

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 995 219**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/00** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**A61K 47/68** (2007.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**C07K 16/32** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.06.2018 PCT/CN2018/091444**  
87 Fecha y número de publicación internacional: **19.12.2019 WO19237322**  
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2018 E 18922975 (0)**  
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2024 EP 3806905**

54 Título: **Métodos y materiales para tratar el cáncer**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.02.2025**

73 Titular/es:  
**SHANGHAI MIRACOGEN INC. (100.00%)  
Suite 4E, Building 3, No. 1238 Zhangjiang Rd,  
Pudong District  
Shanghai 201203, CN**

72 Inventor/es:  
**HU, CHAOHONG;  
LI, HU;  
LIU, WENCHAO y  
DAI, ZHENYU**

74 Agente/Representante:  
**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 995 219 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos y materiales para tratar el cáncer

**Descripción detallada****Campo técnico**

- 5 Este documento se refiere a un producto conjugado de anticuerpo-fármaco ("ADC en sus siglas en inglés") que contiene un anticuerpo anti-HER2 y al menos fármaco anticanceroso como se define en las reivindicaciones, y su uso para tratar un mamífero (p. ej., un ser humano) que tiene un cáncer que expresa HER2.

**Antecedentes**

- 10 HER2 es un protooncogén de muchos cánceres, especialmente cánceres de mama y gástricos que muestran expresión anormalmente alta o amplificación génica de la proteína HER2 (Yan et al., 2014 Cancer treatment reviews, 40(6):770-780). Aproximadamente 15-20% de los pacientes con cáncer de mama expresan de manera anormalmente alta HER2. Esta expresión anormalmente alta está estrechamente relacionada con un aumento de malignidad y mal pronóstico (Witton et al., 2003 The Journal of pathology, 200(3):290-297). El cáncer gástrico es el quinto cáncer más común en todo el mundo, con casi un millón de casos nuevos notificados en 2012 (Ferlay et al., 2015 International Journal of cancer, 136(5):E359-86). Aproximadamente 20% de los cánceres gástricos expresan de manera anormalmente alta HER2 (American Cancer Society, 2017 "Targeted Therapies for Stomach Cancer, disponible en línea en cancer.org). El cáncer gástrico que expresa HER2 es un área de necesidad médica no satisfecha debido a la complejidad genética y la heterogeneidad de la enfermedad (Lordick et al., 2014 Cancer treatment reviews, 40(6):692-700).

- 20 Los usos para las terapias actuales dirigidas a HER2 aprobadas por la Food and Drug Administration (FDA) son limitados. Trastuzumab (HERCEPTIN®) está aprobado por la FDA para tratar cáncer de mama metastásico positivo para HER2 combinado con quimioterapia o taxol, y para el tratamiento de cánceres gástricos progresivos positivos para HER2 combinado con quimioterapia puede prolongar notablemente la supervivencia de pacientes con cáncer gástrico progresivo (Van Cutsem et al., 2009 J clin oncol, 27:1 5s). PERJETA® (pertuzumab) está aprobado por la FDA para tratar pacientes con cáncer de mama metastásico positivo para HER2 que no han recibido terapia anti-HER2 previa o quimioterapia para la enfermedad metastásica combinado con trastuzumab y docetaxel. Kadcyla® (ado-trastuzumab emtansina; también denominado T-DM1) es un ADC aprobado por la FDA que contiene trastuzumab conectado al agente citotóxico emtansina para tratar pacientes con cáncer de mama metastásico positivo para HER2 que recibieron previamente trastuzumab y un taxano. Aunque la terapia combinada puede prolongar la supervivencia global de pacientes con cáncer gástrico, la mitad de ellos progresa un año después del tratamiento, la combinación con trastuzumab solo aumentó la tasa de respuesta en aproximadamente 12%, lo que indica resistencia a trastuzumab entre pacientes (Bang et al., 2010 The Lancet, 376(9742):687-697). Por tanto, existe la necesidad de agentes terapéuticos dirigidos a cánceres que expresan HER2 más eficaces con relación a las opciones de terapia dirigida a HER2 disponibles actualmente, y de agentes terapéuticos dirigidos a cánceres que expresan HER2 que sean resistentes a (p. ej., que no responden a; tales como cánceres que expresan HER2 recidivantes después del tratamiento) opciones de terapia dirigida a HER2 disponibles actualmente.

- 35 Thomann et al. Molecular Immunology 73: 69-75 (2016 divulgan que la galactosilación de Fc modula la toxicidad celular dependiente de anticuerpos de anticuerpos terapéuticos.

- 40 Los documentos WO 2005/081711 A2 y WO 2014/065661 A1 se divulgan productos conjugados de anticuerpo-fármaco que comprenden un anticuerpo anti-HER2 y péptidos de auristatina, así como su uso para tratar cánceres que expresan HER2.

El documento CA 2 900 912 A divulga anticuerpos anti-HER2 altamente galactosilados y usos de los mismos.

**Compendio**

- 45 Este documento proporciona ADC que contienen un anticuerpo dirigido a un antígeno asociado a tumores (polipéptido de HER2) y un fármaco anticanceroso, como se define adicionalmente en las reivindicaciones, que se puede utilizar para tratar un mamífero (p. ej., un ser humano) que tiene un cáncer que expresa el antígeno, un cáncer que expresa HER2). Un producto conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) incluye un anticuerpo anti-HER2 (p. ej., MAB802) y al menos una molécula de un fármaco anticanceroso (p. ej., un derivado de auristatina tal como monometil auristatina E (MMAE)) conjugado con el anticuerpo, como se define adicionalmente en las reivindicaciones. El ADC puede incluir más de una molécula de un fármaco anticanceroso por anticuerpo. Un ADC descrito en el presente documento incluye un anticuerpo anti-HER2 que tiene niveles aumentados de fucosilación (p. ej., con relación a otros anticuerpos anti-HER2). En algunos casos, un ADC descrito en el presente documento puede incluir una razón de fármaco/anticuerpo (DAR; por ejemplo, con relación a otros ADC que contienen anticuerpos anti-HER2). Este documento también proporciona métodos y materiales para fabricar y utilizar ADC que contienen un anticuerpo anti-HER2 (p. ej., MAB802) y uno o más fármacos anticancerosos (p. ej., MMAE). Por ejemplo, se puede utilizar un ADC que contiene un anticuerpo anti-HER2 y uno o más fármacos anticancerosos, como se define adicionalmente en las reivindicaciones, para tratar un mamífero (p. ej., un ser humano) que tiene un cáncer que expresa HER2.

Como se demuestra en el presente documento, el ADC MRG002, que incluye un anticuerpo MAB802 conjugado con MMAE a través de un Conector de vc, muestra actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo* en tumores que expresan HER2. Por ejemplo, MRG002 fue marcadamente más potente que T-DM1 en la inhibición del crecimiento de células cancerosas *in vitro* en varias células de cáncer de mama y gástrico (Tabla 5). Por ejemplo, MRG002 inhibió significativamente el crecimiento tumoral de cánceres de mama y cánceres gástricos *in vivo*, incluyendo en tumores resistentes a trastuzumab y modelos de PDX resistentes a T-DM1. Por tanto, MRG002 puede abordar necesidades médicas no satisfechas para tratar pacientes que tienen cánceres que expresan HER2, especialmente cánceres que expresan HER2 refractarios (p. ej., cánceres de mama que expresan HER2 refractarios y cánceres gástricos que expresan HER2 refractarios) y/o cánceres que expresan HER2 recidivantes (p. ej., metastásicos) (p. ej., cánceres de mama que expresan HER2 recidivantes y cánceres gástricos que expresan HER2 recidivantes).

En general, un aspecto de este documento presenta un ADC que incluye un anticuerpo anti-HER2 que tiene más de aproximadamente 90% de fucosilación, al menos una molécula de un fármaco anticanceroso y un conector que conecta el anticuerpo anti-HER2 y la molécula o moléculas) de dicho fármaco anticanceroso, como se define adicionalmente en las reivindicaciones.

El anticuerpo anti-HER2 puede ser un anticuerpo IgG. El anticuerpo anti-HER2 puede ser un anticuerpo humanizado. El anticuerpo anti-HER2 incluye una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 4. El anticuerpo anti-HER2 incluye una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 8 (p. ej., una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 9). El anticuerpo anti-HER2 puede ser un anticuerpo MAB802. El anticuerpo anti-HER2 puede tener menos de 8% de afucosilación, como se define adicionalmente en las reivindicaciones. El anticuerpo anti-HER2 puede tener una afinidad de unión por CD16 que tiene un valor de constante de disociación en equilibrio (KD) mayor que aproximadamente  $2,5 \times 10^{-08}$  M. El CD 16 puede ser un CD16a 176Val humano, y la KD puede ser de aproximadamente  $6,9 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $7,1 \times 10^{-08}$  M. El CD16 puede ser un CD16a 176Phe humano, y la KD puede ser de aproximadamente  $6,6 \times 10^{-07}$  M a aproximadamente  $6,9 \times 10^{-17}$  M. El ADC comprende al menos tres moléculas de dicho fármaco anticanceroso por molécula de anticuerpo. El fármaco anticanceroso puede ser un derivado de auristatina (p. ej., monometil auristatina E). El conector puede ser un conector escindible (p. ej., un conector dipeptídico de valina citrulina).

En otro aspecto, este documento presenta una composición que incluye una pluralidad de ADC, donde los ADC incluyen un anticuerpo anti-HER2 que tiene más de aproximadamente 90% de fucosilación, al menos una molécula de un fármaco anticanceroso y un conector que conecta el anticuerpo anti-HER2 y la molécula o moléculas del fármaco anticanceroso, como se define adicionalmente en las reivindicaciones. El anticuerpo anti-HER2 puede ser un anticuerpo IgG. El anticuerpo anti-HER2 puede ser un anticuerpo humanizado. El anticuerpo anti-HER2 incluye una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 4. El anticuerpo anti-HER2 incluye una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 8 (p. ej., una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 9). El anticuerpo anti-HER2 puede ser un anticuerpo MAB802. El anticuerpo anti-HER2 puede tener menos de 8% de afucosilación. La composición puede tener una razón fármaco/anticuerpo mayor que aproximadamente 3,5 moléculas de fármaco anticanceroso por anticuerpo anti-HER2 (p. ej., una razón fármaco/anticuerpo de aproximadamente 3,8 moléculas de fármaco anticanceroso por anticuerpo anti-HER2). El fármaco anticanceroso puede ser un derivado de auristatina (p. ej., monometil auristatina E). El conector puede ser un conector escindible (p. ej., un conector dipeptídico de valina citrulina).

En otro aspecto, este documento presenta un ADC, donde el ADC incluye un anticuerpo anti-HER2 que tiene más de aproximadamente 90% de fucosilación, al menos una molécula de un fármaco anticanceroso y un conector que conecta el anticuerpo anti-HER2 y la molécula o moléculas de fármaco anticanceroso, como se define adicionalmente en las reivindicaciones, para su uso en el tratamiento de un mamífero que tiene un cáncer que expresa HER2. El mamífero puede ser un ser humano. El cáncer que expresa HER2 puede ser un cáncer de mama. El cáncer que expresa HER2 puede ser un cáncer gástrico. El cáncer que expresa HER2 puede ser un cáncer refractario (p. ej., un cáncer resistente a trastuzumab o un cáncer resistente a T-DM1). El anticuerpo anti-HER2 puede ser un anticuerpo IgG. El anticuerpo anti-HER2 puede ser un anticuerpo humanizado. El anticuerpo anti-HER2 incluye una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 4. El anticuerpo anti-HER2 incluye una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 8 (p. ej., una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 9). El anticuerpo anti-HER2 puede ser un anticuerpo MAB802. El anticuerpo anti-HER2 puede tener menos de 8% de afucosilación. El anticuerpo anti-HER2 puede tener una afinidad de unión por CD16 que tiene un valor de KD mayor que aproximadamente  $2,5 \times 10^{-08}$  M. El CD16 puede ser un CD16a 176Val humano, y la KD puede ser de aproximadamente  $6,9 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $7,1 \times 10^{-08}$  M. El CD16 puede ser un CD16a 176Phe humano, y la KD puede ser de aproximadamente  $6,6 \times 10^{-07}$  M a aproximadamente  $6,9 \times 10^{-07}$  M. El ADC puede tener actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) que conduce a de aproximadamente 0% a aproximadamente 30% de lisis celular (p. ej., de aproximadamente 13,9% a aproximadamente 15,7% de lisis celular). El ADC puede incluir al menos tres moléculas de fármaco anticanceroso por molécula de anticuerpo anti-HER2. El fármaco anticanceroso puede ser un derivado de auristatina (p. ej., monometil auristatina E). El conector puede ser un conector escindible (p. ej., un conector dipeptídico de valina citrulina). La administración puede incluir administrar de aproximadamente 0,6 mg a aproximadamente 4 mg de ADC por kg de peso corporal del mamífero.

- A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Por ejemplo, se entiende que a los términos "p. ej.", y "tal como", y equivalentes gramaticales de los mismos, les sigue la frase "y sin limitación" a menos que se indique explícitamente lo contrario. Por ejemplo, las formas singulares "un", "uno", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "alrededor de" significa "aproximadamente" (p. ej., más o menos aproximadamente 10% del valor indicado). Aunque se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento para poner en práctica la invención, a continuación, se describen métodos y materiales adecuados. Se aprecia que ciertas características de la invención, que se describen, por claridad, en el contexto de realizaciones separadas, también se pueden proporcionar combinadas en una única realización. Por el contrario, diversas características de la invención que, por brevedad, se describen en el contexto de una única realización, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier subcombinación adecuada. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluidas las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.
- Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y la descripción a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y dibujos, y a partir de las reivindicaciones.

- La invención se define en las reivindicaciones. Cualquier materia que no esté abarcada por las reivindicaciones no es parte de la invención y se proporciona solo con fines de referencia o comparación.
- Cualquier referencia a un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia que implica un cierto compuesto o composición debe entenderse como una referencia a dicho compuesto o composición para su uso en dicho método.

#### Descripción de los dibujos

- La Figura 1 contiene un esquema de una molécula MRG002 que tiene el anticuerpo monoclonal anti-HER2 (MAB802), el Conector vc y un derivado de auristatina MMAE. X es el número de moléculas de MMAE conjugadas por anticuerpo.
- La Figura 2A contiene un esquema de tipos de glicanos. Entre estos glicanos, los que tienen triángulos rojos (que representan fucosa) están fucosilados, mientras que otros no lo están. La Figura 2B contiene un cromatograma de fluorescencia que muestra las fracciones de glicanos presentes en MAB802.
- La Figura 3 contiene un perfil de cromatografía de interacción hidrófoba-cromatografía líquida de alto rendimiento (HIC-HPLC) de MRG002.
- La Figura 4 contiene gráficos que muestran curvas de dosis-respuesta representativas de MRG002, MAB802 y trastuzumab en un ensayo de actividad de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC).
- La Figura 5 contiene un gráfico que muestra la actividad antiproliferación de MRG002 y T-DM1 (Kadcyla®) en células BT-474.
- La Figura 6 muestra el efecto de MRG002, T-DM1, mAb-2 y trastuzumab-ADC sobre el volumen tumoral de modelos CDX de cáncer de mama BT-474 (izquierda) y la foto de tumores al final del estudio (derecha). ADC-2 representa MRG002; mAb-2 representa MAB802; trastuzumab-ADC es un ADC compuesto por trastuzumab y vcMMAE, igual que en MRG002; "对照" representa vehículo; el número de animales fue 10 para el grupo de vehículo, y fue 6 para otros grupos.
- La Figura 7 muestra el efecto de MRG002, T-DM1, mAb-2 y trastuzumab-ADC en el volumen tumoral de modelos CDX de cáncer gástrico NCI-N87 (izquierda) y la foto de tumores al final del estudio (derecha). ADC-2 representa MRG002; mAb-2 representa MAB802; trastuzumab-ADC es un ADC compuesto por trastuzumab y vcMMAE.
- La Figura 8 muestra el efecto de MRG002 (ADC-2) y T-DM1 sobre el volumen tumoral de cáncer de mama modelo de PDX BC#046. Todos los ratones portadores de tumor en el grupo de vehículo (disolvente ADC-2) se habían sacrificado antes del Día 84 para cumplir con los requisitos de bienestar animal (4 ratones tenían una reducción del >20% en el peso corporal, y los otros 7 ratones tenían un volumen tumoral de más de 2000 mm<sup>3</sup>), por lo tanto, no se tomó ninguna fotografía de los tumores.
- La Figura 9 muestra el efecto de MRG002 (ADC-2) y T-DM1 sobre el volumen tumoral de cáncer de mama modelo de PDX BC#197 (izquierda) y la foto de tumores al final del estudio (derecha). El Grupo 1 es vehículo (disolvente ADC-2), el Grupo 2 es ADC-2 a una dosis de 3 mg/kg, el Grupo 3 es ADC-2 a una dosis de 10 mg/kg y el Grupo 4 es T-DM1 a una dosis de 10 mg/kg. Cinco ratones portadores de tumor en el grupo de disolvente ADC-2 se habían sacrificado antes del Día 84 para cumplir con los requisitos de bienestar animal

(el ratón Núm. 8 tenía una reducción >20% en el peso corporal, y los ratones Núm. 2, 5, 6 y 7 tenían un volumen tumoral de más de 2000 mm<sup>3</sup>), por lo tanto, no se tomó ninguna imagen de sus tumores correspondientes.

5 La Figura 10 muestra el efecto de MRG002 (ADC-2) y T-DM1 sobre el volumen tumoral de cáncer gástrico modelo de PDX STO#041. Todos los ratones portadores de tumor en el grupo de vehículo (disolvente ADC-2) se habían sacrificado antes del Día 84 para cumplir con los requisitos de bienestar animal (el volumen tumoral superaba los 2000 mm<sup>3</sup>).

10 La Figura 11 muestra el efecto de MRG002 (ADC-2) y T-DM1 sobre el volumen tumoral de cáncer gástrico modelo de PDX STO#053 (izquierda) y la foto de tumores al final del estudio (derecha). El Grupo 1 es vehículo (disolvente ADC-2), el Grupo 2 es ADC-2 a una dosis de 3 mg/kg, el Grupo 3 es ADC-2 a una dosis de 10 mg/kg y el Grupo 4 es T-DM1 a una dosis de 10 mg/kg. Seis ratones portadores de tumor en el grupo de disolvente ADC-2 se habían sacrificado antes del Día 84 para cumplir con los requisitos de bienestar animal (Núm. 1, 2, 3, 4, 7 y 8 ratones tenían un volumen tumoral >2000 mm<sup>3</sup>), por lo tanto, no se tomó ninguna fotografía de estos tumores.

15 La Figura 12 muestra el efecto de MRG002 (ADC-2) y T-DM1 sobre el volumen tumoral de cáncer gástrico modelo de PDX STO#069. Todos los ratones portadores de tumor en el grupo de vehículo (disolvente ADC-2) se habían sacrificado antes del Día 84 para cumplir con los requisitos de bienestar animal (el volumen tumoral superaba los 2000 mm<sup>3</sup>).

20 La Figura 13 muestra el efecto de MRG002 (ADC-2) y T-DM1 sobre el volumen tumoral de cáncer gástrico modelo de PDX STO#179 (izquierda) y la foto de tumores al final del estudio (derecha). El Grupo 1 es vehículo (disolvente ADC-2), el Grupo 2 es ADC-2 a una dosis de 1 mg/kg, el Grupo 3 es ADC-2 a una dosis de 3 mg/kg y el Grupo 4 es T-DM1 a una dosis de 3 mg/kg. Cinco ratones portadores de tumor en el grupo de vehículo de ADC-2 se habían sacrificado antes del Día 84 para cumplir con los requisitos de bienestar animal (Núm. 1, 2, 3, 4 y 5 ratones tenían un volumen tumoral >2000 mm<sup>3</sup>), por lo tanto, no se tomó ninguna fotografía de estos tumores.

25 La Figura 14 muestra el efecto de MRG002 (ADC-2) y T-DM1 sobre el volumen tumoral de cáncer gástrico modelo de PDX STO#240 (izquierda) y la foto de tumores al final del estudio (derecha). El Grupo 1 es vehículo (disolvente ADC-2), el Grupo 2 es ADC-2 a una dosis de 3 mg/kg, el Grupo 3 es ADC-2 a una dosis de 10 mg/kg y el Grupo 4 es T-DM1 a una dosis de 10 mg/kg. El ratón que porta el tumor Núm. 1 en el grupo de vehículo ADC-2 se había sacrificado antes del Día 84 para cumplir con los requisitos de bienestar animal (volumen tumoral >2000 mm<sup>3</sup>), por lo tanto, no se tomó ninguna imagen de su tumor.

30 La Figura 15 muestra el efecto de MRG002 (ADC-2) y T-DM1 sobre el volumen tumoral de cáncer gástrico modelo de PDX STO#410. Todos los ratones portadores de tumor en el grupo de vehículo (disolvente ADC-2) se sacrificaron antes del Día 84 para cumplir con los requisitos de bienestar animal (el volumen tumoral superaba los 2000 mm<sup>3</sup>).

### Descripción detallada

Este documento proporciona métodos y materiales útiles para tratar el cáncer. Los ADC proporcionados en el presente documento pueden incluir un anticuerpo que se dirige a un antígeno asociado a tumores (un polipéptido de HER2) y un fármaco anticanceroso, como se define adicionalmente en las reivindicaciones, que se puede utilizar para tratar un mamífero (p. ej., un ser humano) que tiene un cáncer que expresa el antígeno (un cáncer que expresa HER2). Los ADC incluyen un anticuerpo anti-HER2 (p. ej., MAB802) y al menos una (p. ej., 2, 3, 4, 5 o más) molécula de uno o más fármacos anticancerosos (p. ej., un derivado de auristatina tal como MMAE), como se define adicionalmente en las reivindicaciones. En algunos casos, los ADC proporcionados en el presente documento y como se definen en las reivindicaciones se pueden utilizar para tratar un mamífero (p. ej., un ser humano) que tiene un cáncer que expresa el antígeno (un cáncer que expresa HER2). Por ejemplo, uno o más ADC que contienen un anticuerpo anti-HER2 y un fármaco anticanceroso como se define adicionalmente en las reivindicaciones son adecuados para la administración a un mamífero que tiene un cáncer que expresa HER2 para reducir la gravedad del cáncer, para reducir un síntoma del cáncer y/o para reducir el número de células cancerosas presentes dentro del mamífero.

### Productos conjugados de anticuerpo-fármaco

50 Este documento proporciona ADC que contienen un anticuerpo anti-HER2 (p. ej., MAB802) y al menos una (p. ej., 2, 3, 4, 5 o más) molécula de uno o más fármacos anticancerosos (p. ej., un derivado de auristatina tal como MMAE), como se define adicionalmente en las reivindicaciones. Sin vincularse a la teoría, se cree que los ADC descritos en el presente documento (p. ej., MRG002) se unen a receptores HER2 en la superficie de células tumorales, se internalizan a través de endocitosis mediada por receptores, liberan MMAE dentro del lisosoma y provocan la supresión del crecimiento de células tumorales y/o muerte celular.

**Anticuerpos**

Los ADC descritos en el presente documento (ADC que contienen un anticuerpo anti-HER2 y uno o más fármacos anticancerosos) incluyen un anticuerpo anti-HER2 apropiado, como se define adicionalmente en las reivindicaciones. En general, un "anticuerpo" puede ser un anticuerpo completo o un fragmento de unión a antígeno (Fab) (p. ej., un Fab de origen natural o un Fab sintético (p. ej., una proteína de fusión tal como un fragmento variable de cadena sencilla (scFv)). Por ejemplo, un anticuerpo anti-HER2 puede incluir cualquier anticuerpo completo o fragmento de anticuerpo que tenga afinidad de unión por un polipéptido de HER2. Un anticuerpo anti-HER2 puede ser cualquier clase y subclase apropiada (p. ej., IgG tal como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4; IgA tal como IgA1 e IgA2; IgD; IgE; e IgM). En algunos casos, un anticuerpo anti-HER2 como se define en las reivindicaciones puede ser un anticuerpo IgG (p. ej., una IgG1). Un anticuerpo anti-HER2 puede ser un anticuerpo recombinante. Un anticuerpo anti-HER2 puede ser un anticuerpo quimérico (p. ej., un anticuerpo humanizado). En algunos casos, un anticuerpo anti-HER2 puede ser un anticuerpo humanizado. El anticuerpo anti-HER2 tal como se define en las reivindicaciones es un anticuerpo monoclonal. Un anticuerpo anti-HER2 puede ser un anticuerpo monoespecífico o un anticuerpo biespecífico. Por ejemplo, en casos donde un anticuerpo anti-HER2 es un anticuerpo biespecífico, el anticuerpo anti-HER2 biespecífico puede tener afinidad de unión por un polipéptido de HER2 y afinidad de unión por un segundo antígeno. Un anticuerpo anti-HER2 puede tener afinidad de unión por un polipéptido de HER2 fosforilado o puede tener afinidad de unión por un polipéptido de HER2 no fosforilado.

La cadena ligera del anticuerpo anti-HER2 como se define en las reivindicaciones incluye las regiones determinantes de complementariedad (CDR) expuestas a continuación:

20 ASQDVNTAVA (SEQ ID NO: 1);  
SASFLYS (SEQ ID NO: 2); y  
QQHYTTPPT (SEQ ID NO: 3).

En particular, la cadena ligera del anticuerpo anti-HER2 que incluye las CDR expuestas en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 incluye una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 4.

**SEQ ID NO:4:**

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFVLYSGVPSRFS  
GSRSGTDFTLHISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTIFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK  
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEK  
25 HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

La cadena pesada del anticuerpo anti-HER2 como se define en las reivindicaciones incluye las CDR expuestas a continuación:

30 GFNIKDTYIH (SEQ ID NO: 5);  
IYPTNGYTRYADSVK (SEQ ID NO: 6); y  
WGGDGFYAMDY (SEQ ID No: 7).

En particular, la cadena pesada del anticuerpo anti-HER2 que incluye las CDR expuestas en SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7 incluye una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10.

**SEQ ID NO:8**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYA  
DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVVSSA  
STRGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS  
35 LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEP

**SEQ ID NO:9**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYA  
 DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSA  
 STKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS  
 LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP  
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS  
 VLTVLIIQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL  
 TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV  
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

**SEQ ID NO:10**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYA  
 DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSA  
 STKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS  
 LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF  
 PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV  
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL  
 TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV  
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5 En algunos casos, una cadena pesada de anticuerpo anti-HER2 puede tener una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 por ciento (p. ej., al menos 78%, al menos 79%, al menos 80%, al menos 81%, al menos 82%, al menos 83%, al menos 84%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 99% o el 100%) idéntica a la secuencia expuesta en una cualquiera de SEQ ID NO: 9 a SEQ ID NO: 10. Por ejemplo, un anticuerpo anti-HER2 puede tener una secuencia de aminoácidos que es al menos 75% idéntica a SEQ ID NO: 9 e incluye la secuencia de aminoácidos  
 10 expuesta en SEQ ID NO: 8, incluyendo las CDR expuestas en SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7. Por ejemplo, un anticuerpo anti-HER2 puede tener una secuencia de aminoácidos que es al menos 75% idéntica a SEQ ID NO: 9, incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 8, incluyendo las CDR expuestas en SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7, y tiene una secuencia de EEM en los residuos 359-361.

15 Los ejemplos de anticuerpos anti-HER2 que se pueden utilizar en un ADC descrito en el presente documento incluyen, sin limitación, MAB802, trastuzumab.

Este documento también proporciona ácidos nucleicos que codifican anticuerpos anti-HER2 descritos en el presente documento, así como construcciones (p. ej., construcciones de expresión) para expresar ácidos nucleicos que codifican anticuerpos anti-HER2 descritos en el presente documento.

20 El anticuerpo anti-HER2 como se define en las reivindicaciones tiene un mayor nivel de fucosilación y opcionalmente un menor nivel de afucosilación (p. ej., con relación a otros anticuerpos anti-HER2, tales como anticuerpos anti-HER2 utilizados en terapias actuales dirigidas a HER2 aprobadas por la FDA (p. ej., trastuzumab)).

Como se emplea en el presente documento, el porcentaje de fucosilación se refiere al porcentaje molar de glicanos anclados al anticuerpo que contiene fucosa (es decir, la razón en porcentaje de la cantidad molar de los glicanos fucosilados con respecto a la cantidad molar total de glicanos tanto fucosilados como no fucosilados).

25 Como se emplea en el presente documento, el porcentaje de afucosilación se refiere al porcentaje molar de glicanos anclados al anticuerpo que no contienen fucosa (es decir, la razón en porcentaje de la cantidad molar de los glicanos no fucosilados con respecto a la cantidad molar total de glicanos tanto fucosilados como no fucosilados).

30 Los ejemplos de tipos de glicanos pueden ser los mostrados en la Figura 2A. Por ejemplo, con referencia a la Figura 2A, el porcentaje de fucosilación se puede determinar como una razón de la cantidad total de glicanos fucosilados (G0F-GlcNAc, G0F, G1F y G2F) dividido por la cantidad total de todos los glicanos (G0F-GlcNAc, G0, G0F, Man5, G1, G1F y G2F). De manera similar, el porcentaje de afucosilación se puede determinar como la razón de la cantidad total de glicanos no fucosilados (G0, Man5 y G1) a la dividida por la cantidad total de todos los glicanos (G0F-GlcNAc, G0, G0F, Man5, G1, G1F y G2F).

- El anticuerpo anti-HER2 como se define en las reivindicaciones tiene un mayor nivel de fucosilación y opcionalmente un menor nivel de afucosilación en la región Fc del anticuerpo. Se puede utilizar cualquier método apropiado para determinar la cantidad de fucosilación en un anticuerpo. Por ejemplo, se puede realizar un análisis de glicosilación (p. ej., un análisis de N-glicanos) utilizando HPLC (véanse, por ejemplo, los ejemplos) o como se describe en otro lugar (véase, p. ej., la FARMACOPEA EUROPEA 8.0; 2.2.59. Análisis de glicanos de glicoproteínas).
- El anticuerpo anti-HER2 como se define en las reivindicaciones tiene más de 90% de fucosilación, y en algunos casos más de aproximadamente 91%, más de aproximadamente 92%, más de aproximadamente 93%, más de aproximadamente 94%, más de aproximadamente 95%, más de aproximadamente 95%, más de aproximadamente 96%, más de aproximadamente 98%, más de aproximadamente 99% o aproximadamente 100% de fucosilación).
- En algunos casos, el anticuerpo anti-HER2 como se define en las reivindicaciones puede tener de 90% a aproximadamente 100% de fucosilación (p. ej., de aproximadamente 93% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 95% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 97% a aproximadamente 100%, de 90% a aproximadamente 97%, de 90% a aproximadamente 95%, de 90% a aproximadamente 92%, o de aproximadamente 92% a aproximadamente 98%, o de aproximadamente 92% a aproximadamente 99% de fucosilación). Por ejemplo, un anticuerpo anti-HER2 puede tener aproximadamente 97,77% o aproximadamente 98% de fucosilación.
- En algunos casos, el anticuerpo anti-HER2 puede tener menos de 10% de afucosilación (p. ej., menos de aproximadamente 9%, menos de aproximadamente 8%, menos de aproximadamente 7%, menos de aproximadamente 6%, menos de aproximadamente 5%, menos de aproximadamente 4%, menos de aproximadamente 3%, menos de aproximadamente 2%, menos de aproximadamente 1% o menos de aproximadamente 0,5% de afucosilación). En algunos casos, el anticuerpo anti-HER2 puede tener de aproximadamente 0% a aproximadamente 10% de afucosilación (p. ej., de aproximadamente 0% a aproximadamente 9%, de aproximadamente 0% a aproximadamente 8%, de aproximadamente 0% a aproximadamente 7%, de aproximadamente 0% a aproximadamente 6%, de aproximadamente 0% a aproximadamente 5%, de aproximadamente 0% a aproximadamente 4%, de aproximadamente 0% a aproximadamente 3%, de aproximadamente 0% a aproximadamente 2%, de aproximadamente 0% a aproximadamente 1%, de aproximadamente 1% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 3% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 1% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 2% a aproximadamente 7%, de aproximadamente 3% a aproximadamente 6%, de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 5%, de aproximadamente 1% a aproximadamente 4%, o de aproximadamente 2% a aproximadamente 3% de afucosilación).
- En algunos casos, el anticuerpo anti-HER2 se puede modificar para que tenga un mayor nivel de fucosilación y para que tenga un menor nivel de afucosilación. Se puede utilizar cualquier método apropiado para alterar (p. ej., aumentar o disminuir) el nivel de fucosilación de un anticuerpo anti-HER2. Por ejemplo, el nivel de fucosilación en un anticuerpo anti-HER2 se puede alterar, por ejemplo, modificando la osmolalidad del medio de cultivo. Por ejemplo, el nivel de fucosilación en un anticuerpo anti-HER2 se puede aumentar utilizando, por ejemplo, una fucosiltransferasa. Por ejemplo, el nivel de fucosilación en un anticuerpo anti-HER2 se puede reducir utilizando, por ejemplo, un inhibidor de fucosiltransferasa. En algunos casos, un anticuerpo anti-HER2 se puede modificar para que tenga un mayor nivel de fucosilación y/o para que tenga un nivel disminuido de afucosilación como se describe en otro lugar (véase, por ejemplo, Konno et al., 2012 Cytotechnology, 64:249-265; y Yamane-Ohnuki et al., 2009 mAb, 1:3).
- El anticuerpo anti-HER2 puede tener menor actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (p. ej., con relación a otros anticuerpos anti-HER2, tales como anticuerpos anti-HER2 utilizados en terapias actuales dirigidas a HER2 aprobadas por la FDA (p. ej., trastuzumab)). Por ejemplo, el anticuerpo anti-HER2 puede tener actividad ADCC que conduce a menor lisis celular. En algunos casos, el anticuerpo anti-HER2 puede tener actividad ADCC que conduce a menos de aproximadamente 30% de lisis celular (p. ej., menos de aproximadamente 30%, menos de aproximadamente 29%, menos de aproximadamente 29%, menos de aproximadamente 28%, menos de aproximadamente 27%, menos de aproximadamente 26%, menos de aproximadamente 25%, menos de aproximadamente 24%, menos de aproximadamente 23%, menos de aproximadamente 22%, menos de aproximadamente 21%, menos de aproximadamente 20%, menos de aproximadamente 19%, menos de aproximadamente 18%, menos de aproximadamente 17%, menos de aproximadamente 16%, menos de aproximadamente 15%, menos de aproximadamente 14%, menos de aproximadamente 13%, menos de aproximadamente 12%, menos de aproximadamente 11%, menos de aproximadamente 10%, menos de aproximadamente 9%, menos de aproximadamente 8%, menos de aproximadamente 7%, menos de aproximadamente 6% o menos de aproximadamente 5%). En algunos casos, el anticuerpo anti-HER2 puede tener actividad ADCC que conduce a de aproximadamente 0% a aproximadamente 30% de lisis celular (p. ej., de aproximadamente 0% a aproximadamente 28%, de aproximadamente 0% a aproximadamente 25%, de aproximadamente 0% a aproximadamente 22%, de aproximadamente 0% a aproximadamente 20%, de aproximadamente 0% a aproximadamente 17%, de aproximadamente 0% a aproximadamente 15%, de aproximadamente 0% a aproximadamente 13%, de aproximadamente 0% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 0% a aproximadamente 5%, de aproximadamente 2% a aproximadamente 30%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 30%, de aproximadamente 10% a aproximadamente 30%, de aproximadamente 12% a aproximadamente 30%, de aproximadamente 15% a aproximadamente 30%, de aproximadamente 18% a aproximadamente 30%, de aproximadamente 20% a aproximadamente 30%, de aproximadamente 22% a

aproximadamente 30%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 30%, de aproximadamente 3% a aproximadamente 25%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 22%, de aproximadamente 8% a aproximadamente 20%, de aproximadamente 10% a aproximadamente 18%, o de aproximadamente 13% a aproximadamente 16% de lisis celular). Por ejemplo, el anticuerpo anti-HER2 puede tener actividad ADCC que conduce a de aproximadamente 13,9% a aproximadamente 15,7% de lisis celular. Por ejemplo, el anticuerpo anti-HER2 puede tener actividad ADCC que conduce a aproximadamente 14,8% de lisis celular.

El anticuerpo anti-HER2 puede tener menor afinidad de unión a CD16 (p. ej., con relación a otros anticuerpos anti-HER2, tales como anticuerpos anti-HER2 utilizados en terapias actuales dirigidas a HER2 aprobadas por la FDA (p. ej., trastuzumab)). El CD16 puede ser un CD16 humano. El CD16 puede ser una forma CD16a o CD16b de CD16. Por ejemplo, el CD16 puede ser un CD16a. En algunos casos, el CD16 puede tener un resto de valina en la posición 176 (p. ej., un CD16 176VAL). En algunos casos, el CD16 puede tener un resto de fenilalanina en la posición 176 (p. ej., un CD16 176Phe). En algunos casos, el anticuerpo anti-HER2 puede tener una afinidad de unión a CD16 que tiene un valor de constante de disociación en equilibrio (KD) mayor que aproximadamente  $2,5 \times 10^{-08}$  M (p. ej., mayor que aproximadamente  $2,7 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $3,0 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $3,2 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $3,5 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $4,0 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $4,3 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $4,5 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $4,8 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $5,0 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $5,3 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $5,5 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $5,7 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $6,0 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $6,2 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $6,5 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $6,8 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $7,0 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $7,3 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $7,5 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $7,8 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $8,0 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $8,2 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $8,5 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $8,7 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $9,0 \times 10^{-08}$  M, o mayor que aproximadamente  $9,5 \times 10^{-08}$  M). En algunos casos, un anticuerpo anti-HER2 puede tener una afinidad de unión a CD16 que tiene un valor de KD de aproximadamente  $2,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $10,0 \times 10^{-08}$  M (p. ej., de aproximadamente  $3,0 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $10,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $3,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $10,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $4,0 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $10,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $4,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $10,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $5,0 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $10,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $5,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $10,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $6,0 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $10,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $6,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $10,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $6,8 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $10,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $7,0 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $10,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $7,2 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $10,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $7,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $10,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $7,8 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $10,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $8,0 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $10,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $8,2 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $10,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $8,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $10,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $2,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $9,5 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $2,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $9,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $2,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $8,8 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $2,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $8,5 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $2,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $8,2 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $2,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $8,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $2,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $7,7 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $2,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $7,5 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $2,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $7,3 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $2,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $7,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $2,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $6,8 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $2,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $6,5 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $3,0 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $9,5 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $3,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $9,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $4,0 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $8,8 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $4,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $8,5 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $5,0 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $8,2 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $5,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $8,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $6,0 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $7,8 \times 10^{-08}$  M, o de aproximadamente  $6,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $7,5 \times 10^{-08}$  M). Por ejemplo, un anticuerpo anti-HER2 puede tener una afinidad de unión a CD16 (p. ej., una afinidad de unión por un CD16a 176Val humano) que tiene un valor de KD de aproximadamente  $6,9 \times 10^{-08}$  M (p. ej., aproximadamente  $6,988 \times 10^{-08}$  M) a aproximadamente  $7,1 \times 10^{-08}$  M (p. ej., aproximadamente  $7,089 \times 10^{-08}$  M). Por ejemplo, el anticuerpo anti-HER2 puede tener una afinidad de unión a CD16 (p. ej., una afinidad de unión por un CD16a 176Phe humano) que tiene un valor de KD de aproximadamente  $6,6 \times 10^{-07}$  M (p. ej., aproximadamente  $6,620 \times 10^{-07}$  M) a aproximadamente  $6,9 \times 10^{-07}$  M (p. ej., aproximadamente  $6,894 \times 10^{-07}$  M).

### Fármacos anticancerosos

Los ADC descritos en el presente documento (ADC que contienen un anticuerpo anti-HER2 y uno o más fármacos anticancerosos, como se define adicionalmente en las reivindicaciones) pueden incluir cualquier fármaco anticanceroso apropiado. En algunos casos, los uno o más fármacos anticancerosos pueden incluir una o más moléculas de un único fármaco anticanceroso (p. ej., por anticuerpo anti-HER2). En algunos casos, los uno o más fármacos anticancerosos pueden incluir una o más moléculas de dos o más fármacos anticancerosos diferentes (p. ej., por anticuerpo anti-HER2). El fármaco anticanceroso puede ser un agente citotóxico. El fármaco anticanceroso puede ser un agente antimicrotúbulos. El fármaco anticanceroso puede ser un inhibidor de la formación de microtúbulos. El fármaco anticanceroso puede ser un agente antineoplásico. El fármaco anticanceroso puede ser un compuesto natural o un fármaco sintético. Los ejemplos de fármacos anticancerosos que se pueden utilizar en los ADC descritos en el presente documento incluyen, sin limitación, auristatinas (p. ej., monometil auristatina E (MMAE) y monometil auristatina F

(MMAF)), maitansinas (p. ej., mertansina (DM1), maitansina (INN) y maitansina (USAN)), pirrolobenzodiazepinas (PBD), duocarmicinas, caliqueamicinas, SN-38, amanitina y eribulina, o derivados de los mismos.

Por ejemplo, los ADC que contienen un anticuerpo anti-HER2 y uno o más fármacos anticancerosos pueden incluir una o más moléculas de MMAE por molécula del anticuerpo.

## 5 Conectores

Los ADC descritos en el presente documento (ADC que contienen un anticuerpo anti-HER2 y uno o más fármacos anticancerosos, como se define adicionalmente en las reivindicaciones) incluyen uno o más conectores que conectan el anticuerpo anti-HER2 y los uno o más fármacos anticancerosos. Un conector puede ser cualquier conector apropiado.

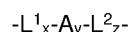
10 Puesto que una función del conector es proporcionar una conexión física entre el anticuerpo y el fármaco, puede servir como conector, en principio, una amplia variedad de grupos químicos. El conector típicamente es un grupo conector orgánico divalente en donde una valencia representa el punto de unión al anticuerpo y la otra valencia representa la unión al fármaco.

15 El conector puede ser un conector escindible o un conector no escindible. En algunos casos, el conector puede ser un conector escindible. Por ejemplo, el conector escindible puede ser escindido por una enzima tal como catepsina B. El conector puede ser un conector peptídico que incluye uno o más (p. ej., 1, 2, 3, 4 o más) aminoácidos (p. ej., aminoácidos naturales o aminoácidos no naturales). Por ejemplo, el conector peptídico puede incluir uno o más de valina y/o citrulina.

20 El conector también puede ser un conector biodegradable. Los ejemplos de conectores que se pueden utilizar en los ADC descritos en el presente documento incluyen, sin limitación, conectores dipeptídicos de valina citrulina (Conectores vc), conectores disulfuro, conectores tioéter, SPP, SMCC, SPDB, MC, butirato de acetilo y CL2A y/o hadrazona, PEG4-Mal,b-glucurónido. En algunos casos, el conector puede ser como el descrito en otra parte (véase, por ejemplo, Donaghy, 2016 mAb, 8:659-71).

25 Por ejemplo, los ADC que contienen un anticuerpo anti-HER2 y uno o más fármacos anticancerosos pueden incluir un Conector vc que conecta el anticuerpo anti-HER2 y los uno o más fármacos anticancerosos.

En algunas realizaciones, el conector tiene la fórmula:



en donde:

30  $L^1$  es un primer grupo químico divalente;  
x es 0 o 1;

Ay es un aminoácido o grupo peptídico, en donde:

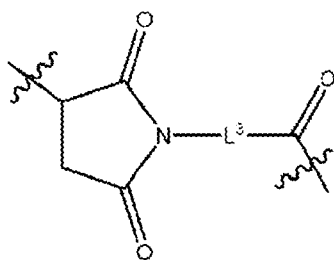
35 cada A es un grupo de aminoácidos seleccionado independientemente;  
y es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12;  
 $L^2$  es un segundo grupo químico divalente; y  
z es 0 o 1.

40  $L^1$ , cuando está presente, conecta el anticuerpo a un aminoácido o radical peptídico de fórmula  $-A_y$ . El anticuerpo se ancla a  $L^1$  a través de un grupo funcional que puede formar un enlace covalente adecuado tal como un mercapto (SH), amino, hidroxilo, carboxi o carboxilo. El grupo funcional puede estar presente en el anticuerpo como se obtuvo originalmente o ser introducido por manipulación química. Por ejemplo, los grupos mercapto se pueden generar por reducción de un enlace disulfuro intramolecular. Los grupos amino adecuados pueden incluir un grupo amino de un radical de lisina del anticuerpo.

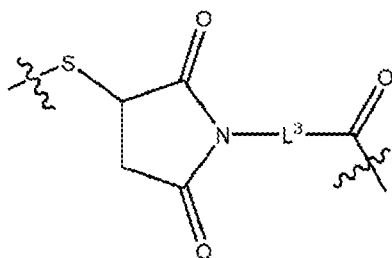
Los ejemplos de grupos  $L^1$  adecuados incluyen, p. ej. -O-, -S-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -C(O)-, -NH-, -N-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -NHC(O)-, -C(O)NH-, -O(CO)-, -C(O)O-, -O(CO)NH-, -NHC(O)O-, -O(CO)O-, -NHC(O)NH-, -O-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -S-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -S(O)-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -S(O)<sub>2</sub>-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -C(O)-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -NH(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)C(O)-, -C(O)(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)C(O)-, -C(O)(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)NH-, -O(CO)-, -C(O)O-, -O(CO)NH-, -NHC(O)O-, -O(CO)O-, -NHC(O)NH-, alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> no sustituido, heteroalquileo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> no sustituido, o alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> o heteroalquileo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> sustituido con uno o más (p. ej., 1, 2, 3, 4 o 5 sustituyentes) seleccionados independientemente del grupo que consiste en alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, halógeno, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -CN, -NO<sub>2</sub>, -C(=O)R, -OC(=O)Ar, -C(=O)OR, -C(=O)NR<sub>2</sub>, -C(=NR)NR<sub>2</sub>, -OR, -Ar, -OAr, -(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)Ar, -O(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)Ar, -OC(=O)alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(=O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -OC(=O)NR<sub>2</sub>, -NR<sub>2</sub>, -NRAr, -NR(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)Ar, -NRC(=O)R, -NRC(=O)Ar, -NRC(=O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -NRC(=O)NR<sub>2</sub>, -NRSO<sub>2</sub>R, -SR, -S(O)R, -SO<sub>2</sub>R, -OSO<sub>2</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -SO<sub>2</sub>NR<sub>2</sub>, perfluoroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -alquilen(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-OR, -O-alquilen(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-N-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)<sub>2</sub>, -P(=O)(OR)<sub>2</sub>, -OP(=O)(OR)<sub>2</sub>, oxo y sulfuro, en donde cada grupo R es hidrógeno o (alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), p. ej., metilo y en donde cada Ar es independientemente arilo o heteroarilo no sustituidos o arilo o heteroarilo sustituidos con uno o más de alquilo C<sub>1</sub>-

5 C6, alqueniilo C2-C6, alquiniilo C2-C6, halógeno, haloalquilo C1-C6, -CN, -NO<sub>2</sub>, -C(=O)R, -C(=O)OR, -C(=O)NR<sub>2</sub>,  
 -C(=NR)NR<sub>2</sub>, -OR, -OC(=O)alquilo C1-C6, -OC(=O)O-alquilo C1-C6, -OC(=O)NR<sub>2</sub>, -NR<sub>2</sub>, -NRC(=O)R,  
 -NRC(=O)O-alquilo C1-C6, -NRC(=O)NR<sub>2</sub>, -NRSO<sub>2</sub>R, -SR, -S(O)R, -SO<sub>2</sub>R, -OSO<sub>2</sub>-alquilo C1-C6, -SO<sub>2</sub>NR<sub>2</sub>,  
 10 perfluoroalquilo C1-C6, -alquilen(C2-C6)-OR, -O-alquilen(C2-C6)-N(alquilo (C1-C6)<sub>2</sub>), -P(=O)(OR)<sub>2</sub>, -OP(=O)(OR)<sub>2</sub> en  
 donde cada grupo R es hidrógeno o (alquilo C1-C6). Además, el alqueniilo C1-C10 y el heteroalqueniilo C1-C10 pueden  
 estar sustituidos con uno o más grupos oxo (C=O) y los átomos de nitrógeno y azufre del grupo heteroalqueniilo pueden  
 estar opcionalmente oxidados (p. ej., para formar S(O), -S(O)<sub>2</sub>- o N-óxido). Los grupos heteroalqueniilo adecuados  
 pueden incluir una o más unidades de 1,2-dioxi-etileno -(O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O-, donde n es un número entero, p. ej., 1, 2, 3, 4  
 o 5). El alqueniilo C1-C10 y el heteroalqueniilo C1-C10 también incluyen alqueniilo C1-C6 y heteroalqueniilo C1-C6 y alqueniilo  
 C1-C3 y heteroalqueniilo C1-C3

L<sup>1</sup> puede ser un grupo de fórmula:

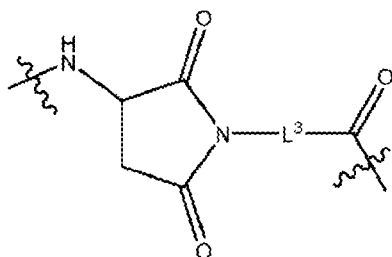


que se puede anclar al anticuerpo, por ejemplo, a través de S o NH, de modo que el radical de unión (incluyendo el grupo funcional que ancla L<sup>1</sup> al anticuerpo) tiene la fórmula:



15

o



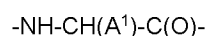
20

Los grupos L<sup>3</sup> adecuados incluyen grupos de fórmula alqueniilo C1-C10 o heteroalqueniilo C1-C10, tal como -CH<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-, y -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-. En algunas realizaciones, L<sup>3</sup> tiene la fórmula -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-.

El aminoácido o grupo peptídico, cuando está presente, es un aminoácido, o una unidad de dipéptido, tripéptido, tetrapéptido, pentapéptido, hexapéptido, heptapéptido, octapéptido, nonapéptido, decapéptido, undecapéptido o dodecapéptido.

En algunas realizaciones, cada A es un grupo de fórmula:

25



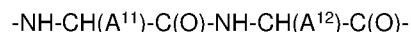
30

En algunas realizaciones, cada A<sup>1</sup> se selecciona independientemente entre hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, bencilo, p-hidroxibencilo, -CH<sub>2</sub>OH, -CH(OH)CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>COOH, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCOCH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCHO, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCOCH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCHO, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, 2-piridilmetilo, 3-piridilmetilo, 4-piridilmetilo, fenilo, ciclohexilo, 2-(fenil)etilo, 2-(4-hidroxifenil)etilo, (imidazol-4-il)metilo e indol-3-ilmetilo.

En algunas realizaciones, cada A es un radical de aminoácido seleccionado de alanina, citrulina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, metionina, asparragina, pirrolisina, prolina, glutamina, arginina, serina, treonina, selenocisteína, valina, triptófano y tirosina.

5 Los grupos aminoácido que forman A pueden ser de configuración R o S (o D o L). En algunas realizaciones, los aminoácidos pueden tener configuración natural (es decir, S o L; o R/L en el caso de la cisteína).

En algunas realizaciones, A es un dipéptido de la siguiente fórmula:



en donde A<sup>11</sup> y A<sup>12</sup> se seleccionan independientemente entre grupos de fórmula A1 como se ha definido anteriormente.

10 En algunas realizaciones A<sup>11</sup> puede ser metilo y A<sup>12</sup> puede ser (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>. En algunas realizaciones A<sup>11</sup> puede ser isopropilo y A<sup>12</sup> puede ser (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>. En algunas realizaciones A<sup>11</sup> puede ser bencilo y A<sup>12</sup> puede ser (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>. En algunas realizaciones A<sup>11</sup> puede ser indol-3-ilmetilo y A<sup>12</sup> puede ser (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>. En algunas realizaciones A<sup>11</sup> puede ser metilo y A<sup>12</sup> puede ser (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub>. En algunas realizaciones A<sup>11</sup> puede ser isopropilo y A<sup>12</sup> puede ser (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub>. En algunas realizaciones A<sup>11</sup> puede ser bencilo y A<sup>12</sup> puede ser (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub>. En algunas realizaciones A<sup>11</sup> puede ser indol-3-ilmetilo y A<sup>12</sup> puede ser (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub>.

15 L<sup>2</sup>, cuando está presente, conecta el aminoácido o radical peptídico de fórmula -A<sub>Y</sub>- a la molécula de fármaco. Los ejemplos de L<sup>2</sup> adecuados grupos incluyen,

p. ej.: -O-, -S-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -C(O)-, -NH-, -N-alquilo C1-C6, -NHC(O)-, -C(O)NH-, -O(CO)-, -C(O)O-, -O(CO)NH-, -NHC(O)O-, -O(CO)O-, -NHC(O)NH-, -O-alquilenilo C1-C6, -S-alquilenilo C1-C6, -S(O)-alquilenilo C1-C6, -S(O)<sub>2</sub>-alquilenilo C1-C6, -C(O)alquilenilo C1-C6, -NH(alquilen(C1-C6))C(O)-, -C(O)(alquilen(C1-C6))C(O)-, -C(O)(alquilen(C1-C6))NH-, -O(CO)-, -C(O)O-, -O(CO)NH-, -NHC(O)O-, -O(CO)O-, -NHC(O)NH-, alquilenilo C1-C10 no sustituido,

20 heteroalquilenilo C1-C10 no sustituido, o alquilenilo C1-C10 o heteroalquilenilo C1-C10 sustituidos con uno o más (p. ej. 1, 2, 3, 4 o 5 sustituyentes) seleccionados independientemente del grupo que consiste en alquilo C1-C6, alquilenilo C2-C6, alquilenilo C2-C6, halógeno, haloalquilo C1-C6, -CN, -NO<sub>2</sub>, -C(=O)R, -OC(=O)Ar, -C(=O)OR, -C(=O)NR<sub>2</sub>, -C(=NR)NR<sub>2</sub>, -OR, -Ar, -OAr, -(alquilen(C1-C6))Ar, -O(alquilen(C1-C6))Ar, -OC(=O)alquilo C1-C6, -OC(=O)Oalquilo C1-C6, -OC(=O)NR<sub>2</sub>, -NR<sub>2</sub>, -NRAr, -NR(alquilen(C1-C6))Ar, -NRC(=O)R, -NRC(=O)Ar, -NRC(=O)Oalquilo C1-C6, -NRC(=O)NR<sub>2</sub>, -NRSO<sub>2</sub>R, -SR, -S(O)R, -SO<sub>2</sub>R, -OSO<sub>2</sub>-alquilo C1-C6, -SO<sub>2</sub>NR<sub>2</sub>, perfluoroalquilo C1-C6, -alquilen(C2-C6)-OR, -O-alquilen(C2-C6)-N(alquilo(C1-C6))<sub>2</sub>, -P(=O)(OR)<sub>2</sub>,

30 -OP(=O)(OR)<sub>2</sub>, oxo y sulfuro, en donde cada grupo R es hidrógeno o (alquilo C1-C6), p. ej. metilo y en donde cada Ar es independientemente arilo o heteroarilo no sustituidos o arilo o heteroarilo sustituidos con uno o más de alquilo C1-C6, alquilenilo C2-C6, alquilenilo C2-C6, halógeno, haloalquilo C1-C6, -CN, -NO<sub>2</sub>, -C(=O)R, -C(=O)OR, -C(=O)NR<sub>2</sub>, -C(=NR)NR<sub>2</sub>, -OR, -OC(=O)alquilo C1-C6, -OC(=O)O-alquilo C1-C6, -OC(=O)NR<sub>2</sub>, -NR<sub>2</sub>, -NRC(=O)R, -NRC(=O)O-alquilo C1-C6, -NRC(=O)NR<sub>2</sub>, -NRSO<sub>2</sub>R, -SR, -S(O)R, -SO<sub>2</sub>R, -OSO<sub>2</sub>-alquilo C1-C6, -SO<sub>2</sub>NR<sub>2</sub>, perfluoroalquilo C1-C6, -alquilen(C2-C6)-OR, -O-alquilen(C2-C6)-N(alquilo(C1-C6))<sub>2</sub>,

35 -P(=O)(OR)<sub>2</sub>, -OP(=O)(OR)<sub>2</sub> en donde cada grupo R es hidrógeno o (alquilo C1-C6). Además, el alquilenilo C1-C10 y el heteroalquilenilo C1-C10 pueden estar sustituidos con uno o más grupos oxo (C=O) y los átomos de nitrógeno y azufre de un grupo heteroalquilenilo pueden estar opcionalmente oxidados (p. ej., para formar S(O), -S(O)<sub>2</sub>- o N-óxido). Los grupos heteroalquilenilo adecuados pueden incluir una o más unidades de 1,2-dioxetileno -(O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O-, donde n es un número entero, p. ej., 1, 2, 3, 4 o 5).

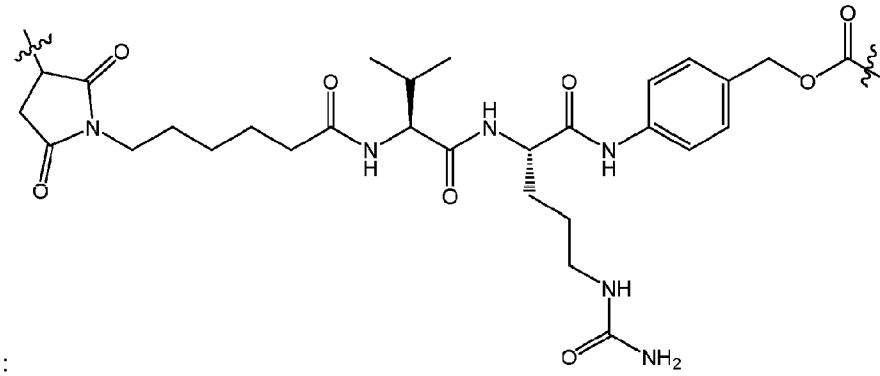
40 El alquilenilo C1-C10 y el heteroalquilenilo C1-C10 también incluyen alquilenilo C1-C6 y heteroalquilenilo C1-C6 y alquilenilo C1-C3 y heteroalquilenilo C1-C3.

En algunas realizaciones, el grupo de L<sup>2</sup> es uno que puede desintegrarse para liberar la molécula de fármaco tras la hidrólisis de un enlace entre el aminoácido o el radical peptídico -A<sub>Y</sub>- y L<sup>2</sup>.

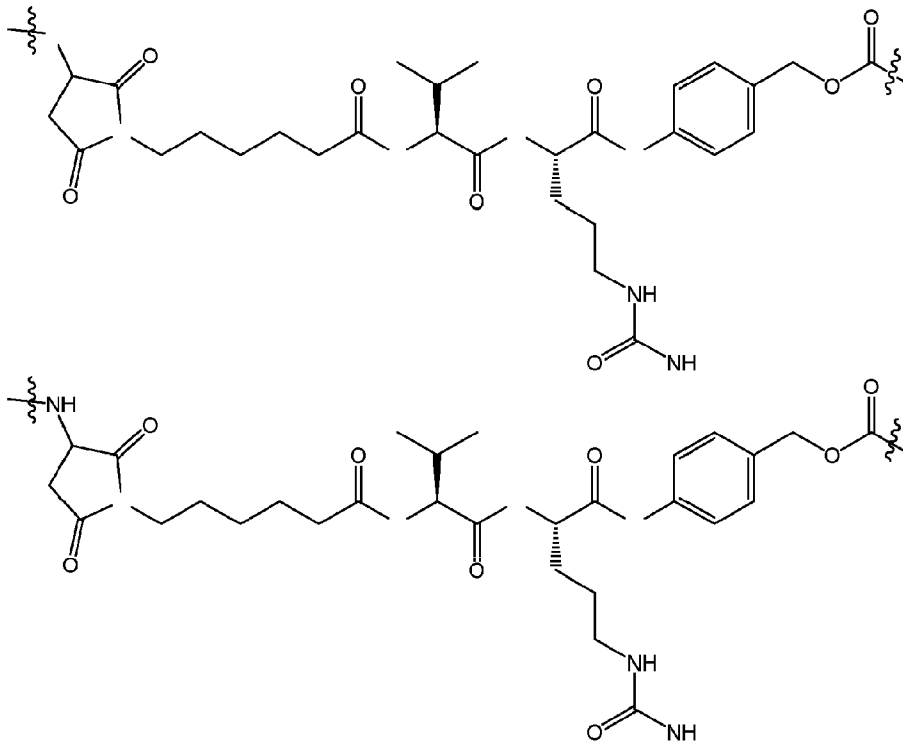
45 Alternativamente, un Compuesto de la Invención que contiene una unidad Espaciadora autoinmolante puede liberar -D sin la necesidad de una etapa de hidrólisis separada. En esta realización, --Y-- es un grupo PAB que está conectado a -W.sub.w- a través del átomo de nitrógeno amino del grupo PAB, y conectado directamente a -D a través de un grupo carbonato, carbamato o éter. Sin vincularse a la teoría, el Esquema 2 representa un posible mecanismo de liberación de fármaco de un grupo PAB que está anclado directamente a -D a través de un grupo carbamato o carbonato. Un ejemplo de tal grupo es un grupo L<sup>2</sup> para-aminobencilo de fórmula -NH-p-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>- o NH-p-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-OC(O) que puede liberar fármaco mediante una reacción de eliminación.

50

En algunas realizaciones, el conector puede tener la siguiente fórmula



o una de las fórmulas siguientes (con un grupo S o NH formando la unión entre el anticuerpo y el grupo conector):



5

En algunos casos, los ADC descritos en el presente documento (ADC que contienen un anticuerpo anti-HER2 y uno o más fármacos anticancerosos, como se define adicionalmente en las reivindicaciones) pueden incluir un anticuerpo MAB802 y aproximadamente, de promedio, 3,8 moléculas de MMAE conectadas por un Conector vc. Por ejemplo, el ADC puede ser como el descrito en el Ejemplo 1. Por ejemplo, el ADC puede ser como el mostrado en la Figura 1.

10 **ADC**

Los ADC descritos en el presente documento (ADC que contienen un anticuerpo anti-HER2 y uno o más fármacos anticancerosos (p. ej., MMAE), como se define adicionalmente en las reivindicaciones) pueden tener una menor actividad de ADCC (p. ej., con relación a otros anticuerpos anti-HER2, tales como anticuerpos anti-HER2 utilizados en las terapias dirigidas a HER2 aprobadas por la FDA actuales (p. ej., trastuzumab)). Por ejemplo, los ADC descritos en el presente documento (ADC que contienen un anticuerpo anti-HER2 y uno o más fármacos anticancerosos (p. ej., MMAE), como se define adicionalmente en las reivindicaciones) pueden tener actividad de ADCC que conduce a menor lisis celular. En algunos casos, un ADC puede tener actividad de ADCC que conduce a menos de aproximadamente 30% de lisis celular (p. ej., menos de aproximadamente 30%, menos de aproximadamente 29%, menos de aproximadamente 29%, menos de aproximadamente 28%, menos de aproximadamente 27%, menos de aproximadamente 26%, menos de aproximadamente 25%, menos de aproximadamente 24%, menos de aproximadamente 23%, menos de aproximadamente 22%, menos de aproximadamente 21%, menos de aproximadamente 20%, menos de aproximadamente 19%, menos de aproximadamente 18%, menos de aproximadamente 17%, menos de aproximadamente 16%, menos de aproximadamente 15%, menos de aproximadamente 14%, menos de aproximadamente 13%, menos de aproximadamente 12%, menos de

20

aproximadamente 11%, menos de aproximadamente 10%, menos de aproximadamente 9%, menos de aproximadamente 8%, menos de aproximadamente 7%, menos de aproximadamente 6% o menos de aproximadamente 5%). En algunos casos, el ADC puede tener actividad de ADCC que conduce a de aproximadamente 0% a aproximadamente 30% de lisis celular (p. ej., de aproximadamente 0% a aproximadamente 28%, de aproximadamente 0% a aproximadamente 25%, de aproximadamente 0% a aproximadamente 22%, de aproximadamente 0% a aproximadamente 20%, de aproximadamente 0% a aproximadamente 17%, de aproximadamente 0% a aproximadamente 15%, de aproximadamente 0% a aproximadamente 13%, de aproximadamente 0% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 0% a aproximadamente 5%, de aproximadamente 2% a aproximadamente 30%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 30%, de aproximadamente 10% a aproximadamente 30%, de aproximadamente 12% a aproximadamente 30%, de aproximadamente 15% a aproximadamente 30%, de aproximadamente 18% a aproximadamente 30%, de aproximadamente 20% a aproximadamente 30%, de aproximadamente 22% a aproximadamente 30%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 30%, de aproximadamente 1% a aproximadamente 25%, de aproximadamente 3% a aproximadamente 22%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 20%, de aproximadamente 7 a aproximadamente 18% o de aproximadamente 10 a aproximadamente 13% de lisis celular. Por ejemplo, el ADC puede tener actividad ADCC que conduce a de aproximadamente 9,9% a aproximadamente 12,7% de lisis celular. Por ejemplo, el ADC puede tener actividad ADCC que conduce a aproximadamente 11,3% de lisis celular.

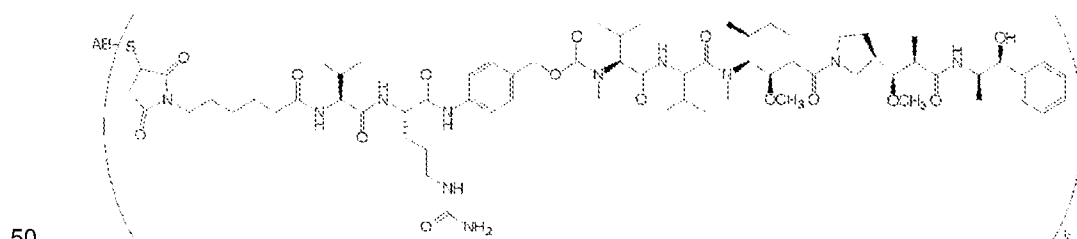
Los ADC descritos en el presente documento (ADC que contienen un anticuerpo anti-HER2 y uno o más fármacos anticancerosos (p. ej., MMAE), como se define adicionalmente en las reivindicaciones) pueden tener menor afinidad de unión a CD16 (p. ej., con relación a otros anticuerpos anti-HER2, tales como anticuerpos anti-HER2 utilizados en terapias dirigidas a HER2 aprobadas por la FDA actuales (p. ej., trastuzumab)). El CD16 puede ser un CD16 humano. El CD16 puede ser una forma CD16a o CD16b de CD16. Por ejemplo, el CD16 puede ser un CD16a. En algunos casos, el CD16 puede tener un resto de valina en la posición 176 (p. ej., un CD16 176VAL). En algunos casos, el CD16 puede tener un resto de fenilalanina en la posición 176 (p. ej., un CD16 176Phe). En algunos casos, el CD16 puede tener un resto de fenilalanina en la posición 176. En algunos casos, un ADC puede tener una afinidad de unión a CD16 que tiene un valor de KD mayor que aproximadamente  $2,5 \times 10^{-08}$  M (p. ej., mayor que aproximadamente  $2,7 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $3,0 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $3,2 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $3,5 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $4,0 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $4,3 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $4,5 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $4,8 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $5,0 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $5,3 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $5,5 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $5,7 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $6,0 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $6,2 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $6,5 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $6,8 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $2,5 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $7,0 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $7,3 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $7,5 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $7,8 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $8,0 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $8,2 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $8,5 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $8,7 \times 10^{-08}$  M, mayor que aproximadamente  $9,0 \times 10^{-08}$  M, o mayor que aproximadamente  $9,5 \times 10^{-08}$  M). En algunos casos, un ADC puede tener una afinidad de unión a CD16 que tiene un valor de KD de aproximadamente  $2,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $10,0 \times 10^{-08}$  M (p. ej., de aproximadamente  $3,0 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $10,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $3,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $10,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $4,0 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $10,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $4,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $10,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $5,0 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $10,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $5,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $10,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $6,0 \times 10^{-09}$  M a aproximadamente  $10,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $6,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $10,0 \times 10^{-09}$  M, de aproximadamente  $6,8 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $10,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $7,0 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $10,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $7,2 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $10,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $7,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $10,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $7,8 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $10,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $8,0 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $10,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $8,2 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $10,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $8,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $10,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $8,7 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $10,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $9,0 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $10,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $9,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $10,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $9,8 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $10,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $9,9 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $10,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $2,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $8,8 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $2,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $8,5 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $2,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $8,2 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $2,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $8,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $2,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $7,7 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $2,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $7,5 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $2,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $7,3 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $2,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $7,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $2,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $6,8 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $2,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $6,5 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $3,0 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $9,8 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $3,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $9,5 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $4,0 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $9,2 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $4,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $9,0 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $5,0 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $8,8 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $5,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $8,5 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $6,0 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $8,2 \times 10^{-08}$  M, de aproximadamente  $6,5 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $8,0 \times 10^{-08}$  M, o de aproximadamente  $6,8 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $7,8 \times 10^{-08}$  M). Por ejemplo, un ADC puede tener una afinidad de unión a CD16 (p. ej., una afinidad de unión por un CD16a 176Val humano) que tiene un valor de KD de aproximadamente  $8,094 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $8,465 \times 10^{-08}$  M. Por ejemplo, un ADC puede tener una afinidad de unión a CD16 (p. ej., una afinidad de unión por un CD16a de 176Phe humano) que tiene un valor de KD de aproximadamente  $7,87 \times 10^{-07}$  M a aproximadamente  $9,708 \times 10^{-07}$  M.

Los ADC descritos en el presente documento (ADC que contienen un anticuerpo anti-HER2 y uno o más fármacos anticancerosos (p. ej., MMAE), como se define adicionalmente en las reivindicaciones) pueden tener al menos una (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más) molécula de un fármaco antineoplásico (p. ej., por molécula de anticuerpo anti-HER2). En algunos casos, los ADC descritos en el presente documento pueden tener más de una molécula (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6 o más) de un fármaco anticanceroso (p. ej., por molécula de anticuerpo anti-HER2). Por ejemplo, un ADC puede tener de aproximadamente 3 moléculas a aproximadamente 8 moléculas de MMAE (p. ej., de aproximadamente 3 moléculas a aproximadamente 7 moléculas, de aproximadamente 3 moléculas a aproximadamente 6 moléculas, de aproximadamente 3 moléculas a aproximadamente 5 moléculas, de aproximadamente 3 moléculas a aproximadamente 4 moléculas, de aproximadamente 4 moléculas a aproximadamente 8 moléculas, de aproximadamente 5 moléculas a aproximadamente 8 moléculas, de aproximadamente 6 moléculas a aproximadamente 8 moléculas, de aproximadamente 7 moléculas a aproximadamente 8 moléculas, de aproximadamente 4 moléculas a aproximadamente 7 moléculas, de aproximadamente 5 moléculas a aproximadamente 6, de aproximadamente 4 moléculas a aproximadamente 5 moléculas, o moléculas de aproximadamente 6 moléculas a aproximadamente 7 moléculas de MMAE). Por ejemplo, los ADC descritos en el presente documento pueden tener de aproximadamente 3 a aproximadamente 4 moléculas de MMAE por molécula de MAB802. Por ejemplo, los ADC descritos en el presente documento pueden tener, de promedio, aproximadamente 3,8 moléculas de MMAE por molécula de MAB802. En algunos casos, los ADC descritos en el presente documento (ADC que contienen un anticuerpo anti-HER2 y uno o más fármacos anticancerosos (p. ej., MMAE), como se define adicionalmente en las reivindicaciones) pueden tener una mayor DAR (p. ej., con relación a otros ADC dirigidos a HER2, ADC actuales dirigidos a HER2 aprobados por la FDA (p. ej., T-DM1)). La DAR, como se emplea en el presente documento, se refiere al número de moléculas de fármaco anticanceroso conjugadas con un anticuerpo anti-HER2. Se entenderá que los ADC descritos en el presente documento contienen típicamente un número entero de moléculas de fármaco anticanceroso, y que se pretende que cualquier DAR proporcionada como un número racional (p. ej., sugiriendo una fracción o porción de una molécula) se refiera a un número promedio de moléculas de fármaco anticanceroso por anticuerpo anti-HER2. En algunos casos, un ADC puede tener una DAR de más de aproximadamente 3,5 (p. ej., más de aproximadamente 3,55, más de aproximadamente 3,6, más de aproximadamente 3,65, más de aproximadamente 3,7, más de aproximadamente 3,75 o más de aproximadamente 3,8). Por ejemplo, un ADC puede tener una DAR de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 8 (p. ej., de aproximadamente 4 a aproximadamente 8, de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 8, de aproximadamente 5 a aproximadamente 8, de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 8, de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8, de aproximadamente 7 a aproximadamente 8, de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 7, de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 6,5, de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 6, de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 5,5, de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 5, de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 4,5, de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 4, de aproximadamente 3,6 a aproximadamente 7, de aproximadamente 3,7 a aproximadamente 6, o de aproximadamente 3,8 a aproximadamente 5). Por ejemplo, un ADC puede tener una DAR de aproximadamente 3,8.

En algunos casos, los ADC descritos en el presente documento (ADC que contienen un anticuerpo anti-HER2 y uno o más fármacos anticancerosos, como se define adicionalmente en las reivindicaciones) pueden tener actividad de ADCC que conduce a de aproximadamente 9,9% a aproximadamente 12,7% de lisis celular (p. ej., aproximadamente 11,3% de lisis celular), pueden tener una afinidad de unión a CD16 (p. ej., una afinidad de unión por un CD16a 176Val humano) que tiene un valor de KD de aproximadamente  $8,094 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $8,465 \times 10^{-08}$  M, puede tener una afinidad de unión a CD16 (p. ej., una afinidad de unión por un CD16a de 176Phe humano) que tiene un valor de KD de aproximadamente  $7,877 \times 10^{-07}$  M a aproximadamente  $9,708 \times 10^{-17}$  M y/o puede tener una DAR de aproximadamente 3,8.

En algunos casos, los ADC descritos en el presente documento (ADC que contienen un anticuerpo anti-HER2 y uno o más fármacos anticancerosos, como se define adicionalmente en las reivindicaciones) también pueden incluir uno o más componentes adicionales. Por ejemplo, los ADC pueden incluir marcas detectables tales como, sin limitación, marcas fluorescentes (p. ej., para controlar la localización).

En algunas realizaciones, el ADC se puede representar mediante la siguiente fórmula:



en donde AB representa el anticuerpo y k representa el número de grupos conectores/fármaco unidos por molécula de anticuerpo. Para cualquier molécula de anticuerpo dada, k representa un número entero, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. Para el ADC representado en conjunto, k representa la razón fármaco/anticuerpo (es decir, el número promedio de moléculas de fármaco ancladas por anticuerpo). En algunas realizaciones, k puede estar en el intervalo

de aproximadamente 1 a aproximadamente 6, por ejemplo, aproximadamente 1, aproximadamente 1,5, aproximadamente 2, aproximadamente 2,5, aproximadamente 3, aproximadamente 3,5, aproximadamente 4, aproximadamente 4,5, aproximadamente 5, aproximadamente 5,5 o aproximadamente 6. En algunas realizaciones, k puede ser aproximadamente 3,5 o mayor, por ejemplo, aproximadamente 3,55 o mayor, aproximadamente 3,6 o mayor, aproximadamente 3,7 o mayor, aproximadamente 3,75 o mayor, o aproximadamente 3,8 o mayor.

**Usos terapéuticos**

Este documento también proporciona usos terapéuticos de los ADC descritos en el presente documento (ADC que contienen un anticuerpo anti-HER2 (p. ej., MAB802) y uno o más fármacos anticancerosos), como se define adicionalmente en las reivindicaciones. Específicamente, se puede utilizar un ADC que contiene un anticuerpo anti-HER2 y uno o más fármacos anticancerosos para tratar un mamífero (p. ej., un ser humano) que tiene un cáncer que expresa HER2.

Como se emplea en el presente documento, los términos "tratar" o "tratando" se refieren a uno o más de (1) prevenir una enfermedad; por ejemplo, prevenir una enfermedad, afección o trastorno en un individuo que puede estar predispuesto a la enfermedad, afección o trastorno pero que aún no experimenta o muestra la patología o sintomatología de la enfermedad; (2) inhibir una enfermedad; por ejemplo, inhibir una enfermedad, afección o trastorno en un individuo que está experimentando o mostrando la patología o sintomatología de la enfermedad, afección o trastorno (es decir, detener el desarrollo adicional de la patología y/o sintomatología); y (3) mejorar una enfermedad; por ejemplo, mejorar una enfermedad, afección o trastorno en un individuo que está experimentando o mostrando la patología o sintomatología de la enfermedad, afección o trastorno (es decir, revertir la patología y/o sintomatología) por ejemplo, disminuir la gravedad de la enfermedad o reducir o aliviar uno o más síntomas de la enfermedad.

En algunos casos, tratar el cáncer puede incluir reducir el número, frecuencia o gravedad de uno o más (p. ej., dos, tres, cuatro o cinco) signos o síntomas de un cáncer en un mamífero que tiene un cáncer. Por ejemplo, el tratamiento puede reducir la gravedad de un cáncer (p. ej., puede reducir el número de células cancerosas en y/o reducir el tamaño (p. ej., el volumen) de un tumor), reducir la progresión del cáncer (p. ej., puede reducir o eliminar el crecimiento tumoral y/o la metástasis o puede reducir el potencial proliferativo, migratorio y/o invasivo de las células cancerosas) y/o reducir el riesgo de recurrencia de un cáncer en un mamífero que tiene cáncer. Por ejemplo, la administración de uno o más ADC que contienen un anticuerpo anti-HER2 (p. ej., MAB802) y uno o más fármacos anticancerosos (p. ej., MMAE), como se define adicionalmente en las reivindicaciones, a un mamífero (p. ej., un ser humano) que tiene un cáncer que expresa HER2 puede inhibir el crecimiento de células cancerosas de células cancerosas que expresan HER2. Por ejemplo, la administración de uno o más ADC que contienen un anticuerpo anti-HER2 (p. ej., MAB802) y uno o más fármacos anticancerosos (p. ej., MMAE), como se define adicionalmente en las reivindicaciones, a un mamífero (p. ej., un ser humano) que tiene un cáncer que expresa HER2 puede reducir el volumen tumoral de un tumor que expresa HER2.

Cualquier mamífero apropiado que tenga un cáncer que expresa HER2 puede tratarse como se describe en el presente documento. Por ejemplo, los seres humanos y otros primates tales como monos que tienen un cáncer que expresa HER2 se pueden tratar con uno o más ADC descritos en el presente documento (ADC que contienen un anticuerpo anti-HER2 (p. ej., MAB802) y uno o más fármacos anticancerosos, como se define adicionalmente en las reivindicaciones) para reducir un síntoma del cáncer, y/o para reducir el número de células cancerosas presentes dentro del mamífero dentro del ser humano u otro primate. En algunos casos, perros, gatos, caballos, vacas, cerdos, ovejas, ratones y ratas que tienen un cáncer que expresa HER2 se pueden tratar con uno o más ADC que contienen un anticuerpo anti-HER2 (p. ej., MAB802) y uno o más fármacos anticancerosos como se define adicionalmente en las reivindicaciones.

Cuando se trata un mamífero (p. ej., un ser humano) que tiene un cáncer que expresa HER2 como se describe en el presente documento, el cáncer que expresa HER2 puede ser cualquier cáncer que expresa HER2 apropiado. En algunos casos, el cáncer que expresa HER2 puede ser un cáncer refractario (p. ej., un cáncer que es resistente (p. ej., no responde a) un fármaco anticanceroso). Por ejemplo, el cáncer tratado como se describe en el presente documento puede ser un cáncer resistente a trastuzumab. Por ejemplo, un cáncer tratado como se describe en el presente documento puede ser un cáncer resistente a T-DM1. En algunos casos, un cáncer que expresa HER2 puede ser un cáncer recidivante (p. ej., metastásico). Los ejemplos de cánceres que expresan HER2 que pueden tratarse como se describe en el presente documento incluyen, sin limitación, cánceres de mama, cánceres gástricos, cánceres de pulmón, cánceres de colon, cánceres de ovario, cánceres de vejiga, cánceres cervicales, cánceres de próstata, cánceres de tiroides, carcinomas de cabeza y cuello, glioblastomas y sarcomas. Por ejemplo, el cáncer que expresa HER2 puede ser un cáncer de mama que expresa HER2 (p. ej., un cáncer de mama resistente a trastuzumab y/o T-DM1). Por ejemplo, el cáncer que expresa HER2 puede ser un cáncer gástrico que expresa HER2 (p. ej., un cáncer gástrico resistente a trastuzumab y/o T-DM1).

En algunos casos, se puede evaluar un mamífero que tiene cáncer para determinar si el cáncer es un cáncer que expresa HER2. Se puede utilizar cualquier método apropiado para determinar si un cáncer es un cáncer que expresa HER2 o no. Por ejemplo, la expresión de HER2 se puede determinar utilizando, por ejemplo, un ensayo de transcripción tal como RT-PCR y/o un ensayo de traducción tal como un análisis de transferencia Western.

Una vez identificado que tiene un cáncer que expresa HER2 (p. ej., un cáncer de mama que expresa HER2 o un cáncer gástrico que expresa HER2), se pueden administrar a un mamífero uno o más ADC descritos en el presente documento (ADC que contienen un anticuerpo anti-HER2 (p. ej., MAB802) y uno o más fármacos anticancerosos, como se define adicionalmente en las reivindicaciones).

- 5 Se pueden administrar uno o más ADC descritos en el presente documento (ADC que contienen un anticuerpo anti-HER2 (p. ej., MAB802) y uno o más fármacos anticancerosos, como se define adicionalmente en las reivindicaciones) a un mamífero que tiene un cáncer como terapia combinada con uno o más agentes adicionales utilizados para tratar un cáncer. Por ejemplo, se pueden administrar uno o más ADC descritos en el presente documento a un mamífero combinados con uno o más tratamientos anticancerosos (p. ej., terapia de radiación, quimioterapia, otras terapias dirigidas, terapia hormonal, inhibidores de la angiogénesis y/o inhibidores de puntos de control inmunitario tales como anticuerpos anti-PD-1, anticuerpos anti-PD-L1, anticuerpos anti-CTLA4 y anticuerpos anti-TIGIT). En los casos donde se utiliza una composición que incluye uno o más ADC descritos en el presente documento con agentes adicionales para tratar un cáncer, los uno o más agentes adicionales se pueden administrar al mismo tiempo o independientemente. En algunos casos, se puede administrar una composición que incluye uno o más ADC descritos en el presente documento en primer lugar, y administrar los uno o más agentes adicionales en segundo lugar, o viceversa.

### Composiciones y administración

- 20 Se pueden formular uno o más ADC descritos en el presente documento (ADC que contienen un anticuerpo anti-HER2 (p. ej., MAB802) y uno o más fármacos anticancerosos, como se define adicionalmente en las reivindicaciones) en una composición (p. ej., una composición farmacéuticamente aceptable) para la administración a un mamífero que tiene un cáncer que expresa HER2. Por ejemplo, se puede formular una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más ADC descritos en el presente documento en una composición adecuada para la administración a un mamífero que tiene un cáncer que expresa HER2 para tratar al mamífero. Una composición puede ser una composición estéril. Se puede formular una composición para administración en cualquier forma apropiada incluyendo, sin limitación, soluciones, suspensiones, formulaciones de liberación sostenida, comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos y gránulos.

- 25 Una composición que contiene uno o más ADC descritos en el presente documento (ADC que contienen un anticuerpo anti-HER2 (p. ej., MAB802) y uno o más fármacos anticancerosos, como se define adicionalmente en las reivindicaciones) puede incluir una pluralidad (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 25, 50, 75, 100 o más) de productos conjugados de anticuerpo-fármaco. En algunos casos, los ADC descritos en el presente documento dentro de una composición que contiene una pluralidad de ADC pueden contener el mismo número de moléculas de uno o más fármacos anticancerosos. En algunos casos, los ADC descritos en el presente documento dentro de una composición que contiene una pluralidad de ADC pueden contener diferentes números de moléculas de uno o más fármacos anticancerosos. En algunos casos, la composición puede tener una mayor DAR (p. ej., con relación a otros ADC dirigidos a HER2, tales como los ADC actuales dirigidos a HER2 aprobados por la FDA (p. ej., T-DM1)). En algunos casos, la composición puede tener una DAR mayor que aproximadamente 3,5 (p. ej., mayor que aproximadamente 3,55, mayor que aproximadamente 3,6, mayor que aproximadamente 3,65, mayor que aproximadamente 3,7, mayor que aproximadamente 3,75 o mayor que aproximadamente 3,8). Por ejemplo, una composición puede tener una DAR de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 8 (p. ej., de aproximadamente 4 a aproximadamente 8, de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 8, de aproximadamente 5 a aproximadamente 8, de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 8, de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8, de aproximadamente 7 a aproximadamente 8, de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 7, de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 6,5, de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 6, de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 5,5, de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 5, de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 4,5, de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 4, de aproximadamente 3,6 a aproximadamente 7, de aproximadamente 3,7 a aproximadamente 6, o de aproximadamente 3,8 a aproximadamente 5). Por ejemplo, un ADC puede tener una DAR de aproximadamente 3,8.

- 50 En algunos casos, una composición que contiene uno o más ADC descritos en el presente documento (ADC que contienen un anticuerpo anti-HER2 (p. ej., MAB802) y uno o más fármacos anticancerosos, como se define adicionalmente en las reivindicaciones) puede ser una composición farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más ADC descritos en el presente documento puede formularse en una composición farmacéuticamente aceptable adecuada para la administración a un mamífero que tiene un cáncer que expresa HER2 para tratar al mamífero. Como se emplea en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del criterio médico razonable, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, en consonancia con una razón beneficio/riesgo razonable. Por ejemplo, se puede formular una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más antagonistas de los canales de calcio de tipo T junto con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables (p. ej., aditivos, diluyentes y/o excipientes). El portador farmacéuticamente aceptable puede ser un material sólido, semisólido o líquido. El portador farmacéuticamente aceptable puede ser cualquier compuesto que actúe como vehículo, portador o medio para uno o más antagonistas de los canales de calcio de tipo T. Los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables que se pueden utilizar en una composición farmacéuticamente aceptable descrita en el presente documento incluyen, sin limitación, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, tales como albúmina sérica humana, sustancias tampón tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio,

mezclas parciales de glicéridos de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato disódico, hidrogenofosfato potásico, cloruro sódico, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias con base de celulosa, polietilenglicol tal como vitamina E TPGS, carboximetilcelulosa sódica, poliacrilatos, ceras, polímeros de bloques de polietileno-polióxipropileno y grasa de lana.

- 5 Se puede formular una composición (p. ej., una composición farmacéutica) que contiene uno o más ADC descritos en el presente documento (ADC que contienen un anticuerpo anti-HER2 (p. ej., MAB802) y uno o más fármacos anticancerosos, como se define adicionalmente en las reivindicaciones) para la administración en cualquier forma apropiada. La composición descrita en la presente memoria puede estar en forma sólida o en forma líquida. En algunos casos, la composición farmacéuticamente aceptable que contiene uno o más ADC descritos en el presente documento
- 10 puede ser una composición de liberación sostenida. Los ejemplos de formas en donde se puede formular una composición descrita en el presente documento incluyen, sin limitación, soluciones, suspensiones, comprimidos, cápsulas (p. ej., cápsulas de gelatina blanda o cápsulas de gelatina dura), píldoras, polvos, gránulos, pastillas, sobres, sellos, elixires, emulsiones, jarabes, aerosoles (p. ej., aerosoles sólidos o aerosoles líquidos) y pomadas. En algunos casos, la composición farmacéuticamente aceptable que contiene uno o más ADC descritos en el presente documento
- 15 puede ser una composición estéril. Por ejemplo, la composición farmacéuticamente aceptable que contiene uno o más ADC descritos en el presente documento puede incluir soluciones inyectables estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que vuelven la composición isotónica con la sangre del receptor pretendido; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes.
- 20 Se puede diseñar una composición (p. ej., una composición farmacéutica) que contiene uno o más ADC descritos en el presente documento (ADC que contienen un anticuerpo anti-HER2 (p. ej., MAB802) y uno o más fármacos anticancerosos, como se define adicionalmente en las reivindicaciones) para cualquier tipo de administración apropiado (p. ej., administración tópica, oral, parenteral o inhalada). Cuando se administra mediante administración tópica, la composición farmacéutica que contiene uno o más ADC descritos en el presente documento (ADC que contienen un anticuerpo anti-HER2 (p. ej., MAB802) y uno o más fármacos anticancerosos, como se define adicionalmente en las reivindicaciones) se puede administrar por vía transdérmica, epidérmica, oftálmica y/o a las membranas mucosas (p. ej., por vía intranasal, vaginal y rectal). Cuando se administra mediante administración tópica, la composición farmacéutica que contiene uno o más CAF descritos en el presente documento puede estar en forma de, por ejemplo, parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizaciones, líquidos y polvos.
- 30 Cuando se administra mediante administración oral, la composición farmacéutica que contiene uno o más ADC descritos en el presente documento (ADC que contienen un anticuerpo anti-HER2 (p. ej., MAB802) y uno o más fármacos anticancerosos, como se define adicionalmente en las reivindicaciones) puede estar en forma, por ejemplo, de una píldora, comprimido o cápsula. Cuando se administra mediante administración parenteral, la composición farmacéutica que contiene uno o más ADC descritos en el presente documento (ADC que contienen un anticuerpo anti-HER2 (p. ej., MAB802) y uno o más fármacos anticancerosos, como se define adicionalmente en las reivindicaciones) se puede administrar mediante inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intracraneal (p. ej. intratecal o intraventricular). Cuando se administra mediante administración parenteral, la composición farmacéutica que contiene uno o más ADC descritos en el presente documento puede estar en forma, por ejemplo, de líquidos, geles, gotas, supositorios, pulverizaciones y polvos. Cuando se administra mediante
- 40 administración parenteral, la composición farmacéutica que contiene uno o más ADC descritos en el presente documento se puede administrar en forma de una o más dosis de bolo o se puede administrar mediante una perfusión continua (p. ej., mediante una bomba). Cuando se administra mediante administración inhalada, la composición farmacéutica que contiene uno o más ADC descritos en el presente documento (ADC que contienen un anticuerpo anti-HER2 (p. ej., MAB802) y uno o más fármacos anticancerosos, como se define adicionalmente en las reivindicaciones) puede ser pulmonar. Por ejemplo, la administración de la composición farmacéutica que contiene uno o más ADC descritos en el presente documento puede incluir la inhalación o insuflación de un líquido (p. ej., un aerosol) y/o un sólido (p. ej., polvo). Cuando se administra mediante administración inhalada, la composición farmacéutica que contiene uno o más ADC descritos en el presente documento puede estar en forma, por ejemplo, de líquidos, geles y polvos.
- 50 Se puede administrar una composición (p. ej., una composición farmacéutica) que contiene uno o más ADC descritos en el presente documento (ADC que contienen un anticuerpo anti-HER2 (p. ej., MAB802) y uno o más fármacos anticancerosos, como se define adicionalmente en las reivindicaciones) local o sistémicamente. Por ejemplo, se puede administrar la composición que contiene uno o más ADC descritos en el presente documento sistémicamente mediante una administración oral o mediante inyección a un mamífero (p. ej., un ser humano).
- 55 Las dosis eficaces de uno o más ADC descritos en el presente documento (ADC que contienen un anticuerpo anti-HER2 (p. ej., MAB802) y uno o más fármacos anticancerosos, como se define adicionalmente en las reivindicaciones) pueden variar dependiendo de la gravedad del cáncer, la vía de administración, la edad y el estado de salud general del sujeto, el uso de excipientes, la posibilidad de uso conjunto con otros tratamientos terapéuticos tal como el uso de otros agentes y el criterio del médico a cargo.
- 60 La cantidad eficaz de una composición que contiene uno o más ADC descritos en el presente documento (ADC que contienen un anticuerpo anti-HER2 (p. ej., MAB802) y uno o más fármacos anticancerosos, como se define adicionalmente en las reivindicaciones) puede ser cualquier cantidad que reduzca la gravedad de un cáncer, reduzca

la progresión del cáncer y/o reduzca el riesgo de reaparición de un cáncer en el mamífero sin producir toxicidad significativa para el mamífero. Una cantidad eficaz de un ADC que contiene un anticuerpo anti-HER2 (p. ej., MAB802) y uno o más fármacos anticancerosos, como se define adicionalmente en las reivindicaciones, puede ser de aproximadamente 0,6 mg por kg de peso corporal (mg/kg) a aproximadamente 10 mg/kg (p. ej., de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 2 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 3 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 4 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 6 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 7 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 8 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 9 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 0,6 mg/kg a aproximadamente 9 mg/kg, de aproximadamente 0,6 mg/kg a aproximadamente 8 mg/kg, de aproximadamente 0,6 mg/kg a aproximadamente 7 mg/kg, de aproximadamente 0,6 mg/kg a aproximadamente 6 mg/kg, de aproximadamente 0,6 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, de aproximadamente 0,6 mg/kg a aproximadamente 4 mg/kg, de aproximadamente 0,6 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, de aproximadamente 0,8 mg/kg a aproximadamente 9 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 8 mg/kg, de aproximadamente 1,5 mg/kg a aproximadamente 7 mg/kg, de aproximadamente 2 mg/kg a aproximadamente 6 mg/kg, de aproximadamente 3 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 4 mg/kg, de aproximadamente 1,5 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, de aproximadamente 2 mg/kg a aproximadamente 4 mg/kg, o de aproximadamente 2 mg/kg a aproximadamente 6 mg/kg). Por ejemplo, la cantidad eficaz de un ADC que contiene un anticuerpo MAB802 y una o más moléculas de MMAE puede ser de aproximadamente 1,8 mg/kg a aproximadamente 2,4 mg/kg. Por ejemplo, la cantidad eficaz de un ADC que contiene un anticuerpo MAB802 y una o más moléculas de MMAE puede ser de aproximadamente 2 mg/kg. Por ejemplo, la cantidad eficaz de un ADC que contiene un anticuerpo MAB802 y una o más moléculas de MMAE puede ser de aproximadamente 3 mg/kg. La cantidad eficaz puede permanecer constante o se puede ajustar como una escala deslizante o dosis variable dependiendo de la respuesta del mamífero al tratamiento. Diversos factores pueden influir en la cantidad eficaz real utilizada para una aplicación concreta. Por ejemplo, la frecuencia de administración, la duración del tratamiento, el uso de múltiples agentes de tratamiento, la vía de administración y la gravedad de la afección (p. ej. un cáncer) puede requerir un aumento o disminución en la cantidad eficaz real administrada.

La frecuencia de administración de una composición que contiene uno o más ADC descritos en el presente documento (ADC que contienen un anticuerpo anti-HER2 (p. ej., MAB802) y uno o más fármacos anticancerosos, como se define adicionalmente en las reivindicaciones) puede ser cualquier frecuencia que reduzca la gravedad de un cáncer, reduzca la progresión del cáncer y/o reduzca el riesgo de reaparición de un cáncer en el mamífero sin producir toxicidad significativa para el mamífero. Por ejemplo, la frecuencia de administración puede ser de aproximadamente una vez a la semana a aproximadamente una vez cada cuatro semanas, de aproximadamente una vez cada dos semanas a aproximadamente una vez cada tres semanas, o de aproximadamente una vez cada tres semanas a aproximadamente una vez cada cuatro semanas. En algunos casos, la frecuencia de administración puede ser aproximadamente una vez cada tres semanas. La frecuencia de administración puede permanecer constante o puede ser variable durante la duración del tratamiento. El curso de tratamiento con una composición que contiene uno o más ADC descritos en el presente documento puede incluir períodos de reposo. Por ejemplo, se puede administrar diariamente una composición que contiene uno o más ADC descritos en el presente documento durante un período de dos semanas seguido de un período de reposo de dos semanas, y tal régimen se puede repetir múltiples veces. Al igual que con la cantidad eficaz, pueden influir diversos factores en la frecuencia de administración real utilizada para una aplicación concreta. Por ejemplo, la cantidad eficaz, la duración del tratamiento, el uso de múltiples agentes de tratamiento, la vía de administración y la gravedad del cáncer que expresa HER2 pueden requerir un aumento o disminución en la frecuencia de administración.

La duración eficaz para administrar una composición que contiene uno o más ADC descritos en el presente documento (ADC que contienen un anticuerpo anti-HER2 (p. ej., MAB802) y uno o más fármacos anticancerosos, como se define adicionalmente en las reivindicaciones) puede ser cualquier duración que reduzca la gravedad de un cáncer, reduzca la progresión del cáncer y/o reduzca el riesgo de reaparición de un cáncer en el mamífero sin producir toxicidad significativa para el mamífero. Por ejemplo, la duración eficaz puede variar de algunos días a varias semanas, meses o años. En algunos casos, la duración eficaz para el tratamiento de un cáncer puede variar de aproximadamente un mes a aproximadamente 10 años. Por ejemplo, la duración eficaz puede incluir cualquier número apropiado de administraciones (p. ej., ciclos de tratamiento) de una composición que contiene uno o más ADC descritos en el presente documento. En algunos casos, la duración eficaz para el tratamiento de un cáncer puede incluir ocho administraciones (p. ej., ciclos de tratamiento) de una composición que contiene uno o más ADC descritos en el presente documento. En la duración eficaz real utilizada para un tratamiento particular pueden influir múltiples factores. Por ejemplo, la duración eficaz puede variar con la frecuencia de administración, la cantidad eficaz, el uso de múltiples agentes de tratamiento, la vía de administración y la gravedad de la afección que se esté tratando.

En algunos casos, se puede realizar el seguimiento del cáncer que expresa HER2 presente en un mamífero. Por ejemplo, se puede realizar el seguimiento del tamaño de un tumor presente dentro de un mamífero, el número de células cancerosas presentes dentro de un mamífero, y/o la gravedad de uno o más síntomas relacionados con el cáncer que se está tratando. Se puede utilizarse cualquier método apropiado para determinar si se reduce o no el número de células cancerosas presentes dentro de un mamífero. Por ejemplo, se pueden utilizar técnicas de generación de imágenes para evaluar el número de células cancerosas presentes en un mamífero.

La composición que contiene uno o más ADC descritos en el presente documento (ADC que contienen un anticuerpo anti-HER2 (p. ej., MAB802) y uno o más fármacos anticancerosos, como se define adicionalmente en las reivindicaciones) se puede combinar con material de envasado y configurarse en un kit. El material de envasado incluido en un kit puede contener instrucciones o una etiqueta que describa cómo se puede utilizar la composición para tratar un mamífero (p. ej., un ser humano) que tiene un cáncer que expresa HER2 tal como se describe en el presente documento.

La invención se describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos.

**EJEMPLOS**

**Ejemplo 1: Preparación de MRG002**

**10 Preparación de MAB802**

MAB802 es una IgG1 recombinante humanizada con una masa molar esperada promedio a 145.423 Da. Se desarrolló basándose en la misma secuencia de aminoácidos que trastuzumab con fucosilación elevada (menor afucosilación) y menor actividad ADCC según el diseño de la molécula MRG002.

15 Las secuencias de la cadena ligera (SEC ID NO: 4) y las secuencias de la cadena pesada (SEC ID NO: 9) de MAB802 fueron codificadas en plásmidos de expresión y fueron expresadas por células CHO cotransfectadas de forma estable con estos plásmidos. La subclonación posterior mediante dilución limitante produjo una línea celular con productividad específica relativamente alta, buenas características de crecimiento y calidad de producto deseada, y se utilizó para producir el banco de células primario (BCP), del que se derivaron el banco de células maestro (BCM) y el banco de células de trabajo (BCT).

20 La fabricación de MAB802 se inició descongelando un vial del BCT que contenía células CHO que expresaban el anticuerpo monoclonal MAB802. Las células se expandieron seriadamente en recipientes de tamaño creciente hasta un biorreactor de producción de 250 L. Las células se recogieron y el MAB802 se purificó mediante cromatografía de tres etapas, seguido de una etapa de nanofiltración para eliminar cualquier agente viral adventicio potencial. El conjunto se concentró después y el tampón se cambió a un tampón de formulación mediante una etapa de ultrafiltración/diafiltración. La masa de MAB802 purificado y formulado se filtró, se introdujo en botellas y se almacenó.

La caracterización de MAB802 incluyó estudios de las características estructurales y propiedades fisicoquímicas del anticuerpo, incluyendo estructura primaria, secundaria y de orden superior, modificaciones postraduccionales, bioactividad *in vitro*, pureza e impurezas.

30 Los pesos moleculares del anticuerpo intacto, la cadena ligera y la cadena pesada estaban en línea con el valor teórico; la secuencia de aminoácidos era compatible con la secuencia teórica.

35 Las modificaciones postraduccionales se evaluaron utilizando procedimientos de análisis de glicosilación. Los glicanos se liberaron del mAb mediante PNGasa F, y se derivatizaron con el agente fluorescente 2-AB. Los glicanos derivatizados se analizaron con HPLC de fase normal. Cada fracción de glicano se separó y se cuantificó por su área de pico. En la Figura 2B se muestra un cromatograma de fluorescencia representativo. Las modificaciones postraduccionales fueron compatibles entre lotes, y la afucosilación fue significativamente menor que la de Herceptin® (Tabla 1).

**Tabla 1.1: Porcentaje de N-glicano de MAB802 y Herceptin®**

Tipo de N-glicano	Lote 1 de Herceptin	Lote 2 de Herceptin	Lote 3 de Herceptin	Lote 1 de MAB802	Lote 2 de MAB802	Lote 3 de MAB802
G0F-GlcNAc	1,04	0,78	0,71	0,43	0,49	0,43
G0	5,18	5,05	5,1	0,3	0,29	0,29
G0F	40,9	38,98	36,92	52,43	53,44	50,52
Man5	4,26	3,71	2,34	0,51	0,55	0,47
G1	2,62	2,67	3,22	0,35	0,36	0,39
G1F	34,98	36,82	39,54	36,07	36,15	38,41
G2F	6,43	7,21	8,3	6,18	6,03	6,84
Otros	4,59	4,78	3,87	3,73	2,69	2,65

**Tabla 1.2: Comparación de los niveles de afucosilación de MAB802 y Herceptin®**

	Lote 1 de MAB802	Lote 2 de MAB802	Lote 3 de MAB802	Lote 1 de Herceptin	Lote 2 de Herceptin	Lote 3 de Herceptin
% de afucosilación	2,56	2,27	1,86	15,60	15,17	12,57

**Tabla 1.3: Comparación de los niveles de afucosilación de MAB802 y Herceptin®**

	MAB802	Herceptin®
Afucosilación (%)*	2,23	14,45

Nota: \* Valor medio de tres lotes

5 MAB802 mostró una actividad ADCC significativamente menor que la de Herceptin® (Figura 4), que está de acuerdo con la menor afinidad de unión a CD16 de MAB802 en comparación con Herceptin®.

**Preparación de MRG002**

MRG002 es un producto conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) compuesto por tres componentes: el anticuerpo monoclonal anti-HER2 (MAB802), el Conector vc y un derivado de auristatina MMAE (Figura 1). Cada molécula de MRG002 porta, de promedio, 3,8 MMAE.

10 Se sometieron a cambio de tampón aproximadamente 10 mg de anticuerpo MAB802 a tampón reductor utilizando diafiltración y se determinó la concentración de proteína utilizando A<sub>280</sub>. Se añadió DTT reductor al anticuerpo a una razón molar de 2:1 y la mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas con mezcla constante. Después, el anticuerpo parcialmente reducido se cambió a un tampón de conjugación con un dispositivo de ultrafiltración de 30 KD (15 mL de capacidad) y la concentración de proteína se determinó mediante A<sub>280</sub>. Se aplicaron muestras de 10 µl para determinar el número promedio de tiol libre por anticuerpo con el ensayo de Ellman.

Se utilizó la siguiente fórmula para calcular la concentración molar de tiol libre:

$$C_{\text{tiol}} = \frac{A_{412} \times 112}{b \times 24150} \text{ (M)}$$

donde b es la longitud de la trayectoria óptica de la cubeta (normalmente 1 cm).

20 El número medio de tioles libres por anticuerpo se calculó basándose en la concentración molar del anticuerpo y el tiol libre.

25 Se preparó una solución que contenía un producto conjugado de fármaco-conector de MMAE conectado a través de un dipéptido de valina-citrulina (vcMMAE) en estado puro en DMSO y se añadió al anticuerpo reducido a una razón molar de 1:1 respecto al tiol libre, la composición se mezcló y la mezcla resultante se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con mezcla constante. Se añadió N-acetil-L-cisteína a la mezcla de reacción a una razón molar de 20:1 a vcMMAE, se mezcló la composición y la mezcla resultante se incubó durante 5 minutos. Por último, la mezcla se purificó y se cambió el tampón a un tampón de formulación utilizando un dispositivo de ultrafiltración de 30 KD (15 mL de capacidad) para obtener el producto acabado, que después se almacenó a ≤-60°C.

**Determinación de la relación fármaco/anticuerpo**

30 La razón fármaco/anticuerpo (DAR) de los lotes de MRG002 preparados se determinó mediante el perfil de HIC-HPLC (Figura 3). Se realizó HIC-HPLC como se describe en otra parte (véase, p. ej., Ouyang, "Capítulo 17: Drug-to-Antibody Ratio (DAR) and Drug Load Distribution by Hydrophobic Interaction Chromatography and Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography" 2013; Laurent Ducry (ed.), Antibody-Drug Conjugates, Methods in Molecular Biology, vol. 1045; Springer Science+Business Media).

35

**Ejemplo 2: Afinidad de unión in vitro**

**Materiales y métodos**

Se analizaron las cinéticas de unión de MRG002, MAB802 y Herceptin® respecto a HER2-Fc inmovilizado, CD16a humano (176Val, His Tag) y CD16a humano (176Phe, His Tag) mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) utilizando Biacore T200. Se diluyeron IgG anti-his y hFc contra HER2 a 20 µg/ml y 2 µg/ml, respectivamente, en acetato de sodio (pH 4,5) y se inmovilizaron en chip sensor de la serie S CM5 (GE Healthcare) mediante acoplamiento de amina a la cantidad de aproximadamente 6000 y 300 unidades de resonancia, respectivamente; después para las células de flujo con IgG anti-his inmovilizada, se inyectaron 0,5 µg/ml de CD16a humano (176Val, His Tag) o CD16a humano (176Phe, His Tag) a un caudal de 10 µl/min para unirse a la IgG anti-his inmovilizada. Finalmente, se inyectaron diluciones seriadas de MRG002, MAB802 o Herceptin® en tampón HBS-EP (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3,0 mM, tensioactivo P20 al 0,05%, pH 7,4) en su celda de flujo correspondiente a un caudal de 30 µl/min. La velocidad de asociación (Ka), la velocidad de disociación (Kd) y la constante de equilibrio de disociación (KD) se calcularon utilizando el soporte lógico BIAevaluationtion (BIAcore) ajustando los datos con modelo de unión bivalente.

**Resultados experimentales**

Los estudios de afinidad de unión (en lo sucesivo denominada afinidad) in vitro incluyeron la afinidad de MRG002, MAB802 y el fármaco de referencia Herceptin® contra HER2 humano, así como CD16a humano (176Val; 176Phe).

Se estudió la afinidad de MRG002 por HER2 humano, por CD16a humano (176Val) y por CD16a humano (176Phe). Para comparar la diferencia de afinidad antes y después de la conjugación, así como la uniformidad entre lotes, se estudiaron 3 lotes de MRG002 y los lotes correspondientes de MAB802. Además, este estudio comparó la afinidad de Herceptin® con MRG002 y MAB802. La afinidad se midió mediante Biacore T200 utilizando la técnica de resonancia de plasmón superficial (SPR) como se describe en otra parte (véase, p. ej., Campbell et al., 2007 Biomaterials, 28(15):2380-2392).

La afinidad de unión de estas muestras al antígeno HER2 humano y a CD16a humano se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2: La afinidad de unión de MRG002, MAB802 y Herceptin® al antígeno HER2 humano y CD16a humano se midió utilizando Biacore**

	Afinidad de unión al antígeno HER2 humano, KD (M)	Afinidad de unión a CD 16a (176Val, Etiqueta His), KD (M)	Afinidad de unión a CD16a (176Phe, Etiqueta His), KD (M)
MRG002	6,625~7,503E-11	8,094~8,465E-08	7,877~9,708E-07
MAB802	7,988~9,861E-11	6,988~7,089E-08	6,620~6,894E-07
Herceptin®	1,219E-10	2,484E-08	2,535E-07

Afinidad de unión al antígeno HER2 humano: el valor de KD de los 3 lotes de MRG002 varió de 6,625x10<sup>-11</sup> a 7,503x10<sup>-11</sup> M; el valor de KD de los 2 lotes de MAB802 varió de 7,988x10<sup>-11</sup> a 9,861x10<sup>-11</sup> M; el valor de KD de Herceptin® fue 1,219x10<sup>-10</sup> M. Estos resultados mostraron que la afinidad era similar antes y después de la conjugación, y que MAB802 tiene afinidad similar a Herceptin®. La afinidad de Herceptin® con antígeno HER2 humano era compatible con la presentada en la bibliografía (véase, p. ej., Selis et al., 2016 International journal of molecular sciences, 17(4):491).

Afinidad de unión a CD16a humano (176Val, His Tag): el valor de KD de los 3 lotes de MRG002 varió de 8,094x10<sup>-08</sup> a 8,465x10<sup>-08</sup> M; el valor de KD de los 2 lotes de MAB802 varió de 6,988x10<sup>-08</sup> a 7,089x10<sup>-08</sup> M; el valor de KD de Herceptin® fue 2,484x10<sup>-08</sup> M. Estos resultados mostraron que la afinidad era similar antes y después de la conjugación. Sin embargo, la afinidad de MAB802 fue 3 veces menor que la de la Herceptin®.

La afinidad de unión a CD16a humano (176Phe, His Tag): el valor de KD de los 3 lotes de MRG002 varió de 7,877x10<sup>-07</sup> a 9,708x10<sup>-07</sup> M; el valor de KD de los 2 lotes de MAB802 varió de 6,620x10<sup>-07</sup> hasta 6,894x10<sup>-07</sup> M; el valor de KD de la Herceptin® 2,535x10<sup>-07</sup> M. Estos resultados mostraron que la afinidad era similar antes y después de la conjugación. Sin embargo, la afinidad de MAB802 fue 3 veces menor que la de la Herceptin®.

**Ejemplo 3: Actividad ADCC/CDC**

**Materiales y métodos**

Se preparó MRG002 conjugando anticuerpo monoclonal IgG1 anti-HER2 humanizado recombinante MAB802 con el conector-fármaco vcMMAE. Para evaluar si MRG002 conservaba la actividad ADCC y CDC de MAB802 (que es un tipo IgG1 de anticuerpo monoclonal), se probaron 3 lotes de MRG002 y sus correspondientes lotes de MAB802 para

determinar estas actividades.

**Resultados experimentales**

Utilizando una línea celular NK modificada por ingeniería genética como células efectoras, la línea celular SKBR3 con alta expresión de HER2 como células diana, y Herceptin® como fármaco de referencia positivo, se evaluó la actividad ADCC calculando y comparando la cantidad de lisis de células elegidas como diana (% Máx. de Lisis de Células Diana). Los resultados experimentales se muestran en la Figura 4.

Los resultados mostraron que para los 3 lotes de MRG002, la cantidad promedio de lisis de células diana osciló de 9,9% a 12,7%, y el valor medio fue de 11,3%; para los 2 lotes de MAB802, la cantidad promedio de lisis de células elegidas como diana osciló de 13,9% a 15,7%, y el valor medio fue de 14,8%; para Herceptin®, la cantidad media de lisis de células elegidas como diana osciló entre 23,94% y 33,07%, y el valor medio fue 29,49%. Estos resultados mostraron que la actividad ADCC de MRG002 era similar a la de MAB802 sin conjugación de fármacos, pero era significativamente menor que la de Herceptin®. Puesto que la actividad ADCC del anticuerpo se correlaciona positivamente con su afinidad por CD16, la actividad ADCC más baja de MRG002 y MAB802 en comparación con Herceptin® puede explicarse por la menor afinidad por CD16 (véase la Tabla 2). La cantidad de lisis de células elegidas como diana para Herceptin® era compatible con el informe previo (véase, por ejemplo, Zhao et al., 2011 Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(45):18342-18347).

Utilizando suero humano normal (NHS) al 20% como fuente de complemento, y células SKBR3 que expresaban de manera anormalmente alta HER2 como células diana, se determinó la actividad CDC midiendo la cantidad de ATP liberado en el medio de cultivo por las células diana. Se utilizó la actividad CDC de Rituxan® sobre células Ramos como control positivo, y se utilizó Herceptin® como fármaco de referencia para MAB802.

Los resultados mostraron que la actividad CDC de Rituxan® sobre células Ramos era muy evidente, con lisis de células elegidas como diana del 100%. Sin embargo, tres lotes de MRG002, tres lotes de MAB802 y Herceptin® no mostraron actividad CDC sobre células SKRB3. El resultado de que Herceptin® no tiene actividad CDC significativa sobre células SKRB-3 es compatible con la bibliografía (véanse, por ejemplo, Mamidi et al., 2013 Molecular oncology, 7(3):580-594; Petricevic et al., 2013 Journal of translational medicine, 11(1):307; y Haen et al., 2016 Oncotarget, 7(11):13013).

**Ejemplo 4: Ensayo de citotoxicidad in vitro**

**Materiales y métodos**

Las células se descongelaron y se subcultivaron durante dos generaciones. Después de la eliminación del medio de cultivo, las células se lavaron una vez con 5 mL de DPBS, se digirieron con 3 mL de tripsina, se lavaron y se resuspendieron con el medio de cultivo. Se utilizaron 0,5 mL de la suspensión celular para el recuento celular. Después del recuento celular, las células se colocaron en placas de 96 pocillos a la densidad de 8.000 células/pocillo para las células SKBR3, 20.000 células/pocillo para las células BT-474, 20.000 células/pocillo para las células NCI-N87, 24.000 células/pocillo para las células MDA-MB-453. Después de 24 horas de incubación a 37°C, se añadieron T-DM1 y MRG002 diluidos seriadamente y se incubaron con células durante 96 horas, se añadieron 20 µl/pocillo de reactivo de desarrollo de color CCK-8 y, finalmente, las DO<sub>450-650</sub> se leyeron en un espectrómetro y se realizó un ajuste de cuatro parámetros de la lectura.

Los reactivos y fuentes se enumeran en la Tabla 3 y la Tabla 4, respectivamente.

**Tabla 3: Artículo de prueba**

Nombre	Concentración	Fabricante	Núm. de Lote	Almacenamiento
MRG002	5,2 mg/ml	Shanghai Miracogen Inc.	SWD-001	≤-60°C
T-DM1	10,3 mg/ml	Roche	N-1025	≤-60°C

**Tabla 4: Línea celular y medio de cultivo**

Nombre de la línea celular	Tipo de cáncer	Nivel de expresión de Her2	Origen	Medio de cultivo
SKBR3	Cáncer de mama	alto	ATCC	5A de McCoy+FBS al 10%
BT-474	Cáncer de mama	alto	Instituto de Shanghai para Ciencias Biológicas, CAS	RPM11640+FBS al 10%

Nombre de la línea celular	Tipo de cáncer	Nivel de expresión de Her2	Origen	Medio de cultivo
MDA-MB-453	Cáncer de mama	medio	Instituto de Shanghai para Ciencias Biológicas, CAS	L-15+FBS al 10%
NCI-N87	Cáncer gástrico	alto	Medicilon	RPM11640+FBS al 10%

Nota: Medicilon = Shanghai Medicilon Inc.

## Resultados

Las  $CI_{50}$  promedio de MRG002 y T-DM1 se enumeran en la Tabla 5, aunque las curvas de inhibición del crecimiento celular *in vitro* representativas se muestran en la Figura 5.

5 **Tabla 5: Actividad antiproliferación de MRG002 y T-DM1 en diferentes líneas celulares**

Línea celular	Tipo de tumor	$CI_{50}$ Promedio de MRG002 (ng/mL)	$CI_{50}$ Promedio de T-DM1 (ng/mL)	Multiplicidad de actividad
SKBR3	Cáncer de mama	1,8±0,8	4,7±1,3	2,6
BT-474	Cáncer de mama	5,3±3,5	136,5±82,0	25,7
MDA-MB-453	Cáncer de mama	59,9±8,9	65,9±8,5	1,1
NCI-N87	Cáncer gástrico	22,7±8,8	121,2±19,9	5,3

Nota: Multiplicidad de actividad = Razón de  $CI_{50}$  Promedio de T-DM1 respecto a  $CI_{50}$  Promedio de MRG002

La Tabla 5 muestra que MRG002 fue más eficaz que T-DM1 en la inhibición del crecimiento de estas células cancerosas. Por ejemplo, MRG002 fue 25 veces más potente en la destrucción de células de cáncer de mama BT-474 y 5,3 veces más potente en la destrucción de la línea celular de cáncer gástrico NCI-N87.

## 10 Ejemplo 5: Estudio de eficacia *in vivo*

### Materiales y métodos

La actividad antitumoral de MRG002 se evaluó en dos modelos CDX (Xenoinjerto Derivado de línea Celular) y varios modelos PDX (Xenoinjerto Derivado de Paciente). Los dos modelos de CDX se establecieron con una línea celular de cáncer de mama BT-474 y una línea celular de cáncer gástrico NCI-N87, ambas de las cuales tienen un alto nivel de expresión de HER2, mientras que los modelos de PDX exhiben niveles variables de expresión de HER2.

Los modelos de CDX se establecieron mediante inoculación subcutánea de  $\sim 5 \times 10^6$  células BT-474 o NCI-N87 en ratones desnudos BALB/c. Los ratones con implantación de BT-474 recibieron  $\beta$ -estradiol en forma de gránulos colocados por vía subcutánea para promover el crecimiento tumoral. Se administraron MRG002, T-DM1 o ADC de control sin unión por vía intravenosa en un régimen q7dx2, q7dx3 o q7dx4 cuando los tumores crecieron hasta un tamaño de  $\sim 150 \text{ mm}^3$  a  $\sim 250 \text{ mm}^3$ .

Los modelos de PDX se establecieron mediante implantación subcutánea de pequeños fragmentos de cáncer de mama humano o tejidos de cáncer gástrico ( $15\text{-}30 \text{ mm}^3$ ) en ratones desnudos BALB/c. Tres días antes de la implantación, los ratones destinados a xenoinjertos de cáncer de mama recibieron  $\beta$ -estradiol en forma de gránulos colocados por vía subcutánea para promover el crecimiento tumoral. Se administró MRG002, T-DM1 o ADC de control sin unión q3wx4 por vía intravenosa cuando los tumores crecieron hasta un tamaño de  $\sim 150 \text{ mm}^3$  a  $\sim 250 \text{ mm}^3$ .

Los modelos de PDX consisten en varios modelos de cáncer gástrico y de mama, y muchos de estos modelos son resistentes a Herceptin®. En todos estos experimentos, se utilizó el fármaco ADC dirigido a HER2 disponible comercialmente T-DM1 (Kadcyla®) como fármaco de referencia para comparar la actividad antitumoral.

El tamaño de los tumores se midió dos veces por semana a lo largo del estudio. Se utilizó la siguiente fórmula para calcular el tamaño del tumor: volumen del tumor (VT) = longitud del tumor (l) x anchura del tumor (w)<sup>2</sup>/2, donde "l" y "w" representan la longitud y anchura del tumor, respectivamente; volumen tumoral relativo (VTR) = Vf/V0, donde V0 es el volumen tumoral medido antes del agrupamiento (es decir, Día 0) y Vf es el volumen tumoral medido en el último día del experimento; T/C(%) = (VTR del grupo de artículo de prueba/VTR del grupo de vehículo) x 100%; %ICT = (VT promedio del grupo de vehículos - VT promedio del grupo de artículo de prueba)/VT promedio del grupo de artículo de prueba x 100%. Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo con protocolos institucionales aprobados de cuidado de animales e instalaciones.

Se llevaron a cabo estudios exploratorios en modelos CDX BT-474 y NCI-N87 inicialmente con la información enumerada en la Tabla 6.

**Tabla 6: Información de los 2 modelos CDX utilizados en estudios de eficacia *in vivo***

Tipo de tumor	Línea celular	Expresión de HER2
Cáncer de mama ductal	BT-474	Alta
Cáncer gástrico	NCI-N87	Alta

## Resultados

### Eficacia *in vivo* en modelos de CDX de cáncer de mama y gástrico

La actividad antitumoral de MRG002 en la Figura 6 de modelo de CDX de cáncer de mama BT-474 mostró que tanto MRG002 (3 mg/kg, iv, q7dx2) como ADC-Herceptin (3 mg/kg, iv, q7dx2) causaron regresión tumoral completa en el D21 en 6/6 ratones. Mientras tanto, T-DM1 (3 mg/kg, iv, q7dx2) y mAb-2 (3 mg/kg, iv, q7dx2) tenían una tasa de inhibición tumoral de 64% y 57% en el D21, respectivamente. Todos los artículos de prueba fueron bien tolerados por los ratones portadores de tumores.

### Actividad antitumoral de MRG002 en el modelo de CDX de cáncer gástrico NCI-N87

La actividad antitumoral de MRG002 en un estudio exploratorio se muestra en la Figura 7. MRG002 (3 mg/kg, iv, q7dx3) inhibió significativamente el crecimiento de xenoinjertos NCI-N87 de alta expresión de HER2, con T/C (%) = 10,00% y %ICT = 90,07%. La T/C (%) y el %ICT de T-DM1 (3 mg/kg, iv, q7dx3) fueron de 31,72% y de 67,52%, respectivamente. La T/C (%) y el %ICT de ADC-Herceptin (3 mg/kg, iv, q7dx3) fueron de 8,28% y de 91,86%, respectivamente. La T/C (%) y el %ICT de mAb-2 (3 mg/kg, iv, q7dx3) fueron de 74,83% y de 26,28%, respectivamente. Todos los artículos de prueba fueron tolerados por los ratones portadores de tumores.

### Eficacia *in vivo* en modelos PDX de cáncer de mama y gástrico

#### Actividad antitumoral de MRG002 en cáncer de mama modelo de PDX BC#046.

BC#046 es un modelo de PDX de cáncer de mama humano resistente a Herceptin®. Los resultados (Figura 8) mostraron que en el Día 63, la T/C (%) para los grupos de dosis de MRG002 fue de 45,07% (P<0,001) a 1 mg/kg y de 0,45% (P<0,001) a 3 mg/kg, mientras que sus correspondientes %ICT fueron de 54,93% y de 99,55% la T/C (%) y el %ICT de T-DM1 a 3 mg/kg fueron de 6,56% (P<0,001) y de 93,44%, respectivamente.

Estos resultados demostraron que para el modelo de PDX humano BC#046 que expresa de manera anormalmente alta HER2, tanto MRG002 como T-DM1 a 3 mg/kg fueron eficaces en la inhibición del crecimiento tumoral, siendo MRG002 más potente que T-DM1 al mismo nivel de dosis. Todos los ratones portadores de tumor toleraron bien MRG002 y T-DM1.

#### Efecto antitumoral de MRG002 en cáncer de mama modelo de PDX BC#197

BC#197 es un modelo de PDX de cáncer de mama humano resistente a Herceptin®. Los resultados (Figura 9) mostraron que el Día 69, la T/C (%) para los grupos MRG002 fue de 14,11% (P<0,001) a 3 mg/kg y de 2,26% (P<0,001) a 10 mg/kg, mientras que sus correspondientes % ICT fueron de 85,89% y de 97,74%, con 1/8 y 5/8 de regresión tumoral completa, así como 1/8 y 3/8 de regresión tumoral parcial, respectivamente; la T/C (%) y el % ICT de T-DM1 a 10 mg/kg fueron de 63,31% (P<0,001) y de 36,69%, respectivamente.

Estos resultados demostraron que para el modelo de PDX BC#197 que expresa de manera anormalmente alta HER2, MRG002 inhibió eficazmente el crecimiento tumoral tanto a 3 mg/kg como a 10 mg/kg, mientras que T-DM1 a 10 mg/kg no mostró mucha inhibición del crecimiento tumoral. Todos los ratones portadores de tumor toleraron bien MRG002 y T-DM1.

**Efecto antitumoral de MRG002 en cáncer gástrico modelo de PDX STO#041**

STO#041 es un modelo de PDX de cáncer gástrico humano resistente a Herceptin®. Los resultados (Figura 10) mostraron que el Día 46, la T/C (%) para los grupos de dosis de MRG002 fue del 61,46% (P<0,001) a 1 mg/kg y de 32,47% (P<0,001) a 3 mg/kg, mientras que sus correspondientes % ICT fueron de 38,54% y de 67,53%, respectivamente; la T/C (%) y el % ICT de T-DM1 a 3 mg/kg fueron de 83,66% (P>0,05) y de 16,34%, respectivamente.

Estos resultados demostraron que para el modelo de PDX humano STO#041 que expresa de manera anormalmente alta HER2, sólo MRG002 a 3 mg/kg mostró inhibición tumoral significativa. Todos los ratones portadores de tumor toleraron bien MRG002 y T-DM1.

**Efecto antitumoral de MRG002 en cáncer gástrico modelo de PDX STO#053**

Los resultados (Figura 11) mostraron que el Día 45, la T/C (%) para los grupos de dosis de MRG002 fue de 47,75% (P<0,01) a 3 mg/kg y de 0,65% (P<0,001) a 10 mg/kg, mientras que sus correspondientes % ICT fueron de 52,25% y de 99,35%, respectivamente; la T/C (%) y el % ICT de T-DM1 a 10 mg/kg fueron de 19,43% (P>0,05) y de 80,57%, respectivamente.

Estos resultados demostraron que para el modelo de PDX humano STO#053 que expresa de manera anormalmente alta HER2, tanto MRG002 a 3 mg/kg como T-DM1 a 10 mg/kg mostraron inhibición significativa en el crecimiento tumoral, mientras que MRG002 a 3 mg/kg no mostró mucha inhibición en el crecimiento tumoral. Además, todos los ratones portadores de tumores toleraron bien MRG002 y T-DM1.

**Efecto antitumoral de MRG002 en cáncer gástrico modelo de PDX STO#069**

Los resultados (Figura 12) mostraron que en el Día 40, la T/C (%) para los grupos de dosis de MRG002 fue de 70,78% (P>0,05) a 1 mg/kg y de 6,02% (P<0,001) a 3 mg/kg, mientras que sus correspondientes % ICT fueron de 29,22% y de 93,98%, respectivamente; la T/C (%) y el % ICT de T-DM1 a 3 mg/kg fueron de 90,03% (P>0,05) y de 9,97%, respectivamente.

Estos resultados demostraron que para el modelo de PDX humano STO#069 que expresa de manera anormalmente alta HER2, sólo MRG002 a 3 mg/kg mostró inhibición tumoral significativa. Todos los ratones portadores de tumor toleraron bien MRG002 y T-DM1.

**Efecto antitumoral de MRG002 en cáncer gástrico modelo de PDX STO#179**

STO#179 es un modelo de PDX de cáncer gástrico humano resistente a Herceptin®. Los resultados (Figura 13) mostraron que el Día 59, la T/C (%) para los grupos de dosis de MRG002 fue de 35,20% (P<0,001) a 1 mg/kg y de 4,14% (P<0,001) a 3 mg/kg, mientras que sus correspondientes % ICT fueron de 64,80% y de 95,86%, respectivamente; la T/C (%) y el % ICT de T-DM1 a 3 mg/kg fueron de 92,56% (P>0,05) y de 7,44%, respectivamente.

Estos resultados demostraron que para el modelo de PDX humano STO#179 que expresa de manera anormalmente alta HER2, MRG002 tanto a 1 mg/kg como a 3 mg/kg mostró una actividad antitumoral significativa de una manera dependiente de la dosis, mientras que T-DM1 a 3 mg/kg no mostró una inhibición significativa del crecimiento tumoral. Todos los ratones portadores de tumor toleraron bien MRG002 y T-DM1.

**Efecto antitumoral de MRG002 en cáncer gástrico modelo de PDX STO#240**

STO#240 es un modelo de PDX de cáncer gástrico humano resistente a Herceptin®. Los resultados (Figura 14) mostraron que en el Día 83, la T/C (%) para los grupos de dosis de MRG002 fue de 20,70% (P<0,001) a 3 mg/kg y de 18,78% (P<0,001) a 10 mg/kg, mientras que sus correspondientes % ICT fueron de 79,30% y de 81,22%, respectivamente; la T/C (%) y el % ICT de T-DM1 a 10 mg/kg fueron de 40,96% (P<0,01) y de 59,04%, respectivamente.

Estos resultados demostraron que para el modelo de PDX humano STO#240 que expresa de manera anormalmente alta HER2, MRG002 tanto a 3 mg/kg como a 10 mg/kg mostró una actividad antitumoral significativa, mientras que T-DM1 a 10 mg/kg no mostró una inhibición significativa del crecimiento tumoral. Todos los ratones portadores de tumor toleraron bien MRG002 y T-DM1.

**Efecto antitumoral de MRG002 en cáncer gástrico modelo de PDX STO#410**

STO#410 es una Herceptin®Modelo PDX de cáncer gástrico humano resistente. Los resultados (Figura 15) mostraron que en el Día 38, la T/C (%) para los grupos de dosis de MRG002 fue de 39,94% (P<0,001) a 3 mg/kg y de 0% (P<0,001) a 10 mg/kg, mientras que sus correspondientes % ICT fueron de 60,06% y de 100%, respectivamente; la T/C (%) y el % ICT de T-DM1 a 10 mg/kg fueron de 108,79% (P>0,05) y de -8,79%, respectivamente.

Estos resultados demostraron que para el modelo de PDX humano STO#410 que expresa de manera anormalmente alta HER2, MRG002 mostró actividad antitumoral significativa tanto a 3 mg/kg como a 10 mg/kg, mientras que T-DM1 a 10 mg/kg no mostró inhibición en el crecimiento tumoral. Todos los ratones portadores de tumor toleraron bien MRG002 y T-DM1.

## Resumen

La actividad antitumoral de estos modelos se resume en la Tabla 7.

**Tabla 7: Eficacia *in vivo* de MRG002 (i.v., q3w x 4) en modelos de PDX positivos para HER2 de cáncer gástrico (STO) y de mama (BC).**

Número de modelo	Artículo de ensayo	Dosis	Fecha para el cálculo de T/C (%) y %ICT	T/C (%)	%ICT
		(mg/kg)			
BC#046	Vehículo	/	Día 63	100	0
	MRG002	1		45,07 (P<0,001)	54,93
		3		0,45 (P<0,001)	99,55
	T-DM1	3		6,56 (P<0,001)	93,44
BC#197	Vehículo	/	Día 69	100 0	
	MRG002	3		14,11 (P<0,001)	85,89
		10		2,26 (P<0,001)	97,74
	T-DM1	10		63,31 (P<0,001)	36,69
STO#041	Vehículo	/	Día 46	100	0
	MRG002	1		61,46 (P>0,05)	
		3		32,47 (P<0,001)	67,53
	T-DM1	3		83,66 (P>0,05)	16,34
STO#053	Vehículo	/	Día 45	100	0
	MRG002	3		47,75 (P<0,01)	52,25
		10		0,65 (P<0,001)	99,35
	T-DM1	10		19,43 (P<0,001)	80,57
STO#069	Vehículo	/	Día 40	100	0
	MRG002	1		70,78 (P>0,05)	29,22
		3		6,02 (P<0,001)	93,98
	T-DM1	3		90,03 (P>0,05)	9,97
STO#179	Vehículo	/	Día 59	100	0
	MRG002	1		35,20 (P<0,001)	64,80
		3		4,14 (P<0,001)	95,86
	T-DM1	3		92,56 (P>0,05)	7,44
STO#240	Vehículo	/	Día 83	100	0
	MRG002	3		2070 (P<0,001) 79,30	
		10		18,78 (P<0,001)	81,22
	T-DM1	10		40,96 (P<0,05)	59,04
STO#410	Vehículo	/	Día 38	100	0
	MRG002	3		39,94 (P<0,001)	
		10		0 (P<0,001)	100
	T-DM1	10		108,79 (P>0,05)	-8,79

Notas: "/" significa inaplicable; Volumen tumoral (VT) =  $1 \times w^2 / 2$ , donde l y w representan la longitud y la anchura de un tumor, respectivamente; volumen tumoral relativo (VTR) =  $V_f / V_0$ , donde  $V_0$  es el volumen tumoral medido antes del agrupamiento (es decir, Día 0) y  $V_f$  es el volumen tumoral medido en el último día del experimento; T/C(%) = (VTR del grupo de artículo de prueba/VTR del grupo de vehículo) × 100%; %ICT = (VT promedio del grupo de vehículo - VT

Número de modelo	Artículo de ensayo	Dosis (mg/kg)	Fecha para el cálculo de T/C (%) y %ICT	T/C (%)	%ICT
promedio del grupo de artículo de prueba)/VT promedio del grupo de artículo de prueba x 100%.					

Los ensayos de citotoxicidad *in vitro* mostraron que MRG002 es notablemente más potente que T-DM1 en la inhibición del crecimiento de células cancerosas en varias células de cáncer de mama y gástrico (Tabla 7).

5 Los resultados del estudio de eficacia *in vivo* mostraron que MRG002 inhibía significativamente el crecimiento tumoral en modelos de CDX y PDX de mama y gástrico y era bien tolerado por ratones portadores de tumores. Notablemente, MRG002 inhibió significativamente el crecimiento tumoral en tumores resistentes a Herceptin®, y en modelos de PDX resistentes a Kadcyly®.

Estos resultados demostraron que MRG002 muestra actividad antitumoral mejorada en comparación con los ADC disponibles actualmente *in vitro* e *in vivo*.

10 La invención se define por el alcance de las reivindicaciones.

**REIVINDICACIONES**

1. Un producto conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende:
  - un anticuerpo anti-HER2 que tiene más de 90% de fucosilación; en donde dicho anticuerpo anti-HER2 comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 4 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 8;
  - al menos una molécula de un fármaco anticanceroso, y
  - un conector que conecta el anticuerpo anti-HER2 y la al menos una molécula de dicho fármaco anticanceroso;
  - en donde el porcentaje de fucosilación se refiere a la razón porcentual de la cantidad molar de los glicanos fucosilados con respecto a la cantidad molar total de glicanos tanto fucosilados como no fucosilados.
2. El producto conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo anti-HER2 es un anticuerpo IgG.
3. El producto conjugado de anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde dicho anticuerpo anti-HER2 es un anticuerpo humanizado.
4. El producto conjugado de anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicho anticuerpo anti-HER2 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 9.
5. El producto conjugado de anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde dicho anticuerpo anti-HER2 tiene una afinidad de unión por CD16 que tiene un valor de constante de disociación en equilibrio (KD) mayor que aproximadamente  $2,5 \times 10^{-08}$  M;
  - preferiblemente, dicho CD16 es un CD16a 176Val humano, y en donde dicha KD es de aproximadamente  $6,9 \times 10^{-08}$  M a aproximadamente  $7,1 \times 10^{-08}$  M;
  - preferentemente, dicho CD16 es un CD16a 176Phe humano, y en donde dicha KD es de aproximadamente  $6,6 \times 10^{-07}$  M a aproximadamente  $6,9 \times 10^{-07}$  M.
6. El producto conjugado de anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que está caracterizado por uno o más de los siguientes:
  - (i) dicho anticuerpo anti-HER2 tiene menos de 8% de afucosilación; el porcentaje de afucosilación se refiere a la razón en porcentaje de la cantidad molar de los glicanos no fucosilados con respecto a la cantidad molar total de glicanos tanto fucosilados como no fucosilados;
  - (ii) dicho ADC comprende al menos tres moléculas de dicho fármaco anticanceroso por molécula de anticuerpo;
  - (iii) dicho fármaco anticanceroso es monometil auristatina E;
  - (iv) dicho conector es un conector escindible; preferiblemente, dicho conector comprende un conector dipeptídico de valina citrulina.
7. Una composición que comprende una pluralidad de productos conjugados de anticuerpo-fármaco, en donde dicho producto conjugado de anticuerpo-fármaco se define como en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
8. La composición de la reivindicación 7, en donde dicha composición comprende una razón fármaco/anticuerpo mayor que aproximadamente 3,5 moléculas de dicho fármaco anticanceroso por anticuerpo anti-HER2; preferiblemente, dicha composición comprende una razón fármaco/anticuerpo de aproximadamente 3,8 moléculas de dicho fármaco anticanceroso por anticuerpo anti-HER2.
9. Un producto conjugado de anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en el tratamiento de un mamífero que tiene un cáncer que expresa HER2.
10. El producto conjugado de anticuerpo-fármaco para su uso según la reivindicación 9, en donde dicho mamífero es un ser humano.
11. El producto conjugado de anticuerpo-fármaco para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 9-10, en donde dicho cáncer que expresa HER2 es un cáncer de mama, cáncer gástrico o cáncer refractario.
12. El producto conjugado de anticuerpo-fármaco para su uso según la reivindicación 11, en donde dicho cáncer refractario es un cáncer resistente a trastuzumab o cáncer resistente a T-DM1.

- 5 13. El producto conjugado de anticuerpo-fármaco para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 9-12, en donde dicho ADC tiene actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) que conduce a de aproximadamente 0% a aproximadamente 30% de lisis celular;  
preferiblemente, dicho ADC tiene actividad ADCC que conduce a una lisis celular de aproximadamente 13,9% a aproximadamente 15,7%.
14. El producto conjugado de anticuerpo-fármaco para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 9-13, en donde dicho ADC se administra a una dosis de aproximadamente 0,6 mg a aproximadamente 4 mg de dicho ADC por kg de peso corporal de dicho mamífero.
- 10 15. El producto conjugado de anticuerpo-fármaco para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 9-14, que comprende adicionalmente la administración de uno o más agentes anticancerosos adicionales;  
preferiblemente, los uno o más agentes anticancerosos adicionales se seleccionan entre un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-CTLA4 y/o un anticuerpo anti-TIGIT.

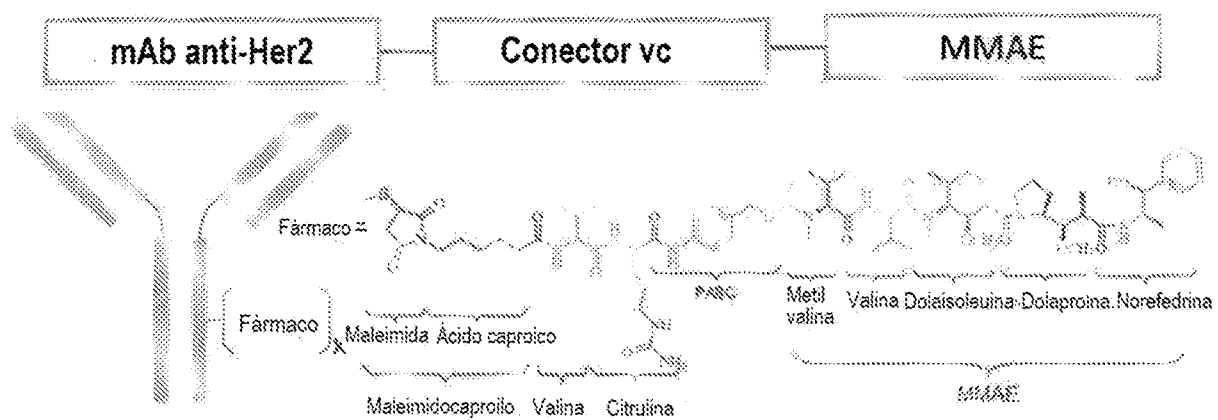


FIG. 1

Tipo de Glicano	Estructura
G0F-GlcNAc	
G0	
G0F	
Man5	
G1	
G1F	
G2F	

- ◆ Manosa
- GlcNAc
- ◇ Galactosa
- ✱ Fucosa

FIG. 2A

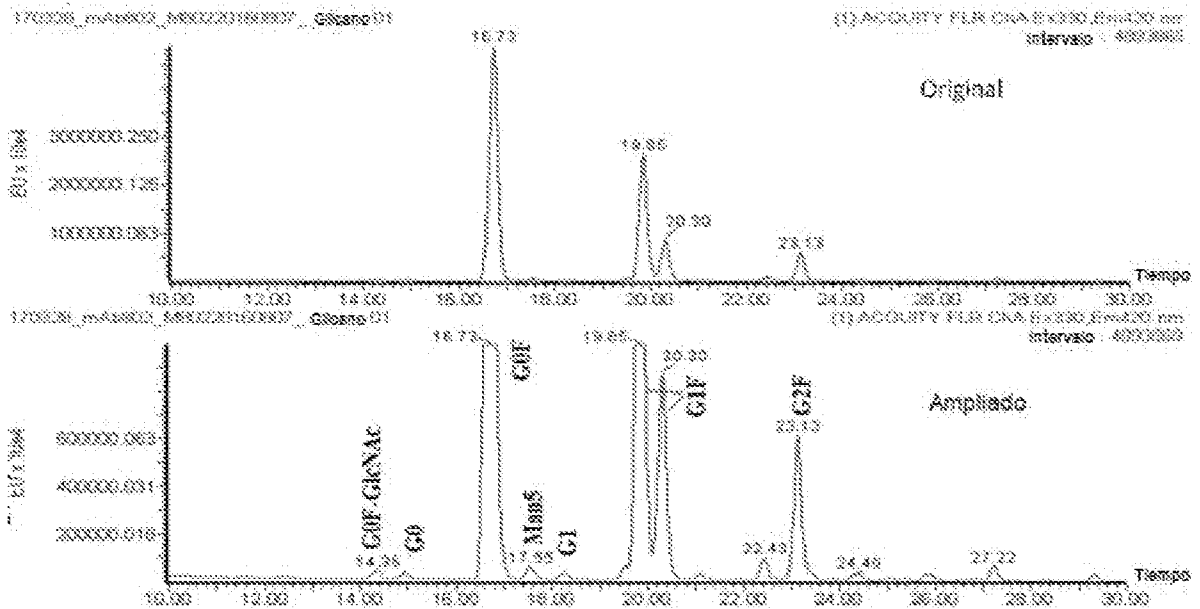


FIG. 2B

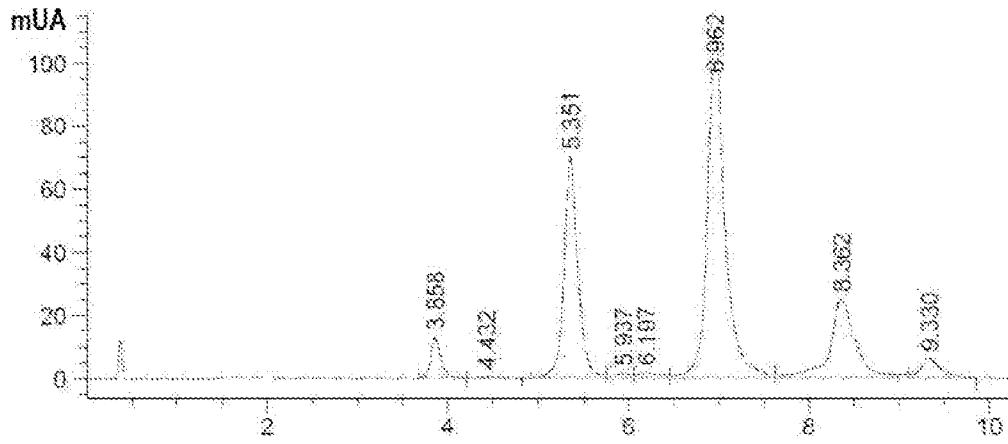
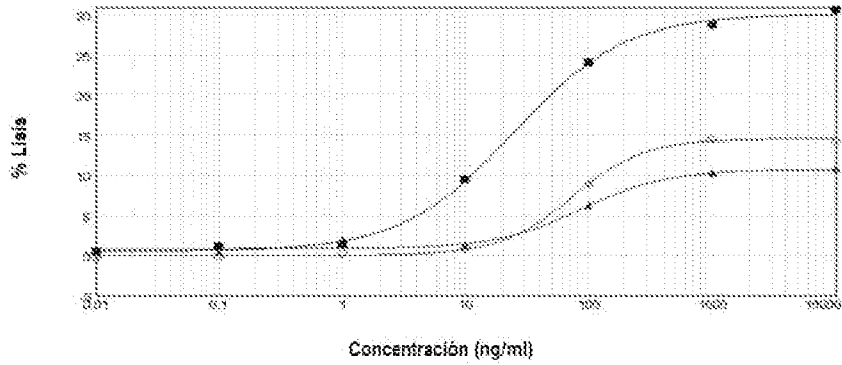
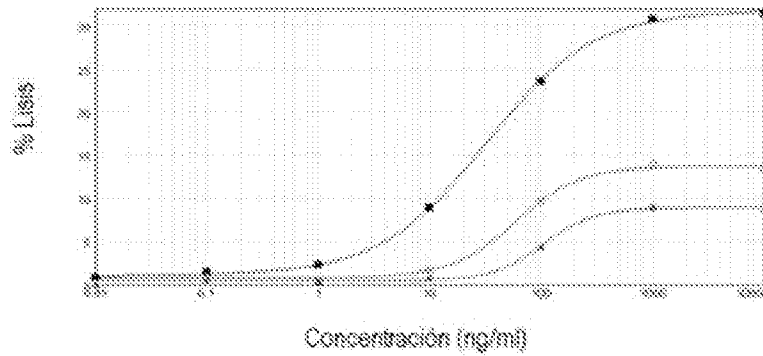


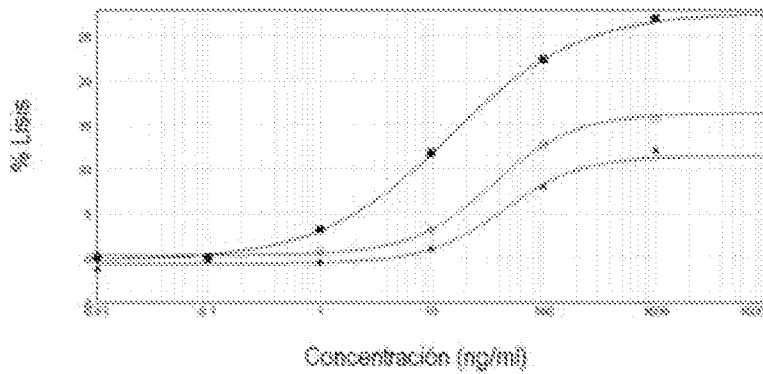
FIG.3



x Lisis Células Diana vs. Conc.) Pexo: Fijo  
 o Lisis Células Diana vs. Conc.) Pexo: Fijo  
 \* Lisis Células Diana vs. Conc.) Pexo: Fijo



x Lisis Células Diana vs. Conc.) Pexo: Fijo  
 o Lisis Células Diana vs. Conc.) Pexo: Fijo  
 \* Lisis Células Diana vs. Conc.) Pexo: Fijo



x Lisis Células Diana vs. Conc.) Pexo: Fijo  
 o Lisis Células Diana vs. Conc.) Pexo: Fijo  
 \* Lisis Células Diana vs. Conc.) Pexo: Fijo

FIG. 4

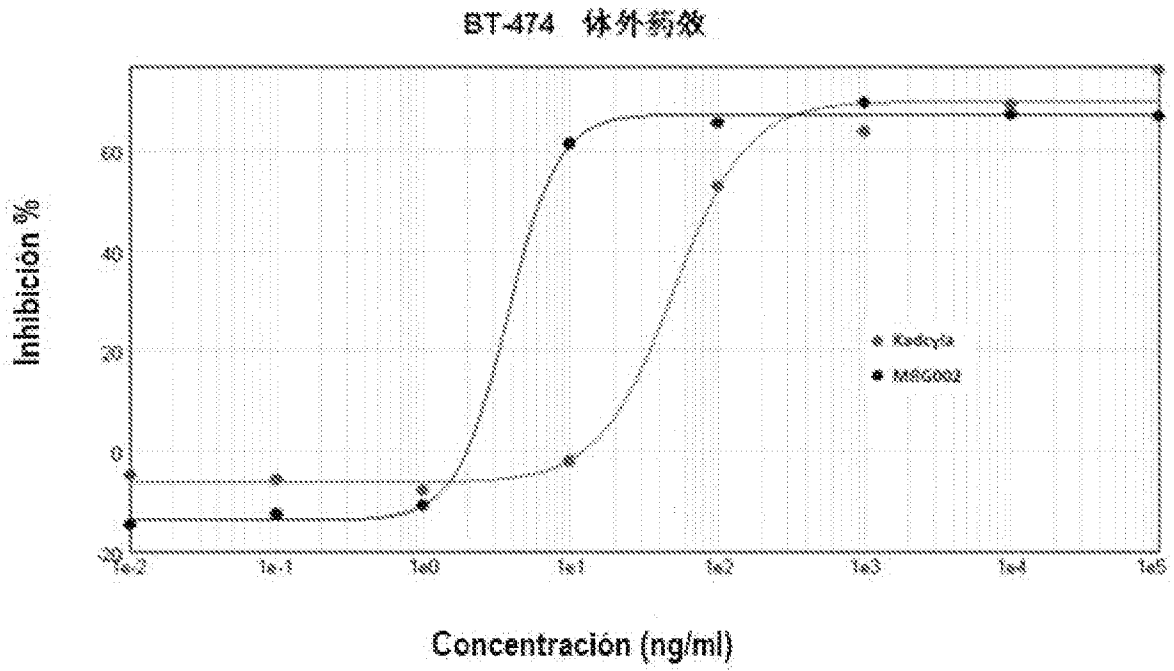


FIG.5

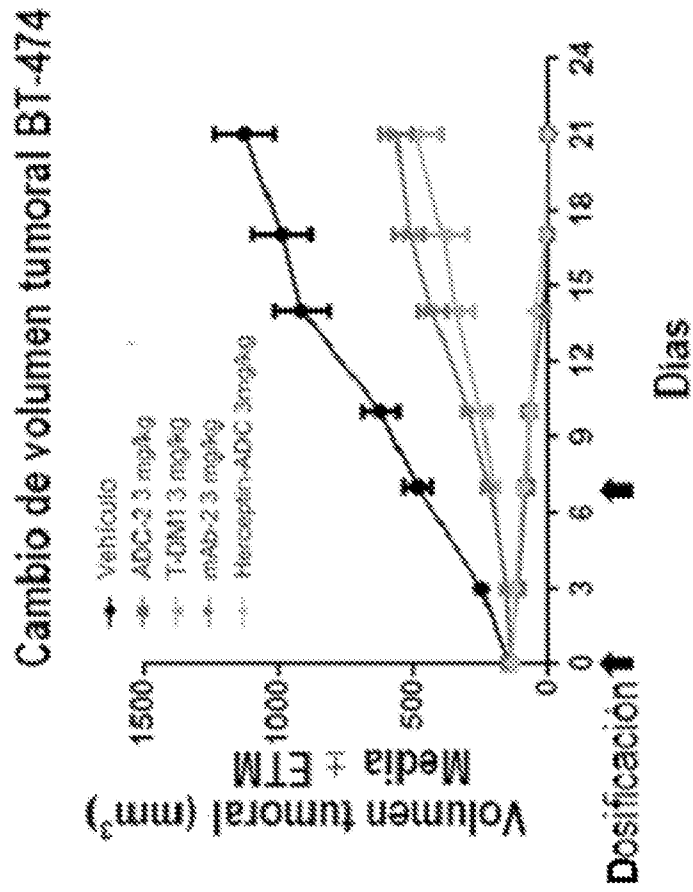
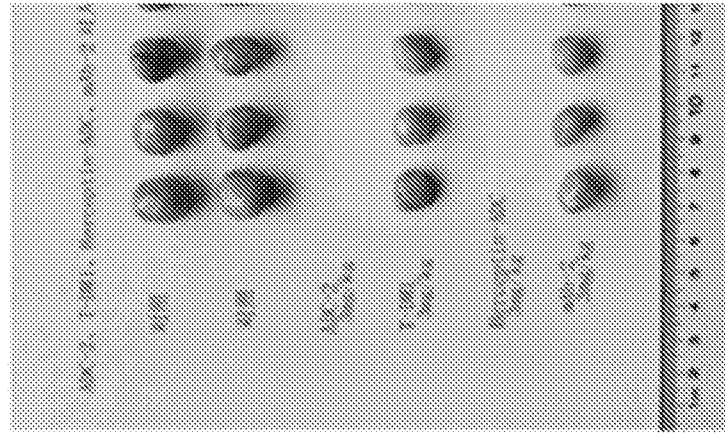


FIG. 6

Modelo Tumor Xenoinjerto

Grupo	Nº de animales	Tratamiento	Día 0	Día 3	Día 6	Día 9	Día 12	Día 15	Día 18	Día 21
Grupo 1	5	Vehicle	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Grupo 2	5	AEC-2 3 mg/kg	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Grupo 3	5	T-DM1 3 mg/kg	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Grupo 4	5	mAb-2 3 mg/kg	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Grupo 5	5	Herceptin-ADC 3 mg/kg	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

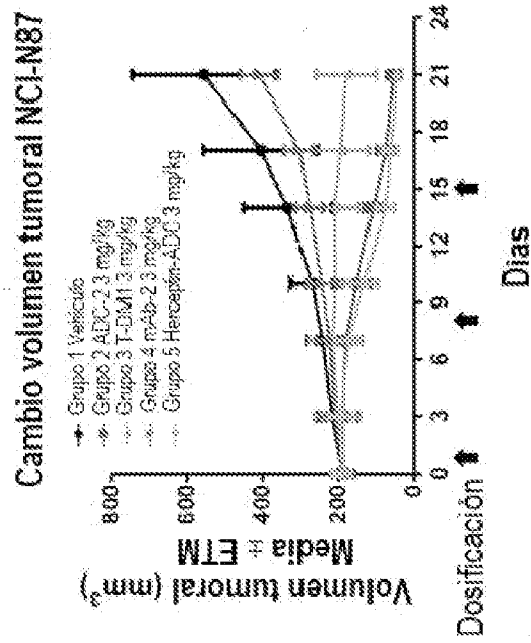


FIG. 7

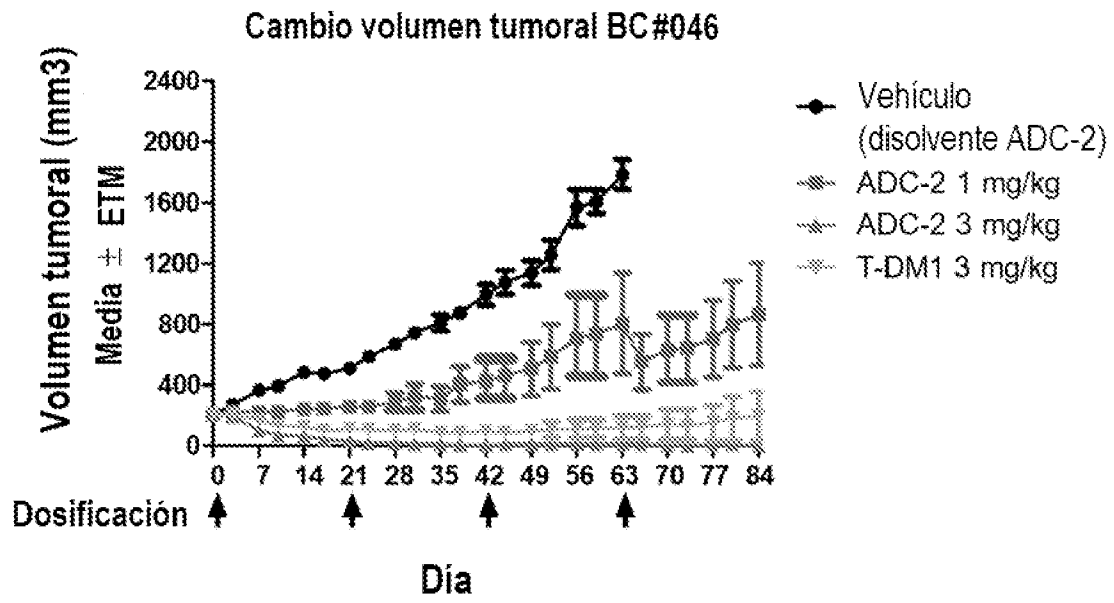


FIG. 8

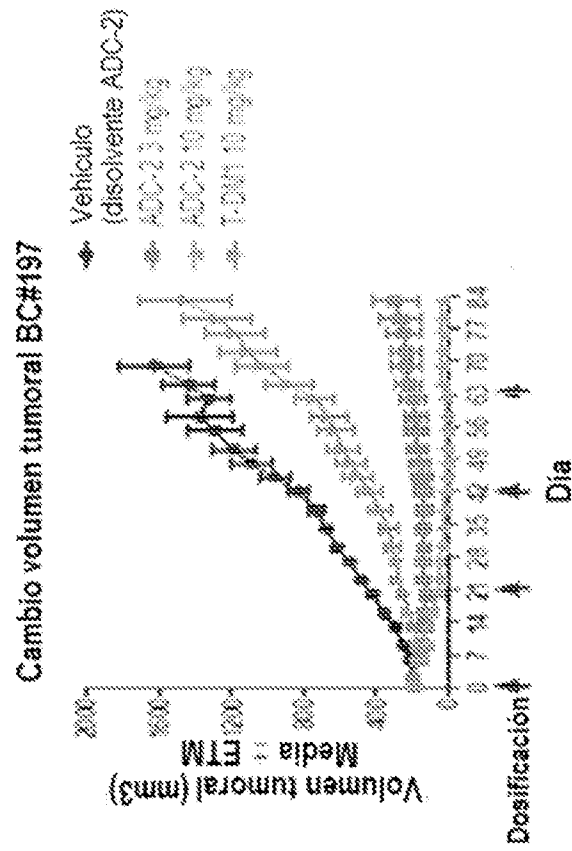
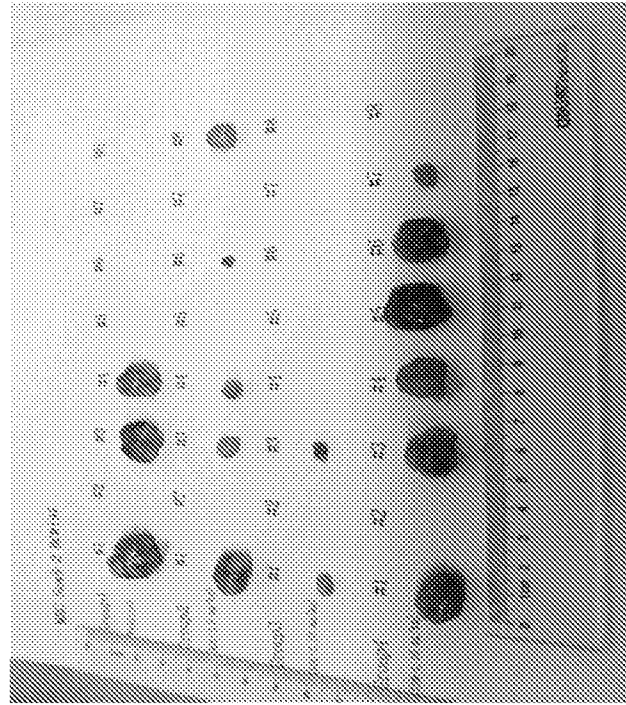


FIG. 9

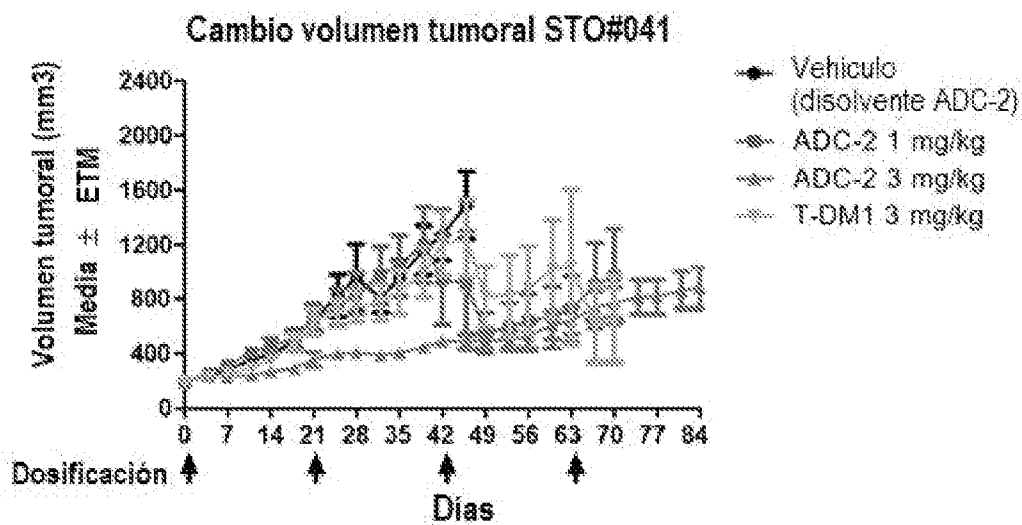


FIG. 10

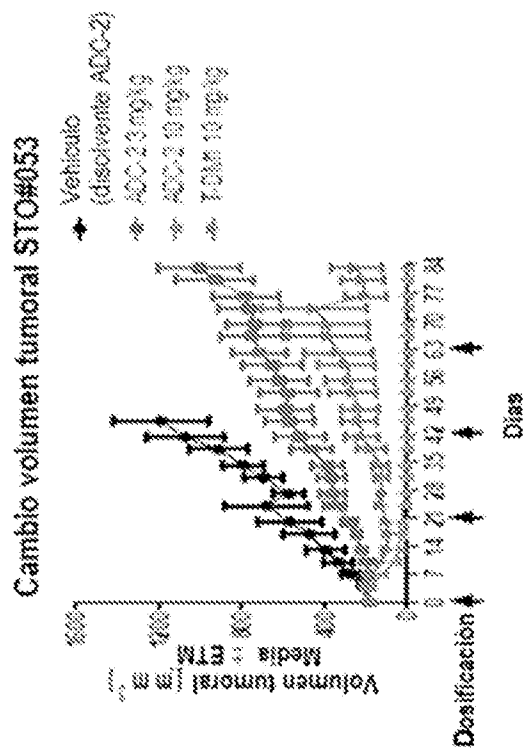
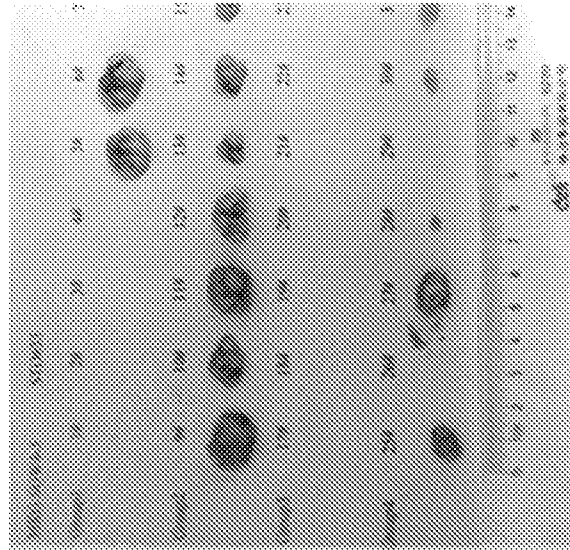


FIG. 11

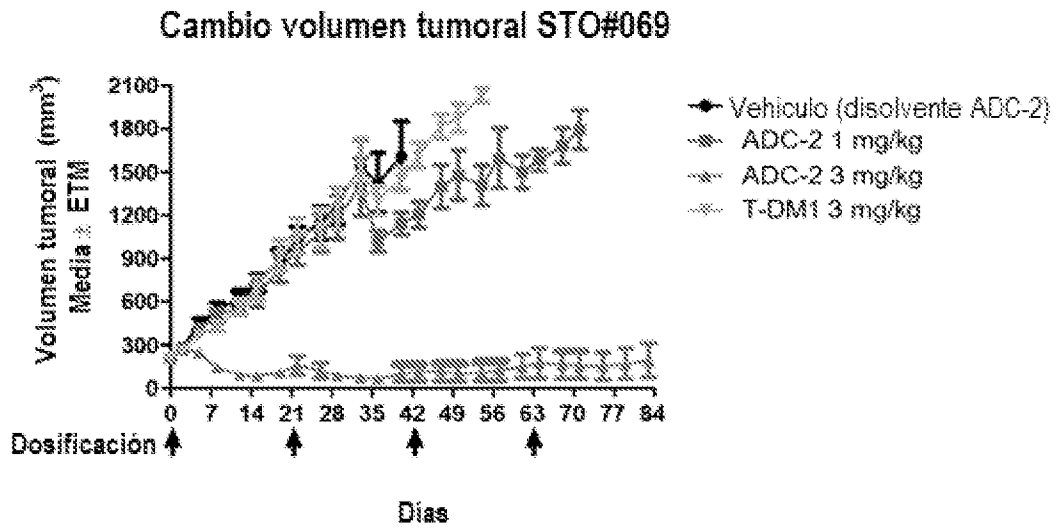


FIG.  
12

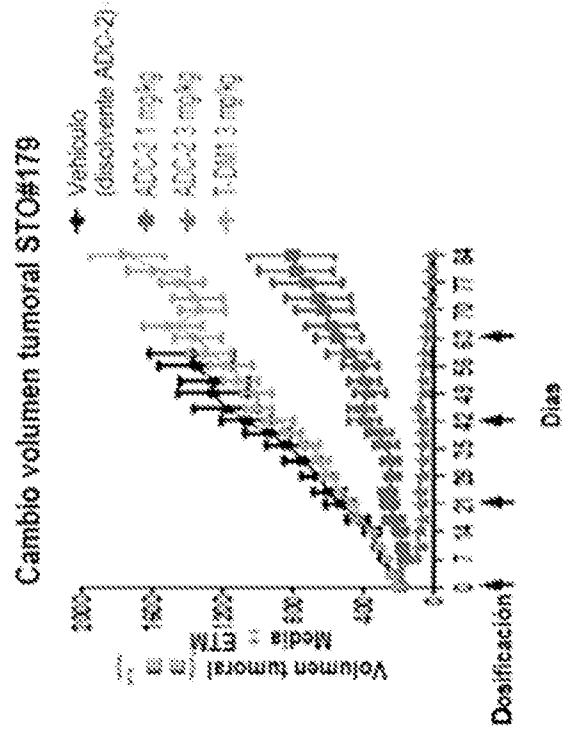
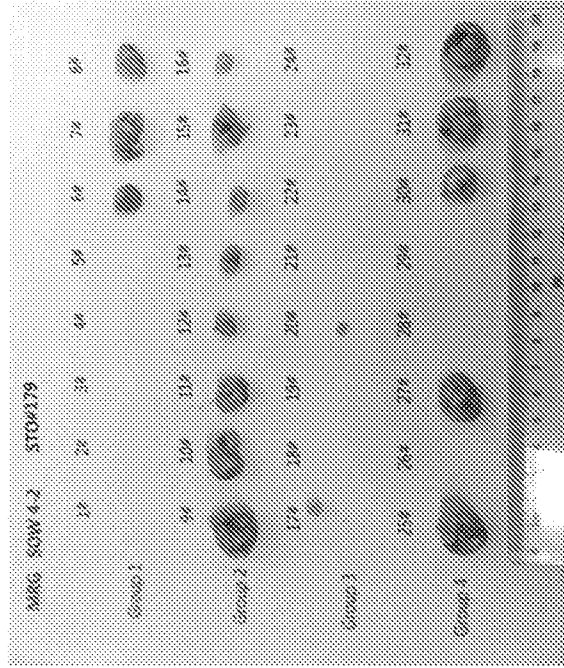


FIG. 13

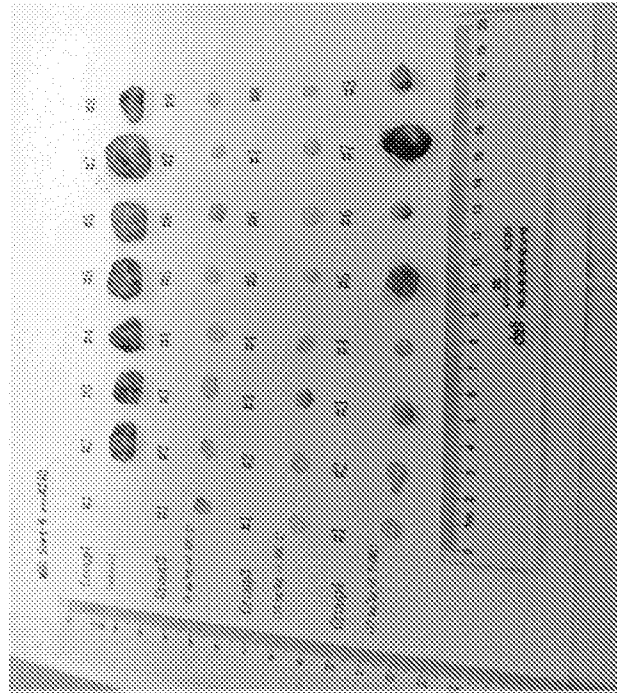
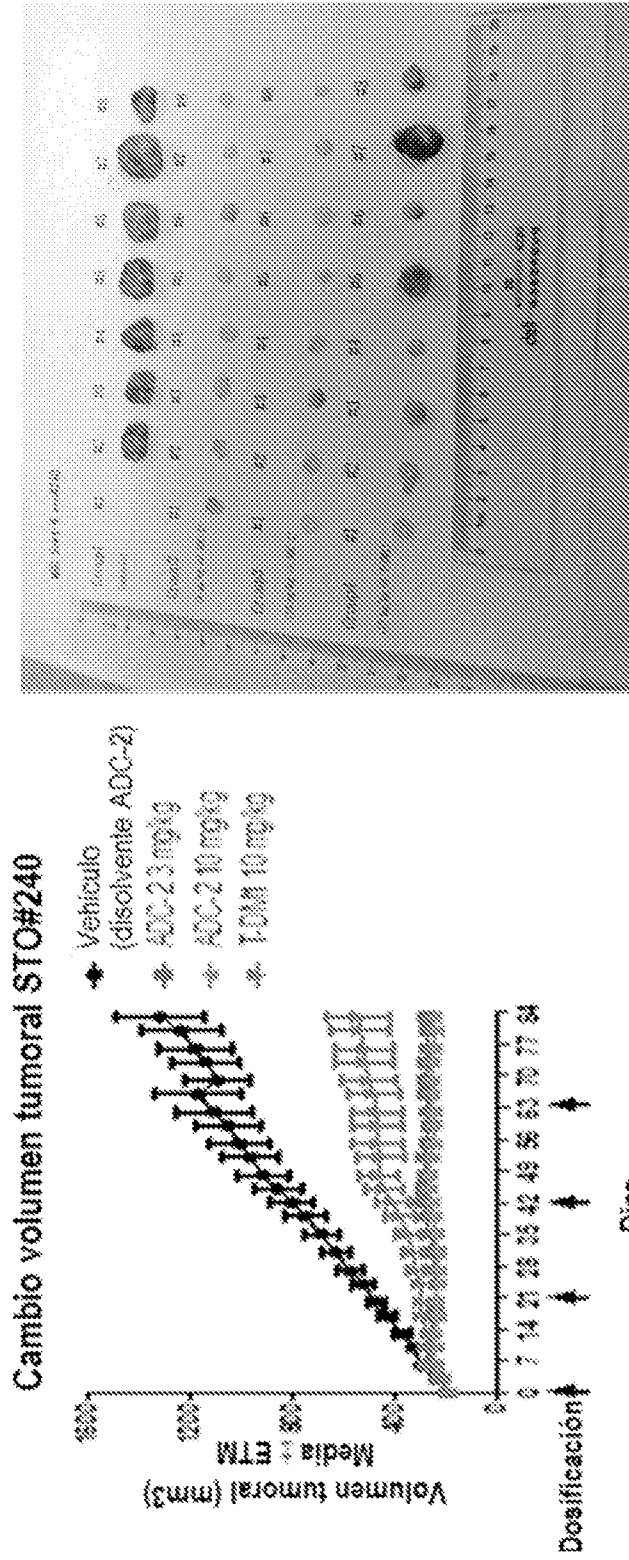


FIG. 14

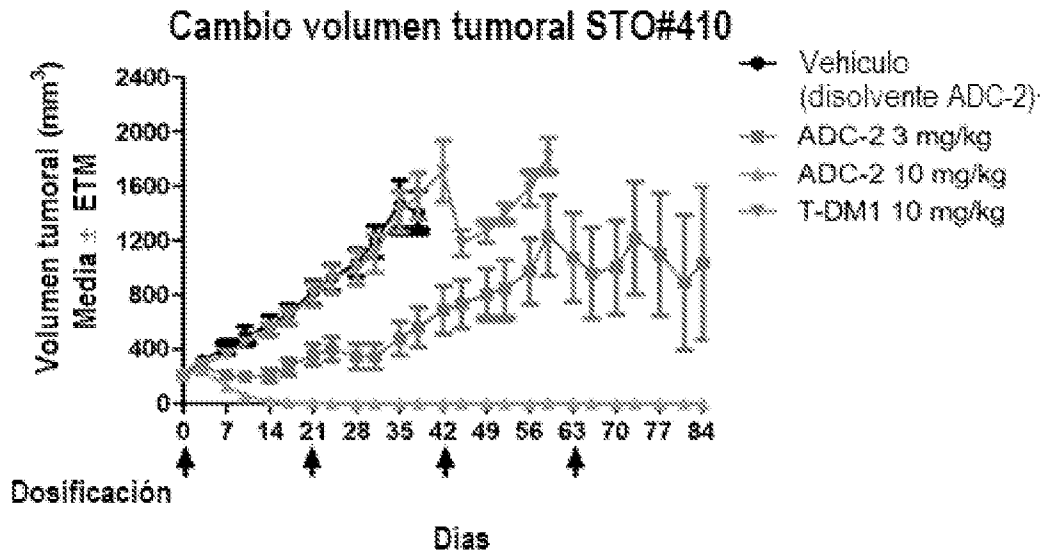


FIG. 15