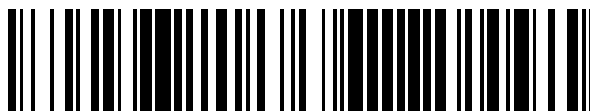


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 875 757**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 47/68 (2007.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.10.2016 PCT/EP2016/001791**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.05.2017 WO17076492**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2016 E 16810243 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.03.2021 EP 3371223**

54 Título: **Anticuerpos biespecíficos para potenciar la selectividad e inhibición tumorales y sus usos**

30 Prioridad:

03.11.2015 EP 15192851
05.07.2016 EP 16178010

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.11.2021

73 Titular/es:

MERCK PATENT GMBH (100.0%)
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE

72 Inventor/es:

DOERNER, ACHIM;
TOLEIKIS, LARS;
SOOD, VANITA, D.;
SELLMANN, CAROLIN y
KNUEHL, CHRISTINE

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 875 757 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 para potenciar la selectividad e inhibición tumorales y sus usos

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a anticuerpos biespecíficos, en especial anticuerpos biespecíficos EGFR × c-MET, para potenciar la selectividad e inhibición tumorales, su uso en el tratamiento del cáncer y métodos de producción de los mismos.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las células cancerosas a menudo se caracterizan por una expresión aberrante de moléculas de la superficie celular, como receptores tirosina quinasa, uno de los cuales es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). El EGFR se activa tras la unión del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y otros ligandos del factor de crecimiento, como TGF- α , anfiregulina (AR), epiregulina (EP), betacelulina (BC) o HB-EGF (Normanno y cols., Gene 366 (2006) 2-16). Tras la dimerización inducida por ligando y su activación, se activan diversas rutas de señalización posteriores, que incluyen RAS/MAPK, PI3K/Akt y STAT que regulan diferentes procesos celulares, incluyendo la síntesis de ADN y la proliferación. La señalización del EGFR normalmente se encuentra desregulada en el cáncer a través de diferentes mecanismos, incluyendo mutaciones genéticas del receptor. Además, las propiedades de la señalización de las formas mutadas del EGFR también muestran una alteración del tráfico celular en comparación con el EGFR natural, ya que algunas de las proteínas reguladores que equilibran la ruta del EGFR presentan una expresión alterada en el cáncer. El EGFR mutado se encuentra, por ejemplo, en cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) y del 60 al 80 % de los cánceres colorrectales expresan un EGFR mutado.

25

En el momento de la aparición del tratamiento del cáncer a base de anticuerpos anti-EGFR se planteó la hipótesis de que la terapia dirigida al EGFR podría ser más eficaz en los tumores que sobreexpresan la proteína, no obstante, los estudios mostraron rápidamente que los niveles de expresión de EGFR no estaban correlacionados con una respuesta a anticuerpos anti-EGFR, como cetuximab (Liska Clin Cancer Res 17[3], feb 2011). Se demostró que el aumento en el número de copias del gen del EGFR, la sobreexpresión del ligando de EGFR y las mutaciones en *TP53* se asociaban con la respuesta a inhibidores del EGFR en el cáncer colorrectal (CCR) (Khambata-Ford y cols., J Clin Oncol 2007;25:3230-7; Moroni y cols., Lancet Oncol 2005;6:279-86; Oden-Gangloff y cols. Br J Cancer 2009;100:1330-5; Tabernero J, J Clin Oncol. 2010 Mar 1;28[7]:1181-9).

30

Entre los efectos secundarios de las terapias dirigidas a EGFR actuales que tienen como objetivo las células que sobreexpresan EGFR se encuentran toxicidades debidas a la expresión basal de EGFR en tejidos distintos al tumor. Por ejemplo, cetuximab que es un anticuerpo monoclonal quimérico humano-murino anti-EGFR, a menudo provoca toxicidades cutáneas, un fenómeno que también se observa en la terapia dirigida a EGFR con gefitinib (J Eur Acad Dermatol Venereol. 2010 abr;24[4]:453-9; SpringerPlus 2013, 2:22).

40

A nivel funcional, las receptor tirosina quinasa a menudo también muestran redundancia, lo que compensará la pérdida de un miembro de la familia. Un ejemplo es la señalización de ERBB3 mantenida que se observa en algunos casos de tumores con mutaciones en EGFR tratados con gefitinib (Science vol. 316, 18 de mayo de 2007: págs. 1039-1043). Esta redundancia funcional puede dar lugar en última instancia a una resistencia tumoral adquirida a un bloqueo terapéutico de un miembro de la familia (Engelmann y cols. Science, 316, 1039 [2007]). La resistencia tumoral adquirida a menudo da lugar a recidivas durante la monoterapia con un inhibidor de RTK.

45

Los estudios muestran que la resistencia intrínseca a la terapia dirigida a EGFR puede ser el resultado de la activación de moléculas efectoras posteriores como KRAS, que se observa en el 35-40 % de los CCR (Knickelbein y cols. Genes Dis. 2015 mar;2[1]:4-12). Múltiples estudios han demostrado ahora que las mutaciones de KRAS en el CCR confieren resistencia a cetuximab por lo que se recomienda limitar el tratamiento con cetuximab en pacientes con tumores KRAS de tipo natural. No obstante, aproximadamente el 25 % de los pacientes con cáncer colorrectal (CCR) de tipo natural para KRAS, BRAF, PIK3CA y PTEN no responden al tratamiento con inhibidores del EGFR (J Clin Oncol. 2010 Mar 1;28[7]:1254-61). El análisis molecular de los pacientes que no responden al tratamiento mediante BEAMing mostró una amplificación del gen MET en estos pacientes tras el tratamiento (Bardelli y cols. Cancer Discov; 3[6]: 658-73). El incremento de la expresión del receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFR, c-MET) y su ligando HGF parece ser una de las principales vías de escape de los tumores durante la monoterapia dirigida a EGFR. Esto también va acompañado a menudo de la amplificación del gen que codifica c-MET (Engelmann y cols. Science 316, 1039 [2007]; Clin Cancer Res 2011;17:472-482). Los experimentos *in vitro* con células HCC827 tratadas con gefitinib mostraron una amplificación de c-MET de 5 a 10 veces (Engelmann y cols. Science, 316, 1039 [2007]).

55

60

El gen MET codifica el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFR, c-MET), que es un receptor tirosina quinasa transmembrana heterodimérico compuesto de una cadena α extracelular y una cadena β transmembrana unidas por enlaces disulfuro y que tiene un único ligando, HGF, también conocido como factor de dispersión.

Estructuralmente, c-MET comprende varios dominios proteicos conservados, como los dominios SEMA, PSI (en plexinas, semaforinas, integrinas), 4 repeticiones IPT (en inmunoglobulinas, plexinas, factores de transcripción), TM (transmembrana), JM (yuxtamembrana) y TK (tirosina quinasa). La unión de HGF a MET desencadena la dimerización del receptor y la transfosforilación, lo que conlleva cambios conformacionales en MET que activan el dominio TK. c-MET media en la activación de vías de señalización posteriores, como la fosfoinosítido 3-quinasa (PI3K)/AKT, Ras-Rac/Rho, proteína quinasa activada por mitógeno y fosfolipasa C, que estimulan actividades morfogénicas, proliferativas y antiapoptóticas, así como la estimulación de las vías implicadas en el desprendimiento, movilidad e invasividad celulares.

De acuerdo con la función de c-MET en la movilidad y morfogénesis celulares, las lesiones metastásicas normalmente muestran niveles de expresión de MET más elevados que los tumores primarios (Cipriani y cols. Lung Cancer 2009, 63:169-179). Se han seguido varios enfoques para inhibir el ligando HGF o el receptor para inhibir la señalización de c-MET. Por ejemplo, AMG102/rilotumumab se une preferencialmente a la forma madura biológicamente activa de HGF, interaccionando con la porción aminoterminal de la cadena β inhibiendo, de este modo, la unión de HGF. Otro anticuerpo monoclonal (AcM) que se estudió para inhibir la actividad de HGF es ficlatuzumab. Ficatuzumab es un anticuerpo IgG1 humanizado que se une al ligando HGF con alta afinidad y especificidad inhibiendo de este modo las actividades biológicas de c-MET/HGF.

Rilotumumab se ha probado como monoterapia en pacientes portadores de glioblastomas recurrentes, carcinomas renales metastásicos o cáncer de ovario y en combinación con quimioterapia en cánceres de próstata o con fármacos antiangiogénicos en tumores sólidos avanzados. Ficatuzumab se probó tanto en monoterapia como asociado con inhibidores del EGFR en el CPNM (Biologics 2013; 7: 61-68). No obstante, en un ensayo clínico en fase II con ficlatuzumab no se alcanzó el criterio principal de valoración.

Por tanto, a pesar del hecho de que se ha progresado en el desarrollo de ambas terapias, anti-EGFR y anti-c-MET, en monoterapia o en combinación, existe una necesidad continua de mejores terapias anti-EGFR para el cáncer, que superen las limitaciones actuales de las terapias basadas en anti-EGFR y prevengan la resistencia tumoral dirigida por c-MET.

Respecto a las proteínas multidominio modificadas genéticamente, como los anticuerpos biespecíficos, en la solicitud de patente internacional publicada WO 2007/110205 A2 se describen dominios de proteínas heterodiméricas modificados genéticamente basados en la tecnología de «dominio modificado genéticamente por intercambio de cadena» (SEED, por sus siglas en inglés). Además, en el documento WO 2007/110205 A2 se describen métodos para preparar dichos dominios de proteínas heterodiméricas modificadas genéticamente.

RESUMEN DE LA INVENCION

Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que las moléculas de inmunoglobulina heterodiméricas biespecíficas que se unen tanto a EGFR como a c-MET son eficaces para el tratamiento de tumores que expresan EGFR y c-MET.

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

En una primera realización, la presente invención proporciona una molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica que comprende

(i) un primer fragmento Fab o scFv que se une específicamente a EGFR y

(ii) un segundo fragmento Fab o scFv que se une específicamente a c-MET y

(iii) una región bisagra de anticuerpo, un dominio CH2 de anticuerpo y un dominio CH3 de anticuerpo que comprenden un dominio híbrido de interfase de interacción proteína-proteína en el que cada uno de dichos dominios de interfase de interacción se forma mediante segmentos de aminoácidos del dominio CH3 de un primer miembro y segmentos de aminoácidos del dominio CH3 de dicho segundo miembro, en el que dicho dominio de interfase proteína-proteína de la primera cadena interacciona con la interfase proteína-proteína de la segunda cadena mediante la homodimerización de los correspondientes segmentos de aminoácidos del mismo miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas dentro de dichos dominios de interacción,

en el que la primera o segunda cadena de inmunoglobulina genéticamente modificada tiene la secuencia polipeptídica («AG-SEED»):

GQPFRPEVHLLPPSREEMTKNQVSLTCLARGFYXPX₁DIAVEWESNGQPENNYKTTSPSRQEPSQGGTTF
FAVTSKLT₂DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKX₃ISL (SEC ID N.º 1), donde X₁, X₂ y X₃ puede ser cualquier aminoácido,

donde la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica se define además por las restricciones adicionales mencionadas en la reivindicación 1 adjunta.

5 En una realización, en la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención, el primer miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas es IgG y el segundo miembro es IgA.

En una realización, X_1 es K o S, X_2 es V o T y X_3 es T o S en la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención según se describe anteriormente.

10 En una realización, la primera o segunda cadena de inmunoglobulina modificada genéticamente de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica según la invención tiene la secuencia polipeptídica («GA-SEED»):
GQPREPQVYTLPPPSEELALNEX1VTLTCLVKGFPYPSDIAVEWLQGSQELPREKYLTWX2PVX3DSD
GSX4FLYSILRVX5AX6DWKKGDTFSCSVMHEALHNHYTQKSLDR, donde X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 y X_6 pueden ser cualquier aminoácido.

15 Según una realización, X_1 es L o Q, X_2 es A o T, X_3 es L, V, D o T; X_4 es F, A, D, E, G, H, K, N, P, Q, R, S o T; X_5 es A o T y X_6 es E o D en la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención.

20 En una realización, la primera cadena de inmunoglobulina modificada genéticamente de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención comprende la secuencia polipeptídica («AG-SEED»):
GQPFREPVHLLPPSREEMTKNQVSLTCLARGFYPKDIAVEWESNGQPENNYKTTSPRQEPSQGT
TFAVTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKTISL y la segunda cadena de inmunoglobulina modificada genéticamente de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención comprende la secuencia polipeptídica («GA-SEED»):
25 GQPREPQVYTLPPPSEELALNELVTLTCLVKGFPYPSDIAVEWLQGSQELPREKYLTWAPVLDSGD
SFFLYSILRVAAEDWKKGDTFSCSVMHEALHNHYTQKSLDR.

Según una realización, la primera cadena de inmunoglobulina modificada genéticamente de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención, como se describe anteriormente, tiene la secuencia polipeptídica («AG-SEED»):
30 GQPFREPVHLLPPSREEMTKNQVSLTCLVRGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTSPRLEPSQGT
TFAVTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL y la segunda cadena de inmunoglobulina modificada genéticamente de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención, según se describe anteriormente, tiene la secuencia polipeptídica («GA-SEED»):
35 GQPREPQVYTLPPPSEELALNNQVTLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPEPREKYLTWAPVLDSGD
SFFLYSILRVDAERWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL.

El primer fragmento Fab o scFv de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención, según se describe anteriormente, se une a EGFR con una K_D de al menos 5×10^{-8} M.

40 El segundo fragmento Fab o scFv de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención, según se describe anteriormente, se une a c-MET con una K_D de al menos 5×10^{-8} M.

45 El primer fragmento Fab o scFv de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención procede de cetuximab (C225).

El primer fragmento Fab o scFv comprende secuencias VL y VH seleccionadas a partir del grupo compuesto por SEC ID N.º 9, SEC ID N.º 10, SEC ID N.º 11, SEC ID N.º 12, SEC ID N.º 43, SEC ID N.º 44, SEC ID N.º 45, SEC ID N.º 46.

50 El segundo fragmento Fab o scFv comprende secuencias VL seleccionadas a partir del grupo compuesto por SEC ID N.º 15, SEC ID N.º 17, SEC ID N.º 19, SEC ID N.º 21, SEC ID N.º 23, SEC ID N.º 25, SEC ID N.º 27, SEC ID N.º 29, SEC ID N.º 31, SEC ID N.º 33, SEC ID N.º 47, SEC ID N.º 49, SEC ID N.º 51.

55 Las secuencias VL del primer fragmento Fab o scFv de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención se seleccionan las secuencias VH de dicho segundo fragmento Fab a partir del grupo compuesto por SEC ID N.º 16, SEC ID N.º 18, SEC ID N.º 20, SEC ID N.º 22, SEC ID N.º 24, SEC ID N.º 26, SEC ID N.º 28, SEC ID N.º 30, SEC ID N.º 32, SEC ID N.º 34, SEC ID N.º 48, SEC ID N.º 50 o SEC ID N.º 52.

60 Según una realización más preferida, el primer y segundo fragmento Fab o scFv de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención según se describe anteriormente comprenden las secuencias de aminoácidos SEC ID N.º 9, SEC ID N.º 43, SEC ID N.º 17, SEC ID N.º 18 o SEC ID N.º 47, SEC ID N.º 48 o SEC ID N.º 11, SEC ID N.º 44, SEC ID N.º 31, SEC ID N.º 51, SEC ID N.º 32 o SEC ID N.º 45, SEC ID N.º 46, SEC ID N.º 29, SEC ID N.º 49, SEC ID N.º 30, SEC ID N.º 50 o SEC ID N.º 45, SEC ID N.º 46, SEC ID N.º 33, SEC ID N.º 34, SEC ID N.º 52 o SEC ID N.º 11, SEC ID N.º 44, SEC ID N.º 33, SEC ID N.º 34, SEC ID N.º 52.

Según una realización más preferida, el primer y segundo fragmento Fab o scFv de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención según se describe anteriormente comprenden las secuencias de aminoácidos SEC ID N.º 11, SEC ID N.º 44, SEC ID N.º 33, SEC ID N.º 34, SEC ID N.º 52 o SEC ID N.º 45, SEC ID N.º 46, SEC ID N.º 29, SEC ID N.º 49, SEC ID N.º 30, SEC ID N.º 50.

En una realización, el dominio Fc de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica según la invención interacciona con FcRn.

En una realización, los aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención que interacciona con FcRn proceden de la IgG1 humana.

En una realización, la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención, según se describe anteriormente, media en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.

En una realización, la presente memoria descriptiva proporciona un polinucleótido aislado que codifica cualquiera de las secuencias de aminoácido según se describe anteriormente.

En una realización, la presente memoria descriptiva proporciona un vector que comprende al menos un polinucleótido de la presente memoria descriptiva.

Según una realización, la presente memoria descriptiva proporciona una célula huésped que comprende al menos un polinucleótido según la presente memoria descriptiva, o que comprende al menos un vector según la presente memoria descriptiva.

En una realización, la invención proporciona un método para producir una molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención según se describe anteriormente, comprendiendo el proceso de la invención:

- cultivar una célula huésped según la presente memoria descriptiva en condiciones suficientes para la expresión heteróloga de dicha molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica;
- purificar dicha molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica.

En una realización, la presente memoria descriptiva proporciona la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención que se puede obtener mediante el método de la invención como se describe anteriormente.

Según una realización, la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica según la invención, según se describe anteriormente, está acoplada a al menos un enlazador.

En una realización, el enlazador de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención está acoplado a un colorante, radioisótopo o citotoxina.

En una realización, al menos una de las cadenas ligeras de Fab o scFv de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención está acoplada a un colorante, radioisótopo o citotoxina.

En una realización, al menos un enlazador, según se describe anteriormente, está acoplado covalentemente a al menos una de las cadenas ligeras de Fab o scFv de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención según se describe anteriormente.

Según una realización, la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención comprende dos enlazadores acoplados covalentemente a las cadenas ligeras de Fab o scFv de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica.

En una realización, las cadenas ligeras de Fab o scFv y/o los dominios CH3 y/o los dominios CH2 de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención están acoplados a un enlazador, donde dicho enlazador está acoplado covalentemente a un colorante, radioisótopo o citotoxina.

Según una realización, la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención es para su uso en el tratamiento del cáncer.

En una realización, la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención es para su uso en el tratamiento del cáncer.

En una realización, la presente memoria descriptiva proporciona una composición que comprende la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención, según se describe anteriormente, y al menos un componente adicional.

- 5 En una realización, la presente memoria descriptiva proporciona una composición farmacéutica que comprende la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención y al menos un componente adicional, o la composición de la presente memoria descriptiva según se describe anteriormente.

10 En una realización, la composición farmacéutica de la presente memoria descriptiva es para su uso en el tratamiento del cáncer.

En una realización, la presente memoria descriptiva proporciona un método para tratar a un sujeto que lo necesita afectado por el cáncer, en el que el tratamiento comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica según la invención.

15

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

20 **Figura 1:** Se representa la unión celular en células NCI-H441 de dos moléculas de inmunoglobulina heterodiméricas biespecíficas de la invención (B10v5x225-H; CS06x225-H) y moléculas de inmunoglobulina heterodiméricas de un solo brazo («one-armed», oa). Anti-HEL: antilisoizima de huevo de gallina (control de isotipo).

25 **Figura 2:** (A) Resultados de la agrupación («binning») de epítomos, (B) experimentos de biosensores mediante interferometría de biocapa (véase el ejemplo 3).

Figura 3: Resultados del desplazamiento de HGF.

Figura 4: Experimentos de ADCC en células A431 utilizando los anticuerpos como se indica.

30 **Figura 5:** Análisis con el sistema Octet de las variantes de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica de un solo brazo (Fab o scFv). «225-L», «225-H» y «225-H» indican las variantes cinéticas de cetuximab humanizado (hu225); «425» indica matuzumab.

35 **Figura 6:** Inhibición de la fosforilación de c-MET en (A) células NCI-H596, (B) células A549.

Figura 7: Resumen cuantitativo de la fosforilación de c-MET en (A) células NCI-H596, (B) células A549.

40 **Figura 8:** (A) Inhibición de la fosforilación de c-MET en células MKN-45 utilizando las moléculas de inmunoglobulina indicadas, (B) inhibición de la fosforilación de EGFR en células NCI-H596 utilizando las moléculas de inmunoglobulinas según se indica.

Figura 9: Ensayos de citotoxicidad en células A549. (A) Control con conjugado sin toxina, (B) ensayo usando anticuerpos acoplados Fab-MMAE-CL según se indica, MMAE: monometil auristatina E

45 **Figura 10:** Ensayos de citotoxicidad en (A) células EBC-1, (B) células NCI-H441

Figura 11: Ensayo de citotoxicidad en células MKN-45 que expresan niveles elevados de c-MET y niveles moderados de EGFR.

50 **Figura 12:** Se representa el aumento de la inhibición de la fosforilación de c-MET en líneas celulares dependientes de HGF: (A) NCI-H596, (B) KP-4.

Figura 13: Aumento de la degradación de c-MET tras el tratamiento durante toda la noche con la molécula B10v5x225-H de la invención.

55

Figura 14: Ensayo de internalización en células NCI-H441 utilizando los anticuerpos y controles según se indica para evaluar la idoneidad de las construcciones individuales para su uso como conjugado fármaco-anticuerpo (CFA).

60 **Figura 15:** Se representan los resultados de un ensayo de unión celular utilizando el anticuerpo y las moléculas de inmunoglobulina indicadas.

Figura 16: Afinidad de unión experimental y calculada para los mutantes puntuales diseñados por ordenador de C225. Las letras de los superíndices indican lo siguiente: **a** - La KD (nM) de los AcM natural (C225) y

mutado se determinó mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR). Cuando $n > 1$, se proporciona la desviación estándar. Las mutaciones que mejoran la afinidad ($p < 0,01$) se muestran en negrita. **b**- Afinidad de unión experimental relativa al tipo natural (kcal/mol). **c** - Afinidad de unión prevista relativa al tipo natural utilizando Rosetta. **d** - Cambio previsto en la energía par Rosetta a lo largo de la interfase. **e**- Cambio previsto en la energía de los puentes de hidrógeno. **f**- Energía de los puentes de hidrógeno calculada de la cadena lateral del residuo mutado. **g** - Cambio previsto en la energía de plegamiento del anticuerpo aislado. NC: no cuantificable, unión muy débil.

Figura 17: Parámetros cinéticos de los anticuerpos SEED parentales monovalentes en comparación con la unión de los Ac biespecíficos MET \times EGFR a los dominios extracelulares de c-MET y EGFR solubles. Se determinaron las constantes cinéticas de cetuximab y matuzumab como referencia. Los anticuerpos se capturaron en biosensores Octet anti-Fc humano y las cinéticas de unión se analizaron a las concentraciones de analito indicadas (de 25 a 0,8 nM o alternativamente de 50 a 3,1 nM). Las temperaturas de fusión (T_m) se determinaron mediante ensayos de intercambio térmico. Leyenda: n. d. = no determinado; KD = constante de afinidad; ka = constante de asociación; kd = constante de disociación; T_m = temperatura de fusión; oa = un solo brazo.

Figura 18: Densidades de receptores de superficie celular c-MET y EGFR humanos en varias líneas celulares tumorales de distintas indicaciones. Se usaron queratinocitos (NHEK.f-c.) para evaluar la toxicidad cutánea relacionada con EGFR y la línea celular hepática HepG2 para la toxicidad hepática mediada por c-MET. Los valores de densidad se presentan como la media de moléculas por célula de triplicados con desviaciones estándar proporcionadas en porcentaje. Leyenda: ACA = adenocarcinoma, CA = carcinoma.

Figura 19: Inhibición de la fosforilación de c-MET y EGFR mediante Ac biespecíficos c-MET \times EGFR. Los valores de IC₅₀ se calcularon mediante un modelo de ajuste 3PL de curvas dosis-respuesta usando GraphPad Prism. Las derivaciones estándar (d.e.) se calcularon para al menos dos experimentos independientes realizados por duplicado. n = número de experimentos independientes.

Figura 20: Inhibición de la fosforilación de c-MET y EGFR mediante Ac biespecíficos c-MET \times EGFR durante la estimulación con ligando. El c-MET fosforilado (**A**) y el EGFR fosforilado (**B**) se cuantificaron en A549, A431 y queratinocitos primarios (NHEK) usando un ensayo de electroquimioluminiscencia (ECL). Las células se trataron con diversas concentraciones de Ac biespecíficos y un control SEED de isotipo no relacionado con estimulación posterior con HGF a 100 ng/ml (A) o EGF a 100 ng/ml (B). Los triángulos indican los respectivos niveles de fosforilación del receptor para células estimuladas (triángulos hacia arriba) y no estimuladas (triángulos hacia abajo). Las curvas de dosis-respuesta se ajustaron usando un modelo 3PL en GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.).

Figura 21: Selectividad *in vitro* de los Ac biespecíficos c-MET \times EGFR en comparación con cetuximab. (**A**) Se mezclaron en una relación de 1:30 EBC-1 como línea celular modelo tumoral con expresión de alta a moderada de c-MET y EGFR y T47D como línea celular modelo epitelial con baja expresión de EGFR y sin expresión de c-MET. Para distinguir las dos líneas celulares, las células EBC-1 se tiñeron con el colorante verde de membrana PKH2. La mezcla de células se incubó con 300 nM de Ac biespecífico y cetuximab y se analizaron mediante citometría de flujo. La unión del anticuerpo se detectó mediante un anticuerpo secundario anti-Fc humano marcado con FITC. Se muestran transferencias en puntos representativas para la fluorescencia verde frente a amarilla. (**B**) La selectividad *in vitro* se definió como el cociente de la media de la intensidad de fluorescencia de EBC-1 y de la población de células T47D.

Figura 22: Citotoxicidad de los conjugados fármaco-anticuerpo SEED biespecíficos c-MET \times EGFR generados mediante conjugación covalente dirigida a sitio del inhibidor de la tubulina MMAE al extremo C terminal de ambas cadenas pesadas en comparación con cetuximab como CFA y CFA anti-lisozima de huevo de gallina (HEL) como las correspondientes construcciones de referencia. La citotoxicidad se evaluó en células tumorales que sobreexpresan EGFR, A431 (**A**) y MDA-MB-468 (**B**), en queratinocitos primarios (NHEK.f-c., **C**) como línea celular epitelial normal, en células que sobreexpresan c-MET, MKN45 (D) y EBC-1 (**E**), así como en HepG2 (**F**) como línea celular hepática. El ensayo se realizó por duplicado en tres experimentos independientes y las curvas se ajustaron a una curva sigmoidea utilizando GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.).

Figura 23: Citotoxicidad del CFA biespecífico c-MET \times EGFR en la línea celular A431 y queratinocitos. Los valores de EC₅₀ para las células A431 y los valores de IC₅₀ para los queratinocitos (NHEK.f-c.) se calcularon mediante el ajuste a una curva sigmoidea usando GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.). Los asteriscos indican un mal ajuste de los resultados, ya que las curvas no alcanzan una meseta de saturación a la concentración más alta (*). ED₈₀ representa la concentración de CFA a la que mueren el 80 % de las células A431 en comparación con células no tratadas, TD₂₀ indica la dosis a la cual la

viabilidad celular de los queratinocitos se reduce en un 20 %. Se calcularon dos definiciones para un índice terapéutico de traducción *in vitro* o rango terapéutico: la diferencia entre IC₅₀ y EC₅₀, así como el cociente entre TD₂₀ y ED₈₀.

5 **Figura 24:** La SE-HPLC analítica indica una pureza >95 % de cuatro ejemplos de anticuerpos (Ac) biespecíficos tras la purificación: **(A)** B10v5x225-M, **(B)** B10v5x225-H, **(C)** CS06x225-M y **(D)** CS06x225-H.

Figura 25: Efecto sinérgico de CS06x225-H sobre la inhibición de la fosforilación de c-MET, EGFR y AKT. **(A)** Las células A549 se incubaron con 300 nM de los correspondientes AcM como se indica durante 3 h y se estimularon con HGF y EGF. Los lisados celulares se sometieron a inmunotransferencia y se detectaron EGFR, c-MET y AKT tanto fosforilados como totales. Se utilizó GAPDH como control de carga. **(B)** Cuantificación de los niveles de fosfo-AKT en células A549 tras el tratamiento con AcM 500 nM, así como combinaciones de los AcM control (500 nM cada uno) y estimulación con HGF y EGF. Los lisados celulares se sometieron a ELISA de electroluminiscencia (ECL). **(C)** El ELISA de ECL de los lisados de células A549 tratadas con AcM y estimuladas con HGF para la detección de c-MET fosforilado indicaba un aumento de la potencia de CS06x225-H en comparación con la combinación de oa CS06 y oa 225-H. **(D)** Las células A549 se trataron con diversas concentraciones de los AcM sin estimulación y los lisados se sometieron a ELISA de ECL para detectar los niveles de c-MET fosforilado. B10v5x225-M y B10v5x225-H mostraron agonismo parcial comparable al de LY2875358.

Figura 26: Internalización de anticuerpos (Ac) biespecíficos determinada mediante citometría de flujo y microscopia de fluorescencia confocal. **(A)** La internalización se cuantificó mediante análisis de citometría de flujo empleando Ac biespecíficos a 100 nM que se detectaron con conjugado anti-Fc humano-AlexaFluor488 a 37 °C durante 1 h en comparación con células incubadas a 4 °C. La unión a la superficie celular residual se inactivó con anticuerpo anti-AlexaFluor488. **(B)** Se incubaron células EBC-1 con CS06x225-H 100 nM y se detectaron con conjugado anti-Fc humano-AlexaFluor488 a 37 °C o a 4 °C. La tinción de la superficie se eliminó mediante lavado ácido.

Figura 27: Citotoxicidad de CFA biespecíficos y Ac biespecíficos sobre NHEK a los 6 días. Se incubaron queratinocitos primarios (NHEK) con diversas concentraciones de CFA biespecífico o, alternativamente, con Ac biespecíficos durante 6 días para excluir el hecho de que la lenta velocidad de división de los queratinocitos en comparación con las células tumorales influya sobre la citotoxicidad del inhibidor de tubulina MMAE. Las curvas se representaron usando un modelo 3PL en GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.).

LISTADO DE SECUENCIAS

	SEC ID N.º 1	AG-SEED
	SEC ID N.º 2	AG-SEED
40	SEC ID N.º 3	GA-SEED
	SEC ID N.º 4	GA-SEED
	SEC ID N.º 5	AG-SEED
	SEC ID N.º 6	GA-SEED
	SEC ID N.º 7	AG-SEED
45	SEC ID N.º 8	GA-SEED
	SEC ID N.º 9	secuencia V _L de C225 humanizado
	SEC ID N.º 10	variantes cinéticas de VL de C225 humanizado
	SEC ID N.º 11	secuencia VH de C225 humanizado
	SEC ID N.º 12	variantes cinéticas de VH de C225 humanizado
50	SEC ID N.º 13	secuencia VL de C425 humanizado
	SEC ID N.º 14	secuencia VH de C425 humanizado
	SEC ID N.º 15	secuencia VL de A12 de unión a c-MET
	SEC ID N.º 16	secuencia VH de A12 de unión a c-MET
	SEC ID N.º 17	secuencia VL de B10 de unión a c-MET
55	SEC ID N.º 18	secuencia VH de B10 de unión a c-MET
	SEC ID N.º 19	secuencia VL de C10 de unión a c-MET
	SEC ID N.º 20	secuencia VH de C10 de unión a c-MET
	SEC ID N.º 21	secuencia VL de E07 de unión a c-MET
	SEC ID N.º 22	secuencia VH de E07 de unión a c-MET
60	SEC ID N.º 23	secuencia VL de G02 de unión a c-MET
	SEC ID N.º 24	secuencia VH de G02 de unión a c-MET
	SEC ID N.º 25	secuencia VL de H06 de unión a c-MET
	SEC ID N.º 26	secuencia VH de H06 de unión a c-MET
	SEC ID N.º 27	secuencia VL de F03 de unión a c-MET

	SEC ID N.º 28	secuencia VH de F03 de unión a c-MET
	SEC ID N.º 29	secuencia VL de F06 de unión a c-MET
	SEC ID N.º 30	secuencia VH de F06 de unión a c-MET
5	SEC ID N.º 31	secuencia VL de B10v5 de unión a c-MET
	SEC ID N.º 32	secuencia VH de B10v5 de unión a c-MET
	SEC ID N.º 33	secuencia VL de CS06 de unión a c-MET
	SEC ID N.º 34	secuencia VH de CS06 de unión a c-MET
	SEC ID N.º 35	enlazador glicina-serina
	SEC ID N.º 36	bisagra 1
10	SEC ID N.º 37	bisagra 2
	SEC ID N.º 38	secuencia CL
	SEC ID N.º 39	secuencia CH1
	SEC ID N.º 40	dominio CH2
	SEC ID N.º 41	dominio CH3 (AG)
15	SEC ID N.º 42	dominio CH3 (GA)
	SEC ID N.º 43	variante cinética S58R de VH de C225 humanizado (hu225-L)
	SEC ID N.º 44	variante cinética N108Y de VL de C225 humanizado (hu225-M)
	SEC ID N.º 45	variante cinética T109D de VH de C225 humanizado (hu225-H)
	SEC ID N.º 46	variante cinética N109E, T116N de VL de C225 humanizado (hu225-H)
20	SEC ID N.º 47	variantes de VL de B10 de unión a c-MET que comprenden sustituciones de aminoácidos únicos o múltiples
	SEC ID N.º 48	variante cinética Q6E de VH de B10 de unión a c-MET (numeración IMGT)
	SEC ID N.º 49	variantes de secuencia de VL de F06 de unión a c-MET que comprenden sustituciones de aminoácidos únicos o múltiples
25	SEC ID N.º 50	variantes de VL de F06 de unión a c-MET que comprenden sustituciones de aminoácidos únicos o múltiples
	SEC ID N.º 51	variantes de VL de B10v5 de unión a c-MET que comprenden sustituciones de aminoácidos únicos o múltiples
30	SEC ID N.º 52	variantes cinéticas de VH de CS06 de unión a c-MET.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Aunque la presente invención se describe en detalle a continuación, debe entenderse que esta invención no se limita a las metodologías, protocolos y reactivos en particular descritos en este documento, ya que estos pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en este documento tiene el propósito únicamente de describir realizaciones en particular y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitada exclusivamente por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que normalmente entiende un experto en la materia.

A continuación se describirán los elementos de la presente invención. Estos elementos se enumeran con realizaciones específicas, sin embargo, debe entenderse que pueden combinarse de cualquier manera y en cualquier número para crear realizaciones adicionales. No debe interpretarse que los ejemplos y las realizaciones preferidas descritos de modo diverso limitan la presente invención solo a las realizaciones descritas explícitamente. Debe entenderse que esta descripción apoya y abarca realizaciones que combinan las realizaciones descritas explícitamente con cualquier número de los elementos descritos y/o preferidos. Asimismo, cualquier permutación y combinación de todos los elementos descritos en esta solicitud debe considerarse revelada por la descripción de la presente solicitud a menos que el contexto indique otra cosa.

A través de esta especificación y las reivindicaciones que le siguen, a menos que el contexto requiera otra cosa, se entenderá que el término «comprender», y variaciones como «comprende» y «comprendiendo», implica la inclusión de un miembro especificado, entero o en fases, pero no la exclusión de cualquier otro miembro no especificado, entero o en fases. El término «constar de» es una realización particular del término «comprender», en el que se excluye cualquier otro miembro no especificado, entero o en fases. En el contexto de la presente invención, el término «comprender» abarca el término «constar de».

Se debe interpretar que los términos «un/una» y «el/la» y referencias similares usadas en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) cubren tanto el plural como el singular, a menos que se indique otra cosa en este documento o lo contradiga claramente el contexto. La relación de intervalos de valores en este documento pretende simplemente servir como un método abreviado de hacer referencia individualmente a cada valor independiente que se encuentra dentro del intervalo. A menos que se indique otra cosa en este documento, cada valor individual se incorpora dentro de la especificación como si se enumerara individualmente en este documento. Ningún texto de la especificación debe interpretarse como que indica algún elemento no reivindicado esencial para la práctica de la invención.

A lo largo del texto de esta especificación se citan varios documentos. Nada en este documento debe interpretarse como una admisión de que la invención no tiene derecho a preceder a dicha memoria descriptiva en virtud de la invención previa.

Los objetivos descritos se resuelven por la presente invención, preferiblemente por el contenido de las reivindicaciones adjuntas. Los inventores han encontrado sorprendentemente que las moléculas de inmunoglobulina heterodiméricas biespecíficas según la invención pueden utilizarse para superar la resistencia a monoterapias dirigidas a EGFR o c-MET. Además, se ha encontrado sorprendentemente que las moléculas de inmunoglobulina heterodiméricas biespecíficas de la invención se unen a células que expresan uno de EGFR o c-MET con menor abundancia y alta selectividad.

El objetivo descrito se resuelve según una primera realización mediante la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención que comprende

(i) un primer fragmento Fab o scFv que se une específicamente a EGFR y

(ii) un segundo fragmento Fab o scFv que se une específicamente a c-MET y

(iii) una región bisagra de anticuerpo, un dominio CH2 de anticuerpo y un dominio CH3 de anticuerpo que comprenden un dominio híbrido de interfase de interacción proteína-proteína en el que cada uno de dichos dominios de interfase de interacción se forma mediante segmentos de aminoácidos del dominio CH3 de un primer miembro y segmentos de aminoácidos del dominio CH3 de dicho segundo miembro, en el que dicho dominio de interfase proteína-proteína de la primera cadena interacciona con la interfase proteína-proteína de la segunda cadena mediante la homodimerización de los correspondientes segmentos de aminoácidos del mismo miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas dentro de dichos dominios de interacción,

en el que la primera o segunda cadena de inmunoglobulina genéticamente modificada tiene la secuencia polipeptídica («AG-SEED»):

GQPFRPEVHLLPPSREEMTKNQVSLTCLARGFYXPX₁DIAVEWESNGQPENNYKTTPSRQEPSQGTTTTFAVTSKLT₂X₂D
KSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKX₃ISL (SEC ID N.º 1), donde X₁, X₂ y X₃ puede ser cualquier aminoácido. Por ejemplo, los aminoácidos representados por X₁, X₂ y X₃ puede seleccionarse independientemente entre sí entre el grupo de aminoácidos naturales. Las cadenas de inmunoglobulina genéticamente modificadas que forman parte de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención y sus correspondientes secuencias se han descrito en el documento WO 2007/110205. En la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención el término heterodimérico

Una «proteína heteromultimérica» según la invención es una molécula de proteína que comprende al menos una primera subunidad y una segunda subunidad, en la que cada subunidad contiene un dominio no idéntico. La molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención comprende dos dominios proteicos no idénticos, por ejemplo, «AG-SEED» y «GA-SEED» que darán lugar a una heterodimerización de los dominios proteicos no idénticos en una relación de 1:1. La molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención según una primera realización comprende un primer fragmento Fab o scFv que se une específicamente a EGFR. El término fragmento Fab se refiere a un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno que puede, por ejemplo, obtenerse mediante tratamiento de las inmunoglobulinas de tipo IgG con papaína, lo que dará lugar a dos fragmentos Fab y un dominio Fc. Los aspectos funcionales y los métodos de obtención de los fragmentos Fab se describen por ejemplo en «Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies» de D.J. King, CRC Press, 1998, capítulo 2.4.1; Zaho y cols. Protein Expression and Purification 67 (2009) 182-189; S.M. Andrew, J.A. Titus, Fragmentation of immunoglobulin G, Curr. Protoc. Cell Biol. (2003) Unidad 16.14 (Capítulo 16). La molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención puede comprender también, por ejemplo, un primer fragmento scFv que se une específicamente a EGFR. El término «scFv» según se usa en la presente invención se refiere a una molécula que comprende un dominio (o región) variable de cadena pesada de anticuerpo (VH) y un dominio (o región) variable de cadena ligera de anticuerpo (VL) conectados mediante un enlazador, y carece de dominios constantes, por ejemplo, un fragmento scFv según la invención puede incluir, por ejemplo, moléculas de unión que constan de un dominio variable de cadena ligera (VL) o porción del mismo, y un dominio variable de cadena pesada (VH) o porción del mismo, donde cada dominio variable (o porción del mismo) deriva del mismo o diferentes anticuerpos. Las moléculas de scFv preferiblemente comprenden un enlazador interpuesto entre el dominio VH y el dominio VL, que puede por ejemplo, incluir una secuencia peptídica que comprenda los aminoácidos glicina y serina. Por ejemplo, la secuencia peptídica puede comprender la secuencia de aminoácidos (Gly₄Ser)_n, donde n es un número entero entre 1 y 6, por ejemplo, n puede ser 1, 2, 3, 4, 5 o 6, preferiblemente n = 4. Las moléculas scFv y sus métodos de obtención son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. N.º 5 892 019; Ho y cols. 1989. Gene 77:51; Bird y cols. 1988 Science 242:423; Pantoliano y cols. 1991. Biochemistry 30:10117; Milenic y cols. 1991. Cancer Research 51:6363; Takkinen y cols. 1991. Protein Engineering 4:837.

Un primer fragmento Fab o scFv de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención se une específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) humano. La unión específica, o cualquiera de sus variantes gramaticales, se refiere a una unión del primer fragmento Fab o scFv con una K_d de al menos 1×10^{-6} M, por ejemplo, 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, 1×10^{-12} M a EGFR. EGFR según la invención se refiere al EGFR que tiene las secuencias que se proporcionan en la entrada P00533 de la base de datos UniProtKB, incluidas todas sus isoformas y variantes de secuencia (entradas P00533-1, P00533-2, P00533-3, P00533-4 de la base de datos UniProtKB), o cualquiera de las mutaciones descritas en Cai y cols., PLoS ONE 9(4):e95228, como por ejemplo, c.2126A>C, c.2155G>T, c.2156G>C, c.2235_2249del15, c.2236_2250del15, c.2237_2251del, c.2239_2248ATTAAGAGGAG>C, c.2240_2257del18, c.2248G>C, c.2303G>T, c.2573T>G, c.2582T>A, p.745del_frameshift, p.L858R, p.S768I. El primer fragmento Fab de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica según la invención se une a EGFR con una K_D de al menos 5×10^{-8} M.

La molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención además comprende un segundo fragmento Fab o scFv que se une específicamente a c-MET. c-MET, según se usa en este documento se refiere al protooncogén MET, receptor tirosina quinasa (entrada P08581 de la base de datos UniProtKB), que también puede denominarse receptor del factor de crecimiento de hepatocitos. Por ejemplo, c-MET también incluye variantes de secuencia como los que se describen en Nat. Genet. 1997 mayo;16(1):68-73, por ejemplo, c-MET R970C (MET^{R970C}), c-MET T992I (MET^{T992I}), MET^{M1149T}, MET^{V1206L}, MET^{V1238I}, MET^{D1246N}, MET^{Y1248C}, MET^{L1213V}, MET^{D1246H}, MET^{Y1248H}, MET^{M1268T}, MET^{A320V}, MET^{N375S}. La unión específica del segundo fragmento Fab o scFv a c-MET se refiere a una unión del segundo fragmento Fab o scFv con una K_d de al menos 1×10^{-6} M, por ejemplo, 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, 1×10^{-12} M a c-MET. El segundo fragmento Fab de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica según la invención se une a c-MET con una K_D de al menos 5×10^{-8} M.

La molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención según una primera realización de la invención comprende además una región bisagra de anticuerpo, un dominio CH2 de anticuerpo y un dominio CH3 de anticuerpo. Por ejemplo, existen cinco clases de inmunoglobulinas (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) que contienen todas ellas una región bisagra y que pueden formar parte de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención. Adicionalmente, algunas de estas clases de inmunoglobulinas tiene subclases, por ejemplo, IgG tiene cuatro subclases (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4). (Alberts, B. y cols., capítulo 23: The Immune System, In Molecular Biology of the Cell, 3.^a edición, Garland Publishing, Inc., Nueva York, N.Y.), cuyas regiones bisagra también pueden formar parte de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención. La región bisagra puede, por ejemplo, estar dividida en tres regiones, la bisagra superior, media e inferior. La bisagra superior se define como el número de aminoácido entre el final del primer dominio de la cadena pesada (CH1) y la primera cisteína que forma un puente disulfuro entre cadenas pesadas. La bisagra media es rica en prolina y contiene los puentes disulfuro en cisteínas entre cadenas pesadas. La bisagra inferior conecta la bisagra media con el dominio CH2 (véase, por ejemplo, Sandle, I. y Michaelsen, T., capítulo 3: Engineering the Hinge Region to Optimize Complement-induced Cytolysis, en Antibody Engineering: A Practical Guide, W. H. Freeman y Co., Nueva York, N.Y.; Hamers-Casterman, C., Naturally Occurring Antibodies Devoid of Light Chains, 363 Nature 446 [1993] y Tersikh, A. V., «Peptabody»: A New Type of High Avidity Binding Protein, 94 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1663 [1997]). La región bisagra de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención puede comprender también, por ejemplo, cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las regiones bisagra descritas en J. of Biological Chem. VOL. 280, N.º 50, págs. 41494-41503, 16 de diciembre, 2005. El primer fragmento Fab o scFv y el segundo fragmento Fab o scFv de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica según la invención comprende las secuencias definidas en la reivindicación 1 adjunta.

En una realización, la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención comprende como primer miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas IgG y como segundo miembro IgA. Por ejemplo, la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención puede en una realización comprender la región bisagra según la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º 1 o SEC ID N.º 2. Por ejemplo, la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención puede comprender derivados de dominios CH3 de IgG e IgA humanas que generan heterodímeros CH3 modificados genéticamente por intercambio de secuencias (SEED) humanos complementarios que están compuestos de segmentos alternativos de secuencias CH3 de IgA e IgG humanas como se describe en Protein Engineering, Design & Selection vol. 23 n.º 4 págs. 195-202, 2010; o documento WO 2007/110205 A1). Los pares resultantes de dominios CH3 SEED se asocian preferiblemente para formar heterodímeros cuando se expresan en células de mamífero. Las proteínas de fusión SEEDbody (Sb) constan de [bisagra de IgG1]-CH2-[CH3 SEED].

En una realización la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención según se describe anteriormente comprende una primera o segunda cadena de inmunoglobulina modificada genéticamente («AG-SEED») que tiene la secuencia polipeptídica según la SEC ID N.º 2 en la que X_1 es K o S, X_2 es V o T, y X_3 es T o S. Por ejemplo, la primera o segunda cadena de inmunoglobulina modificada genéticamente de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º 2 en la que X_1 es K, X_2 es V, y X_3 es S, X_1 es K, X_2 es V, y X_3 es T, X_1 es K, X_2 es T, y X_3 es S, X_1 es K, X_2 es T, y X_3 es T, X_1 es S, X_2 es V, y X_3 es S, X_1 es S, X_2 es V, y X_3 es T, X_1 es S, X_2 es T, y X_3 es S, o X_1 es S, X_2 es T, y X_3 es T.

En una realización, la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención según se describe anteriormente comprende una primera o segunda cadena de inmunoglobulina modificada genéticamente que tiene la secuencia polipeptídica según la SEC ID N.º 3 («GA-SEED»), donde X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 y X_6 puede ser cualquier aminoácido, por ejemplo X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 pueden seleccionarse independientemente entre alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, asparagina o ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina o valina. Según una realización, la primera o segunda cadena de inmunoglobulina modificada genéticamente de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención según se describe anteriormente tiene la secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º 3, donde X_1 es L o Q, X_2 es A o T, X_3 es L, V, D o T; X_4 es F, A, D, E, G, H, K, N, P, Q, R, S o T; X_5 es A o T, y X_6 es E o D. En una realización preferida, la primera cadena de inmunoglobulina modificada genéticamente comprende la secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º 5 («AG-SEED») y la segunda cadena de inmunoglobulina modificada genéticamente de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención según se describe anteriormente comprende la secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º 6 («GA-SEED»).

En una realización, la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención se une al EGFR según se describe anteriormente con una afinidad de al menos $K_D = 5 \times 10^{-8} \text{ M}$, $1 \times 10^{-9} \text{ M}$, $1 \times 10^{-10} \text{ M}$, $1 \times 10^{-11} \text{ M}$, $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ a EGFR. El primer fragmento Fab de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica según la invención se une al EGFR con una K_D de al menos $5 \times 10^{-8} \text{ M}$. Según una realización, la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención se une a c-MET según se describe anteriormente con una afinidad de al menos $K_D = 5 \times 10^{-8} \text{ M}$, $1 \times 10^{-9} \text{ M}$, $1 \times 10^{-10} \text{ M}$, $1 \times 10^{-11} \text{ M}$, $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ a c-MET. El segundo fragmento Fab de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica según la invención se une a c-MET con una K_D de al menos $5 \times 10^{-8} \text{ M}$. Por ejemplo, la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención según se describe anteriormente se une mediante un primer o segundo fragmento Fab o scFv frente a c-MET y EGFR con una afinidad de $K_D = 5 \times 10^{-8} \text{ M}$, $1 \times 10^{-9} \text{ M}$, $1 \times 10^{-10} \text{ M}$, $1 \times 10^{-11} \text{ M}$, $1 \times 10^{-12} \text{ M}$. El EGFR y c-MET pueden, por ejemplo, estar presentes en una única célula, como una célula cancerosa, o por ejemplo, en una célula como por ejemplo, una célula cancerosa, que puede ser una única célula, una diversidad de células o tejido tumoral que expresa c-MET y EGFR. Las células pueden también, por ejemplo, estar en suspensión, o desprendidas del tejido y pueden circular por el torrente circulatorio de un individuo, como un ser humano afectado de cáncer. Por ejemplo, la afinidad del primer y segundo fragmento Fab y/o scFv de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención puede determinarse mediante ELISA o resonancia de plasmones superficiales como se describe en J. Biochem. Biophys. Methods 57 (2003) 213-236, Current Protocols in Protein Science (2006) 19.14.1-19.14.17.

El primer fragmento Fab o scFv de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención según se describe anteriormente deriva de cetuximab (C225). Por ejemplo, el primer fragmento Fab o scFv de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica puede comprender secuencias VL y VH de cetuximab, o por ejemplo, secuencias VL y VH de cetuximab que pueden haber sido humanizadas. Por ejemplo, humanizado según se usa para la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención se refiere a un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo quimérico que contiene una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. La humanización de una secuencia de anticuerpo determinada dará lugar a una reducción de la inmunogenicidad de un anticuerpo xenogénico, como un anticuerpo murino, o anticuerpo quimérico que ya comprende secuencias humanas, para la introducción en un humano, al tiempo que mantiene toda la afinidad de unión al antígeno y la especificidad del anticuerpo. Por ejemplo, cetuximab es un anticuerpo quimérico que está compuesto de las regiones Fv (variable; unión a antígeno) del anticuerpo monoclonal anti-EGFR murino 225 específico de la porción N-terminal del EGFR humano con regiones constantes (estructurales) de las cadenas pesada y ligera kappa de la IgG1 humana.

La humanización puede, por ejemplo, comprender tecnología de injerto de CDR, que implica la sustitución de las regiones determinantes de complementariedad de, por ejemplo, un anticuerpo de ratón en un dominio estructural humano, por ejemplo, véase el documento WO 92/22653. Las estrategias y los métodos para la remodelación superficial de los anticuerpos, y otros métodos para reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos dentro de un huésped diferente, se describen en la patente de EE. UU. 5 639 641. Los anticuerpos pueden humanizarse utilizando varias técnicas diferentes como injerto de CDR (véanse por ejemplo, los documentos EP 0 239 400 B1; WO 91/09967; patentes de EE. UU. N.º 5 530 101; 5 585 089), recubrimiento o remodelación superficial (véanse, por ejemplo, los documentos EP 0 592 106; EP 0 519 596; Padlan E. A., 1991, Molecular Immunology 28(4/5): 489-498; Studnicka G. M. y cols., 1994, Protein Engineering, 7(6): 805-814; Roguska M.A. y cols., 1994, PNAS, 91: 969-973), intercambio de cadenas (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. N.º 5 565 332), e identificación de residuos flexibles (véase, por ejemplo, el documento WO2009032661). Los anticuerpos humanos pueden obtenerse mediante diversos métodos conocidos en la técnica como métodos de despliegue de fagos, como por ejemplo, las patentes de EE. UU. N.º 4 444 887, 4 716 111, 5 545 806 y 5 814 318; y las publicaciones de solicitudes de patente internacional WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, WO 91/10741. Por consiguiente, el primer fragmento Fab o scFv de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención según se describe anteriormente comprende secuencias VL y VH según una cualquiera de SEC ID N.º 9, SEC ID N.º 10, SEC ID N.º 11, SEC ID N.º 12, SEC ID N.º 43, SEC ID N.º 44, SEC ID N.º 45, SEC ID N.º 46. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de VL del primer fragmento Fab o scFv de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica puede comprender la secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º 9, SEC ID N.º 10, SEC ID N.º 44,

SEC ID N.º 46 y las secuencias de aminoácidos de VH seleccionadas entre la SEC ID N.º 43, SEC ID N.º 45, SEC ID N.º 11, SEC ID N.º 12. Las secuencias VL y VH del primer fragmento Fab o scFv según se describe anteriormente puede, por ejemplo, comprender la SEC ID N.º 43 y la SEC ID N.º 9, SEC ID N.º 44 y SEC ID N.º 9 o SEC ID N.º 45 y SEC ID N.º 9 o por ejemplo SEC ID N.º 43 y SEC ID N.º 9 o SEC ID N.º 45 y SEC ID N.º 9 o SEC ID N.º 46 y SEC ID N.º 11.

El segundo fragmento Fab o scFv de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención según se describe anteriormente comprende secuencias VL seleccionadas a partir del grupo compuesto por SEC ID N.º 15, SEC ID N.º 17, SEC ID N.º 19, SEC ID N.º 21, SEC ID N.º 23, SEC ID N.º 25, SEC ID N.º 27, SEC ID N.º 29, SEC ID N.º 31, SEC ID N.º 33, SEC ID N.º 47, SEC ID N.º 49, SEC ID N.º 51.

El segundo fragmento Fab o scFv de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención según se describe anteriormente comprende secuencias VH seleccionadas a partir del grupo compuesto por SEC ID N.º 16, SEC ID N.º 18, SEC ID N.º 20, SEC ID N.º 22, SEC ID N.º 24, SEC ID N.º 26, SEC ID N.º 28, SEC ID N.º 30, SEC ID N.º 32, SEC ID N.º 34, SEC ID N.º 48, SEC ID N.º 50 o SEC ID N.º 52.

Según una realización, el primer y segundo fragmento Fab o scFv de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención según se describe anteriormente comprende las secuencias de aminoácidos seleccionadas a partir de SEC ID N.º 9, SEC ID N.º 43, SEC ID N.º 17, SEC ID N.º 18 o SEC ID N.º 47, SEC ID N.º 48 (p. ej., que puede estar comprendida en la molécula de la invención «225-LxB10») o SEC ID N.º 11, SEC ID N.º 44, SEC ID N.º 31, SEC ID N.º 51, SEC ID N.º 32 (p. ej., que puede estar comprendida en la molécula de la invención «225-MxB10v5») o SEC ID N.º 45, SEC ID N.º 46, SEC ID N.º 29, SEC ID N.º 49, SEC ID N.º 30, SEC ID N.º 50 (p. ej., que puede estar comprendida en la molécula de la invención «225-HxF06») o SEC ID N.º 45, SEC ID N.º 46, SEC ID N.º 33, SEC ID N.º 34, SEC ID N.º 52 (p. ej., que puede estar comprendida en la molécula de la invención «225-HxCS06») o SEC ID N.º 11, SEC ID N.º 44, SEC ID N.º 33, SEC ID N.º 34, SEC ID N.º 52 (p. ej., que puede estar comprendida en la molécula de la invención «225-MxCS06»).

Según una realización, el primer y segundo fragmentos Fab o scFv de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención según se describe anteriormente comprenden las secuencias de aminoácidos seleccionadas a partir de SEC ID N.º 11, SEC ID N.º 44, SEC ID N.º 33, SEC ID N.º 34, SEC ID N.º 52 (p. ej., que se corresponde con la molécula de la invención «225-MxCS06») o SEC ID N.º 45, SEC ID N.º 46, SEC ID N.º 29, SEC ID N.º 49, SEC ID N.º 30, SEC ID N.º 50 (p. ej., que se corresponde con la molécula de la invención «225-HxCS06»).

En una realización de la invención, el dominio Fc de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica interacciona con el receptor Fc neonatal (FcRn). FcRn es un heterodímero similar al complejo principal de histocompatibilidad de clase I compuesto de la cadena ligera soluble de la β 2-microglobulina (β 2m) y una cadena pesada unida a membrana. El análisis de la estructura cristalina reveló que el FcRn humano (hFcRn) se une a la región bisagra CH2-CH3 de ambas cadenas pesadas del homodímero Fc de una IgG, lo que da lugar a una estequiometría 2:1. La interacción entre FcRn y Fc se estabiliza principalmente mediante puentes salinos entre restos aniónicos de FcRn y restos de histidina de la IgG, que están protonados a pH ácido. Los estudios de mutagénesis dirigida a sitio y el análisis de la estructura cristalina del complejo FcRn/Fc de IgG muestran que los restos de aminoácidos del Fc en las posiciones 252-256 de los dominios CH2 y las posiciones 310, 433, 434 y 435 de los dominios CH3 están en el núcleo o muy próximos al sitio de interacción de FcRn, y que los restos de histidina conservados H310 y posiblemente H435 son responsables de la dependencia de pH (véase por ejemplo, mAbs 6:4, 928-942; julio/agosto de 2014; Nature Reviews Immunology 7, 715-725 [septiembre de 2007]). Por ejemplo, la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención puede interaccionar con el FcRn a través de puentes salinos como se describe anteriormente, y puede interaccionar con FcRn mediante puentes salinos que impliquen a otros aminoácidos tanto de AG-SEED como del GA-SEED, protegiendo de este modo a la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención de la degradación y prolongando su semivida en suero. La prolongación de la semivida de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención puede emplearse, por ejemplo, para minimizar las reacciones adversas causadas por dosis altas de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención si se administra a un individuo, por ejemplo, mediante aplicación i.v. o i.m., que también podrá, por ejemplo, dar lugar a una disminución de la frecuencia de inyección de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención. Esto también reducirá, por ejemplo, la carga económica sobre un individuo que pueda necesitar tratamiento con la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención. Por ejemplo, pueden usarse variantes de secuencia de AG-SEED y GA-SEED para reducir la interacción de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención con el FcRn, acortando de este modo su semivida en suero. Las variantes de secuencia, por ejemplo, incluyen las descritas anteriormente, AG-SEED con X₁, X₂ y X₃ que representan cualquier aminoácido o, por ejemplo, preferiblemente una AG-SEED en la que X₁ es K o S, X₂ es V o T y X₃ es T o S, o por ejemplo, una GA-SEED como se describe anteriormente donde X₁, X₂, X₃, X₄, X₅ y X₆ puede ser cualquier aminoácido. Puede preferirse, por ejemplo, que en la GA-SEED X₁ sea L o Q, X₂ sea A o T, X₃ sea L, V, D o T; X₄ sea F, A, D, E, G, H, K, N, P, Q, R, S o T; X₅ sea A o T y X₆ sea E o D.

En una realización, los aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención, según se describe anteriormente, que interacciona con FcRn deriva de IgG1, preferiblemente de la IgG1 humana. Por ejemplo, los aminoácidos que interaccionan con FcRn comprenden aquellos de la IgG1 natural como se describe anteriormente, por ejemplo, los restos de aminoácidos del Fc en las posiciones 252-256 de los dominios CH2 y en las posiciones 310, 433, 434 y 435 de los dominios CH3 están en el núcleo o muy próximos al sitio de interacción con FcRn, de modo que los restos de histidina conservados H310 y posiblemente H435 pueden, por ejemplo, conferir la dependencia del pH de la interacción entre la molécula de inmunoglobulina heterodimérica de la invención y el FcRn.

En una realización, la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención, según se describe anteriormente, media en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo. Por ejemplo, la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención induce ADCC cuando se une al EGFR y al c-MET expresados en la superficie de la misma célula o, por ejemplo, cuando se une a dos células, una de las cuales expresa EGFR y la segunda de las cuales expresa c-MET, donde, por ejemplo EGFR y c-MET son como se define anteriormente. La unión de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención a EGFR y a c-MET presentes en la misma célula o en dos células individuales, pero preferiblemente en la misma célula, es como se describe anteriormente. El término ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo) según se usa para la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención se refiere a un mecanismo de defensa inmunitaria mediado por células en el que una célula efectora del sistema inmunitario lisa de forma activa una célula diana, cuyos antígenos de la superficie de la membrana se han unido a anticuerpos específicos. La ADCC está mediada, por ejemplo, por la unión del CD16 (FcγRIII) expresado en células NK al dominio Fc de los anticuerpos (véase, por ejemplo, Clynes y cols. [2000] *Nature Medicine* 6, 443-446). La ADCC puede, por ejemplo, mejorarse mediante sustituciones de aminoácidos del dominio Fc que afectan a la unión del dominio Fc al CD16. Por ejemplo, Shields y cols. (*J Biol Chem* 9[2], 6591-6604 [2001]) mostraron que las sustituciones de aminoácidos en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración de restos de la UE) mejora la ADCC. Alternativamente, puede obtenerse un aumento de la unión al receptor de Fc y de la función efectora, por ejemplo, alterando la glucosilación de la región Fc. Típicamente, los dos oligosacáridos biantenarios complejos unidos a la Asn 297 del dominio Fc están enterrados entre los dominios CH2, formando contactos extensos con el esqueleto de polisacáridos, y su presencia es esencial para la mediación del anticuerpo en las funciones efectoras como la ADCC (Lifely y cols., *Glycobiology* 5, 813-822 [1995]; Jefferis y cols., *Immunol Rev* 163, 59-76 [1998]; Wright y Morrison, *Trends Biotechnol* 15, 26-32 [1997]). La sobreexpresión de, por ejemplo, la β(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), una glucosiltransferasa que cataliza la formación de oligosacáridos biseccionados aumenta significativamente la actividad ADCC *in vitro* de los anticuerpos. Por tanto, la sobreexpresión de, por ejemplo, GnTIII en líneas celulares utilizadas para la producción de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención, puede dar lugar a proteínas de fusión de la invención enriquecidas en oligosacáridos biseccionados, que generalmente no están fucosiladas y puede mostrar un aumento de la actividad ADCC.

En una realización, la presente memoria descriptiva proporciona polinucleótidos aislados que codifican al menos una de las secuencias de aminoácidos según la SEC ID N.º 1, SEC ID N.º 2, SEC ID N.º 3, SEC ID N.º 4, SEC ID N.º 5, SEC ID N.º 6, SEC ID N.º 7, SEC ID N.º 8, SEC ID N.º 9, SEC ID N.º 10, SEC ID N.º 11, SEC ID N.º 12, SEC ID N.º 13, SEC ID N.º 14, SEC ID N.º 15, SEC ID N.º 16, SEC ID N.º 17, SEC ID N.º 18, SEC ID N.º 19, SEC ID N.º 20, SEC ID N.º 21, SEC ID N.º 22, SEC ID N.º 23, SEC ID N.º 24, SEC ID N.º 25, SEC ID N.º 26, SEC ID N.º 27, SEC ID N.º 28, SEC ID N.º 29, SEC ID N.º 30, SEC ID N.º 31, SEC ID N.º 32, SEC ID N.º 33, SEC ID N.º 34, SEC ID N.º 35, SEC ID N.º 36, SEC ID N.º 37, SEC ID N.º 38, SEC ID N.º 39, SEC ID N.º 40, SEC ID N.º 41, SEC ID N.º 42, SEC ID N.º 43, SEC ID N.º 44, SEC ID N.º 45, SEC ID N.º 46, SEC ID N.º 47, SEC ID N.º 48, SEC ID N.º 49, SEC ID N.º 50, SEC ID N.º 51, SEC ID N.º 52 de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención. Por ejemplo, el polinucleótido aislado de la presente memoria descriptiva puede codificar al menos uno, por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez de las secuencias de aminoácidos según se describe anteriormente. Por ejemplo, en una realización el polinucleótido aislado comprende polinucleótidos que codifican al menos una de las secuencias de aminoácidos según la SEC ID N.º 1, SEC ID N.º 2, SEC ID N.º 3, SEC ID N.º 4, SEC ID N.º 5, SEC ID N.º 6, SEC ID N.º 7, SEC ID N.º 8, SEC ID N.º 31, SEC ID N.º 32, SEC ID N.º 33, SEC ID N.º 34, SEC ID N.º 43, SEC ID N.º 44, SEC ID N.º 45, SEC ID N.º 46, SEC ID N.º 47, SEC ID N.º 48, SEC ID N.º 49, SEC ID N.º 50, SEC ID N.º 51, SEC ID N.º 52 de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención. Por ejemplo, el polinucleótido aislado de la presente memoria descriptiva puede comprender polinucleótidos que codifican secuencias de aminoácidos según (225M, CS06) la SEC ID N.º 11, SEC ID N.º 44, SEC ID N.º 33, SEC ID N.º 34, SEC ID N.º 52 o (225H, CS06) SEC ID N.º 45, SEC ID N.º 46, SEC ID N.º 29, SEC ID N.º 49, SEC ID N.º 30, SEC ID N.º 50. Por ejemplo, en una realización, el polinucleótido aislado según la presente memoria descriptiva puede, por ejemplo, comprender polinucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos según la SEC ID N.º 31, SEC ID N.º 32, SEC ID N.º 43, SEC ID N.º 44, SEC ID N.º 45, SEC ID N.º 46. En una realización, el polinucleótido según la presente memoria descriptiva, por ejemplo, comprende polinucleótidos que codifican los aminoácidos según la SEC ID N.º 31, SEC ID N.º 32, SEC ID N.º 45, SEC ID N.º 46. Por ejemplo, en una realización el polinucleótido según la presente memoria descriptiva codifica secuencias de aminoácidos según la SEC ID N.º 31, SEC ID N.º 32, SEC ID N.º 45, SEC ID N.º 46. En una realización, el polinucleótido según la presente memoria descriptiva comprende polinucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos seleccionados a partir de SEC ID N.º 9, SEC ID N.º 43, SEC ID N.º 17, SEC ID N.º 18 o SEC ID N.º 47, SEC ID N.º 48 (p. ej., que puede estar comprendida en la molécula de la invención «225-

LxB10») o SEC ID N.º 11, SEC ID N.º 44, SEC ID N.º 31, SEC ID N.º 51, SEC ID N.º 32 (p. ej., que puede estar comprendida en la molécula de la invención «225-MxB10v5») o SEC ID N.º 45, SEC ID N.º 46, SEC ID N.º 29, SEC ID N.º 49, SEC ID N.º 30, SEC ID N.º 50 (p. ej., que puede estar comprendida en la molécula de la invención «225-HxF06») o SEC ID N.º 45, SEC ID N.º 46, SEC ID N.º 33, SEC ID N.º 34, SEC ID N.º 52 (p. ej., que puede estar comprendida en la molécula de la invención «225-HxCS06») o SEC ID N.º 11, SEC ID N.º 44, SEC ID N.º 33, SEC ID N.º 34, SEC ID N.º 52 (p. ej., que puede estar comprendida en la molécula de la invención «225-MxCS06») o SEC ID N.º 11, SEC ID N.º 44, SEC ID N.º 33, SEC ID N.º 34, SEC ID N.º 52 (p. ej., que se corresponde con la molécula de la invención «225-MxCS06») o SEC ID N.º 45, SEC ID N.º 46, SEC ID N.º 29, SEC ID N.º 49, SEC ID N.º 30, SEC ID N.º 50 (p. ej., que se corresponde con la molécula de la invención «225-HxCS06») o (225M, CS06) SEC ID N.º 11, SEC ID N.º 44, SEC ID N.º 33, SEC ID N.º 34, SEC ID N.º 52 o (225H, CS06) SEC ID N.º 45, SEC ID N.º 46, SEC ID N.º 29, SEC ID N.º 49, SEC ID N.º 30, SEC ID N.º 50 o (p. ej., que se corresponde con la molécula de la invención «225M, B10v5») SEC ID N.º 11, SEC ID N.º 44, SEC ID N.º 31, SEC ID N.º 51, SEC ID N.º 32 o (p. ej., que se corresponde con la molécula de la invención «225H, CS06») SEC ID N.º 45, SEC ID N.º 46, SEC ID N.º 29, SEC ID N.º 49, SEC ID N.º 30, SEC ID N.º 50. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de cada una de las secuencias de aminoácidos anteriores de la invención puede obtenerse mediante traducción utilizando herramientas de la web, como «Translate tool» (<http://web.expasy.org/translate/>) y pueden, por ejemplo, estar optimizados sus codones según el sistema o huésped de expresión pretendido (véase, por ejemplo, Trends Mol Med. 2014 nov;20(11):604-13; Genome Res. 2007 abr;17(4):401-4). Por ejemplo, los polinucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos según se describe anteriormente pueden estar comprendidos en polinucleótidos individuales, cada uno de los cuales se considera un polinucleótido según la presente memoria descriptiva o, por ejemplo, el polinucleótido según la presente memoria descriptiva puede comprender polinucleótidos que codifican dos de las secuencias de aminoácidos según se describe anteriormente, por ejemplo, en la SEC ID N.º 31, SEC ID N.º 32 o SEC ID N.º 33, SEC ID N.º 34, SEC ID N.º 45, SEC ID N.º 46 o SEC ID N.º 29, SEC ID N.º 30 o SEC ID N.º 11, SEC ID N.º 9 o SEC ID N.º 49, SEC ID N.º 50. Los polinucleótidos según la presente memoria descriptiva como se describe anteriormente pueden, por ejemplo, utilizarse para la producción de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención, por ejemplo, mediante expresión heteróloga en un huésped adecuado, o una célula huésped.

El término «aislado» como se usa con los polinucleótidos según la presente memoria descriptiva se refiere a polinucleótidos que están separados de, por ejemplo, constituyentes, material celular y de otro tipo, con los que el polinucleótido normalmente está asociado en la naturaleza, por ejemplo, el polinucleótido aislado está al menos el 80 %, 90 %, 95 % puro en peso, es decir, carece de constituyentes contaminantes. Por ejemplo, los polinucleótidos aislados de la presente memoria descriptiva pueden referirse a una molécula de ADN que está separada de las secuencias inmediatamente contiguas (en las direcciones 5' y 3') del genoma según se encuentra en la naturaleza del organismo del cual deriva. Por ejemplo, el «polinucleótido aislado» puede comprender una molécula de ADN insertada en un vector, como un plásmido o vector vírico, o integrada en el ADN genómico de un procariota o eucariota.

En una realización, la presente memoria descriptiva proporciona un vector que comprende al menos un polinucleótido según la presente memoria descriptiva como se describe anteriormente. El término vector o vector de expresión según la presente memoria descriptiva se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de replicación extracromosómica. Los vectores preferidos son aquellos capaces de replicación autónoma y expresión de los ácidos nucleicos con los que están relacionados. Los vectores capaces de dirigir la expresión de los genes con los que están operativamente relacionados se denominan en este documento «vectores de expresión». En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante a menudo están en forma de «plásmidos», lo que se refiere en general a lazos de ADN circulares de cadena doble que, en su forma de vector no están unidos al cromosoma. Las secuencias de ácido nucleico necesarias para la expresión de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica en células eucariotas comprende, por ejemplo, al menos un promotor, y potenciadores, señales de terminación y de poliadenilación así como un marcador seleccionable, como por ejemplo, una resistencia a antibiótico. Los vectores de expresión que pueden usarse para la expresión de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención pueden comprender, por ejemplo, pCMV, pcDNA, p4X3, p4X4, p4X5, p4X6, pVL1392, pVL1393, pACYC177, PRS420, o si se van a utilizar sistemas de vectores víricos, por ejemplo, vectores derivados de pBABEpuro, pWPXL, pXP, pueden, por ejemplo, comprender pCMV, pcDNA, p4X3, p4X4, p4X5, p4X6, pVL1392, pVL1393, pACYC177, PRS420, o si se van a utilizar sistemas de vectores víricos por ejemplo, vectores derivados de pBABEpuro, pWPXL, pXP.

En una realización, la presente memoria descriptiva proporciona una célula huésped que comprende la secuencia polinucleotídica o vector según se describe anteriormente, por ejemplo, un polinucleótido o vector o vector de expresión que comprende al menos una secuencia que codifica la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica según se describe anteriormente. Por ejemplo, una célula huésped para su uso en la invención puede ser una célula de levadura, célula de insecto o célula de mamífero. Por ejemplo, la célula huésped de la presente memoria descriptiva puede ser una célula de insecto seleccionada a partir de células Sf9, Sf21, S2, Hi5 o BTI-TN-5B1-4, o por ejemplo, la célula huésped de la presente memoria descriptiva puede ser una célula de levadura seleccionada a partir de *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Yarrowia lipolytica* y *Pichia pastoris*, o por ejemplo, la célula huésped de la presente memoria descriptiva puede ser una célula de mamífero seleccionada a partir de HEK293, HEK293T, HEK293E, HEK 293F, NS0, per.C6,

MCF-7, HeLa, Cos-1, Cos-7, PC-12, 3T3, Vero, vero-76, PC3, U87, SAOS-2, LNCAP, DU145, A431, A549, B35, H1299, HUVEC, Jurkat, MDA-MB-231, MDA-MB-468, MDA-MB-435, Caco-2, CHO, CHO-K1, CHO-B11, CHO-DG44, BHK, AGE1.HN, Namalwa, WI-38, MRC-5, HepG2, L-929, RAB-9, SIRC, RK13, 11B11, 1D3, 2.4G2, A-10, B-35, C-6, F4/80, IEC-18, L2, MH1C1, NRK, NRK-49F, NRK-52E, RMC, CV-1, BT, MDBK, CPAE, MDCK.1, MDCK.2 y D-17.

En una realización, la invención proporciona un método para la producción de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención según se describe anteriormente, en el que el método de la invención comprende las etapas de cultivar una célula huésped según la presente memoria descriptiva según se describe anteriormente en condiciones suficientes para la expresión heteróloga de dicha molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica y purificación de dicha molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica. Por ejemplo, puede permitirse el crecimiento de las células huésped de la presente memoria descriptiva en DMEM que contenía FBS al 10 % y se incubaron a 37 °C en CO₂ al 10 % o, por ejemplo, en medio de cultivo sin proteínas como ayuda en el aislamiento y purificación posteriores, o por ejemplo, en medio de insecto de Grace, express Five® SFM (Life Technologies) o medio High Five® (Life Technologies), medio YNM, caldo YPD, o por ejemplo, PichiaPink (Life Technologies). Por ejemplo, la expresión de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención en células de mamífero puede realizarse según el método descrito en Methods Mol Biol. 2012;907:341-58. Las células de insecto también pueden utilizarse, por ejemplo, para la expresión de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención como, por ejemplo, células de *Drosophila* S2 como se describe en Journal of Immunological Methods 318 (2007) 37-46. Las células de levadura, por ejemplo, también pueden utilizarse para la expresión de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención, como *Pichia pastoris* como se describe en Appl Microbiol Biotechnol. 2014 dic;98(24):10023-39, o Biotechnol Lett. Julio 2015;37(7):1347-54.

Puede permitirse que las células huésped de la presente memoria descriptiva crezcan entre 12-408 h, por ejemplo, de aproximadamente 12 a aproximadamente 400 h, por ejemplo, entre 14 h, 16 h, 18 h, 20 h, 24 h, 36 h, 48 h, 72 h, 96 h a aproximadamente 120 h, 144 h, 168 h, 192, 216 h, 240 h, 264 h, 288 h, 312 h, 336 h, 360 h, 384 h, 408 h. Posteriormente, el vNAR de la invención o la proteína de fusión de la invención puede aislarse y purificarse. Por ejemplo, la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención puede purificarse y aislarse mediante cromatografía, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión molecular, precipitación con sulfato de amonio o ultrafiltración. Por ejemplo, la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención también puede comprender una secuencia señal, que se refiere a una secuencia de aminoácidos capaz de iniciar el paso de un polipéptido, al que se une de forma operativa, por ejemplo, mediante un enlace peptídico, al interior del retículo endoplásmico (RE) de una célula huésped. El péptido señal generalmente se escinde mediante una endopeptidasa (p. ej., una peptidasa específica del péptido señal localizada en el RE) para liberar el polipéptido (maduro). La longitud de un péptido señal típicamente está en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 aminoácidos.

En una realización, la presente memoria descriptiva proporciona una molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica según la invención como se describe anteriormente que se puede obtener mediante el método de la invención como se describe anteriormente. Por ejemplo, la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención como se describe anteriormente puede producirse mediante el método de la invención como se describe anteriormente y aislarse.

En una realización, la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención, según se describe anteriormente, está acoplada a al menos un enlazador. El término «enlazador» o «péptido enlazador» se refiere a una secuencia de aminoácidos sintética o artificial que conecta o enlaza dos moléculas, como por ejemplo, dos secuencias polipeptídicas que enlazan dos dominios polipeptídicos o, por ejemplo, una proteína y un fármaco citostático o toxina. El término «sintético» o «artificial» como se usa en la presente invención se refiere a secuencias de aminoácidos que no son naturales. El enlazador que se une covalentemente a la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención es escindible o no escindible. El término «escindible» como se usa en la presente invención se refiere a enlazadores que pueden ser escindidos por proteasas, ácidos o mediante reducción de un enlace disulfuro (p. ej., mediada por glutatión o sensible a glutatión). Por ejemplo, los enlazadores escindibles pueden comprender enlazadores valina-citrulina, enlazadores hidrazona o enlazadores disulfuro. Los enlazadores no escindibles que pueden, por ejemplo, unirse covalentemente al sustrato que comprende el donante de amino de la invención comprende el enlazador maleimidocaproilo a MMAF (mc-MMAF), N-maleimidometilciclohexano-1-carboxilato (MCC) o enlazadores mercapto-acetamidocaproilo. Por ejemplo, los enlazadores que se acoplan covalentemente a la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención pueden también incluir enlazadores como los descritos en el documento WO 2010/138719, o por ejemplo, aquellos descritos en el documento WO 2014/093379.

En una realización, el enlazador de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención, según se describe anteriormente, está acoplado a un colorante, radioisótopo o citotoxina. El término «conjugado» según se usa para el enlazador como se describe anteriormente se refiere al hecho de que el colorante, radioisótopo o citotoxina puede, por ejemplo, estar no unido covalentemente mediante, por ejemplo, interacciones iónicas o hidrofóbicas, o conjugados covalentemente con la molécula enlazadora como se describe anteriormente. Por ejemplo, el enlazador puede comprender estreptavidina y el colorante, radioisótopo o citotoxina pueden estar unidos covalentemente a

biotina. Por ejemplo, el colorante que puede estar covalentemente unido o conjugado a la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención puede también ser un fluoróforo, como por ejemplo, 1,8-ANS, 4-metilumbeliferona, 7-amino-4-metilcumarina, 7-hidroxi-4-metilcumarina, acridina, Alexa Fluor 350™, Alexa Fluor 405™, AMCA, AMCA-X, ATTO Rho6G, ATTO Rho11, ATTO Rho12, ATTO Rho13, ATTO Rho14, ATTO Rho101, Pacific Blue, Alexa Fluor 430™, Alexa Fluor 480™, Alexa Fluor 488™, BODIPY 492/515, Alexa Fluor 532™, Alexa Fluor 546™, Alexa Fluor 555™, Alexa Fluor 594™, BODIPY 505/515, Cy2, cyQUANT GR, FITC, Fluo-3, Fluo-4, GFP (EGFP), mHoneydew, Oregon Green™ 488, Oregon Green™ 514, EYFP, DsRed, DsRed2, dTomato, Cy3.5, ficoeritrina (PE), rojo rodamina, mTangerine, mStrawberry, mOrange, mBanana, tetrametilrodamina (TRITC), R-ficoeritrina, ROX, DyLight 594, Calcium Crimson, Alexa Fluor 594™, Alexa Fluor 610™, Texas Red, mCherry, mKate, Alexa Fluor 660™, Alexa Fluor 680™, alofocianina, DRAQ-5, carboxinaftofluoresceína, C7, DyLight 750, Cellvue NIR780, DM-NERF, eosina, eritrosina, fluoresceína, FAM, hidroxycumarina, IRDyes (IRD40, IRD 700, IRD 800), JOE, rodamina B Lissamine, Marina Blue, metoxicumarina, naftofluoresceína, PyMPO, 5-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína, 5-carboxi-2',4',5',7'-tetraclorofluoresceína, 5-carboxifluoresceína, 5-carboxi-rodamina, 6-carboxi-rodamina, 6-carboxitetrametilamino, Cascade Blue, Cy2, Cy3, Cy5,6-FAM, cloruro de dansilo, HEX, 6-JOE, NBD (7-nitrobenz-2-oxa-l,3-diazol), Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Pacific Blue, ácido ftálico, ácido tereftálico, ácido isoftálico, violeta de cresilo rápido, violeta azul de cresilo, azul cresilo brillante, ácido para-aminobenzoico, eritrosina, ftalocianinas, azometinas, cianinas, xantinas, succinilfluoresceínas, criptatos de metales de tierras raras, europio trisbipiridina diamina, criptato o quelato de europio, diamina, dicianinas o colorante La Jolla Blue. Los colorantes que pueden utilizarse en la invención pueden incluir también, por ejemplo, puntos cuánticos. El término «punto cuántico» como se usa en la presente invención se refiere a un nanocristal esférico único de material semiconductor en el que el radio del nanocristal es menor o igual al tamaño del radio del excitón de Bohr para ese material semiconductor (el valor del radio del excitón de Bohr puede calcularse a partir de los datos encontrados en manuales que contienen información sobre propiedades de semiconductores, como CRC Handbook of Chemistry and Physics, 83.^a ed., Lide, David R. (Editor), CRC Press, Boca Raton, Fla. [2002]). Los puntos cuánticos se conocen en la técnica, como se describen en referencias como Weller, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 32: 41-53 (1993), Alivisatos, *J. Phys. Chem.* 100: 13226-13239 (1996) y Alivisatos, *Science* 271: 933-937 (1996). Los puntos cuánticos pueden tener, por ejemplo, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 1000 nm de diámetro, por ejemplo, 10 nm, 20 nm, 30 nm, 40 nm, 50 nm, 60 nm, 70 nm, 80 nm, 90 nm, 100 nm, 150 nm, 200 nm, 250 nm, 300 nm, 350 nm, 400 nm, 450 nm o 500 nm, preferiblemente al menos de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 50 nm, más preferiblemente los puntos cuánticos tienen al menos de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 20 nm de diámetro (por ejemplo aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nm). Los puntos cuánticos se caracterizan por su tamaño nanométrico sustancialmente uniforme, que tienen con frecuencia aproximadamente de un 10 % a un 15 % de polidispersión o rango de tamaño. Un punto cuántico es capaz de emitir radiación electromagnética tras su excitación (es decir, el punto cuántico es fotoluminiscente) e incluye un «núcleo» de uno o más materiales semiconductores primeros y puede estar rodeado por una «coraza» de un segundo material semiconductor. Un núcleo de punto cuántico rodeado por una coraza semiconductor se denomina punto cuántico de «núcleo/coraza». El material de la «coraza» circundante tendrá preferiblemente una energía de hueco de banda que es mayor a la energía de hueco de banda del material del núcleo y puede elegirse que tenga una separación atómica próxima a la del sustrato del «núcleo». El núcleo y/o la coraza pueden ser un material semiconductor que incluye, pero sin limitaciones, los materiales del grupo II-VI (ZnS, ZnSe, ZnTe, US, CdSe, CdTe, HgS, HgSe, HgTe, MgS, MgSe, MgTe, CaS, CaSe, CaTe, SrS, SrSe, SrTe, BaS, BaSe, BaTe y similares), III-V (GaN, GaP, GaAs, GaSb, InN, InP, InAs, InSb y similares) y IV (Ge, Si y similares), PbS, PbSe y una aleación o una mezcla de los mismos. Los materiales preferidos de la coraza incluyen ZnS. Los puntos cuánticos pueden estar acoplados al enlazador, enzima o proteína de la invención mediante cualquier método conocido en la técnica, como por ejemplo, los métodos descritos en *Nanotechnology*. 9 diciembre de 2011;22(49):494006; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 84 (2011) 360-368. Por ejemplo, el enlazador según se describe anteriormente puede estar unido o acoplado a un radioisótopo como por ejemplo, ⁴⁷Ca, ¹⁴C, ¹³⁷Cs, ¹⁵⁷Cr, ⁵⁷Co, ⁶⁰Co, ⁶⁷Cu, ⁶⁷Ga, ¹²³I, ¹²⁵I, ¹²⁹I, ¹³¹I, ³²P, ⁷⁵Se, ⁸⁵Sr, ³⁵S, ²⁰¹Th, ³H, preferiblemente, los radioisótopos se incorporan en una molécula adicional, como por ejemplo, un quelante. Los quelantes típicos que pueden usarse por ejemplo como una molécula adicional unida covalentemente al sustrato que comprende el donante de amino de la invención son DPTA, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), EGTA (ácido etilenglicol-O,O'-bis(2-aminoetil)-N,N',N'-tetraacético, NTA (ácido nitrilotriacético), HEDTA (N-(2-hidroxietil)-etilendiamino-N,N',N'-triacético), DTPA (ácido 2-[Bis[2-[bis(carboximetil)amino]-etil]amino]acético) o DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclo-dodecano-1,4,7,10-tetraacético).

Por ejemplo, el enlazador puede estar conjugado covalentemente a una citotoxina, que puede por ejemplo denominarse también «carga activa» (véase p. ej., Perez y cols. *Drug Discovery Today* Vol. 19 (7), julio 2014). Las citotoxinas que, por ejemplo, son adecuadas para la unión covalente a las moléculas enlazadoras pueden agruparse en dos clases principales: la primera clase incluye citotoxinas que rompen el ensamblaje de microtúbulos y la segunda clase incluye citotoxinas cuya diana es la estructura del ADN. En consecuencia, las citotoxinas que pueden, por ejemplo, estar acopladas covalentemente al enlazador como se describe anteriormente incluyen doxorubicina, calicheamicina, auristatina, maitansina, duoaromicina y sus análogos, α -amaitina, tubulisina y sus análogos. Se conocen en la técnica métodos para acoplar o unir covalentemente citotoxinas a enlazadores y pueden, por ejemplo, realizarse según el método descrito en *Mol. Pharmaceutics* 2015, 12, 1813-1835.

En una realización, el al menos un enlazador, según se describe anteriormente, está acoplado covalentemente a al menos una de las cadenas ligeras (VL) de Fab o scFv de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención. Por consiguiente, al menos una cadena ligera, por ejemplo, una o dos cadenas ligeras de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención pueden estar acopladas a un enlazador como se describe anteriormente. Por ejemplo, el acoplamiento covalente puede realizarse mediante la introducción de uno o más, por ejemplo, 2, 3 o 4, 5 o 6, restos de cisteína adicionales en la molécula de scFv, principalmente en el extremo C-terminal, que permiten la conjugación a reactivos con grupos sulfhidrilo reactivos como se describe, por ejemplo, en Merty y cols. *Protein Expression and Purification* 21, 156-164 (2001); Nataranja, A y cols. *Bioconjugate Chem.* 16, 113-121; Krimmer y cols. *Protein Eng., Des. Sel.* 19, 461-470; Albrecht y cols. *Bioconjugate Chem.* 15, 16-26). Los restos de cisteína pueden estar también, por ejemplo, alquilados mediante su reacción con α -halocetonas o aceptores de Michael, como derivados de maleimida. Alternativamente, puede utilizarse, por ejemplo, la modificación de los restos de lisina, que es el método más antiguo y directo para el marcaje de proteínas mediante los grupos amino primarios de lisina. El grupo ϵ -amino de la lisina en la proteína de interés se puede hacer reaccionar fácilmente con ésteres activados, cloruros de sulfonilo, isocianatos e isotiocianato para producir las correspondientes amidas, sulfonamidas, ureas y tioureas (véase p. ej., Takaoka y cols., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013, 52, 4088-4106). Otros ejemplos de bioconjugación incluyen la conjugación de proteínas fluorescentes, colorantes o el anclaje con moléculas funcionales, por ejemplo, los PEG, porfirinas, péptidos, ácidos peptidonucléicos y fármacos (Takaoka y cols., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013, 52, 4088-4106).

Por ejemplo, la conjugación mediada por enzimas puede también aplicarse para el acoplamiento covalente del enlazador como se describe anteriormente a la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención. Por ejemplo, en el documento WO 2014/001325 A1 se describe el uso de sortasa A para la bioconjugación específica de sitio a regiones Fc de un anticuerpo. La sortasa A (SrtA) es la primera proteína integral de la membrana bacteriana descrita en *Staphylococcus aureus*. SrtA cataliza una reacción de transpeptidación que ancla proteínas a la pared celular bacteriana. Tras el reconocimiento de una señal de direccionamiento LPXTG (X = D, E, A, N, Q o K), una cisteína catalítica escinde el enlace peptídico entre los restos T y G, lo que tiene como resultado la formación de un compuesto intermedio tioacilo. Este compuesto intermedio tioacilo puede reaccionar después con una glicina amino terminal que actúa como nucleófilo. SrtA acepta (oligo)glicina N-terminal como nucleófilo, generando un nuevo enlace peptídico entre las dos moléculas. SrtA funciona en condiciones fisiológicas y se ha utilizado en reacciones de bioconjugación para marcar proteínas por ejemplo con biotina, o para funcionalizar un Fab recombinante específico de HER2 con la citotoxina vegetal gelonina (véase p. ej., Popp y cols. [2011] *Angew. Chem. Int. Ed.* 50: 5024-5032; Kornberger y cols. [2014] *mAbs* 6 [2]: 354-366). Típicamente, las proteínas diana como, por ejemplo, las cadenas VL y VH del primer y/o segundo fragmentos Fab o scFv como se describe anteriormente, se marcan en el extremo carboxilo terminal con el motivo LPXTG seguido de una etiqueta de purificación, tal como la transpeptidación mediada por SrtA elimina la etiqueta de la purificación y genera la proteína marcada.

En una realización, la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica según la invención como se describe anteriormente comprende dos enlazadores acoplados covalentemente a las cadenas ligeras de Fab o scFv de dicha molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica. Por ejemplo, los enlazadores pueden acoplarse a la cadena ligera de la cadena VL del primer fragmento Fab o scFv de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención que se une específicamente a EGFR como se describe anteriormente y, por ejemplo, a la cadena VL del segundo fragmento Fab o scFv de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención que se une específicamente a c-MET como se describe anteriormente.

En una realización, las cadenas ligeras de Fab o scFv y/o los dominios CH3 y/o los dominios CH2 de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención como se describe anteriormente están acoplados a un enlazador, donde dicho enlazador está acoplado covalentemente a un colorante, radioisótopo o citotoxina como se describe anteriormente.

Por ejemplo, las cadenas VL del primer y segundo fragmento Fab o scFv pueden estar acopladas covalentemente a un enlazador como se describe anteriormente, donde el enlazador además se acopla a un colorante, radioisótopo o citotoxina como se describe anteriormente, o ambos dominios CH3 genéticamente modificados de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención como se describe anteriormente («AG-SEED», «GA-SEED») pueden estar unidos covalentemente a un enlazador como se describe anteriormente, o por ejemplo, los dominios CH2 de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención con se describe anteriormente, puede cada uno está acoplado covalentemente a un enlazador como se describe anteriormente. Los estudios con el conjugado anticuerpo monoclonal anti-CD30-auristatina E (MMAE) han demostrado que los CFA con una estequiometría anticuerpo-fármaco de 1:2-1:4 son más eficaces, siendo más preferible la relación 1:4 (véase p. ej., Hamblett y cols. *Clinical Cancer Research* [2004] Vol. 10, 7063-7070). Por tanto, la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención como se describe anteriormente puede, por ejemplo, comprender 2, 3 o 4 moléculas enlazadoras que están acopladas covalentemente a la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención, donde cada enlazador está preferiblemente acoplado a una citotoxina como se describe anteriormente, por ejemplo, las cadenas VL y las cadenas VH de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica pueden estar acopladas a una citotoxina a través de un enlazador como se describe anteriormente. Por

ejemplo, las cadenas VH y los dominios CH3 de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención como se describe anteriormente pueden estar acopladas covalentemente a un enlazador, donde cada enlazador está acoplado adicionalmente a una citotoxina. Alternativamente, las cadenas VL del primer y segundo fragmento Fab o scFv y los dominios CH3 o CH2 de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención como se describe anteriormente pueden estar covalentemente acopladas a una citotoxina como se describe anteriormente.

En una realización, la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica según la invención como se describe anteriormente es para su uso en el tratamiento del cáncer. El término «cáncer» según se usa en la presente invención se refiere a diversas afecciones causados por el crecimiento anómalo incontrolado de células, por ejemplo, células capaces de causar cáncer, denominadas «células cancerosas», poseen propiedades características como proliferación incontrolada, inmortalidad, potencial metastásico, crecimiento rápido y velocidad de proliferación y/o determinadas características morfológicas típicas. Las células cancerosas pueden, por ejemplo, estar en forma de tumor, aunque dichas células también pueden existir individualmente dentro de un sujeto, o puede ser una célula cancerosa no oncogénica. El término cáncer según se usa en el contexto del método de tratamiento de la invención puede, por ejemplo, referirse a cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer adrenal, leucemia, linfoma, mieloma, sarcoma óseo y de tejido conjuntivo, tumores cerebrales, cáncer de tiroides, cáncer de páncreas, cáncer hipofisario, cáncer de ojo, cáncer vaginal, cáncer de vulva, cáncer de cuello uterino, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer esofágico, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer hepático, cáncer de vesícula biliar, colangiocarcinoma, cáncer de pulmón, cáncer de testículo, cáncer de pene, cáncer bucal, cáncer de piel, cánceres de riñón, tumor de Wilms y cáncer de vejiga, cáncer colorrectal metastásico (CCRM), metástasis hepáticas no resecable, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (CECC), carcinoma de células de Merkel.

En una realización, la presente memoria descriptiva proporciona una composición que comprende la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención, según se describe anteriormente, y al menos un componente adicional. Por ejemplo, la composición de la presente memoria descriptiva puede comprender la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención como se describe anteriormente y uno o más de agua, tampón, estabilizante, sal, azúcar, conservante (p. ej., cloruro de benzalconio), lípidos, antioxidantes, ácidos carboxílicos, polietilenglicol (PEG). Por ejemplo, el tampón o solución tampón puede tener un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, por ejemplo de aproximadamente pH 5 a aproximadamente pH 6, o de aproximadamente pH 6 a aproximadamente pH 7, o de aproximadamente pH 8 a aproximadamente pH 9, o de aproximadamente 5,1; 5,2; 5,3; 5,4; 5,5; 5,6; 5,7; 5,8; 5,9; 6,0; 6,1; 6,2; 6,3; 6,5; 6,6; 6,7; 6,8; 6,9; 7,0; 7,1; 7,2; 7,3; 7,4; 7,5; 7,6; 7,7; 7,8 a aproximadamente 8,0; 8,1; 8,2; 8,3; 8,4; 8,5; 8,6; 8,7; 8,8; 8,9 y puede comprender, por ejemplo, tampones acetato de sodio, histidina, citrato, succinato o fosfato. Por ejemplo, el acetato sódico, histidina, citrato, succinato o fosfato puede estar presente en la composición según la presente memoria descriptiva a una concentración de aproximadamente 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM a aproximadamente 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 125 mM, 150 mM. Por ejemplo, las soluciones tampón como se describe anteriormente pueden combinarse con un conservante como cloruro de benzalconio para estabilizar la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención como se describe anteriormente. Otros ingredientes pueden, por ejemplo, incluir, polietilenglicol con pesos moleculares promedio de 200-4000 Dalton, por ejemplo, 300, 400, 500 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 1750, 2000, 2250, 2500, 3000, 3500 Dalton y sus derivados. También pueden por ejemplo, utilizarse derivados de polietilenglicol y pueden por ejemplo, incluir monolaurato de polietilenglicol, monooleato de polietilenglicol y monopalmitato de polietilenglicol. Por ejemplo, la composición según la presente memoria descriptiva puede comprender la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica como se describe anteriormente en forma acuosa o liofilizada y al menos un agente quimioterapéutico adicional, donde el agente se selecciona entre el grupo que comprende capecitabina, 5-fluoro-2'-desoxiuridina, irinotecán, 6-mercaptopurina (6-MP), cladribina, clofarabina, citarabina, flouxuridina, fludarabina, gemcitabina, hidroxiurea, metotrexato, bleomicina, paclitaxel, clorambucilo, mitoxantrona, camptotecina, topotecán, tenipósido, colcemida, colchicina, pemetrexed, pentostatina, tioguanina; leucovorina, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, o una combinación de 5-FU, leucovorina, una combinación de 5-fluorouracilo/ácido folínico (5-FU/FA), una combinación de 5-fluorouracilo/ácido folínico (5-FU/FA) y oxaliplatino (FLOX), una combinación de 5-FU, leucovorina, oxaliplatino (FOLFOX), o una combinación de 5-FU, leucovorina e irinotecán (FOLFIRI), o una combinación de leucovorina, 5-FU, oxaliplatino e irinotecán (FOLFOXIRI), o una combinación de capecitabina y oxaliplatino (CapeOx).

En una realización, la presente memoria descriptiva proporciona una composición farmacéutica que comprende la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención como se describe anteriormente y al menos un componente adicional, o que comprende la composición de la presente memoria descriptiva según se describe anteriormente. Por ejemplo, la composición farmacéutica de la presente memoria descriptiva puede comprender la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de la invención según se describe anteriormente en una concentración de aproximadamente 10 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 35 mg/ml, 40 mg/ml, 45 mg/ml, 50 mg/ml, 55 mg/ml, 60 mg/ml a aproximadamente 70 mg/ml, 75 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml, 100 mg/ml, 112 mg/ml, 125 mg/ml, 150 mg/ml, 175 mg/ml, 200 mg/ml, o, por ejemplo, de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 35 mg/ml, 40 mg/ml, 45 mg/ml, 50 mg/ml, 55 mg/ml, 60 mg/ml a aproximadamente

70 mg/ml, 75 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml, 100 mg/ml, 112 mg/ml, 125 mg/ml, 150 mg/ml, 175 mg/ml, 200 mg/ml, o por ejemplo, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 35 mg/ml, 40 mg/ml, 45 mg/ml, 50 mg/ml, 55 mg/ml, 60 mg/ml a aproximadamente 70 mg/ml, 75 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml, 100 mg/ml, 112 mg/ml, 125 mg/ml, 150 mg/ml, 175 mg/ml, 200 mg/ml y, por ejemplo, un tampón acuoso como se describe anteriormente. La composición farmacéutica de la presente memoria descriptiva como se describe anteriormente puede comprender también, por ejemplo, tensioactivos, como por ejemplo, tensioactivos aniónicos, como por ejemplo, una mezcla de alquil sulfatos de sodio, tensioactivos catiónico, como por ejemplo, amonio cuaternario y tensioactivos catiónicos piridinio, o tensioactivos no iónicos, como por ejemplo, ésteres de sorbitán, polisorbatos, por ejemplo polisorbato 20 (monolaurato de polioxietilen-(20)-sorbitán), polisorbato 21 (monolaurato de polioxietilen-(4)-sorbitán), polisorbato 40 (monopalmitato de polioxietilen-(20)-sorbitán), polisorbato 60 (monoestearato de polioxietilen-(20)-sorbitán), polisorbato 61 (monoestearato de polioxietilen-(4)-sorbitán), polisorbato 65 (triestearato de polioxietilen-(20)-sorbitán), polisorbato 80 (monooleato de polioxietilen-(20)-sorbitán), polisorbato 81 (monooleato de polioxietilen-(5)-sorbitán), polisorbato 85 (trioleato de polioxietilen-(20)-sorbitán), polisorbato 120 (monoisoestearato de polioxietilen-(20)-sorbitán), o poloxámeros, por ejemplo, poloxámero 105, poloxámero 108, poloxámero 122, poloxámero 124, benzoato de poloxámero 105. Los conservantes que puede comprender la composición farmacéutica según la presente memoria descriptiva puede ser cloruro de benzalconio en una concentración de 0,004 % a 0,01 %. Por ejemplo, la composición farmacéutica de la presente memoria descriptiva puede formularse utilizando técnicas convencional como formas de dosis discretas, como cápsulas, una solución o una suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión de agua en aceite y como bolo; junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado.

En una realización, la composición farmacéutica de la presente memoria descriptiva como se describe anteriormente es para su uso en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, la composición farmacéutica de la presente memoria descriptiva como se describe anteriormente para su uso en el tratamiento del cáncer puede administrarse a una persona afectada de cáncer.

En una realización, la presente memoria descriptiva proporciona un método de tratamiento que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica de la presente memoria descriptiva según se describe anteriormente. Por ejemplo, el método de tratamiento de la presente memoria descriptiva puede comprender administrar a una persona que lo necesite que padezca cáncer según se describe anteriormente de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg de la composición farmacéutica de la presente memoria descriptiva, o de aproximadamente 0,005 mg/kg a aproximadamente 45 mg/kg, o de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg, o de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 35 mg/kg, o de aproximadamente 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg, 10 mg/kg, 12,5 mg/kg, 15 mg/kg, 17,5 mg/kg, 20 mg/kg, 22,5 mg/kg, 25 mg/kg a aproximadamente 26 mg/kg, 27 mg/kg, 28 mg/kg, 29 mg/kg, 30 mg/kg, 32,5 mg/kg, 35 mg/kg, 37,5 mg/kg, 40 mg/kg, 42,5 mg/kg, 45 mg/kg. Según se usa, el término «mg/kg» se refiere a mg de la composición farmacéutica/kg de peso corporal en la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, una cantidad farmacéuticamente eficaz de la composición farmacéutica de la presente memoria descriptiva puede administrarse a un individuo que padece cáncer. La cantidad farmacéuticamente eficaz depende del individuo, el tipo de cáncer que se va a tratar, el peso corporal y la edad del individuo, el nivel de la enfermedad o la vía de administración.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Generación de ligantes de anticuerpo anti c-MET y anti-EGFR

Generación de ligantes de anticuerpo c-MET

Se realizó un «panning» de bibliotecas de genes de anticuerpos desplegadas en fagos vírgenes HAL7/8 frente a c-MET según Hust y colaboradores. 36;37 Brevemente, tras la preselección con tampón de «panning» (leche desnatada en polvo al 1 %, BSA al 1 %, Tween®20 al 0,05 % en PBS) en placas de 96 pocillos maxisorp (Nunc), se seleccionaron fagos que desplegaban scFv sobre 1 µg de c-MET-Fc (R&D Systems, 358-MT/CF) o de dominio SEMA de c-MET (producido a nivel interno) inmovilizados y se eluyó con tripsina. Después de dos a tres rondas de «panning», los ligantes específicos de c-MET se enriquecieron y seleccionaron mediante ELISA de captura de c-MET de scFv producido.

Para la maduración de la afinidad, (a) se realizó una PCR propensa a errores para los dominios variables utilizando kits de mutagénesis aleatoria GeneMorph II (Agilent Technologies) según las instrucciones del fabricante, (b) aleatorización de la región tres determinante de complementariedad de la cadena pesada (CDR-H3) ordenada por GeneArt aplicando una estrategia de mutagénesis parsimoniosa 70 y (c) se realizó un intercambio de cadenas ligeras usando la diversidad de HAL7/8. El «panning» se llevó a cabo usando despliegue de fagos y despliegue de levaduras para F06 y B10, respectivamente. Para el clon F06, se aplicó una estrategia de selección de disociación mediante lavados rigurosos (diez veces) con 100 µl de tampón de «panning» por pocillo, así como adición de c-MET soluble para el ensayo de competencia (inició de la segunda ronda). CS06 se basó en combinación racional de mutaciones

abundantes de las estrategias (a) y (b). B10v5 se derivó de la estrategia (c) usando despliegue superficial de levaduras como se describe en, por ejemplo, *Biotechnol. Bioeng.* 2009, 103: 1192-201; *Protein Eng Des Sel* 2010; 23: 155-9.

Generación de ligantes de anticuerpo anti-EGFR

La estructura de C225 unido al dominio extracelular de EGFR 42 se optimizó con el programa Rosetta Protein Structure and Design (versión 2.3.0) usando un protocolo de esqueleto fijo y optimización de las cadenas laterales para minimizar la energía del modelo inicial para el diseño según la función de energía de Rosetta. Las moléculas de agua de la interfase observadas en la estructura cristalina se mantuvieron durante la minimización, pero no durante los cálculos del diseño posteriores. Se seleccionaron 37 restos en la interfase anticuerpo-antígeno o próximos a ella para una mutagénesis puntual *in silico* saturante. En cada uno de estos restos se crearon 19 variantes (tipo natural y 18 mutaciones, sin cisteína) optimizando el rotámero del resto mutado mientras se mantenía fijo el esqueleto. Utilizando estos modelos preliminares, los restos vecinos se identificaron como cualquier resto con al menos 3 átomos pesados dentro de 5,5 Å de un átomo pesado en el resto diseñado. El rotámero del resto mutado y sus vecinos se optimizaron usando la función de puntuación Rosetta estándar (una combinación lineal de términos incluyendo un potencial Lennard-Jones, un potencial de puentes de hidrógeno dependiente de orientación, un modelo de solvatación implícita y términos estadísticos que capturan las preferencias de aminoácidos dependientes de esqueleto y rotámero. Las sustituciones hidrófobas se describirán en otro lugar. Las sustituciones polares se filtraron solo a aquellas variantes con mejoras de al menos 0,5 unidades de energía Rosetta en la puntuación de puentes de hidrógeno dependientes de orientación o el potencial de pareja relativo a la molécula nativa reempaquetada para seleccionar variantes mejoradas. Las tres sustituciones puntuales que potencian la afinidad se combinaron en un mutante triple, y este se reempaquetó y puntuó mediante el método Rosetta como se describió anteriormente para los mutantes puntuales. La afinidad de las variantes seleccionadas se midió *in vitro* mediante resonancia de plasmones superficiales. Las variantes también se transfirieron al scFv hu225 y las afinidades en este contexto se verificaron mediante interferometría de biocapa.

Ejemplo 2: Expresión y purificación de SEEDbodies biespecíficos c-MET × EGFR

Varias combinaciones de fragmentos de anticuerpos frente a EGFR y c-MET según la invención como se describe en este documento se unieron a anticuerpos biespecíficos utilizando tecnología SEED.

Los SEEDbodies biespecíficos c-MET × EGFR se expresaron mediante transfección transitoria de células Expi293FTM (células de riñón embrionario humano) según las instrucciones del fabricante del kit de transfección (Invitrogen). Brevemente, las células Expi293FTM en suspensión se cultivaron en medio de expresión Expi293FTM (Invitrogen) a 37 °C, CO₂ al 5 % y 180 rpm. El día de la transfección, las células se sembraron en medio recién preparado con una densidad de células viables por ml final de 2×10^6 . Se añadió a las células la mezcla de reactivo DNA-ExpiFectamineTM293 diluido en medio Opti-MEM® I (Invitrogen). Dieciséis horas después de la transfección se añadieron los potenciadores 1 y 2 de transfección ExpiFectamineTM293. Los sobrenadantes celulares que contenían anticuerpos secretados se recogieron 5 días después de la transfección mediante centrifugación a $4300 \times g$, 4 °C y 20 min y filtración a través de dispositivos Stericup o Steriflip de 0,22 µm (Millipore). Se llevó a cabo una producción a pequeña escala en un volumen de 25 ml y la purificación se realizó con columnas de proteína A para centrifuga PROSEP® A (Millipore, N.º P36486) según las instrucciones del fabricante seguido de diálisis en PBS a pH 7,4 usando el kit de diálisis Pur-A-LyzerTM (Sigma-Aldrich).

Las producciones a gran escala se realizaron en un volumen de expresión de 200 ml. Los sobrenadantes se purificaron mediante cromatografía de afinidad (HiTrap MabSelect SuRe de 5 ml, GE Healthcare) en un aparato ÄKTA Explorer 100 (GE Healthcare) con la posterior cromatografía de exclusión molecular preparativa (HiLoad 26/60Superdex 200 pg, GE Healthcare). Las concentraciones de proteína se determinaron mediante espectroscopia UV A280 y la pureza se analizó mediante electroforesis en gel con geles NuPAGE BisTris 4 %/8 % (Life Technologies) y tinción con Coomassie, así como cromatografía líquida de alta resolución de exclusión molecular analítica (TSK Super SW3000, Tosoh). Los niveles de endotoxina se evaluaron en cartuchos de lisado de amebocitos Limulus Endosafe® PTS y el lector Endofase® PTS (Charles River).

Las secuencias VH y VL del anticuerpo para oa 5D5 (MetMAb, onartuzumab), LY2875358 (LA480_vC8H241, emibetuzumab) y h224G11 (ABT-700) humanizados se obtuvieron a partir de información pública (p. ej., las patentes de EE. UU. N.º US 6 214 344 B1, US 8 398 974 B2, US 0 273 060 A1). Las secuencias se clonaron en vectores de expresión de mamíferos que contenían fragmentos de las cadenas ligeras y pegadas de la región constante de IgG1, excepto en el caso de oa 5D5 donde se aplicó tecnología de botón en ojal («knob-into-hole») (p. ej., como se describe en *Protein Eng* 1996; 9: 617-21). Todos los anticuerpos de referencia anti-c-MET, así como cetuximab (C225, Erbitux) y matuzumab se produjeron a nivel interno (Merck) en células HEK293E utilizando procedimientos estándar de transfección y purificación, por ejemplo, como se describe anteriormente.

Ejemplo 3: Unión de los anticuerpos biespecíficos c-MET × EGFR a c-MET y EGFR en células

Se analizó la capacidad de unión de los anticuerpos biespecíficos c-MET × EGFR, los anticuerpos control de un solo brazo (monovalentes) (anti-c-MET y anti-EGFR), así como un control de isótopo no relacionado (anti-lisozima de huevo de gallina, anti-HEL) a células NCI-H441 que expresan c-MET y EGFR (como por ejemplo, se muestra en la figura 1, figura 15). Las células NCI-H441 se despegaron con tripsina, se centrifugaron a 250 × g durante 10 min a 4 °C y se resuspendieron en tampón FACS (BSA al 1 % en PBS 1x). Las células se transfirieron a placas de 96 pocillos de fondo redondo a una densidad 1×10^5 células/pocillo en hielo. Se añadieron anticuerpos biespecíficos c-MET × EGFR (0,02-200 nM) en tampón FACS por triplicado durante 1 h en hielo. Las células se centrifugaron a 1000 × g durante 5 min a 4 °C y se lavaron 3 veces con 100 µl de tampón FACS. Las células se incubaron con 500 ng/pocillo de anticuerpo de cabra específico anti-fragmento gamma del Fc de la IgG humana conjugado con fluoresceína (FITC) (Jackson ImmunoResearch) diluido en tampón FACS en hielo durante 1 h. Las células se lavaron de nuevo 3 veces con 100 µl de tampón FACS. Para la tinción de contraste de las células no viables, las células centrifugadas se resuspendieron en 200 µl de solución de yoduro de propidio (Invitrogen) diluido en tampón FACS (1:200). La fluorescencia de las células se analizó a 488 nm usando un citómetro Guava easyCyte HT (Millipore). Los datos se representaron como la media de la intensidad de fluorescencia (fluorescencia total menos fluorescencia de fondo, es decir, control de células sin teñir) frente al logaritmo de la concentración de anticuerpo biespecífico y se ajustó a una curva de dosis-respuesta sigmoidea con pendiente variable usando GraphPad Prism 4 (GraphPad Software).

Ejemplo 4: «Binning» de epítomos de ligantes de anticuerpo anti-c-MET usando interferometría de biocapa (BLI)

Se llevó a cabo un experimento de «binning» (agrupación) de epítomos con anticuerpos anti-c-MET que se utilizaron en los anticuerpos biespecíficos y se comparó con los anticuerpos de referencia procedentes de la literatura (MetMab, emibetuzumab, h224G11). Se realizaron experimentos con biosensores utilizando interferometría de biocapa en una plataforma Octet Red (Forté Bio) equipada con puntas de biosensores (Forté Bio) anti-Fc humano (AHC). Todos los datos se recopilaron a 30 °C en tampón de cinética (PBS pH 7,4, BSA al 0,1 %, Tween-20 al 0,02 %). Se produjo ECD-His de c-MET humano (HGFR, dominio extracelular del receptor del factor de crecimiento de hepatocitos) y se purificó en el laboratorio. Las puntas de biosensores se equilibraron 30 segundos en PBS. A continuación, se inmovilizaron 25 nM para IgG bivalentes y 50 nM para anticuerpos monovalentes de un solo brazo en PBS en puntas de los biosensores durante 200 s como anticuerpo primario. Las puntas se inactivaron con 400 nM de un anticuerpo control no relacionado (anti-lisozima de huevo de gallina, anti-HEL SEED, diluido en PBS) para minimizar la unión posterior de los anticuerpos secundarios a las puntas de los biosensores. Tras la adquisición de un valor basal en tampón de cinética durante 60 s, el ECD del c-MET humano se sometió a anticuerpos primarios inmovilizados durante 600 s. A continuación, las interacciones entre los anticuerpos anti-c-MET secundarios y ECD de c-MET unido a los anticuerpos primarios inmovilizados se analizaron durante 600 s. El análisis de la unión del anticuerpo secundario se realizó visualmente diferenciando la unión simultánea caracterizada por una alta velocidad de unión [nM] en comparación con un control de isotipo no relacionado (anti-HEL SEED). Los resultados del «binning» de epítomos se representan en la figura 2A.

Ejemplo 5: Ensayo de ELISA competitivo de HGF/desplazamiento de HGF por los anticuerpos de la invención

La competencia entre el HGF humano recombinante (factor de crecimiento de hepatocitos, R&D Systems, 294-HGN/CF) y el anticuerpo por la unión al ECD de c-MET humano recombinante (dominio extracelular del HGFR, receptor del factor de crecimiento de hepatocitos) se detectó mediante ELISA usando HGF en fase sólida. Se inmovilizó el HGF humano recombinante (1,255 pmol) en placas Maxisorp de 96 pocillos (Thermo Scientific) durante toda la noche a 4 °C. Tras bloquear las placas con BSA al 2 %, se añadió a las placas ECD de c-MET humano recombinante biotinilado (1,13 pmol) preincubado con diluciones seriadas de anticuerpos (de 200 nM a 0,2 nM). La unión se reveló utilizando estreptavidina conjugada con HRP (Merck Millipore), sustrato de TMB y ácido sulfúrico (solución de ELISA Ultra TMB en un paso). La absorbancia resultante de la unión del ECD de c-MET a HGF sin adición de anticuerpo anti-c-MET se definió como el 100 % de unión a HGF. Se utilizó anti-HEL (lisozima de huevo de gallina) como anticuerpo control de isotipo no relacionado. Los datos se representaron como % de unión a HGF frente al logaritmo de la concentración de anticuerpo y se ajustaron a una curva dosis-respuesta sigmoidea con pendiente variable utilizando GraphPad Prism 4 (GraphPad Software). Los resultados del desplazamiento se representan en la figura 3.

Ejemplo 6: Ensayo de luminosidad para titulación celular

La viabilidad celular se cuantificó utilizando el ensayo de luminosidad para titulación celular (Promega) que se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se despegaron las células y se sembraron en los pocillos interiores de placas de 96 pocillos de cultivo celular tratadas blancas opacas (Perkin&Elmer). El número de células sembradas osciló entre 8000 y 15 000 células viables por pocillo dependiendo de la línea celular en 80 µl por pocillo. Se dejó que las células se pegaran durante al menos tres horas en una cabina humidificada a 37 °C, CO₂ al 5 %. A continuación, las células se trataron con anticuerpos por duplicado que se diluyeron en medio específico de la línea celular (oscilando de 60 a 0,01 nM finales). Dependiendo del ensayo, se añadieron conjugados Fab-toxina con un exceso molar de tres veces (Fab-toxina de Moradec, MMAE o DMSA). Después de 72 h, se detectó la viabilidad celular añadiendo 100 µl por pocillo de reactivo CellTiter-Glo® (Promega) con el posterior mezclado en un agitador de placas durante 2 min a 350 rpm y 10 min de incubación en oscuridad a temperatura ambiente. La luminiscencia se midió en

un Synergy 5 (Biotek) con un tiempo de lectura de 0,5 segundos por pocillo (sensibilidad: 170). Se restó la luminiscencia de fondo de pocillos solo con medio del reactivo CellTiter-Glo® (Promega). Los datos se representaron como porcentaje de viabilidad de las células no tratadas frente al logaritmo de la concentración de anticuerpo y se ajustaron a una curva dosis-respuesta sigmoidea con pendiente variable utilizando GraphPad Prism 4 (GraphPad Software).

Ejemplo 7: Generación de CFA y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo

Generación de CFA

La conjugación dirigida a sitio mediada por sortasa de valina-citrulina (vc)-monometil auristatina E (MMAE) al Fc del anticuerpo se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente (véase por ejemplo, ACS Chem. Biol. 2015, 10: 2158-65). Brevemente, se generaron anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina heterodiméricas biespecíficas de la invención portadoras de un sitio de reconocimiento de enzima en el extremo C-terminal de ambas cadenas pesadas, se transfectaron y se purificaron mediante cromatografía de afinidad. A continuación, se incubó un equivalente de anticuerpo con 11 equivalentes de conjugado sustrato-vc-MMAE en presencia de sortasa 5 μ M y CaCl₂ 5 mM en tampón de reacción (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) durante 30 min a 22 °C. La reacción se detuvo con EDTA 10 mM como quelante de iones calcio. Los CFA resultantes se purificaron mediante cromatografía de exclusión molecular.

Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo

La capacidad de los anticuerpos para inducir ADCC se evaluó usando el ADCC Reporter Bioassay Core Kit (Promega) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células diana (células A431) se despegaron y se sembraron en los pocillos interiores de placas de cultivo tisular de 96 pocillos tratadas blancas opacas (Perkin&Elmer) con una densidad celular de 12 500 células viables por pocillo (100 μ l). Las células A431 se cultivaron en tampón de ADCC que contenía medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con suero bovino fetal (FBS) con bajo contenido en IgG al 4 % (Gibco). Se dejó que las células se pegaran durante toda la noche en una cabina humidificada a 37 °C, CO₂ al 5 %. Al día siguiente se retiró el medio y las células se trataron con 25 μ l de anticuerpos por pocillo diluidos en tampón ADCC (las concentraciones finales oscilaban entre 5 y 0,0016 nM). Posteriormente se añadieron células Jurkat recombinantes (Promega) con función de células efectoras (360 μ l de células efectoras diluidas en 3,6 ml de tampón ADCC, 25 μ l por pocillo). Después de seis horas de incubación en una cabina humidificada a 37 °C, CO₂ al 5 %, se añadieron a cada pocillo 75 μ l de sustrato de luciferasa Bio Glo (Promega), que se equilibró a temperatura ambiente. Tras diez minutos de incubación a temperatura ambiente protegidas de la luz, se midió la luminiscencia en un lector Synergy 5 (Biotek) con un tiempo de lectura de 0,5 segundos por pocillo (sensibilidad: 170). Se restó la luminiscencia de fondo en los pocillos solo con medio. Las unidades de luminiscencia relativa se representaron frente al logaritmo de la concentración de anticuerpo y se ajustaron a una curva dosis-respuesta sigmoidea con pendiente variable utilizando GraphPad Prism 4 (GraphPad Software).

Ejemplo 8: Ensayo de fosforilación del receptor

Para evaluar el efecto de unión de las moléculas de inmunoglobulina heterodiméricas biespecíficas de la invención sobre los niveles de fosforilación en la señalización mediada por c-MET y EGFR, se determinaron tanto c-MET como EGFR mediante ELISA de electroquimioluminiscencia de captura (ECL) de c-MET o EGFR (ensayo MSD). Todos los reactivos se obtuvieron de Meso Scale Discovery y se prepararon según las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se dispusieron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos (Sigma-Aldrich) un día antes del tratamiento, se dejaron sin suero y se trataron con diluciones seriadas de los anticuerpos (0-167 nM en medio de privación) durante 1 h a 37 °C, CO₂ al 5 %. Tras la estimulación con 100 ng/ml de HGF y/o EGF (ambos de R&D Systems) durante 5 min a 37 °C, las células se lisaron con tampón de lisis enfriado en hielo suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (Calbiochem). Se recubrieron placas de 96 pocillos de alta unión que incluyen electrodos (Meso Scale Discovery) con anticuerpo de captura anti-c-MET total (Cell Signaling Technologies) o anticuerpos anti-EGFR total (Abcam) seguido del bloqueo con Bloqueo A al 3 % en PBS suplementado con Tween®20 al 0,05 %. Tras la incubación con lisados celulares, la detección se llevó a cabo con anti-fosfo-c-MET (Cell Signaling Technologies), anticuerpos anti-fosfo-tirosina (R&D Systems) y mediante la detección de sustancias recomendada por el proveedor. Las mediciones se realizaron con el SECTOR® Imager 6000 (Meso Scale Discovery). Para la cuantificación de los niveles de fosfo-AKT, se utilizó el kit Phospho(Ser473)/Total AKT Assay Whole Cell Lyate (Meso Scale Discovery). Las curvas de dosis respuesta se representaron como el logaritmo de la concentración de anticuerpo frente a la señal de ECL. Los valores de IC₅₀ se calcularon mediante un modelo de ajuste 3PL usando GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.). Los datos de al menos dos experimentos se utilizaron para calcular la media de la IC₅₀ \pm desviación estándar (d.e.), véase por ejemplo la fig. 20, fig. 25 (A).

Ejemplo 9: Cuantificación de la densidad de receptores de la superficie celular

Los niveles de expresión en superficie del receptor en líneas celulares seleccionadas se determinaron utilizando el análisis QFIKIT (Dalo K0078) empleando citometría de flujo, cuyos resultados se muestran en la figura 18. Brevemente, se utilizaron como patrón de calibración cinco poblaciones de microesferas de calibración que presentaban

cantidades diferentes de moléculas de AcM de ratón en sus superficies. Se marcaron $1,5 \times 10^5$ células/pocillo con anti-EGFR de ratón primario (ab187287, Abcam) y anticuerpos anti-c-MET de ratón (MAB3582, R&D Systems) a dosis saturantes (5 µg/ml). A continuación, las microesferas y las células se tiñeron con $F(ab')_2$ de cabra anti-Fc de ratón secundario conjugado con FITC (10 µg/ml, Jackson Immuno Research) y se midieron mediante citometría de flujo usando un citómetro Guava easyCyte HT (Millipore). Las microesferas y las células se midieron el mismo día utilizando la misma configuración. Basándose en una recta de calibración para la fluorescencia de las microesferas frente a la densidad en superficie de las microesferas, se calcularon las densidades de antígeno en la superficie celular para c-MET y EGFR.

Ejemplo 10: Ensayo de internalización

La internalización de las moléculas de inmunoglobulina heterodiméricas biespecíficas de la invención se determinó mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo de extinción anti-Alexa Fluor 488 o mediante microscopia confocal aplicando decapado de pH. Para la citometría de flujo, las células (1×10^5) se incubaron con Ac biespecíficos 100 nM seguido por anticuerpo anti-Fc humano conjugado con Alexa Fluor 488 (específico de Fcγ, Jackson Immuno Research). Tras el lavado con tampón FACS, las células se incubaron a 37 °C o 4 °C durante 1 h para permitir la internalización. A continuación, la unión residual a la superficie del Ac biespecífico se inactivó con IgG anti-Alexa Fluor 488 (Life Technologies) y las células se fijaron con formaldehído al 4 % (p/v) y se analizaron mediante citometría de flujo. La internalización se calculó del siguiente modo:

$$\text{internalización rel. [\%]} = \frac{(37^\circ\text{C con inact.}) - (4^\circ\text{C con inact.})}{(37^\circ\text{C sin inact.}) \times 100}$$

Para la microscopia de fluorescencia, las células (3×10^5) se crecieron sobre cubreobjetos de vidrio (Menzel Glaser) colocados en placas de 6 pocillos. Dos días después, las células se mantuvieron en hielo y se trataron con Ac biespecíficos 100 nM seguido por la detección con fragmento Fab anti-Fc humano conjugado con Alexa Fluor 488. Tras el lavado con BSA al 1 % en PBS, las células se incubaron en el medio correspondiente a 37 °C o 4 °C durante 1 h para permitir la internalización. Mediante la adición de tampón a pH bajo enfriado en hielo (glicina 50 mM, NaCl 150 mM, pH 2,7, ajustado con HCl), se eliminaron los Ac biespecíficos residuales de la superficie de las células. Finalmente, las células se fijaron con formaldehído al 4 % (p/v) y se montaron en portaobjetos con ProLong Diamond Antifade Mountant con DAPI (Life Technologies). El análisis se realizó en un microscopio confocal TCS SPS de Leica equipado con un objetivo de 100 aumentos (Leica Microsystems).

Ejemplo 11: Cultivo celular

Las líneas celulares humanas que se utilizaron según la presente memoria descriptiva se obtuvieron de la American Type Culture Collection (A431, A549, MDA-MB-468, NCI-H1975, NCI-H441, NCI-H596), el Riken Bioresource Center Cell Bank (EBC-1, KP-4), Lipha (HepG2) y la German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (MKN45) y se mantuvieron según las condiciones de cultivo estándar (37 °C, CO₂ al 5 %, humedad del 95 %) utilizando las formulaciones de los medios recomendadas. Las líneas A549 y A431 se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Life Technologies) que contenía suero bovino fetal al 10 % (FBS, Life Technologies). Las líneas MDA-MB-468, NCI-H1975, HepG2 y MKN45 se mantuvieron en RPMI-1640 (Life Technologies) suplementado con FBS al 10 %, L-glutamina 2 mM y piruvato de sodio 1 mM (ambos de Life Technologies). Las líneas NCI-H441 y NCI-H596 se cultivaron en RPMI-1640 con FBS al 10 %, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, D(+)-glucosa a 2,5 g/l (Sigma-Aldrich) y HEPES 10 mM (Life Technologies). Las células KP-4 se cultivaron en DMEM/F-12 con FBS al 10 %. Las células EBC-1 se mantuvieron en medio esencial mínimo (MEM) con FBS al 10 % y L-glutamina 2 mM. NHEK.f.-c. (PromoCell, N.º C-12007) se obtuvieron de PromoCell y se propagaron en medio de crecimiento de queratinocitos recomendado con suplementos (PromoCell, N.º C-20111) y con DetachKit (PromoCell, N.º C-41210) para despegar las células. Las células Expi293FTM se obtuvieron de Life Technologies y se cultivaron en el correspondiente medio de expresión Expi293. Se comprobó que todas las líneas celulares estaban estériles, con certificación de libres de micoplasma y nunca excedían de los 20 pases.

Ejemplo 12: Resonancia de plasmones superficiales

Los parámetros de afinidad y cinética de las variantes de C225 diseñadas *in silico* se verificaron mediante resonancia de plasmones superficiales. Se introdujeron sustituciones dirigidas por ordenador en el C225 natural usando el kit QuikChangeII (Stratagene) con cebadores de mutagénesis. Los anticuerpos variantes se expresaron en células HEK-293-6E. Los sobrenadantes aclarados se purificaron mediante cromatografía de afinidad utilizando proteína A. La concentración de anticuerpo se determinó mediante absorbancia a 280 nm, y la pureza se verificó mediante análisis en SDS-PAGE. La resonancia de plasmones superficiales se realizó en un Biacore A-100 (GE Healthcare). Los chips CM5 se acoplaron con anticuerpo de cabra anti-IgG humana (Jackson ImmunoResearch, Inc. 109-005-098) y se usó para capturar el C225 natural o sus variantes diseñadas. Se usó EGFR humano (dominio extracelular, R&D Systems, 1095-ER) como analito. La afinidad se determinó mediante titulación del analito entre 0 y 40 nM y determinando las

constantes cinéticas de velocidad usando el software BiaEvaluation para ajustar las fases de asociación y disociación mediante un modelo de unión Lagmuir 1:1. La KD se determinó como el cociente de las constantes cinéticas.

Ejemplo 13: Ensayo de intercambio térmico

5 La estabilidad térmica de las moléculas de inmunoglobulina heterodiméricas biespecíficas de la invención así como de los controles (C225 [cetuximab], matuzumab y construcciones de «un solo brazo» [oa]) se midieron utilizando un sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus (Life Technologies) según las instrucciones del fabricante, cuyos resultados se muestran en la figura 17 y la correspondiente descripción. Brevemente, la proteína 1 μ M se mezcló con un
10 exceso de 20 veces de SYPRO Orange (Life Technologies) en PBS a pH 7.4. Se registraron curvas de fusión de 25 a 99 °C con un aumento de 1 °C/60 s. Los datos se analizaron con el software Protein Thermal Shift™ (Life Technologies) calculando el máximo de la curva de la segunda derivada.

REIVINDICACIONES

1. Molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica que comprende

(i) un primer fragmento Fab o scFv que se une específicamente a EGFR, en el que el primer fragmento Fab o scFv deriva de cetuximab (C225) y comprende secuencias VL y VH seleccionadas a partir del grupo compuesto por SEC ID N.º 9, SEC ID N.º 10, SEC ID N.º 11, SEC ID N.º 12, SEC ID N.º 43, SEC ID N.º 44, SEC ID N.º 45, SEC ID N.º 46, y

(ii) un segundo fragmento Fab o scFv que se une específicamente a c-MET, en el que el segundo fragmento Fab o scFv comprende secuencias VL seleccionadas a partir del grupo compuesto por SEC ID N.º 15, SEC ID N.º 17, SEC ID N.º 19, SEC ID N.º 21, SEC ID N.º 23, SEC ID N.º 25, SEC ID N.º 27, SEC ID N.º 29, SEC ID N.º 31, SEC ID N.º 33, SEC ID N.º 47, SEC ID N.º 49, SEC ID N.º 51,

y en el que las secuencias VH de dicho segundo fragmento Fab se selecciona a partir del grupo compuesto por SEC ID N.º 16, SEC ID N.º 18, SEC ID N.º 20, SEC ID N.º 22, SEC ID N.º 24, SEC ID N.º 26, SEC ID N.º 28, SEC ID N.º 30, SEC ID N.º 32, SEC ID N.º 34, SEC ID N.º 48, SEC ID N.º 50 o SEC ID N.º 52 y

(iii) una región bisagra de anticuerpo, un dominio CH2 de anticuerpo y un dominio CH3 de anticuerpo que comprenden un dominio híbrido de interfase de interacción proteína-proteína en el que cada uno de dichos dominios de interfase de interacción está formado por segmentos de aminoácidos del dominio CH3 de un primer miembro y segmentos de aminoácidos del dominio CH3 de dicho segundo miembro, en el que dicho dominio de interfase proteína-proteína de la primera cadena interacciona con la interfase proteína-proteína de la segunda cadena mediante la homodimerización de los correspondientes segmentos de aminoácidos del mismo miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas dentro de dichos dominios de interacción,

en el que la primera o segunda cadena de inmunoglobulina genéticamente modificada tiene la secuencia polipeptídica («AG-SEED»):

GQPFPRPEVHLLPPSREEMTKNQVSLTCLARGFYXPX₁DIAVEWESNGQPENNYKTTPSRQEPSQGTTTFAVTSKL TX₂DKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKX₃ISL (SEC ID N.º 1), donde X₁, X₂ y X₃ puede ser cualquier aminoácido, y donde el primer fragmento Fab se une a EGFR con una K_D de al menos 5 × 10⁻⁸ M, y donde el segundo fragmento Fab se une a c-MET con un K_D de al menos 5 × 10⁻⁸ M.

2. Molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica según la reivindicación 1, en la que el primer miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas es IgG y el segundo miembro es IgA.

3. Molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica según la reivindicación 2, en la que X₁ es K o S, X₂ es V o T y X₃ es T o S.

4. La molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en la que la primera o segunda cadena de inmunoglobulina genéticamente modificada tiene la secuencia polipeptídica («GA-SEED»):

GQPREPQVYTLPPPSEELALNEX1VTLTCLVKGFYPSDIAVEWLQGSQELPREKYLTWX2PVX3DSD GSX4FLYSILRVX5AX6DWKKGDTFSCSVMEALHNHYTQKSLDR, donde X₁, X₂, X₃, X₄, X₅ y X₆ pueden ser cualquier aminoácido.

5. Molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica según la reivindicación 4, donde X₁ es L o Q, X₂ es A o T, X₃ es L, V, D o T; X₄ es F, A, D, E, G, H, K, N, P, Q, R, S o T; X₅ es A o T y X₆ es E o D.

6. Molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que la primera cadena de inmunoglobulina genéticamente modificada tiene la secuencia polipeptídica («AG-SEED»):

GQPFPRPEVHLLPPSREEMTKNQVSLTCLARGFYPKDIAVEWESNGQPENNYKTTPSRQEPSQGTT TFAVTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKTISL y la segunda cadena de inmunoglobulina genéticamente modificada tiene la secuencia polipeptídica («GA-SEED»):

GQPREPQVYTLPPPSEELALNELVTLTCLVKGFYPSDIAVEWLQGSQELPREKYLTWAPVLDSGD SFFLYSILRVAAEDWKKGDTFSCSVMEALHNHYTQKSLDR.

7. Molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la primera cadena de inmunoglobulina genéticamente modificada comprende la secuencia polipeptídica («AG-SEED»):

GQPFPEVHTLPPSREEMTKNQVSLTCLVRGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPSRLEPSQGTT TFAVTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL y la segunda cadena de inmunoglobulina genéticamente modificada comprende la secuencia polipeptídica («GA-SEED»): GQPREPQVYTLPPPSEELALNNQVTLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEPREKYLTWAPVLDSGD SFFLYSILRVDASRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL.

8. Molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica según la reivindicación 1, en la que el primer y segundo fragmento Fab o scFv comprenden las secuencias de aminoácidos seleccionadas entre SEC ID N.º 9, SEC ID N.º 43, SEC ID N.º 17, SEC ID N.º 18 o SEC ID N.º 47, SEC ID N.º 48 (225L, B10), o (225M, B10v5) SEC ID N.º 11, SEC ID N.º 44, SEC ID N.º 31, SEC ID N.º 51, SEC ID N.º 32 o (225H, F06) SEC ID N.º 45, SEC ID N.º 46, SEC ID N.º 29, SEC ID N.º 49, SEC ID N.º 30, SEC ID N.º 50 o (225H, CS06) SEC ID N.º 45, SEC ID N.º 46, SEC ID N.º 33, SEC ID N.º 34, SEC ID N.º 52 o (225M, CS06) SEC ID N.º 11, SEC ID N.º 44, SEC ID N.º 33, SEC ID N.º 34, SEC ID N.º 52
9. Molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica según la reivindicación 8, en la que el primer y segundo fragmento Fab o scFv comprenden las secuencias de aminoácidos (225M, CS06) SEC ID N.º 11, SEC ID N.º 44, SEC ID N.º 33, SEC ID N.º 34, SEC ID N.º 52 o (225H, CS06) SEC ID N.º 45, SEC ID N.º 46, SEC ID N.º 29, SEC ID N.º 49, SEC ID N.º 30, SEC ID N.º 50.
10. Molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que el dominio Fc interacciona con el FcRn.
11. Molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica según la reivindicación 10, en la que la inmunoglobulina biespecífica media en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.
12. Método para la producción de la molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 que comprende:
 - cultivar al menos una célula huésped que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica al menos una de las secuencias de aminoácidos según la SEC ID N.º 1, SEC ID N.º 2, SEC ID N.º 3, SEC ID N.º 4, SEC ID N.º 5, SEC ID N.º 6, SEC ID N.º 7, SEC ID N.º 8, SEC ID N.º 9, SEC ID N.º 10, SEC ID N.º 11, SEC ID N.º 12, SEC ID N.º 13, SEC ID N.º 14, SEC ID N.º 15, SEC ID N.º 16, SEC ID N.º 17, SEC ID N.º 18, SEC ID N.º 19, SEC ID N.º 20, SEC ID N.º 21, SEC ID N.º 22, SEC ID N.º 23, SEC ID N.º 24, SEC ID N.º 25, SEC ID N.º 26, SEC ID N.º 27, SEC ID N.º 28, SEC ID N.º 29, SEC ID N.º 30, SEC ID N.º 31, SEC ID N.º 32, SEC ID N.º 33, SEC ID N.º 34, SEC ID N.º 35, SEC ID N.º 36, SEC ID N.º 37, SEC ID N.º 38, SEC ID N.º 39, SEC ID N.º 40, SEC ID N.º 41, SEC ID N.º 42, SEC ID N.º 43, SEC ID N.º 44, SEC ID N.º 45, SEC ID N.º 46, SEC ID N.º 47, SEC ID N.º 48, SEC ID N.º 49, SEC ID N.º 50, SEC ID N.º 51, SEC ID N.º 52 en condiciones suficientes para la expresión de dicha molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica,
 - purificar dicha molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica.
13. Molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que dicha molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica está covalentemente acoplada a al menos un enlazador y en la que el enlazador de dicha molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica está acoplada a un colorante, radioisótopo o citotoxina.
14. Molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica según la reivindicación 13, en la que el al menos uno enlazador está acoplado covalentemente a al menos una de las cadenas ligeras de Fab o scFv de dicha molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica.
15. Molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica según la reivindicación 14, en la que dicha molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica comprende dos enlazadores acoplados covalentemente a las cadenas ligeras de Fab o scFv de dicha molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica.
16. Molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica según la reivindicación 15, en la que las cadenas ligeras de Fab o scFv y/o los dominios CH3 y/o los dominios CH2 están acoplados covalentemente a un enlazador, en la que dicho enlazador está acoplado covalentemente a un colorante, radioisótopo o citotoxina.
17. Molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, o según cualquiera de las reivindicaciones 13-16 para su uso en el tratamiento del cáncer.
18. Molécula de inmunoglobulina heterodimérica biespecífica para su uso según la reivindicación 17, en la que el cáncer es cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer adrenal, leucemia, linfoma, mieloma, sarcoma óseo y de tejido conjuntivo, tumores cerebrales, cáncer de tiroides, cáncer de páncreas, cáncer hipofisario, cáncer de ojo, cáncer vaginal, cáncer de vulva, cáncer de cuello de útero, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer esofágico, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer hepático, cáncer de vesícula biliar, colangiocarcinoma, cáncer de pulmón, cáncer de testículo, cáncer de pene, cáncer bucal, cáncer de piel, cánceres de riñón, tumor de Wilms y cáncer de vejiga, cáncer colorrectal metastásico (CCRM), metástasis hepáticas no resecable,

cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (CECC), carcinoma de células de Merkel.

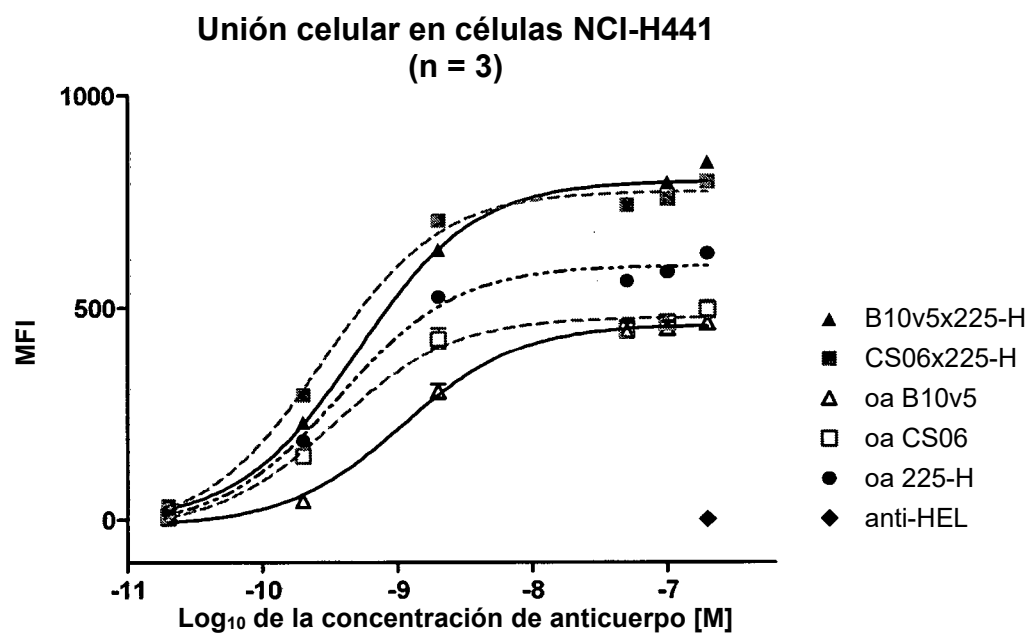


FIGURA 1

A

1.° \ 2.°	B10	B10v5	LY2875358	F06	CS06	224G11	5D5	DN30
B10		n.d.	n.d.	+	n.d.	+	n.d.	+/-
B10v5				+	+	+	+	+/-
LY2875358	n.d.			n.d.	+	+	+	n.d.
F06	+	n.d.	n.d.		n.d.		n.d.	+/-
CS06	+	+	+				+/-	+
224G11	+	n.d.	n.d.		n.d.		n.d.	+
5D5	+	+	+			+		+/-
DN30	+	n.d.	n.d.	+	n.d.	+/-	n.d.	

B

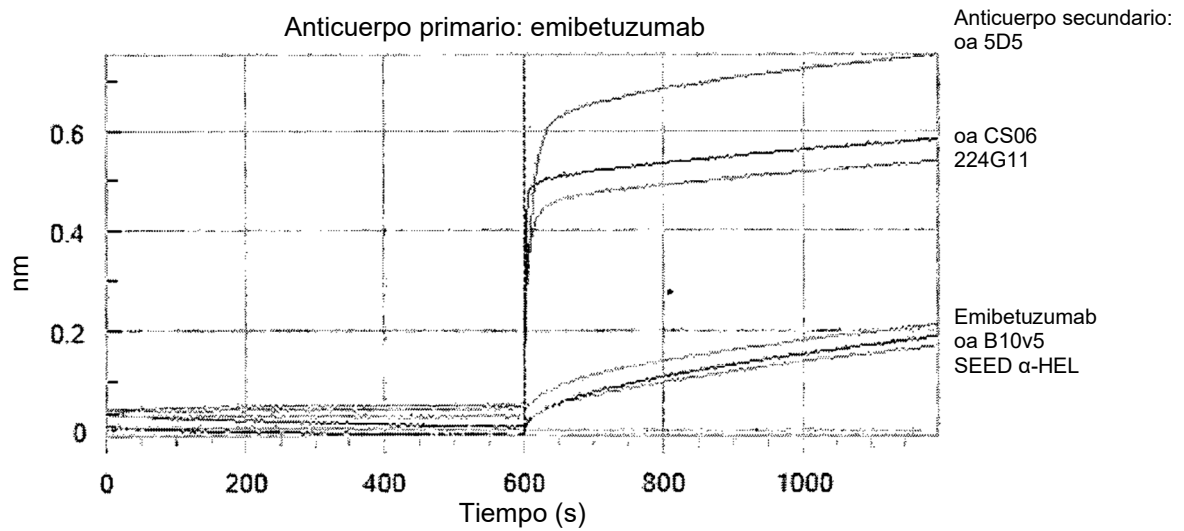


FIGURA 2

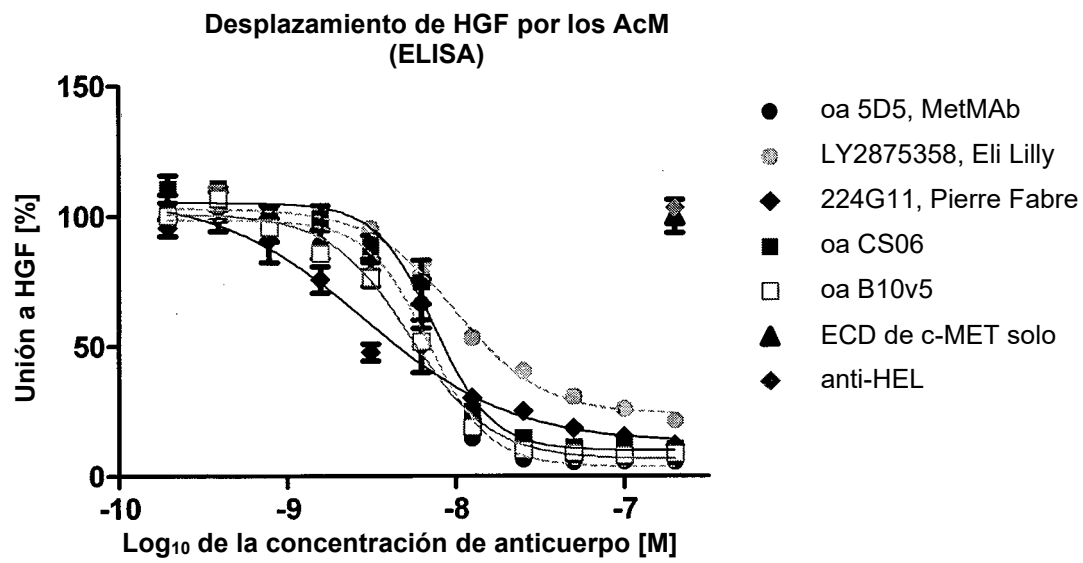


FIGURA 3

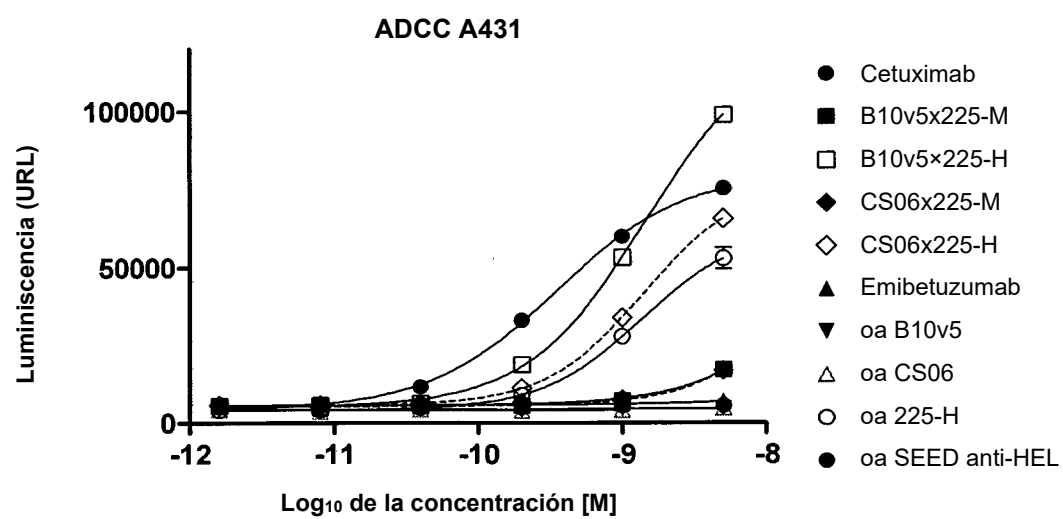


FIGURA 4

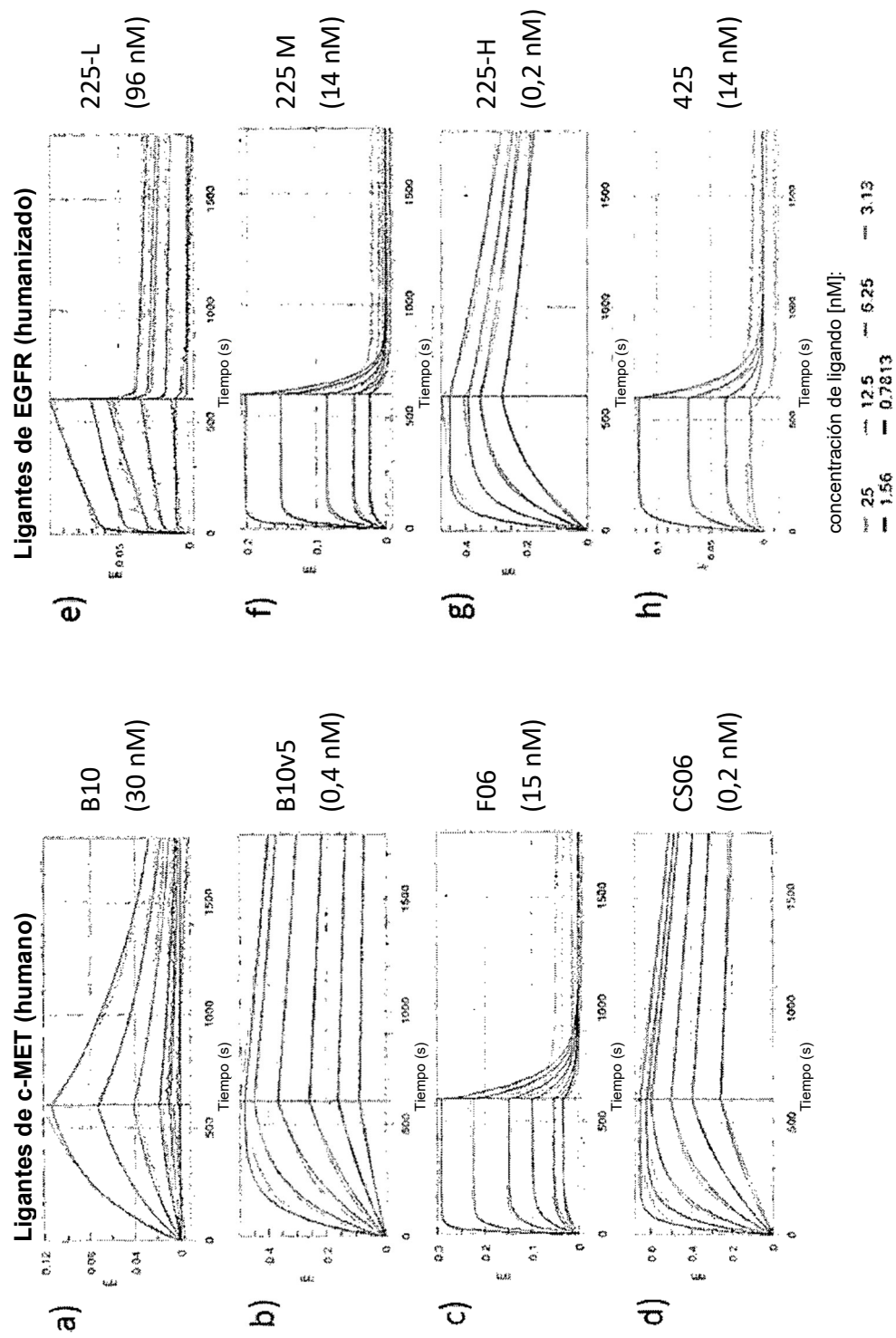
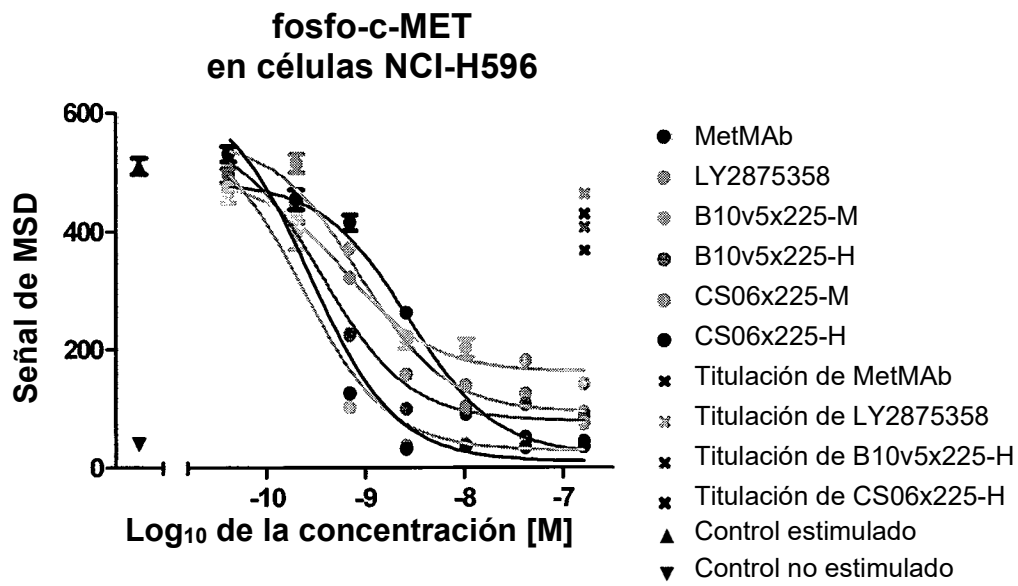


FIGURA 5

A



B

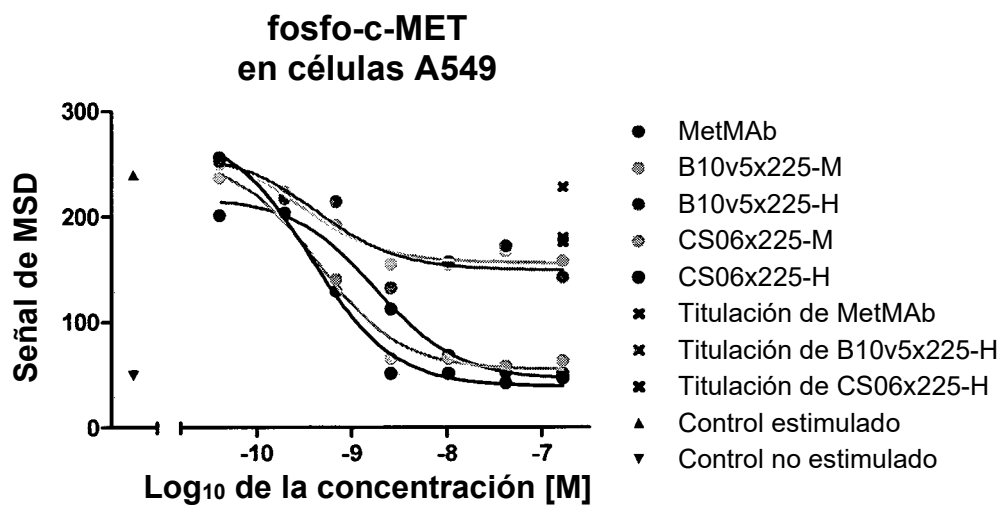


FIGURA 6

A

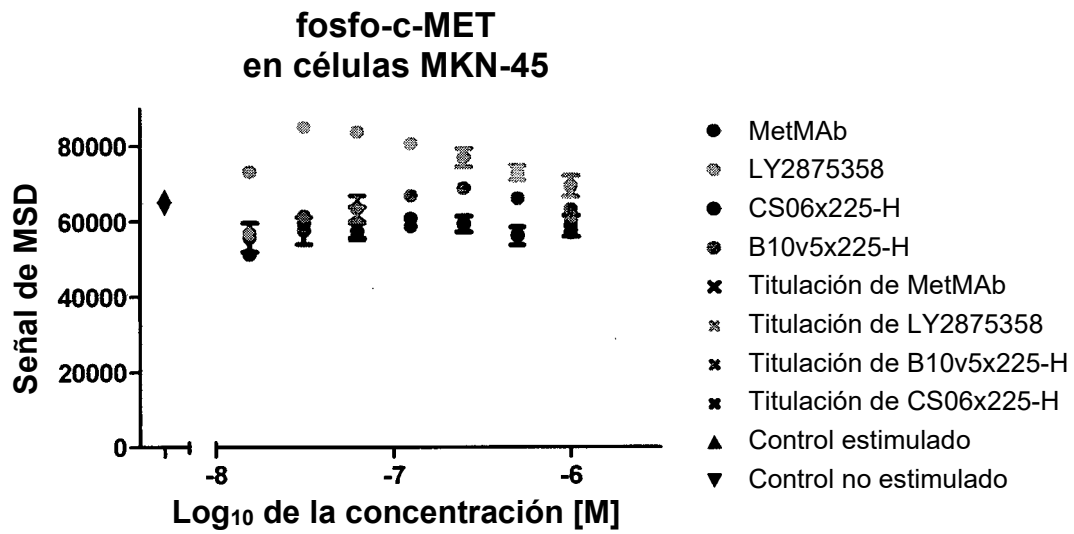
Anticuerpo	POTENCIA IC₅₀ [M]	EFICACIA % DE EFECTO
METMAb	NANOMOLAR	100 %
LY2875358		90 %
B10v5x225-M		80 %
B10v5x225-H	SUBNANOMOLAR	90 %
CS06x225-M		93 %
CS06x225-H		100 %

B

Anticuerpo	POTENCIA IC₅₀ [M]	EFICACIA % DE EFECTO
METMAb	NANOMOLAR	100 %
B10v5x225-M	SUBNANOMOLAR	43 %
B10v5x225-H		52 %
CS06x225-M	SUBNANOMOLAR	93 %
CS06x225-H		100 %

FIGURA 7

A



B

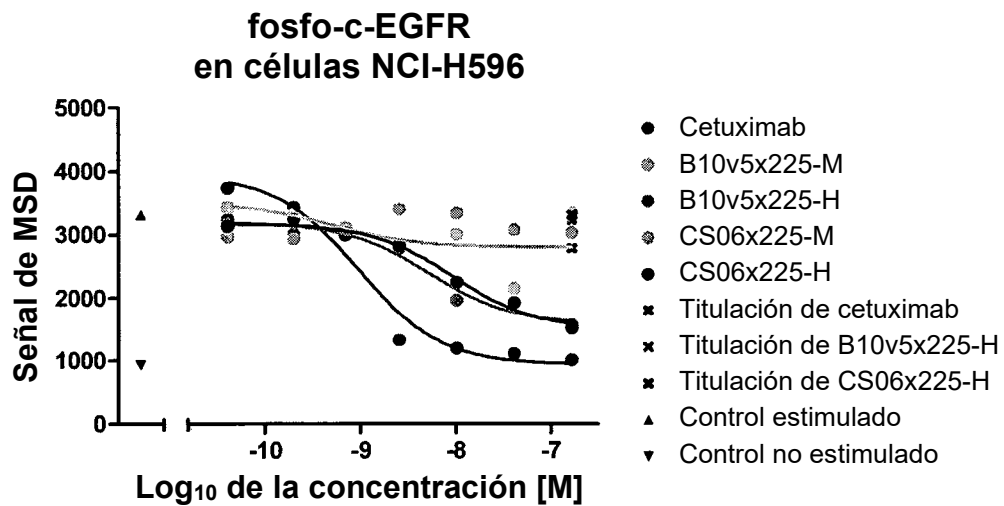
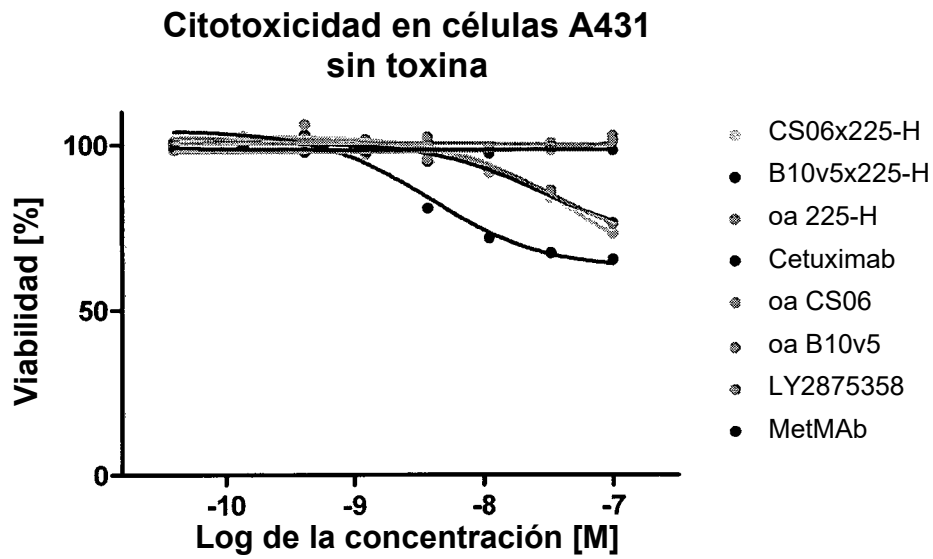


FIGURA 8

A



B

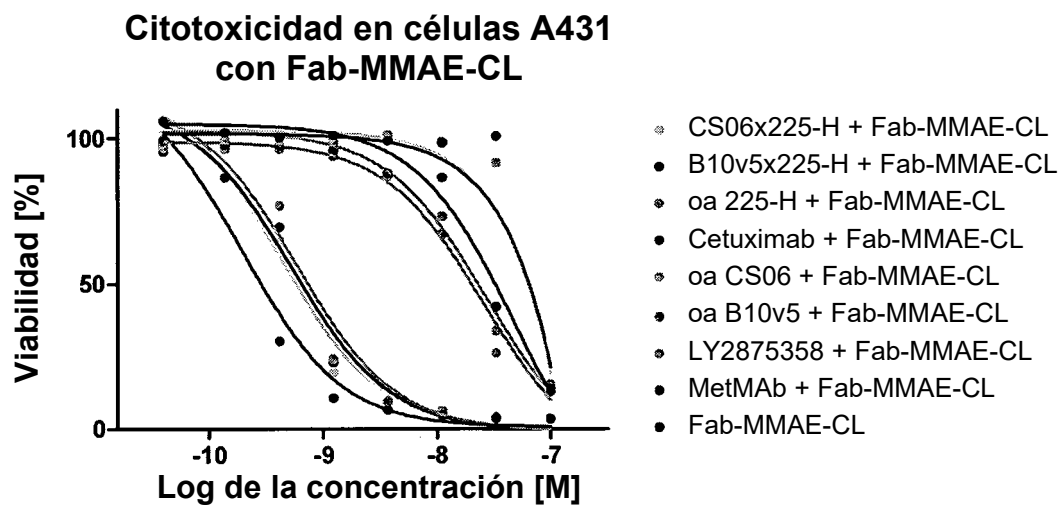
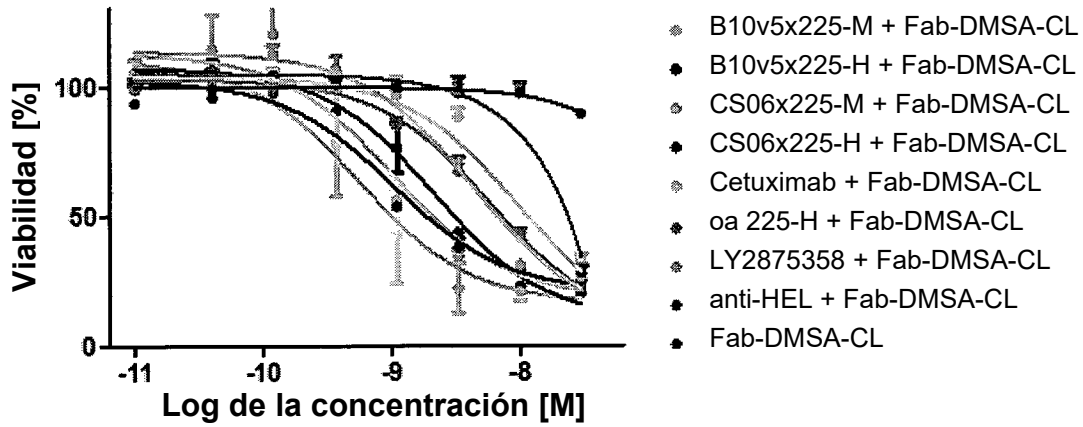


FIGURA 9

A

**Citotoxicidad en células EBC-1
con Fab-DMSA-CL**



B

**Citotoxicidad en células NCI-H441
con Fab-DMSA-CL**

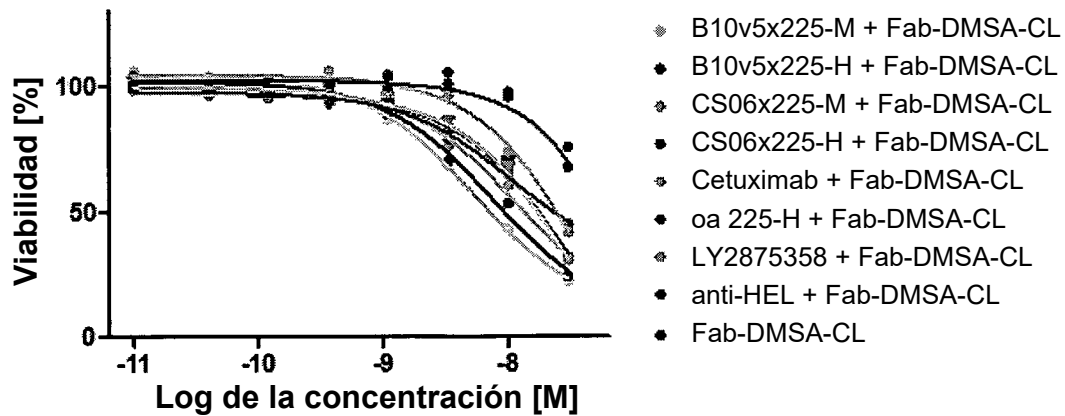
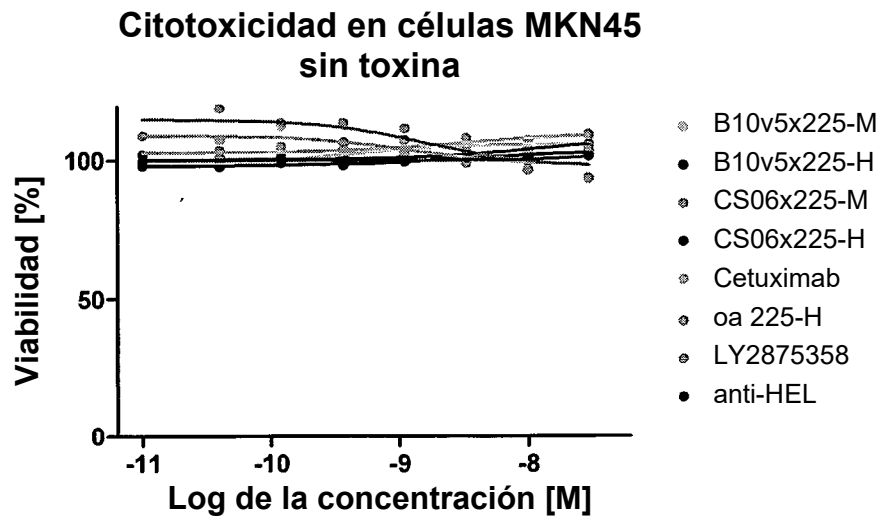


FIGURA 10

A



B

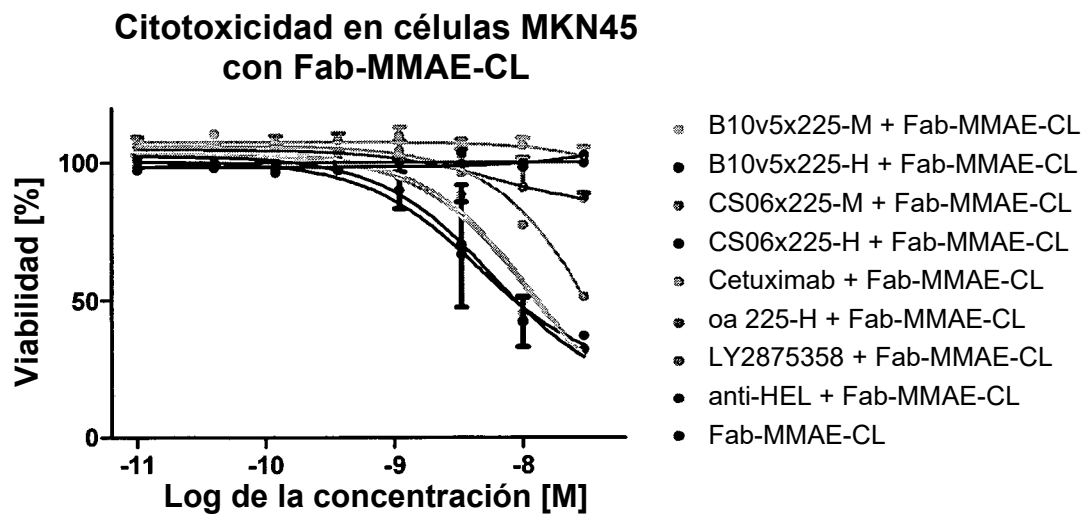
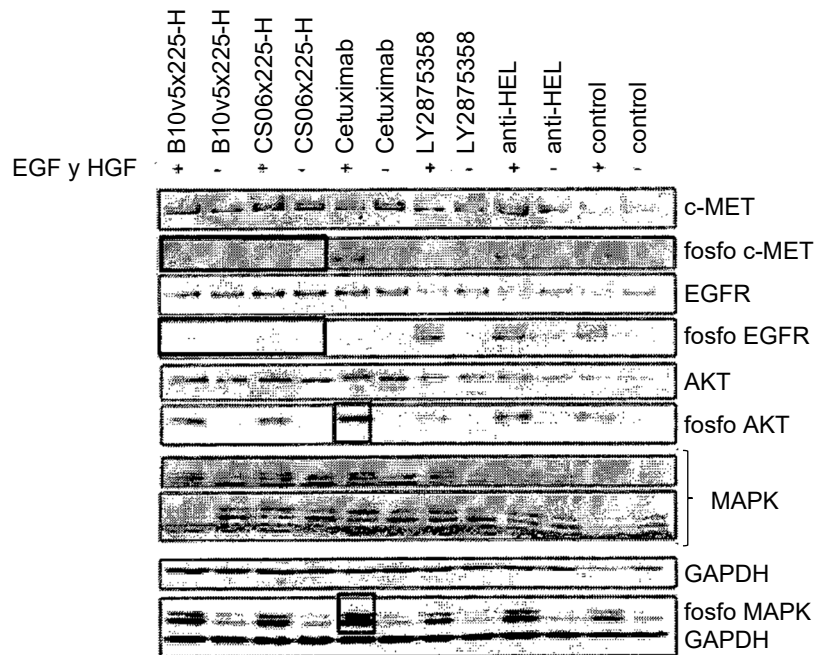


FIGURA 11

A

H596 (dependiente de HGF)



B

KP-4 (autocrino)

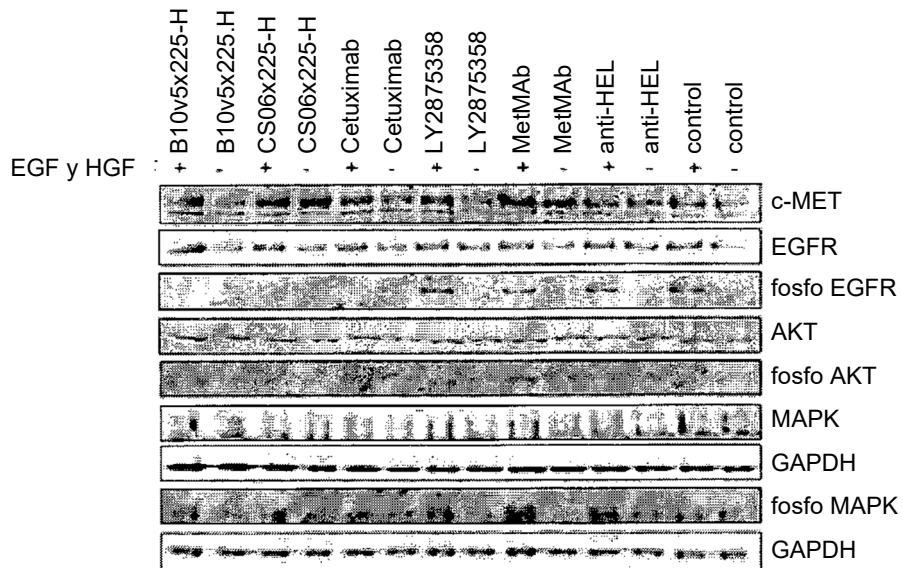


FIGURA 12

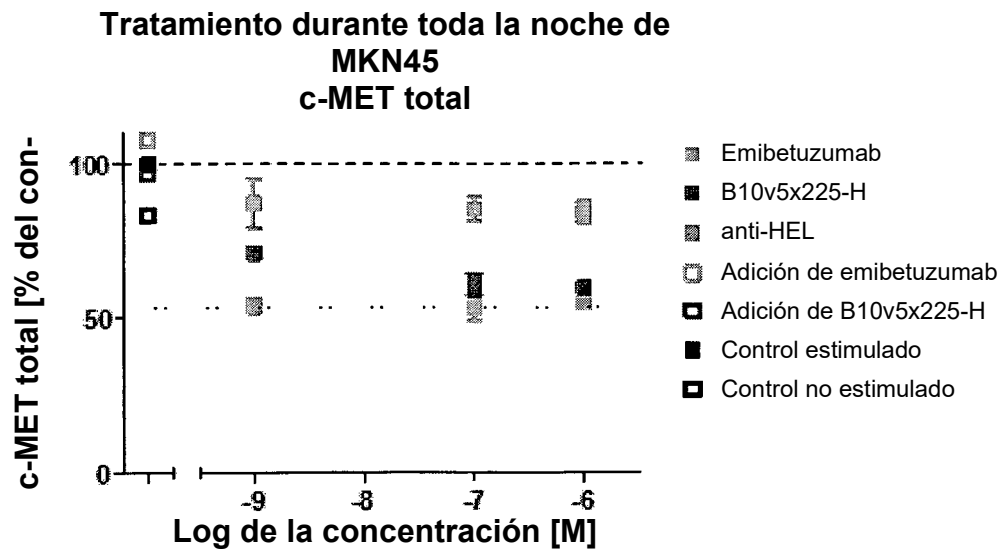
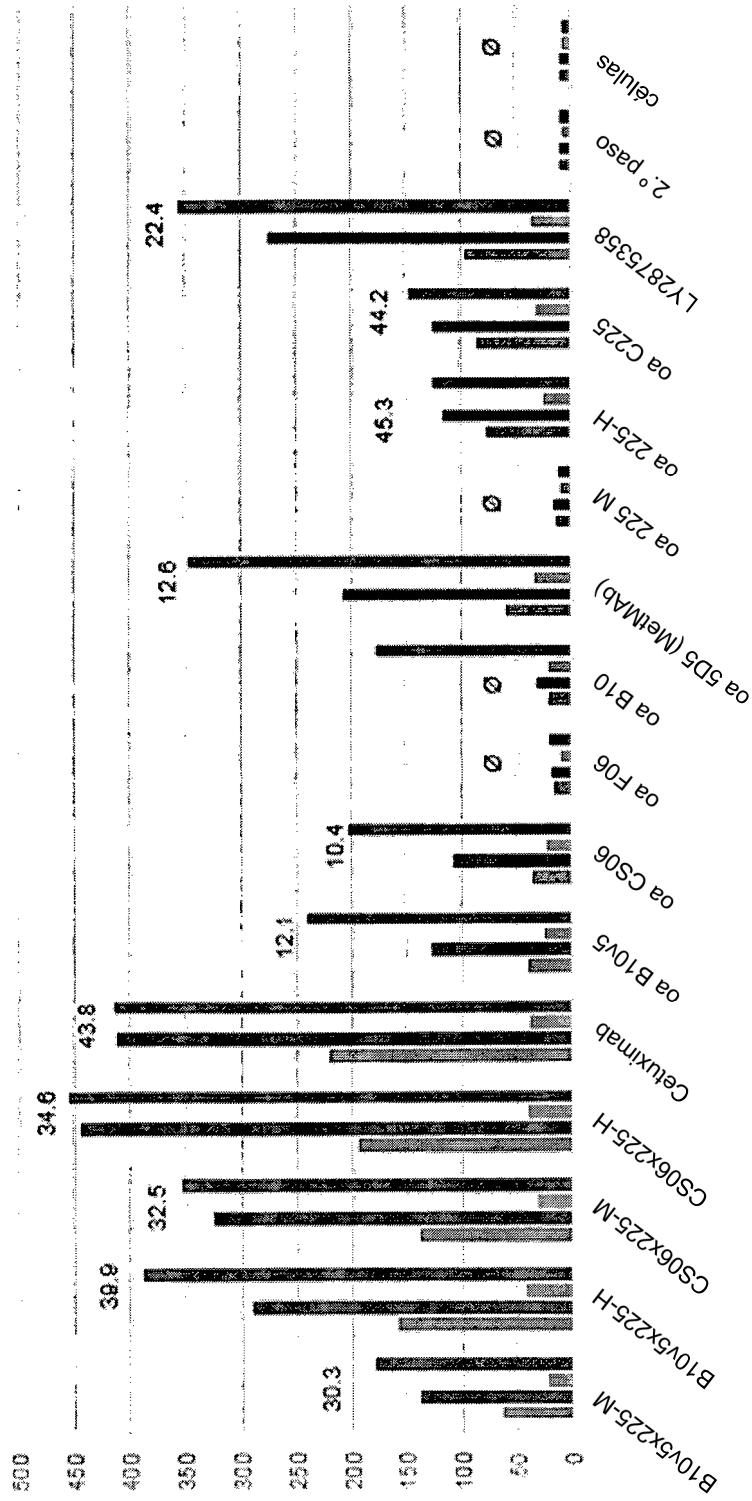


FIGURA 13

Internalización en células NCI-H441



■ 37 °C con inactivación ■ 37 °C sin inactivación ■ 4 °C con inactivación ■ 4 °C sin inactivación

FIGURA 14

Nombre de la construcción	Unión celular - Citometría de flujo (MFI a 100 nM)						
	EBC-1 c-MET+++ EGFR++	A431 c-MET+ EGFR+++	MKN-45 c-MET+++ EGFR++	A549 c-MET+ EGFR++	SK-MEL2 c-MET+ EGFR-	HepG2 c-MET+ EGFR+	CHO-S c-MET- EGFR-
B10x225-L	434	947	1221	192	23	85	17
B10x225-M	671	1476	1787	572	53	84	36
B10x225-H	948	1980	1318	454	64	100	46
B10x425	361	1123	1265	270	25	101	19
F06x225-L	801	1198	1173	215	68	98	29
F06x225-M	793	1899	1221	303	58	74	15
F06x225-H	793	3242	1195	303	56	87	15
F06x425	656	1266	1161	265	67	76	23
B10v5x225-L	2041	847	1217	249	341	451	129
B10v5x225-M	2284	1291	1268	383	457	793	276
B10v5x225-H	2060	1762	1330	335	222	352	94
B10v5x425	1962	1428	1280	328	213	348	108
CS06x225-L	2048	890	1531	212	188	254	17
CS06x225-M	1871	1174	1470	264	236	330	41
CS06x225-H	1558	1855	1553	292	164	198	14
CS06x425	1371	1351	1454	268	132	164	12
oa 225-L	137	1256	83	91	17	22	14
oa 225-M	189	1498	144	138	19	40	25
oa 225-H	287	2230	199	184	20	53	15
oa 425	212	1150	184	170	17	50	15
oa F06	667	40	1276	91	32	28	13
oa B10	952	103	916	130	39	69	47
oa CS06	2627	37	1490	147	213	296	11
oa B10v5	2312	49	1503	91	272	399	88

«oa»: molécula de inmunoglobulina heterodimérica de un solo brazo.

Ensayos de unión celular de las moléculas de inmunoglobulina indicadas a las células que expresan diferentes niveles de EGFR y/o c-MET indicando +++ niveles de expresión altos, ++ niveles de expresión moderados y + niveles de expresión bajos. Los valores proporcionados indican la media de las intensidades de fluorescencia determinada mediante citometría de flujo a una concentración de molécula de inmunoglobulina de 100 nM.

FIGURA 15

Mutación	K_D^a	$\Delta\Delta G_{\text{exp}}^b$	$\Delta\Delta G_{\text{calc}}^c$	$\Delta\Delta E_{\text{par}}^d$	$\Delta\Delta E_{\text{Hbnd}}^e$	$E_{\text{Hbnd_sc}}^f$	$\Delta\Delta G_{\text{Ac}}^g$
Nat.	$1,52 \pm 0,29$	0	0	0	0	0	0
C225-L	NQ		-0,7	-0,4	-0,4	-1,1	1,6
C225-M	15,26	1,36	-0,7	0,1	-0,8	-1,1	6,3
C225-H1	$0,77 \pm 0,09$	-0,41	-2,0	-1,1	-1,2	-2,2	-0,7
C225-H2	$1,09 \pm 0,13$	-0,20	-0,2	-0,1	-0,7	-1,1	3,1
C225-H3	$0,37 \pm 0,04$	-0,84	-0,9	-0,6	-0,2	-0,2	0,4
C225-H	$0,08 \pm 0,03$	-1,75	-3,2				-6,3

FIGURA 16

Anticuerpo	Analito	K_D [M]	k_a [$M^{-1} s^{-1}$]	k_d [s^{-1}]	T_m [$^{\circ}C$]
oa B10	c-MET	1,2E-08	1,0E+05	1,2E-03	$65,7 \pm 0,001$
oa B10v5	c-MET	3,8E-10	4,0E+05	1,6E-04	$64,0 \pm 0,172$
B10v5xhu225-M	c-MET	3,7E-10	4,0E+05	1,5E-04	$64,5 \pm 0,001$
B10v5xhu225-H	c-MET	3,6E-10	4,0E+05	1,5E-04	$62,8 \pm 0,174$
oa F06	c-MET	4,2E-09	2,5E+06	1,1E-02	$64,8 \pm 0,172$
oa CS06	c-MET	1,9E-10	1,1E+06	2,1E-04	$64,9 \pm 0,001$
CS06xhu225-M	c-MET	2,1E-10	1,1E+06	2,2E-04	$64,8 \pm 0,126$
CS06xhu225-H	c-MET	1,2E-10	3,3E+06	3,9E-04	$62,2 \pm 0,172$
oa hu225-L	EGFR	2,2E-07	6,1E+05	1,4E-01	n.d.
oa hu225 M	EGFR	4,4E-09	3,7E+06	1,6E-02	$65,2 \pm 0,174$
B10v5xhu225-M	EGFR	4,7E-09	3,6E+06	1,7E-02	$64,5 \pm 0,001$
CS06xhu225-M	EGFR	3,9E-09	4,6E+06	1,8E-02	$64,8 \pm 0,126$
oa hu225-H	EGFR	1,4E-10	3,6E+06	4,9E-04	$62,7 \pm 0,001$
B10v5xhu225-H	EGFR	1,5E-10	3,5E+06	5,3E-04	$62,8 \pm 0,174$
CS06xhu225-H	EGFR	1,2E-10	3,3E+06	3,9E-04	$62,2 \pm 0,172$
cetuximab (C225)	EGFR	1,2E-09	6,1E+05	7,4E-04	$67,3 \pm 0,172$
oa hu425	EGFR	2,2E-08	5,3E+05	1,2E-02	n.d.
matuzumab (425)	EGFR	1,2E-08	6,4E+05	7,8E-03	n.d.

FIGURA 17

Línea celular	Origen	Densidad de c-MET [$\times 10^3 \pm \% \text{ d.e.}$]	Densidad de EGFR [$\times 10^3 \pm \% \text{ d.e.}$]
A431	CA epidermoide	$14,7 \pm 0,2$	$661,0 \pm 1,4$
A549	ACA de pulmón	$18,0 \pm 0,6$	$39,3 \pm 0,6$
EBC-1	CE de pulmón	$261,6 \pm 1,1$	$62,2 \pm 1,1$
HepG2	CA hepatocelular	$11,1 \pm 1,4$	$1,3 \pm 4,7$
KP-4	CA pancreático	$7,7 \pm 0,5$	$50,8 \pm 0,9$
MDA-MB-468	ACA de mama	$14,2 \pm 1,0$	$1825,5 \pm 0,1$
MKN-45	ACA gástrico	$171,7 \pm 1,0$	$45,4 \pm 0,3$
NCI-H1975	ACA de pulmón	$35,5 \pm 0,7$	$37,8 \pm 0,7$
NCI-H441	ACA de pulmón	$52,2 \pm 0,8$	$46,6 \pm 3,7$
NCI-H596	ACA de pulmón	$6,7 \pm 1,0$	$148,5 \pm 1,4$
NHEK.f-c.	queratinocitos	$7,1 \pm 8,9$	$128,7 \pm 8,7$
T47D	ACA de mama	0,0	$13,2 \pm 0,9$

FIGURA 18

Anticuerpo	Receptor	A549		NHEK.f-c.	
		IC ₅₀ [nM] \pm d.e.	n	IC ₅₀ [nM] \pm d.e.	n
CS06x225-H	fosfo-c-MET	$0,3 \pm 0,2$	4	0,1	1
	fosfo-EGFR	0,8	1	0,8	1
B10v5x225-H	fosfo-c-MET	$0,3 \pm 0,2$	2	0,2	1
	fosfo-EGFR	$1,1 \pm 0,4$	2	$1,7 \pm 0,3$	2
oa 5D5	fosfo-c-MET	$0,8 \pm 0,5$	4	0,7	1
cetuximab	fosfo-EGFR	$0,4 \pm 0,1$	3	$0,3 \pm 0,2$	2

FIGURA 19

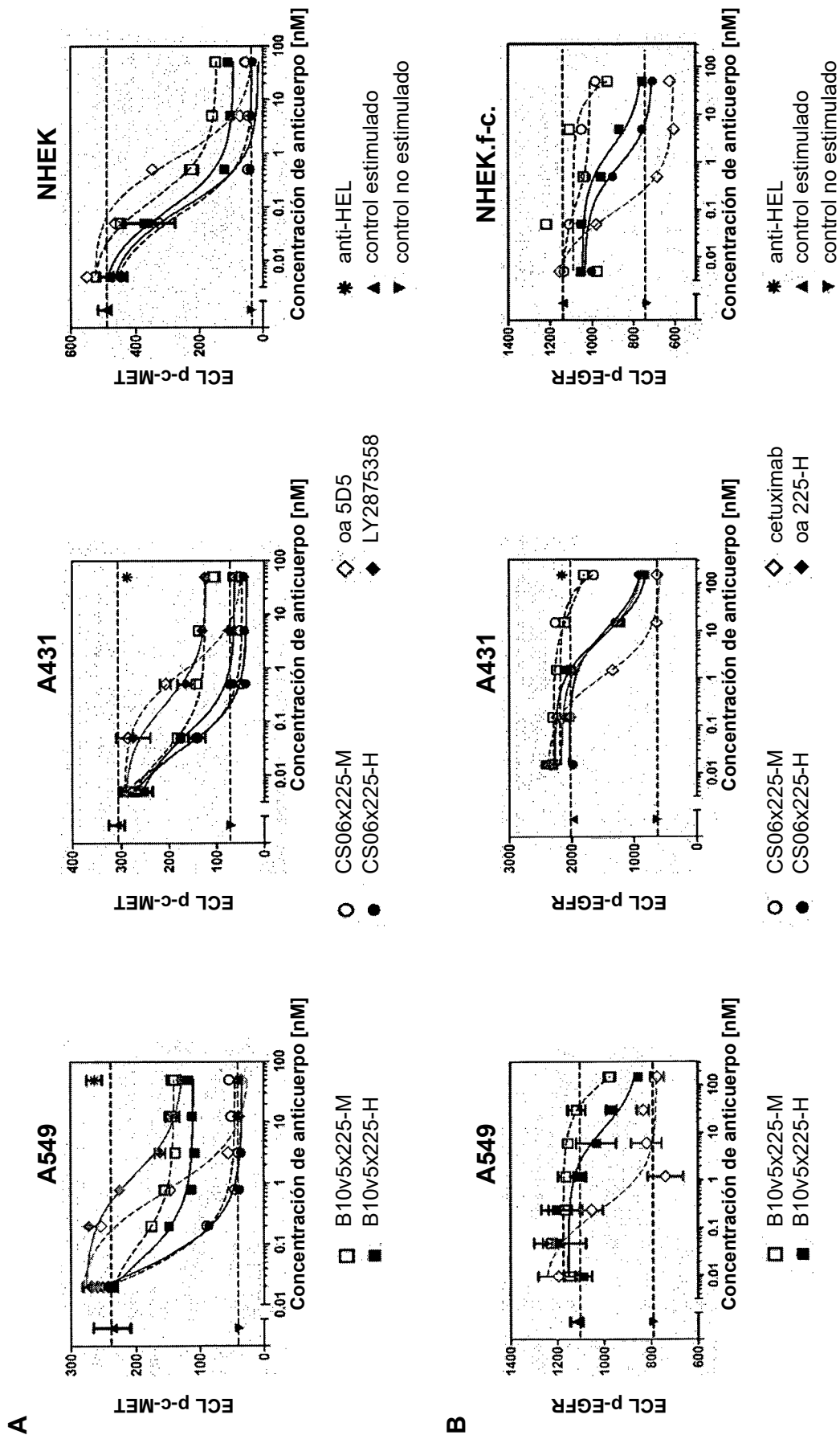


FIGURA 20

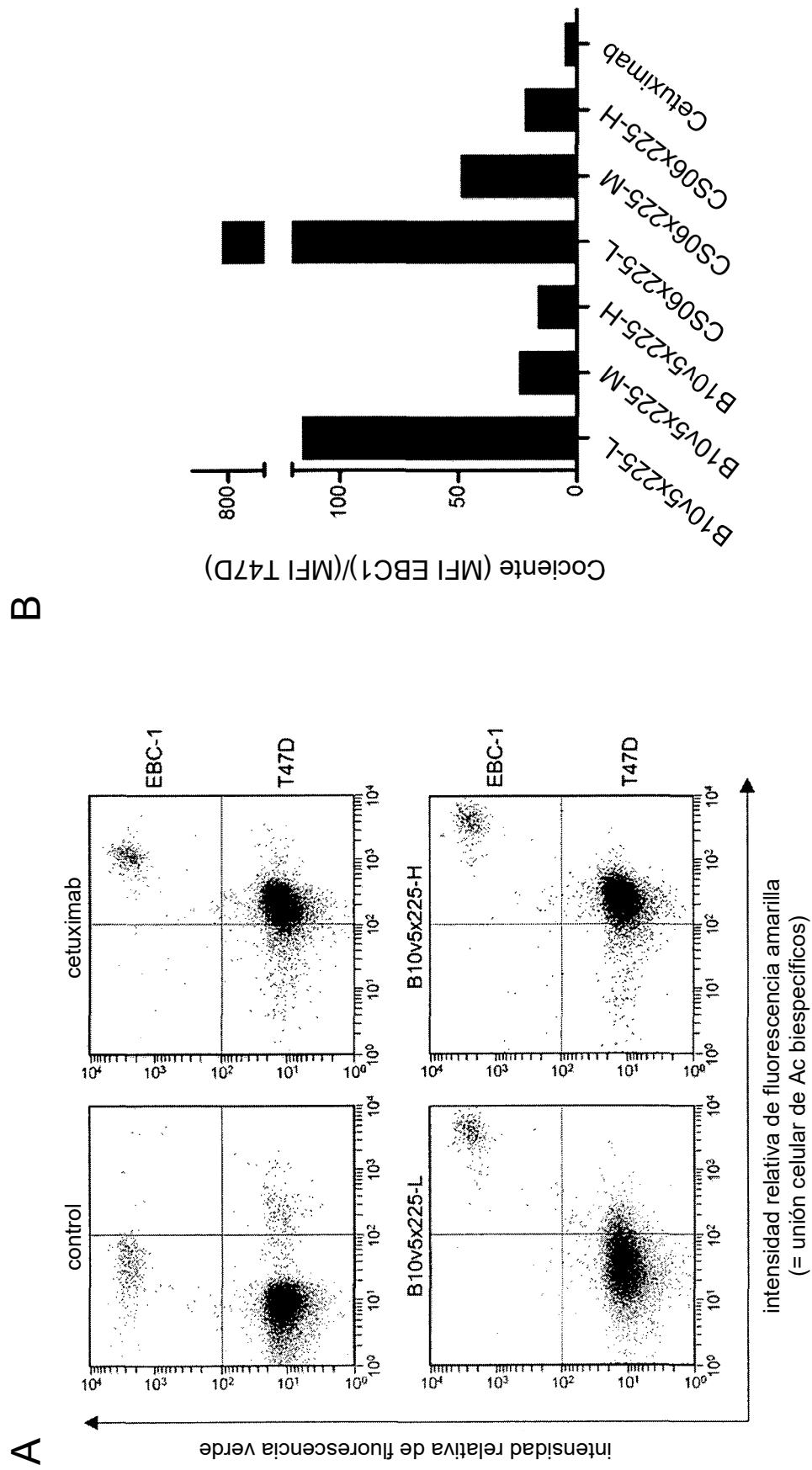


FIGURA 21

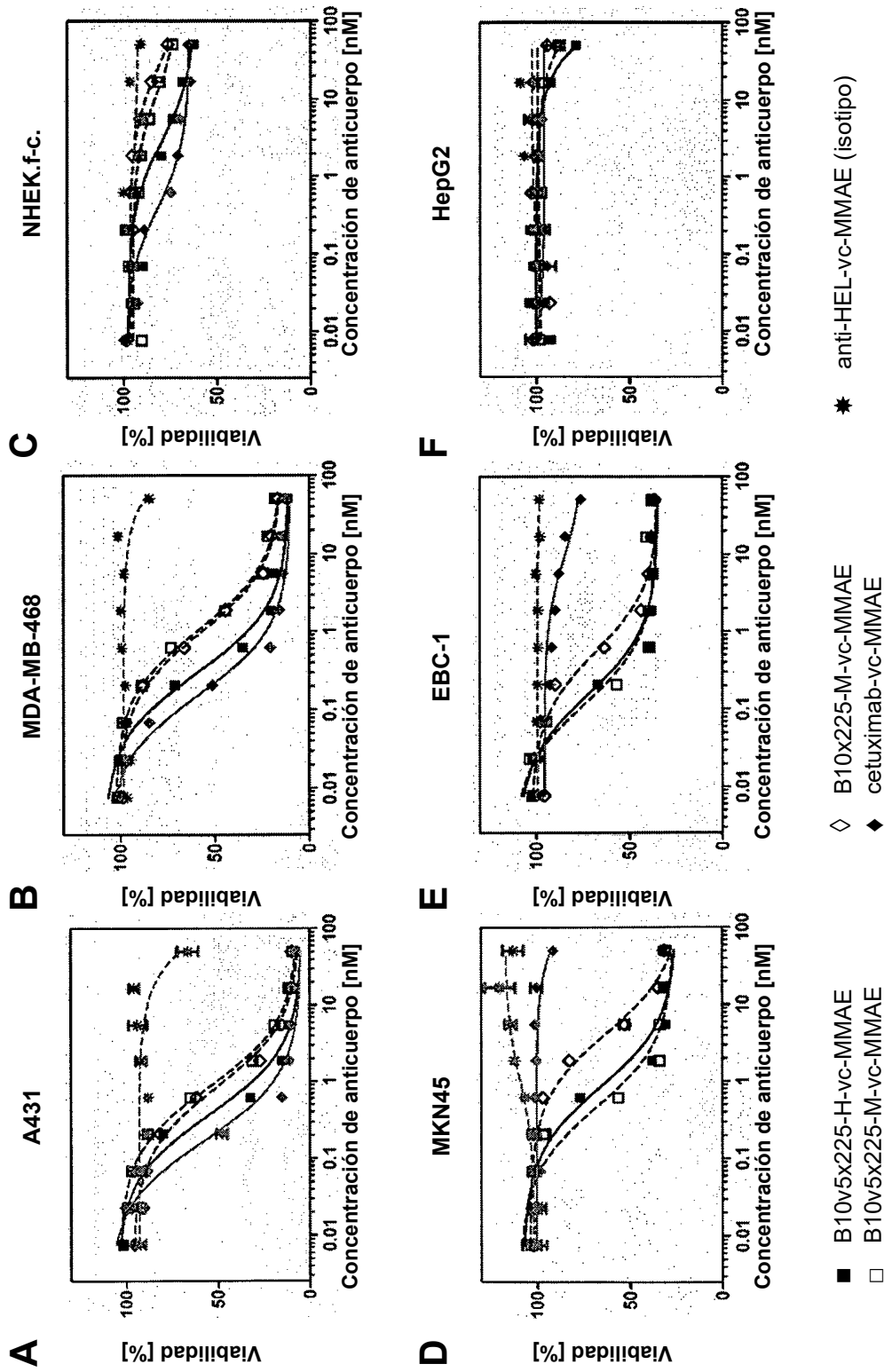


FIGURA 22

Anticuerpo	A431				NHEK.f-c.				rango tera- péutico	
	EC ₅₀ [nM]	ED ₈₀ [nM]	% de muerte celular a 50 nM	<i>n</i>	IC ₅₀ [nM]	TD ₂₀ [nM]	% de muerte celular a 50 nM	<i>n</i>	IC ₅₀ - EC ₅₀ [nM]	TD ₂₀ / ED ₈₀
B10v5x225- H-vc- MMAE	0,4 ± 0,1	2,1 ± 0 ,7	93 ± 1,3	5	5,9 ± 2,9	3,7 ± 1 ,1	37 ± 12	5	5,6	2
B10v5x225- M-vc- MMAE	1,0 ± 0,3	5,0 ± 1 ,5	91 ± 0,4	3	19 ± 7 *	25 ± 8	30 ± 9	3	28,1*	6
B10x225- M-vc- MMAE	0,7 ± 0,2	3,6 ± 0 ,9	90 ± 0,5	3	20 ± 1 0*	19 ± 8	27 ± 11	3	18,8*	5
cetuximab- vc-MMAE	0,1 ± 0,04	0,7 ± 0 ,3	92 ± 1,4	5	1,0 ± 0,5	0,8 ± 0 ,5	34 ± 10	5	0,9	1

FIGURA 23

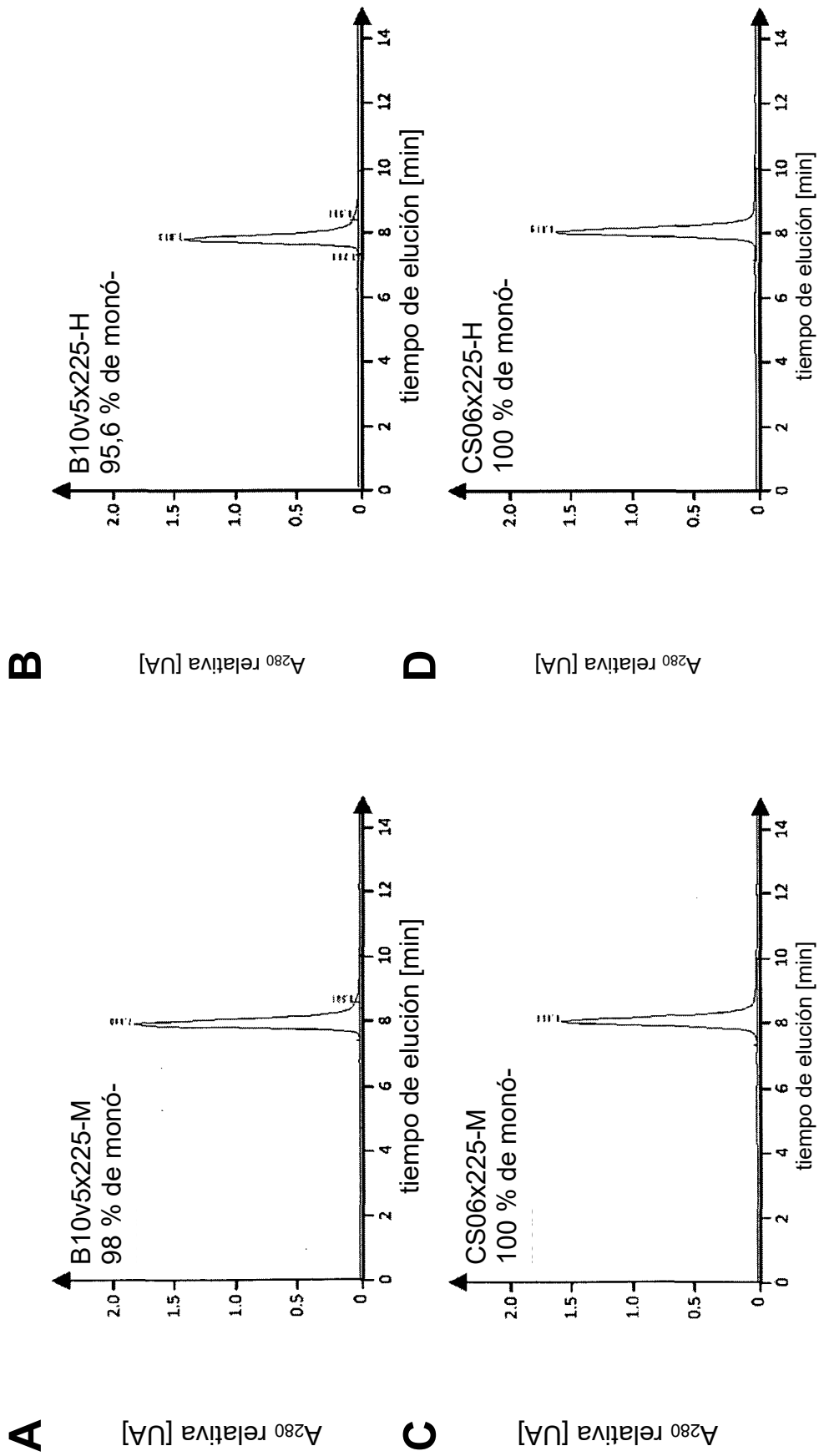


FIGURA 24

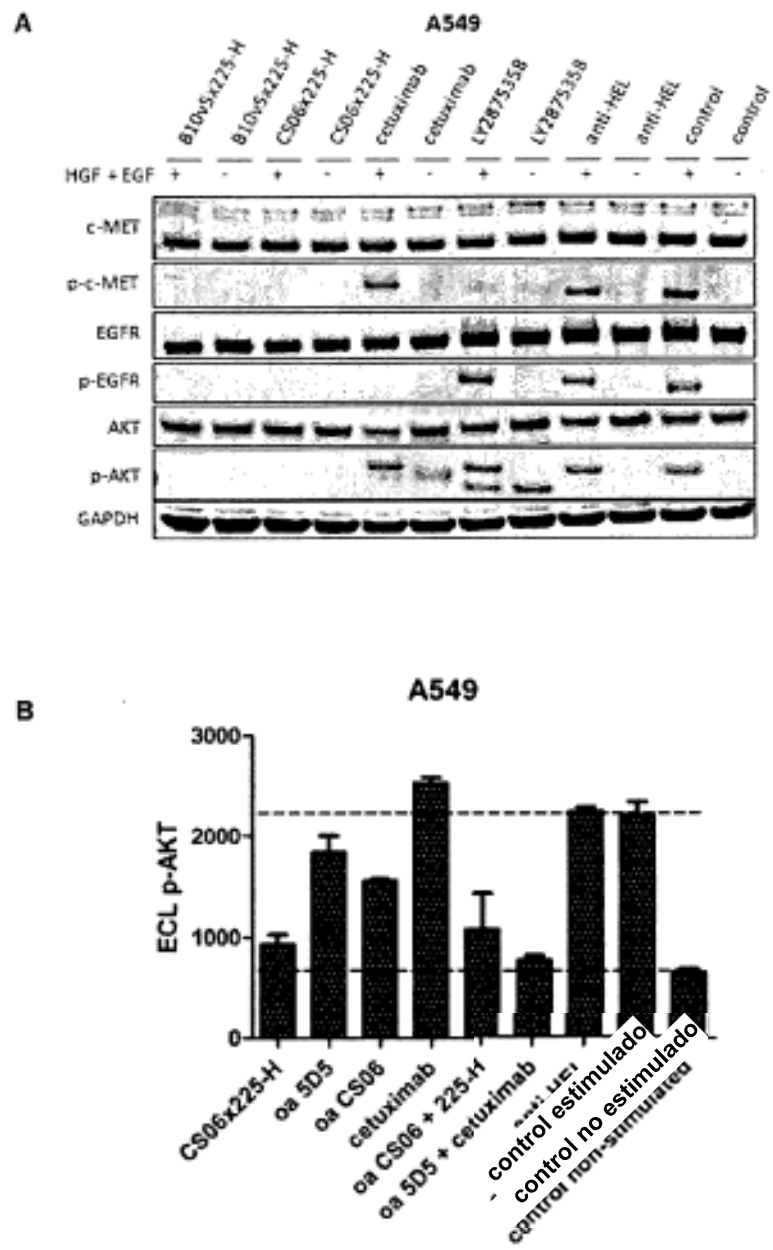
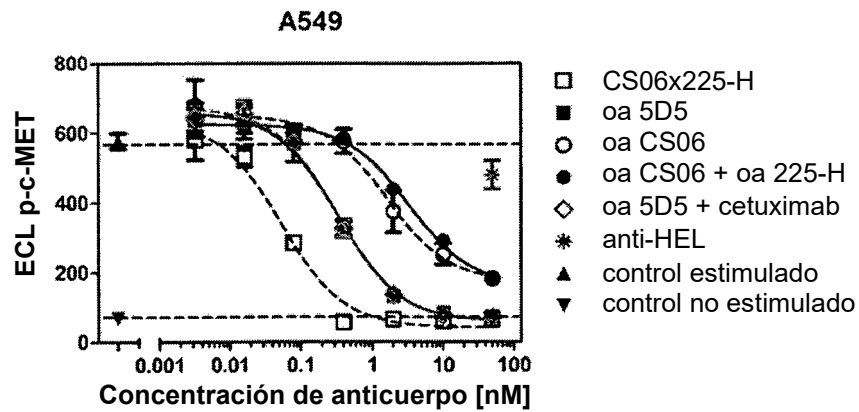


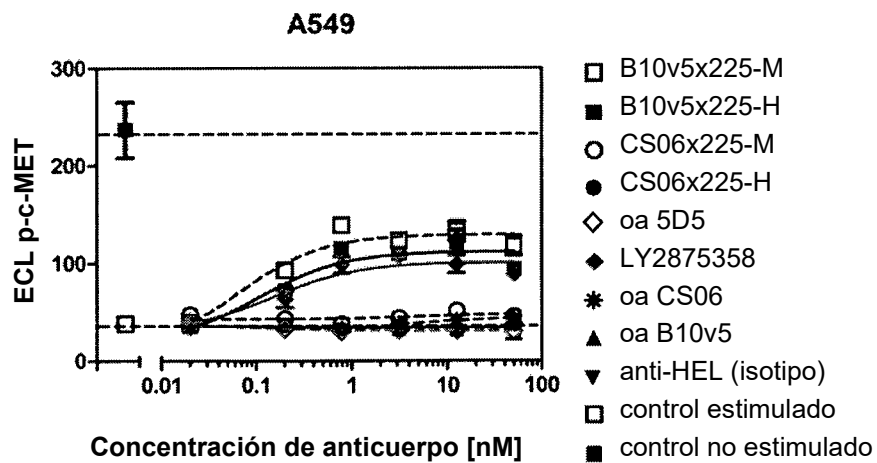
FIGURA 25 A, B

C



5

D



10

FIGURA 25 C, D

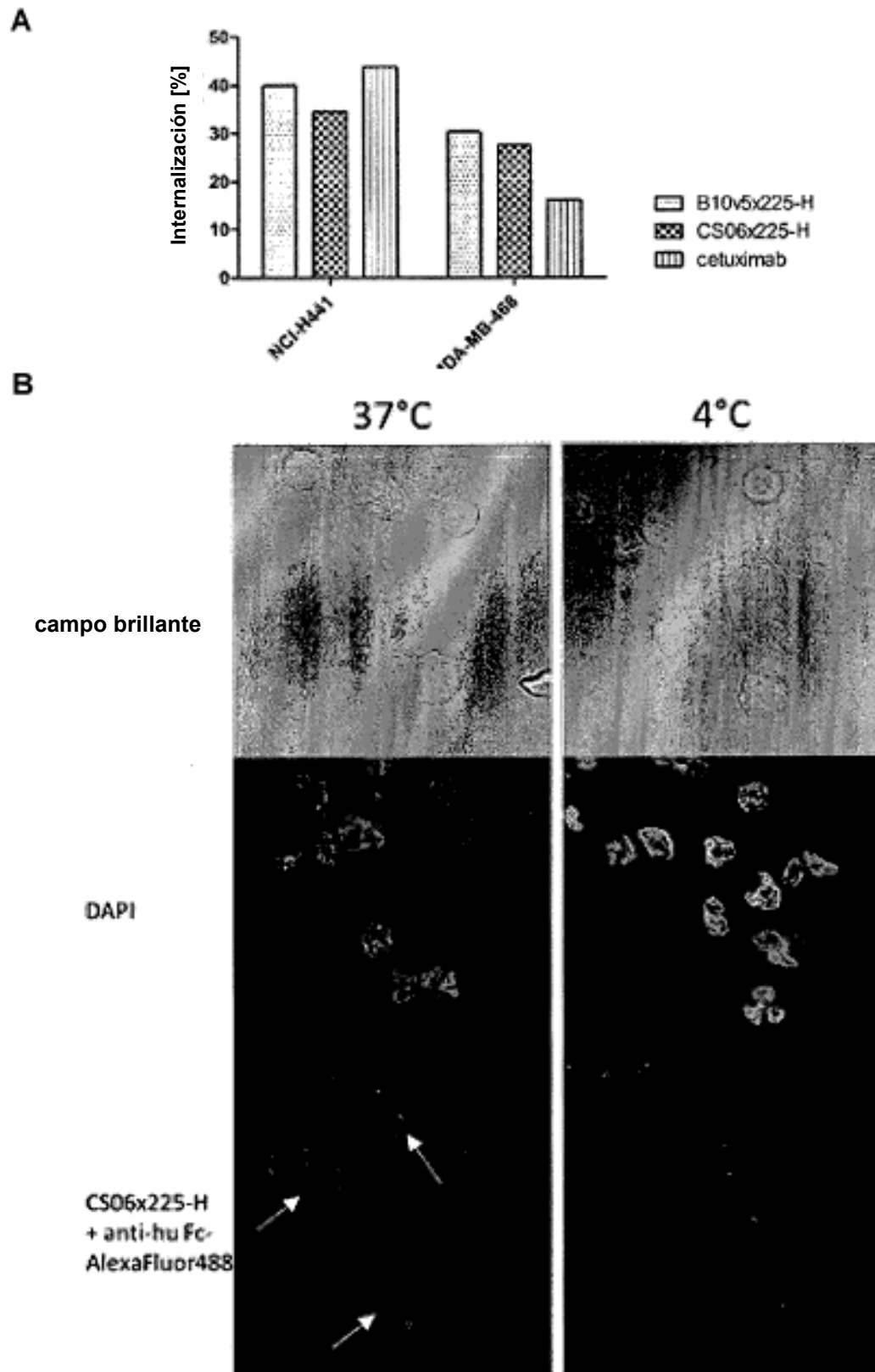
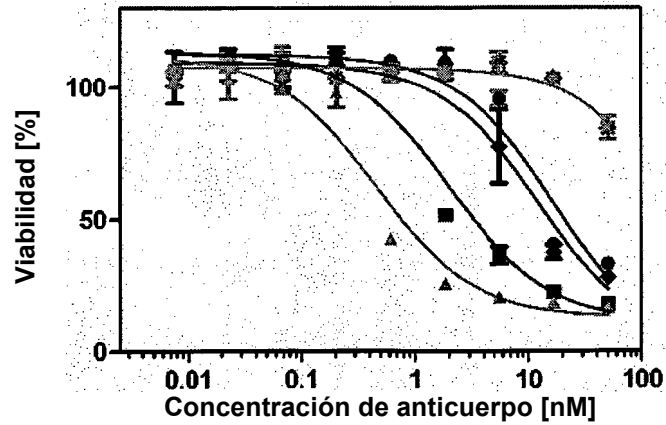
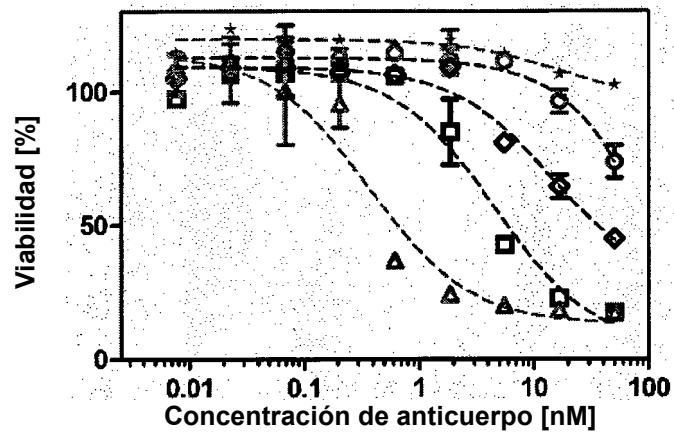


FIGURA 26

Células NHEK (6 días)



Células NHEK (6 días)



- B10v5x225-H-vc-MMAE
- B10v5x225-M-vc-MMAE
- ◆ B10x225-M-vc-MMAE
- ▲ cetuximab-vc-MMAE
- * anti-HEL-vc-MMAE (isotipo)
- B10v5x225-H
- B10v5x225-M
- ◇ B10x225-M
- △ cetuximab
- * anti-HEL (isotipo)

FIGURA 27