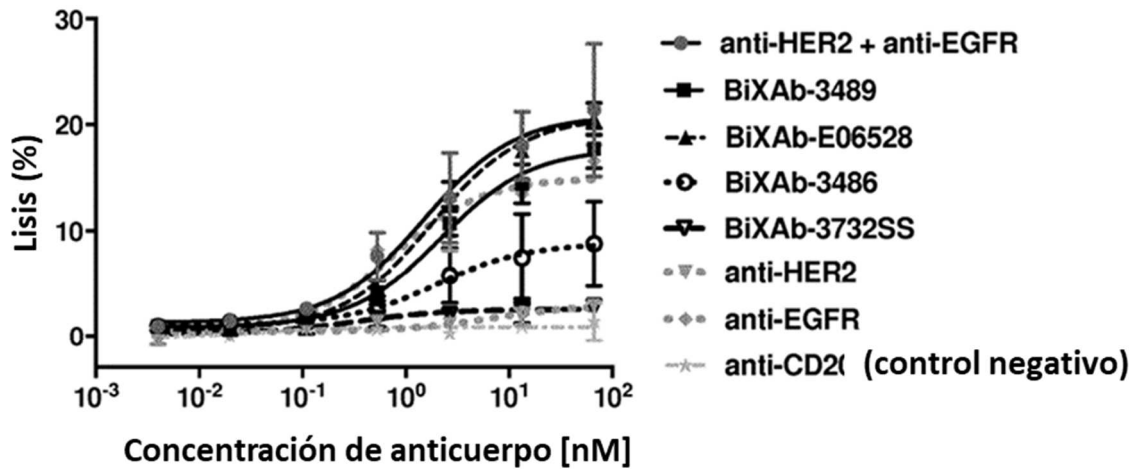


FIGURA 6A

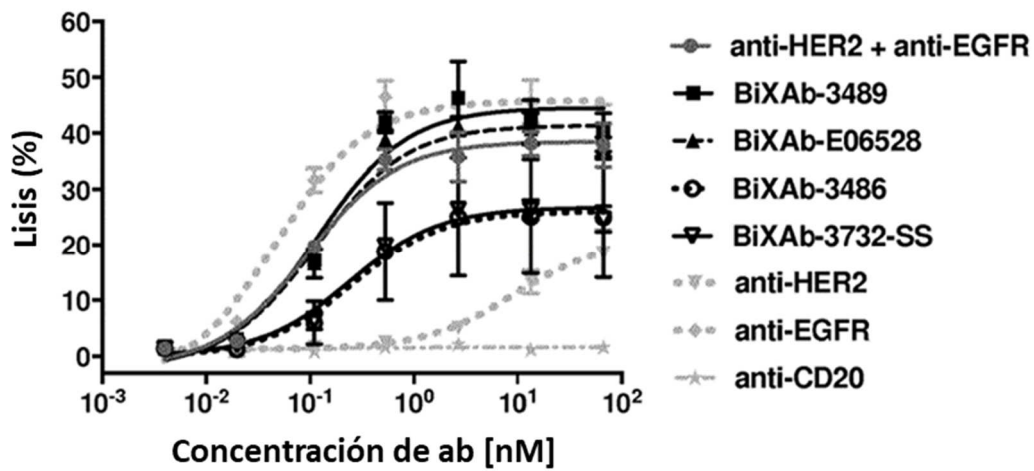


FIGURA 6B

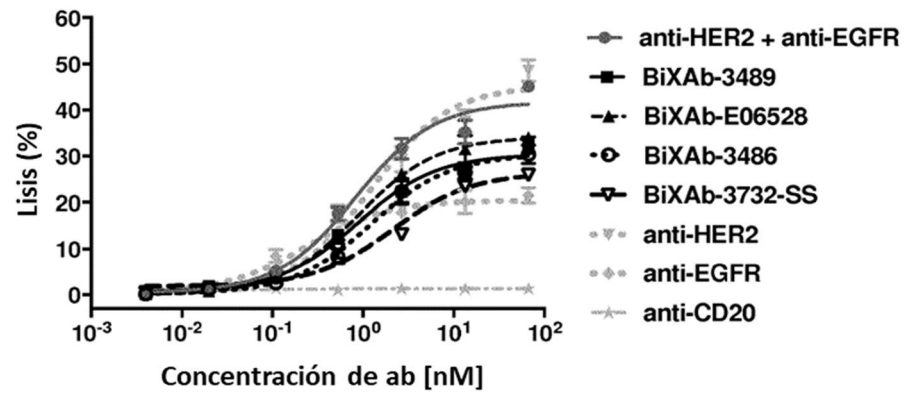


FIGURA 6C

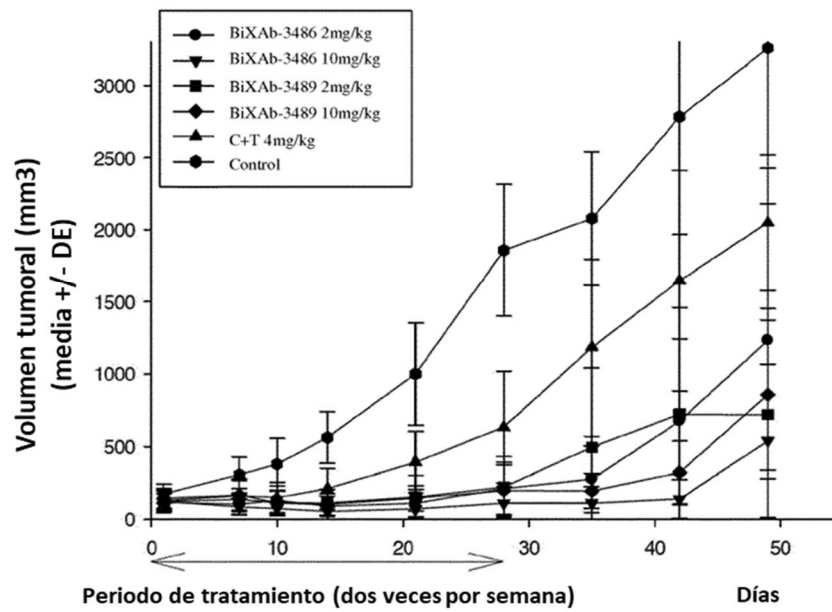


FIGURA 7A

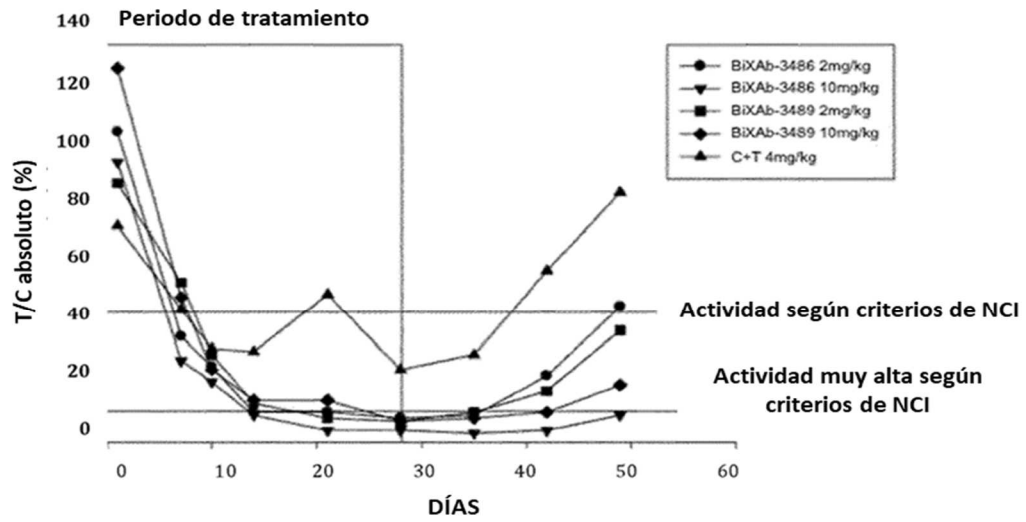


FIGURA 7B

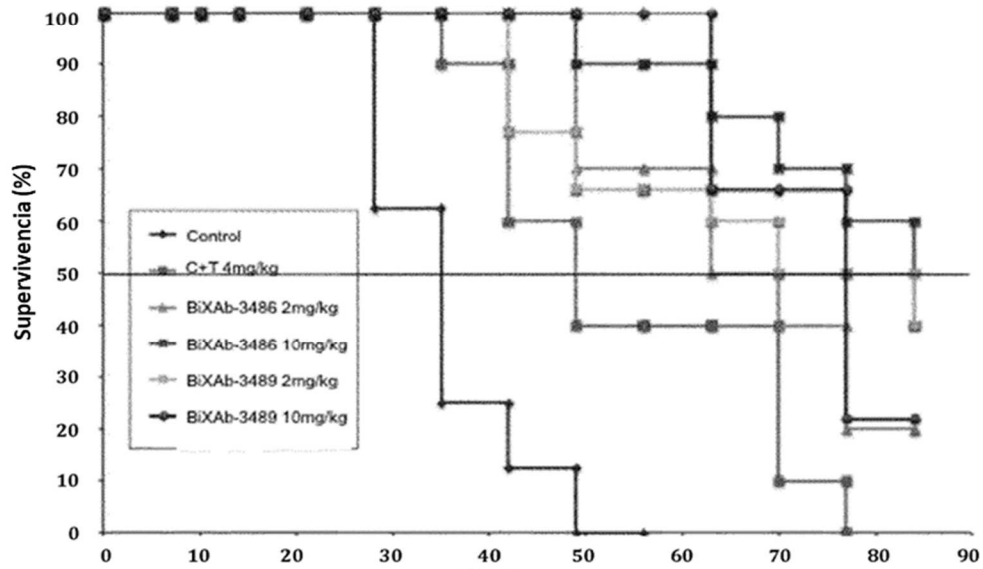


FIGURA 7C

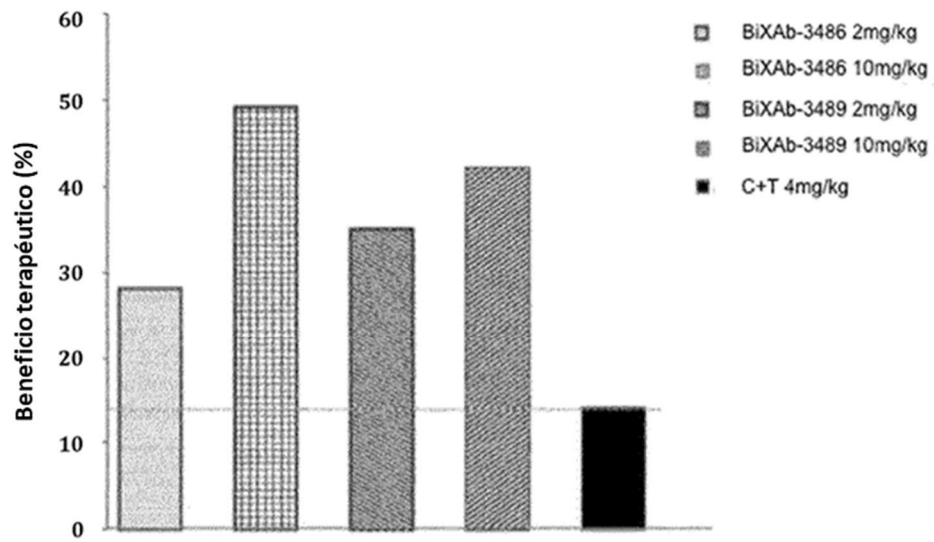


FIGURA 7D