

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 995 733**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2015** **PCT/US2015/066951**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2016** **WO16106157**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2015** **E 15874216 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2024** **EP 3237005**

54 Título: **Anticuerpos tetraivalentes biespecíficos y procedimientos de fabricación y utilización de los mismos**

30 Prioridad:

22.12.2014 US 201462095348 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.02.2025

73 Titular/es:

**SYSTIMMUNE, INC. (100.00%)
15318 NE 95th Street
Redmond, WA 98052, US**

72 Inventor/es:

**GAO, ZEREN;
TAN, PHIL;
KOVACEVICH, BRIAN;
RENSHAW, BLAIR;
ADAMO, JEFFREY;
MAK, NG SZE AMANDA;
ZHUO, SHI;
CHEN, LAN y
ZHU, YI**

74 Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

Observaciones:

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

ES 2 995 733 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 tetravalentes biespecíficos y procedimientos de fabricación y utilización de los mismos

5 CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente divulgación se refiere en general al campo técnico de los agentes terapéuticos de anticuerpos, y más particularmente se refiere a anticuerpos tetravalentes biespecíficos contra dos miembros diferentes de la familia EGFR.

10 ANTECEDENTES

[0002] Se ha demostrado que la sobreexpresión y/o desregulación de miembros de la familia de receptores ErbB/HER, tales como EGFR, HER2, HER3, HER4, desempeñan un papel importante en la tumorigénesis en los cánceres. La mutación y amplificación de EGFR o HER2 produce una señal de crecimiento aberrante que activa la vía de señalización descendente que contribuye a la tumorigénesis. Se han aprobado anticuerpos terapéuticos e inhibidores de moléculas pequeñas dirigidos contra EGFR y HER2 para su uso en el tratamiento del cáncer (Arteaga et al., Nature Reviews Clinical Oncology 9 16-32, enero de 2012). Los anticuerpos monoclonales contra miembros de la familia EGFR, tales como EGFR y HER2, han demostrado buenas respuestas clínicas en el cáncer de colon (Price et al., The Lancet Oncology 15(6), páginas 569-579, mayo de 2014), carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Cohen, Cancer Treatment Reviews 40 (2014) 567-577), cáncer de mama y gástrico (Arteaga et al., Nature Reviews Clinical Oncology 9 16-32, enero de 2012). Varios anticuerpos anti-EGFR terapéuticos, incluidos cetuximab, panitumumab y nimotuzumab, son agentes terapéuticos aprobados para varios tipos de cáncer, incluido el cáncer colorrectal metastásico, el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y el glioma (Price y Cohen, Curr. Treat Options Oncol. Marzo de 2012;13(1):35-46; Bode et al., Expert Opin. Biol Ther. 2012 diciembre; 12(12):1649-59). Desafortunadamente, muchos tumores que inicialmente responden a estos agentes terapéuticos finalmente progresan debido a una resistencia adquirida a los agentes (Jackman et al. J Clin Oncol 2010; 28:357-60). Por lo tanto, existe la necesidad de mejores agentes terapéuticos contra el cáncer. Dhimolea et al. World Bispecific Antibody Summit, 27 y 28 de septiembre de 2011, Boston, MA. S. Hu et al. describen anticuerpos cuatro en uno que tienen una actividad inhibidora del cáncer superior contra EGFR, HER2, HER3 y VEGF a través de la interrupción de la comunicación cruzada HER/MET. El documento US 2014/056895 A1 describe proteínas de unión similares a anticuerpos de región variable dual que tienen orientación de región de unión cruzada. El documento US 2010/256338 A1 describe anticuerpos multiespecíficos que comprenden anticuerpos de longitud completa y fragmentos Fab de cadena única. El documento WO 2014/144357 A1 describe anticuerpos biespecíficos tetravalentes. El documento US 2012/134993 A1 describe composiciones y procedimientos para utilizar proteínas de unión multiespecífica que comprenden una combinación anticuerpo-receptor. El documento US 2014/135482 A1 describe anticuerpos biespecíficos anti ErbB3/anti cMet.

40 DESCRIPCIÓN RESUMIDA

[0003] La divulgación da a conocer un anticuerpo tetravalente biespecífico, comprendiendo dicho anticuerpo tetravalente biespecífico: un primer polipéptido de cadena pesada de IgG1, conector y dominio de cadena única Fv (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 136; un segundo polipéptido de cadena pesada de IgG1, conector y dominio scFv que comprende la SEQ ID NO: 136; un primer polipéptido de cadena ligera kappa que comprende la SEQ ID NO: 131; y un segundo polipéptido de cadena ligera kappa que comprende la SEQ ID NO: 131; en el que la primera y segunda cadenas pesadas de IgG1 y la primera y segunda cadenas ligeras kappa forman un resto de IgG con una especificidad de unión para EGFR; y en el que el primer y segundo dominios scFv tienen cada uno una especificidad de unión para HER3. Los objetivos y ventajas de la divulgación resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de realizaciones preferidas de la misma en relación con los dibujos adjuntos.

50 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0004] La presente divulgación se describirá ahora con referencia a las figuras, en las que los mismos números de referencia indican elementos similares.

La Figura 1 es un diagrama que muestra las estructuras de dominio de un anticuerpo inmunoglobulina G (IgG) mono-específico bivalente de ejemplo.

La Figura 2 es un diagrama que muestra la estructura del dominio de un anticuerpo biespecífico tetravalente de ejemplo que comprende un resto de IgG y dos restos de scFv.

La Figura 3 muestra los diagramas de estructura de dominio de los anticuerpos biespecíficos tetravalentes de ejemplo 1X1, 1X2, 1X3, 1X4, 1X4.2, 1X5 y 1X6.

La Figura 4 muestra la comparación de la secuencia del dominio VH entre SI-1X4 y SI-1X4.2 mostrando las 5 diferencias de aminoácidos.

Las Figuras 5 y 6 son gráficos que muestran la unión del EGFR monomérico por BLI.

Las Figuras 7, 8, y 9 son gráficos que muestran la unión de ELI biespecífico.

La Figura 10 es un gráfico que muestra el ELISA de EGFR dimérico.

Las Figuras 11 muestra la cinética de unión de SI-1C5.2 y SI-1X4.2 con EGFR monomérico analizada por Octet.

La Figura 12 muestra el análisis citométrico de flujo de la unión de anticuerpos SI-1X a células A431.
 La Figura 13 muestra el análisis citométrico de flujo de la unión de anticuerpos SI-1X a células BxPC3.
 La Figura 14 muestra el análisis citométrico de flujo de la unión del anticuerpo SI-1X4.2 a las células Fadu.
 La Figura 15 muestra el análisis citométrico de flujo de la unión del anticuerpo SI-1X4.2 a las células A431.
 La Figura 16 muestra el efecto de los anticuerpos SI-1X sobre la proliferación de células A431.
 La Figura 17 muestra el efecto de los anticuerpos SI-1X sobre la proliferación de células A431.
 La Figura 18 muestra el efecto de los anticuerpos SI-1X sobre la proliferación de células BxPC3.
 La Figura 19 muestra el efecto de los anticuerpos SI-1X sobre la proliferación de células BxPC3.
 La Figura 20 muestra el efecto de los anticuerpos SI-1X4.2 sobre la proliferación de células Fadu.
 La Figura 21 muestra el efecto de los anticuerpos SI-1X4.2 sobre la proliferación de células A431.
 La Figura 22 muestra la actividad ADCC de los anticuerpos SI-1X en las células Fadu.
 La Figura 23 muestra la actividad ADCC de los anticuerpos SI-1X en células NCI-H1975.
 La Figura 24 muestra la fusión térmica de los anticuerpos SI-1X para demostrar su estabilidad.
 La Figura 25 muestra la estabilidad sérica de los anticuerpos SI-1X durante un período de 7 días.
 La Figura 26 es un gráfico que muestra los resultados del ELISA recubierto de EGFR para el estudio PK en ratas.
 La Figura 27 es un gráfico que muestra los resultados del ELISA recubierto de HER3 para el estudio PK en ratas.
 La Figura 28 es un gráfico que muestra los resultados de la prueba ELISA tipo sándwich para el estudio PK en ratas.
 La Figura 29 es un gráfico que muestra un gráfico del volumen tumoral medio frente a los días en el estudio de xenoinjerto en ratones.
 La Figura 30 es un gráfico que muestra un gráfico del peso corporal relativo frente a las semanas en el estudio de xenoinjerto de ratón.

DESCRIPCION DETALLADA

[0005] La presente divulgación da a conocer anticuerpos tetravalentes biespecíficos con propiedades o eficacias terapéuticas superiores a los anticuerpos anti-EGFR conocidos actualmente.

[0006] Los anticuerpos tetravalentes biespecíficos pueden inhibir simultáneamente la señalización mediada por EGFR y HER3 y, por lo tanto, superar la resistencia al tratamiento con inhibidores de EGFR o anticuerpos monoclonales.

[0007] Debe tenerse en cuenta que, tal como se utiliza en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "y" y "el" o "la" en toda esta memoria descriptiva y las reivindicaciones, la palabra "comprender", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entenderán como que implican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros indicados, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros que incluyan referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

[0008] Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una parte de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región de unión al antígeno o variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, Fab'-SH; diacuerpos; anticuerpos lineales (véase la Patente de EE.UU. No. 5.641.870, Ejemplo 2; Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995)); moléculas de anticuerpos de cadena única (por ejemplo, scFv). Si bien en la presente descripción y a lo largo de toda la memoria descriptiva se hace referencia a anticuerpos y a diversas propiedades de los anticuerpos, la misma divulgación también se aplica a fragmentos de anticuerpos funcionales, por ejemplo, fragmentos Fab de doble acción.

[0009] En un aspecto, se proporciona un anticuerpo tetravalente biespecífico, comprendiendo dicho anticuerpo tetravalente biespecífico: un primer polipéptido de cadena pesada de IgG1, conector y dominio de cadena única Fv (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 136; un segundo polipéptido de cadena pesada de IgG1, conector y dominio scFv que comprende la SEQ ID NO: 136; un primer polipéptido de cadena ligera kappa que comprende la SEQ ID NO: 131; y un segundo polipéptido de cadena ligera kappa que comprende la SEQ ID NO: 131; en el que la primera y segunda cadenas pesadas de IgG1 y la primera y segunda cadenas ligeras kappa forman un resto de IgG con una especificidad de unión para EGFR; y en el que el primer y segundo dominios scFv tienen cada uno una especificidad de unión para HER3. El resto de IgG puede proporcionar estabilidad al resto de scFv. El anticuerpo tetravalente biespecífico puede bloquear la señalización de las vías AKT y MAPK/ERK y puede mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) hacia las células que expresan uno o ambos antígenos. En una realización, el anticuerpo tetravalente biespecífico es capaz de unirse a ambos antígenos simultáneamente. En algunas realizaciones, el anticuerpo tetravalente biespecífico proporciona una inhibición tumoral más fuerte en ensayos de proliferación in vitro e in vivo que el control parental de anticuerpo monoespecífico o la combinación de controles parentales de anticuerpo monoespecífico.

[0010] Los miembros de la familia EGFR pueden incluir EGFR, HER2, HER3, un fragmento o un derivado de los mismos.

[0011] Los anticuerpos tetravalentes biespecíficos tienen la actividad de inhibir el crecimiento de células cancerosas. Un anticuerpo puede tener una constante de disociación (K_d) de ≤ 80 nM, ≤ 50 nM, ≤ 30 nM, ≤ 20 nM, ≤ 10 nM o $\leq 0,1$ nM para su diana EGFR o HER3. El anticuerpo puede unirse a ambas dianas simultáneamente. El anticuerpo puede

unirse a EGFR y HER3 con una Kd inferior a 50 nM. El anticuerpo puede unirse a EGFR y/o HER3 con una Kd inferior a 40, 30, 25, 20, 19, 18 o 10 nM. En una realización, el anticuerpo se une a EGFR con una Kd inferior a 30 nM y se une a HER3 con una Kd inferior a 30 nM. En una realización, el anticuerpo se une a EGFR con una Kd inferior a 50 nM y se une a HER3 con un Kd inferior a 50 nM simultáneamente.

[0012] En otro aspecto, la divulgación da a conocer ácidos nucleicos aislados que codifican los anticuerpos tetravalentes biespecíficos tal como se reivindica.

[0013] En un aspecto adicional, la divulgación da a conocer vectores de expresión que tienen los ácidos nucleicos aislados que codifican el anticuerpo tetravalente biespecífico, tal como se reivindica. Los vectores pueden ser expresables en una célula huésped. La célula huésped puede ser procariota o eucariota.

[0014] En un aspecto adicional, la divulgación da a conocer células huésped que tienen los ácidos nucleicos aislados que codifican los anticuerpos tetravalentes biespecíficos, tal como se reivindica, o los vectores de expresión que incluyen dichas secuencias de ácidos nucleicos.

[0015] En el presente documento se describe un procedimiento para producir anticuerpos tetravalentes biespecíficos. El procedimiento puede incluir cultivar las células huésped descritas anteriormente para que se produzca el anticuerpo.

[0016] En un aspecto adicional, la divulgación da a conocer inmunoconjugados que incluyen los anticuerpos tetravalentes biespecíficos, tal como se reivindica, y un agente citotóxico.

[0017] En un aspecto adicional, la divulgación da a conocer composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos tetravalentes biespecíficos, tal como se reivindica, o los inmunoconjugados descritos en el presente documento y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición puede incluir además un radioisótopo, un radionúclido, una toxina, un agente terapéutico, un agente quimioterapéutico o una combinación de los mismos.

[0018] Un anticuerpo tetravalente biespecífico puede ser para la utilización en un procedimiento para tratar a un sujeto con un cáncer. El procedimiento puede incluir la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo tetravalente biespecífico descrito en el presente documento. El cáncer puede incluir células que expresan al menos dos miembros de la familia EGFR, incluyendo, por ejemplo, EGFR, HER2, HER3, un fragmento o un derivado de los mismos. El cáncer puede ser cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de próstata y cáncer de pulmón de células no pequeñas, glioma, cáncer de esófago, cáncer nasofaríngeo, cáncer anal, cáncer rectal, cáncer gástrico, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino y cáncer cerebral.

[0019] El procedimiento puede incluir además coadministrar una cantidad eficaz de un agente terapéutico. El agente terapéutico puede ser, por ejemplo, un anticuerpo, un agente de quimioterapia, un agente citotóxico, una enzima o una combinación de los mismos. El agente terapéutico puede ser un agente antiestrógeno, un inhibidor del receptor de tirosina o una combinación de los mismos.

[0020] El agente terapéutico puede ser un agente biológico.

[0021] El agente terapéutico puede ser un inhibidor de puntos de control.

[0022] El agente terapéutico puede incluir PD1, PDL1, CTLA4, 4-1BB, OX40, GITR, TIM3, LAG3, TIGIT, CD40, CD27, HVEM, BTLA, VISTA, B7H4, un derivado, un conjugado o un fragmento de los mismos. El agente terapéutico puede ser capecitabina, cisplatino, trastuzumab, fulvestrant, tamoxifeno, letrozol, exemestano, anastrozol, aminoglutetimida, testolactona, vorozol, formestano, fadrozol, letrozol, erlotinib, lapatinib, dasatinib, gefitinib, imatinib, pazopinib, lapatinib, sunitinib, nilotinib, sorafenib, nab-palitaxel o un derivado de los mismos. El sujeto que necesita dicho tratamiento puede ser un ser humano.

[0023] Un anticuerpo tetravalente biespecífico puede ser para la utilización en un procedimiento para tratar a un sujeto administrándole al sujeto una cantidad efectiva del anticuerpo tetravalente biespecífico para inhibir una actividad biológica de un receptor HER.

[0024] En la figura 1 se muestra un diagrama de la estructura general de IgG.

[0025] En la figura 2 se muestra un diagrama de un anticuerpo tetravalente biespecífico. En este ejemplo, el anticuerpo tetravalente biespecífico incluye dos cadenas pesadas de IgG1 humanas, dos cadenas ligeras kappa humanas y dos dominios Fv de cadena única (scFv). Las dos cadenas pesadas de IgG1 humanas y las cadenas ligeras kappa humanas forman un resto de IgG con una especificidad de unión a un miembro de la familia EGFR, y cada uno de los dos dominios scFv está conectado al residuo C-terminal de cualquiera de las cadenas pesadas de IgG1 humanas mediante un conector con una secuencia de aminoácidos de gly-gly-gly-gly-ser-gly-gly-gly-ser ((G₄S)₂). Cada dominio scFv está en el orden: extremo N-terminal- pesada variable-enlazador-ligera variable-extremo C terminal. El

enlazador está compuesto por la secuencia de aminoácidos gly-gly-gly-gly-ser-gly-gly-gly-gly-ser-gly-gly-gly-gly-ser, también conocida como (G₄S)₃.

[0026] Las secuencias de aminoácidos de CH1, CH2, CH3, CL, conector y enlazador pueden ser idénticas. Cada anticuerpo tetravalente biespecífico tiene una especificidad de unión anti-HER3 bivalente en un extremo del anticuerpo y una especificidad de unión anti-EGFR bivalente en el otro extremo. Un par de cadena pesada variable y cadena ligera variable anti-HER3 se designa como 1C1, y cuatro pares de cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables anti-EGFR se designan como 1C3, 1C5, 1C5.2, 1C6 y 1C6.4, respectivamente. Los anticuerpos tetravalentes biespecíficos se designan como 1X1, 1X2, 1X3, 1X4, 1X4.2, 1X5, 1X5.2, 1X6 y 1X6.4.

[0027] Además, en algunos de los estudios se utilizó una molécula de control 1C4 (también designada como SI-1C4). 1C4 es un anticuerpo biespecífico contra EGFR y HER3 construido sobre la plataforma dos en uno descrita por Schaefer et. al., 2011 (Schaefer et al., Cancer Cell. 18 de octubre de 2011; 20(4): 472-86). El IC4 tiene una estructura similar a la de un anticuerpo monoclonal. La molécula puede unirse a EGFR o HER3 en cada brazo Fab, pero no puede unirse a ambas dianas simultáneamente en cada brazo Fab.

[0028] Los fragmentos de ADN de cadena ligera variable, cadena pesada variable y FV de cadena única (scFv) se generaron mediante síntesis génica a través de un proveedor externo. Los fragmentos de ADN de cadena pesada Gamma-1 humana y cadena ligera kappa humana se generaron mediante síntesis génica a través de un proveedor externo. Los fragmentos se ensamblaron entre sí mediante ligación de ADN utilizando sitios de restricción y se clonaron en un vector que está diseñado para la expresión transitoria en células de mamíferos. El vector contiene un promotor derivado de CMV fuerte y otros elementos en dirección 5' y 3' necesarios para la expresión transitoria. Se verificó que los plásmidos de expresión de IgG resultantes contenían las secuencias de ADN esperadas mediante secuenciación de ADN.

[0029] La expresión transitoria de las construcciones de anticuerpos se logró utilizando la transfección de células HEK293F adaptadas a la suspensión con PEI lineal como se describe en otra parte (ver Protocolos CSH; 2008; doi:10.1101/pdb.prot4977). Los anticuerpos se purificaron a partir de los sobrenadantes de transfección resultantes utilizando cromatografía de afinidad de proteínas y cromatografía de exclusión por tamaño si era necesario. La calidad de las proteínas se analiza mediante una columna Superdex 200. Las proteínas utilizadas para todos los ensayos tienen una pureza de más del 90%.

[0030] El anticuerpo biespecífico se puede utilizar para el tratamiento de tipos de cáncer con coexpresiones de EGFR y HER3, que incluyen, sin limitación, cáncer de colon, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, glioma, cáncer de páncreas, cáncer nasofaríngeo y otros tipos de cáncer.

[0031] El anticuerpo biespecífico es de especificidad dual tetravalente. El anticuerpo de ejemplo puede incluir una IgG y dos scFv, lo que proporciona dos especificidades de unión diferentes en comparación con el anticuerpo monoespecífico IgG. El componente IgG proporciona estabilidad y una semivida sérica mejorada con respecto a otros anticuerpos biespecíficos que utilizan solo scFv, tales como la tecnología BiTE (Lutterbuese et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107.28 (2010): 12605-12610. PMC. Web. 2 de diciembre de 2014) y otros (por ejemplo, US7332585B2). También es capaz de mediar ADCC mientras que aquellos sin componente Fc no pueden (por ejemplo, US7332585B2). La naturaleza de especificidad dual tetravalente proporciona al anticuerpo biespecífico una capacidad de unión simultánea sobre algunos otros anticuerpos biespecíficos, que solo pueden unirse a un antígeno a la vez (Schanzer et al., Antimicrob. Agents Chemother. 2011, 55(5):2369; EP272942A1).

[0032] Para facilitar la narración, las secuencias de o relacionadas con los anticuerpos biespecíficos se resumen en la TABLA 1 a continuación.

Tabla 1. Resumen de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de anticuerpos bispecíficos o relacionados con los mismos

SECUENCIAS SI-1C1	
SEQ ID NO: 1	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA LIGERA DE SI-1C1
SEQ ID NO: 2	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE CADENA LIGERA VARIABLE DE CADENA LIGERA DE SI-1C1
SEQ ID NO: 3	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA LIGERA DE SI-1C1. EL DOMINIO CONSTANTE KAPPA HUMANO ESTÁ SUBRAYADO
SEQ ID NO: 4	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE CADENA LIGERA VARIABLE DE CADENA LIGERA DE SI-1C1. LAS REGIONES DETERMINANTES DE COMPLEMENTARIEDAD ESTÁN SUBRAYADAS
SEQ ID NO: 5	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA PESADA DE SI-1C1
SEQ ID NO: 6	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE CADENA PESADA VARIABLE DE CADENA PESADA DE SI-1C1
SEQ ID NO: 7	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA PESADA DE SI-1C1. EL DOMINIO GAMMA-1 HUMANO ESTÁ SUBRAYADO
SEQ ID NO: 8	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE CADENA PESADA VARIABLE DE CADENA PESADA DE SI-1C1. LAS REGIONES DETERMINANTES DE COMPLEMENTARIEDAD ESTÁN SUBRAYADAS
SECUENCIAS SI-1C3	
SEQ ID NO: 9	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA LIGERA DE SI-1C3
SEQ ID NO: 10	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE CADENA LIGERA VARIABLE DE CADENA LIGERA DE SI-1C3
SEQ ID NO: 11	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA LIGERA DE SI-1C3. EL DOMINIO CONSTANTE KAPPA HUMANO ESTÁ SUBRAYADO
SEQ ID NO: 12	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE CADENA LIGERA VARIABLE DE CADENA LIGERA DE SI-1C3. LAS REGIONES DETERMINANTES DE COMPLEMENTARIEDAD ESTÁN SUBRAYADAS
SEQ ID NO: 13	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA PESADA DE SI-1C3
SEQ ID NO: 14	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE CADENA PESADA VARIABLE DE CADENA PESADA DE SI-1C3
SEQ ID NO: 15	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA PESADA DE SI-1C3. EL DOMINIO GAMMA-1 HUMANO ESTÁ SUBRAYADO
SEQ ID NO: 16	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE CADENA PESADA VARIABLE DE CADENA PESADA DE SI-1C3. LAS REGIONES DETERMINANTES DE COMPLEMENTARIEDAD ESTÁN SUBRAYADAS
SECUENCIAS SI-1C4	
SEQ ID NO: 17	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA LIGERA DE SI-1C4
SEQ ID NO: 18	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE CADENA LIGERA VARIABLE DE CADENA LIGERA DE SI-1C4
SEQ ID NO: 19	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA LIGERA DE SI-1C4. EL DOMINIO CONSTANTE KAPPA HUMANO ESTÁ SUBRAYADO
SEQ ID NO: 20	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE CADENA LIGERA VARIABLE DE CADENA LIGERA DE SI-1C4. LAS REGIONES DETERMINANTES DE COMPLEMENTARIEDAD ESTÁN SUBRAYADAS

(continuación)

SECUENCIAS SI-1C4	
SEQ ID NO: 21	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA PESADA DE SI-1C4
SEQ ID NO: 22	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE CADENA PESADA VARIABLE DE CADENA PESADA DE SI-1C4
SEQ ID NO: 23	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA PESADA DE SI-1C4. EL DOMINIO GAMMA-1 HUMANO ESTÁ SUBRAYADO
SEQ ID NO: 24	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE CADENA PESADA VARIABLE DE CADENA PESADA DE SI-1C4. LAS REGIONES DETERMINANTES DE COMPLEMENTARIEDAD ESTÁN SUBRAYADAS
SECUENCIAS SI-1C5	
SEQ ID NO: 25	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA LIGERA DE SI-1C5
SEQ ID NO: 26	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE CADENA LIGERA VARIABLE DE CADENA LIGERA DE SI-1C5
SEQ ID NO: 27	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA LIGERA DE SI-1C5. EL DOMINIO CONSTANTE KAPPA HUMANO ESTÁ SUBRAYADO
SEQ ID NO: 28	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE CADENA LIGERA VARIABLE DE CADENA LIGERA DE SI-1C5. LAS REGIONES DETERMINANTES DE COMPLEMENTARIEDAD ESTÁN SUBRAYADAS
SEQ ID NO: 29	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA PESADA DE SI-1C5
SEQ ID NO: 30	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE CADENA PESADA VARIABLE DE CADENA PESADA DE SI-1C5
SEQ ID NO: 31	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA PESADA DE SI-1C5. EL DOMINIO GAMMA-1 HUMANO ESTÁ SUBRAYADO
SEQ ID NO: 32	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE CADENA PESADA VARIABLE DE CADENA PESADA DE SI-1C5. LAS REGIONES DETERMINANTES DE COMPLEMENTARIEDAD ESTÁN SUBRAYADAS
SECUENCIAS SI-1C5.2	
SEQ ID NO: 33	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA LIGERA DE SI-1C5.2
SEQ ID NO: 34	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE CADENA LIGERA VARIABLE DE CADENA LIGERA DE SI-1C5.2
SEQ ID NO: 35	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA LIGERA DE SI-1C5.2. EL DOMINIO CONSTANTE KAPPA HUMANO ESTÁ SUBRAYADO
SEQ ID NO: 36	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE CADENA LIGERA VARIABLE DE CADENA LIGERA DE SI-1C5.2. LAS REGIONES DETERMINANTES DE COMPLEMENTARIEDAD ESTÁN SUBRAYADAS
SEQ ID NO: 37	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA PESADA DE SI-1C5.2
SEQ ID NO: 38	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE CADENA PESADA VARIABLE DE CADENA PESADA DE SI-1C5.2
SEQ ID NO: 39	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA PESADA DE SI-1C5.2. EL DOMINIO GAMMA-1 HUMANO ESTÁ SUBRAYADO
SEQ ID NO: 40	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE CADENA PESADA VARIABLE DE CADENA PESADA DE SI-1C5.2. LAS REGIONES DETERMINANTES DE COMPLEMENTARIEDAD ESTÁN SUBRAYADAS

(continuación)

SECUENCIAS SI-1C6	
SEQ ID NO: 41	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA LIGERA DE SI-1C6
SEQ ID NO: 42	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE CADENA LIGERA VARIABLE DE CADENA LIGERA DE SI-1C6
SEQ ID NO: 43	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA LIGERA DE SI-1C6. EL DOMINIO CONSTANTE KAPPA HUMANO ESTÁ SUBRAYADO
SEQ ID NO: 44	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE CADENA LIGERA VARIABLE DE CADENA LIGERA DE SI-1C6. LAS REGIONES DETERMINANTES DE COMPLEMENTARIEDAD ESTÁN SUBRAYADAS
SEQ ID NO: 45	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA PESADA DE SI-1C6
SEQ ID NO: 46	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE CADENA PESADA VARIABLE DE CADENA PESADA DE SI-1C6
SEQ ID NO: 47	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA PESADA DE SI-1C6. EL DOMINIO GAMMA-1 HUMANO ESTÁ SUBRAYADO
SEQ ID NO: 48	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE CADENA PESADA VARIABLE DE CADENA PESADA DE SI-1C6. LAS REGIONES DETERMINANTES DE COMPLEMENTARIEDAD ESTÁN SUBRAYADAS
SECUENCIAS SI-1X1	
SEQ ID NO: 49	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA LIGERA DE SI-1X1
SEQ ID NO: 50	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE CADENA LIGERA VARIABLE DE CADENA LIGERA DE SI-1X1
SEQ ID NO: 51	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA LIGERA DE SI-1X1. EL DOMINIO CONSTANTE KAPPA HUMANO ESTÁ SUBRAYADO
SEQ ID NO: 52	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE CADENA LIGERA VARIABLE DE CADENA LIGERA DE SI-1X1. LAS REGIONES DETERMINANTES DE COMPLEMENTARIEDAD ESTÁN SUBRAYADAS
SEQ ID NO: 53	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X1
SEQ ID NO: 54	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE CADENA PESADA VARIABLE DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X1
SEQ ID NO: 55	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE SCFV DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X1
SEQ ID NO: 56	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X1. EL DOMINIO GAMMA-1 HUMANO ESTÁ SUBRAYADO. EL CONECTOR ESTÁ EN CURSIVA. SCFV ESTÁ EN NEGRITA
SEQ ID NO: 57	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE CADENA PESADA VARIABLE DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X1. LAS REGIONES DETERMINANTES DE COMPLEMENTARIEDAD ESTÁN SUBRAYADAS
SEQ ID NO: 58	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE SCFV DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X1. ORDEN: VH -- ENLAZADOR -- VL. LAS REGIONES DETERMINANTES DE COMPLEMENTARIEDAD ESTÁN SUBRAYADAS. EL ENLAZADOR ESTÁ EN CURSIVA Y NEGRITA
SECUENCIAS SI-1X2	
SEQ ID NO: 59	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA LIGERA DE SI-1X2

(continuación)

SECUENCIAS SI-1X2	
SEQ ID NO: 60	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE CADENA LIGERA VARIABLE DE CADENA LIGERA DE SI-1X2
SEQ ID NO: 61	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA LIGERA DE SI-1X2. EL DOMINIO CONSTANTE KAPPA HUMANO ESTÁ SUBRAYADO
SEQ ID NO: 62	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE CADENA LIGERA VARIABLE DE CADENA LIGERA DE SI-1X2. LAS REGIONES DETERMINANTES DE COMPLEMENTARIEDAD ESTÁN SUBRAYADAS
SEQ ID NO: 63	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X2
SEQ ID NO: 64	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE CADENA PESADA VARIABLE DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X2
SEQ ID NO: 65	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE SCFV DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X2
SEQ ID NO: 66	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X2. EL DOMINIO GAMMA-1 HUMANO ESTÁ SUBRAYADO. EL CONECTOR ESTÁ EN CURSIVA. SCFV ESTÁ EN NEGRITA
SEQ ID NO: 67	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE CADENA PESADA VARIABLE DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X2. LAS REGIONES DETERMINANTES DE COMPLEMENTARIEDAD ESTÁN SUBRAYADAS
SEQ ID NO: 68	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE SCFV DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X1. ORDEN: VH – ENLAZADOR – VL. LAS REGIONES DETERMINANTES DE COMPLEMENTARIEDAD ESTÁN SUBRAYADAS. EL ENLAZADOR ESTÁ EN CURSIVA Y NEGRITA
SECUENCIAS SI-1X3	
SEQ ID NO: 69	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA LIGERA DE SI-1X3
SEQ ID NO: 70	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE CADENA LIGERA VARIABLE DE CADENA LIGERA DE SI-1X3
SEQ ID NO: 71	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA LIGERA DE SI-1X3. EL DOMINIO CONSTANTE KAPPA HUMANO ESTÁ SUBRAYADO
SEQ ID NO: 72	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE CADENA LIGERA VARIABLE DE CADENA LIGERA DE SI-1X3. LAS REGIONES DETERMINANTES DE COMPLEMENTARIEDAD ESTÁN SUBRAYADAS
SEQ ID NO: 73	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X3
SEQ ID NO: 74	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE CADENA PESADA VARIABLE DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X3
SEQ ID NO: 75	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE SCFV DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X3
SEQ ID NO: 76	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X3. EL DOMINIO GAMMA-1 HUMANO ESTÁ SUBRAYADO. EL CONECTOR ESTÁ EN CURSIVA. SCFV ESTÁ EN NEGRITA
SEQ ID NO: 77	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE CADENA PESADA VARIABLE DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X3. LAS REGIONES DETERMINANTES DE COMPLEMENTARIEDAD ESTÁN SUBRAYADAS

(continuación)

SECUENCIAS SI-1X3	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE SCFV DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X3. ORDEN: VH – ENLAZADOR – VL LAS REGIONES DETERMINANTES DE COMPLEMENTARIEDAD ESTÁN SUBRAYADAS. EL ENLAZADOR ESTÁ EN CURSIVA Y NEGRITA
SEQ ID NO: 78	
SECUENCIAS SI-1X4	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA LIGERA DE SI-1X4
SEQ ID NO: 79	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE CADENA LIGERA VARIABLE DE CADENA LIGERA DE SI-1X4
SEQ ID NO: 80	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA LIGERA DE SI-1X4. EL DOMINIO CONSTANTE KAPPA HUMANO ESTÁ SUBRAYADO
SEQ ID NO: 81	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE CADENA LIGERA VARIABLE DE CADENA LIGERA DE SI-1X4. LAS REGIONES DETERMINANTES DE COMPLEMENTARIEDAD ESTÁN SUBRAYADAS
SEQ ID NO: 82	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X4
SEQ ID NO: 83	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE CADENA PESADA VARIABLE DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X4
SEQ ID NO: 84	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE SCFV DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X4
SEQ ID NO: 85	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X4. EL DOMINIO GAMMA-1 HUMANO ESTÁ SUBRAYADO. EL CONECTOR ESTÁ EN CURSIVA. SCFV ESTÁ EN NEGRITA
SEQ ID NO: 86	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE CADENA PESADA VARIABLE DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X4. LAS REGIONES DETERMINANTES DE COMPLEMENTARIEDAD ESTÁN SUBRAYADAS
SEQ ID NO: 87	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE SCFV DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X4. ORDEN: VH – ENLAZADOR – VL LAS REGIONES DETERMINANTES DE COMPLEMENTARIEDAD ESTÁN SUBRAYADAS
SEQ ID NO: 88	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA LIGERA DE SI-1X4.2
SEQ ID NO: 89	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE CADENA LIGERA VARIABLE DE CADENA LIGERA DE SI-1X4.2
SEQ ID NO: 90	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE CADENA LIGERA VARIABLE DE CADENA LIGERA DE SI-1X4.2 OPTIMIZADA EN CODONES PARA LA EXPRESIÓN EN CHO
SEQ ID NO: 91	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA LIGERA DE SI-1X4.2. EL DOMINIO CONSTANTE KAPPA HUMANO ESTÁ SUBRAYADO
SEQ ID NO: 92	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE CADENA LIGERA VARIABLE DE CADENA LIGERA DE SI-1X4.2. LAS REGIONES DETERMINANTES DE COMPLEMENTARIEDAD ESTÁN SUBRAYADAS
SEQ ID NO: 93	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X4.2
SEQ ID NO: 94	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE CADENA PESADA VARIABLE DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X4.2
SEQ ID NO: 95	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE CADENA PESADA VARIABLE DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X4.2 OPTIMIZADA EN CODONES PARA LA EXPRESIÓN EN CHO
SEQ ID NO: 96	

(continuación)

SECUENCIAS SI-1X4.2	
SEQ ID NO: 97	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE SCFV DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X4.2
SEQ ID NO: 98	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X4.2. EL DOMINIO GAMMA-1 HUMANO ESTÁ SUBRAYADO. EL CONECTOR ESTÁ EN CURSIVA. SCFV ESTÁ EN NEGRITA
SEQ ID NO: 99	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE CADENA PESADA VARIABLE DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X4. LAS REGIONES DETERMINANTES DE COMPLEMENTARIEDAD ESTÁN SUBRAYADAS
SEQ ID NO: 100	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE SCFV DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X4.2. ORDEN: VH -- ENLAZADOR -- VL. LAS REGIONES DETERMINANTES DE COMPLEMENTARIEDAD ESTÁN SUBRAYADAS. EL ENLAZADOR ESTÁ EN CURSIVA Y NEGRITA
SECUENCIAS SI-1X5	
SEQ ID NO: 101	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA LIGERA DE SI-1X5
SEQ ID NO: 102	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE CADENA LIGERA VARIABLE DE CADENA LIGERA DE SI-1X5
SEQ ID NO: 103	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA LIGERA DE SI-1X5. EL DOMINIO CONSTANTE KAPPA HUMANO ESTÁ SUBRAYADO
SEQ ID NO: 104	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE CADENA LIGERA VARIABLE DE CADENA LIGERA DE SI-1X5. LAS REGIONES DETERMINANTES DE COMPLEMENTARIEDAD ESTÁN SUBRAYADAS
SEQ ID NO: 105	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X5
SEQ ID NO: 106	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE CADENA PESADA VARIABLE DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X5
SEQ ID NO: 107	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE SCFV DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X5
SEQ ID NO: 108	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X5. EL DOMINIO GAMMA-1 HUMANO ESTÁ SUBRAYADO. EL CONECTOR ESTÁ EN CURSIVA. SCFV ESTÁ EN NEGRITA
SEQ ID NO: 109	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE CADENA PESADA VARIABLE DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X5. LAS REGIONES DETERMINANTES DE COMPLEMENTARIEDAD ESTÁN SUBRAYADAS
SEQ ID NO: 110	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE SCFV DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X5. ORDEN: VH -- ENLAZADOR -- VL. LAS REGIONES DETERMINANTES DE COMPLEMENTARIEDAD ESTÁN SUBRAYADAS. EL ENLAZADOR ESTÁ EN CURSIVA Y NEGRITA
SECUENCIAS SI-1X6	
SEQ ID NO: 111	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA LIGERA DE SI-1X6
SEQ ID NO: 112	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE CADENA LIGERA VARIABLE DE CADENA LIGERA DE SI-1X6
SEQ ID NO: 113	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA LIGERA DE SI-1X6. EL DOMINIO CONSTANTE KAPPA HUMANO ESTÁ SUBRAYADO

(continuación)

SECUENCIAS SI-1X6	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE CADENA LIGERA VARIABLE DE CADENA LIGERA DE SI-1X6. LAS REGIONES DETERMINANTES DE COMPLEMENTARIEDAD ESTÁN SUBRAYADAS
SEQ ID NO: 114	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X6
SEQ ID NO: 115	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE CADENA PESADA VARIABLE DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X6
SEQ ID NO: 116	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE SCFV DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X6
SEQ ID NO: 117	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X6. EL DOMINIO GAMMA-1 HUMANO ESTÁ SUBRAYADO. EL CONECTOR ESTÁ EN CURSIVA. SCFV ESTÁ EN NEGRITA
SEQ ID NO: 118	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE CADENA PESADA VARIABLE DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X6. LAS REGIONES DETERMINANTES DE COMPLEMENTARIEDAD ESTÁN SUBRAYADAS
SEQ ID NO: 119	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE SCFV DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X6. ORDEN: VH – ENLAZADOR – VL. LAS REGIONES DETERMINANTES DE COMPLEMENTARIEDAD ESTÁN SUBRAYADAS. EL ENLAZADOR ESTÁ EN CURSIVA Y NEGRITA
SEQ ID NO: 120	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA LIGERA DE SI-1C6.2
SECUENCIAS SI-1C6.2	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE CADENA LIGERA VARIABLE DE CADENA LIGERA DE SI-1C6.2
SEQ ID NO: 121	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA LIGERA DE SI-1C6.2
SEQ ID NO: 122	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA LIGERA DE SI-1C6.2. EL DOMINIO CONSTANTE KAPPA HUMANO ESTÁ SUBRAYADO
SEQ ID NO: 123	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE CADENA LIGERA VARIABLE DE CADENA LIGERA DE SI-1C6.2. LAS REGIONES DETERMINANTES DE COMPLEMENTARIEDAD ESTÁN SUBRAYADAS
SEQ ID NO: 124	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA PESADA DE SI-1C6.2
SEQ ID NO: 125	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE CADENA PESADA VARIABLE DE CADENA PESADA DE SI-1C6.2
SEQ ID NO: 126	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA PESADA DE SI-1C6.2
SEQ ID NO: 127	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA PESADA DE SI-1C6.2. EL DOMINIO GAMMA-1 HUMANO ESTÁ SUBRAYADO
SEQ ID NO: 128	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE CADENA PESADA VARIABLE DE CADENA PESADA DE SI-1C6.2. LAS REGIONES DETERMINANTES DE COMPLEMENTARIEDAD ESTÁN SUBRAYADAS
SECUENCIAS SI-1X6.4	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA LIGERA DE SI-1X6.4
SEQ ID NO: 129	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE CADENA LIGERA VARIABLE DE CADENA LIGERA DE SI-1X6.4
SEQ ID NO: 130	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA LIGERA DE SI-1X6.4
SEQ ID NO: 131	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA LIGERA DE SI-1X6.4. EL DOMINIO CONSTANTE KAPPA HUMANO ESTÁ SUBRAYADO

(continuación)

SECUENCIAS SI-1X6.4	
SEQ ID NO: 132	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE CADENA LIGERA VARIABLE DE CADENA LIGERA DE SI-1X6.4. LAS REGIONES DETERMINANTES DE COMPLEMENTARIEDAD ESTÁN SUBRAYADAS
SEQ ID NO: 133	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X6.4
SEQ ID NO: 134	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE CADENA PESADA VARIABLE DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X6.4
SEQ ID NO: 135	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE SCFV DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X6.4
SEQ ID NO: 136	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LONGITUD COMPLETA DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X6.4. EL DOMINIO GAMMA-1 HUMANO ESTÁ SUBRAYADO. EL CONECTOR ESTÁ EN CURSIVA. SCFV ESTÁ EN NEGRITA
SEQ ID NO: 137	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE CADENA PESADA VARIABLE DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X6.4. LAS REGIONES DETERMINANTES DE COMPLEMENTARIEDAD ESTÁN SUBRAYADAS
SEQ ID NO: 138	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE SCFV DE CADENA PESADA BIESPECÍFICA DE SI-1X6.4. ORDEN: VH -- ENLAZADOR -- VL. LAS REGIONES DETERMINANTES DE COMPLEMENTARIEDAD ESTÁN SUBRAYADAS. EL ENLAZADOR ESTÁ EN CURSIVA Y NEGRITA

EJEMPLOS

[0033] Si bien los siguientes ejemplos se proporcionan únicamente a modo de ilustración y no de limitación, los expertos en la materia reconocerán fácilmente una variedad de parámetros no críticos que podrían cambiarse o modificarse para producir resultados esencialmente iguales o similares.

Ejemplo 1: Diferencias de secuencia entre SI-1X4 y SI-1X4.2

[0034] SI-1X4.2 es una modificación de la molécula SI-1X4 y contenía 5 cambios de aminoácidos como se indica a continuación: V71A, T75S, N76S, A93T y S107T utilizando el sistema de numeración de Kabat. Algunos de estos cambios, especialmente las posiciones 75, 76 y 93, potencialmente hicieron interacción con el antígeno, aunque no están en los bucles CDR y son esenciales para la unión y la actividad. La Figura 4 muestra las 5 diferencias de aminoácidos entre SI-1X4.2 y SI-1X4.

Ejemplo 2: Caracterización de anticuerpos contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico utilizando BLI

[0035] La unión del dominio extracelular de EGFR monomérico se midió en un ensayo de unión por interferometría de biocapa (BLI) en un instrumento BLItz (ForteBio, Inc.). Se diluyeron 25 µg/mL de SI-1C3, SI-1C4, SI-1C6, SI-1X1, SI-1X2, SI-1X5 y SI-1X6 en PBS y se capturaron en puntas de biosensor BLItz anti-Fc de hulgG durante 120 segundos. Las puntas se lavaron durante 30 segundos en PBS y se trasladaron a una muestra de EGFR (ProSpec Bio, PKA-344) para su unión a 588 nM. La unión del ECD de EGFR a las puntas se registró como señales de interferometría de biocapa (Δ nm) durante un tiempo de asociación de 120 segundos. Las puntas se trasladaron a PBS y se observó la disociación durante 240 segundos (*tiempo de disociación de SI-1C6 observado de solo 120 segundos). Las figuras 5 y 6 describen datos a partir de la etapa de asociación del EGFR con el biosensor cargado con anticuerpos. Cada figura muestra una comparación con SI-1C4 como anticuerpo de referencia.

[0036] Dado que SI-1C3 y SI-1X2 comparten su dominio de unión EGFR mostrado como un Fab, sus perfiles de unión son similares y más fuertes que la forma scFv expresada en SI-1X1 (Figura 6). Cada uno tiene una velocidad de disociación a EGFR muy lenta en comparación con SI-1C4 y no se ve afectado por su velocidad de unión. SI-1X1 puede mostrar una velocidad de unión más débil a EGFR, pero se mantiene unido con mucha fuerza. La misma tendencia se observa en la Figura 5, donde las versiones Fab de los dominios de unión de EGFR que se expresan en SI-1C6 y SI-1X6 se unen a una velocidad más rápida que su scFv representativo que se expresa en SI-1X5. Tener el dominio de unión de EGFR en el lado Fab del anticuerpo biespecífico parece unirse con velocidades de unión más rápidas que las versiones scFv, pero exhiben velocidades de disociación similares. SI-1X3 y SI-1X4 no exhiben unión de EGFR monomérico en este ensayo (datos no mostrados) y la unión de EGFR dimérico se investiga en un ELISA a continuación.

Ejemplo 3: Caracterización de anticuerpos contra EGFR y Her3 utilizando BLI

[0037] La unión biespecífica a los dominios extracelulares de EGFR y Her3 se midió en un ensayo de unión por interferometría de biocapa (BLI) en un instrumento BLItz (ForteBio, Inc.). Se diluyeron 200 nM de SI-1C1, SI-1C3, SI-1C4, SI-1C6, SI-1X1, SI-1X2, SI-1X3, SI-1X4, SI-1X5 y SI-1X6 en tampón cinético 1X (ForteBio, Inc.) y se capturaron en las puntas del biosensor BLItz con Fc de IgG anti-hu durante 120 segundos. Las puntas se lavaron en KB durante 30 segundos y se trasladaron a una muestra de EGFR (ProSpec Bio, PKA-344) para la unión a 200 nM. La unión del ECD de EGFR a las puntas se registró como señales de interferometría de biocapa (Δ nm) durante un tiempo de asociación de 120 segundos. Las puntas se trasladaron a KB y se observó la disociación durante 60 segundos. El proceso se repitió con la muestra de ECD de Her3 (Sino Biological, 10201-H08H-10) a 200 nM durante 120 segundos y una etapa de disociación similar de 60 segundos en KB. Las figuras 8-10 7-9 muestran datos que comienzan en la etapa de asociación de EGFR al biosensor cargado con anticuerpos. Los anticuerpos pueden exhibir una unión biespecífica simultánea de EGFR y Her3 mientras están unidos por el Fc al sensor. Tal como se observa en la Figura 7 y la Figura 8, la visualización del dominio de unión de EGFR como Fab (SI-1X2, SI-1X6) tiene una unión de velocidad de asociación más fuerte que sus formas scFv (SI-1X1, SI-1X5, respectivamente). Aquí, tanto EGFR como Her3 exhiben la misma tendencia de velocidad de asociación $Fa \gg scFv$. SI-1X3 y SI-1X4 no exhiben unión al EGFR monomérico, sin embargo cada uno tiene la capacidad de unirse a Her3, tal como se esperaba ya que cada molécula usa el mismo dominio de unión de α Her3 que SI-1X1, SI-1X2, SI-1X5 y SI-1X6. SI-1X3 y SI-1X4 se investigan para la unión de EGFR dimérico en un ELISA a continuación.

Ejemplo 4: Ensayo de ELISA con EGFR dimérico

[0038] Tal como se observó anteriormente, SI-1X3 y SI-1X4 no pudieron unirse a una forma monomérica de EGFR en un ensayo BLI (Figura 9). Se ha sugerido que para que el dominio de unión de α EGFR utilizado en SI-1C5, SI-1X3 y SI-1X4 se una a EGFR *in vitro*, se requiere una unión bivalente (Pérez et al, *Chin Clin Oncol* 2014; 3(1):5). Para observar esto, utilizamos ELISA para la unión de anticuerpos en relación con otros anticuerpos de unión a EGFR que utilizan una forma dimérica de EGFR.

[0039] Se realizó una ELISA utilizando el reactivo ECD de EGFR dimérico, SI-2C1, fusionado a Fc de conejo creado de forma interna. Se recubrieron inmunoplasmas Maxisorp (Nunc) con EGFR a 3 µg/mL en PBS a 4°C durante la noche. Las placas se bloquearon en PBS con BSA al 3 % y Tween20 al 0,05 % durante 2 horas a temperatura ambiente. Los anticuerpos se capturaron a partir de 10 µg/mL excepto para SI-1C5, SI-1X3 y SI-1X4 que comenzaron a 50 µg/mL (indicado en nM), todos con diluciones 3X en PBST (BSA al 1%) durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo IgG-HRP humano de cabra (Jackson ImmunoResearch, 109-035-098) se utilizó para la detección de la parte Fc de los anticuerpos a una dilución de 1:2000 en PBST (BSA al 1 %) y se reveló en TMB (Thermo Scientific) durante 5 minutos con H₂SO₄ 2 M como solución de parada. Se realizaron 3 lavados con PBST (BSA al 1 %) entre cada etapa. Todos los puntos de datos se realizaron por triplicado y se recopilaron a 450 nm (Figura 10). SI-1C5, SI-1X3 y SI-1X4 se unieron al ECD del EGFR dimérico en este formato de ELISA en altas concentraciones en comparación con las otras moléculas.

Ejemplo 5: Cinética de enlace de 1C5.2 y 1X4.2 utilizando Octet

[0040] Cinética determinada utilizando el instrumento ForteBio Octet Red96 con sensores anti-Fc humano (ForteBio, AHC #18-5060). Experimentos de unión realizados a 30° C con mezcla a 1000 RPM. La proteína EGFR es el dominio extracelular (Met 1-Ser 645) del EGFR humano con una etiqueta de polihistidina C-terminal. Todas las muestras se diluyeron en tampón cinético 10X (ForteBio #18-5032). 1C5.2, 1X6 y 1X4.2 se cargaron en 8 sensores a 10 µg/ml cada uno durante 300 segundos seguido de una línea base durante 60 segundos en tampón cinético 10X. La asociación con la proteína EGFR se realizó durante 300 segundos con cada sensor en una única concentración de proteína EGFR (300, 100, 33,33, 11,11, 3,705, 1,235, 0,4116 y 0 nM). A continuación, se realizó la disociación en tampón cinético 10X durante 900 segundos. En la figura 11 se muestra un trazo típico de asociación y disociación para 1C5.2 y 1X4.2.

[0041] El análisis de datos se realizó utilizando el software de análisis de datos ForteBio v9.0. Se realizó un ajuste de curva de software y se utilizaron los cuatro ajustes de curva más óptimos para cada 1C5.2 (TABLA 2), 1X4.2 (TABLA 3) y 1X6 (TABLA 4) y se promediaron para determinar KD, k(on) y k(dis). La KD promedio para SI-1C5.2 y SI-1X4.2 fue de 19,2 nM y 18,4 nM, respectivamente. La KD promedio para SI-1C6 fue de 3,04 nM. 1C5.2 y 1X4.2 contenían cinco cambios de aminoácidos en comparación con 1C5 y 1X4, tal como se describe en el ejemplo 1. Estos cambios explicaron la unión mejorada al ECD de EGFR en comparación con los datos generados para 1C5 y 1X4 en la Figura 10.

TABLA 2. Resumen de KD, KON y KDIS para 1C5.2

	EGFR (NM)	KD (M)	KON (1/MS)	KDIS(1/S)
SI-1C5.2	300	3,74E-08	4,61E+04	1,72E-03
SI-1C5.2	100	2,23E-08	7,89E+04	1,76E-03
SI-1C5.2	33,3	9,94E-09	1,60E+05	1,59E-03
SI-1C5.2	11,1	7,08E-09	2,12E+05	1,50E-03
PROMEDIOS		1,92E-08	1,24E+05	1,64E-03

TABLA 3. Resumen de KD, KON y KDIS para 1X4.2

	EGFR (NM)	KD (M)	KON (1/MS)	KDIS(1/S)
SI-1X4.2	300	3,69E-08	4,63E+04	1,71E-03
SI-1X4.2	100	2,10E-08	7,88E+04	1,65E-03
SI-1X4.2	33,3	9,44E-09	1,58E+05	1,49E-03
SI-1X4.2	11,1	6,19E-09	2,18E+05	1,35E-03
PROMEDIOS		1,84E-08	1,25E+05	1,55E-03

TABLA 4. Resumen de KD, KON y KDIS para 1X6

	EGFR (NM)	KD (M)	KON (1/MS)	KDIS(1/S)
SI-1C6	300	3,04E-09	4,11E+05	1,25E-03
SI-1C6	100	3,04E-09	4,11E+05	1,25E-03
SI-1C6	33,3	3,04E-09	4,11E+05	1,25E-03
SI-1C6	11,1	3,04E-09	4,11E+05	1,25E-03
PROMEDIOS		3,04E-09	4,11E+05	1,25E-03

Ejemplo 6: Pruebas de unión de anticuerpos biespecíficos de ejemplo a líneas de células tumorales

[0042] Los anticuerpos biespecíficos SI-1X1, SI-1X2, SI-1X3, SI-1X4, SI-1X5 y SI-1X6, así como un control de isotipo, se analizaron para determinar su unión a las líneas de células tumorales A431 (carcinoma epidermoide, ATCC CRL-1555) y BxPC3 (adenocarcinoma pancreático, ATCC CRL-1687) mediante citometría de flujo. Las células se cultivaron en medio RPMI-1640 que contenía 10 % de suero bovino fetal y se recolectaron para su análisis mientras se encontraban en fase de crecimiento exponencial. Se lavaron alícuotas de 5 × 10⁶ células una vez en PBS, a continuación se resuspendieron en 250 µl de PBS + 1 % de albúmina de suero bovino (BSA) y se incubaron a 4 °C durante 15 minutos para bloquear las membranas y evitar la unión no específica. Se añadieron 250 µl de anticuerpo, diluidos a 10 µg/ml en PBS/BSA al 1%, a cada muestra para obtener una concentración final de anticuerpo de 5 µg/ml.

Las células se incubaron en anticuerpo primario durante 1 hora a 4 °C con agitación. A continuación, las células se lavaron dos veces con 1 ml de PBS/1%BSA y, a continuación, se resuspendieron en 500 µl de Fc de IgG antihumano de ratón conjugado con PE y se incubaron a 4 °C con agitación durante 45 minutos. Las muestras se lavaron de nuevo dos veces con 1 ml de PBS/BSA al 1%, se resuspendieron en 300 µl de PBS y se analizaron utilizando un citómetro de flujo FACScalibur. Para cada muestra, se recogieron 10.000 eventos en el canal FL-2. Los histogramas se generaron utilizando el software FCS Express y los histogramas SI-1X se superpusieron con histogramas de la tinción de control de isotipo. Los seis anticuerpos biespecíficos mostraron desplazamientos en el histograma con respecto a la tinción de control, lo que indica unión celular. Estos datos se muestran en la Figura 12 (unión de células A431) y la figura 13 (unión de células BxPC3).

Ejemplo 7: Caracterización de SI-1C5.2 y SI-1X4.2 mediante ensayos de unión celular

[0043] El anticuerpo biespecífico, SI-1X4.2, los anticuerpos monoespecíficos, SI-1C5.2 y SI-1C1, así como un control de isotipo se probaron para la unión a las líneas de células tumorales, A431 (carcinoma epidermoide, ATCC CRL-1555) (Figura 14) y FaDu (carcinoma de células escamosas hipofaríngeo, ATCC HTB-43) (Figura 15) por citometría de flujo. Las células se cultivaron en medio RPMI-1640 que contenía 10% de suero bovino fetal y se recolectaron para el análisis mientras estaban en fase de crecimiento exponencial. Las células se lavaron una vez en PBS, a continuación se resuspendieron en PBS + albúmina de suero bovino fetal (FBS) al 5 % a una concentración de 5×10^5 células/ml y se incubaron a 4°C durante 15 minutos para bloquear las membranas de la unión no específica. Se añadieron alícuotas de 100 µl de células a alícuotas de 100 µl de anticuerpo (también diluido en PBS + FBS al 5 %) en una placa de 96 pocillos. Las muestras se incubaron en anticuerpo primario durante 45 minutos en hielo. Las células se lavaron a continuación dos veces con 200 µl de PBS + FBS al 5 % y a continuación se resuspendieron en 100 µl de IgG-Fc antihumana de ratón conjugada con PE y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Las muestras se lavaron nuevamente dos veces con 200 µl de PBS + FBS al 5 %, se resuspendieron en 200 µl de PBS y se analizaron utilizando un citómetro de flujo FACScalibur. Para cada muestra, se recolectaron 10000 eventos en el canal FL-2. Los histogramas se analizaron utilizando el software FCS Express y se determinó la intensidad de fluorescencia media geométrica (IFMG) para cada conjunto de datos. Los valores de unión de EC50 se determinaron representando la IFMG frente a la concentración de anticuerpos utilizando el software Graphpad Prism. El anticuerpo biespecífico, SI-1X4.2 mostró un perfil de unión similar al anticuerpo anti-EGFR monoespecífico, SI-1C5.2 con EC50 similar en ambas líneas celulares. El otro anticuerpo anti-Her3 monoespecífico, SI-1C1, se une débilmente a las dos líneas celulares probablemente debido al bajo nivel de expresión de Her3 en la superficie de las células. 1C5.2 y 1X4.2 contenían cinco cambios de aminoácidos en comparación con 1C5 y 1X4, tal como se describe en el ejemplo 1. Estos cambios explicaron una mejor unión a las células diana en comparación con la molécula parental, 1X4.

Ejemplo 8: Efecto antiproliferativo de los anticuerpos SI-1X en líneas de células tumorales

[0044] Para evaluar el potencial inhibidor del crecimiento de los anticuerpos biespecíficos anti-Her3/EGFR, se analizó el efecto sobre la proliferación de células A431 (ATCC CRL-1555, Manassas, Va.), que son una línea tumoral de carcinoma epidermoide. También se analizó el efecto sobre la proliferación de BxPC3 (ATCC CRL-1687, Manassas, Va.), una línea tumoral de adenocarcinoma pancreático. Para cada línea, se sembraron células en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos a una densidad de 6000 células/pocillo en 100 µl de medio RPMI-1640 que contenía 1% de suero bovino fetal. Después de 4 horas, se añadieron los anticuerpos de prueba a diversas concentraciones, que oscilaban de 0,0015 nM a 100 nM. Las células se cultivaron en presencia de anticuerpos de prueba durante 72 horas. A cada pocillo se le añadieron 20 µl de reactivo MTS (Promega, Madison, WI) y las células se incubaron a 37 °C durante 2 horas. Las células que proliferan activamente absorben fácilmente el MTS, lo reducen a formazán (que absorbe fácilmente la luz a 490 nm) y a continuación lo secretan al medio de cultivo. Después de la incubación, se midieron los valores de DO490 utilizando un lector de absorbancia BioTek (Winooski, VT) ELx800. Los valores de DO490 para las células de control (tratadas solo con medio) también se obtuvieron de esta manera en el momento de la adición del anticuerpo para establecer la actividad metabólica basal (en la línea base). La proliferación se puede calcular restando la DO490 basal del control de la DO490 a las 72 horas. Los datos de las titulaciones de anticuerpos se expresaron en % de la población de control según la siguiente fórmula: % de proliferación de control = (proliferación de prueba / proliferación de control)*100.

[0045] Los efectos de varios anticuerpos anti-Her3/anti-EGFR biespecíficos sobre la proliferación de células A431 se muestran en la Figura 16 y la Figura 17. SI-1X2 demostró un efecto antiproliferativo más eficaz que los anticuerpos de control SI-1C1 (anti-Her3), SI-1C3 (anti-EGFR) o SI-1C1 y SI-1C3 aplicados juntos. SI-1X1 exhibió efectos antiproliferativos, aunque no en el grado observado con SI-1C3 y la combinación de SI-1C1 y SI-1C3. Los gráficos de inhibición, así como los valores de IC50, se muestran en la Figura 17. Se observaron resultados similares para SI-1X5 y SI-1X6, donde SI-1X6 es más potente que SI-1X5 y el anticuerpo de control SI-1C1 (anti-Her3), sin embargo mostró un potencial antiproliferativo similar al del anticuerpo de control SI-1C6 (anti-EGFR) y la combinación de SI-1C1 y SI-1C6. Esto puede verse junto con los valores de IC50 en la Figura 17.

[0046] Estas moléculas también se probaron para determinar sus efectos antiproliferativos en la línea celular BxPC3 (Figura 18 y Figura 19). Nuevamente, SI-1X2 demostró un efecto antiproliferativo más eficaz que los anticuerpos de control SI-1C1 (anti-Her3), SI-1C3 (anti-EGFR) o SI-1C1 y SI-1C3 aplicados juntos. SI-1X1 fue más eficaz que SI-1C1, pero más débil que SI-1C3 y la combinación de SI-1C1 y SI-1C3. Las curvas de inhibición y los valores de IC50 se

muestran en la Figura 19. La proliferación de BxPC3 fue inhibida más fuertemente por SI-1X5 y SI-1X6 que por los anticuerpos de control SI-1C1 (anti-Her3), SI-1C6 (anti-EGFR) o SI-1C1 y SI-1C6 en combinación. Estos datos junto con los valores de IC50 se muestran en la Figura 19.

5 Ejemplo 9: Efecto antiproliferativo de SI-1C5.2 y SI-1X4.2 sobre líneas de células tumorales

[0047] Para evaluar el potencial inhibidor del crecimiento de los anticuerpos biespecíficos anti-Her3/EGFR, se analizó el efecto sobre la proliferación de células FaDu (línea de carcinoma de células escamosas nasofaríngeas, ATCC HTB-43) y A431 (carcinoma epidermoide, ATCC CRL-1555). Las células se sembraron en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos a una densidad de 6000 células/pocillo en 100 µl de medio RPMI-1640 que contenía 1 % de suero bovino fetal. Después de 4 horas, se añadieron los anticuerpos de prueba a diversas concentraciones, que oscilaban de 0,0015 nM a 100 nM. Las células se cultivaron en presencia de los anticuerpos de prueba durante 72 horas. A cada pocillo, se añadieron 11 µl de reactivo azul de alamar (Thermo Scientific) y las células se incubaron a 37 °C durante 2 horas. Las células que proliferan activamente absorben fácilmente el azul de alamar, lo reducen y a continuación lo secretan en el medio de cultivo. La forma reducida del azul de alamar es muy fluorescente. Después de la incubación, se midió la fluorescencia utilizando un lector de placas multimodo FilterMax F5 de Molecular Devices (Sunnyvale, CA) utilizando una longitud de onda de excitación de 535 nm y una longitud de onda de emisión de 595 nm. Los valores de fluorescencia de las células de control (tratadas solo con medio) también se obtuvieron de esta manera en el momento de la adición del anticuerpo para establecer la actividad metabólica basal. La proliferación se puede calcular restando la fluorescencia basal del control de los valores de fluorescencia a las 72 horas. Los datos de las titulaciones de anticuerpos se expresaron como % de la población de control de acuerdo con la siguiente fórmula: % de proliferación de control = (proliferación de prueba / proliferación de control)*100.

[0048] Los efectos de SI-1C5.2 y SI-1X4.2 sobre la proliferación de células Fadu y A431 se muestran en la Figura 20 y la Figura 21, respectivamente. En ambas líneas celulares, SI-1X4.2 demostró un efecto antiproliferativo eficaz mejorado que los anticuerpos de control, SI-1C5.2 (Mab anti-EGFR), SI-1C1 (Mab anti-Her3) o SI-1C1 y SI-1C7 aplicados juntos.

30 Ejemplo 10: Actividades ADCC de los anticuerpos biespecíficos SI-1X

[0049] Se probó la capacidad de los anticuerpos SI-1X para mediar la citotoxicidad celular contra varias líneas de células tumorales. Se obtuvo sangre completa de voluntarios sanos y normales. La sangre se diluyó con un volumen igual de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se colocaron cuidadosamente en capas alícuotas de 20 ml de sangre diluida sobre 15 ml de Ficol Pacque PLUS (GE Life Sciences cat# 17-1440-02; Pittsburgh, PA). Los tubos se centrifugaron a 300 g durante 40 minutos sin interrupción. Después de la centrifugación, se aspiró cuidadosamente la mayor parte de la capa de plasma y se eliminó cuidadosamente la capa leucocítica (que contenía PBMC) con una pipeta en el menor volumen posible. Las PBMC se agruparon en tubos de 50 ml y se añadió PBS para llevar cada tubo hasta 50 ml. Los tubos se centrifugaron a 1300 RPM durante 10 minutos y se aspiró cuidadosamente el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 40 ml de PBS y se centrifugaron nuevamente. El proceso se repitió para un total de 2 lavados. Después del lavado final, las células se resuspendieron en 30 ml de RPMI-1630 + 10 % de FBS y se incubaron durante la noche a 37 °C, 5 % de CO₂.

[0050] Las células diana analizadas fueron la línea de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, FaDu (ATCC HTB-43, Manassus, VA) y la línea de células de adenocarcinoma de pulmón de células no pequeñas, NCI-H1975 (ATCC CRL-5908, Manassus, VA). Las células diana se marcaron con calceína de la siguiente manera. Las células se cultivaron como monocapas y se separaron mediante incubación con accutase. Las células se lavaron dos veces en RPMI sin suero. 1 ml de células a 4×10^6 células/ml se mezcló con 1 ml de RPMI (sin suero) + 20 µM de calceína AM (Sigma cat# C1359; St. Louis, MO). Las células se incubaron a 37 °C durante 30 minutos, con mezcla suave cada 10 minutos. Después del marcado, las células se lavaron dos veces con 14 ml de RPMI + FBS al 10 % + 2,5 mM de probenecid (medio de ensayo). El probenecid (Sigma cat. n.º P8761; St. Louis, MO) es un inhibidor del transportador aniónico y se sabe que reduce la liberación espontánea de calceína intracelular. Las células se resuspendieron en 20 ml de medio de ensayo y se dejaron recuperar durante 2 horas a 37 °C, 5 % de CO₂. A continuación, las células se lavaron una vez con medio de ensayo y se diluyeron a 200 000 células/ml. Se llevaron alícuotas de 50 µl (10 000 células) de células marcadas con calceína a placas de fondo redondo de 96 pocillos. Se añadieron 50 µl de anticuerpo (a una concentración final de 3X) a las células y se dejó que se unieran durante 40 minutos en hielo. Las PBMC del día anterior se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos, se resuspendieron en 20 ml de medio de ensayo fresco, se contaron y se diluyeron a 6×10^6 células/ml. Se añadieron 50 µl de PBMC (300.000) a cada pocillo y las placas se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ durante 4 horas. Cada anticuerpo se tituló por triplicado mediante diluciones en serie de 10 veces, comenzando con 50 nM y bajando hasta 0,00005 nM. También se prepararon pocillos de control que contenían células diana marcadas en ausencia de anticuerpos y células efectoras para medir la liberación máxima y espontánea de calceína.

[0051] Al final de la incubación de 4 horas, se añadieron 50 µl de medio de ensayo que contenía 8 % de IGEPA CA-630 (Sigma cat# I8896; St. Louis, MO) a los pocillos de control que contenían únicamente células diana marcadas (para medir la liberación máxima de calceína). Se añadieron 50 µl de medio de ensayo a todos los demás pocillos para llevar el volumen total a 200 µl por pocillo. Las placas se centrifugaron a 2000 RPM durante 10 minutos y se

transfrieron cuidadosamente 150 µl de sobrenadante a placas de 96 pocillos con fondo en V. Estas placas se centrifugaron a 2000 RPM durante 10 minutos adicionales y se transfirieron cuidadosamente 100 µl de sobrenadante a placas de 96 pocillos de fondo transparente y negro. La calceína presente en el sobrenadante se cuantificó midiendo la fluorescencia de cada muestra utilizando una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 535 nm. El porcentaje de lisis específica se calculó de la siguiente manera:

% de lisis específica = [(valor de la muestra de prueba - liberación espontánea)/(liberación máxima - liberación espontánea)]*100

[0052] Los datos se muestran en la Figura 22 y la Figura 23. En ambas líneas celulares, SI-1X6.4 medió la citotoxicidad celular, pero no fue particularmente más eficaz que los anticuerpos de control, SI-1C6.2, SI-1C7, o la combinación de SI-1C6.2 + SI-1C7. SI-1X6.4 sí medió la citotoxicidad con una EC50 menor que nuestro anticuerpo de referencia, SI-1C4. En ambas líneas celulares, SI-1X4.2 medió la citotoxicidad celular aproximadamente en el mismo grado que los anticuerpos de control. Sin embargo, no fue tan eficaz como mediador de la citotoxicidad celular como el anticuerpo de referencia, SI-1C4. Esto probablemente se deba a la menor afinidad de SI-1X4.2.

Ejemplo 11: Estabilidad térmica de los anticuerpos biespecíficos SI-1X

[0053] Se realizó un estudio de desplazamiento térmico de proteínas para el análisis de la estabilidad térmica de las proteínas. Las reacciones de fusión de proteínas se configuraron utilizando Protein Thermal Shift Buffer™ y Protein Thermal Shift Dye™ (Applied Biosystems). En resumen, la mezcla de reacción de 20 µl contiene 5 µg de proteína, 5 µl de Protein Thermal Shift Buffer™ y 2,5 µl de Protein Thermal Shift™ Dye diluido 8X. Para el control negativo, se utilizó PBS en su lugar. La mezcla de reacción se añadió a la placa de reacción óptica MicroAmp y se selló con película adhesiva óptica MicroAmp. Cada muestra consistió en 4 repeticiones. Las reacciones de fusión de proteínas se realizaron en el sistema de PCR en tiempo real de Applied Biosystem de 25 a 90 °C en incrementos del 1 °C y a continuación se analizaron mediante el software Protein Thermal Shift™. La Figura 24 muestra la curva térmica de SI-1X2, SI-1X4.2, SI-1X6.4, SI-1C3, SI-1C6.2, SI-1C5.2 y SI-1C7. La tabla 5 muestra la Tf para estas moléculas se define como la temperatura necesaria para desplegar el 50 % de la proteína. Las moléculas biespecíficas 1X2, 1X4.2 y 1X6 tienen todas una Tf de alrededor de 66 °C, que es comparable a la de todos los MAbs (1C3, 1C6.2, 1C5.2) y las moléculas Fc-scFv (1C7).

TABLA 5

Nombre de proteína	Tf (°C)
SI-1X2	66,52
SI-1C3	70,06
SI-1X4.2	66,94
SI-1C5.2	70,26
SI-1X6.4	66,50
SI-1C6.2	70,12
SI-1C7	66,40

Ejemplo 12: Estabilidad sérica de los anticuerpos biespecíficos SI-1X

[0054] La estabilidad sérica de las moléculas SI-1C5.2, SI-1C6.2, SI-1X4.2 y SI-1X6.4 se determinó mediante la unión comparativa al ECD de EGFR monomérico mediante ELISA después de la incubación a 100 µg/ml en suero humano al 95 % (Atlanta Biologics, S40110) a 37 °C durante los puntos de tiempo de los días 0, 3 y 7 con un punto de tiempo adicional de 55 °C el día 7 para proporcionar una condición conocida en la que se produce la degradación. Las placas de ELISA se recubrieron con ECD de EGFR monomérico (SI-2R4) a 3 µg/ml en PBS a 4 °C durante la noche. Las placas de ELISA recubiertas se bloquearon con PBST con BSA al 3 % durante 2 horas a 25 °C y a continuación se lavaron 3 veces con PBST. SI-1C6.2 y SI-1X6.4 se diluyeron 1:10 con PBST con BSA al 1% y se diluyeron 4 veces en toda la placa. SI-1C5.2 y SI-1X4.2 se diluyeron 1:2 con PBST con BSA al 1% y se diluyeron 4 veces en toda la placa y se incubaron a 25 °C durante 1 hora. Se realizaron 3 lavados más con PBST antes de la captura de antígeno con 1 µg/mL de IgG1 de conejo con ECD de Her3 (SI-1R1) durante 1 hora a 25 °C en PBST con BSA al 1%. Se realizaron 3 lavados más con PBST antes de aplicar el anticuerpo secundario IgG-HRP de cabra anti-conejo (Bio-Rad 172-1019) a una dilución de 1:5000 en PBST con BSA al 1% a 25 °C durante 1 hora. 3 lavados finales con PBST antes del revelado con 100 µl de Pierce 1-step Ultra TMB ELISA (Pierce, 34028) durante 10 minutos con una detención final con 100 µl de H₂SO₄ 2 M. Las placas se leyeron a 450 nm. Los datos de ELISA se representaron y se crearon curvas utilizando GraphPad Prism 6.

[0055] Los resultados del ELISA se indican mediante EC50 en la Figura 25 e indican un perfil favorable de degradación menor cuando se mantienen a 37 °C. Cuando se colocan a 55 °C, la EC50 cambia aproximadamente un logaritmo a medida que las moléculas se someten a condiciones de degradación. Los valores de EC50 para SI-1C5.2 se desplazan de 589,7 pM el día 0 a 755,2 pM el día 7 a 37 °C (Δ165,5 pM) con un desplazamiento a 6,522 nM el día 7 a 55 °C (Δ5932,3 pM). Los valores de EC50 para SI-1C6 se desplazan de 218,2 pM el día 0 a 226,6 pM el día 7 a 37 °C (Δ8,4 pM) con un desplazamiento a 1,322 nM el día 7 a 55 °C (Δ1103 pM). Los valores de EC50 para SI-1X4.2 se desplazan de 429,3 pM el día 0 a 466,7 pM el día 7 a 37 °C (Δ37,4 pM) con un desplazamiento a 4,248 nM el día 7 a 55 °C

($\Delta 3818,7$ pM). Los valores de EC₅₀ para SI-1X6 se desplazan de 209,3 pM el día 0 a 237,3 pM el día 7 a 37 °C ($\Delta 28$ pM) con un desplazamiento a 4,112 nM el día 7 a 55 °C ($\Delta 3902,7$ pM).

Ejemplo 13: Semivida PK de las moléculas SI-1X

[0056] Para probar su semivida in vivo, se realizaron experimentos farmacocinéticos en ratas SD. Se administró una única inyección intravenosa en la vena de la cola de Abs biespecíficos (1C6 10 mg/kg, 1X6 10 mg/kg, 1X2 10 mg/kg, 1X4 32 mg/kg) a grupos de 4 ratas hembras aleatorizadas por peso corporal (rango de 190-212 g). Se extrajo sangre (~150 μ L) del plexo orbital en cada punto de tiempo, se procesó para el suero y se almacenó a -80 °C hasta el análisis. La duración del estudio fue de 28 días.

[0057] Las concentraciones de anticuerpos se determinaron utilizando tres ensayos ELISA. En el ensayo 1 (ELISA recubierto con ECD de EGFR), se revistió la placa con Fc de conejo con EGFR recombinante, los pocillos se lavaron con PBST (solución salina tamponada con fosfato con Tween al 0,05 %) y se bloquearon con BSA al 1 % en PBST. A continuación, se añadió suero o patrones diluidos con suero, seguido de lavado con PBST, adición de IgG antihumana de conejo marcada con HRP (BOSTER) y lavado adicional con PBST. A continuación, se añadió TMB y las placas se incubaron 2,5 minutos en la oscuridad. La reacción de color se detuvo añadiendo ácido sulfúrico 2 M. La placa se leyó a una longitud de onda de 450 nm. Para el ensayo 2 (ELISA recubierto con Her3), se detectó suero utilizando un ELISA similar, pero se utilizó HER3-His recombinante como reactivo de captura. Para el ensayo 3 (ELISA tipo sándwich), se recubrió con HER3-His recombinante, se añadió suero o patrón diluido en suero, seguido de lavado con PBST, adición de EGFR-Fc de conejo en PBST y lavado adicional con PBST. A continuación se añadió IgG de cabra anti-conejo marcada con HRP (BOSTER). Los parámetros farmacocinéticos se determinaron con un modelo no compartimental.

[0058] Las Figuras 26-28 muestran datos de concentración sérica de cuatro anticuerpos con tres ensayos diferentes, respectivamente. Los parámetros farmacocinéticos ajustados a partir de los estudios farmacocinéticos in vivo se proporcionan en la TABLA 6. Los datos farmacocinéticos incluyen la semivida, que representa la fase beta que caracteriza la eliminación del anticuerpo del suero, y la C_{max}, que representa la concentración sérica máxima observada, y el AUC, que representa el área bajo la curva de concentración-tiempo.

TABLA 6

Ensayo	Muestra	Semivida (h)	C _{max} (μ g/ml)	AUC (μ g/ml*h)
ELISA recubierto con EGFR	SI-1X6	159	325,5	18250,6
	SI-1X2	130	280,3	18889,8
	SI-1X4.2	146	627,8	31317,0
	SI-1C6	130	196,4	3790,3
ELISA recubierto con Her3	SI-1X6	142	236,7	14213,6
	SI-1X2	135	264,8	19012,2
	SI-1X4.2	124	715,6	40063,4
ELISA Sandwich	SI-1X6	136	301,6	14182,6
	SI-1X2	123	297,6	17203,9
	SI-1X4.2	211	518,9	34874,6

Ejemplo 14: Estudios de xenoinjerto en ratones

[0059] El ejemplo probó la actividad de SI-1X2, SI-1X4.2 y SI-1X6 del bloqueo concomitante de EGFR, HER3 en modelos preclínicos de Fadu (modelo de xenoinjerto de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello) y comparó su potencia con cetuximab y cetuximab en combinación con un anticuerpo anti-HER3.

[0060] Todos los estudios con ratones se llevaron a cabo a través del Institutional Animal Care y se utilizaron protocolos para animales aprobados por el comité de acuerdo con las pautas institucionales. Se adquirieron ratones desnudos Balb/c hembra de seis semanas de edad de Beijing Vital River Laboratories y se alojaron en cabinas de flujo laminar con filtro de aire con un ciclo de luz de 12 horas y comida y agua ad libitum. El tamaño de los grupos de animales se calculó para medir la diferencia de medias entre los grupos placebo y de tratamiento del 25% con una potencia del 80% y un valor P de 0,01. Los ratones hospedadores que portaban xenoinjertos se asignaron de forma aleatoria e igualitaria a los grupos de control o de tratamiento. Los experimentos con animales se llevaron a cabo de forma controlada y no ciega. Para los estudios de xenoinjertos derivados de líneas celulares, se inyectó a los ratones por vía subcutánea 2x10⁶ Fadu suspendido en 150 μ L de medio de cultivo por ratón.

[0061] Una vez que los tumores alcanzaron un volumen promedio de 100-250 mm³, los ratones se aleatorizaron en 9 grupos, con 6 ratones por grupo. Control de vehículo, 1C6 (25 mg/kg), 1C4 (25 mg/kg), 1C6 + 1C1 (25 mg/kg + 50 mg/kg), SI-1X2 (25 mg/kg), SI-1X6 (10 mg/kg), SI-1X6 (25 mg/kg) y SI-1X4.2 (10 mg/kg), SI-1X4 (25 mg/kg). Todos los artículos de prueba se administraron una vez por semana mediante inyección intravenosa. Los tumores se midieron

con un calibrador digital durante todo el período de tratamiento cada 3 días y el volumen se determinó utilizando la siguiente fórmula: $\frac{1}{2} \times \text{largo} \times \text{ancho}^2$. El peso corporal de los ratones se registró antes de la primera dosis y a continuación cada semana durante el período de tratamiento y el período de recuperación.

- 5 [0062] Todos los grupos de prueba de SI-1X2, SI-1X6 y la combinación de SI-1X4.2 y SI-1X6 produjeron una inhibición significativa del crecimiento tumoral en comparación con el control positivo de SI-1C6 excluyendo el grupo de dosis baja de SI-1X4.2 10 mg/kg (Figuras 29-30). Además, no se observaron recaídas 2 semanas después de la interrupción del tratamiento, excluyendo el grupo de dosis baja de SI-1X4.2 10 mg/kg.

10 Composiciones farmacéuticas

- 15 [0063] El término "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un fármaco eficaz para lograr un efecto deseado, por ejemplo, para mejorar una enfermedad en un sujeto. Cuando la enfermedad es un cáncer, la cantidad eficaz del fármaco puede inhibir (por ejemplo, ralentizar en cierta medida, inhibir o detener) una o más de las siguientes características de ejemplo, que incluyen, sin limitación, el crecimiento de células cancerosas, la proliferación de células cancerosas, la motilidad de células cancerosas, la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos, la metástasis tumoral y el crecimiento tumoral. Cuando la enfermedad es un cáncer, la cantidad eficaz del fármaco puede realizar alternativamente una o más de las siguientes acciones cuando se administra a un sujeto: ralentizar o detener el crecimiento tumoral, reducir el tamaño del tumor (por ejemplo, el volumen o la masa), aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el cáncer, prolongar la supervivencia libre de progresión, dar como resultado una respuesta objetiva (que incluye, por ejemplo, una respuesta parcial o una respuesta completa) y aumentar el tiempo de supervivencia general. En la medida en que el fármaco pueda prevenir el crecimiento y/o matar las células cancerosas existentes, es citostático y/o citotóxico.

- 25 [0064] Con respecto a la formulación de composiciones adecuadas para administración a un sujeto, tal como un paciente humano que necesita tratamiento, los anticuerpos divulgados en el presente documento pueden mezclarse o combinarse con portadores farmacéuticamente aceptables conocidos en la técnica, dependiendo de la vía de administración elegida. No existen limitaciones particulares para los modos de aplicación de los anticuerpos divulgados en el presente documento, y la elección de vías de administración adecuadas y composiciones adecuadas son conocidas en la técnica sin experimentación indebida.

- 35 [0065] Aunque son posibles muchas formas de administración, una forma de administración de ejemplo sería una solución para inyección, en particular para inyección intravenosa o intraarterial. Habitualmente, una composición farmacéutica adecuada para inyección puede incluir portadores o excipientes farmacéuticamente adecuados, tales como, sin limitación, un tampón, un surfactante o un agente estabilizador. Los tampones de ejemplo pueden incluir, sin limitación, tampón de acetato, fosfato o citrato. Los surfactantes de ejemplo pueden incluir, sin limitación, polisorbato. El estabilizador de ejemplo puede incluir, sin limitación, albúmina humana.

- 40 [0066] De manera similar, los expertos en la materia tienen la capacidad de determinar la cantidad o concentración efectiva de los anticuerpos divulgados en el presente documento para tratar de manera efectiva una afección, tal como el cáncer. Otros parámetros, tales como las proporciones de los diversos componentes en la composición farmacéutica, las dosis y frecuencia de administración, pueden ser obtenidos por los expertos en la materia sin una experimentación indebida. Por ejemplo, una solución adecuada para inyección puede contener, sin limitación, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg de anticuerpos por ml.
- 45 La dosis de ejemplo puede ser, sin limitación, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 mg/Kg de peso corporal. La frecuencia de administración de ejemplo podría ser, sin limitación, una vez al día o tres veces a la semana.

- 50 [0067] Si bien la presente divulgación se ha descrito con referencia a realizaciones o ejemplos particulares, se puede entender que las realizaciones son ilustrativas y que el alcance de la divulgación no está limitado de esa manera. Realizaciones alternativas de la presente divulgación pueden resultar evidentes para aquellos que tengan conocimientos ordinarios de la técnica a la que pertenece la presente divulgación. En consecuencia, el alcance de la presente divulgación está definido por las reivindicaciones adjuntas y está respaldado por la descripción anterior.

55

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo tetravalente biespecífico, comprendiendo dicho anticuerpo tetravalente biespecífico:
un primer polipéptido de cadena pesada de IgG1, conector y dominio de cadena única Fv (scFv) que comprende la
5 SEQ ID NO: 136;
un segundo polipéptido de cadena pesada de IgG1, conector y dominio scFv que comprende la SEQ ID NO: 136;
un primer polipéptido de cadena ligera kappa que comprende la SEQ ID NO: 131; y
un segundo polipéptido de cadena ligera kappa que comprende la SEQ ID NO: 131;
10 en el que la primera y segunda cadenas pesadas de IgG1 y la primera y segunda cadenas ligeras kappa forman un
resto de IgG con una especificidad de unión para EGFR; y
en el que el primer y segundo dominios scFv tienen cada uno una especificidad de unión para HER3
2. Ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo tetravalente biespecífico de la reivindicación 1.
- 15 3. Vector de expresión que comprende el ácido nucleico aislado de la reivindicación 2.
4. Célula huésped que comprende: el ácido nucleico aislado de la reivindicación 2; o
el vector de expresión de la reivindicación 3, preferiblemente en la que la célula huésped es una célula procariota o
una célula eucariota.
- 20 5. Inmunoconjugado que comprende el anticuerpo de la reivindicación 1 y un agente citotóxico.
6. Composición farmacéutica, que comprende el anticuerpo tetravalente biespecífico de la reivindicación 1 y un
portador farmacéuticamente aceptable.
- 25 7. Composición farmacéutica, según la reivindicación 6, que comprende además un radioisótopo, un radionúclido, una
toxina, un agente terapéutico, un agente quimioterapéutico o una combinación de los mismos.
8. Composición farmacéutica, que comprende el inmunoconjugado de la reivindicación 5 y un portador
30 farmacéuticamente aceptable.

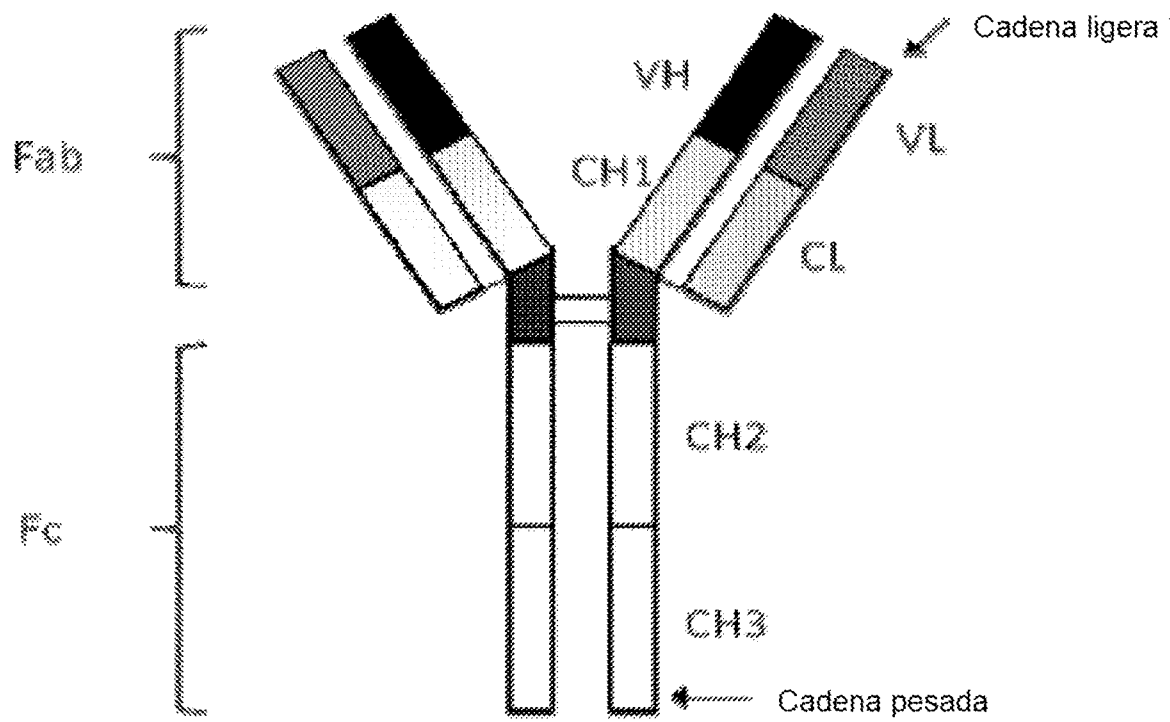


FIG. 1 (Técnica anterior)

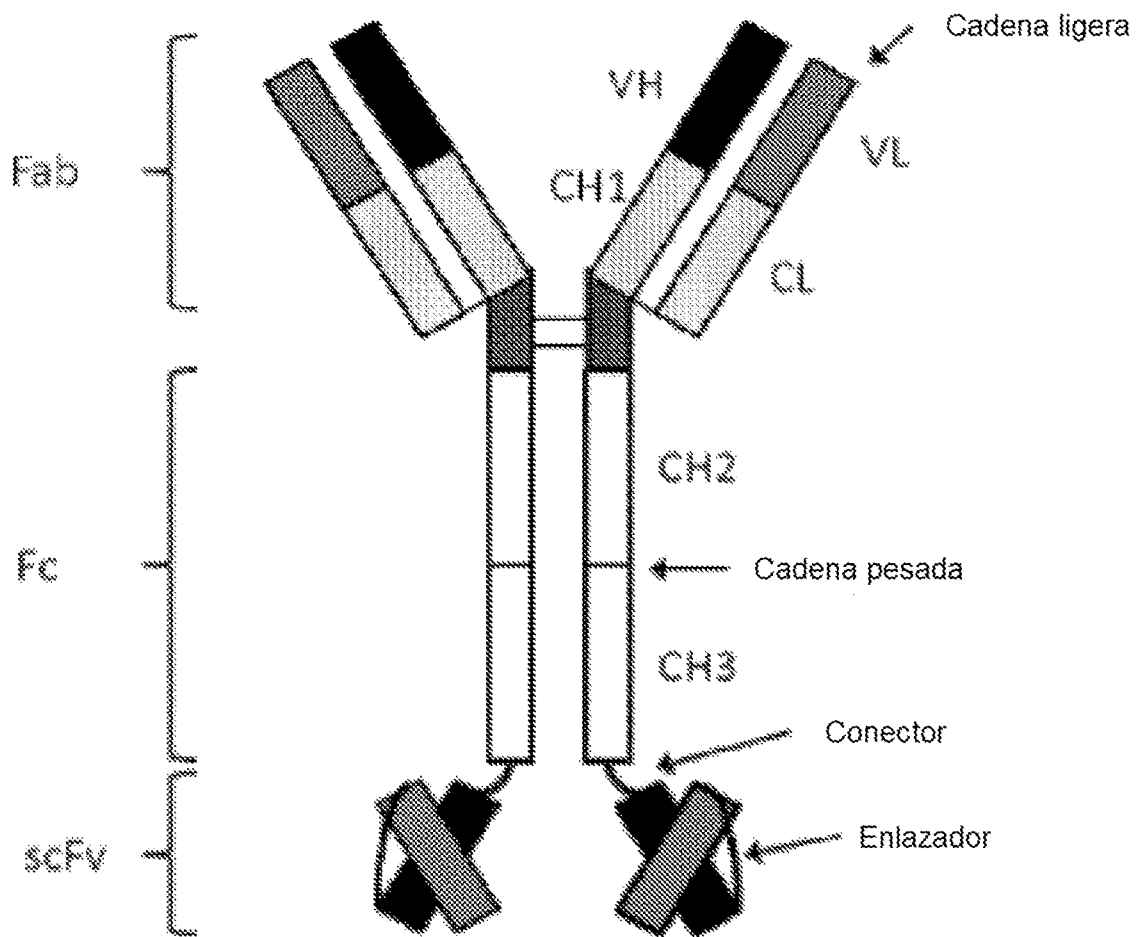


FIG. 2

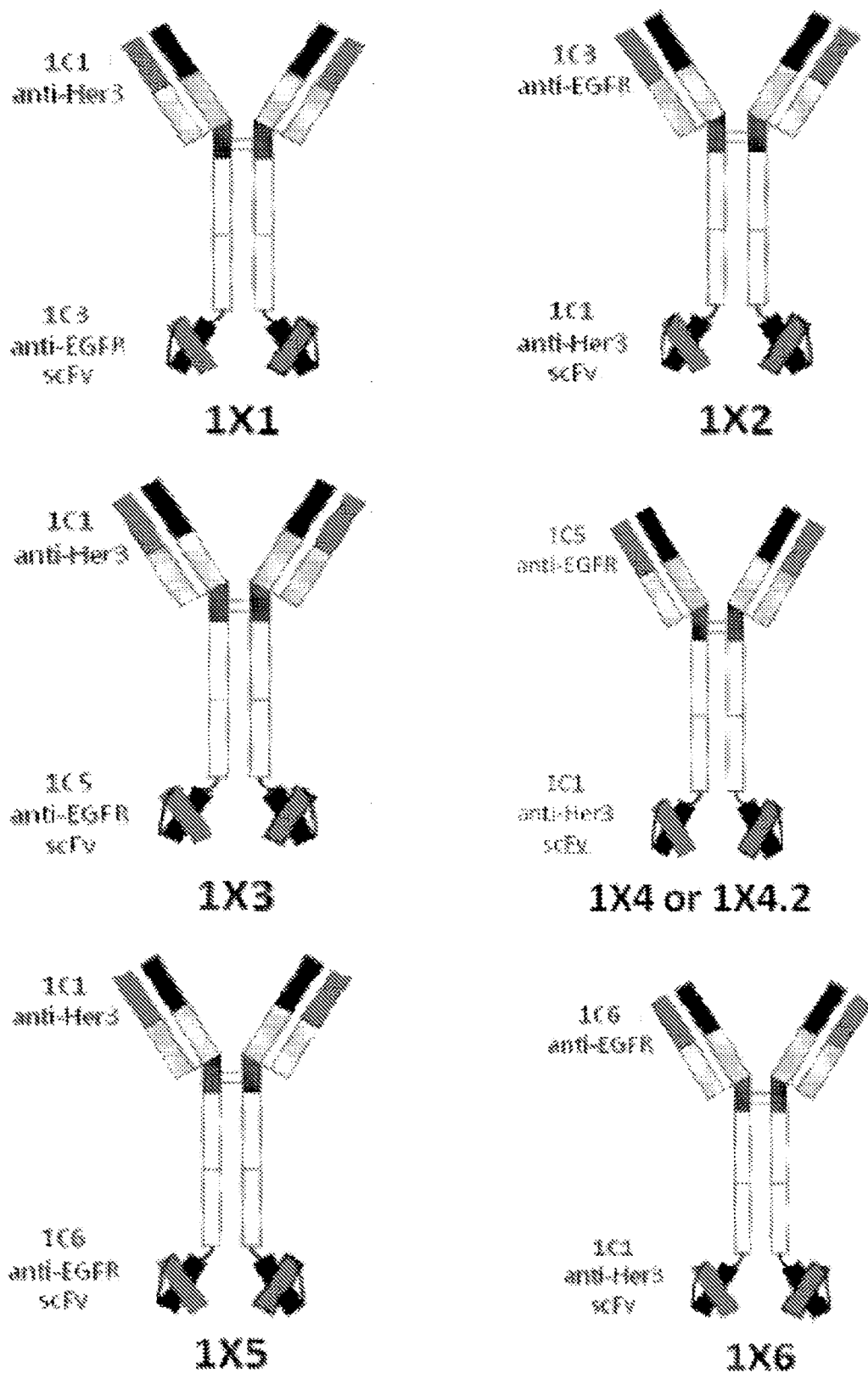


FIG. 3

	(1)	1	10	20	30	40	50
S-1X4 VH	(1)	DVQLQQSGAEVWNPQSSVWVSCNLSGYTFTNYIYVWVQAPGQGLEWIGGIN					
S-1X4.2 VH	(1)	DVQLQQSGAEVWNPQSSVWVSCNLSGYTFTNYIYVWVQAPGQGLEWIGGIN					
consenso	(1)	DVQLQQSGAEVWNPQSSVWVSCNLSGYTFTNYIYVWVQAPGQGLEWIGGIN					
Sección 2							
	(53)	53	60	70	80	90	104
S-1X4 VH	(53)	PTSGGSENFNEKFKTRVITITDESSITAYMELSSLSSEDTAFYFCRQGLWFD					
S-1X4.2 VH	(53)	PTSGGSENFNEKFKTRVITITDESSITAYMELSSLSSEDTAFYFCRQGLWFD					
consenso	(53)	PTSGGSENFNEKFKTRVITITDESSITAYMELSSLSSEDTAFYFCRQGLWFD					
Sección 3							
	(105)	105	110	123			
S-1X4 VH	(105)	SDGRGFDFFWCGCGSTVTVSS					
S-1X4.2 VH	(105)	SDGRGFDFFWCGCGSTVTVSS					
consenso	(105)	SDGRGFDFFWCGCGSTVTVSS					

FIG. 4

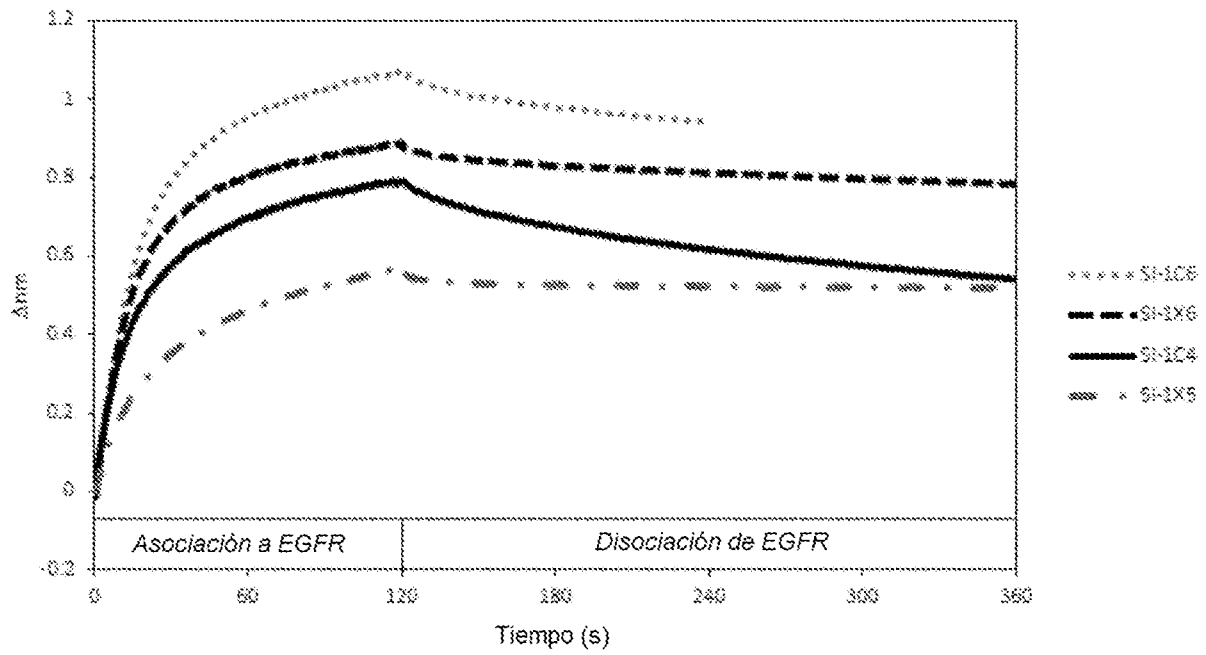


FIG. 5

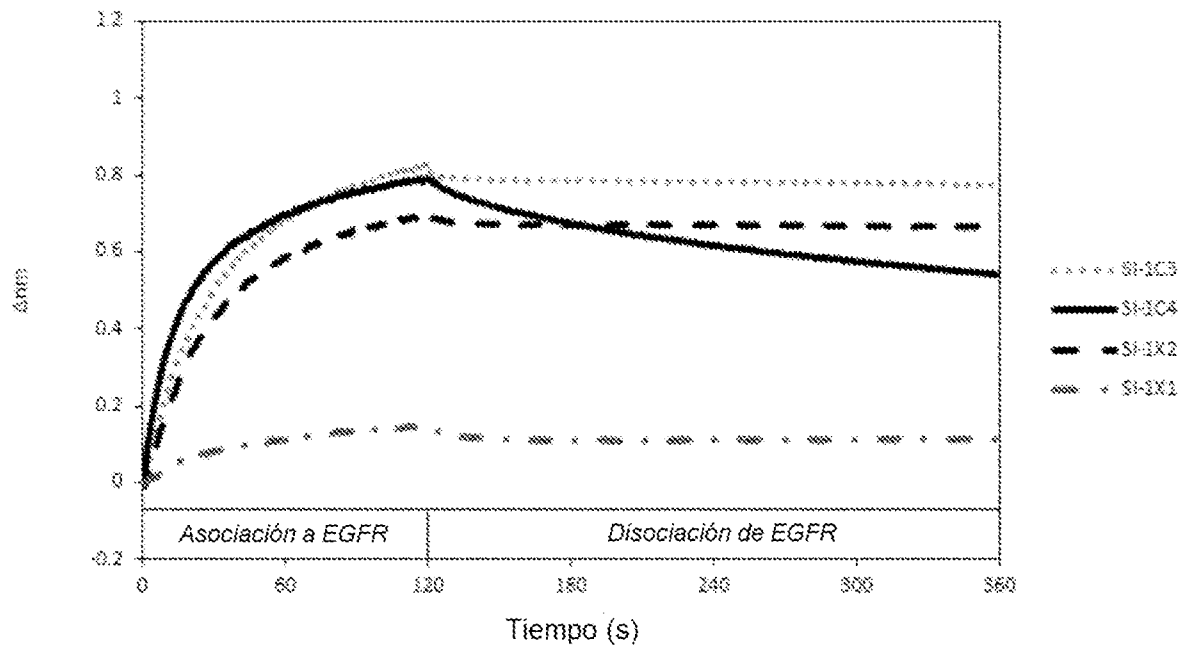


FIG. 6

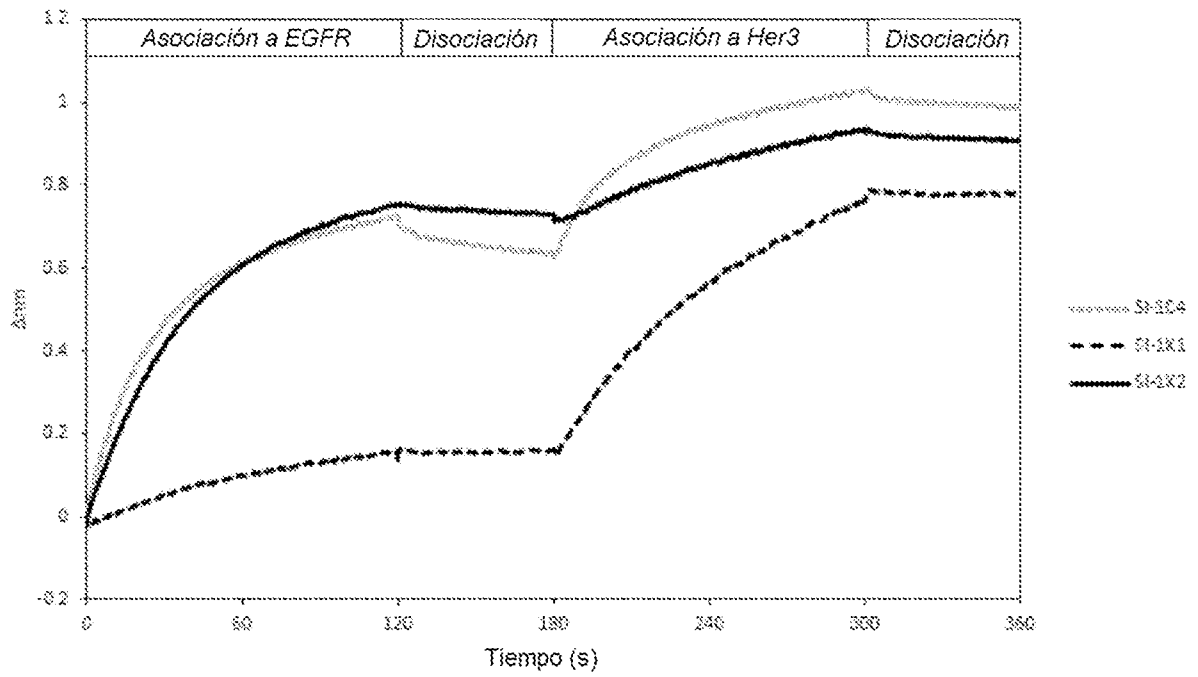


FIG. 7

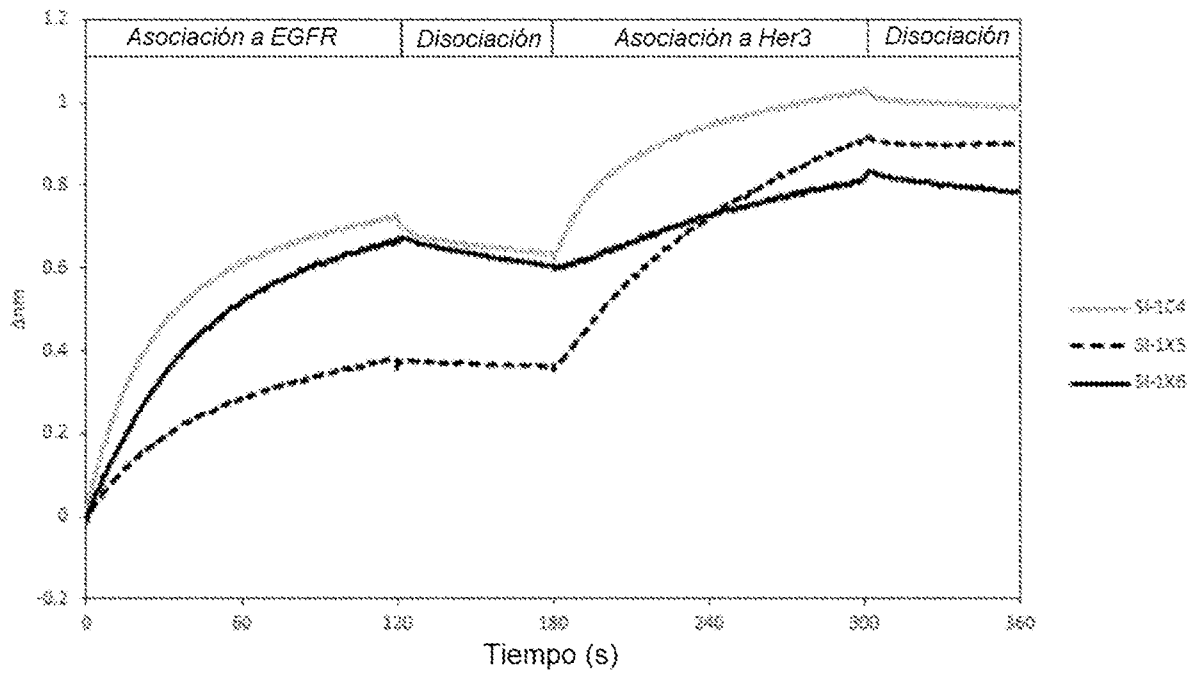


FIG. 8

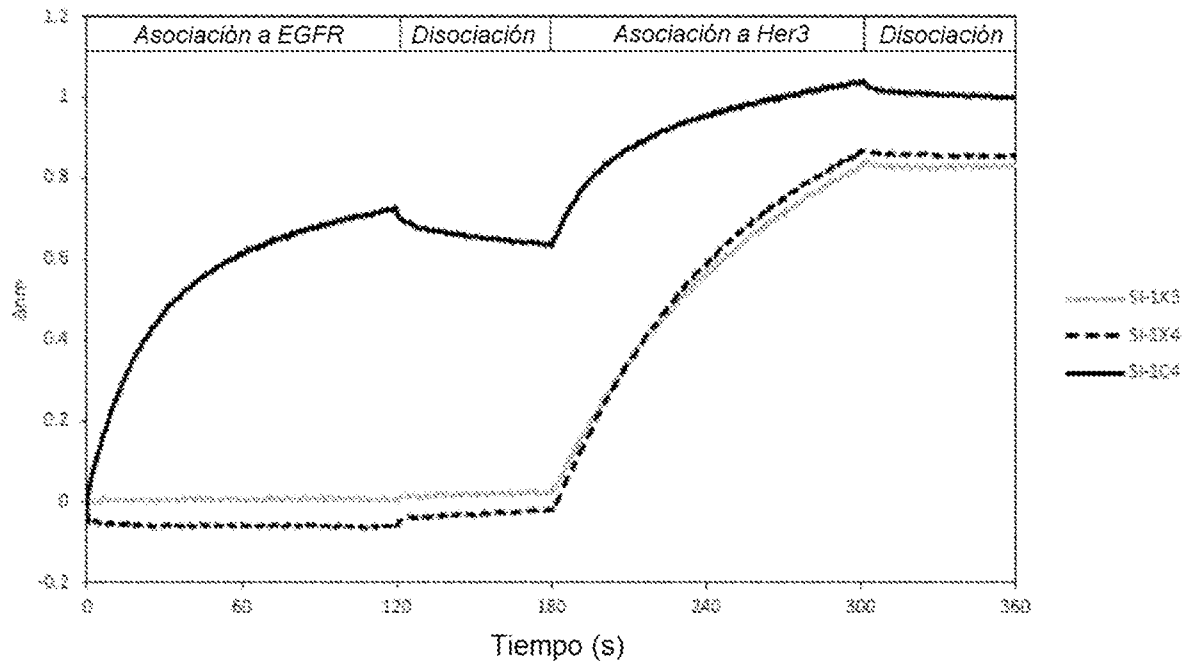


FIG. 9

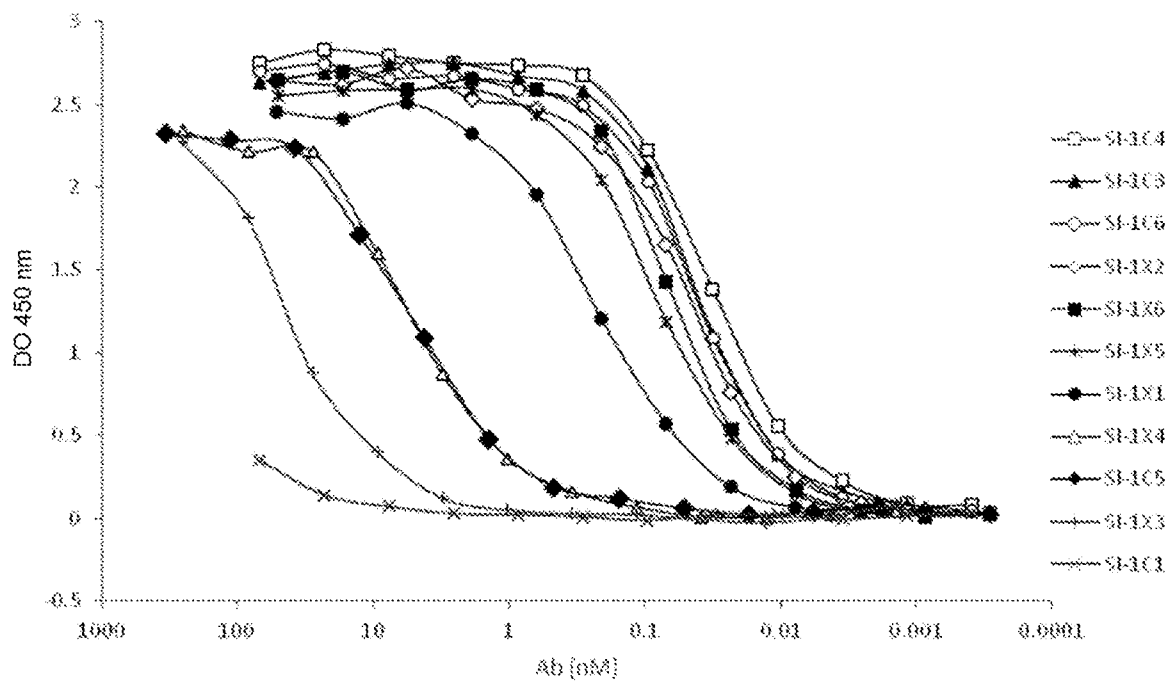


FIG. 10

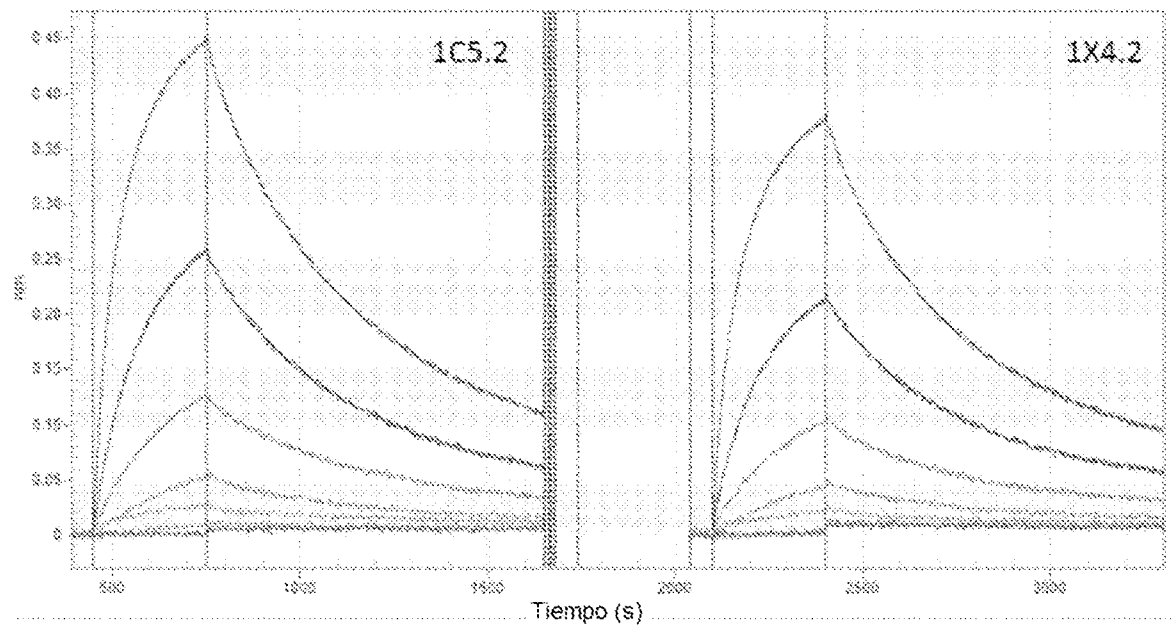


FIG. 11

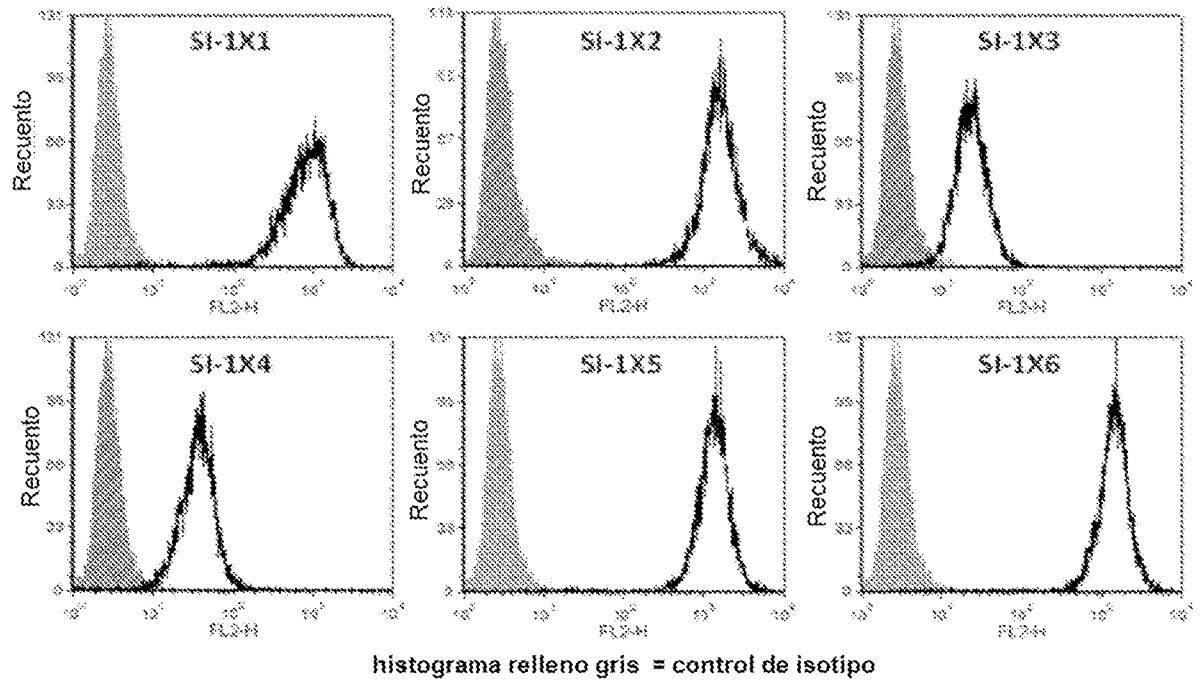


FIG. 12

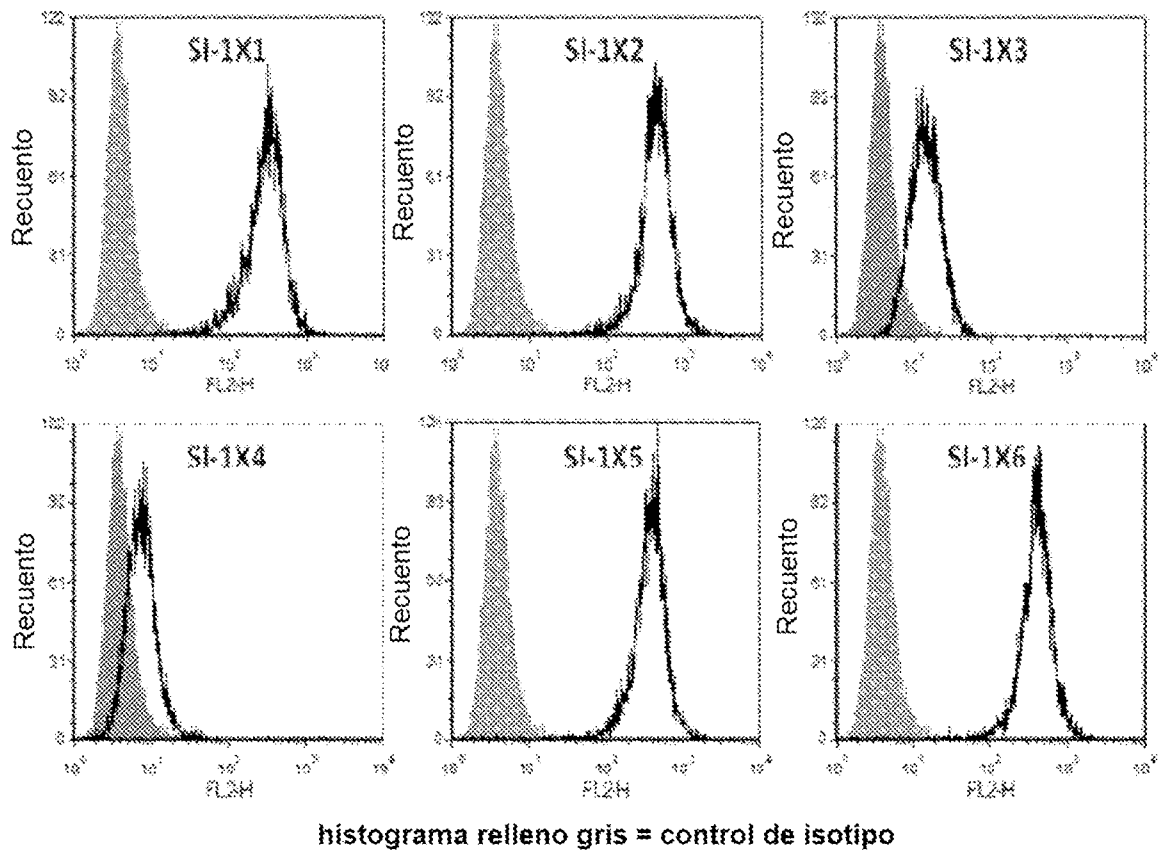
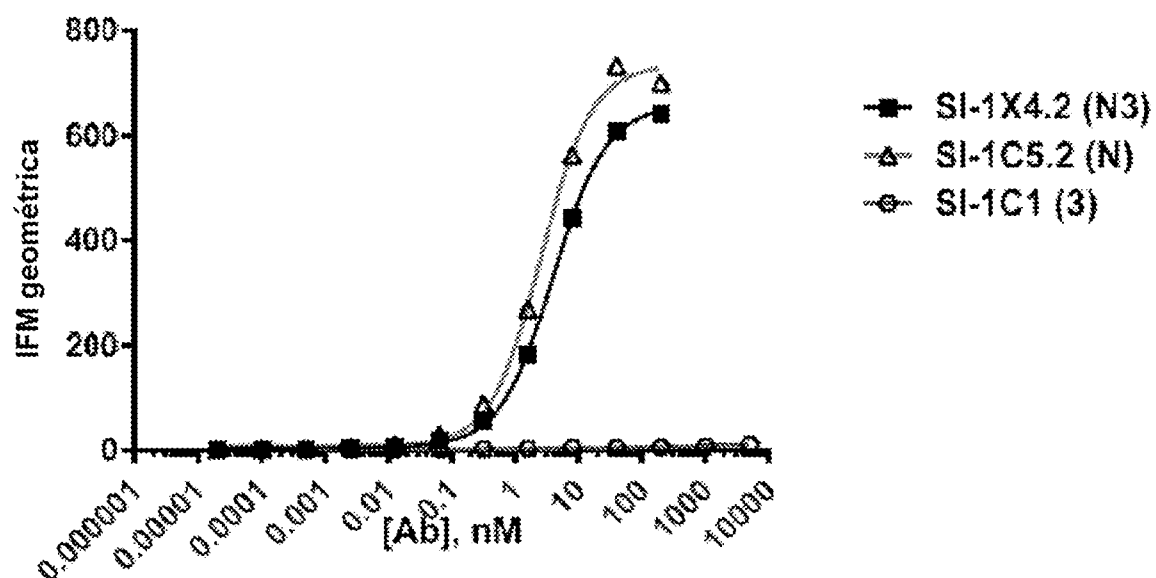


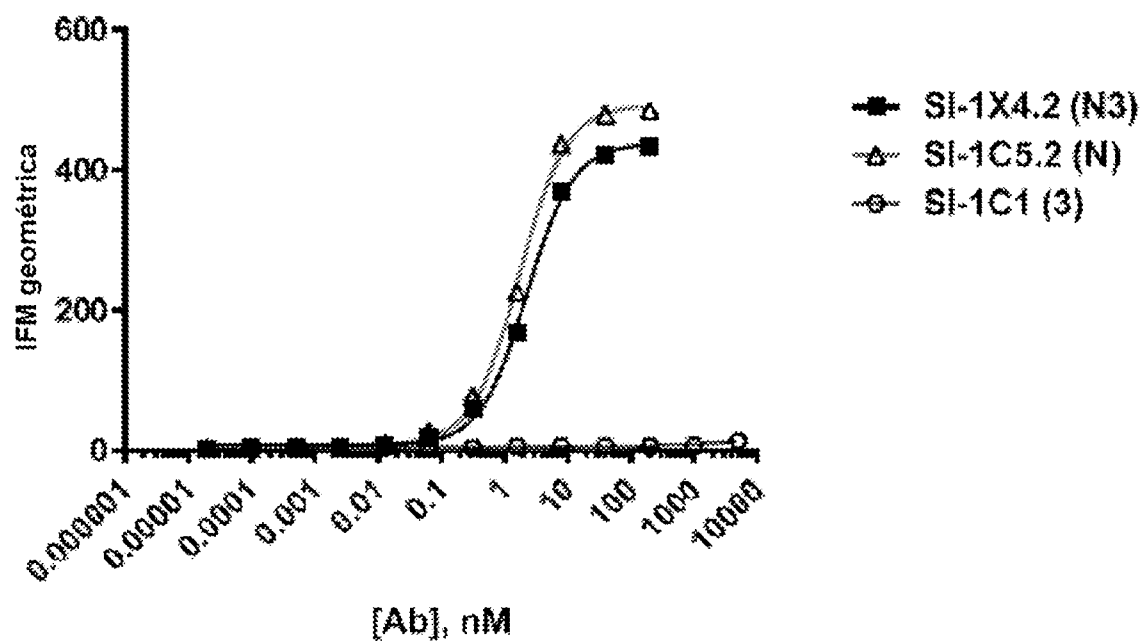
FIG. 13



Anticuerpo	IC50 (nM)
SI-1X4.2 (N3)	4.02
SI-1C5.2 (N)	2.62
SI-1C1 (3)	N/A*

*IC50 no calculada - no se alcanza la meseta

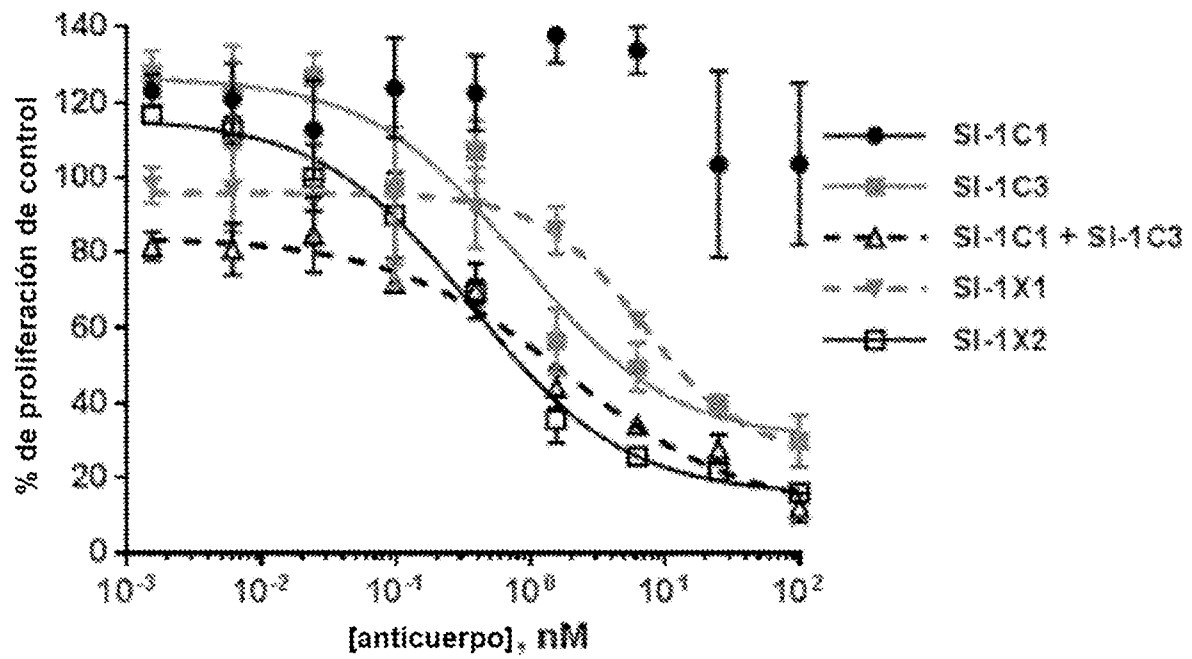
FIG. 14



Anticuerpo	IC50 (nM)
SI-1X4.2 (N3)	2.28
SI-1C5.2 (N)	1.75
SI-1C1 (3)	N/A*

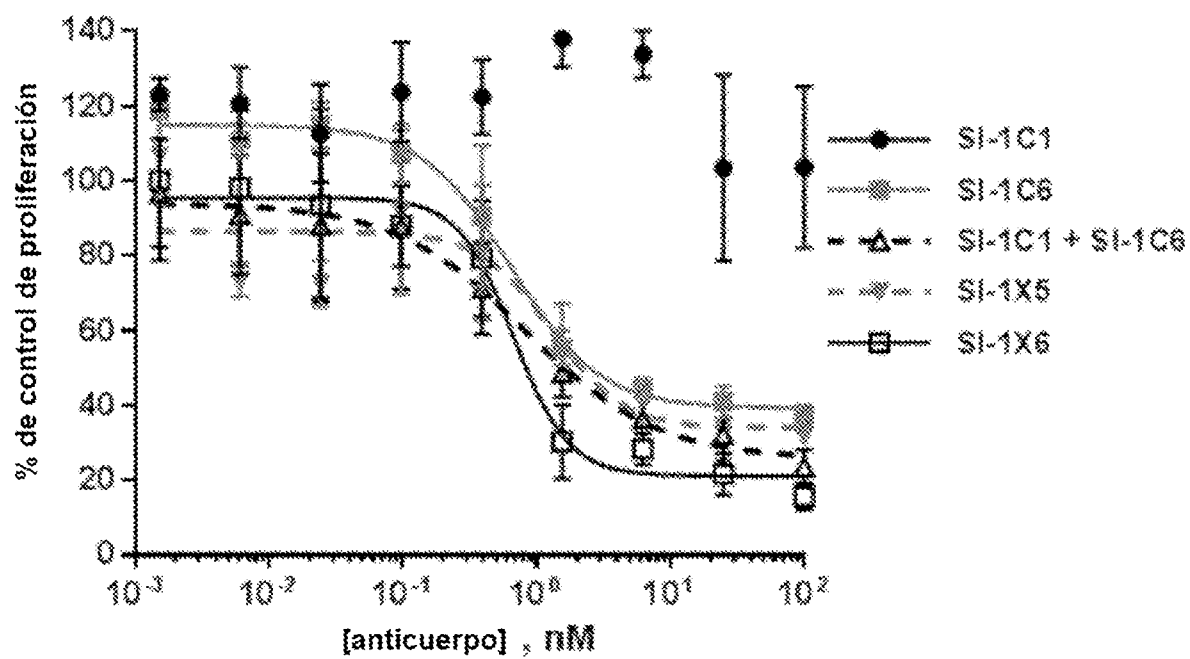
*IC50 no calculada - no se alcanza la meseta

FIG. 15



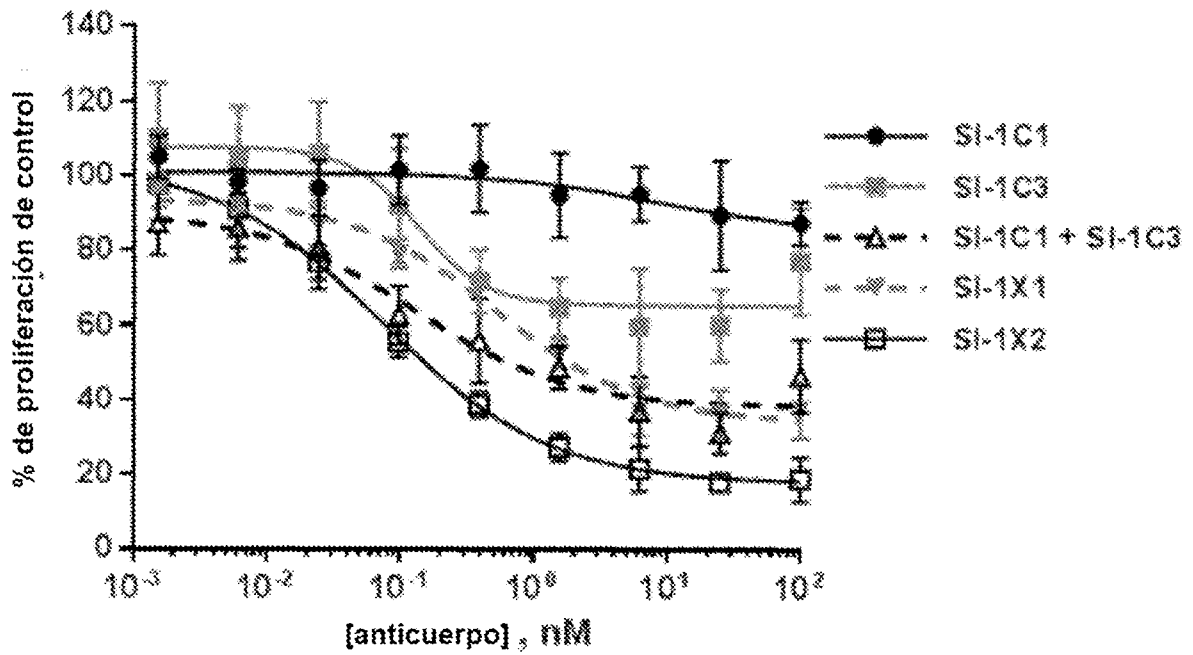
Valores IC50 de A431 (nM)				
SI-1C1	SI-1C3	SI-1C1 + SI-1C3	SI-1X1	SI-1X2
N/A	0.83	1.91	6.84	0.37

FIG. 16



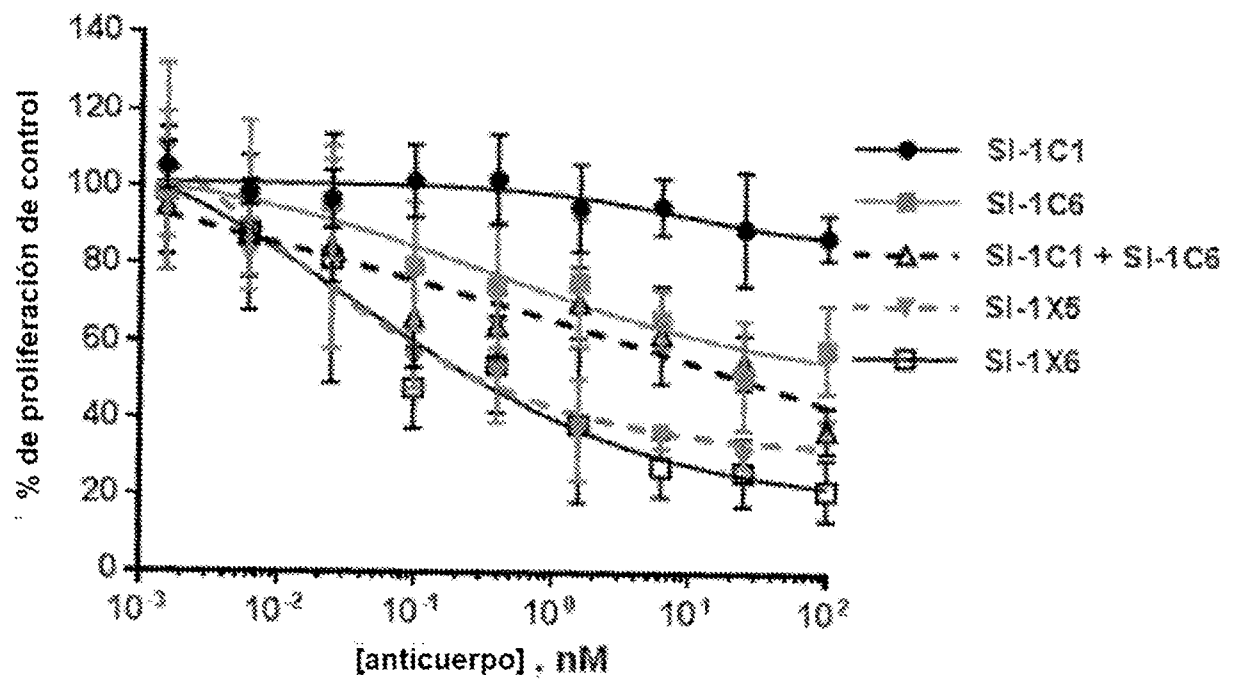
Valores IC50 de A431 (nM)				
SI-1C1	SI-1C6	SI-1C1 + SI-1C6	SI-1X5	SI-1X6
N/A	0.64	0.84	1.30	0.68

FIG. 17



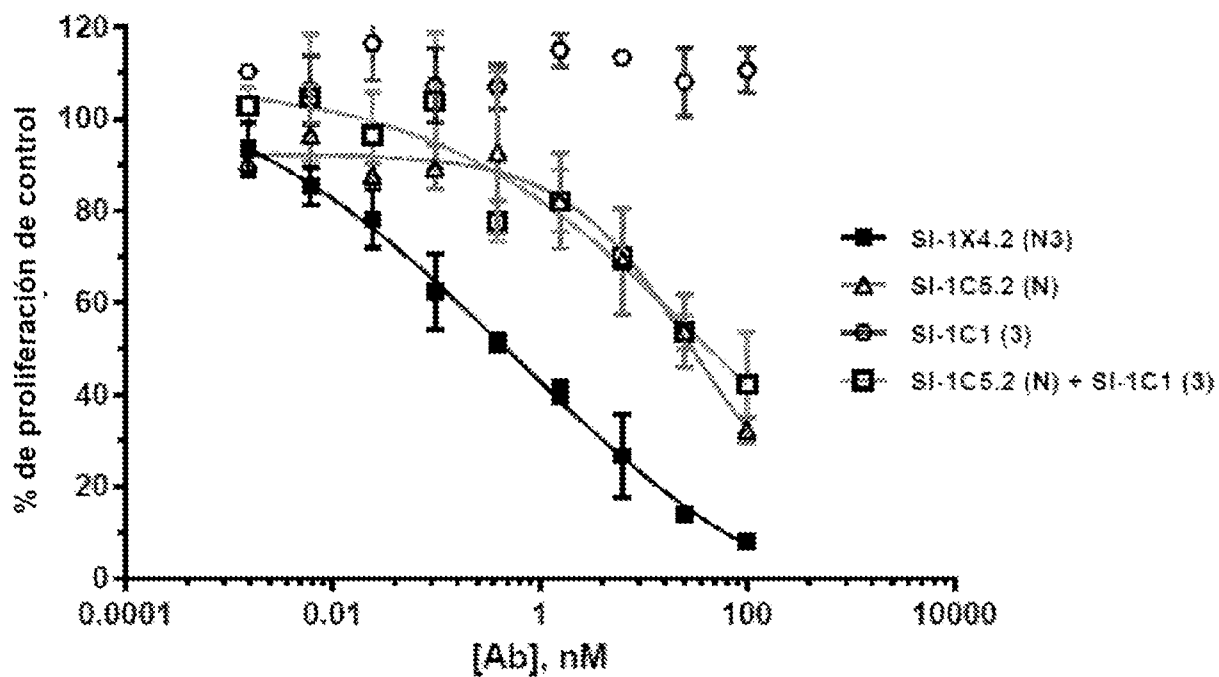
Valores de IC50 de BxPC3 (nM)				
SI-1C1	SI-1C3	SI-1C1 + SI-1C3	SI-1X1	SI-1X2
8.48	0.14	0.13	0.53	0.07

FIG. 18



Valores IC50 de BxPC3 (nM)				
SI-1C1	SI-1C6	SI-1C1 + SI-1C6	SI-1X5	SI-1X6
8.48	0.37	ambiguos	0.01	0.03

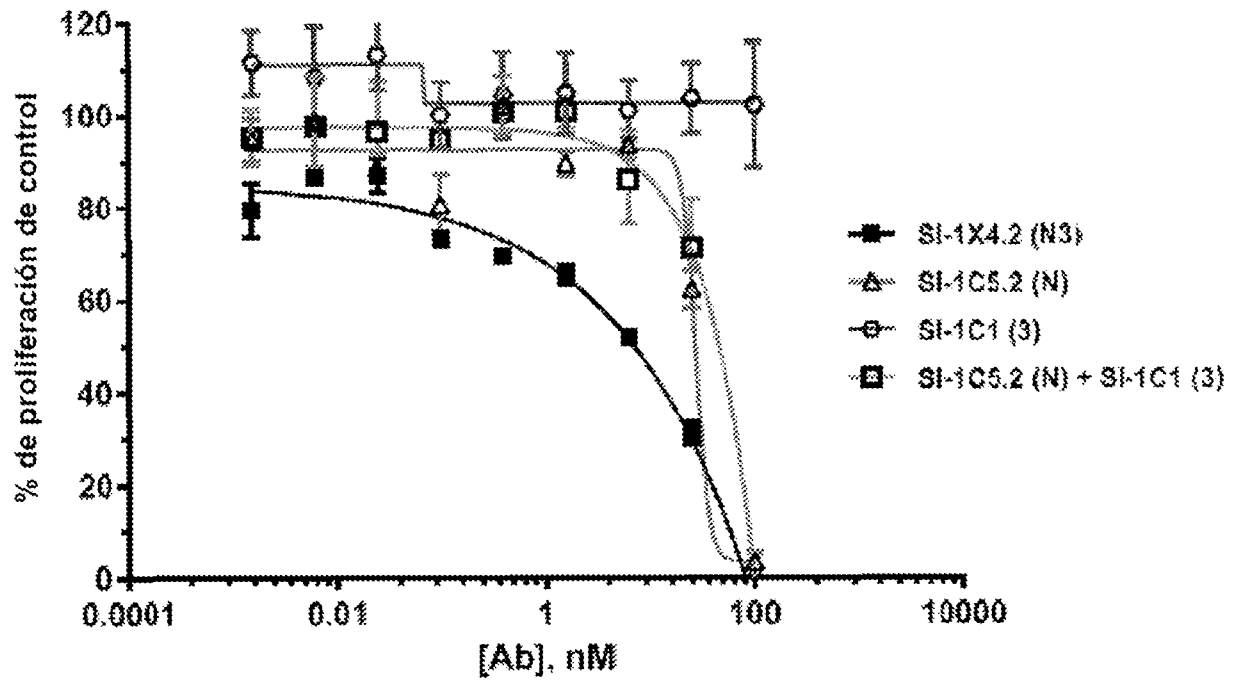
FIG. 19



Anticuerpo	IC50 (nM)
SI-1X4.2 (N3)	0.54
SI-1C5.2 (N)	27.73 *
SI-1C1 (3)	N/A
SI-1X5.2 (N) + SI-1C1 (3)	35.04 *

*IC50 aproximada - no se alcanza la línea base

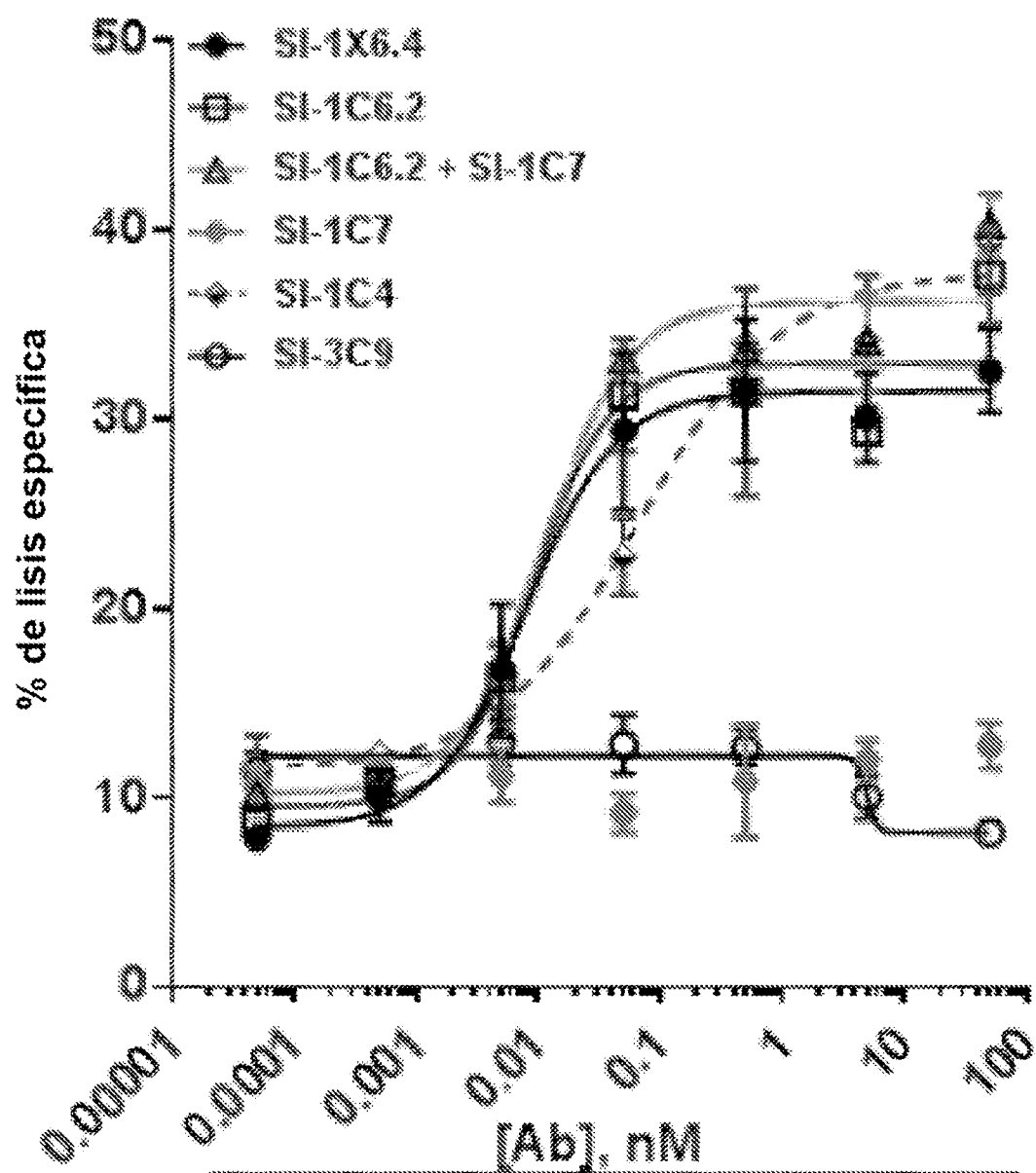
FIG. 20



Anticuerpo	IC50 (nM)
SI-1X4.2 (N3)	sin línea base
SI-1C5.2 (N)	sin línea base
SI-1C1 (3)	N/A
SI-1X5.2 (N) + SI-1C1 (3)	sin línea base

*IC50 aproximada - no se alcanza la línea base

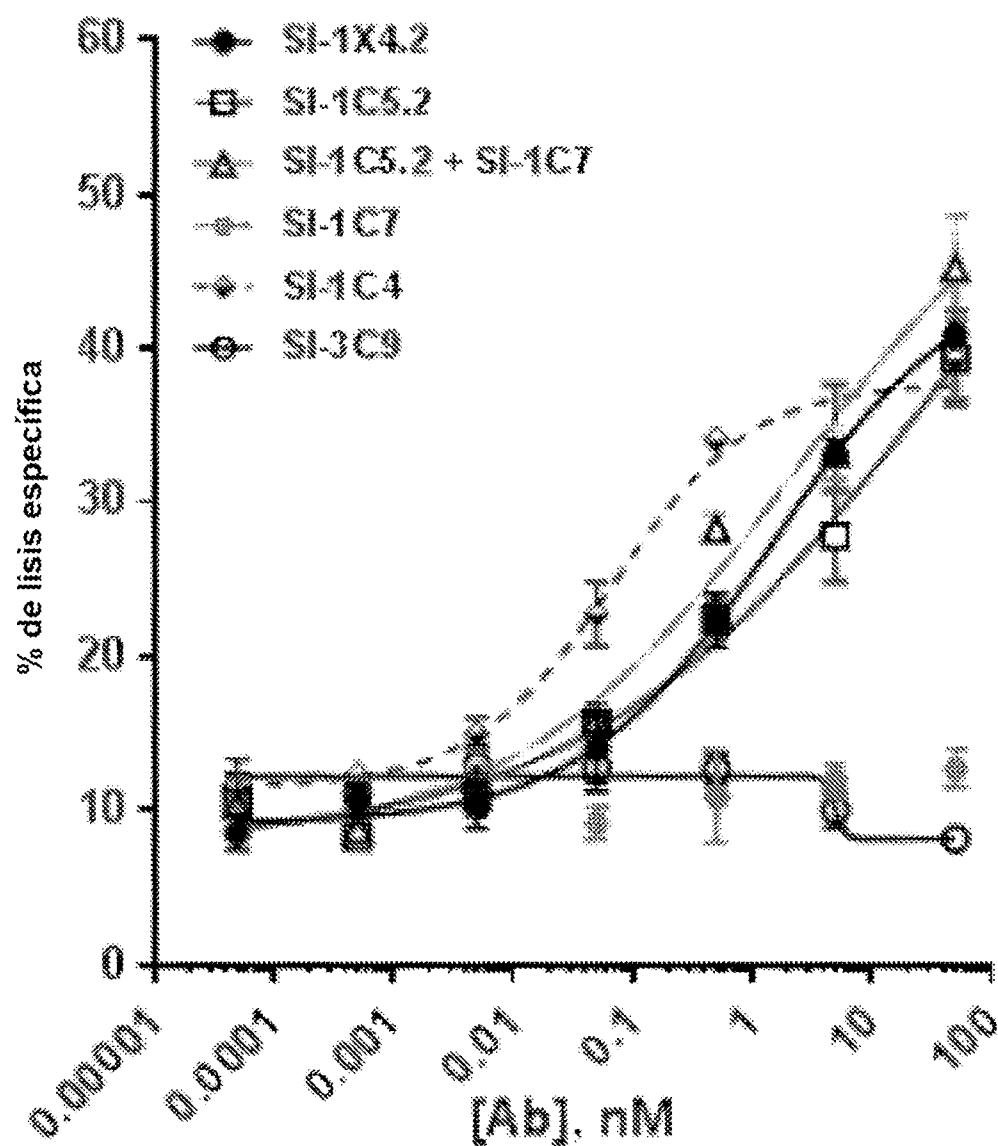
FIG. 21



Anticuerpo	EC50 (nM)
SI-1X6.4 (C3)	0.008
SI-1C6.2 (C)	0.009
SI-1C6.2 (C) + SI-1C7 (3)	0.011
SI-1C7 (3)	N/A*
SI-1C4 (2n1)	0.068
SI-3C9 (control)	-

*EC50 no calculada - meseta no alcanzada

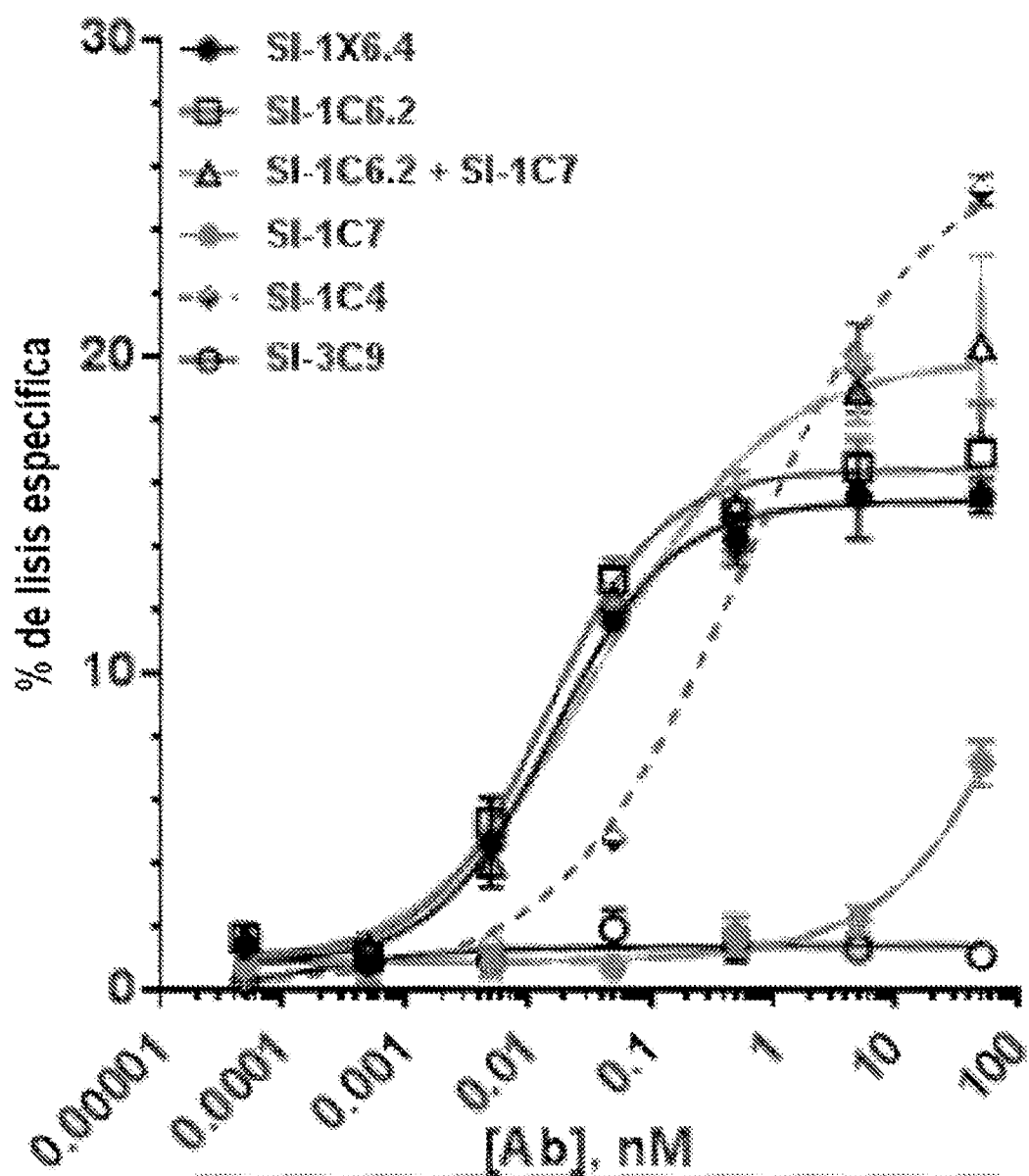
Fig. 22a



Anticuerpo	EC50 (nM)
SI-1X4.2 (N3)	1.49
SI-1C5.2 (N)	N/A*
SI-1C5.2 (N) + SI-1C7 (3)	2.16
SI-1C7 (3)	N/A*
SI-1C4 (2in1)	0.068
SI-3C9 (control)	-

*EC50 no calculada - meseta no alcanzada

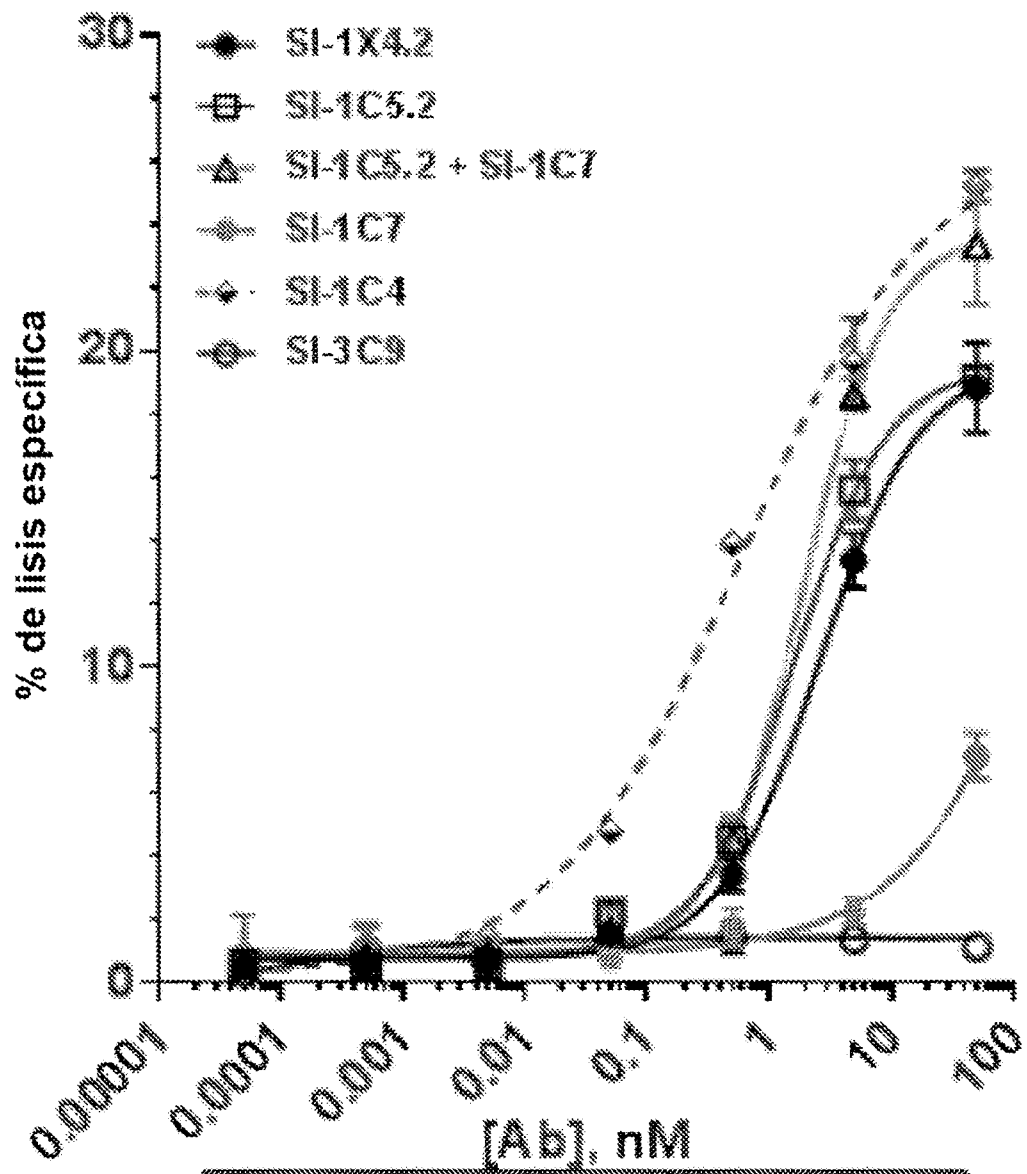
FIG. 22b



Anticuerpo	EC50 (nM)
SI-1X6.4 (C3)	0.016
SI-1C6.2 (C)	0.014
SI-1C6.2 (C) + SI-1C7 (3)	0.039
SI-1C7 (3)	N/A*
SI-1C4 (2in1)	0.589
SI-3C9 (control)	-

*EC50 no calculada - meseta no alcanzada

FIG. 23a



Anticuerpo	EC50 (nM)
SI-1X4.2 (N3)	2.62
SI-1C5.2 (N)	1.63
SI-1C5.2 (N) + SI-1C7 (3)	1.87
SI-1C7 (3)	N/A*
SI-1C4 (Zin1)	0.589
SI-3C9 (control)	"

*EC50 no calculada - meseta no alcanzada

FIG. 23b

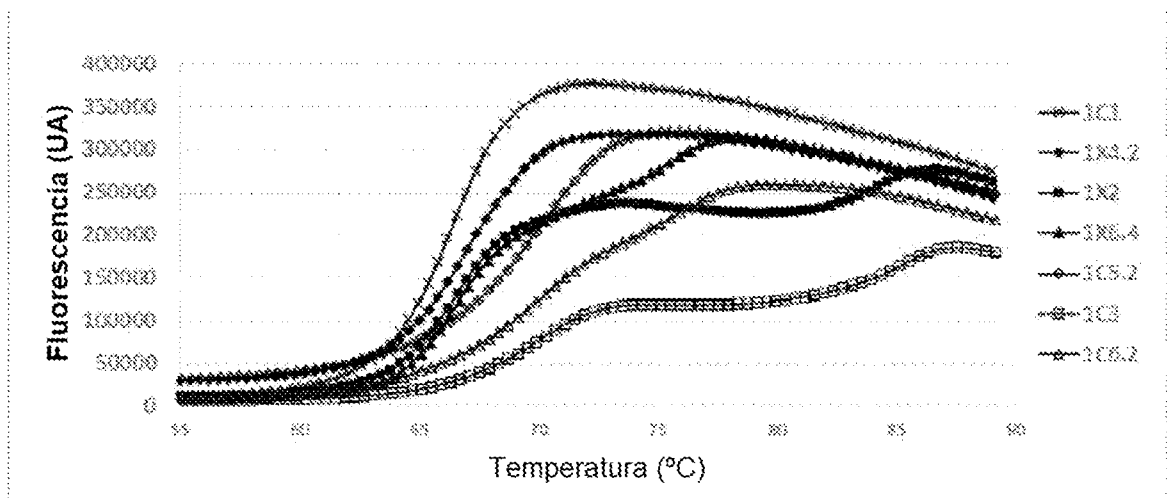
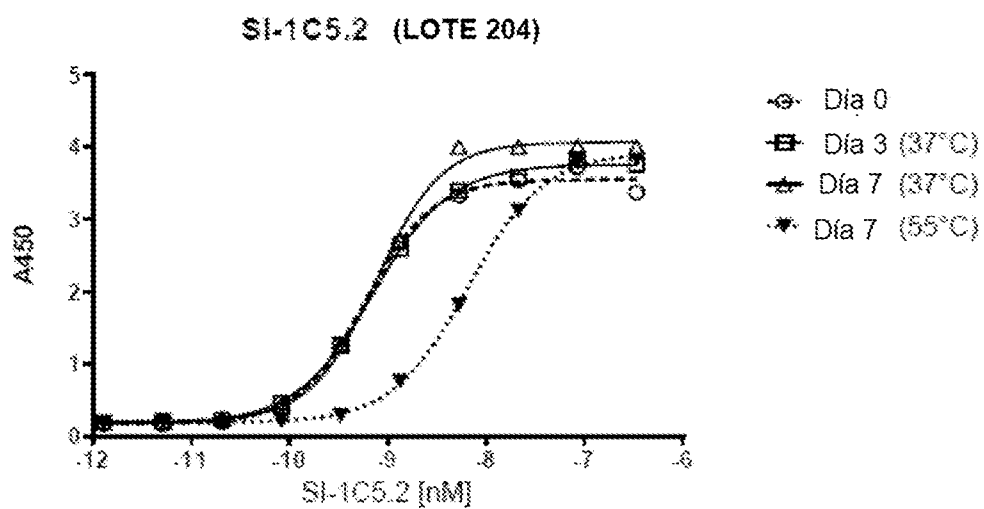
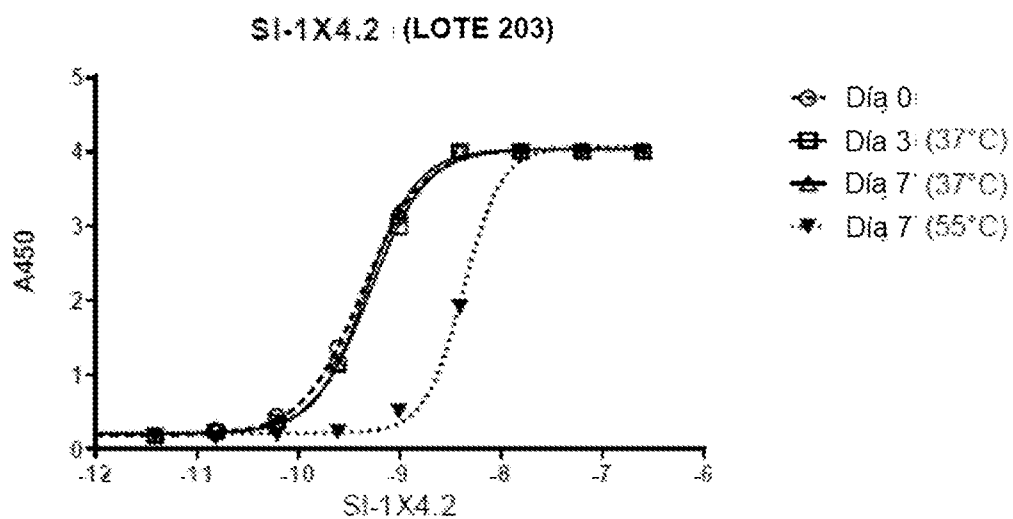


FIG. 24



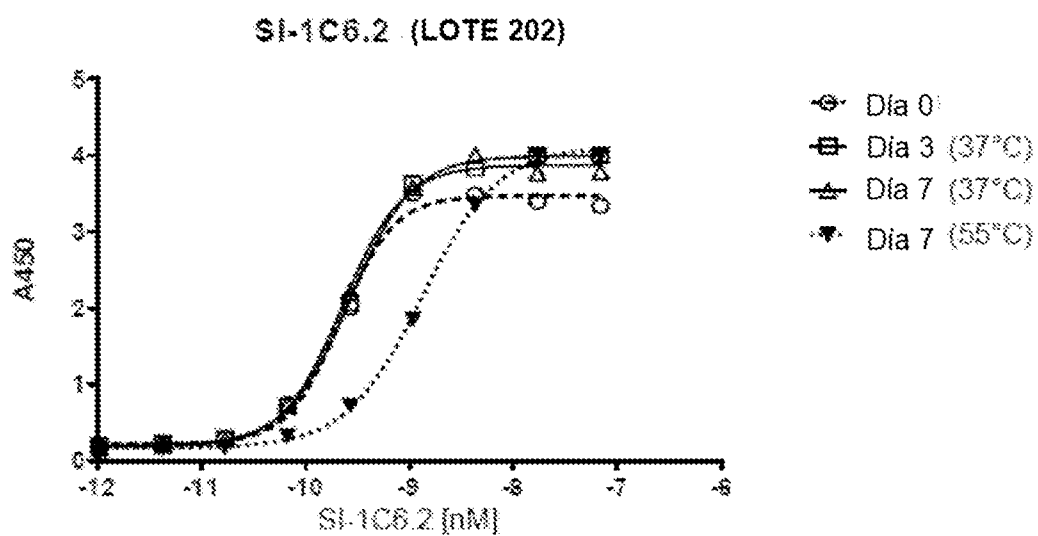
	Día 0	Día 3 (37°C)	Día 7 (37°C)	Día 7 (55°C)
EC50	5.897e-010	7.021e-010	7.552e-010	6.522e-009

FIG. 25a



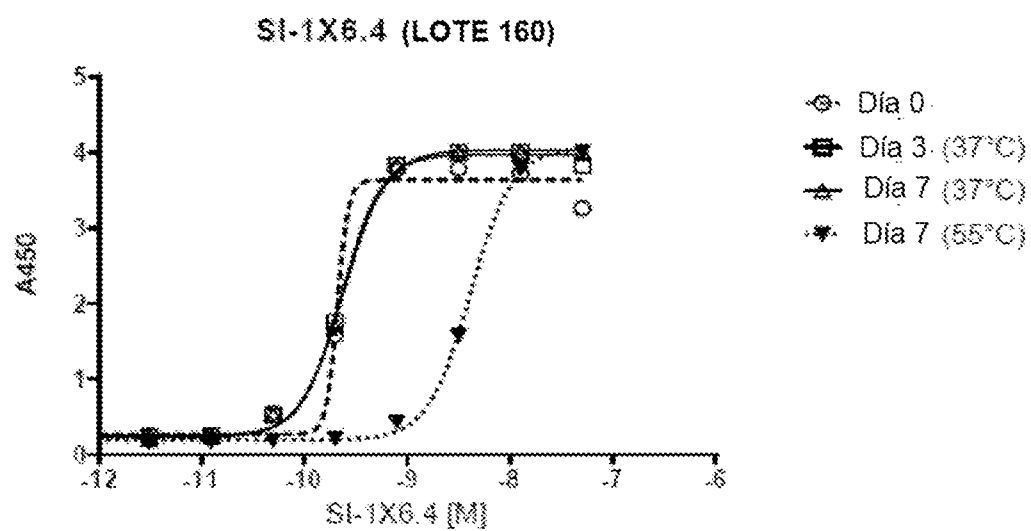
	Día 0	Día 3 (37°C)	Día 7 (37°C)	Día 7 (55°C)
EC50	4.293e-010	5.089e-010	4.667e-010	4.248e-009

FIG. 25b



	Día 0	Día 3 (37°C)	Día 7 (37°C)	Día 7 (55°C)
EC50	2.182e-010	2.651e-010	2.266e-010	1.322e-009

FIG. 25c



	Día 0	Día 3 (37°C)	Día 7 (37°C)	Día 7 (55°C)
EC50	~ 2.093e-010	2.300e-010	2.373e-010	4.112e-009

FIG. 25d

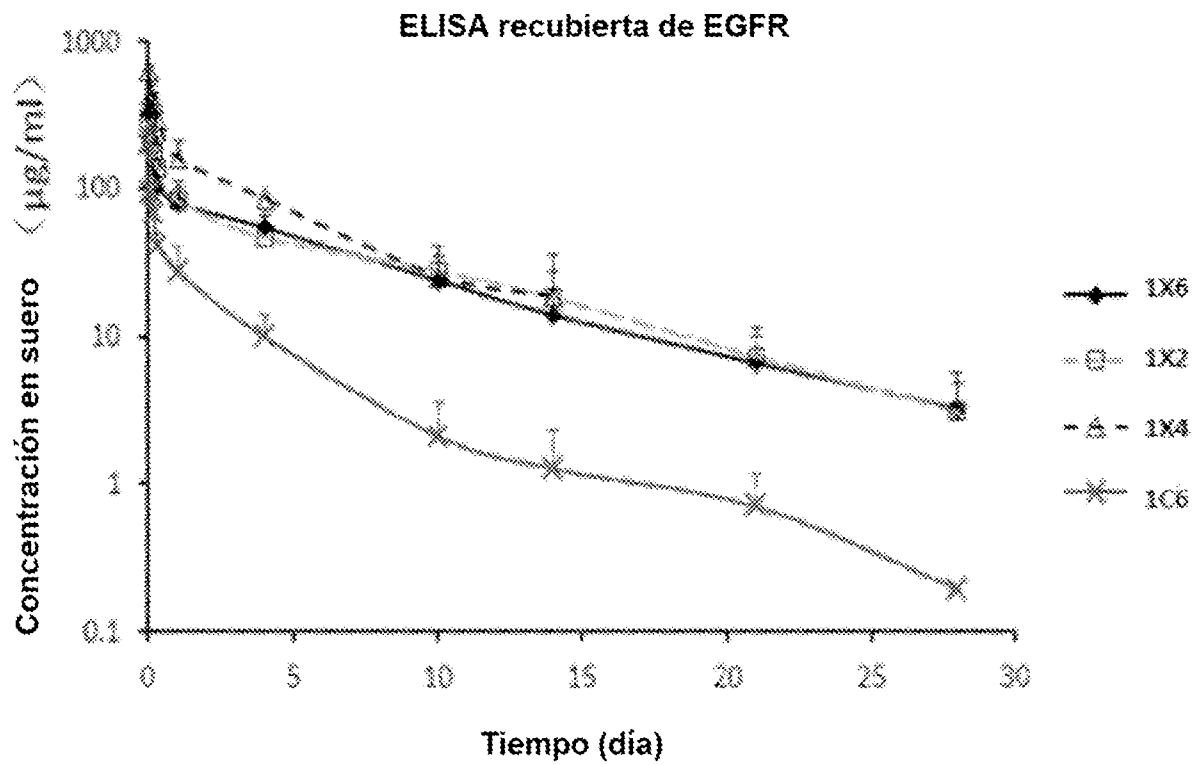


FIG. 26

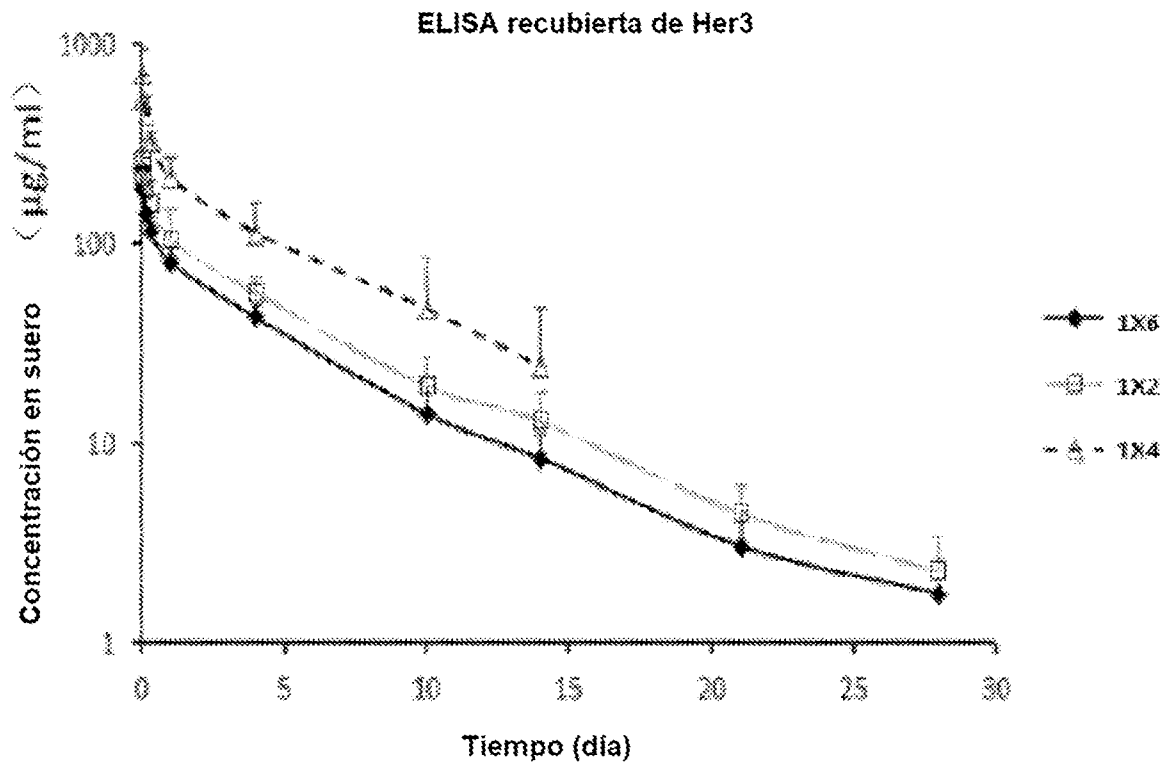


FIG. 27

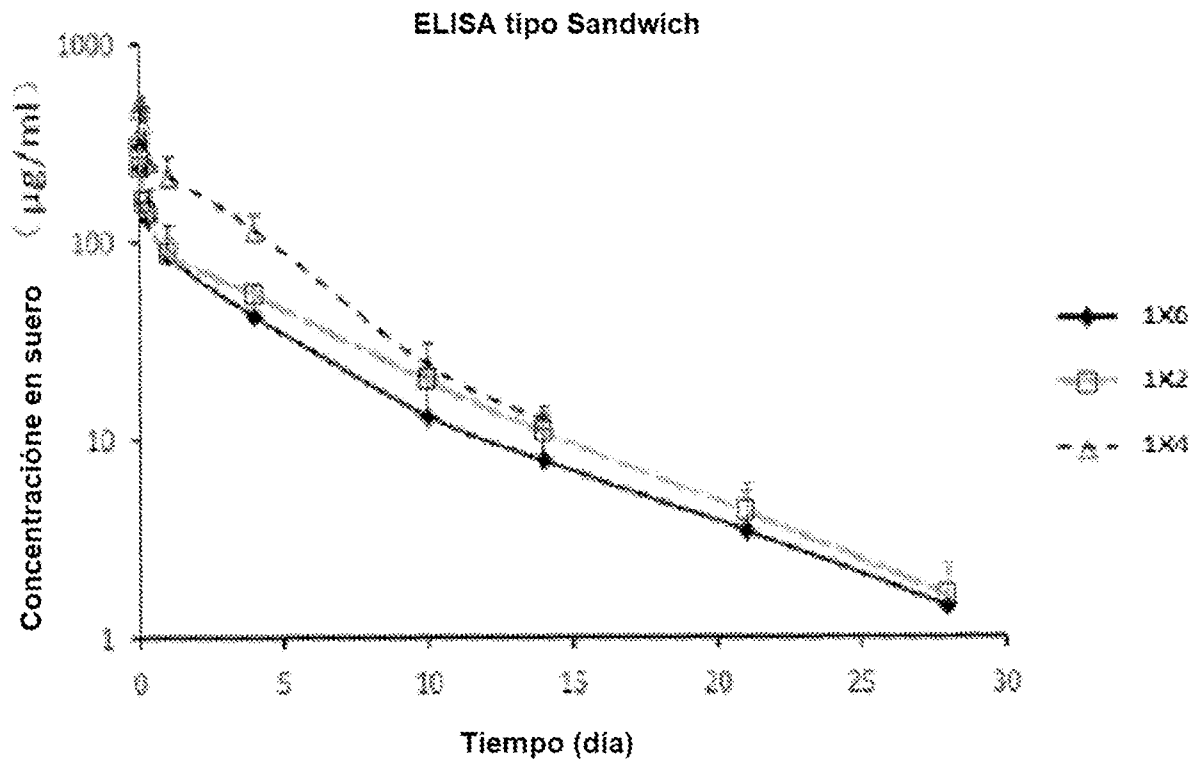


FIG. 28

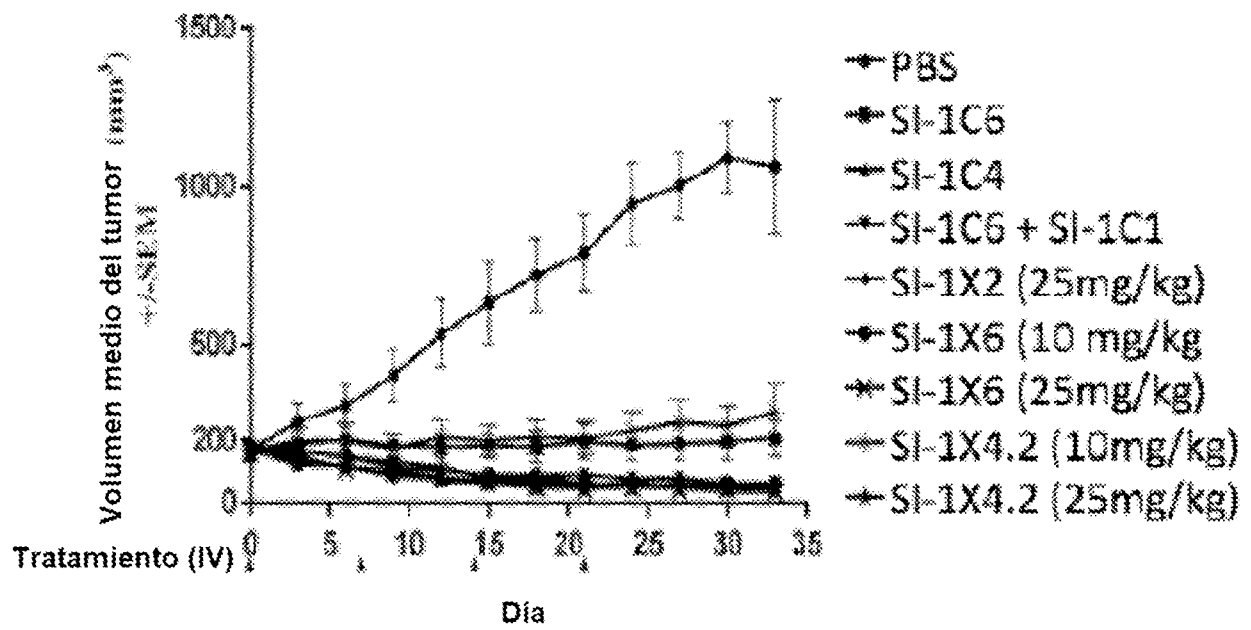


FIG. 29

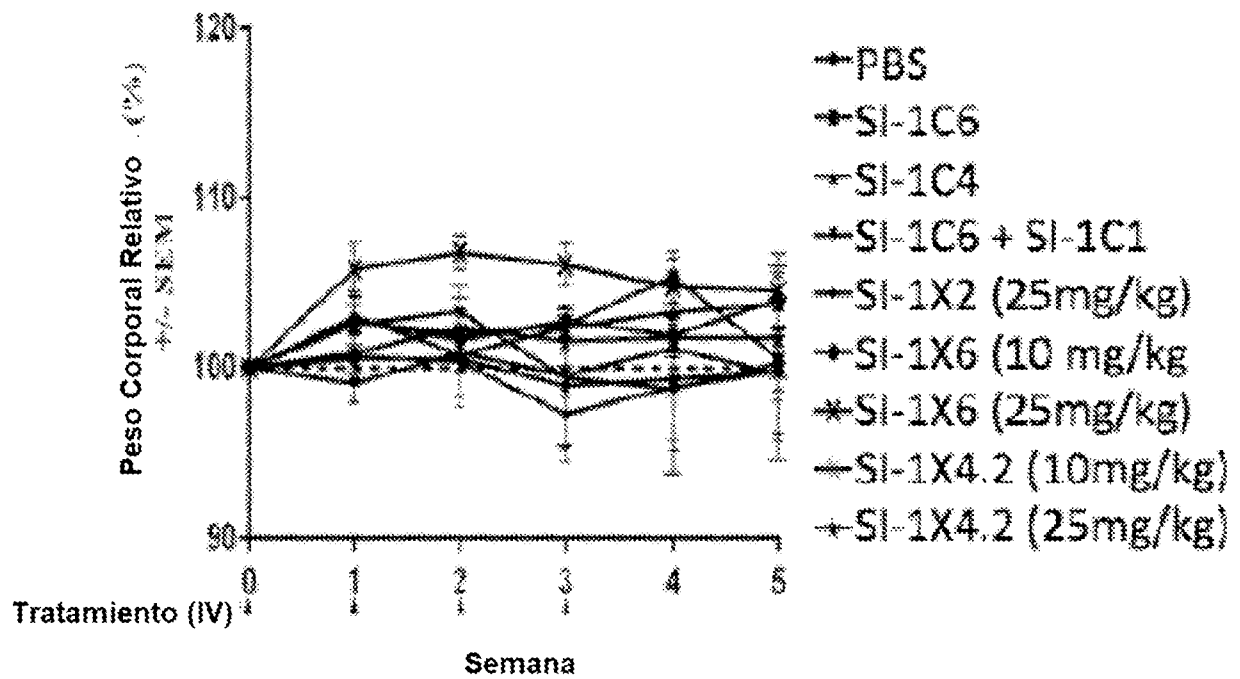


FIG. 30